

Universidad Politécnica de Cartagena
Departamento de Producción Vegetal

Utilización de aguas regeneradas para el riego de dos especies de la familia de las mirtáceas (*Myrtus communis* L. y *Eugenia myrtifolia* L.). Respuesta morfológica, fisiológica y bioquímica a distintos niveles de salinidad.

José Ramón Acosta Motos

2014



Universidad Politécnica de Cartagena
Departamento de Producción Vegetal

Utilización de aguas regeneradas para el riego de dos especies de la familia de las mirtáceas (*Myrtus communis* L. y *Eugenia myrtifolia* L.). Respuesta morfológica, fisiológica y bioquímica a distintos niveles de salinidad.

José Ramón Acosta Motos

Directora: M^a Jesús Sánchez Blanco

Codirector: José Antonio Hernández Cortés

2014

Reconocimientos:

D. José Ramón Acosta Motos, Licenciado en Biología, durante el tiempo de realización de la Tesis Doctoral, ha disfrutado de una Beca FPI (Formación de Personal Investigador) BES-2009-016963 concedida por el MCINN (Ministerio de Ciencia e Innovación).

Este trabajo forma parte del conjunto de actividades realizadas en el Departamento de Riego del CEBAS (CSIC) y ha sido financiado por los siguientes proyectos:

1.- Título del proyecto: Establecimiento del nivel de tolerancia a la salinidad mediante el estudio de las relaciones hídricas de plantas mediterráneas tipo ornamental. CICYT (AGL2008-05258-CO2-01).

Entidad financiadora: MICINN

Entidad participante: CEBAS (CSIC)

Duración: 2008 - 2011

Investigadora principal: Dra. M^a Jesús Sánchez-Blanco

2.- Título del proyecto: Gestión del riego con aguas marginales en la producción viverística de plantas ornamentales y en el mantenimiento del paisaje vegetal urbano CICYT (AGL 2011-30022-CO2-01-02).

Entidad financiadora: MICINN

Entidad participante: CEBAS (CSIC) -UPCT

Duración: 2012 - 2014

Investigadora principal: Dra. M^a Jesús Sánchez-Blanco.

3.- Título del proyecto: Optimización de la gestión de aguas residuales regeneradas con distintos niveles de salinidad mediante el uso de plantas micorrizadas con fines ornamentales adaptadas a clima mediterráneo. Proyecto Séneca (15356/PI/10).

Entidad financiadora: Fundación Séneca. Murcia

Entidades participantes: CEBAS-CSIC y ETSIA-UPCT

Duración: 2011 - 2013

Investigadora principal: Dra. M^a Jesús Sánchez-Blanco.

Durante el período de realización de la Tesis Doctoral se han publicado resultados en:

Revistas científicas listadas en el JCR:

Acosta-Motos, JR., Álvarez, S., Hernández, JA., Sánchez-Blanco, MJ. 2014. Reclaimed Water for Irrigation of *Myrtus communis* L. Plants: Morphological and Physiological Response to Different Levels of Salinity. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, Paper No: 84 / 14 (Aceptado).

Acosta-Motos, JR., Álvarez, S., Barba-Espín, G., Hernández, JA., Sánchez-Blanco, MJ. 2014. Effects of irrigation with regenerated waste-water from different sources on the water relations, mineral content and antioxidative metabolism of *Myrtus communis* L. plants. (en revisión).

Revistas científicas no listadas en el JCR:

Álvarez, S., Bañón, S., **Acosta-Motos, JR.,** Sánchez-Blanco, MJ. 2012. Crecimiento, relaciones hídricas y parámetros ornamentales de plantas de callistemon con bajas disponibilidades hídricas y regadas con agua salina. *Actas de Horticultura* 60: 536–540. ISBN 978-84-615-7861-0. Depósito Legal: AL-192-2012

Álvarez, S., Castillo, M., **Acosta-Motos, JR.,** Navarro, A., Sánchez-Blanco, MJ. 2012. Photosynthetic response, biomass distribution and water status changes in *Rhamnus alaternus* plants during drought. *Acta Horticulturae*, 937: 853-860.

Congresos:

Castillo, M., Broeto, F., Rodríguez, P., **Acosta-Motos, JR.,** Sánchez-Blanco, MJ. 2009. Biomasa, conductividad hidráulica y crecimiento del tallo de planta de lentisco regada con agua de distintos niveles de salinidad. XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV); XI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Zaragoza (España).

Álvarez, S., Castillo, M., **Acosta-Motos, JR.,** Navarro, A., Sánchez-Blanco, MJ. 2010. Photosynthetic Response, Biomasa Distribution and Water Status Changes in *Rhamnus alaternus* Plants during Drought. XXVIII Congreso Internacional de Horticultura de Lisboa, - International Horticultural Congress - Lisboa (Portugal).

Acosta-Motos, JR., Castillo, M., Álvarez, S., Bañón, S., Salcedo, F., Gómez-Bellot, MJ., Sánchez-Blanco, MJ. 2010. Efecto del riego con aguas regeneradas en el desarrollo, composición mineral y estado hídrico de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. X Simposium Hispano-Portugués de Relaciones Hídricas en las Plantas. Cartagena, Murcia (España).

Acosta-Motos, JR., Barba-Espín, G., Broetto, F., Gómez-Bellot, MJ., Castillo, M., Álvarez, S., Bañón, S., Sánchez-Blanco MJ. 2011. Reutilización de aguas regeneradas para el riego de plantas de *Myrtus communis*: Respuesta morfológica y fisiológica a los distintos niveles de salinidad. XIX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. XII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Castellón (España).

Castillo, M., Broetto, F., Gómez-Bellot, MJ., **Acosta-Motos, JR.**, Álvarez, S., Bañón, S., Sánchez-Blanco, MJ. 2011. Modificaciones morfológicas y acumulación de iones en tres especies mediterráneas con distinta tolerancia al déficit hídrico y a la salinidad. XIX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. XII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal Castellón (España).

Álvarez, S., **Acosta-Motos, JR.**, Bañón S., Sánchez-Blanco MJ. 2011. Efecto del riego deficitario moderado y severo en la calidad y eficiencia en el uso del agua de plantas de callistemon en condiciones de vivero. V Jornadas Ibéricas de Horticultura Ornamental. Faro (Portugal).

Gómez-Bellot, MJ., Nortes, PA., Gonçalves, KS., **Acosta-Motos, JR.**, Ortuño, MF., Sánchez-Blanco, MJ. 2012. Evaluación de la respuesta fotosintética e hídrica durante el día y concentración iónica de plantas de evónimo regadas con agua regenerada con altos niveles de salinidad. XI Simposio Hispano-Portugués de Relaciones Hídricas en las Plantas. Sevilla (España).

Gómez-Bellot, MJ., Castillo, M., Álvarez, S., **Acosta-Motos, JR.**, Alarcón, JJ., Ortuño, MF., Bañón, S., Sánchez-Blanco, MJ. 2012. Effect of different quality irrigation water on the growth, mineral concentration and physiological parameters of *Viburnum tinus* plants. II Symposium on Horticulture in Europe. Angers (France).

Acosta-Motos, JR., Álvarez, S., López-Climent, MF., Manzí, M., Gómez-Cadenas, A., Sánchez-Blanco, MJ. 2013. Water status and biochemical changes in *Myrtus communis* plants to cope with saline conditions. XX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal XIII Congreso Luso-Español de Fisiología Vegetal. Lisboa (Portugal).

Acosta-Motos, JR., Díaz-Vivancos, JR., Álvarez, S., Fernández, N., Sánchez-Blanco, MJ., Hernández, JA. 2014. Mechanisms of tolerance developed by *Myrtus communis* L. and *Eugenia myrtifolia* L. plants at several salinity levels. VI Jornadas Ibéricas de Horticultura Ornamental. Valencia (España)

Agradecimientos:

Quiero agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad (MEC), anteriormente Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN), por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral gracias a la concesión de una beca FPI.

Al Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) en Murcia y a la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (ETSIA-UPCT) en Cartagena, por poner a mi disposición sus instalaciones y servicios.

A mi Directora María Jesús Sánchez Blanco por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación, por su implicación, apoyo constante e interés en la realización de esta Memoria.

A mi Codirector José Antonio Hernández Cortés por su esfuerzo e implicación para la realización de esta Tesis. También agradecerle su trato personal hacia mí y su sentido del humor.

A mi Tutor Sebastián del Pilar Bañón Arias por su apoyo, consejos y ayuda en las tareas de gestión.

A todo el Personal Científico del Departamento de Riego del CEBAS por su inestimable ayuda y apoyo durante estos años de realización de la Tesis. Destacar la labor realizada por las técnicas María Dolores (Lola) y M^a Fuensanta (Mari).

A todo el personal Científico-Técnico del Departamento de Mejora Vegetal del CEBAS y a todo el personal Científico-Técnico del Departamento de Biología del estrés y Patología Vegetal del CEBAS, por toda su ayuda y apoyo.

A todo el Grupo de Investigación del Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universitat Jaume I de Castellón, por toda la ayuda prestada y por el trato personal recibido.

A todas las personas que he tenido el gusto de conocer a lo largo de estos años y me han mostrado su afecto y ayuda.

A mis amigos, ya que sin vuestro apoyo constante, vuestras risas, consejos y buenos momentos que hemos pasado juntos, la escritura de esta Tesis habría sido más difícil. A Borja, a Cristina e Isabel María, a Noelia y Nando, a Irene y Antonio, a Gema y Noé, a Nati, Felipe, Jesús y Maiko y a Mari del personal de limpieza. Por supuesto, el agradecimiento se amplía a todas vuestras familias. A los que pueda estar olvidando, os pido perdón de antemano.

A mi familia

A mis padres y hermanos por vuestro apoyo y consejos.

A mi abuela (Lela) porque siempre confió en mí

Resumen y Abstract

Resumen

La investigación realizada evalúa la posibilidad de la reutilización de aguas residuales de distinta calidad, que previamente han sido depuradas (ARD), para el riego de dos especies de la familia de las Mirtáceas (*Myrtus communis* L. y *Eugenia myrtifolia* L.) empleadas con usos y fines ornamentales. Las aguas utilizadas en este trabajo tienen una composición que varía estacionalmente ya que presentan orígenes distintos, aunque tienen en común que son aguas más o menos salinas: ARD1 (CE = 1,7 dS/m), ARD2 (CE = 3,5 dS/m), ARD3 (CE = 8 dS/m). Por tanto, es necesario establecer el nivel de tolerancia de las especies estudiadas a los elementos químicos potencialmente fitotóxicos presentes en este tipo de aguas, tales como el cloro, sodio y boro. También es importante estudiar los beneficios que las ARDs pueden aportar a la fisiología de la planta. Tanto *E. myrtifolia* como *M. communis* son especies adecuadas para utilizarse en estudios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en respuesta al riego con aguas de baja calidad. Los resultados obtenidos establecen que el uso de ARDs provoca efectos diferentes en las plantas, dependiendo del origen y calidad de dichas aguas, especialmente en lo referente a la capacidad de recuperación con respecto a los niveles de salinidad aplicados. También las respuestas de las plantas son distintas en función del drenaje aplicado. Los solutos presentes en las aguas regeneradas minimizan los efectos tóxicos producidos por las sales. Los resultados obtenidos también han permitido identificar las respuestas y mecanismos utilizados por dichas especies para paliar los efectos negativos de la aplicación de distintos niveles de salinidad (0,8 dS/m; 4 dS/m; 8 dS/m; 12 dS/m), tanto a corto plazo (días) como a largo plazo (4 meses), analizando los efectos osmóticos y tóxicos producidos por las sales. Con tal objeto, se ha estudiado el comportamiento hídrico, nutricional y bioquímico de las plantas. También se ha prestado atención a la capacidad de recuperación después de las alteraciones sufridas durante la fase de salinización, observándose en ambas especies que el cambio brusco frente a las nuevas condiciones de riego, aun utilizando agua de buena calidad y lavando exhaustivamente las sales del sustrato, supone para las plantas una nueva situación de estrés. Todo ello permite identificar las distintas estrategias utilizadas por las plantas: acumulación selectiva o exclusión de iones, compartimentación de iones a nivel celular y de planta completa, síntesis de iones compatibles (ajuste osmótico), cambios en la eficiencia fotosintética y en la fluorescencia de clorofilas, cambios anatómicos y en la temperatura de las hojas, alteración en la estructura de las membranas, así como alteraciones en los perfiles hormonales.

Con respecto a algunas diferencias interespecíficas, las plantas de mirto acumulan el ion Na^+ en la raíz, restringiendo su translocación a la parte aérea y limitando la absorción del ion Cl^- por la raíz, pero no su transporte a las hojas. En contraste, las plantas de eugenia limitan la absorción del ion Na^+ y tienden a acumular más el ion Cl^- en la raíz, dificultando su transporte a la parte aérea. También merecen destacarse los cambios anatómicos que se producen en las plantas de eugenia, consistentes en un aumento en el porcentaje de parénquima en empalizada (zona que contiene los cloroplastos) y de los espacios intercelulares, mientras que tiene lugar una disminución del parénquima esponjoso, para conseguir una menor resistencia que facilite la llegada del CO_2 a los cloroplastos, en una situación en la que su entrada a la hoja se encuentra limitada debida al cierre estomático. En el caso del mirto los cambios anatómicos observados no afectan al parénquima en empalizada mientras que se observa una disminución en el porcentaje de células del parénquima esponjoso y un aumento en los espacios intercelulares. Por otra parte la eficiencia fotosintética (*quenching* fotoquímico), después de un mes de riego con aguas salinas (NaCl), fue mayor en eugenia mientras que sus mecanismos de eliminación de exceso de energía luminosa en forma de calor (*quenching* no fotoquímico) mostraron valores más bajos. Las respuestas observadas en los parámetros de fluorescencia fueron inversas en el caso del mirto. Por último como respuesta al estrés oxidativo, las plantas de mirto presentan mayores niveles de actividad catalasa, mientras que en eugenia se observan mayores niveles constitutivos de las actividades SOD, POX y MDHAR.

Los resultados obtenidos pueden ser muy valiosos en estudios interdisciplinarios para estimar el significado ecológico del estrés salino en determinadas especies vegetales.

Abstract

This Thesis evaluates the possibility of reuse of wastewater of varying quality, that has previously been purified (RW, reclaimed water), for the irrigation of two plant species from the Myrtaceae family (*Myrtus communis* L. and *Eugenia myrtifolia* L), employed for ornamental purposes. The different waters used have a composition that varies seasonally as they derive from different origins. However, they have in common some level of salinity: RW1 (CE = 1.7 dS/m), RW2 (CE = 3.5 dS/m), RW3 (CE = 8 dS/m). Thus, it is necessary to establish the level of tolerance of the species studied to potentially phytotoxic chemical elements present in these types of waters, such as chlorine, sodium and boron. It is also important to consider the benefits that such waters can contribute to the physiology of these plants. Both *E. myrtifolia* as *M. communis* are appropriate species for use in morphological, physiological and biochemical studies describing their response to irrigation with low quality water. The results establish that the use of RW causes different effects on plants, depending on the origin and quality of wastewater, especially with regard to the recovery from the salinity levels applied. In addition, the plant responses will differ depending on the possibility of drainage application. Solutes present in RW minimize toxic effects of salts. The results also have identified responses and mechanisms used by these species to mitigate the negative effects of applying different levels of salinity (0.8 dS/m; 4 dS/m; 8 dS/m; 12 dS/m), both in the short term (days) and at long term (4 months), analyzing the osmotic and toxic effects of salts. For this purpose, the nutritional and the biochemical behavior of plants was studied. The response of the plants after recovery from the salinization periods has also been taken into account. In both plant species, the abrupt change from the new irrigation conditions, even using good quality water, brought about a new stress situation. This allows us to identify different strategies used by both plant species: selective accumulation or exclusion of ions, ion compartmentalization at the cellular level and whole plant, synthesis of compatible solutes (osmotic adjustment), changes in photosynthetic efficiency and chlorophyll fluorescence, anatomical and leaf temperature changes, alteration in the structure of the membranes, as well as alterations in hormone profiles.

Regarding some interspecific differences, myrtle plants accumulate Na^+ ion in the root, restricting its translocation to the aerial part and limiting the Cl^- ion uptake by the roots, but with no transport to the leaves. In contrast, eugenia plants limited Na^+ uptake and accumulated more Cl^- in the root, preventing its transport to

the shoots. Also, it is worth mentioning the anatomical changes that occurred in eugenia plants, consisting of an increase in the percentage of palisade parenchyma (the region containing the most number of chloroplasts) and intercellular spaces, while there was a decrease in the spongy parenchyma, that can facilitate CO₂ arrival to the chloroplasts, in a situation where its entry to the leaf can be limited due to stomatal closure. In myrtle plants, anatomical changes observed did not affect the palisade parenchyma, but a decrease in the percentage of spongy parenchyma cells was observed as well as an increase in intercellular space. Moreover, photosynthetic efficiency (photochemical quenching parameters), after a month of irrigation with saline water, was higher in eugenia while their mechanisms of safe removal of excess light energy (non-photochemical quenching) showed lower values, whereas an inverse response in the fluorescence parameters was observed in myrtle plants. Finally, in response to oxidative stress, myrtle plants exhibited higher levels of catalase activity, while eugenia plants displayed higher basal levels of SOD, POX and MDHAR activities.

The results can be very valuable in interdisciplinary studies to estimate the ecological significance of salt stress in ornamental plant species.

Índice

INDICE

	Pág
1.- Justificación y objetivo.....	1
2.- Antecedentes.....	5
2.1.- Introducción.....	7
2.2.- Familia Myrtaceae.....	8
2.3.- Especies estudiadas.....	9
2.3.1.- <i>Myrtus communis</i> L.....	9
2.3.2.- <i>Eugenia myrtifolia</i> L.....	14
2.4.- Otras especies con valor ornamental dentro de la familia de las mirtáceas.....	16
2.5.- Aguas residuales depuradas (aguas regeneradas).....	16
2.5.1.- Aspectos generales.....	16
2.5.2.- Utilización de aguas residuales tratadas para el riego de especies con fines ornamentales.....	18
2.6.- Efectos generales de la salinidad sobre las plantas.....	22
2.7.- Tolerancia de las plantas a la salinidad: Mecanismos a corto y largo plazo.....	24
3.- Material y métodos.....	27
3.1.- Material vegetal y condiciones experimentales.....	29
3.2.- Tratamientos.....	30

3.3.- Análisis de aguas.....	31
3.4.- Análisis de sustrato.....	32
3.5.- Análisis del material vegetal.....	32
3.5.1.- Crecimiento y desarrollo.....	32
3.5.1.1.- Biomasa.....	32
3.5.1.2.- Altura y tasa de crecimiento.....	33
3.5.2.- Determinación de solutos inorgánicos.....	34
3.5.2.1.- Contenido mineral.....	34
3.5.2.2.- Tasa de absorción de iones.....	35
3.5.3.- Color, contenido relativo de clorofila (CRC) y clorofila total..	36
3.5.4.- Relaciones hídricas.....	38
3.5.4.1.- Potencial hídrico y sus componentes.....	38
3.5.4.2.- Potencial osmótico saturado.....	39
3.5.4.3.- Análisis de Curvas P-V.....	39
3.5.4.4.- Conductividad hidráulica.....	41
3.5.4.5.- Contenido relativo de agua.....	42
3.5.4.6.- Determinación de L-prolina.....	43
3.5.5.- Intercambio gaseoso.....	44
3.5.5.1.- Fotosíntesis y conductancia.....	44
3.5.5.2.- Eficiencia fotosintética del fotosistema II.....	45

3.5.5.3.- Medida de fluorescencia de clorofilas.....	45
3.5.6.- Microscopia óptica de campo claro.....	47
3.5.6.1.- Inclusión de muestras en resina Spurr.....	47
3.5.7.- Termografía.....	48
3.5.8.- Metabolismo antioxidativo.....	48
3.5.8.1.- Parámetros de estrés oxidativo.....	48
3.5.8.1.1.- Pérdida de electrolitos.....	48
3.5.8.1.2.- Peroxidación de lípidos.....	49
3.5.8.2.- Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	51
3.5.8.2.1.- Detección histoquímica de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	51
3.5.8.2.2.- Detección de radicales superóxido (O ₂ ⁻).....	51
3.5.8.3.- Enzimas antioxidantes.....	52
3.5.8.3.1.- Homogeneización de las muestras para análisis enzimáticos.....	52
3.5.8.3.2.- Determinación de actividades enzimáticas.....	52
3.5.8.3.2.1.- Ascorbato peroxidasa (APX).....	53
3.5.8.3.2.2.- Catalasa (CAT).....	53
3.5.8.3.2.3.- Peroxidasa (POX).....	53
3.5.8.3.2.4.- Deshidroascorbato reductasa (DHAR).....	54
3.5.8.3.2.5.- Monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR).....	54

3.5.8.3.2.6.- Glutación reductasa (GR).....	55
3.5.8.3.2.7.- Superóxido dismutasa (SOD).....	55
3.5.8.4.- Antioxidantes no enzimáticos.....	56
3.5.8.4.1.- Análisis del ácido ascórbico y del glutación.....	56
3.5.8.4.1.1.- Determinación de ácido ascórbico.....	57
3.5.8.4.1.2.- Determinación de glutación.....	57
3.5.9.- Perfil hormonal.....	58
3.5.10.- Análisis estadístico de los datos.....	59
4.- Capítulo 1. Efecto del riego con aguas residuales depuradas con distintos niveles de salinidad en el comportamiento de <i>Eugenia myrtifolia</i> L.....	61
4.1.- Introducción.....	63
4.2.- Material y métodos.....	64
4.2.1.- Material vegetal y condiciones experimentales.....	64
4.2.2.- Tratamientos.....	64
4.2.3.- Medidas relacionadas con el crecimiento.....	65
4.2.4.- Relaciones hídricas e intercambio gaseoso.....	65
4.2.5.- Eficiencia fotosintética del fotosistema II (F_v/F_m), clorofila y color.....	66
4.2.6.- Análisis de las distintas aguas usadas en el ensayo, contenido mineral, tasa de absorción y análisis del sustrato.....	66

4.2.7.- Metabolismo antioxidativo.....	67
4.2.8.- Análisis estadístico de los datos.....	67
4.3.- Resultados.....	67
4.3.1.- Crecimiento y distribución de biomasa.....	67
4.3.2.- Relaciones hídricas e intercambio gaseoso.....	74
4.3.3.- Eficiencia fotosintética del fotosistema II (PS II), clorofila y color.....	78
4.3.4.- Absorción y distribución de elementos fitotóxicos (sodio, cloruro y boro) en la planta.....	81
4.3.5.- Metabolismo antioxidativo.....	90
4.4.- Discusión.....	92
5.- Capítulo 2. Efecto del riego con aguas residuales depuradas con distintos niveles de salinidad en el comportamiento de <i>Myrtus communis</i> L.....	
5.1.- Introducción.....	101
5.2.- Material y métodos.....	102
5.2.1.- Material vegetal y condiciones experimentales.....	104
5.2.2.- Tratamientos.....	102
5.2.3.- Medidas relacionadas con el crecimiento.....	103
5.2.4.- Relaciones hídricas e intercambio gaseoso.....	103
5.2.5.- Medidas relacionadas con la clorofila y el color.....	104

5.2.6.- Análisis de las distintas aguas, contenido mineral, tasa de absorción y análisis del sustrato.....	104
5.2.7.- Metabolismo antioxidativo.....	105
5.2.8.- Análisis estadístico de los datos.....	105
5.3.- Resultados.....	105
5.3.1.- Crecimiento y distribución de biomasa.....	105
5.3.2.- Relaciones hídricas e intercambio gaseoso.....	110
5.3.3.- Contenido en clorofila y color de las hojas.....	114
5.3.4.- Absorción y distribución de nutrientes fitotóxicos en la planta (sodio, cloruro y boro).....	116
5.3.5.- Metabolismo antioxidativo.....	127
5.4.- Discusión.....	130
6.- Capítulo 3. Efecto de los nutrientes y de la salinidad que aporta el agua de riego en la morfología, relaciones hídricas y cambios bioquímicos en plantas de <i>Myrtus communis</i> L.....	135
6.1.- Introducción.....	137
6.2.- Material y métodos.....	138
6.2.1.- Material vegetal y condiciones experimentales.....	138
6.2.2.- Tratamientos.....	138
6.2.3.- Medidas morfológicas y contenido mineral.....	139
6.2.4.- Medidas fisiológicas.....	139

6.2.5.- Medidas bioquímicas y hormonales.....	140
6.2.6.- Análisis estadístico de los datos.....	141
6.3.- Resultados.....	141
6.3.1.- Cambios morfológicos.....	141
6.3.2.- Cambios fisiológicos.....	145
6.3.2.1.- Relaciones hídricas.....	145
6.3.2.2.- Intercambio gaseoso y termografía.....	148
6.3.3.- Cambios nutricionales.....	151
6.3.4.- Cambios bioquímicos y hormonales.....	157
6.3.4.1.- Medida de L-prolina.....	157
6.3.4.2.- Medida de MDA.....	158
6.3.4.3.- Perfil hormonal.....	158
6.3.4.4.- Relaciones de interés.....	159
6.4.- Discusión.....	162
7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de tolerancia a la salinidad de <i>Myrtus communis</i> L. y <i>Eugenia myrtifolia</i> L. Respuestas a corto y a largo plazo. Capacidad de recuperación.....	
7.1.- Introducción.....	171
7.2.- Material y métodos.....	172
7.2.1.- Material vegetal y condiciones experimentales.....	172

7.2.2.- Tratamientos.....	172
7.2.3.- Medidas relacionadas con el crecimiento.....	173
7.2.4.- Contenido mineral y tasas de absorción.....	173
7.2.5.- Relaciones hídricas, determinación de L-prolina, intercambio gaseoso, fluorescencia de clorofilas y síntesis de clorofilas en hojas.....	174
7.2.6.- Termografía.....	174
7.2.7.- Estudio de cambios estructurales en las hojas por microscopía óptica de campo claro.....	175
7.2.8.- Metabolismo antioxidativo.....	175
7.2.9.- Análisis estadístico de los datos.....	175
7.3.- Resultados.....	175
7.3.1.- <i>Myrtus communis</i> L.....	175
7.3.1.1.- Crecimiento.....	175
7.3.1.2.- Cambios nutricionales.....	177
7.3.1.3.- Cambios fisiológicos.....	185
7.3.1.3.1.- Relaciones hídricas y síntesis de L-prolina.....	185
7.3.1.3.2.- Intercambio gaseoso.....	191
7.3.1.3.3.- Fluorescencia de clorofilas y síntesis de clorofilas.....	193
7.3.1.4.- Termografía.....	202
7.3.1.5.- Microscopía.....	202
7.3.1.6.- Metabolismo antioxidativo.....	204

7.3.1.6.1.- Pérdida de electrolitos y peroxidación de lípidos.....	204
7.3.1.6.2.- Detección de ROS por técnicas histoquímicas.....	205
7.3.1.6.3.- Enzimas antioxidantes.....	208
7.3.2.- <i>Eugenia myrtifolia</i> L.....	218
7.3.2.1.- Crecimiento.....	218
7.3.2.2.- Cambios nutricionales.....	220
7.3.2.3.- Cambios fisiológicos.....	233
7.3.2.3.1.- Relaciones hídricas y síntesis de L-prolina.....	233
7.3.2.3.2.- Intercambio gaseoso.....	236
7.3.2.3.3.- Fluorescencia de clorofilas y síntesis de clorofilas.....	239
7.3.2.4.- Termografía.....	244
7.3.2.5.- Microscopía.....	246
7.3.2.6.- Metabolismo antioxidativo.....	248
7.3.2.6.1.- Pérdida de electrolitos y peroxidación de lípidos.....	248
7.3.2.6.2.- Detección de ROS por técnicas histoquímicas.....	249
7.3.2.6.3.- Enzimas antioxidantes.....	254
7.3.2.6.4.- Antioxidantes no enzimáticos.....	255
7.4.- Discusiones.....	209
7.4.1.- Discusión: <i>Myrtus communis</i> L.....	211
7.4.2.- Discusión: <i>Eugenia myrtifolia</i> L.....	257

8.- Conclusiones.....	269
9.- Bibliografía.....	275
10.- Índice de tablas, figuras y fotografías.....	307
11.- Abreviaturas y símbolos.....	329

1.- Justificación y objetivo

Justificación y objetivo

La utilización de aguas residuales depuradas (ARD) para el riego agrícola y de jardinería ha adquirido una notable importancia en los países desarrollados, debido a una creciente necesidad de aprovechar racionalmente los recursos hídricos. Las ventajas de utilizar este tipo de agua para el riego se derivan de la disponibilidad de un abastecimiento a precio competitivo, del uso potencial de los nutrientes que contengan y de la reducción de los efectos contaminantes en el medioambiente. Para consolidar estas prácticas de riego, es esencial que el desarrollo de la reutilización de agua esté basado en evidencias científicas de sus efectos sobre las plantas, el medio ambiente y la salud pública. Una problemática importante en el uso de ARD, desde el punto de vista del crecimiento y desarrollo de las plantas, subyace en la variabilidad estacional que estas aguas presentan en sus características físico-químicas y microbiológicas.

Aspectos como la salinidad, toxicidad iónica y carga de materia orgánica son problemas cuya magnitud variará según la procedencia del agua. Los problemas de salinidad asociados al uso de aguas residuales no son distintos a los causados por la salinidad de las aguas procedentes de otras fuentes, que pueden ser importantes si generan restricciones para su uso, por lo que se debe de atender al adecuado manejo del riego y al nivel de tolerancia a la salinidad de las especies vegetales que se utilizan.

En este sentido, en la producción de plantas ornamentales es importante seleccionar especies con mecanismos que ayuden a tolerar los daños osmóticos y salinos que provocan el uso de estas aguas. El estrés salino origina una serie de mecanismos en las plantas que se inician con la percepción del factor estresante, seguido de una transducción de la señal. En una segunda etapa, tienen lugar los cambios a escala molecular, celular, fisiológica y de desarrollo que permiten establecer una etapa de resistencia o respuestas en las que el organismo se adapta al factor de estrés con procesos de reparación y ajuste. Con la eliminación del factor estresante, el funcionamiento de la planta puede volver a su estado normal, aunque puede no conseguirlo por completo, aspecto importante para identificar el nivel de tolerancia a la salinidad.

En general, los efectos de las sales son de dos tipos: **1) a corto plazo**, por inhibición osmótica afectando a la absorción de agua por las raíces (suele

ocurrir a las pocas horas o a los 2-3 días de la aplicación de la sal) produciéndose, entre otros, una reducción en la asimilación de carbono. **2) a largo plazo**, debido a una acumulación de sal en las hojas dando lugar a toxicidad iónica, desequilibrios nutricionales y estrés oxidativo, que pueden contribuir a los daños observados por el efecto de la salinidad.

Sin embargo, en general, el grupo de respuestas observadas depende del nivel de salinidad, genotipo de la planta, etapa de desarrollo considerada y la interacción con los factores ambientales. La mayoría de los estudios sobre tolerancia a la salinidad se han realizado con distintas especies cultivadas, si bien existe menos información con respecto a plantas utilizadas con fines ornamentales, como es el caso de las especies de la familia de las Mirtáceas aquí descritas: *Eugenia myrtifolia* L. y *Myrtus communis* L.

Por todo ello, un objetivo sería establecer que tipo de ARD utilizado resulta más apropiado y cual sería el manejo del riego que debe utilizarse para obtener una planta de calidad, eliminando la variable de factores ambientales cambiantes. Otro objetivo sería conocer los mecanismos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos asociados a la tolerancia a la salinidad que presentan estas dos especies ornamentales. También interesa conocer las diferencias que ambas especies presentan entre sí, con respecto al grado de tolerancia de cada una.

La aplicación de este estudio será útil, tanto desde un punto de vista básico con el fin de avanzar en el conocimiento de la respuesta de las plantas a la salinidad, como desde un punto de vista práctico para conocer los beneficios del uso de las aguas regeneradas para el riego de plantas con fines paisajísticos.

2.- Antecedentes

2.1.- Introducción

El agua disponible y, en particular, la denominada “agua dulce” es un compuesto escaso si se considera el conjunto de la hidrosfera (capa de agua existente en la superficie del planeta Tierra).

El 97% de la hidrosfera lo constituye el agua salada de mares y océanos. En cambio, el agua dulce (superficial y subterránea) apenas supone un 1% del total. El resto formado por un 2% de agua en forma de hielo y un porcentaje mucho menor (0,001%) de vapor de agua en la atmósfera, no son fácilmente asequibles.

El agua dulce subterránea tampoco tiene acceso fácil ya que muchas veces se encuentra en niveles freáticos profundos. Con respecto al agua dulce superficial (la más solicitada) también termina perdiéndose tras su utilización bien porque pasa a esos niveles profundos o bien porque resulta contaminada e inservible directamente para nuevos usos.

En este contexto es donde se plantea la búsqueda de soluciones alternativas para paliar el déficit de recursos naturales de agua dulce. Una de las alternativas viables parece ser la “reutilización de las aguas residuales después de su depuración y/o regeneración para la adecuación a nuevos usos”.

Los avances en los procesos de tratamiento de aguas han conseguido, en años recientes, disponer de “aguas residuales depuradas” (ARD) aptas para fines agrícolas, industriales o de mejora medioambiental. En este último caso, podría considerarse la utilización de estas aguas para el riego de plantas ornamentales con fines paisajísticos, en revegetación, jardinería urbana o de espacios de ocio, en general.

Con esa perspectiva, pueden plantearse aproximaciones convergentes que lleven a escoger las especies más aptas para ser regadas con ARD de unas determinadas características. Así la carga en materia orgánica, la salinidad o toxicidad iónica potencial en el agua disponible van a condicionar la adaptabilidad de las poblaciones de plantas ornamentales que se utilicen. Esto plantea que se proceda, en primer lugar, a un desglose descriptivo en los materiales objeto de trabajo, es decir, las plantas arbustivas (leñosas) de la familia *Myrtaceae* utilizadas, así como las aguas residuales depuradas que se emplean. También se consideran los posibles efectos (osmótico, tóxico, nutricional y oxidativo) que provocan las sales presentes en estas aguas y los

mecanismos de resistencia (tolerancia y/o evitación) que dichas plantas desarrollarán para adaptarse al riego con tales aguas.

2.2.- Familia *Myrtaceae*

Generalidades

Las mirtáceas (*Myrtaceae*) son una familia de árboles o arbustos perennifolios, ricos en aceites esenciales, pertenecientes al orden Myrtales y formada por unos 130 géneros y unas 2.900 especies presentes en regiones tropicales y subtropicales, aunque algunas también se ubican en Europa.

Características

Porte: árboles o arbustos. **Hojas:** enteras, simples, usualmente opuestas, estípulas efímeras o ausentes, con puntuaciones glandulares, aromáticas. **Flores:** actinomorfas, perfectas, a veces imperfectas, epíginas, dispuestas en cimas o solitarias. **Perianto:** sépalos 4-5, libres o connados, frecuentemente persistentes en el fruto, algunas veces formando una caliptra caduca; pétalos 4-5, imbricados o soldados, a veces formando una caliptra caduca. **Estambres:** ∞ , insertos opuestos a los pétalos en fascículos; filamentos libres o unidos en la base; anteras pequeñas, versátiles o basifijas, con dehiscencia longitudinal. **Gineceo:** ovario ínfero, 2- ∞ locular, placentación axilar o parietal, estilo simple, alargado; estigma capitado o peltado; óvulos 2- ∞ . **Fruto:** cápsula, baya o drupa con 1 a ∞ semillas. **Semilla:** sin endosperma o muy poco.

Distribución y Hábitat

Las mirtáceas habitan principalmente en zonas tropicales, aunque también se hallan en zonas frías y templadas (Mabberley, 1993), (Figura A.1).



Figura A.1.- Distribución mundial de las mirtáceas

2.3.1.- Especie estudiada

Myrtus communis L.



Fotografía A.1.- Plantas de *Myrtus communis* L.

Nombre común

Mirto, arrayán, murta, murtonera, myrta, mata gallinas.

Etimología

Del griego "myrtos" que significa perfume, por ser planta muy aromática. "Myrtus" era el nombre que daban los romanos al mirto. El otro nombre "arrayán", por el que también se le conoce, proviene del árabe ar-Rayhan o Rihan (el "aromático").

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae, División: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida, Subclase: Rosidae, Orden: Myrtales, Familia: Myrtaceae, Subfamilia: Myrtoideae, Tribu: Myrteae, Género: Myrtus, Especie: communis.

Descripción de la especie

Esta especie de interés ornamental se ha descrito como un arbusto aromático perennifolio mediterráneo (Ariza *et al.*, 1997; López-González, 2004; Martínez-Sánchez *et al.*, 2008) de gran interés por su uso ornamental en proyectos de revegetación y paisajismo (Romani *et al.*, 2004) que alcanza normalmente unos dos metros de altura (puede llegar a los cuatro metros). Sus tallos son rectos y algo pubescentes, de 0,6-1,3 m de longitud y muy

ramificados. De cada uno nace un par de hojas enfrentadas, lustrosas, con peciolo corto y de forma ovalo-lanceolada. Son glabras y de color verde oscuro en su haz y pelosas en los nervios del envés con un verde más claro; el tamaño del limbo varía de los 20-45 x 10-20 mm. Las flores son solitarias, de unos 3 cm de diámetro, con 5 pétalos de color blanco. El fruto es una pequeña baya globosa, coronada por el cáliz persistente, de un color negro-azulado (a veces blanquecino) (Fotografía A.1). Las semillas, de unos 2,5-3,5 mm de tamaño, son reniformes y tienen un color amarillento (Valdés *et al.*, 1987; Rosúa-Campos *et al.*, 2001; López- González, 2004; Martínez-Sánchez *et al.*, 2008).

Ecología

El mirto crece en el monte bajo y en el estrato arbustivo de pinares, encinares y alcornocales, así como en coscojares, lentiscales y otros matorrales pertenecientes a la serie de degradación de dichas comunidades. Puede crecer en las riberas de los ríos, desde el nivel del mar hasta los 1000 m de altitud aproximadamente. El mirto habita en climas suaves, sin sequías acusadas, buscando la humedad edáfica (Valdés *et al.*, 1987) ya que en condiciones naturales puede sufrir estrés por sequía y alta radiación solar (Valdés *et al.*, 1987; Mendes *et al.*, 2001). Se presenta en zonas de clima termomediterráneo, con un ombroclima subhúmedo. Respecto a la edafología está considerada como una especie silicícola por su habilidad de absorber silicio, aunque se presenta en gran cantidad de suelos (Rosúa-Campos *et al.*, 2001) y se cultiva perfectamente en los calizos. El mirto rebrota vigorosamente de cepa tras el fuego o tala, pero sus semillas no soportan las altas temperaturas de los incendios (García-Fayos *et al.*, 2001).

Distribución

Desde un punto de vista geográfico se extiende por el sur de Europa, sobre todo en las costas de la Región Mediterránea, norte de África y por el centro y suroeste asiático, estando presentes también en la Región Macaronésica, exceptuando Cabo Verde. En la Península Ibérica podemos encontrar esta especie en el suroeste y de manera más abundante en el litoral mediterráneo y en las Islas Baleares; también está presente en el Noroeste de Portugal y en Galicia (Valdés *et al.*, 1987; Rosúa-Campos *et al.*, 2001; López-

González, 2004). Por otro lado el mirto ha sido identificado en zonas arenosas de dunas, donde está frecuentemente expuesto a suelos salinos durante la estación de verano (Tattini *et al.*, 2006).

Floración y Fructificación

Normalmente florece entre junio y agosto, pero en ocasiones puede hacerlo incluso en octubre. El mirto es una especie entomófila, de flores hermafroditas de color blanco (Fotografía A.2). La maduración de los frutos tiene lugar en otoño, siendo entonces cuando adquieren ese característico color azulado (García-Fayos *et al.*, 2001), aunque existe un dimorfismo en el color de los frutos y algunos ejemplares producen frutos de color blanquecino (Traveset *et al.*, 2001). Tanto la floración como la fructificación están sujetas a una variación individual e interanual, lo que provoca oscilaciones en la recolección de los frutos (Cani, 1996; Traveset *et al.*, 2001) que suele realizarse a partir de diciembre, de forma manual. Cada fruto contiene de 2 a 20 semillas, variando según la población (García-Fayos *et al.*, 2001).



Fotografía A.2.- Flores blancas en plantas de mirto

Importancia ornamental y otros usos

Desde un punto de vista ornamental se trata de una especie muy utilizada en jardinería, apreciada por la vistosidad de su follaje y su olor. Es frecuente su uso como seto o topiaria, debido a su buena resistencia a la poda (López-González, 2004). La variabilidad de porte que se obtiene, a veces, en un mismo lote de siembra puede ser un inconveniente a la hora de formar setos

perfectamente alineados y recortados, por lo que la multiplicación vegetativa es una técnica muy recomendable en los viveros para la obtención de planta uniforme. También se utiliza como verde de complemento (con podas discriminadas en la naturaleza). Otro uso importante para el mirto es su empleo como planta medicinal en países de la zona mediterránea (Tattini *et al.*, 2006). Recientemente, esta especie ha sido identificada como fuente de taninos hidrosolubles y de flavonoides glicosídicos (Romani *et al.*, 2004).

Técnicas de multiplicación

Las semillas de *Myrtus communis* L. no presentan letargo, por lo que si se elimina previamente la pulpa del fruto, no tienen problema alguno a la hora de germinar (Catalán, 1985; Traveset *et al.*, 2001). La siembra se puede realizar desde otoño hasta primavera, bajo un rango de temperatura de 20-30 °C (Mitrakos *et al.*, 1981). Dicha siembra se puede acelerar sumergiendo las semillas en agua durante 12-24 horas (Catalán, 1985). De esta forma se pueden obtener las primeras germinaciones en el primer mes, completándose ésta antes de los 3 meses (Traveset *et al.*, 2001). También se pueden aplicar tratamientos pregerminativos, (a pesar de la buena germinación que presenta esta especie), con el objetivo de acelerar y homogeneizar el proceso, tales como una estratificación a 5°C durante uno o dos meses (Piotto, 1992), o una escarificación con ácido sulfúrico.

El conocimiento de las condiciones de extracción y almacenamiento de las semillas es de gran importancia para conservar su capacidad germinativa. Algunos autores proponen la maceración previa de los frutos durante unas horas, su trituración y la separación de las semillas con una criba y agua a presión. Después, una vez separadas las semillas del fruto, se secan hasta alcanzar un 6-8 % de humedad. Las semillas almacenadas a una temperatura de 4-5 °C y en condiciones de hermeticidad, pueden conservarse hasta al menos 5 años (Catalán, 1985).

Existen distintos datos acerca de la capacidad germinativa de los lotes de semillas, pudiéndose obtener un 80-85% de germinación (Catalán, 1985; Fernández-Rufete y Plana, 2007). No obstante, a veces, las semillas recién recolectadas presentan una elevada dormición por lo que los tratamientos de estratificación de semillas (en arena a 3°C durante 45 días) se recomiendan para obtener buenas germinaciones (Fernández-Rufete y Plana, 2007).

Un kilogramo de semillas suele contener en torno a las 150.000 semillas (Semillas Silvestres S.L., 2007).

Respecto a la multiplicación asexual se puede conseguir mediante esquejes semileñosos terminales, según indican ensayos realizados en el Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias de Lorca (Fernández-Rufete y Plana, 2007).

Manejo en vivero

La siembra de semillas de *Myrtus communis* L. puede realizarse en primavera, obteniéndose una alta germinación inicial en esa misma estación. El trasplante de plántulas puede realizarse a envases forestales de 300 cm, para planta tipo 1-0, obteniéndose un tamaño final aproximado de 10-15 cm de altura. En los viveros que aun lo cultivan a raíz desnuda, pueden obtener, para planta 1-1, ejemplares de unos 60-80 cm de altura si el ciclo es largo (Costa y Sánchez, 2001). El mirto es una especie que no tolera los encharcamientos, por lo que los riegos serán frecuentes pero de poco caudal (Fernández-Rufete y Plana, 2007).

Respecto al endurecimiento de la especie durante la fase de vivero, los ensayos realizados en la UPCT concluyen que la aplicación de paclobutrazol, indistintamente del régimen del riego, es un método eficaz de endurecimiento ya que aumenta considerablemente la supervivencia de las plantas. Esta resistencia se debe a los cambios morfológicos y fisiológicos que induce el paclobutrazol en las plantas tanto de la parte aérea como en la parte radical. Asimismo, estas modificaciones provocan una mejora en el estado hídrico de las plantas con una reducción en el consumo de agua y una mayor resistencia a la sequía.

Observaciones

El mirto está catalogado como especie de interés especial según el Decreto 50/2003 de 30 de mayo, por el que se crea el Catálogo Regional de Flora Silvestre Protegida de la Región de Murcia.

2.3.2.- Especie estudiada

Eugenia myrtifolia L.



Fotografía A.3.- Plantas de *Eugenia myrtifolia* L.

Nombre común

Comúnmente se llama **cereza cepillo** (*Brush Cherry*)

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae, División: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida, Subclase: Rosidae, Orden: Myrtales, Familia: Myrtaceae Subfamilia: Myrtoideae, Tribu: Myrteae, Género: Eugenia, Especie: myrtifolia.

Descripción de la especie

Es un arbusto o árbol de los bosques templados húmedos (Fotografía A.3). Puede alcanzar una altura de 35 m con un diámetro de 6 dm. Las plantas son perennes, con hojas brillantes y lustrosas, de color verde intenso cuyas puntas se tiñen en invierno de color bronce o rojo brillante. Cuando las hojas son jóvenes son opuestas, simples, lanceoladas de 4-8 cm de largo. La cereza cepillo se cultiva comúnmente en el este de Australia, particularmente como sus cultivares más pequeños y arbustivos. Estos son especialmente populares para formar setos.

Ecología

Soporta medianamente las heladas. En zonas de clima frío se cultiva en invernaderos. Crecen bien en suelos sueltos y bien drenados, no encharcados, con contenido elevado en materia orgánica.

Distribución

En zonas tropicales del continente asiático y Oceanía (Australia y Nueva Zelanda) y en otras regiones subtropicales de Brasil, Argentina, Uruguay y Paraguay.

Floración y Fructificación

Las flores tardan aproximadamente entre 2 y 3 años en florecer, son blancas y en racimos. Las frutas que suelen presentar un color rojo oscuro, son comestibles.

Usos y valor ornamental

Las plantas de esta especie se utilizan como pantallas para formar setos, también son utilizadas como arbolitos en arte topiario y en borduras como especie única. Presentan una buena adaptación en contenedores. En caso de poda es muy escasa la producción de sus frutos rojos que son decorativos. Las agradables frutas ácidas se comen frescas o cocinadas. La fruta puede ser usada para elaborar mermeladas y jaleas.

Técnicas de multiplicación

El fruto de la especie *E. myrtifolia* es una baya, la cual contiene las semillas en su interior. Lo más importante a considerar antes de recolectar las semillas es que la planta se encuentre sana y fuerte, para evitar transmitir alguna virosis a través de éstas. Para extraer las semillas, se coloca un puñado en un trapo de algodón, se retuerce y se sostiene debajo del grifo con agua fría para permitir que se embeban bien y luego se escurre bien el trapo hasta que no salga más líquido. Posteriormente se abre el trapo y se separan las semillas de la pulpa machacada. Dejar secar un par de días sobre papel en un lugar fresco, seco y aireado.

2.4.- Otras especies con valor ornamental dentro de la familia de las mirtáceas.

El **eucalipto** o **eucaliptus** (*Eucalyptus*): Del latín *eucalyptus* y éste del griego *ευκάλυπτος* -en griego significa «bien cubierto» refiriéndose a la yema de sus flores). Existen alrededor de 700 especies, la mayoría oriundas de Australia.

El **callistemon** o **limpiatubos**: Su nombre proviene de las palabras griegas *kalli*=hermoso y *stemon*=estambre. El género *Callistemon* comprende arbustos y algunos árboles, siempreverdes con la corteza fisurada. Comprende una treintena de especies nativas de Australia. Las más frecuentes son: *Callistemon citrinus* que es muy apreciado en jardinería por su espectacular floración y el cultivar *Callistemon citrinus* 'Splendens' que también se le denomina *Callistemon laevis*. Tiene espigas cilíndricas y densas, con los filamentos más largos y de color rojo carmín.

Los **metrosideros**: El nombre deriva del griego *metra* o duramen y *sideron* o hierro. Quizás las especies mejor conocidas son *Metrosideros excelsa* (Pohutukawa), *Metrosideros robusta* (árbol rata del norte) *Metrosideros umbellata* (árbol rata del sur) de Nueva Zelanda y *Metrosideros polymorpha* (Lehua) de Hawai. Es un género de aproximadamente 50 árboles, arbustos y enredaderas nativos de las islas del océano Pacífico, desde las Filipinas a Nueva Zelanda e incluyendo las Islas Bonín, Polinesia, y Melanesia, con una anómala presencia remota en Sudáfrica.

2.5.- Aguas residuales depuradas (aguas regeneradas)

2.5.1.- Aspectos generales

La importancia del agua para los seres vivos es consecuencia de sus propiedades físico-químicas (Nobel, 1991). El agua, principal componente de las plantas, es un elemento imprescindible para su crecimiento y desarrollo, siendo el factor más limitante para su cultivo. Del agua absorbida por las plantas, una pequeña parte es retenida y utilizada en los procesos de crecimiento y en la realización de la fotosíntesis, mientras que el resto se pierde por transpiración.

Como sustancia vital para la humanidad, el agua se ha convertido en un motivo de preocupación mundial en las últimas décadas. El incremento

demográfico, la industrialización de los países más desarrollados, la creciente contaminación, las variaciones climáticas y las prácticas ineficaces de la gestión del agua, han dado lugar a situaciones de pronunciado desequilibrio en el balance hídrico en determinadas zonas pobladas del planeta, especialmente en aquellas regiones áridas o semiáridas. (Delgado-Díaz, 2003).

El creciente descenso del volumen y de la calidad de las reservas existentes de agua, junto a los principios aceptados de la conservación del medio ambiente a través de un desarrollo sostenible, han dado lugar al planteamiento de soluciones alternativas que puedan paliar el déficit de recursos naturales de agua dulce. Entre estas alternativas viables aparece entre otras la utilización de las aguas regeneradas (MetCalf y Eddy, 1995; Mujeriego *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2001; Asano, 2006).

Todo proyecto de regeneración de aguas residuales plantea dos requisitos básicos:

- 1) Definición de los niveles de calidad adecuados a los usos que se le vaya a dar al agua regenerada.
- 2) Establecimiento de los procesos de tratamiento para alcanzar los límites de calidad para cada uno de los usos previstos.

En general en función de su tratamiento y uso, se pueden definir los siguientes tipos de aguas:

Aguas depuradas: Aguas residuales que han sido sometidas a un proceso de tratamiento que permita adecuar su calidad a la normativa de vertido aplicable.

Aguas regeneradas: Aguas residuales depuradas que, en su caso, han sido sometidas a un proceso de tratamiento adicional o complementario que permite adecuar su calidad al uso al que se destinan.

En la Figura A.2 se representa la calidad relativa de las aguas naturales, potables y residuales, así como los niveles conseguidos en la calidad en función de su tratamiento.

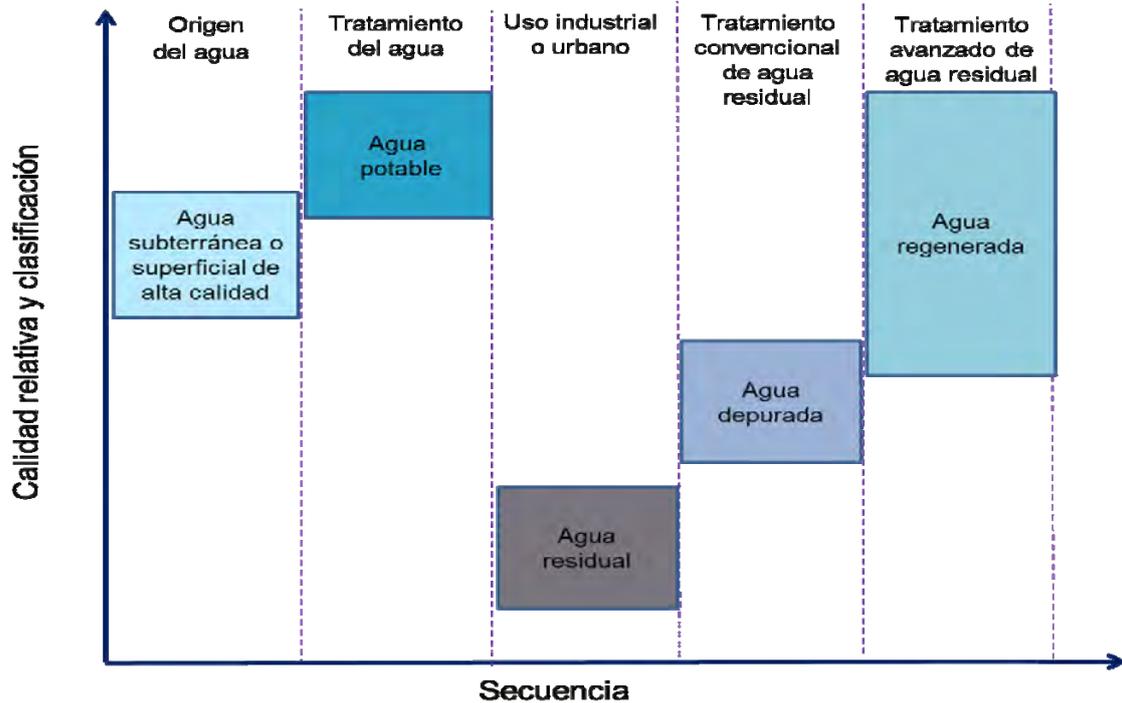


Figura A.2.- Calidad relativa del agua según el uso y tratamiento

2.5.2.- Utilización de aguas residuales depuradas para el riego de especies con fines ornamentales.

El agua de buena calidad era el único recurso hídrico que se utilizaba en algunos estados de los EE.UU. Los propietarios utilizaban, aproximadamente, el 60% del agua potable para el riego de espacios de recreo, para la jardinería o para la floricultura (Utah Division of water resources, 2003). En la actualidad, dada la escasez de recursos hídricos y la sensibilidad ecológica que se tiene en cuenta en la gestión y planificación del paisaje, (Botequilha-Leitão y Ahern, 2002) se plantea la necesidad de utilizar fuentes alternativas de agua para el riego. Entre las distintas fuentes de aguas alternativas disponibles, se incluye el agua residual depurada o regenerada, los efluentes municipales tratados, y las aguas subterráneas salobres. Debido al aumento de las zonas verdes en el entorno urbano y dada la creciente escasez de agua en estas zonas, se obliga a la reutilización de aguas residuales depuradas para el riego (Navarro *et al.*, 2008; McCammon *et al.*, 2009).

La aplicación de aguas residuales depuradas es una práctica común en muchas zonas de cultivo, especialmente en ambientes áridos y semiáridos,

donde el agua es un factor muy limitante (Yermiyahu *et al.*, 2008), aunque el agua se utiliza también para fines distintos del riego y así *para el público, en general "un paisaje puede servir como un indicador visual del uso del agua debido a su exposición visual "* (Thayer, 1976).

Si el efluente tratado contiene determinados nutrientes esenciales para el crecimiento de la planta y, además, la calidad del agua es buena (es decir, no presenta demasiadas sales), tal efluente puede mejorar el crecimiento de las plantas y reducir las necesidades de fertilizantes (Quist *et al.*, 1999; Gori *et al.*, 2000). También, la aplicación de las aguas residuales industriales y municipales a la tierra puede ser una estrategia de gestión segura, desde un punto de vista ambiental (Rodríguez *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2006).

Sin embargo, en general las aguas residuales depuradas pueden ser negativas para el crecimiento vegetal porque pueden presentar altas concentraciones de iones fitotóxicos y, por tanto, altos niveles de sal, problema cuya magnitud estará en función de la ubicación de las plantas depuradoras (Feigin *et al.*, 1991; Brar *et al.*, 2000; Yadav *et al.*, 2002; Niu *et al.*, 2007; Bañón *et al.*, 2011).

En el caso particular del sureste de la Península Ibérica las estaciones depuradoras de aguas residuales (E.D.A.R) situadas cerca de la costa tienden a producir aguas residuales con una conductividad eléctrica (CE) alta. En Murcia existen 88 estaciones depuradoras de aguas residuales, que producen más de 109 hm³ al año de este tipo de agua (ESAMUR, 2012), lo que supone el 6% de los recursos hídricos renovables anuales (PHCS, 1995). El principal problema asociado al uso de estas aguas es la salinidad ya que el 93% de ellas tiene una conductividad eléctrica (CE) superior a 2 dS m⁻¹ y el 37 % presenta valores de CE superiores a 3 dS m⁻¹ (ESAMUR, 2005) (Tabla A.1).

Tabla A.1.- Tipos de E.D.A.R. conocidos hasta 2012, cuya gestión y mantenimiento controla ESAMUR.

Tipo de E.D.A.R.	Número de Instalaciones	Volumen depurado (Hm ³ /año)	%
Depuración Biológica	34	57,95	53,0%
Depuración Biológica con tratamiento terciario	52	49,98	45,7%
Plantas de Lagunaje	1	1,44	1,3%
Plantas con tratamiento primario o en construcción	1	0,04	0,03%
Totales	88	109,41	100%

Con respecto al número de E.D.A.R y las magnitudes de explotación de los recursos hídricos se ha realizado un seguimiento exhaustivo desde el año 2009 hasta el año 2012 (Tabla A.2).

Tabla A.2.- Número de E.D.A.R. y magnitudes de explotación estudiadas desde el año 2009 hasta el año 2012.

	2009	2010	2011	2012
Nº de E.D.A.R. activas controladas por ESAMUR	96	104	100	88
Volumen tratado (Hm³/año)	102,1	110,9	115	109
Fangos evacuados (miles tn. mat. fresca/año)	134,9	128,8	134,5	141,3
Contaminación recibida (miles tn.DBO₅/año)	43,7	40	43,4	45,9
Contaminación eliminada (miles tn.DBO₅/año)	42,8	39,2	42,7	45,3
Habitantes equivalentes medios (miles)	1.997	1.836	1.983	2.090
Rendimiento medio obtenido (%)	97,9	97,9	98,4	98,6
Energía Consumida (Gwh)	66,1	63,4	63,1	55
Ratio Consumo Eléctrico (Kwh/m³)	0,65	1,46	0,55	0,5

La reutilización de las aguas residuales depuradas requiere de tratamientos terciarios avanzados, entre los que se incluye entre otros: la filtración por arena, la desinfección, la desalinización, micro y ultrafiltración por membranas.

En resumen, los compuestos químicos de mayor interés en horticultura, procedentes de aguas residuales después de pasar por todos los procesos de tratamiento, son: sodio, cloro, boro, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, bicarbonato, y sulfato (Farnham *et al.*, 1985; Wu *et al.*, 2001; Duncan *et al.*, 2009).

El ahorro de agua para proyectos de revegetación y paisajismo implica seleccionar plantas capaces de tolerar el estrés salino con el fin de permitir el uso de agua de baja calidad. Con relación al uso de aguas residuales para el riego de plantas de interés ornamental, se han publicado recientemente una serie de trabajos en donde se destaca la importancia cada vez más creciente de la utilización de este recurso hídrico como fuente alternativa al uso del agua tradicional (Bañón *et al.*, 2011; Miralles *et al.*, 2011; Valdés *et al.*, 2012; Cassaniti *et al.*, 2013; Gómez-Bellot *et al.*, 2013a y 2013b).

Uno de los aspectos de gran interés para adecuar el uso de aguas de baja calidad son las técnicas aplicadas a las plantas durante su cultivo que condicionan y afectan a su desarrollo y comportamiento agronómico. En este sentido, la elección y el manejo del riego pueden economizar el empleo de

agua y permitir el uso de aguas de baja calidad sin mermar el valor ornamental de las plantas, e incluso puede proporcionar resistencia frente a los distintos estreses. El manejo del riego mediante la aplicación de drenaje es una herramienta útil para retrasar los problemas asociados con la salinidad del agua. En definitiva, a menor calidad del agua habría que aplicar un mayor drenaje para evitar la acumulación de sales, aunque también es importante el tipo de sustrato utilizado (Singh *et al.*, 1996). Evans (2004) estudió estas consideraciones en plantas ornamentales crecidas en maceta, aportando distintas recomendaciones para el uso de una determinada fracción de drenaje según la conductividad eléctrica del agua de riego empleada.

2.6.- Efectos generales de la salinidad sobre las plantas

Los efectos de las sales sobre las plantas son el resultado combinado de una interacción compleja entre diferentes procesos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. El exceso de las sales, bien sea en el sustrato o en el agua de riego, puede afectar al desarrollo de la planta de diferentes maneras:

1. Efecto osmótico

Se produce cuando la reducción del desarrollo de la planta puede relacionarse con la disminución del potencial osmótico de la disolución del suelo, con independencia de las sales presentes. Es el efecto más general de la salinidad. Con el riego se aportan agua y sales; el agua puede permanecer en el suelo a capacidad de campo, se puede perder por evaporación desde el suelo o por transpiración desde la planta, lo cual produce un aumento de la concentración de sales en el medio, dificultándose así la capacidad de absorción de agua por parte de la planta. Esta alteración del balance de agua dentro de la planta es el principal factor responsable del efecto negativo del exceso de sales. Este efecto, generalmente, no determina síntomas específicos. Reduce el crecimiento y el desarrollo en la planta y origina una coloración verde oscura en las hojas.

2. Efecto iónico específico

Se denomina así cuando la reducción se debe a la presencia de iones en los tejidos de las plantas, a concentraciones superiores a las toleradas. Dependiendo de la naturaleza del ión, se producirán lesiones características en las hojas.

2.1 Efecto tóxico.

La toxicidad es debida a la absorción y acumulación de ciertos iones como el sodio, el cloruro y el boro en los distintos órganos de la planta. Algunos iones como SO_4^{2-} y HCO_3^- , en algunos casos muy concretos, también pueden provocar daños tóxicos.

2.2 Efecto nutricional.

Se produce cuando la presencia de algunos de estos iones fitotóxicos en la disolución del suelo afecta a la absorción o transporte de los elementos esenciales o nutricionales para la supervivencia de las plantas. Por ejemplo, el Cl^- puede disminuir la absorción de NO_3^- y el Na^+ puede hacer lo mismo con el K^+ y con el Ca^{2+} .

3. Junto con estos componentes mencionados anteriormente, se ha descrito que la salinidad también produce un estrés oxidativo, mediado por especies reactivas del oxígeno (ROS) a nivel subcelular.

Como resumen de lo anteriormente expuesto, se representa un esquema general de los efectos que produce la salinidad en las plantas (Figura A.3).

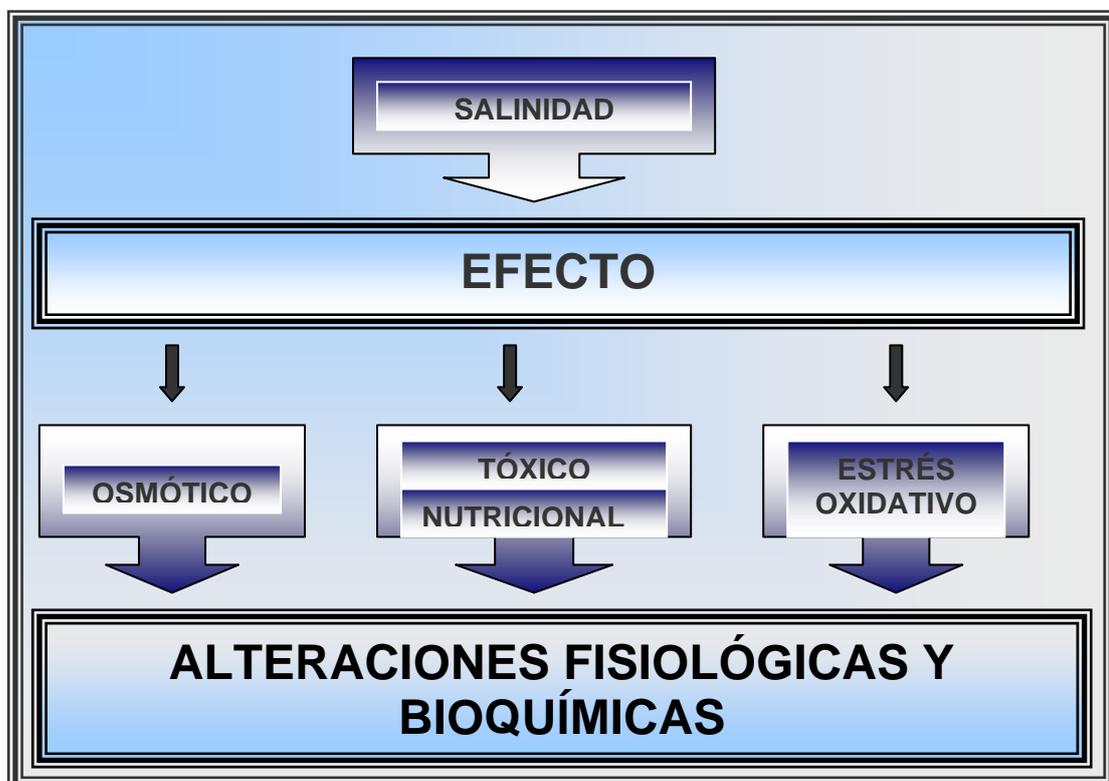


Figura A.3.- Efecto de las sales sobre las plantas.

En conjunto, los diversos efectos que las sales provocan en las plantas, afectando a su crecimiento y a la turgencia de los tejidos hasta la pérdida de la estructura celular por daños en las membranas plasmáticas e inhibición o activación de distintas actividades enzimáticas, son consecuencia de un efecto osmótico, tóxico y nutricional, además de un estrés oxidativo (Hernández *et al.*, 1993, 1995, 2001b; McKersie y Leshem, 1994; Munns y Tester, 2008; Flowers *et al.*, 2010).

2.7.- Tolerancia de las plantas a la salinidad: Mecanismos a corto y largo plazo.

Las plantas para adaptarse al riego con altas concentraciones de sales deben activar múltiples mecanismos como aumentar la capacidad de obtener y/o retener agua restituyendo la homeostasis iónica (Rejili *et al.*, 2007). Estos mecanismos de adaptación se reflejan macroscópicamente como un menor crecimiento (Munns, 2008), con modificaciones de la relación parte aérea/raíz (Tattini *et al.*, 2006) y una limitación de la expansión foliar (Cramer, 2002). Estos mecanismos son consecuencia de cambios metabólicos en la síntesis de ácido abscísico y otras fitohormonas y de solutos osmoprotectores (como prolina o glicinbetaina). Además, se producen cambios fisiológicos como la alteración en la permeabilidad de las membranas a los iones y al agua, el cierre estomático y la disminución de la transpiración y fotosíntesis, etc. Esta respuesta adaptativa está gobernada por señales moleculares que regulan la relación con el medio externo. Por ejemplo, cambios en la actividad de canales y transportadores de membranas (Munns y Tester, 2008) así como la activación y transcripción de genes, entre cuyos efectos está la modificación de rutas biosintéticas que dan lugar a un ajuste osmótico y a la protección de las estructuras celulares (Rejili *et al.*, 2007).

En general, las respuestas de las plantas a los diferentes estreses son complejas dado que tales procesos afectan a diversas partes de la planta y de modo distinto en cada caso (Bray, 1997). Todos los procesos fisiológicos de las plantas pueden variar bajo una situación de estrés, aunque sólo algunos de los cambios confieren resistencia a la planta (Hsiao *et al.*, 1976; Alegre-Batlle, 2000). Sin embargo, los avances de la investigación en este campo sugieren que las respuestas o adaptaciones específicas a un determinado tipo de estrés representan un pequeño porcentaje frente al gran número de respuestas comunes a varios de ellos (Tudela y Tadeo, 1993). Hay que tener en cuenta

que en condiciones naturales, incluidos los factores ambientes mediterráneos, las plantas se encuentran sometidas a múltiples estreses, aunque los efectos de los mismos no suelen ser aditivos (Azcón-Bieto, 1987; Chapin *et al.*, 1987; Sanchez-Diaz y Aguirreolea, 1991).

El estrés origina una serie de mecanismos en las plantas que se inician, en primer lugar, con la percepción del factor estresante seguido de una traducción de la señal (Tracy *et al.*, 2008) (Figura A.5). En una segunda etapa, tienen lugar los cambios a escala molecular, celular, fisiológica y de desarrollo que permiten establecer una etapa de resistencia o respuestas (fase de restitución), en la que el organismo se adapta al factor de estrés empezando con procesos de reparación y posible compensación ante los efectos de dicho estrés (Niknam y McComb, 2000). Con frecuencia la planta vuelve a su estado normal, aunque puede no conseguirlo por completo. En general, el grupo de respuestas observadas depende de la severidad y duración del estrés, genotipo de la planta, etapa de desarrollo y su interacción con los factores ambientales. Tal complejidad de factores hace difícil describir cuáles son las respuestas de las plantas que aumentan su resistencia (Alegre-Batlle, 2000). Por último, si el factor de estrés aumenta o continúa por mucho tiempo, se podría llegar a un estado crítico o fase final, que podría implicar, incluso, la muerte de la planta (Salisbury y Ross, 1994). Lichtenthaler (1998) añadió a las tres fases anteriores, una nueva denominada fase de recuperación o regeneración, durante la cual las plantas podrían recuperar de forma parcial o total sus funciones fisiológicas, cuando el agente estresante deja de afectarlas.

La tolerancia de un cultivo a la salinidad es compleja, ya que involucra respuestas de tipo iónico y osmótico a nivel celular (Cheeseman, 1988, Yeo, 1998). Los mecanismos que confieren tolerancia a nivel celular pueden no tener efecto a nivel macroscópico. En la planta se suelen producir interacciones entre células con distinta función (absorción, transporte y asimilación de carbono) que están en distintos órganos enfrentadas a condiciones ambientales distintas (Yeo, 1998). La morfología foliar y distintas variables ambientales pueden modificar la absorción de iones y la transpiración en un ecosistema agrícola. A pesar de los avances realizados en el conocimiento de los diferentes mecanismos de tolerancia y de los logros alcanzados, quedan aspectos importantes a tener en cuenta y que habrá que estudiar en el futuro, como el impacto en la productividad del agrosistema.

Uno de los efectos más evidentes del estrés salino para las plantas es la reducción en su capacidad de absorción de agua. Este factor se puede manifestar de una forma similar al efecto producido por el estrés hídrico, dando lugar a una reducción en la expansión foliar y a una pérdida de turgencia. Una célula vegetal expuesta a un medio salino equilibra su potencial hídrico perdiendo agua, lo que induce la disminución del potencial osmótico y de turgencia. Esta situación genera señales químicas (aumento del Ca^{2+} libre intracelular, síntesis de ABA, etc.) que pueden desencadenar posteriores respuestas adaptativas (Hasegawa *et al.*, 2000; Abdul-Jaleel *et al.*, 2007). Durante el proceso de ajuste se produce la acumulación de solutos orgánicos e inorgánicos que reducen el potencial osmótico celular (Munns, 2002), y la reducción en la conductividad hidráulica de las membranas, posiblemente por disminución del número o apertura de los canales de agua (acuaporinas) (Carvajal *et al.*, 1999). Una vez recuperada la turgencia, se puede restablecer el crecimiento (Jacoby, 1994). Los cambios macroscópicos que se observan bajo condiciones de salinidad, como reducción del área foliar y de la relación parte aérea/raíz, también reflejan el ajuste necesario para recuperar el balance hídrico.

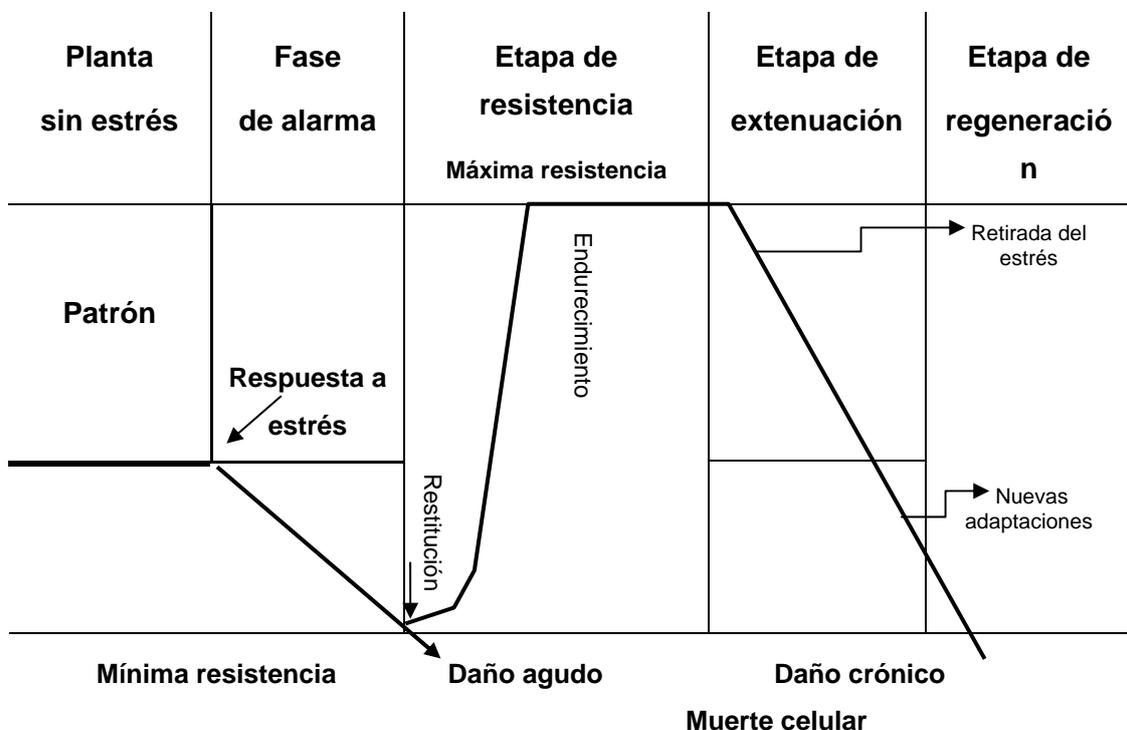


Figura A.4.- Concepto general de las fases secuenciales y respuestas inducidas en plantas por exposición al estrés.

3.- Material y métodos

3.1.- Material vegetal y condiciones experimentales

Para los ensayos correspondientes al capítulo 1 y 5 de la presente Tesis se emplearon plantas de *Eugenia myrtifolia* L. procedentes de los viveros García, localizados en el término municipal de Lorca (Murcia). En los ensayos correspondientes a los capítulos 2, 3 y 4 se utilizaron plantas de *Myrtus communis* L. suministradas por viveros Ajauque, localizados en el término municipal de Fortuna (Murcia). Las plantas estaban cultivadas en bandejas multialveolares de polietileno negro y dimensiones por alveolo de 50x50x115 mm (Fotografía MM.1)



Fotografía MM.1.- Plantas de mirto en bandejas multialveolares.

El trasplante para los distintos ensayos se realizó en macetas de polietileno negro, circulares y con unas dimensiones de 14x12x12 cm (Fotografía MM.2). El volumen de las macetas era de aproximadamente 1,2 L. Con respecto al sustrato, se utilizó una mezcla de fibra de coco, turba (negra y rubia) y perlita en volumen 8:7:1, respectivamente. Se fertilizó con Osmocote, abono universal de lenta liberación, en gránulos cubiertos, del tipo N-P-K; 14-13-13 que correspondía a una composición:

-14% nitrógeno:

-7,2% nitrógeno nítrico.

-6,8% nitrógeno amoniacal

-13% anhídrido fosfórico (P_2O_5)

-13% óxido de potasio (K_2O)

-7% anhídrido sulfúrico (SO_3)



Fotografía MM.2.- Plantas de mirto en la cámara de crecimiento.

Después del trasplante, las macetas se trasladaron a una cámara de crecimiento controlado, simulando los cambios naturales de temperatura (23°C/18°C día/noche), luz activa para fotosíntesis (350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa) con un fotoperiodo (16 horas de luz y 8 de oscuridad) y humedad relativa (HR) (55%-70%). Las plantas en todos los ensayos realizados quedaron distribuidas en 3 bloques al azar, conteniendo, cada uno, 4 bandejas con 10 plantas (40 plantas por bloque).

3.2.- Tratamientos

Todos los capítulos realizados en esta Tesis constan de cuatro tratamientos. Concretamente:

- a) En el capítulo 1 se utilizaron plantas de *E. myrtifolia* regadas durante cuatro meses, con un tratamiento control y tres tipos distintos de aguas regeneradas (ARD1, CE=1,7 dS m^{-1} ; ARD2, CE= 4 dS m^{-1} y ARD3, CE= 8 dS m^{-1}). Estas mismas plantas, durante dos meses, se regaron con agua de buena calidad sin aplicar ningún tipo de drenaje.
- b) En el capítulo 2 se emplearon plantas de *M. communis* sometidas a los mismos tratamientos que en el capítulo 1, durante el mismo periodo tiempo, pero en este caso sí que se aplicó una fracción de drenaje en función de la salinidad de los tratamientos.

- c) En el capítulo 3 se utilizaron plantas de *M. communis* regadas, durante tres meses, con un tratamiento control, dos tipos de aguas regeneradas (ARD1, CE= 1,7-2 dS m⁻¹ y ARD2, CE= 4-5 dS m⁻¹) y un tratamiento de NaCl (CE= 8dS m⁻¹), aplicando mayor drenaje conforme aumentaba la salinidad de los tratamientos.
- d) Con respecto al capítulo 4-5, ambas especies se regaron, durante un mes, con un tratamiento control y tres tipos de aguas salinas (S4, CE= 4 dS m⁻¹; S8, CE= 8 dS m⁻¹ y S12, CE= 12 dS m⁻¹), sin aplicar ningún tipo de drenaje, pero aplicando después unos lavados con agua de buena calidad, a todas las plantas y durante un periodo de tiempo que no alcanzó el mes.

3.3.- Análisis de aguas

Para cada tipo de agua utilizada se recogieron cuatro muestras, guardadas en botellas de cristal, que fueron transportadas al laboratorio en un recipiente con hielo. Estas botellas se almacenaron a 5°C antes de ser procesadas para su análisis químico.

Las concentraciones de macronutrientes (Na, K, Ca, Mg), de micronutrientes (Fe, B, Mn) y de metales pesados (Ni, Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) se determinaron por medio de un dispositivo de plasma acoplado inductivamente (ICP-ICAP 6500 DUO Thermo, England). Las concentraciones de aniones (cloruro, nitrato, fosfato y sulfato), se analizaron mediante cromatografía iónica (Chromatograph Metrohm, Switzerland). El valor del pH se midió con un pH-metro Cryson-507 (Cryson Instruments S.A., Barcelona, Spain). La conductividad eléctrica y los sólidos disueltos totales (SDT) se determinaron usando un conductivímetro multi-rango Cryson-HI8734 (Cryson Instruments, S.A., Barcelona, Spain) y la turbidez se midió con un turbidímetro Dinko-D-110 (Dinko Instruments S.A., Barcelona, Spain).

La calidad microbiológica del agua de riego se analizó mediante la detección del número total de coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* presentes en 100 mL de agua (APHA, 1985). Las muestras se filtraron utilizando un sistema de vacío, a través de un filtro de membranas estériles de tamaño de poro de 0,45 µm (Millipore, Billerica, USA). La formación de colonias se obtuvo después de la incubación durante 24 horas sobre la superficie de placas de agar Chromocult (Merck, Darmstadt, Germany). Las temperaturas de

incubación fueron de 37°C para los coliformes totales y *E.coli*, así como de 44,5°C para los coliformes fecales. El contenido microbiano se expresó como log de unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc mL⁻¹). Para la detección de *E.coli* O157:H7, los medios enriquecidos se prepararon vertiendo 25 mL de muestra de agua dentro de bolsas Stomacher estériles y añadiendo 225 mL de caldo de triptona de soja modificado mTSB + Novobiocina (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK). Una vez homogenizados, los medios enriquecidos se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, los medios enriquecidos se esparcieron sobre placas Petri conteniendo Agar Sorbitol MacConkey (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain) y suplementos CT (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C. Las posibles colonias de *E.coli* O157:H7 (sin color) se seleccionaron y almacenaron en tubos eppendorf con caldo de soja con triptona + 10% glicerol a -20°C, antes de llevar a cabo un análisis por PCR (Manafi y Kneifel, 1989). El recuento de huevos de helmintos se llevó a cabo siguiendo el método Bailenger (1979).

3.4.- Análisis de sustrato

Las muestras de sustrato se almacenaron y se enviaron a un laboratorio de análisis externo (Fitosoil). Los contenidos de Na, Ca y Mg se determinaron en un extracto del sustrato utilizando un dispositivo de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) y el contenido de cloruros se analizó mediante cromatografía iónica. La CE se determinó con un conductímetro sobre un extracto del sustrato saturado de agua.

3.5.- Análisis del material vegetal

3.5.1.- Crecimiento y desarrollo

3.5.1.1.- Biomasa

Para el estudio de las medidas relacionadas con el crecimiento se seleccionaron plantas representativas a las que se eliminó el sustrato para aislar el material vegetal de cada una de ellas (hojas, tallos y raíz)). Los pesos frescos (PF) se determinaron y después, tras el correspondiente secado en la estufa a 80°C hasta peso constante, se calcularon los pesos secos (PS). Posteriormente, se obtuvieron los cocientes entre el peso seco de la raíz

peso seco de la parte aérea y la succulencia aérea (que relaciona el peso fresco aéreo / peso seco aéreo). Por último, también se determinó el número de hojas y el área foliar total con la ayuda de un medidor de área foliar AM 200 (ADC BioScientific Ltd., Herts, England), (Fotografía MM.3)



Fotografía MM.3.- Medidor de área foliar AM 200.

También, se calcularon los siguientes índices de crecimiento:

- a) SLA, (*Specific Leaf Area* o área foliar específica). El SLA, que indica la relación entre el área y el peso foliar, se calculó mediante la expresión: $SLA = \text{área foliar} / \text{PS hojas}$.
- b) LWR (*Leaf Weight Ratio* o la relación inversa del SLA). El LWR, que informa de la fracción de la biomasa total conservada en las hojas, se obtuvo de acuerdo con la expresión: $LWR = \text{PS hojas} / \text{área foliar}$
- c) LAR (*Leaf Area Ratio* o relación de superficie foliar). El LAR, que refleja el tamaño de la superficie fotosintética con relación a la masa que respira, se calculó mediante la fórmula: $LAR = \text{área foliar} / \text{PS total}$.

3.5.1.2.- Altura y tasa de crecimiento:

En las plantas se realizaron medidas periódicas de la altura y de la tasa de crecimiento relativa. Dicha tasa se calculó teniendo en cuenta el aumento de altura entre dos medidas consecutivas con respecto a la altura inicial.

3.5.2.- Determinación de solutos inorgánicos

3.5.2.1.- Contenido mineral

El contenido de solutos inorgánicos se determinó en hojas, tallos y raíces. Los elementos analizados fueron: Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, B, P, S, Al, Pb, Cd, Cr, Ni, As, Be, Bi, Co, Li, Mo, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, V. Se determinaron en un extracto de digestión con $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ (2:1, v/v) mediante un dispositivo de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES IRIS INTREPID II XDL), (Fotografía MM.4) .



Fotografía MM.4.- ICP-OES (dispositivo de plasma acoplado inductivamente).

Los aniones analizados fueron: fluoruros, cloruros, nitritos, bromuros, nitratos, fosfatos y sulfatos. Se determinaron en un extracto de digestión con agua destilada, previamente filtrados por medio de filtros de tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$, utilizando un Cromatógrafo Iónico Metrohm (CIM), (Fotografía MM.5).



Fotografía MM.5.- Cromatógrafo iónico.

También, se analizó la concentración de cloruros mediante un analizador de cloruros (Chloride Analyser Model 926, Sherwood Scientific Ltd, UK), en el extracto acuoso obtenido mediante la mezcla de 100 mg de polvo vegetal seco con 40 mL de agua destilada, después de 30 minutos de agitación y filtrado con un tamaño de poro de 0,45 μm (Fotografía MM.6).



Fotografía MM.6.- Analizador automático de cloruros modelo 926.

3.5.2.2.- Tasa de absorción de iones

La velocidad de absorción de los diferentes iones por el sistema radical se calculó considerando el contenido total de iones de cada una de las plantas muestreadas usando la fórmula descrita por Pitman (1975):

$$J = (M2-M1) / (WR*t)$$

Donde M1 y M2 corresponden a la concentración expresada en mmoles de un ion con respecto a la planta completa (vástagos+raíces), tanto al inicio (M1) como al final (M2) del experimento, t es el tiempo expresado en días y WR se calcula como $(WR2-WR1) / \ln(WR2/WR1)$, siendo WR1 y WR2 el peso seco de las raíces al inicio y al final del experimento, respectivamente.

3.5.3.- Color, contenido relativo de clorofila (CRC) y clorofila total

Las determinaciones analíticas de color se realizaron con un colorímetro de reflexión Minolta CR-10 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan), con una apertura de 8 mm de diámetro y ángulo de visión 0°, sobre fondo blanco (Fotografía MM.7).

Las características del color se estudiaron de acuerdo con las coordenadas de color de la Comisión Internacional (CIELAB). Las medidas del ángulo Hue y Croma son medidas de absorción selectiva de luz visible (McGuire, 1992). Los valores de la "Luminosidad" (L^*) están comprendidos entre 0 (negro) y 100 (blanco). La luminosidad mide la capacidad de una superficie para reflejar la luz, es decir, la mayor o menor claridad de la hoja. El "Croma" (C^*) representa la saturación del color o intensidad. Los valores bajos indican colores mates y los valores altos colores vivos e intensos. El Croma describe el grado en que tiene lugar esta absorción selectiva, lo que determina la mayor o menor viveza (saturación/palidez) del color. El "ángulo Hue" (h^*) describe la longitud a la que se absorbe el color e indica el tono o color.

Cada disparo se realizó apoyando el visor sobre el centro de una hoja madura de textura turgente con el color uniforme.



Fotografía MM.7.- Colorímetro Minolta CR-10.

La determinación de la cantidad relativa de clorofila (CRC) en hojas se realizó con un medidor Minolta SPAD-502 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan), (Fotografía MM.8).



Fotografía MM.8.- Medidor de clorofila Minolta SPAD-502.

La determinación de clorofila total se realizó en hojas siguiendo el protocolo de Inskeep y Bloom (1985). Se emplearon 3 hojas por planta que se trocearon finamente. Se incubaron 300 mg de material foliar con 3 mL de Dimetilformamida (DMF) en un bote de centelleo. Las muestras se incubaron en oscuridad, durante 3 días, a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se sometieron a agitación constante, durante 24 horas, hasta que todos los trozos de material foliar presentaban color blanco, lo que indicaba una extracción óptima de todas las clorofilas presentes en las hojas. Por último se determinó la absorbancia a 647 nm (valor a) y 664,5 nm (valor b), frente a un blanco que contenía DMF.

Para determinar la cantidad de clorofila a, de clorofila b y de clorofila total de la hoja (en mg/mL) se aplicó un factor de dilución de 0,1 (0,3 g/3 mL) y las siguientes formulas:

$$\text{Clorofila b} = 20,70 \text{ Abs}_{647} - 4,62 \text{ Abs}_{664,5}$$

$$\text{Clorofila a} = 12,70 \text{ Abs}_{664,5} - 2,79 \text{ Abs}_{647}$$

$$\text{Clorofila total} = 17,90 \text{ Abs}_{647} + 8,08 \text{ Abs}_{664,5}$$

3.5.4.- Relaciones hídricas

3.5.4.1.- Potencial hídrico y sus componentes

Las medidas de potencial hídrico (Ψ_h) se realizaron durante las horas centrales de iluminación diurna en la cámara de crecimiento. Las medidas se llevaron a cabo con una cámara de presión (Soil Moisture Equipment Co., Santa Bárbara, CA, USA, mod. 3000) según la técnica descrita por Scholander *et al.*, (1965) (Fotografía MM.9). Las hojas se envolvieron en una bolsa de plástico y se colocaron rápidamente en la cámara de presión (Turner, 1988). Una vez cerrado el dispositivo la presión se incrementó a razón de 0,03 MPa/s utilizando gas nitrógeno



Fotografía MM.9.- Cámara de presión Soil Moisture mod. 3000

El potencial osmótico (Ψ_o) se midió con un osmómetro de presión de vapor Wescor 5520, (Wescor Inc., Logan, UT, USA) (Fotografía MM.10). El osmómetro había sido previamente calibrado con disoluciones de osmolalidad conocida. Las hojas recién cortadas se envolvían en papel de aluminio, se introducían en nitrógeno líquido (-196°C) y se almacenaban a -30°C para romper las membranas celulares, con lo que el componente de turgencia se anula (Ψ_p) y el potencial hídrico resulta análogo al osmótico. Antes de realizar las medidas, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se colocaron en una jeringa y en el jugo celular exprimido se midió el potencial osmótico, de acuerdo con Gucci (1991).

El potencial de presión (Ψ_p) se calculó como la diferencia entre el potencial hídrico y el potencial osmótico.



Fotografía MM.10.- Osmómetro de presión de vapor Wescor 5520.

3.5.4.2.- Potencial osmótico saturado

Las hojas escogidas para la determinación del potencial osmótico saturado (Ψ_{os}) se colocaron sumergiendo sus pecíolos en vasos con agua destilada. Estos vasos se pusieron a 4°C y en la oscuridad. Después de 24 horas, una vez alcanzada la máxima turgencia, las hojas se secaron con papel de filtro para eliminar el agua superficial y se envolvieron en papel de aluminio. Rápidamente, se introdujeron en nitrógeno líquido, determinando posteriormente el potencial osmótico a máxima saturación mediante el mismo procedimiento señalado anteriormente para la medida del potencial osmótico (Ψ_o), (Fotografía MM.10).

3.5.4.3.- Análisis de Curvas P-V

Para realizar el estudio e interpretación de las curvas presión-volumen (P-V) se procedió al muestreo de hojas que se cortaron al inicio del día y se sometieron a una completa saturación, durante 24 horas en oscuridad, sumergiendo sus pecíolos en un vaso con agua destilada (Davies y Money, 1986; Yoon y Ritcher, 1990). Al día siguiente se elaboraron las curvas P-V por el método de la libre deshidratación o libre transpiración, ya que de esta

manera se pueden procesar varias hojas a la vez en una misma cámara y se simula mejor el modo natural de la deshidratación vegetal (transpiración estomática y cuticular), en lugar de utilizar, un empuje artificial para llevar el agua por el tallo o pecíolo hasta la superficie del corte (Hinckley *et al.*, 1980). La técnica de libre transpiración para la obtención de curvas P-V (Tyree y Hammel, 1972), constituye un método fiable para la cuantificación de parámetros hídricos y es, por tanto, una herramienta muy empleada en la investigación de las relaciones hídricas en las plantas. Con este procedimiento se permite que la hoja se vaya secando bajo las condiciones ambientales del laboratorio (Hinckley *et al.*, 1980; Kikuta *et al.*, 1985).

El contenido hídrico se determinó midiendo los cambios de peso fresco que se producían durante el período de desecación. Una vez hidratada la hoja, se cortó la base del pecíolo con una cuchilla y se obtuvo el peso de la hoja con una balanza de 0,1 mg de precisión, así como el potencial hídrico (Ψ_h) inicial con la cámara de presión. La hoja se secó progresivamente fuera de la cámara, en las condiciones ambientales del laboratorio y se midió su peso fresco y potencial hídrico a intervalos regulares (durante varias horas). La velocidad de presurización y despresurización era de 0,02 MPa s⁻¹. En cada medida de Ψ_h se obtuvo un valor del peso fresco justo inmediatamente después que se empleó para el cálculo del contenido relativo de agua (CRA).

Tras la realización de las medidas, las hojas se secaron en estufa a 80 °C durante 72 horas y se obtuvo el peso seco para el cálculo de los parámetros referentes al contenido relativo de agua según Barrs (1968).

La variable representada frente a la inversa del potencial hídrico ($1/\Psi_h$) es el contenido relativo de agua (CRA) (Wilson *et al.*, 1979, 1980; Kikuta *et al.*, 1985; Turner *et al.*, 1987; Saruwatari y Davis, 1989).

A partir de las isothermas de ψ_h se estimaron los siguientes parámetros (Turner, 1988):

- a) el contenido relativo de agua apoplástica (CRA_a)
- b) el potencial osmótico a máxima saturación (Ψ_{os})
- c) el contenido relativo de agua en el punto de pérdida de turgencia (CRA_{ppt})
- d) el potencial hídrico en el punto de pérdida de turgencia (Ψ_{ppt})
- e) el módulo de elasticidad al 100% del CRA (ϵ).

El CRA_a se calculó mediante la extrapolación al eje de abscisas de la porción lineal de la curva correspondiente a la representación $1/\Psi_h$ vs CRA mientras que el Ψ_{os} se estimó extrapolando la parte de la curva que es lineal hasta el eje de las ordenadas. El punto de inflexión de la curva en que ésta comienza a ser lineal corresponde al inicio de la pérdida de turgencia, donde el potencial de presión (Ψ_p) se anula, obteniéndose el potencial hídrico y el contenido relativo de agua, ambos en el punto de pérdida de turgencia. (Ψ_{ppt} y CRA_{ppt}). El módulo de elasticidad de un tejido, ϵ , se define como la variación en la presión de turgencia para un cambio determinado en el peso de agua simplástica (Tyree y Hammel, 1972; Cheung *et al.*, 1975). El módulo de elasticidad (ϵ) aumenta de forma no lineal con la presión de turgencia, hasta un máximo a partir del cual se hace constante (Cheung *et al.*, 1976). El módulo de elasticidad (ϵ) al 100% del CRA se estimó suponiendo una relación casi lineal entre el potencial de presión (Ψ_p) y el CRA, de acuerdo con el método de Wilson *et al.*, 1979. El módulo de elasticidad (ϵ) al 100% del CRA se estimó usando la fórmula:

$$\epsilon = (\text{CRA}_{\text{ppt}} \times \Psi_{os}) / (100 - \text{CRA}_{\text{ppt}})$$

La determinación del CRA_a, por extrapolación en una curva P-V se ha cuestionado (Ritcher *et al.*, 1979) dado el alto error que se puede cometer al estimar este parámetro (Wilson *et al.*, 1980), debido a la considerable extrapolación implicada (Wenkert *et al.*, 1978) y a la repetida compresión y descompresión que implica el procedimiento de la libre deshidratación. Los valores de CRA_a obtenidos en este trabajo experimental no se muestran a pesar de que la determinación del CRA_a por análisis de las curvas P-V es uno de los métodos más ampliamente aceptado (Santakumari y Berkowitz, 1989; Rascio *et al.*, 1990; Andersen *et al.*, 1991; Corcuera, 2003).

3.5.4.4.- Conductividad hidráulica

La conductividad hidráulica de las raíces se midió siguiendo el método de Ramos y Kaufmann, 1979. La raíz se lava y separa del suelo. Después se separa la parte radical de la parte aérea y la raíz se sumerge inmediatamente en un recipiente con agua y se coloca en la cámara de presión. Después de extraer el aire, se somete la raíz a una presión constante y a través de un tubo que termina en un pequeño recipiente se recoge el exudado radical y se va midiendo periódicamente. Cuando se ha terminado la medida, la raíz se coloca

en la estufa a unos 80°C hasta alcanzar un peso constante para calcular el peso seco de la raíz (Fotografía MM.11)

La conductividad hidráulica se calcula con la fórmula:

$$L_p = J / (P \times W) \text{ donde:}$$

L_p : conductividad hidráulica ($\text{mg g}^{-1} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$)

J : velocidad con la que el flujo de agua entra en el sistema radicular (mg s^{-1})

P : presión hidrostática aplicada (MPa)

W : peso seco de la raíz (g)



Fotografía MM.11.- Medida de la conductividad hidráulica de las raíces.

3.5.4.5.- Contenido relativo de agua

El contenido relativo de agua (CRA), se determinó según Barrs (1968) a partir de la siguiente expresión:

$$\text{CRA} = [(PF-PS) / (PT-PS)] * 100 \text{ donde:}$$

PF es el peso fresco, PS es el peso seco y PT el peso turgente. El peso fresco corresponde al peso de la hoja en el momento del muestreo, el peso turgente es el peso de las hojas tras su saturación en agua destilada a 4°C en la oscuridad, durante 24 horas y el peso seco es el peso de las hojas tras colocarlas en la estufa a 80°C hasta alcanzar un peso constante.

3.5.4.6.- Determinación de L-prolina

El método de determinación de L-prolina (Bates *et al.*, 1973), se fundamenta en la reacción que produce la ninhidrina con los aminoácidos. El amoniaco así formado reacciona con una segunda molécula de ninhidrina protonada para producir un pigmento, del cual sólo el átomo de nitrógeno pertenece al aminoácido. La metodología es específica para determinar el contenido de L-prolina.

Reactivos

Ninhidrina ácida: se prepara calentando 1,25 g de ninhidrina en 30 mL de ácido acético glacial y 20 mL de ácido ortofosfórico del 6M, con agitación hasta disolverlo. Se mantiene a 4° C hasta su uso, que no debe superar las 24 horas.

Ácido ortofosfórico 6M: para preparar 500 mL de este reactivo, se mezclan 346 mL de ácido ortofosfórico 85% con 154 mL de agua destilada.

Ácido sulfosalicílico al 3%: se disuelven 15 gramos de ácido sulfosalicílico en 500 mL de agua destilada.

Procedimiento

El material vegetal congelado (0,1 gramos) se homogenizó con 5 mL de ácido sulfosalicílico al 3% en un homogenizador Ultra-Turrax a máxima velocidad. El extracto obtenido se centrifugó durante 10 minutos a una velocidad de 12000 x g. Para la reacción se mezcló 1 mL del sobrenadante con 1 mL de ninhidrina ácida y 1 mL de ácido acético glacial. Esta mezcla se incubó en un baño a 100°C durante una hora. Transcurrido dicho tiempo la reacción se enfrió en baño de hielo durante, al menos, 5 minutos. Posteriormente, la mezcla de reacción se sometió a una extracción con 2 mL de tolueno. Para ello la nueva mezcla se agitó vigorosamente en un vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta la separación de las dos fases. A continuación se recogió la fase superior (fase orgánica), que es la que contiene el cromóforo, midiendo su absorbancia a 520 nm frente a un blanco de tolueno puro. La concentración de L-prolina en las muestras se realizó por interpolación con una curva de calibrado de L-Prolina en un rango de concentraciones 0-0,2 mM (Tabla MM.1).

Tabla MM1.- Mezcla de reacción utilizada para la curva de calibrado de la L-prolina.

[L-Pro] (patrón)	µL de L-Pro 0,2 mM	µL ác. Sulfosalicílico 3%	Ninhidrina (mL)	ác acético glacial (mL)	Tolueno (mL)
0,2	1000	0	1	1	2
0,15	750	250	1	1	2
0,1	500	500	1	1	2
0,07	350	650	1	1	2
0,05	250	750	1	1	2
0,03	150	850	1	1	2
0,01	50	950	1	1	2
0	0	1000	1	1	2

3.5.5.- Intercambio gaseoso

3.5.5.1.- Fotosíntesis y conductancia

La fotosíntesis neta (P_n) y conductancia estomática (g_s) se midieron en hojas, durante las horas centrales de iluminación diurna en la cámara de crecimiento, usando un aparato de intercambio gaseoso portátil (LI-6400; Licor Inc., Lincoln, NE, USA). La velocidad del flujo de aire circulante dentro del sistema durante el periodo de medida, fue de aproximadamente 350 mol/s, con un déficit de presión de vapor de la hoja al aire de aproximadamente 2 KPa (Fotografía MM.12).



Fotografía MM.12 .- Aparato de intercambio gaseoso portátil LI-COR Inc., LI-6400.

3.5.5.2.- Eficiencia fotosintética del fotosistema II (F_v/F_m)

Los parámetros de fluorescencia (F_v/F_m) se midieron en la superficie de las hojas y se realizaron con un fluorímetro portátil OptiScience (Mod. OS30; Opti-Sciences Inc., Tyngsboro, MA, USA). Las medidas de fluorescencia se realizaron en hojas que previamente se adaptaron a la oscuridad tras permanecer 20 minutos sin luz, antes de comenzar las medidas (Camejo *et al.*, 2005) (Fotografía MM.13)



Fotografía MM.13.- Fluorímetro portátil OS-30.

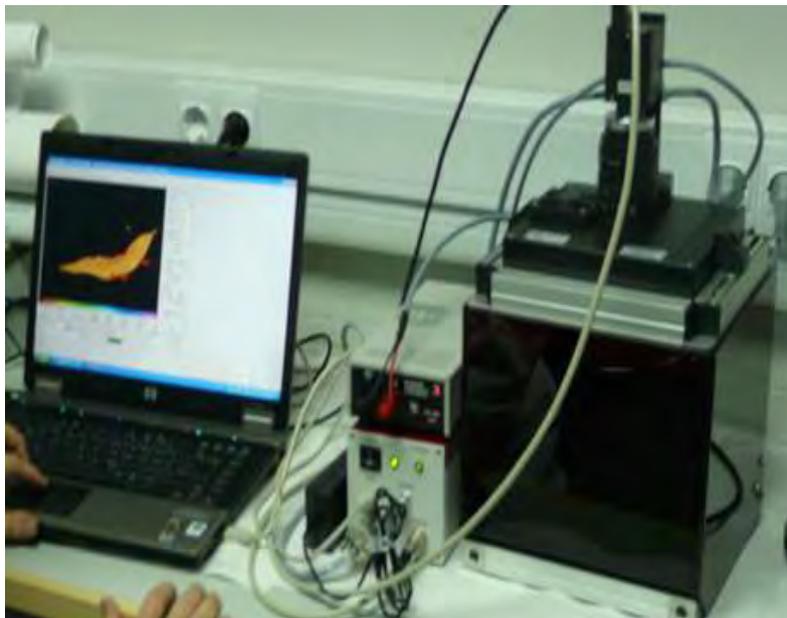
3.5.5.3.- Medida de fluorescencia de clorofilas

La fluorescencia de clorofilas en las hojas se analizó con un fluorímetro (IMAGIM-PAM M-series, Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Después de una adaptación de las hojas a la oscuridad (10 minutos) se registraron los valores de fluorescencia máxima y mínima. Se realizó un análisis cinético en presencia de luz actínica ($81 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) con pulsos repetidos de 0,8 s de luz saturante ($2700 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) a intervalos de 20 s. Se midieron parámetros relacionados con procesos fotoquímicos, como $Y(II)$, qP y F_v/F_m , y parámetros relacionados con procesos no fotoquímicos, tales como qN , NPQ y $Y(NPQ)$. El parámetro $Y(II)$ (rendimiento cuántico) mide la eficiencia de la fotoquímica del fotosistema II (PSII). En concreto mide la proporción de luz absorbida por la clorofila asociada con el PSII que es usada en procesos fotoquímicos. Otro parámetro que mide procesos fotoquímicos, en el *quenching* fotoquímico (qP). Aunque aparentemente es similar a $Y(II)$, su significado es

diferente. Así, qP mide la proporción de centros de reacción del PSII que están abiertos. Y(II) y qP están interrelacionados con un tercer parámetro, F_v/F_m , que mide la eficiencia máxima del PSII, es decir, la eficiencia cuántica si todos los centros del PSII estuviesen abiertos (Maxwell y Johnson 2000) (Fotografía MM.14).

Con respecto a los parámetros relacionados con procesos no fotoquímicos, NPQ, qN y Y(NPQ) miden cambios sobre la disipación de calor. Para analizar estos parámetros es necesario adaptar las plantas a la oscuridad. Los incrementos en estos parámetros se producen como resultado de los procesos que protegen a la hoja de daños inducidos por una alta intensidad luminosa o por otros estreses (Maxwell y Johnson 2000).

Igualmente se analizaron los valores de ETR (*Electron Transport Rate*) o velocidad de transporte electrónico. Para calcularlos se realizaron “Curvas de Luz”, que determinan la tasa de transporte electrónico ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que se establece con el incremento de la intensidad luminosa (PAR).



Fotografía MM.14.- Fluorímetro IMAGIM-PAM.

3.5.6.- Microscopia óptica de campo claro

3.5.6.1.- Inclusión de muestras en resina Spurr

Las secciones de hoja media, totalmente expandida, de 1 x 1 mm se incluyeron en resina Spurr siguiendo el siguiente protocolo:

1.- **Fijación:** Las muestras se fijaron en una disolución de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 4% en tampón fosfato sódico (TPNa) 0,1M a pH= 7,2 durante dos horas y media a 4°C.

2.-**Lavados:** Tras la fijación, se realizaron tres lavados de 15 minutos con el TPNa.

3.-**Postfijación:** Se realizó en una disolución de tetróxido de osmio al 1% en TPNa 0,1M a pH=7,2 durante dos horas, a 4°C y en oscuridad.

4.-**Lavados:** Una vez retirado el tetróxido de osmio, se realizaron dos lavados con TPNa 0,1 M pH 7,2 y un tercero durante toda la noche.

5.-**Deshidratación:** La deshidratación se realizó mediante la aplicación de una serie de concentraciones crecientes de etanol (35%, 50%, 70%, 96% y etanol absoluto), permaneciendo las muestras en cada una de ellas durante 30 minutos.

6.- **Inclusión:** Se siguió el siguiente procedimiento a 4°C:

- a) Oxido de propileno, dos cambios de 30 minutos cada uno.
- b) Oxido de propileno: Resina Spurr (1:1), durante 90 minutos.
- c) Resina Spurr, durante 24 horas.

7.- **Solidificación:** Las muestras se colocaron en moldes pretallados (Sigma) y rellenos con resina Spurr (Spurr, 1969), posteriormente se colocaron en la estufa a 68°C durante un periodo de tiempo mínimo de 16 horas.

Las secciones se obtuvieron utilizando los bloques cuya inclusión se había hecho anteriormente, realizando cortes semifinos de 0,5-0,7 μm mediante un ultramicrotomo Leica, en el servicio de Microscopia de la Universidad de Murcia. Estos cortes se montaron en un portaobjetos y fueron teñidos con una disolución de azul de toluidina al 0,5%. Las imágenes se obtuvieron con la ayuda de una lupa Olympus SZX PT en campo claro.

3.5.7.- Termografía

Las imágenes térmicas se obtuvieron con una cámara termográfica (ThermaCam FLIR-e50 System, Inc., UK). Las imágenes se obtuvieron con una resolución de 240 x 180 píxeles, operando en una longitud de onda de 7,5-13 μm , con un nivel de ruido en las diferencias de temperatura de 0,05°C a 30°C y una precisión de la lectura de 2°C del 2%. Esta cámara presenta una combinación de infrarrojo de alta resolución e imágenes del espectro visible, facilitando la identificación de las hojas en los termogramas. La temperatura de fondo necesaria para calcular las temperaturas objeto de estudio se calculó como la temperatura de radiación en un papel arrugado de aluminio colocado en una posición similar a la de las hojas interés, fijando el valor de emisividad de 1,0 (Jones *et al.*, 2002). La emisividad para la medida de las hojas se fijó a 0,96 (Jones 2004; Grant *et al.*, 2006; Leinonen *et al.*, 2006). Las imágenes se tomaron a una distancia de 0,7 m del objeto de interés. Las imágenes térmicas se procesaron con un software ThermaCam Explorer (FLIR QuickReport) (Fotografía MM.15).



Fotografía MM.15.- Cámara termográfica ThermaCam.

3.5.8.- Metabolismo antioxidativo

3.5.8.1.- Parámetros de estrés oxidativo

3.5.8.1.1.- Pérdida de electrolitos (PE)

La pérdida de electrolitos es un parámetro que informa de la alteración de la permeabilidad de las membranas celulares. La medida se llevó a cabo de

acuerdo con Lafuente *et al.* (1991). La determinación de este parámetro requiere el empleo de 30 discos foliares de 2 mm de diámetro que se incubaron en viales con 10 mL de manitol 0,3 M durante 24 horas, midiéndose la conductividad eléctrica (CE) al final de ese periodo (valor A) con un conductivímetro digital Crison Mod. 524 (Crison Instruments, S.A. Barcelona, España). Posteriormente, los tubos que contenían los discos foliares se pesaron y se calentaron a 100°C durante 10 minutos. Una vez enfriados a temperatura ambiente, los tubos se volvieron a pesar con el fin de reponer con agua destilada el volumen evaporado, manteniéndolos en agitación durante media hora. Transcurrido ese tiempo se mide la CE total (valor B) (Fotografía MM.16 A y B). La pérdida de electrolitos se expresó en % de la conductividad eléctrica total empleando la fórmula:

$$PE = (A/B) \times 100.$$



Fotografías MM16 (A y B).-Discos foliares con 10 mL de manitol 0.3 M.

3.5.8.1.2.- Peroxidación de Lípidos (PL)

Reactivos

Ácido tricloroacético 20% (TCA= Trichloroacetic acid; 20g /100 mL)

Ácido tiobarbitúrico al 0,5 % (TBA= Thiobarbituric acid; 0,5g / 100 mL)

Extracción

En el Capítulo 3, la concentración de malondialdehído (MDA) en las hojas se midió según el procedimiento descrito en Hodges *et al.* (1999). El

material foliar (0,4 g) se homogeneizó en 5 mL de etanol frío al 80% usando un homogenizador de tejidos (Ultra-Turrax; IKA-Werke, Staufen, Germany). Los homogenizados se centrifugaron a 4500 rpm durante 45 minutos a una temperatura de 4°C. Para obtener la mezcla A se hizo reaccionar un 1 mL del sobrenadante con 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y para obtener la mezcla B se hizo reaccionar 1 mL de sobrenadante con 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,5% preparado en TCA al 20%. Las mezclas de reacción se incubaron en un baño de agua a 90°C durante 1h. Después de este tiempo, las muestras se enfriaron en un baño de hielo y se centrifugaron a 12000 x g durante 10 minutos. En el caso de la mezcla A la absorbancia se midió a dos longitudes de onda (532 y 600 nm). En el caso de la mezcla B la absorbancia se midió a tres longitudes de onda (440, 532 y 600 nm).

Cálculos

$$A = ((A_{532+TBA}) - (A_{600+TBA})) - ((A_{532-TBA}) - (A_{600-TBA}))$$

$$B = ((A_{600+TBA}) - (A_{440+TBA})) * 0,0571$$

La concentración de MDA en los extractos se calculó según Arbona *et al.* (2008) aplicando la fórmula:

$$\text{Equivalentes de MDA (nmol mL}^{-1}\text{)} = ((A-B) / 157000 * 1000000).$$

En los capítulos 1, 2 y 4-5, la peroxidación de lípidos (PL) o determinación del contenido de MDA se estimó determinando la concentración de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) según Hernández y Almansa (2002). El material vegetal consistente en 0,3-0,4 g de hoja, se homogeneizó con 4 volúmenes de ácido perclórico 1 M. El homogenado se centrifugó a 15000 x g durante 10 minutos. Del sobrenadante se tomaron 0,4 mL que se mezclaron con 1,2 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,5% preparado en ácido perclórico 1 M. Esta mezcla se incubó a 90°C durante 20 minutos. La reacción se detuvo colocando los tubos en un baño de hielo. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 10000 x g durante 5 minutos, leyéndose a continuación la absorbancia a 532 nm en los sobrenadantes restándole el valor de absorbancia a 600 nm. La cantidad de TBARS se calculó usando un coeficiente de extinción molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Cakmak y Horst, 1991).

3.5.8.2.- Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS)

3.5.8.2.1.- Detección histoquímica de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La detección “*in situ*” de H₂O₂ se llevó a cabo empleando un protocolo para tinción histoquímica dependiente de peroxidasa endógena, según Hernández *et al.* (2001).

Hojas enteras procedentes de plantas que habían crecido en ausencia (controles) y en presencia de distintas concentraciones de NaCl, se sumergieron en una disolución de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (0,1 mg mL⁻¹) preparada en tampón Tris-acetato 50 mM (pH 5,0) y se infiltraron a vacío con una bomba de agua. Posteriormente, se incubaron a 25°C en oscuridad durante 4 horas. Trascorrido este tiempo, las hojas se sometieron a una decoloración controlada en presencia de etanol al 80 % (v/v) a 60°C (al baño maría), para eliminar la clorofila. Seguidamente, diferentes hojas de cada muestra, se visualizaron con la ayuda de una lupa Olympus SZX PT. Para la toma de imágenes se empleó el software ProgRes^R C10^{plus}/C12^{plus} Capture Pro.

3.5.8.2.2.- Detección histoquímica de radicales superóxido (O₂⁻)

La detección “*in situ*” de O₂⁻ se llevó a cabo empleando un protocolo basado en la reducción de sales de tetrazolio (NBT) por parte de los radicales superóxido presentes en las muestras, según Hernández *et al.* (2001).

Hojas enteras procedentes de plantas que habían crecido en ausencia (controles) y en presencia de distintas concentraciones de NaCl, se sumergieron en una disolución de NBT (0,1 mg mL⁻¹) preparada en tampón HEPES-NaOH 50 mM, pH 7,6, y se infiltraron a vacío con una bomba de agua. Posteriormente, se incubaron a 25°C en oscuridad durante 4 horas. Trascorrido este tiempo, las hojas se sometieron a una decoloración controlada en presencia de etanol al 80 % (v/v) a 60°C (al baño maría), para eliminar la clorofila. Seguidamente, diferentes hojas de cada muestra, se visualizaron con la ayuda de una lupa Olympus SZX PT. Para la toma de imágenes se empleó el software ProgRes^R C10^{plus}/C12^{plus} Capture Pro.

3.5.8.3.- Enzimas antioxidantes

3.5.8.3.1.- Homogeneización de las muestras para análisis enzimáticos

Todos los protocolos se llevaron a cabo a 4°C. Las hojas (1 g de peso fresco aproximadamente) se homogeneizaron en un mortero con 3 mL de tampón Tris-Acetato 50 mM (pH 6,0), conteniendo EDTA 0,1 mM, cisteína 2 mM y Triton X-1000 0,2% (v/v), además de PVPP (polivinilpolipirrolidona) al 2% (p/v). Para la determinación de la actividad APX se adicionó ascorbato 20 mM al medio de extracción. El extracto se filtró a través de dos capas de malla de nylon y se centrifugó a 10000 rpm, en una minicentrífuga Hettich (micro 120, Alemania), durante 20 min. Los sobrenadantes se filtraron usando columnas de Sephadex G-25 NAP (GE Healthcare) equilibradas con el tampón de extracción, en ausencia o presencia de ascorbato 2 mM.

3.5.8.3.2.- Determinación de actividades enzimáticas

Todas las determinaciones enzimáticas se realizaron con un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-1603 equipado con un termoestato que mantenía la temperatura constante a 25°C (Fotografía MM.17).



Fotografías MM.17. Espectrofotómetro UV/V de doble haz

3.5.8.3.2.1.- Ascorbato peroxidasa (APX, EC: 1.11.1.11.)

La actividad enzimática se determinó según el método de Hossain y Asada (1984) y Hiner *et al.* (2000) basado en la medida de absorbancia a 290 nm que correspondiente a la oxidación del ácido ascórbico. La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 mL, contenía ácido ascórbico 0,2 mM disuelto en tampón HEPES-NaOH 50 mM, pH 7,6; H₂O₂ 0,1 mM y 20-50 µL de muestra.

La reacción se inició al añadir el H₂O₂, a la mezcla de reacción, siguiéndose la oxidación del ascorbato a 290 nm durante 1 minuto, frente a un blanco constituido por el tampón de reacción más una cantidad de muestra igual a la usada en la reacción problema, pero sin H₂O₂. La actividad enzimática, expresada en nmoles de ácido ascórbico oxidado x min⁻¹ x mL⁻¹, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el ácido ascórbico de 2,8 mM⁻¹ x cm⁻¹ (Hossain y Asada, 1984; Hiner *et al.*, 2000).

3.5.8.3.2.2.- Catalasa (CAT, EC: 1.11.1.6)

La actividad de la enzima catalasa se midió según Aebi (1984) que está basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240 nm motivada por la desaparición del H₂O₂.

La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 mL, contenía H₂O₂ 10,6 mM en tampón fosfato potásico (TPK) 50 mM, pH 7,0. La reacción se inició por la adición de 20-100 µL de muestra, convenientemente diluida con el tampón de reacción (TPK 50 mM pH 7,0). El registro se efectuó midiendo la variación de absorbancia frente a un blanco que solo contenía el tampón de reacción. La actividad enzimática, expresada en µmoles x min⁻¹ x mL⁻¹, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el H₂O₂ de 39,58 M⁻¹ cm⁻¹ (del Río *et al.*, 1977).

3.5.8.3.2.3.- Peroxidasa (POX, EC. 1.11.1.7)

La actividad peroxidasa se empleó con método descrito por Ros-Barceló (1998) basado en la medida a 593 nm de la oxidación del 4-metoxi- α -naftol. La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 mL, contenía tampón Tris-acetato 50 mM pH 5,0; H₂O₂ 0,5 mM, 4-methoxi- α -naftol 1 mM y una cantidad de

muestra que oscilaba entre 10-25 μL . La reacción se inició por la adición de la muestra, siguiendo la oxidación del 4-methoxy- α -naftol a 593 nm durante 2 min. El registro de la reacción se efectuó midiendo frente a un blanco de tampón de reacción. La actividad enzimática, expresada como μmol de 4-metoxi- α -naftol oxidado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el 4-methoxy- α -naphthol de $21600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ros Barceló, 1998).

3.5.8.3.2.4.- Deshidroascorbato reductasa (DHAR, EC: 1.8.5.1)

La actividad enzimática se siguió con el método descrito por Dalton *et al.* (1993), con ligeras modificaciones. Consiste en la medida, a 265 nm, de la formación de ascorbato a partir de deshidroascorbato. El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 mL de una mezcla que contenía tampón fosfato potásico 100 mM, pH 6,5, con EDTA 0,1 mM, previamente burbujeado con nitrógeno y deshidroascorbato (DHA) 4 mM, glutatión reducido (GSH) 50 mM y 25-100 μL de muestra.

La reacción mide el incremento de absorbancia a 265 nm en los primeros 30-60 segundos después de la adición de DHA, frente a un blanco de muestra que no contiene extracto vegetal (tampón de reacción, DHA 4 mM y GSH 50 mM). El valor final de la absorbancia de cada reacción problema se calculó restando el valor obtenido en la medida realizada en ausencia de muestra. La actividad enzimática expresada en nmoles de ascorbato $\times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$, se calculó a partir de la velocidad inicial de la reacción y de un coeficiente de extinción molar para el ascorbato de $14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.8.3.2.5.- Monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR, EC: 1.6.5.4)

La actividad enzimática se determinó utilizando el método de Arrigoni *et al.* (1981), con algunas modificaciones, basado en la disminución de la absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación del NADH. La mezcla de reacción, con un volumen final de 1 mL, contenía tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,2; NADH 0,2 mM, ácido ascórbico 1 mM, 0,5 unidades de ascorbato oxidasa (AO) y 10-50 μL de muestra.

La reacción se inició por adición de NADH, siguiendo su oxidación durante 1 minuto frente a un blanco de muestra que contenía tampón Tris-HCl

50 mM pH 7,8; NADH 0,2 mM y la misma cantidad de muestra que en la reacción problema. La oxidación del NADH fue corregida restando el valor de absorbancia de este blanco. Como sistema generador del radical monodeshidroascorbato, se empleó una mezcla de ácido ascórbico 1 mM y 0,5 unidades de ascorbato oxidasa, necesario para conseguir un descenso de absorbancia a 265 nm comprendido entre 0,01 y 0,02 unidades por minuto. La actividad enzimática expresada en nmoles de NADH oxidado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.8.3.2.6.- Glutación reductasa (GR, EC: 1.6.4.2)

La determinación de la actividad enzimática se basó en el empleo del método de Edwards *et al.* (1990) que está basado en la medida del descenso de absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación del NADPH durante la reducción del GSSG a GSH por la acción de la enzima glutación reductasa (GR).

La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 mL, contenía tampón formado por EDTA 1 mM y MgCl_2 3mM en Tris-HCl 100 mM, pH 7,8; GSSG 0,6 mM, NADPH 0,2 mM y 20-50 μL de muestra. Durante la reacción se sigue la oxidación del NADPH durante 2 minutos tras la adición del GSSG a la mezcla de reacción (tampón de reacción, 20-50 μL de muestra y NADPH 0,2 mM), la cual habrá sido incubada previamente durante otros 2 minutos y actúa como blanco de muestra. En cada ensayo, cada medida correspondiente a la reacción problema que contenía el extracto enzimático fue corregida restando el valor obtenido en el blanco de muestra. La actividad enzimática, expresada en nmoles de NADPH oxidado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.8.3.2.7.- Superóxido dismutasa (SOD, EC: 1.15.1.1)

La actividad enzimática se estimó mediante el método descrito por McCord y Fridovich (1969). La técnica se basa en la inhibición, por la superóxido dismutasa, de la reducción del citocromo c por los radicales libres $\text{O}_2^{\cdot -}$ generados por el sistema enzimático xantina-xantina oxidasa.

El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 mL de una mezcla que contenía citocromo c 10^{-3} M y xantina 10^{-3} M, en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,8, con EDTA 0,1 mM, al que se añaden 10-25 μ L de muestra vegetal. La reacción se inició al añadir a la mezcla problema un volumen previamente determinado, mediante una reacción control, de una suspensión de xantina oxidasa preparada en el tampón utilizado anteriormente (Tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,8). La reducción del citocromo c se siguió de forma continuada a una absorbancia de 550 nm durante 2 minutos.

En primer lugar se efectuó una reacción control en ausencia de muestra. Para ello, una vez ajustado el cero del espectrofotómetro con 1 mL de mezcla de reacción, se adicionaron distintos volúmenes de xantina oxidasa (3-10 μ L), hasta obtener un Δ Abs₅₅₀/min comprendido entre 0,024 y 0,026. Una unidad de actividad SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50% en la velocidad inicial de reducción del citocromo c en la reacción control a 25 °C (McCord y Fridovich, 1969). La actividad enzimática, en U x mL⁻¹, se calculó a partir del porcentaje de inhibición producido por la muestra, según la expresión:

$$\% I = \frac{\Delta\text{Abs}_{550}/\text{min} (\text{control}) - \Delta\text{Abs}_{550}/\text{min} (\text{problema})}{\Delta\text{Abs}_{550} / \text{min} (\text{control})} \times 100$$

% Inhibición

$$\text{Unidades SOD/mL} = \frac{\% \text{ Inhibición}}{50\% \times V} \times F$$

dónde V es el volumen de la muestra utilizada expresada en mL, F el factor de dilución empleado y Δ Abs₅₅₀ es el incremento en la absorbancia a 550 nm.

3.5.8.4.- Antioxidantes no enzimáticos

3.5.8.4.1.- Análisis de ácido ascórbico y de glutatión

Para el análisis de ácido ascórbico y de glutatión, las muestras (0,5 g) se homogenizaron con nitrógeno líquido en presencia de 4 volúmenes de ácido perclórico 1 M. Las muestras se centrifugaron a 15000 x g durante 10 minutos, y 0,5 mL del sobrenadante se neutralizó con K₂CO₃ 5M hasta alcanzar un pH

5-6 (entre 30-35 μL). Las muestras se centrifugan para eliminar el precipitado de perclorato potásico que se forma. El sobrenadante neutralizado se emplea para la determinación tanto de ácido ascórbico como de glutatión (Díaz-Vivancos *et al.*, 2010).

3.5.8.4.1.1.- Determinación de ácido ascórbico

El ascorbato se midió mediante un método adaptado de Veljovic-Jovanovic *et al.* (2001). Este método mide la disminución de la absorbancia a 265 nm debida a la oxidación específica del ascorbato por acción de la enzima ascorbato oxidasa (AO). El ascorbato reducido (ASC) y su forma oxidada relativamente estable (deshidroascorbato; DHA), se miden juntos como ascorbato total después de la conversión de DHA a ASC por incubación con ditioneitol (DTT).

Para la medida de ASC la mezcla de reacción contenía 0,23 mL de agua, 0,35 mL de tampón fosfato sódico 0,2 M pH 5,6 y 20 μL de sobrenadante neutralizado, en un volumen final de 0,6 mL. Se midió la absorbancia a 265 nm hasta alcanzar un valor estable (2-5 min) y posteriormente se adicionaron 5 U de ascorbato oxidasa (AO; Sigma). Los valores de la A_{265} se tomaron 2-5 minutos después de la adición de AO y la cantidad de ASC presente en la muestra se calculó mediante la fórmula: $A_{265} - (A_{265} + \text{AO})$, expresándose en $\mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$ a partir del coeficiente de extinción molar para el ácido ascórbico ($2,8 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

Para el ensayo del ascorbato total (ASCt), 0,1 mL de sobrenadante neutralizado se mezclaron con 0,14 mL de NaH_2PO_4 0,12 M (pH 7,5) y 10 μL de DTT 25 mM. La determinación espectrofotométrica del ASCt se realizó como se ha descrito anteriormente para el ascorbato reducido. El ASC oxidado (DHA) se calcula por la diferencia entre el ASCt y el ASC.

$$\text{AO (DHA)} = \text{ASC total} - \text{ASC}$$

3.5.8.4.1.2.- Determinación del glutatión

El glutatión reducido (GSH), su forma oxidada (GSSG) y el contenido total de glutatión (GSH+GSSG) se analizaron usando ácido 5,5'-ditio-bis (2 nitro benzoico) (DTNB) y glutatión reductasa (GR, Sigma) en presencia de NADPH (Noctor y Foyer, 1998).

La reacción de cuantificación del contenido total de glutatión se llevó a cabo en un lector de placas según Queval y Noctor (2007). La reacción consistió en una mezcla de 0,1 mL NaH_2PO_4 0,2 M pH 7,5 conteniendo EDTA 10 mM; 10 μL NADPH 10 mM; 10 μL DTNB 12 mM; 10 μL de GR 20 U/mL y 10 μL extracto neutralizado, siguiendo el incremento de absorbancia a 412 nm durante dos minutos debido a la reacción del DTNB con el grupo tiol del GSH. El DTNB, al reaccionar con el GSH da lugar a dos moléculas de tionitrobenzoato, el cual absorbe a 412 nm, por escisión de su puente disulfuro (Griffith, 1985).

Para la medida de GSSG, 0,1 mL de sobrenadante neutralizado se mezclaron con 3 μL de 2-vinilpiridina. La mezcla se agitó vigorosamente hasta la emulsión y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. El reactivo 2-vinilpiridina bloquea los grupos tiol del GSH y se añade para enmascarar el GSH en la cuantificación. La determinación de GSSG se realiza de la misma manera que para el glutatión total.

Para calcular los contenidos de glutatión, los datos de $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ obtenidos se interpolaron en una recta de calibrado calculada previamente a partir de concentraciones de GSH conocidas (0-100 μM). Una vez conocidos los datos correspondientes al glutatión total y al oxidado, los contenidos de glutatión reducido (GSH) se calculan restando al valor del glutatión total el valor del oxidado según la fórmula:

$$\text{GSH} = \text{Glutatión total} - \text{GSSG}.$$

3.5.9.- Perfil hormonal

Las hormonas vegetales, ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), jasmonatos (JA) y ácido indolacético (AIA) presentes en hojas se analizaron mediante HPLC acoplado a un espectrómetro de masas como se describe en (Durgbanshi *et al.*, 2005; Arbona y Gómez-Cadenas, 2008).

El material vegetal fresco (200 mg de hojas) se pesó y se incorporó a tubos de centrifuga de 15 mL. El siguiente paso consiste en añadir 50 μL de estándar interno. Posteriormente se adicionan 5 mL de agua destilada y se homogeniza con el Ultra-Turrax, realizando pulsos de 20 segundos durante 1 minuto y 40 segundos (20 segundos triturando y 20 segundos de descanso). El material vegetal triturado y homogenizado se centrifuga a 4500 rpm durante 30 minutos. Una vez terminada la centrifugación se recoge el sobrenadante en un

tubo nuevo. El sobrenadante se acidifica con ayuda de una sonda fina, añadiendo ácido acético al 30%, hasta alcanzar valores de pH= 2,8-3,2 (este es un paso crítico por lo que es importante controlar los valores de pH). A continuación, se realiza la partición líquido-líquido con dietiléter, añadiendo 3 mL de dietiléter a la muestra acidificada y se homogeniza con el vortex para mezclar las dos fases que se forman. El siguiente paso consiste en centrifugar el sobrenadante a 2000 rpm, durante 10 minutos, para recoger de nuevo el sobrenadante obtenido y volver a realizar una segunda partición. Es importante no arrastrar residuos al recuperar el sobrenadante. Al final se recuperan aproximadamente 4 mL de fase orgánica.

Finalmente, la fase orgánica se deseca en el Speed-vac con un programa que no proporcione calor. Esta etapa suele tardar aproximadamente 90 minutos. El pellet obtenido se resuspende con 100 µL de metanol y se sonica en el Ultrasonido durante 5-10 minutos. A continuación se le añaden 900 µl de agua Mili Q. El volumen total se homogeniza con vortex y se filtra. Para ello se emplea un filtro de acetato de 0,22 µm de tamaño de poro. El filtro se acondiciona pasándole agua tres veces y posteriormente aire hasta secarlo totalmente. La muestra filtrada se pone en un vial y queda lista para su análisis.

La muestra se resuspendió después en una disolución de agua: metanol (9:1), se filtró y se inyectó en un sistema de HPLC (Alliance 2695, Waters Corp., Milford, USA). Las hormonas se separaron a continuación en una columna C18 de fase inversa Kromasil (100 × 2,1 mm 5-µm de tamaño de partícula) usando metanol y agua ultrapura todo ello suplementado con ácido acético glacial a una concentración de 0,05% (fase móvil). El espectrómetro de masas, un triple cuadrupolo (Quattro LC, Micromass Ltd., Manchester, UK), se programó en modo de ionización por electrospray y las hormonas vegetales se detectaron de acuerdo con sus transiciones específicas usando un método de espectrometría de masas según Arbona y Gómez-Cadenas (2008).

3.5.10.- Análisis estadístico de los datos

La significación de los efectos del riego con aguas de baja calidad para los capítulos 1, 2 y 3 se analizó mediante un análisis de varianza simple (ANOVA) usando STATGRAPHICS PLUS para Windows. Las medias de los tratamientos fueron separadas con la Prueba de Rango Múltiple de Duncan ($P < 0,05$).

La significación de los efectos de los distintos tratamientos salinos para el capítulo 4-5 reflejada por el valor de F se llevó a cabo mediante un análisis de varianza simple (ANOVA), por medio del programa estadístico SPSS para Windows. Las medias de los tratamientos fueron separadas en grupos homogéneos con la Prueba de Rango Múltiple de Duncan ($P < 0,05$).

4.- Capítulo 1. Efecto del riego con aguas residuales depuradas con distintos niveles de salinidad en el comportamiento de *Eugenia myrtifolia* L.

4.- Efecto del riego con aguas residuales depuradas con distintos niveles de salinidad en el comportamiento de *Eugenia myrtifolia* L.

4.1.- Introducción

Diversos estudios han puesto de manifiesto el interés agronómico y medioambiental que puede tener el uso de aguas regeneradas, previamente tratadas, conocidas como aguas residuales depuradas (ARD), para el riego de algunas especies vegetales (Wu *et al.*, 1995; Parsons *et al.*, 2001; Pedrero y Alarcón 2009; Pedrero *et al.*, 2010, 2012). Aunque se conocen ciertos beneficios de utilizar dichas aguas, éstas generalmente son de baja calidad, ya que contienen altas concentraciones de sales. Sin embargo, el impacto que estos compuestos produzcan sobre el desarrollo de las plantas dependerá del origen y tratamiento de las aguas en cuestión y de la tolerancia a estas sales de la especie que se esté tratando (Bañón *et al.*, 2011; Miralles *et al.*, 2011; Valdés *et al.*, 2012; Gómez-Bellot *et al.*, 2013a y 2013b; Cassaniti *et al.*, 2013).

El objetivo de este ensayo consiste en estudiar el impacto que producen ciertas aguas regeneradas, de distinta procedencia y composición, sobre el desarrollo y calidad de plantas de *E. myrtifolia*. Se analiza el comportamiento de algunos parámetros fisiológicos relacionados con el agua en la planta y con la eficiencia fotosintética. También se describen los niveles de los iones inorgánicos más fitotóxicos (Cl^- , Na^+ , B^{3+}) presentes en estas aguas, que se acumulan en un volumen reducido de sustrato y, a su vez, en las distintas partes de la planta. Además, se presta atención al efecto que el riego con este tipo de aguas produce sobre la actividad de algunas enzimas antioxidantes. Por otra parte, también se describe el efecto sobre los niveles de peroxidación de lípidos, que es un parámetro de estrés oxidativo utilizado como marcador de daños en membranas. Todos estos estudios se llevaron a cabo en condiciones ambientales controladas para evitar otros posibles efectos añadidos debidos a las variables climáticas.

4.2.- Material y métodos

4.2.1.- Material vegetal y condiciones experimentales

Se emplearon 120 plantas de *Eugenia myrtifolia*, las cuales fueron trasplantadas a macetas de 14 x 12 cm de diámetro (1,2 L), usando como sustrato una mezcla de fibra de coco, turba (negra y rubia) y perlita en proporción (8:7:1) y abonadas con osmocote plus (2 g L⁻¹ de sustrato) (14:13:13 N, P, K + microelementos). El ensayo se realizó en una cámara de crecimiento controlado, simulando los cambios naturales de temperatura (23°C/18°C día/noche), luz (350 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidad luminosa) y HR (55%-70%). Las plantas quedaron distribuidas en 3 bloques al azar, conteniendo, cada uno, 4 bandejas con 10 plantas (40 plantas por bloque). Cada una de estas 4 bandejas de un bloque recibía un tratamiento distinto

4.2.2.- Tratamientos

Durante 4 meses (fase I), se aplicaron un tratamiento control dónde la CE del agua de riego era de 0,8 dS m⁻¹ (indicando que su uso no es restrictivo o peligroso según las clasificaciones de la FAO) y 3 tipos de aguas residuales depuradas (ARD) procedentes de distintas estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) localizadas en Murcia (España): ARD1 (CE= 1,7 dS m⁻¹) localizada en Jumilla, ARD2 (CE= 4 dS m⁻¹) localizada en Campotejar y ARD3 (CE= 8 dS m⁻¹) localizada en Mazarrón. Las clasificaciones de la FAO indican severas restricciones a la hora de usar las dos últimas aguas. En las EDAR se aplica un tratamiento convencional de fangos activos seguido de un tratamiento terciario con radiación ultravioleta. Al comienzo del periodo experimental se analizaron las propiedades químicas de las distintas aguas utilizadas. Las concentraciones de los iones Na⁺, Cl⁻ y B³⁺ fueron analizadas:

Control (Na= 140 mg L⁻¹; Cl= 184 mg L⁻¹; B= 0,13 mg L⁻¹), ARD1 (Na= 260 mg L⁻¹; Cl= 720 mg L⁻¹; B= 0,18 mg L⁻¹), ARD2 (Na= 362 mg L⁻¹; Cl= 862 mg L⁻¹; B= 0,55 mg L⁻¹) y ARD3 (Na= 1492 mg L⁻¹; Cl= 1557 mg L⁻¹; B= 1,26 mg L⁻¹).

El riego se aplicaba dos días por semana, pesando las macetas para que alcanzasen el mismo valor en todas ellas, sin superar la capacidad de campo, por lo que no fue aplicado ningún tipo de drenaje. Después de la fase de estrés (fase I), todas las plantas se sometieron a un periodo de recuperación de 2 meses (fase II), donde las plantas fueron regadas como los controles.

4.2.3.- Medidas relacionadas con el crecimiento

En tres momentos concretos: al inicio del ensayo (antes de imponer los tratamientos), al final de la fase I y al final de la fase II para cada tratamiento, se seleccionaron 6 plantas, en las que el sustrato fue cuidadosamente eliminado de las raíces, quedando separado el material vegetal fresco de cada una de ellas. Con el fin de medir los distintos pesos secos, el material vegetal fresco se secó en la estufa a una temperatura de 80°C hasta alcanzar un peso constante.

El diámetro del tallo se midió utilizando un pie de rey. También, el cociente raíz / parte aérea se determinó en las mismas plantas dividiendo el peso seco de la raíz por el peso seco de la parte aérea (hojas más tallos). El número de hojas y el área foliar (cm²) se determinó en las mismas plantas usando un medidor de área foliar (AM 200; (ADC BioScientific Ltd., Herts, England). Con los datos obtenidos se calcularon los siguientes índices de crecimiento: SLA, (Specific Leaf Area o área específica foliar), LWR (Leaf Weight Ratio o la inversa de SLA) y LAR (Leaf Area Ratio o relación de superficie foliar).

A lo largo del ensayo se midió la altura de la planta utilizando 20 plantas por tratamiento y la tasa de crecimiento relativa que se calculó teniendo en cuenta el aumento de altura entre dos medidas consecutivas con respecto a la altura inicial.

4.2.4.- Relaciones hídricas e intercambio gaseoso

Periódicamente se midieron, en 6 plantas por tratamiento durante las horas centrales de iluminación, cambios en el potencial hídrico foliar (Ψ_h), en el contenido relativo de agua (CRA), en la conductancia estomática (g_s) y en la tasa de fotosíntesis neta (P_n). Los Ψ_h se estimaron de acuerdo con Scholander *et al.* (1965), usando una cámara de presión (Model 3000; Soil Moisture Equipment Co., Santa Barbara, CA, USA). El CRA en las hojas se midió según Barrs *et al.* (1968). La g_s y la P_n se determinaron en hojas totalmente expandidas usando un aparato de intercambio gaseoso portátil (LI-6400; LICOR Inc., Lincoln, NE, USA). Al final de la fase I y de la fase II se midió la conductividad hidráulica de las raíces (L_p) en 6 plantas por tratamiento según el método descrito por Ramos y Kaufmann (1979), usando una cámara de presión (Model 3000; Soil Moisture Equipment Co., Santa Barbara, CA, USA).

4.2.5.- Eficiencia fotosintética del fotosistema II (F_v/F_m), clorofila y color.

Las determinaciones analíticas de la eficiencia fotosintética, de la clorofila y del color se realizaron, periódicamente, en diez hojas por tratamiento con el color uniforme y de textura turgente (hojas maduras) de la zona media de la planta. Los valores para obtener el cociente F_v/F_m se obtuvieron con un fluorímetro portátil OptiScience (Mod. OS 30; Opti-Sciences Inc., Tyngsboro, MA, USA). La determinación de la cantidad relativa de clorofila (CRC) se hizo con un medidor Minolta SPAD-502 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) y las medidas de color se realizaron con un colorímetro de reflexión Minolta CR-10 colorimeter (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan).

4.2.6.- Análisis de las distintas aguas usadas en el ensayo, contenido mineral, tasa de absorción y análisis del sustrato

Las medidas de los contenidos de solutos inorgánicos y la CE de las distintas aguas utilizadas en el ensayo, se realizaron al inicio del ensayo (antes de aplicar los diferentes tratamientos). La CE se determinó utilizando el equipo multirango, Cryson-HI8734 (Crisom Instruments S.A. Barcelona, Spain). Las concentraciones de Na^+ y B^{3+} se determinaron mediante el uso del espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-ICAP 6500 DUO Thermo, England) y el cloruro se analizó por cromatografía iónica con un Metrom Chromatograph (Switzerland).

Para el estudio del contenido mineral en las distintas partes de la planta, se emplearon el mismo número de plantas que para el crecimiento, las cuales se separaron en hojas, tallos y raíces, se secaron a $80^{\circ}C$ y se almacenaron a temperatura ambiente para proceder al análisis de solutos inorgánicos. La concentración de Cl^- se analizó mediante el uso de un analizador de cloruros (Model 926 Chloride Analyser, Sherwood Scientific Ltd.) La concentración de Na^+ , B^{3+} , K^+ y Ca^{2+} se determinó mediante el uso del espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES IRIS INTREPID II XDL). La tasa de absorción de los iones Na^+ , Cl^- , B^{3+} , K^+ y Ca^{2+} se calculó al final de la fase I y al final de la fase II según la fórmula descrita por Pitman (1975).

Seis muestras de sustrato se almacenaron y se enviaron a un laboratorio de análisis externo (Fitosoil) al final del periodo de salinidad (fase I). El sustrato se secó a temperatura ambiente durante una semana. Los

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

contenidos Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} se determinaron en un extracto saturado de agua con un plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) y el contenido de cloruros se analizó mediante cromatografía iónica. La CE se determinó sobre un extracto saturado de agua del sustrato con un conductivímetro.

4.2.7.- Metabolismo antioxidativo

Los análisis relacionados con el metabolismo antioxidativo (determinación de la actividad de enzimas antioxidantes) y parámetros de estrés oxidativo (peroxidación de lípidos) se explican en el Apartado General de Material y Métodos. En este experimento los parámetros se midieron en hojas frescas procedentes de 5 plantas por tratamiento al final de la fase I.

4.2.8.- Análisis estadístico de los datos

La significación de los efectos de las distintas aguas residuales (o de los diferentes tratamientos) fue analizada mediante un análisis de varianza simple (ANOVA) por medio del programa estadístico STATGRAPHICS PLUS para Windows. Las medias de los tratamientos fueron separadas con la prueba de Rango Múltiple de Duncan ($P < 0.05$).

4.3.- Resultados

4.3.1.- Crecimiento y distribución de biomasa

A los cuatro meses del inicio de la aplicación de los distintos tratamientos (fase I), la producción de biomasa de la parte aérea disminuyó en las plantas regadas con ARD, lo que se debió a una reducción del peso seco de las hojas y no a la de los tallos, donde no hubo diferencias significativas (Tabla 1.1). La biomasa de las raíces no se vio afectada por los tratamientos de riego, sin embargo el cociente peso seco raíz/peso seco parte aérea aumentó por efecto de las sales. Concretamente se observó un aumento del 61%, 42%, 93% para los tratamientos ARD1, ARD2 y ARD3, respectivamente, en comparación con el control. El peso seco total de la planta disminuyó conforme aumentaba la salinidad de los tratamientos (20%, 30% y 51% para los tratamientos ARD1, ARD2 y ARD3, respectivamente). El diámetro del tallo principal de las plantas se redujo de forma significativa en ARD2 y ARD3. El

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

área foliar disminuyó en todas las plantas regadas con ARD, de forma más marcada en ARD3, alrededor de un 80%. El número total de hojas sólo disminuyó significativamente en este último tratamiento (Tabla 1.1).

Tabla 1.1.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre diferentes parámetros de crecimiento en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I.

Parámetros	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	ARD3	
Diámetro tallo (mm)	4,94±0,13c	4,76±0,21bc	4,40±0,09b	3,78±0,08a	***
Peso seco hoja (g pl ⁻¹)	4,05±0,46c	2,61±0,35b	2,24±0,41ab	1,25±0,35a	**
Peso seco tallo (g pl ⁻¹)	1,70±0,15	1,37±0,17	1,52±0,29	1,15±0,13	n.s
Peso seco aéreo (g pl ⁻¹)	5,75±0,61b	3,98±0,45a	3,76±0,68a	2,40±0,41a	**
Peso seco raíz (g pl ⁻¹)	1,88±0,18	2,11±0,23	1,65±0,14	1,51±0,21	n.s
Peso seco total (g pl ⁻¹)	7,63±0,74c	6,08±0,64bc	5,41±0,74a	3,91±0,62a	**
P.S. Raíz/P.S. Aéreo	0,33±0,03a	0,53±0,04bc	0,47±0,07ab	0,64±0,04c	**
Nº de hojas totales	293±31b	250±24b	215±19b	113±24a	**
Área foliar total (cm ²)	1031±169c	645±81b	465±31ab	205±50a	***

Los datos representan los valores medios ± error estándar de 5 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.00$ y n.s: diferencias no significativas.

La distribución de la biomasa en las distintas partes de la planta se aprecia en la Figura 1.1. La biomasa de las hojas, en relación a la biomasa total de la planta, disminuyó proporcionalmente con el nivel de salinidad aplicado. Por el contrario, la biomasa de las raíces, en relación con el total de biomasa de la planta, aumentó por efecto de los tratamientos (40% 27% y 57% para ARD1, ARD2 y ARD3, respectivamente).

Con respecto a los índices de biomasa, el área específica foliar, SLA (*Specific Leaf Area*) y la relación de superficie foliar, LAR (*Leaf Area Ratio*) disminuían con la salinidad de los tratamientos, sobre todo en ARD3. En este sentido, se observó un descenso del 33% para SLA y del 62% para el LAR. La inversa del SLA, conocida como, LWR (*Leaf Weight Ratio*), aumentó significativamente en el tratamiento ARD3 (1,5 veces con respecto al tratamiento control) (Tabla 1.2).

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

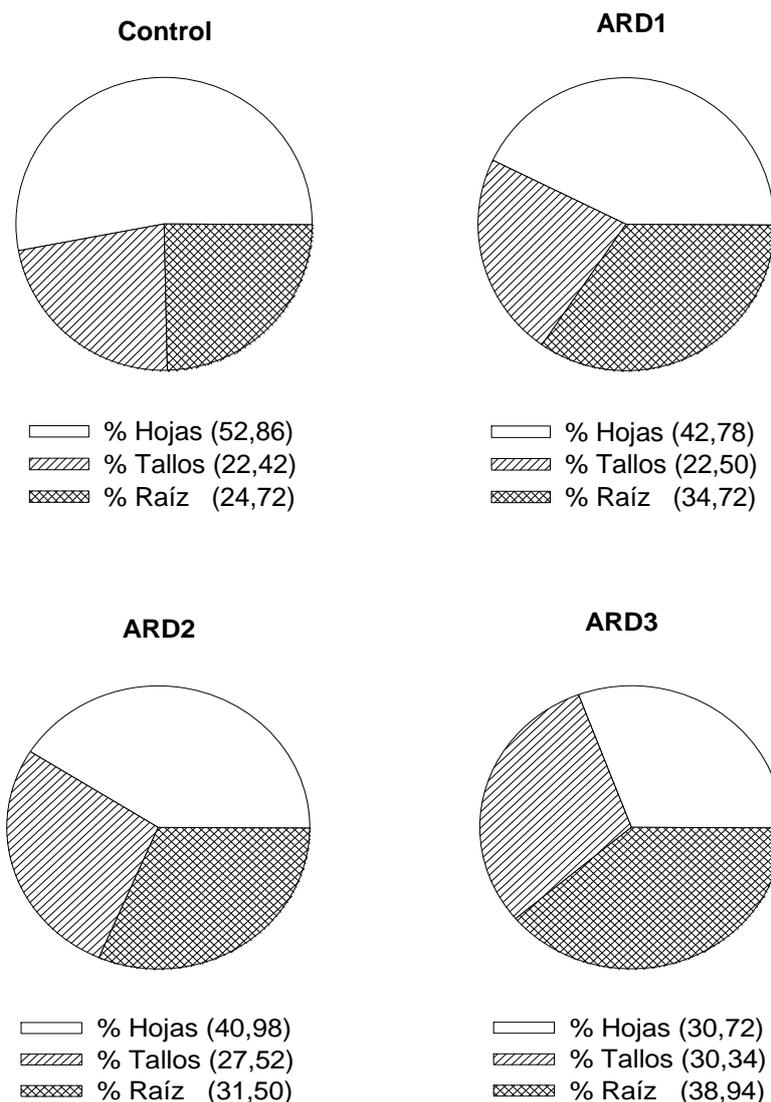


Figura 1.1.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas en la distribución de biomasa en las distintas partes de las plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I.

Tabla 1.2- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre diferentes índices de crecimiento en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I.

Índices	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	ARD3	
SLA x 10 ²	2,50±0,13b	2,48±0,04b	2,26±0,37ab	1,67±0,05a	*
LWR	40,26±1,99a	40,39±0,65a	48,31±8,40ab	59,98±1,91b	*
LAR x 10 ²	1,33±0,09c	1,06±0,06bc	0,90±0,01b	0,51±0,07a	***

Los datos representan los valores medios ± error estándar de 5 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

Al final de este periodo (fase I), el 100% de las plantas regadas con el tratamiento ARD3 murieron, debido a que la elevada acumulación de sales en el substrato fue muy alta, como veremos más adelante (Tabla 1.5). De hecho a pesar de que, desde ese momento, todas las plantas se regaron con agua de buena calidad (fase II), no se producía la recuperación de la mayoría de los parámetros de crecimiento estudiados en las plantas regadas con el tratamiento ARD 2 (Tabla 2). Este comportamiento se apreció en el peso seco de las hojas, peso seco de la parte aérea y peso seco del total de la planta, así como en el diámetro del tallo y área foliar. Por otra parte, algunos parámetros que no habían mostrado cambios en la fase de aplicación del tratamiento ARD2 con respecto al control (fase I), sí se vieron modificados en la fase II, como ocurría con el peso seco de los tallos, el cociente entre raíz y parte aérea y el número total de hojas. La biomasa de las raíces no presentó cambios significativos en la fase II entre los diferentes tratamientos (Tabla 1.3).

Tabla 1.3.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre diferentes parámetros de crecimiento en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase II.

Parámetros	Tratamientos			P
	Control	ARD1	ARD2	
Diámetro tallo (mm)	6,16±0,19b	5,69±0,28b	4,32±0,24a	**
Peso seco hoja (g pl ⁻¹)	6,79±0,75b	6,10±0,28b	2,20±0,84a	**
Peso seco tallo (g pl ⁻¹)	2,79±0,29b	2,02±0,18a	1,41±0,21a	**
Peso seco aéreo (g pl ⁻¹)	9,58±1,04b	8,12±0,44b	3,62±1,05a	**
Peso seco raíz (g pl ⁻¹)	1,95±0,24	2,38±0,46	1,60±0,58	n.s
Peso seco total (g pl ⁻¹)	11,53±1,21b	10,50±0,70b	5,22±1,62a	*
P.S. Raíz /P.S. Aéreo	0,21±0,02a	0,29±0,05ab	0,40±0,08b	*
Nº de hojas totales	457±60b	440±11b	178±59a	**
Área foliar total (cm ²)	1516±205b	1292±85b	340±135a	***

Los datos representan los valores medios ± error estándar de al menos 5 plantas diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$ y n.s: diferencias no significativas.**

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

En cuanto a la distribución de la biomasa en las distintas partes de la planta (Figura 1.2), al final de la fase II se comprobó que la biomasa de las hojas en relación con la de la planta completa fue de un 34% menor en plantas tratadas con ARD2, con respecto al control. Sin embargo, el resto de relaciones estudiadas no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos.

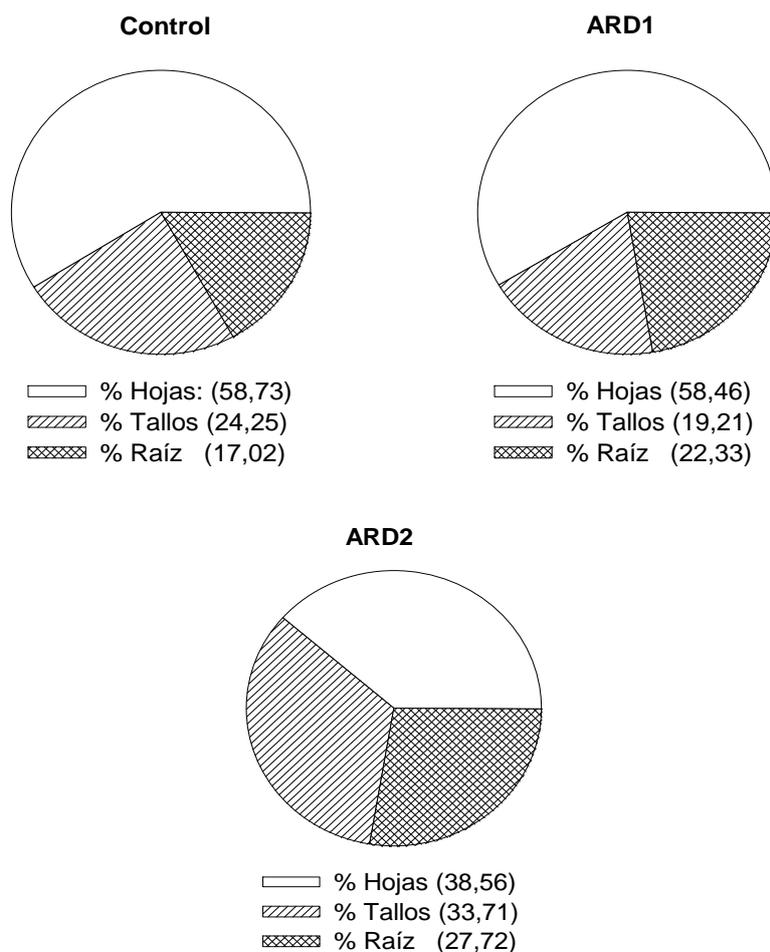


Figura 1.2.- Efecto del tratamiento con aguas residuales depuradas en la distribución de biomasa en las distintas partes de las plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase II.

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

Los índices de crecimiento SLA y LAR fueron más bajos para ARD2, concretamente un 36% y un 54%. Por el contrario, el índice LWR se incrementó en un 27% en el tratamiento ARD2 respecto a los valores control. No obstante, los tratamientos control y ARD1 presentaron valores similares para los índices de crecimiento calculados (Tabla 1.4).

Tabla 1.4- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre diferentes índices de biomasa en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase II.

Índices	Tratamientos			P
	Control	ARD1	ARD2	
SLA x 10 ²	2,20±0,10b	2,10±0,09b	1,40±0,29a	*
LWR	45,27±2,09a	47,49±1,97a	57,59±3,91b	*
LAR x 10 ²	1,30±0,05b	1,20±0,10b	0,62±0,14a	***

Los datos representan los valores medios ± error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, * $P < 0.001$.**

La altura de las plantas presentó una dinámica similar en todos los tratamientos, con la salvedad de que las plantas control, al final de la fase I resultaron ser un poco más altas. Las diferencias entre los tratamientos salinos no fueron significativas (Figura 1.3A). Al final del ensayo, las plantas de los tratamientos ARD no llegaron a alcanzar los valores de las plantas control. En la tasa de crecimiento relativa a la altura, calculada como la diferencia entre un día de medida de la altura y el anterior, a lo largo del ensayo (Figura 1.3B), se distinguen, independientemente de los tratamientos aplicados, dos periodos de crecimiento durante el ensayo: desde el inicio hasta la semana 15 se observó una caída de dicha tasa, y desde la semana 15 hasta el final del ensayo se produjo una tasa de crecimiento más estable.

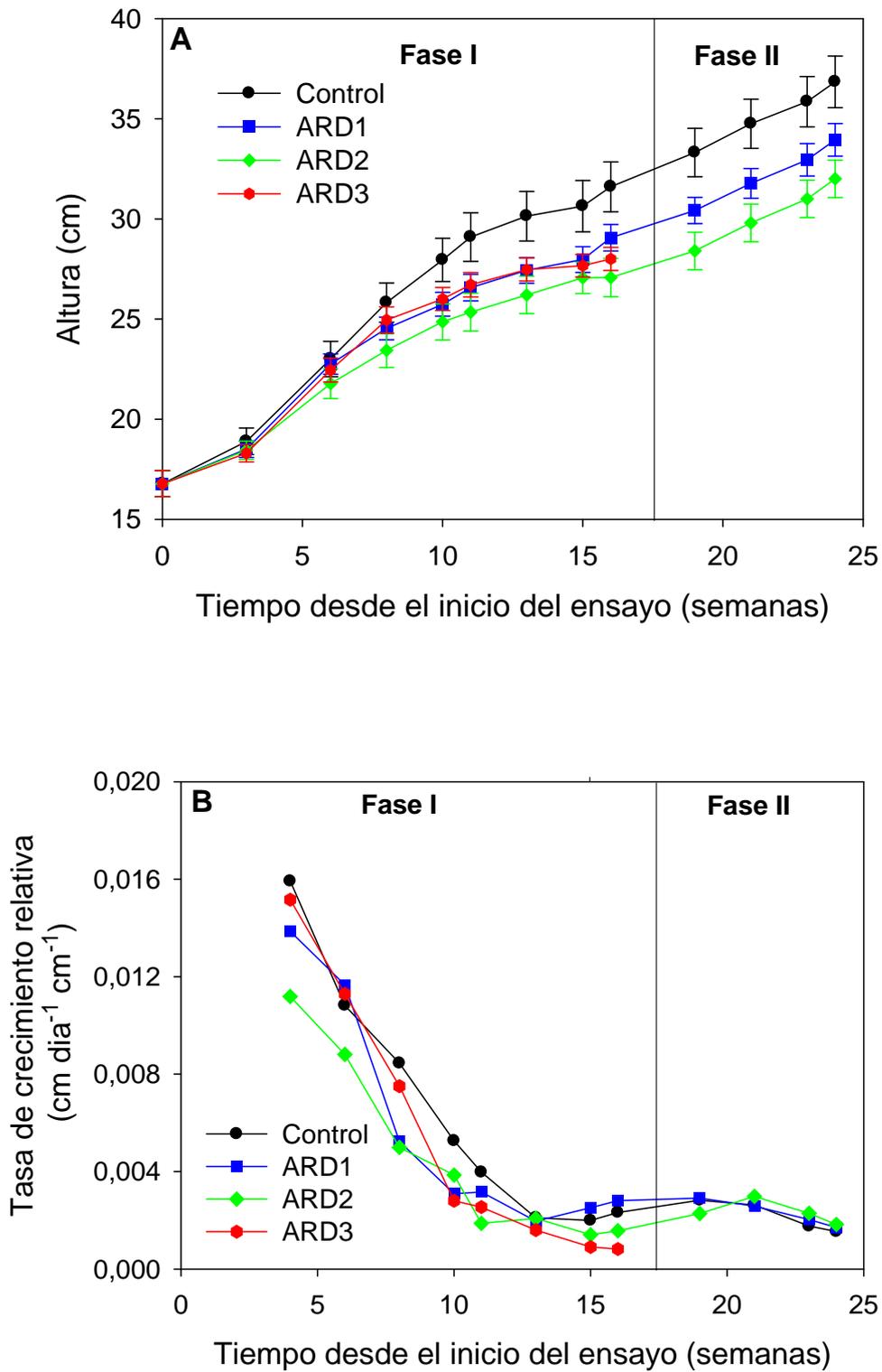


Figura 1.3- Evolución durante el ensayo de la altura (A) y de la tasa de crecimiento relativa (B) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. sometidas a distintos tratamientos de riego.

4.3.2.- Relaciones hídricas e intercambio gaseoso

La conductividad hidráulica de las raíces (L_p) al final de la aplicación de los tratamientos disminuyó un 48%, 58% y 64%, conforme aumentaba la conductividad eléctrica del agua de riego con respecto al control. Además, se apreció incluso una disminución mayor durante la fase II en el tratamiento ARD2, con respecto al control (Figura 1.4A y 1.4B).

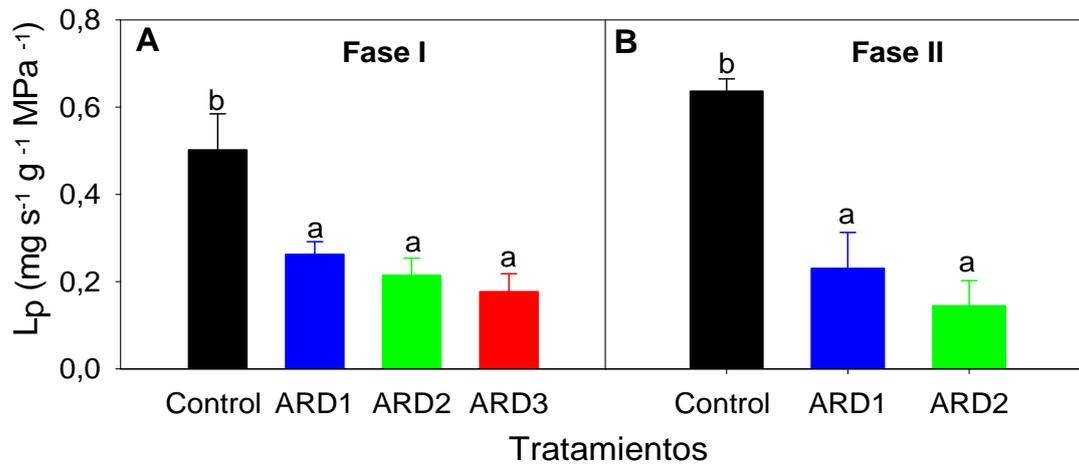


Figura 1.4.- Conductividad hidráulica de las raíces (L_p) al final de la fase I (A) y al final de la fase II (B) en raíces de *Eugenia myrtifolia* L. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

El efecto de los tratamientos produjo una disminución de los valores de potencial hídrico foliar (Ψ_h) y de contenido relativo en agua (CRA) (Figuras 1.5A y 1.5B), con una deshidratación foliar importante desde el inicio de la aplicación de los tratamientos, hasta alcanzar valores de - 2,0 MPa para Ψ_h y 87% de CRA en las plantas de ARD3. Los valores de Ψ_h de las plantas control y ARD1 fueron más parecidos entre sí (-0,8 MPa y -0,9 MPa, respectivamente). El tratamiento de ARD2 presentó valores intermedios entre control y ARD3 (-1,1 MPa). Para CRA, las diferencias entre los tratamientos de ARD no fueron tan marcadas (Figuras 1.5A y 1.5B). No se apreció una recuperación de los valores de Ψ_h ni de los de CRA para los tratamientos de ARD en la fase II.

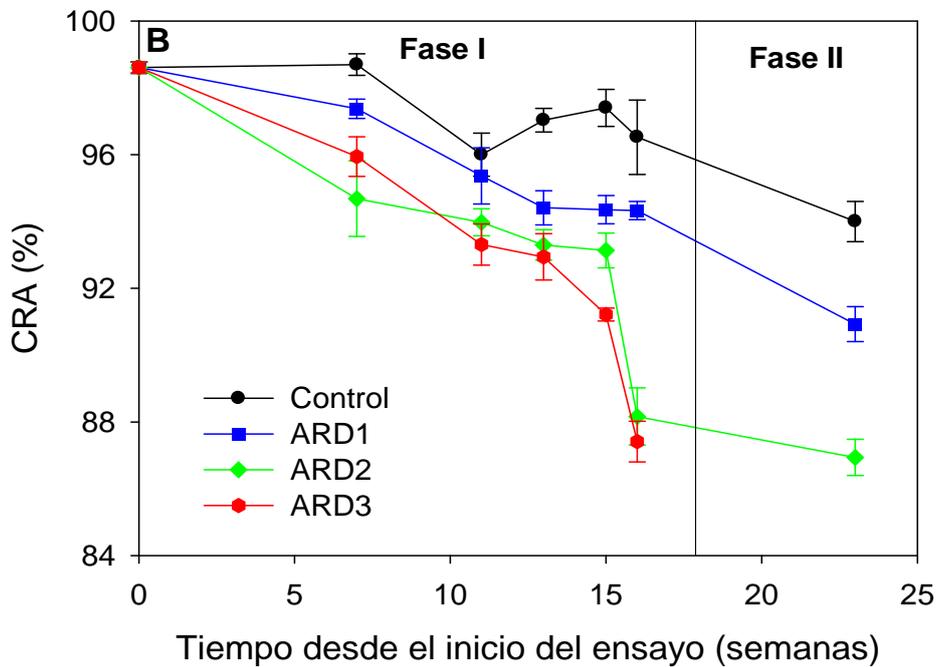
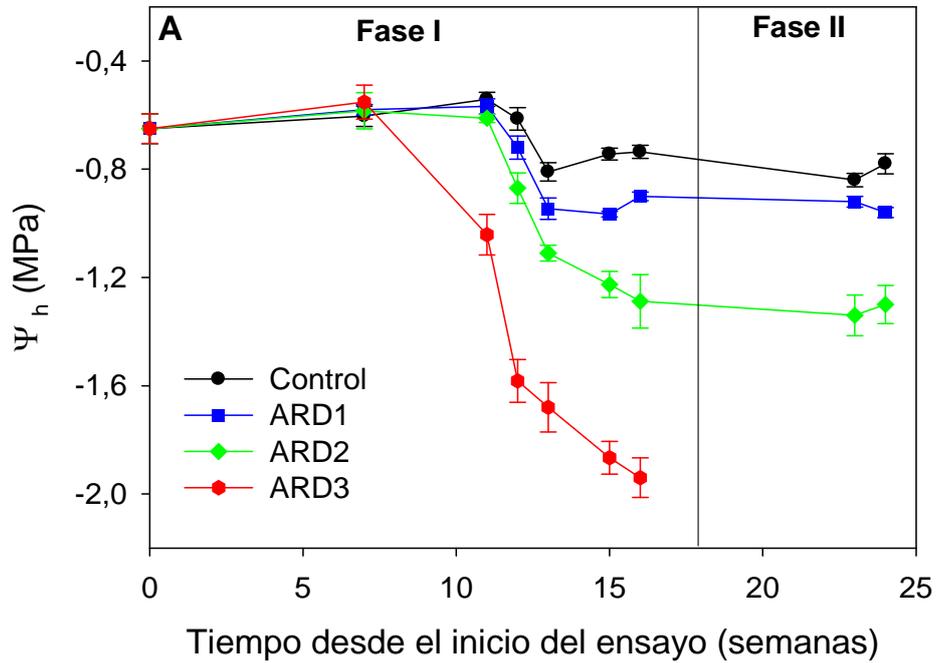


Figura 1.5.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial hídrico foliar (Ψ_h) (A) y del contenido relativo de agua (CRA) (B) en hojas de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. sometidas a distintos tratamientos de riego.

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

Los valores de conductancia estomática (g_s) (Figura 1.6A) se reducían de manera importante en los tratamientos que recibieron agua con los mayores valores de CE (ARD2 y ARD3). Los tratamientos control y ARD1 presentaron valores similares entre sí. La fotosíntesis neta (P_n) disminuyó en todas las plantas a lo largo de la fase I, con reducciones importantes en ARD2 y ARD3 (Figura 1.6B), no observándose una recuperación de dichos parámetros.

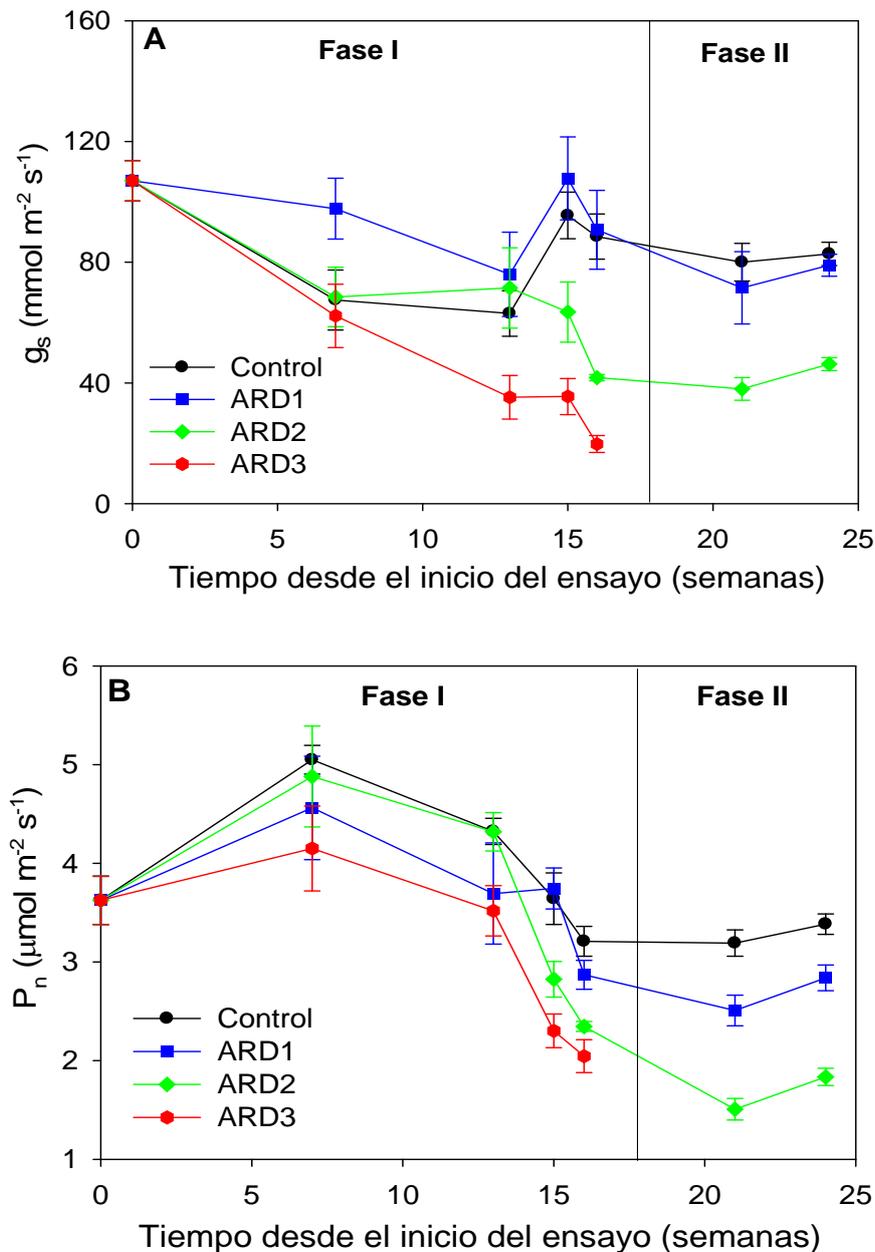


Figura 1.6.- Evolución de la conductancia estomática (g_s) (A) y de la fotosíntesis (P_n) (B) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo.

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

La representación de los valores de fotosíntesis neta y potencial hídrico frente a la conductancia estomática reflejaron tendencias similares (Figura 1.7), observándose que tanto en el control como en el tratamiento menos salino (ARD1), los dos parámetros (P_n y Ψ_h) mostraron valores independientes con respecto a los cambios en la conductancia estomática. Sin embargo, en los tratamientos más salinos (ARD2 y ARD3) se observó una disminución de los niveles de ambos parámetros, que se correspondían con los valores más bajos de conductancia estomática (Figura 1.7)

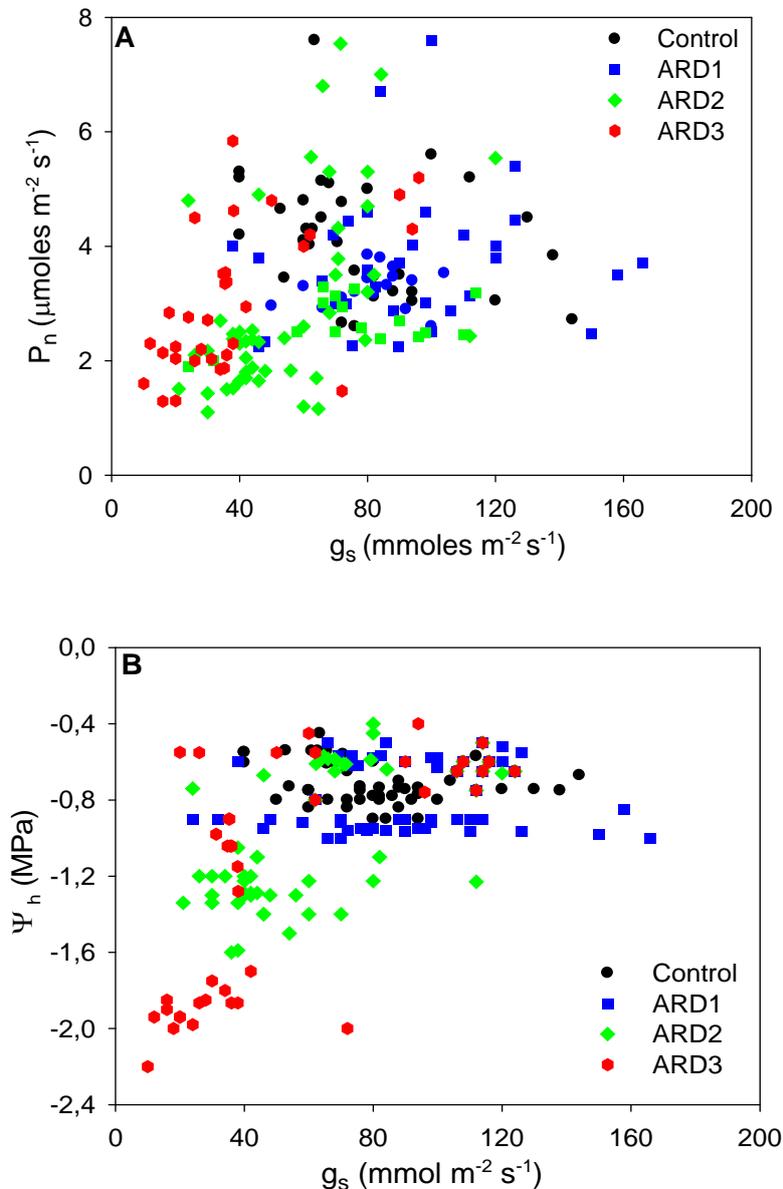


Figura 1.7.- Relación entre la fotosíntesis neta y la conductancia estomática (P_n/g_s) (A) y relación entre potencial hídrico foliar y conductancia estomática (Ψ_h/g_s) (B) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo.

4.3.3.- Eficiencia fotosintética del fotosistema II (PS II), clorofila y color

El contenido relativo de clorofila en las hojas de todas las plantas aumentó al inicio del ensayo, con una tendencia a ser más alto en los tratamientos salinos. Concretamente, en la semana 7 del ensayo se observó un aumento de los contenidos de clorofila de un 10% para ARD2, mientras que en la semana 13 los contenidos de clorofila aumentaban un 6% en ARD2 y un 15% en ARD3, respecto al control (Figura 1.8). Sin embargo, dicha tendencia se invirtió pasados unas 16 semanas desde la aplicación de los tratamientos, por lo que al final de la fase I ARD2 y ARD3 presentaron los contenidos más bajos de clorofila, un 9% y un 11%, respectivamente, en comparación con el control. En la fase II los valores de clorofila del tratamiento ARD2 no llegaron a alcanzar los valores observados para el control y ARD1.

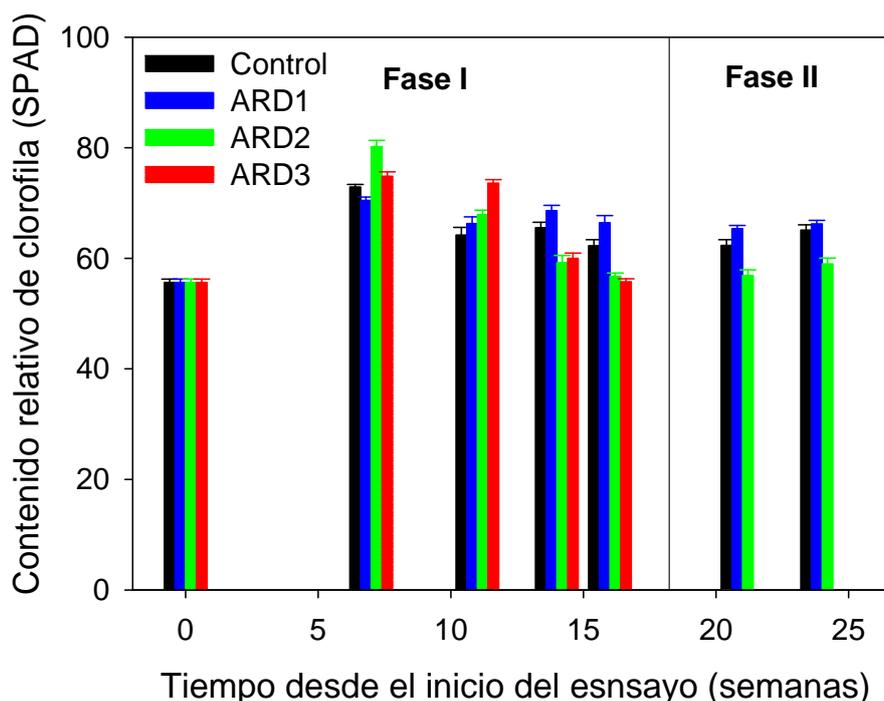


Figura 1.8.- Contenido relativo de clorofila (medido en unidades SPAD) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo.

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

En cuanto al efecto de los tratamientos sobre la eficiencia del PS II, medida como F_v/F_m (Figura 1.9), el comportamiento fue similar al de la clorofila, aunque con menos diferencias significativas entre los tratamientos. Al final de la fase I se observó una disminución similar de los valores de F_v/F_m en ARD2 y ARD3. La recuperación de los valores de este parámetro al final del ensayo se produjo en el tratamiento ARD2, en donde ya no se apreciaban diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

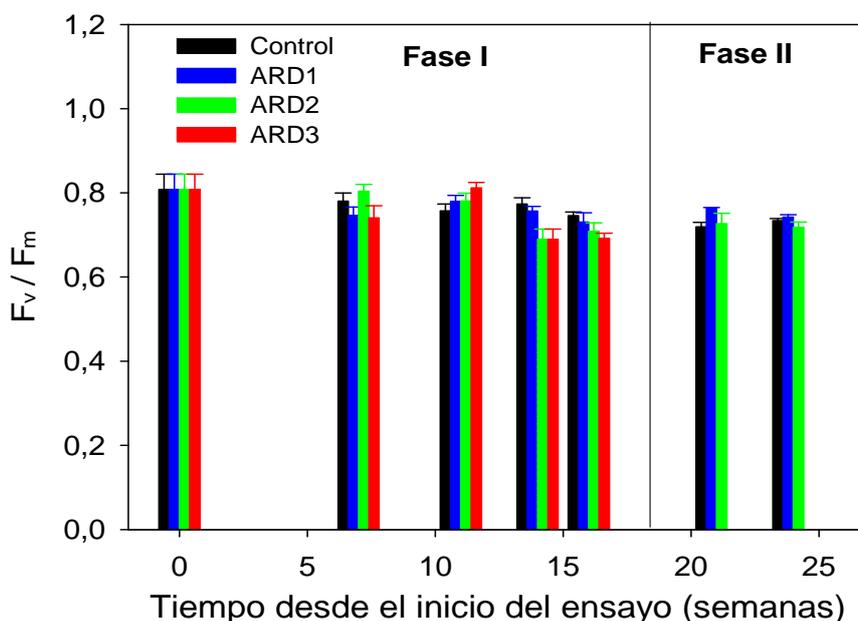


Figura 1.9.- Eficiencia fotosintética del fotosistema II, medida como el cociente F_v/F_m , en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo.

Los parámetros de color de las plantas se ven modificados a lo largo del ensayo (Figura 1.10), destacando al final de la fase I un descenso de los valores de Cromo (Figura 1.10A) y del Angulo Hue (Figura 1.10B) en ARD3. Sin embargo, se produjo un incremento de la luminosidad (Figura 1.10C), para estas mismas plantas. El tratamiento ARD2 presentó valores intermedios entre el ARD1 y ARD3. Al final de la recuperación, el Cromo aumentó en los tratamientos ARD1 (29%) y ARD2 (53%) con respecto a los controles.

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

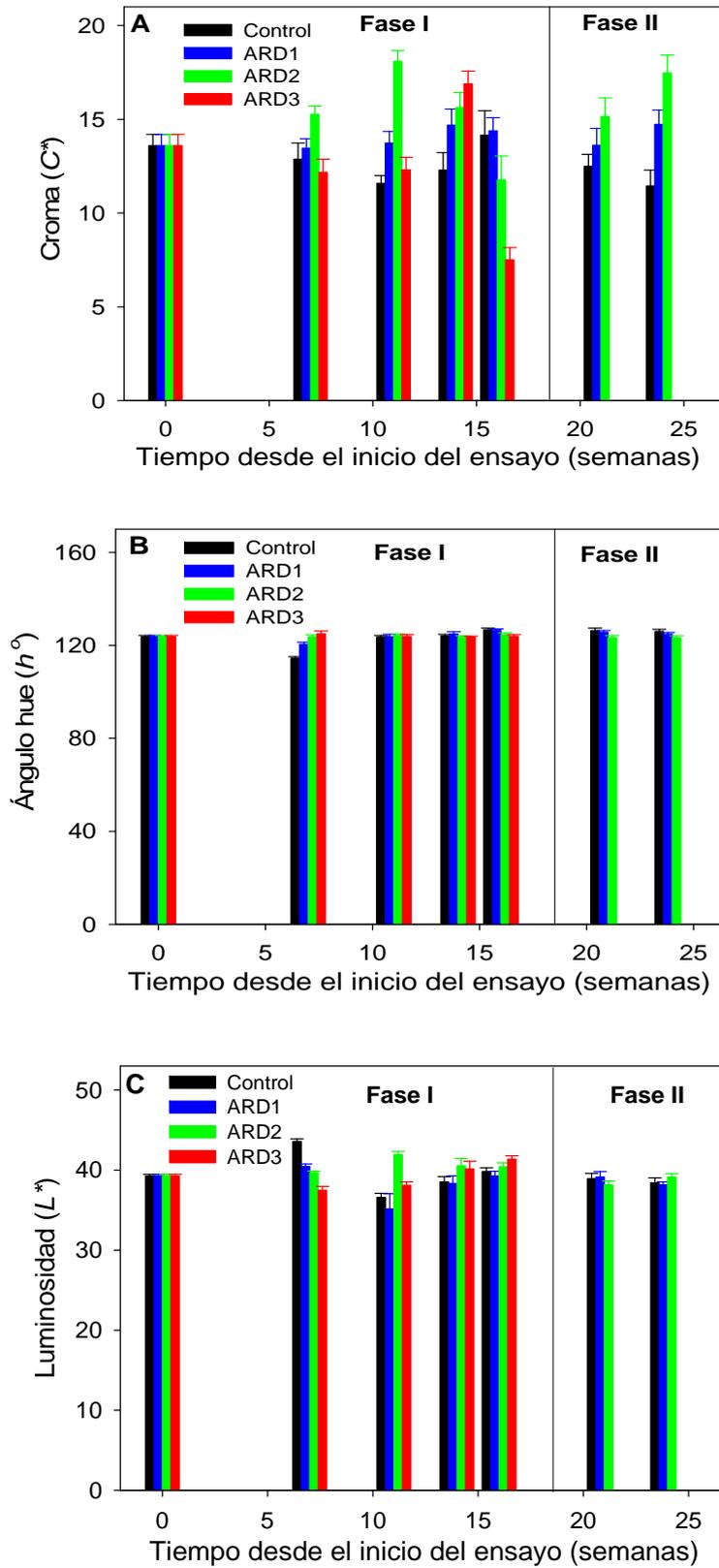


Figura 1.10.- Estudio de los distintos parámetros relacionados con el color de las hojas en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. regadas con diferentes niveles de salinidad.

4.3.4.- Absorción y distribución de elementos fitotóxicos (sodio, cloruro y boro) en la planta

La CE del sustrato en la fase I fue similar para el control y el tratamiento de ARD1 (Tabla 1.5), aunque se produce un incremento de la acumulación de los iones Na⁺ y Cl⁻ conforme aumentamos el nivel de salinidad en el agua de riego. La acumulación de iones, como consecuencia de no aplicar drenaje en ninguno de los tratamientos, fue muy alta e implicó que el tratamiento ARD3 presentara un grado de salinidad no tolerable para las plantas al final del periodo experimental.

Tabla 1.5 Medida de la CE y el contenido iónico del sustrato en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I.

Parámetros	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	ARD3	
CE (dS/m)	10,06±0,57a	12,48±0,54a	21,54±1,66b	27,45±0,79c	***
Ca ²⁺ (mmol/Kg PS)	12,63±0,99a	9,15±0,64a	18,65±1,71b	19,47±1,33b	***
Mg ²⁺ (mmol/Kg PS)	10,26±0,87a	9,42±0,63a	23,61±1,71b	22,86±0,98b	***
Cl ⁻ (mmol/Kg PS)	56,53±2,98a	85,50±4,43b	159,81±14,03c	239,07±6,68d	***
Na ⁺ (mmol/Kg PS)	34,57±1,16a	60,73±2,34b	119,34±8,56c	163,34±3,58d	***

Los datos representan los valores medios ± error estándar de al menos 5 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, *** $P < 0.001$.

La tasa de absorción de los iones, expresada como el total de iones distribuidos por la planta, absorbidos por el sistema radicular de las plantas de *E. myrtifolia* durante el periodo experimental (fase I y fase II) se representan en las Figuras 1.11.

En cuanto a la tasa de absorción del ion Na⁺ se observó, al final de la fase I un aumento significativo para los tratamientos más severos (ARD2 y ARD3). De la misma manera, al final de la fase II se produjo un aumento significativo en ARD2 (Figura 1.11A).

Respecto a la tasa de absorción del ion Cl⁻, al final de la fase I se producía un aumento en todos los tratamientos de ARD siendo significativo sólo para ARD3 en comparación con el control (Figura 1.11B). En la fase II no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 1.11B).

En relación a la tasa de absorción del B³⁺ se observó diferencias significativas en los tratamientos ARD2 y ARD3 al final de la fase I. En la fase II se observó la misma tendencia para el tratamiento ARD2 (Figura 1.11C).

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

La tasa de absorción del potasio disminuyó progresivamente en las dos Fases del ensayo conforme aumentaba la CE de los tratamientos (Figura 1.11D).

En el caso del calcio durante la fase I se produjo un aumento de su absorción conforme aumentaba la severidad de los tratamientos. Dicha respuesta se invirtió en la fase II (Figura 1.11E).

Comparando las distintas tasas, al final de la fase I, se apreció, en general, unos valores más altos para el sodio, cloro, boro y calcio en las plantas ARD2 y ARD3, en relación a los controles. De la misma forma en la fase II, dicho comportamiento se mantenía y los valores más altos en las tasas de absorción de iones se observaron en los tratamientos ARD2 (Figura 1.11). Además, es de destacar que la tasa de absorción que presentaba los valores absolutos más altos era la del Na^+ indicando una mayor facilidad de transporte para el Na^+ que para el resto de iones estudiados (Figura 1.11).

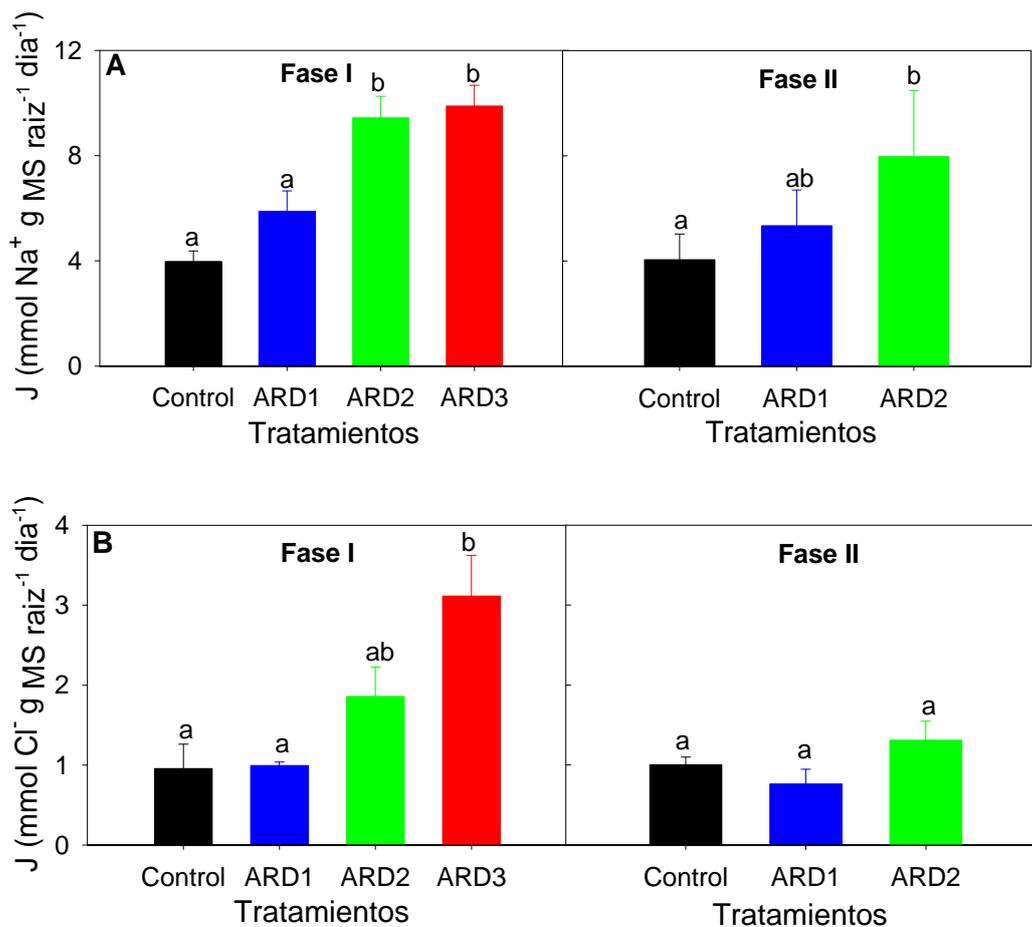


Figura 1.11A.- Tasa de absorción de los iones Na^+ (A) y Cl^- (B) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. en las diferentes fases del ensayo. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 5 plantas diferentes. Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

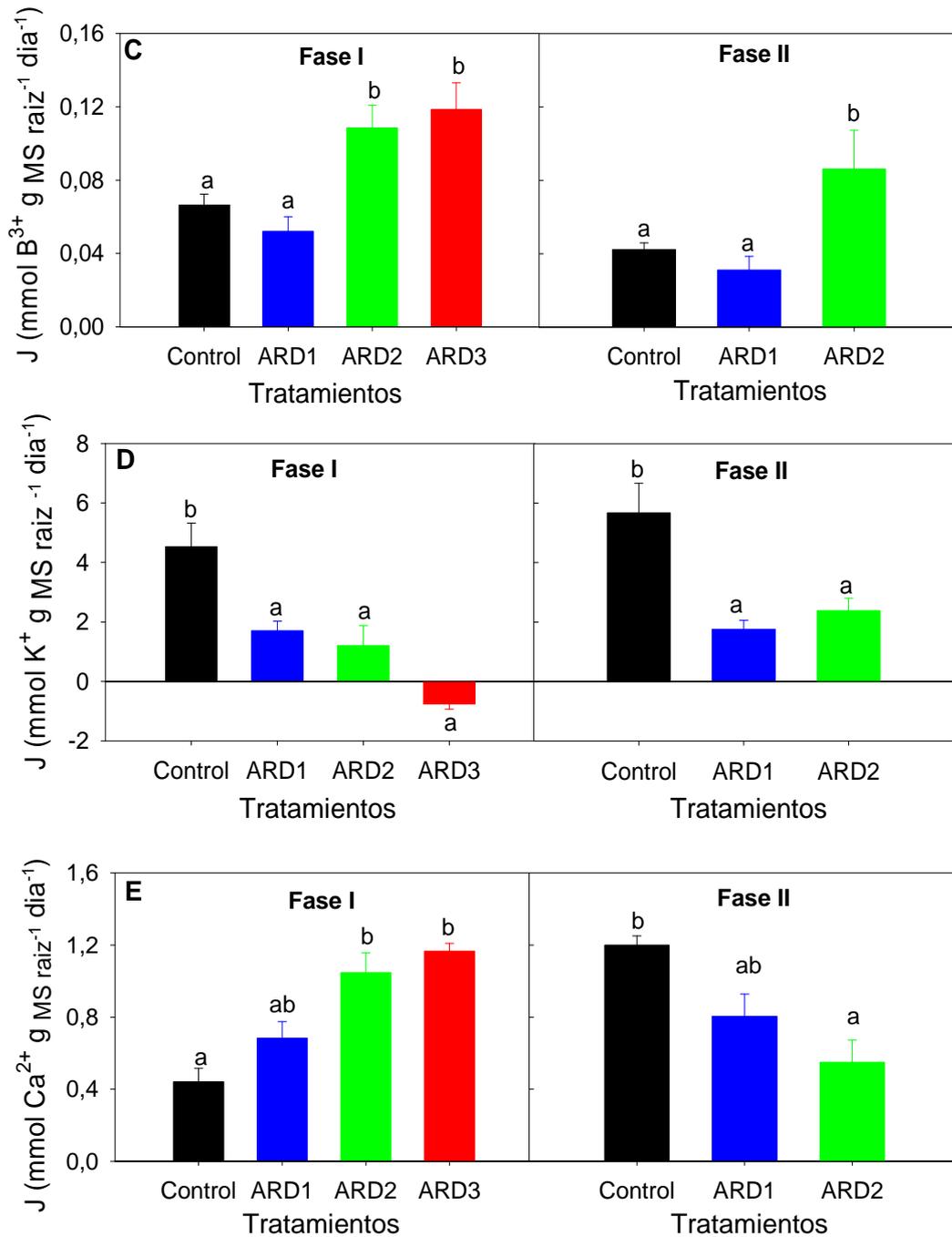


Figura 1.11B.- Tasa de absorción de los iones, B³⁺ (C), K⁺ (D) y Ca²⁺ (E) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. en las diferentes fases del ensayo. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

A los cuatro meses del inicio de la fase I, el contenido de cloro en hoja sólo aumentó significativamente en ARD3 en relación al control. En tallo y raíz este elemento se incrementó a partir del tratamiento ARD2.

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

En cuanto a los valores de Na⁺, dichas diferencias también tuvieron lugar, pero desde el nivel más bajo de salinidad (ARD1), produciéndose un incremento del 19%, del 49% y del 81% en hojas, tallos y raíces, en relación al control. (Tabla 1.6).

La acumulación en boro observada en hojas fue significativa para el tratamiento ARD2, mientras que en las raíces lo fue para los tratamientos con mayores conductividades eléctricas (ARD2 y ARD3), no modificándose en el tallo (Tabla 1.6).

Con respecto al K⁺, la respuesta es totalmente distinta a la observada para los iones Na⁺ y Cl⁻. Conforme aumentaba la CE de los tratamientos disminuía la concentración del ion potasio. También se observaron estas diferencias en los 3 órganos estudiados.

En relación al Ca²⁺ hubo un incremento significativo en hojas y tallos conforme aumentaba la salinidad de los tratamientos, estas diferencias no fueron significativas en raíz.

Tabla 1.6.- Influencia de los tratamientos de riego en la concentración (expresada en mmoles/ Kg peso seco) de los iones cloruro, sodio, boro, potasio y calcio en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I.

Iones	Órgano	Tratamientos				P
		Control	ARD1	ARD2	ARD3	
Cl ⁻	Hojas	198,3±14,4a	220,0±15,7a	214,1±11,3a	267,0±20,5b	*
	Tallos	132,4±11,4a	148,2±8,4ab	169,0±10,8bc	204,5±12,4c	**
	Raíz	191,6±13,5a	149,9±10,0a	224,8±21,8b	245,6±16,2b	**
Na ⁺	Hojas	291,4±18,5a	345,7±24,1ab	408,3±34,9b	410,9±28,0b	*
	Tallos	200,0±16,1a	298,4±35,2ab	382,2±40,9ab	305,2±43,3b	*
	Raíz	146,9±10,1a	265,8±11,6b	373,8±50,2bc	390,9±49,4c	**
B ³⁺	Hojas	10,3±0,1ab	8,7±0,9a	11,4±0,3b	10,6±0,4ab	*
	Tallos	2,9±0,1	2,8±0,4	3,3±0,5	3,2±0,1	n.s
	Raíz	2,8±0,1a	2,9±0,3a	5,5±0,7b	7,3±2,1b	*
K ⁺	Hojas	794,1±41,9c	692,1±46,6bc	596,4±53,8ab	457,9±32,2a	***
	Tallos	361,6±15,1b	304,7±9,3ab	297,3±36,3ab	199,3±14,7a	**
	Raíz	385,5±29,8b	259,8±16,7a	263,0±15,9a	306,2±27,1a	**
Ca ²⁺	Hojas	158,1±6,0a	156,9±5,7a	163,4±8,5a	197,0±12,9b	*
	Tallos	121,9±6,7a	124,2±8,1a	168,7±12,9b	148,7±7,4ab	**
	Raíz	148,8±10,7	182,3±7,3	156,6±13,3	150,2±10,3	n.s

Los datos representan los valores medios ± error estándar de 5 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y n.s: diferencias no significativas.

En la fase II, el contenido de cloruros en raíz fue significativamente mayor en el tratamiento ARD2 que en ARD1 (Tabla 1.7).

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

Las principales diferencias encontradas entre los tratamientos se debieron al contenido en Na⁺ y a su distribución en las diferentes partes de la planta. En este caso, los niveles de Na⁺ fueron mayores en los dos tratamientos que en las plantas control. Hay que destacar que en la fase II la concentración de Na⁺ en todas las partes de la planta fue mayor que en la fase I para todos los tratamientos (Tabla 1.7).

En cuanto a la concentración de B³⁺ se observaron diferencias significativas en los tallos y en las raíces en el tratamiento de ARD2, con respecto a los otros tratamientos (Tabla 1.7).

Con respecto al K⁺ se observaron acusados descensos, conforme aumentaba la salinidad de los tratamientos y en las distintas partes de la planta (Tabla 1.7).

En relación al Ca²⁺ los valores fueron menores en hojas y tallo en ambos tratamientos ARD (Tabla 1.7).

Tabla 1.7.- Influencia de los tratamientos de riego en la concentración (expresada en mmoles/ Kg peso seco) de los iones sodio, cloruro y boro en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase II.

Iones	Órgano	Tratamientos			P
		Control	ARD1	ARD2	
Cl ⁻	Hojas	207,32±13,65	199,44±6,98	198,31±29,01	n.s
	Tallos	179,15±9,80	183,66±3,85	197,18±20,44	n.s
	Raíz	207,32±21,69ab	173,52±24,58a	227,61±4,32b	*
Na ⁺	Hojas	395,92±20,70a	411,20±4,01ab	502,99±60,55b	*
	Tallos	254,89±20,60a	350,22±25,92ab	374,06±42,83b	**
	Raíz	295,98±20,42a	465,92±21,40b	600,87±25,02c	***
B ³⁺	Hojas	9,73±0,07	8,53±0,75	10,22±0,67	n.s
	Tallos	3,25±0,23a	2,90±0,16a	3,97±0,16b	**
	Raíz	3,10±0,18a	2,92±0,39a	8,29±2,43b	*
K ⁺	Hojas	857,66±24,9b	693,40±22,91a	723,65±61,04a	*
	Tallos	436,51±37,30b	371,63±11,48ab	295,32±39,93a	*
	Raíz	370,87±21,75b	252,72±9,44a	340,32±11,88b	***
Ca ²⁺	Hojas	187,96±7,15b	154,67±8,46a	144,56±9,81a	*
	Tallos	179,02±6,96b	125,48±10,31a	131,54±3,81a	***
	Raíz	193,96±9,64ab	231,05±18,08b	175,83±5,77a	*

Los datos representan los valores medios ± error estándar de 5 plantas diferentes. Letras distintas entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan (p<0.05). P: nivel de significación, *P<0.05, **P<0.01, *P<0.001 y n.s: diferencias no significativas.**

Al final de la fase I, se observó una tendencia a disminuir el peso seco de la hoja y aumentar la concentración, conforme se incrementaba la salinidad de los tratamientos, de los iones Na⁺ y Cl⁻ (Figura 1.12A y 1.12B). En concreto,

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

en el caso de Cl^- parece haber un rango umbral de acumulación de este ión, que por encima del cual no se producía un descenso del peso seco de la planta tan acusado como en el caso de Na^+ . Con respecto al boro, dicha relación no parecía ser tan clara en comparación con los otros dos iones, aunque se observó cierta similitud para los tratamientos más salinos (ARD2 y ARD3) (Figura 1.12C). En el caso del K^+ el peso seco de las hojas disminuía conforme lo hacía la concentración de este ion a medida que aumentaba la CE de los tratamientos (Figura 1.12D). Para el Ca^{2+} la relación durante la fase I es muy parecida a la del Na^+ , Cl^- y B^{3+} (Figura 1.12E).

En la Fase II, las tendencias son similares a las observadas en la fase I y más concretamente para el ion Na^+ , en donde la relación entre la disminución de peso seco y acumulación del ión en las hojas resulta más clara (Figura 1.12), excepto para el caso del calcio en donde la relación responde de una manera contraria a lo observado en la fase I.

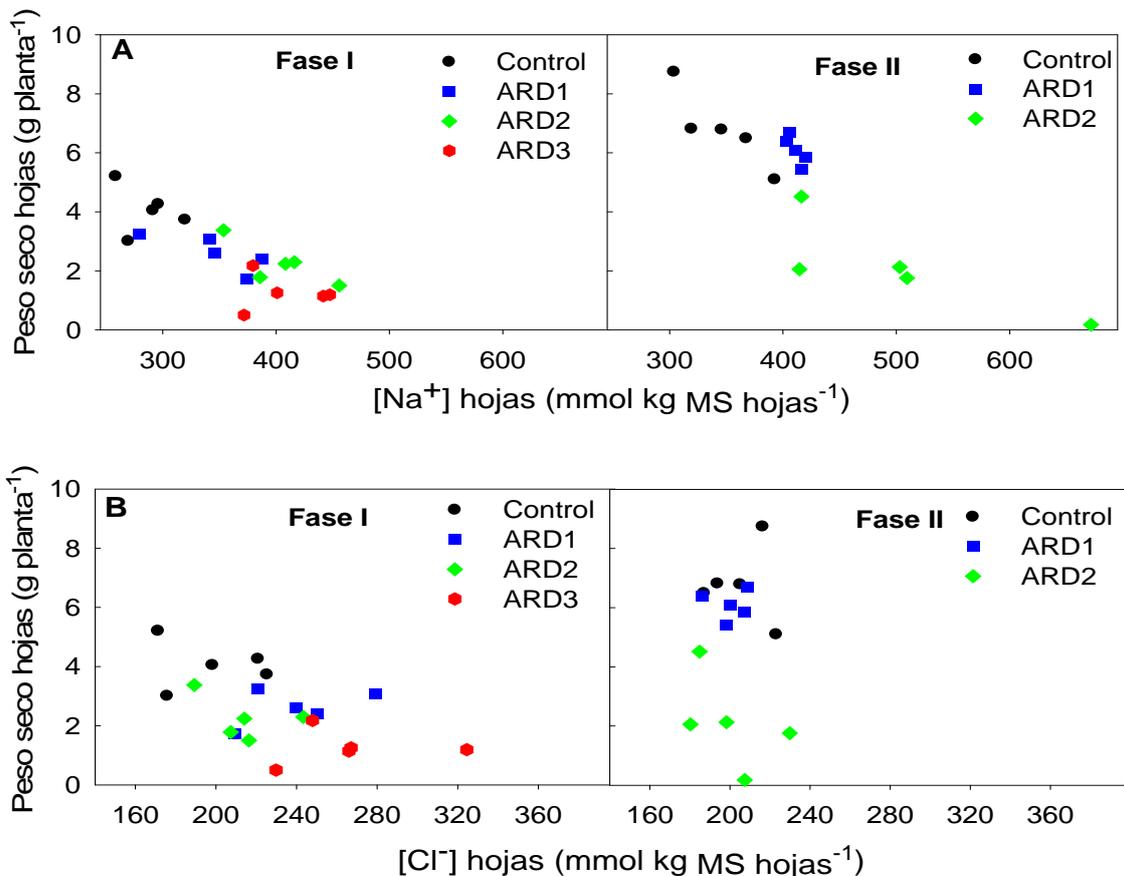


Figura 1.12A.- Influencia de los diferentes tratamientos de riego en la relación entre el peso seco de las hojas y la concentración de los iones Na^+ (A) y Cl^- (B) de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. en las diferentes fases del ensayo.

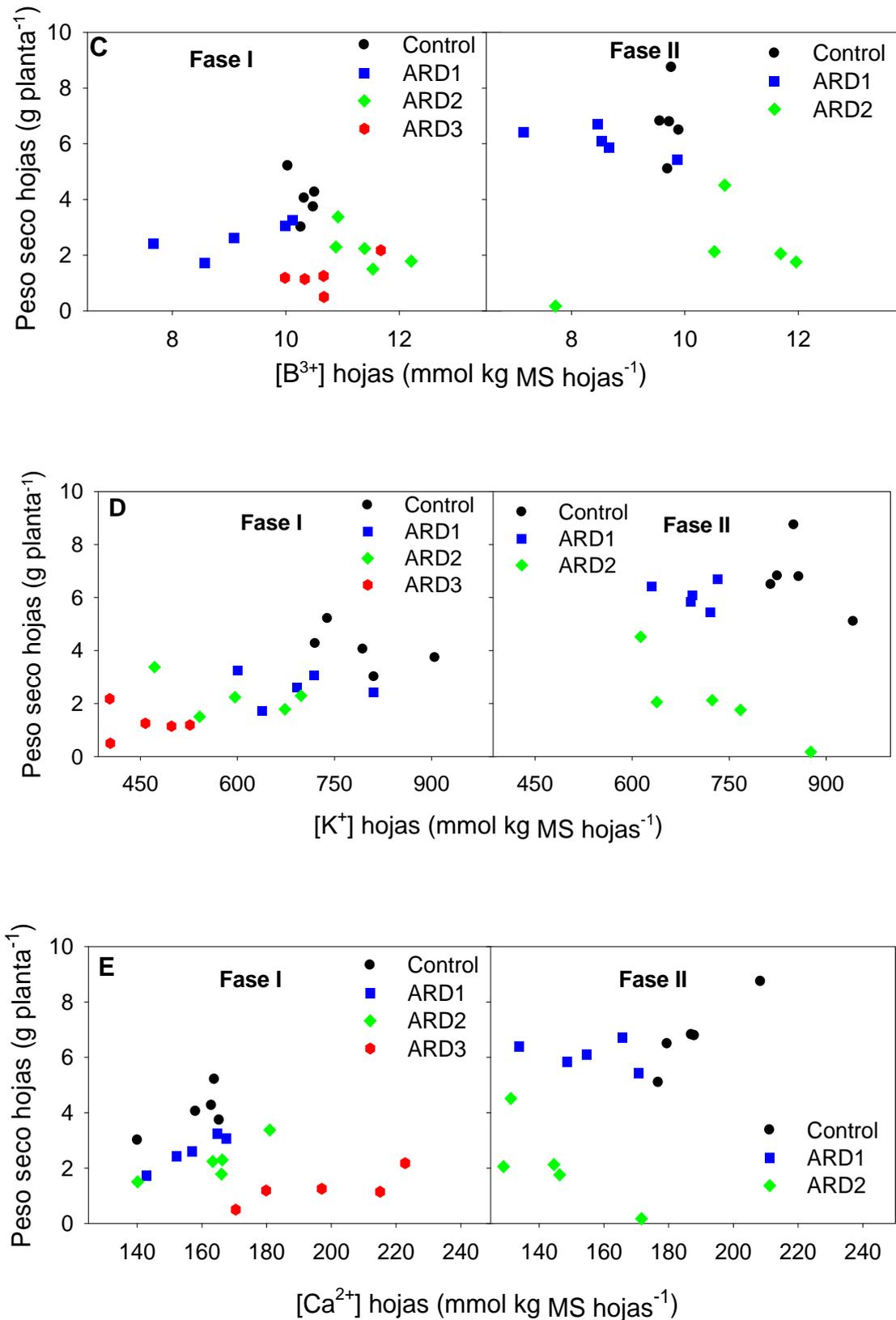


Figura 1.12B.- Relación entre el peso seco y la concentración en hojas de los iones, B³⁺ (C), K⁺ (D) y Ca²⁺ (E) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. sometidas a diferentes tratamientos en las diferentes fases del ensayo.

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

En la fase I, los valores de los cocientes K^+/Na^+ y K/Cl^- son los que disminuyeron en mayor proporción conforme aumentaba la severidad de los tratamientos salinos. En concreto, el ratio K^+/Na^+ disminuía un 28%, 43% y 63% en hojas, tallos y raíces en ARD1. En ARD2, se observó un descenso del 47% del 56% y del 73% y en ARD3 del 59%, 63% 72%, respectivamente. Por lo que respecta al cociente K^+/Cl^- se produjo un descenso del 31%, del 29% y del 3% en hojas, tallos y raíz, respectivamente en ARD1. En ARD2 se observó un descenso del 33%, 32, 41% y en ARD3 en un 58%, 62% y 38%, respectivamente. (Tablas 1.8A).

Con respecto a los cocientes Ca^{2+}/Na^+ y Ca^{2+}/Cl^- (Tabla 1.8A) sólo se observaron diferencias significativas en raíces. Para el cociente Ca^{2+}/Cl^- hay que destacar la particularidad observada en el tratamiento ARD1 donde los valores en raíz fueron los más altos, con respecto a los demás tratamientos.

Con respecto a los valores del cociente Na^+/Cl^- , se produjo un descenso en el tallo y en la raíz en ARD1. En cuanto al tratamiento ARD2 se observó diferencias significativas en todos los órganos estudiados y en el caso del tratamiento ARD3 los valores disminuyeron en los distintos órganos, en comparación con ARD2.

Tabla 1.8A.- Cocientes entre los iones representativos en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I.

Cocientes	Órgano	Tratamientos				P
		Control	ARD1	ARD2	ARD3	
K^+/Na^+	Hojas	2,76±0,12c	2,00±0,11b	1,47±0,19a	1,14±0,06a	***
	Tallos	1,80±0,06c	1,03±0,07b	0,80±0,17ab	0,66±0,04a	***
	Raíz	2,67±0,45b	1,01±0,13a	0,73±0,06a	0,77±0,03a	***
K^+/Cl^-	Hojas	4,16±0,44c	2,85±0,23b	2,77±0,19b	1,76±0,12a	***
	Tallos	2,77±0,37b	1,97±0,39ab	1,89±0,41ab	1,06±0,21a	*
	Raíz	1,99±0,29b	1,93±0,38b	1,18±0,19a	1,23±0,10a	*
Ca^+/Na^+	Hojas	0,55±0,03	0,46±0,05	0,42±0,07	0,50±0,07	n.s
	Tallos	0,61±0,05	0,44±0,08	0,46±0,08	0,53±0,12	n.s
	Raíz	1,06±0,35b	0,69±0,04ab	0,43±0,03a	0,38±0,04a	*
Ca^{2+}/Cl^-	Hojas	0,82±0,07	0,65±0,05	0,79±0,13	0,78±0,10	n.s
	Tallos	0,97±0,20	0,85±0,24	1,08±0,21	0,80±0,15	n.s
	Raíz	0,78±0,23a	1,30±0,14b	0,69±0,10a	0,60±0,06a	*
Na^+/Cl^-	Hojas	1,50±0,09 a	1,44±0,17a	1,93±0,15b	1,57±0,20a	*
	Tallos	1,54±0,20a	1,92±0,37b	2,34±0,13b	1,60±0,27a	*
	Raíz	0,76±0,07a	1,87±0,12b	1,60±0,18b	1,59±0,10b	***

Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 5 plantas diferentes. Letras distintas entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ y n.s: diferencias no significativas.

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

En la fase II, con respecto a los cocientes K^+/Na^+ y K^+/Cl^- , las tendencias entre tratamientos y en los distintos órganos de la planta fueron similares, si las comparamos con la Fase I. Cabría destacar que los valores absolutos son más bajos en todos los tratamientos, cuando se comparan con los valores de la Fase I, indicando que incluso en el tratamiento control se estaban acumulando los iones fitotóxicos. También se observó, entre los distintos tratamientos, una mayor movilización del ión sodio en esta Fase, disminuyendo más los valores del cociente K^+/Na^+ que los del cociente K^+/Cl^- . Con respecto a los cocientes Ca^{2+}/Na^+ y Ca^{2+}/Cl^- (Tabla 1.8B) se observó que las diferencias significativas también se producían en hojas y en tallos, indicando, una mayor movilización de ambos iones fitotóxicos a la parte aérea de la planta y no así en el caso del calcio. Los valores del cociente Na^+/Cl^- aumentaron para los diferentes tratamientos y en comparación con la fase I. Esto nos vuelve a sugerir un papel fitotóxico más importante del ion sodio en esta última Fase.

Tabla 1.8B.- Cocientes entre los iones representativos en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase II.

Cocientes	Órgano	Tratamientos			P
		Control	ARD1	ARD2	
K^+/Na^+	Hojas	2,50±0,14c	1,68±0,11b	1,12±0,10a	***
	Tallos	1,73±0,16b	1,07±0,06a	0,76±0,19a	**
	Raíz	1,29±0,09b	0,55±0,03a	0,60±0,04a	***
K^+/Cl^-	Hojas	4,16±0,15b	3,45±0,15a	3,59±0,24a	**
	Tallos	2,43±0,15b	2,02±0,05a	1,60±0,39a	*
	Raíz	1,87±0,19b	1,55±0,12a	1,50±0,05a	*
Ca^+/Na^+	Hojas	0,55±0,05b	0,37±0,03a	0,27±0,04a	**
	Tallos	0,72±0,07b	0,37±0,02a	0,33±0,03a	***
	Raíz	0,66±0,05c	0,48±0,06b	0,32±0,02a	**
Ca^{2+}/Cl^-	Hojas	0,92±0,06b	0,76±0,04a	0,79±0,06a	*
	Tallos	1,01±0,07b	0,71±0,08a	0,68±0,05a	*
	Raíz	0,95±0,06	1,41±0,33	0,80±0,04	n.s
Na^+/Cl^-	Hojas	1,69±0,15a	2,07±0,07a	3,39±1,03b	*
	Tallos	1,42±0,07a	1,90±0,11b	2,10±0,16b	**
	Raíz	1,45±0,12a	2,87±0,49b	2,53±0,12b	*

Los datos representan los valores medios ± error están de 6 plantas diferentes. Letras distintas entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$ y n.s: diferencias no significativas.**

4.3.5.- Metabolismo antioxidativo

Después de 4 meses de tratamiento (fase I) se observó que la salinidad producía un estrés oxidativo, tal y como mostraba el aumento de los niveles de peroxidación lipídica, medido como TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) (Figura 1.13). Los daños en membrana eran mucho mayores en plantas tratadas con ARD3 que en los tratamientos ARD1 y ARD2. En este sentido, los valores de TBARS eran 3 veces mayores en el tratamiento ARD3 a los observados en plantas controles, mientras que en los tratamientos ARD1 y ARD2, el aumento en la peroxidación de lípidos era aproximadamente de un 70% respecto a los controles (Figura 1.13).

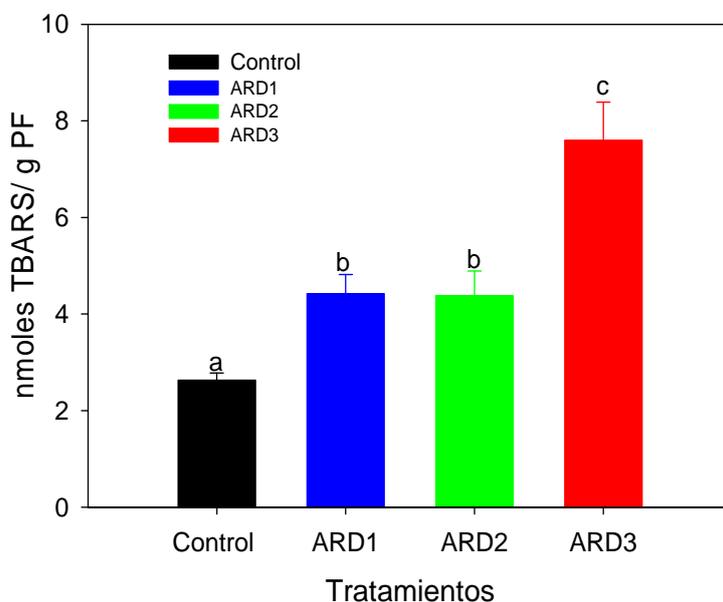


Figura 1.13.- Peroxidación lipídica medida en las hojas como formación de TBARS en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 5 plantas diferentes. Letras distintas entre barras indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

Con respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes, cabe mencionar, en primer lugar, que no fue posible detectar la actividad DHAR (enzima que regenera la forma reducida del ascorbato) en hojas de *E. myrtifolia*, lo que sugiere que estas plantas reciclan el ascorbato reducido mediante la enzima MDHAR. En segundo lugar, con respecto al efecto de la salinidad sobre las enzimas antioxidantes detectadas, es de destacar que el tratamiento ARD1 producía pocos cambios en la actividad de dichas

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

enzimas (Tabla 1.9). Sólo se observó un descenso de un 20% en la actividad MDHAR. Sin embargo, los tratamientos ARD2, y sobre todo el ARD3, dieron lugar a importantes cambios en estas enzimas. El tratamiento ARD2 producía un aumento de un 90% en la actividad POX pero provocó un descenso de las enzimas del ciclo ASC-GSH, que fue mucho mayor en la actividad GR (casi 3 veces) que en las actividades APX (30%) y MDHAR (53%). El tratamiento ARD3 provocó un desequilibrio en el metabolismo antioxidativo en las hojas de *E. myrtifolia*. Así, por un lado producía un aumento de las actividades SOD (42%), catalasa (68%) y POX (8,5 veces), y por otro lado, al igual que el tratamiento ARD2, producía un descenso en la actividad de las enzimas del ciclo ASC-GSH pero mucho más marcado. La actividad APX disminuyó en un 30%, la MDHAR presentó un descenso de 3 veces y de 10 veces la actividad GR (Tabla 1.9).

Tabla 1.9- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre la actividad de diferentes enzimas antioxidantes en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I.

Enzimas	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	ARD3	
CAT ($\mu\text{mol min}^{-1}/\text{g PF}$)	22,2 \pm 1,9a	31,3 \pm 2,2ab	33,3 \pm 4,8ab	36,6 \pm 2,1b	**
APX ($\text{nmol min}^{-1}/\text{g PF}$)	111,9 \pm 11,8b	119,9 \pm 7,3b	76,9 \pm 9,4a	72,5 \pm 8,4a	***
MDHAR ($\text{nmol min}^{-1}/\text{g PF}$)	11,5 \pm 0,6d	9,4 \pm 0,4c	5,4 \pm 0,3b	3,7 \pm 0,2a	***
GR ($\text{nmol min}^{-1}/\text{g PF}$)	3,9 \pm 0,3c	3,7 \pm 0,2c	1,4 \pm 0,1b	0,4 \pm 0,1a	***
SOD (U/g PF)	9,7 \pm 1,8a	10,3 \pm 2,1ab	13,1 \pm 2,5ab	13,8 \pm 2,7b	*
POX ($\mu\text{mol min}^{-1}/\text{g PF}$)	23,01 \pm 2,3a	18,4 \pm 3,4a	43,7 \pm 8,6b	196,2 \pm 15,5c	***

Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 5 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.4.- Discusión

La salinidad es el resultado de la acumulación de sales en el sustrato y depende de las propiedades físico-químicas del sustrato, el riego y la fracción de lavado (Niu y Rodríguez, 2006). También la salinidad es una característica dinámica que se establece en la zona de las raíces y es el resultado de la evaporación, extracción y absorción de agua en esa zona, por parte de la planta (Tanji, 2002).

La respuesta de las plantas a distintos niveles salinos es diferente, dependiendo de la especie vegetal que se seleccione para ser estudiada. Mantener un nivel constante de salinidad en el sustrato es difícil, sobre todo cuando se trabaja con volúmenes de suelo reducidos, como es el caso de este ensayo, en donde se fijan las condiciones ambientales, así como el manejo del riego, para centrarse más en los efectos que la acumulación de sales en el sustrato produce en las plantas de *E. myrtifolia*.

La resistencia a la salinidad de una planta se puede definir como la capacidad de tolerar el efecto de las sales sin que ello tenga consecuencias adversas, como la reducción del crecimiento (Levitt, 1980; Grieve *et al.*, 2008). En los cultivos agrícolas, el daño por estrés salino se mide como un efecto sobre la productividad, sin embargo en las especies con fines paisajísticos se evalúa por su incidencia en la calidad visual de la planta y en la alteración de su valor ornamental, más que por la modificación de su crecimiento (Wu y Guo, 2005). En las condiciones de este ensayo, se observó que *E. myrtifolia* disminuía su peso seco aéreo cuando las plantas recibían un tratamiento ARD, aunque era en el tratamiento de mayor salinidad donde se apreciaba, de una manera más evidente, la disminución de la biomasa en las hojas. No obstante como se ha comentado, la acumulación de materia seca y su relación con el crecimiento no es un parámetro indicador de calidad en plantas con fines ornamentales, más bien se puede apreciar que un manejo adecuado del riego puede hacer que la salinidad tenga un aprovechamiento ventajoso desde el punto de vista ornamental y medioambiental, como es la mejora de la compactidad de las plantas (Bañón *et al.*, 2011). También cuando se utilizan aguas regeneradas, el beneficio que pueden aportar los distintos nutrientes (N, P, K) puede ir dirigido a contrarrestar algunos de los efectos dañinos provocados por la alta salinidad de estas aguas (Gómez-Bellot *et al.*, 2013).

Sin embargo, el grado de exhibición de los daños producidos en las hojas y el momento de la aparición de dichos síntomas son parámetros más

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

evaluables para este tipo de plantas. Así la alta acumulación de sales en el sustrato del tratamiento ARD3 supuso unos síntomas muy severos de daños foliares, llegando a producirse una defoliación muy importante e incluso la muerte de las mismas al final del periodo salino. Del mismo modo, las plantas del tratamiento ARD2 mostraron reducciones de biomasa, pero no cambios en el número de hojas con respecto a las plantas control (Tabla 1). Por el contrario, las raíces no se afectaron en ningún caso. Normalmente, en condiciones salinas las reducciones en la parte aérea son más acusadas que en el sistema radical (Munns, 2002), aunque la respuesta depende de la especie que se esté considerando. Así, plantas de *Viburnum tinus* regadas con aguas regeneradas con CE en el agua de riego de 2 dS m^{-1} presentaron reducciones en la biomasa de las raíces, mientras que las raíces de plantas de lentisco y evónimo regadas con aguas regeneradas de 4 dS m^{-1} no se vieron afectadas (Bañón *et al.*, 2012; Gómez-Bellot *et al.*, 2013). No obstante, los efectos en el crecimiento de las plantas están más relacionados con el nivel de salinidad aplicado, incluso en la fase de recuperación, donde todas las plantas se regaron con agua de buena calidad. Por ello se observó que las plantas de ARD2 crecieron menos que las plantas ARD1 y los controles (Tabla 1), como consecuencia de que los efectos, tanto osmóticos como tóxicos, no fueron reversibles (Rodríguez *et al.*, 2005). En general, cuando previamente se ha aplicado un estrés severo, la recuperación del crecimiento suele ser parcial y está relacionada con la recuperación del proceso de fotosíntesis (Grzesiak *et al.*, 2006). La acumulación de sal en la fase de recuperación pudo afectar a la tasa de fotosíntesis, acelerando la senescencia de la hoja y reduciendo el área foliar en ARD2, como se ha observado en otras especies (Navarro *et al.*, 2007; Chaves *et al.*, 2011).

Como ya se ha comentado, las reducciones en el crecimiento de las plantas y en área foliar, como respuesta a la salinidad, responden a cambios en los procesos fisiológicos y metabólicos de la planta. Para cuantificar la respuesta fisiológica a la salinidad, diversos autores han medido parámetros tales como fotosíntesis, conductancia estomática, emisión de fluorescencia de clorofilas, contenido en clorofila, absorción de iones y acumulación de los mismos en los distintos tejidos (Niu y Cabrera, 2010; Chaves *et al.*, 2011; Álvarez *et al.*, 2012). Entre tales parámetros medibles uno de los más destacados en la respuesta de la planta a la salinidad es la apertura estomática (g_s). Generalmente, la medida de este parámetro es más sensible que la del valor de la tasa de fotosíntesis neta (P_n), aunque ello también depende de

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

varios factores (nivel de salinidad, duración del estrés salino y de la especie vegetal considerada). En el presente ensayo y como indican los valores de potencial hídrico y contenido relativo de agua en las plantas *E. myrtifolia*, el efecto osmótico debido a la mayor dificultad de tomar agua por las raíces, se hizo más evidente en las plantas ARD2 y ARD3 (Figura 1.4), lo que se manifestó en una reducción de los valores de conductancia estomática (Azza Mazher *et al.*, 2007), provocando, a su vez, limitaciones en las tasa de fotosíntesis. El resultado es similar al observado con plantas de *Phillyrea latifolia* que crecieron bajo distintas concentraciones de salinidad (Tattini *et al.*, 2002) y en la que las diferencias en ambos parámetros, g_s y P_n , fueron mayores entre el tratamiento control y los salinos, conforme avanzaba el tiempo de aplicación de los distintos tratamientos. (Figuras 1.6A y 1.6B). Quizás, en la fase I, estén implicados tanto factores estomáticos como no estomáticos en la reducción de la P_n . En relación con esto último, se observó que se producía una degradación del contenido de clorofila en los tratamientos más salinos, provocando también una ligera disminución de los valores de F_v/F_m y cambios en los parámetros de color de las hojas. Estos parámetros han sido útiles como evaluación de la tolerancia a la salinidad de las plantas.

Por otra parte y aunque la recuperación después de un periodo de salinidad viene caracterizada por un incremento de los parámetros hídricos (Chaves *et al.*, 2009), no se observó tal mejora en las condiciones de este ensayo, especialmente en ARD2, provocando que los demás parámetros estudiados no se recuperaran tampoco en dicho tratamiento.

La relación entre P_n/g_s (WUE, eficiencia intrínseca en el uso del agua), aumentó en ARD3 en las primeras semanas del ensayo para después disminuir, lo que implicaba nuevamente que, en condiciones más severas de salinidad, la fotosíntesis puede verse más negativamente afectada como consecuencia de una mayor acumulación de iones tóxicos en las hojas (Álvarez *et al.*, 2011; Álvarez *et al.*, 2012).

El área específica foliar (SLA), que expresa la conversión de la biomasa creada invertida en la superficie de nuevas hojas, y la relación de superficie foliar (LAR), que representa la cantidad de biomasa que la planta invierte en área foliar, disminuían con la severidad de los tratamientos (sobre todo en ARD3). La inversa de la SLA, conocida como LWR, que se usa para conocer la redistribución de los asimilados, aumentó en el tratamiento de mayor salinidad (ARD3).

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

Independientemente de que el efecto osmótico pudo limitar el crecimiento de las plantas de los tratamientos ARD2 y ARD3 (Figura 1) (Azza Mazher *et al.*, 2007), parece que los descensos en el peso seco de las plantas podrían estar más relacionados con la acumulación de Cl^- y en mayor medida de Na^+ (Figuras 1.12A y B), ya que un incremento de los niveles de salinidad indujo un aumento de Na^+ y Cl^- en hojas y especialmente en raíces (Cassaniti *et al.*, 2009; Álvarez *et al.*, 2012). En algunos estudios, la tolerancia a la salinidad está más relacionada con la acumulación de iones fitotóxicos en las raíces que en las hojas, lo cual podría suponer un limitado transporte de estos iones a los tallos (Colmer *et al.*, 2005). No obstante, la mayor acumulación de iones (Na^+ y Cl^-) en la parte aérea, incluso en la fase de recuperación, pudo inducir daños salinos y provocar cambios como los ya descritos.

La presencia de concentraciones altas de B^{3+} es otro problema asociado al uso de aguas regeneradas, lo que explicaría los mayores niveles de B^{3+} observados en hojas y raíces, sobre todo en las plantas ARD3. No obstante no se observaron daños típicos de toxicidad en boro. Probablemente, los elevados niveles de Na^+ podrían interferir en la absorción del catión B^{3+} (El-Motaium *et al.*, 1994; Edelstein *et al.*, 2005; López-Gómez *et al.*, 2007), y por otro lado, los síntomas asociados a la acumulación de Na^+ y Cl^- podrían enmascarar y/o mitigar los típicos daños por exceso de B^{3+} (Bañón *et al.*, 2012).

Normalmente, unos niveles altos de salinidad provocan una disminución en la absorción de K^+ y Ca^{2+} en muchas de las especies estudiadas (Nilu *et al.*, 1995; Chaparzadeh *et al.*, 2003;). En este caso, los cocientes de K^+/Na^+ y $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ disminuyeron en los tratamientos salinos y en todas las partes de la planta, en ambas Fases, lo que confirma el efecto perjudicial de la salinidad sobre la asimilación de iones importantes, por su efecto osmótico (K^+) o en la señalización celular (Ca^{2+}). El K^+ cumple una función importante en la regulación del potencial osmótico de las células vegetales y además activa diferentes enzimas implicadas en la respiración y en la fotosíntesis. La deficiencia de K^+ provoca clorosis marginal en las hojas y entre las venas (Briskin 2010).

La aplicación de tratamientos con elevados niveles de salinidad, provocaba un estrés oxidativo en las plantas de *E. myrtifolia* tal y como se observa por el aumento de los niveles de peroxidación de lípidos, parámetro de estrés oxidativo que es indicador de daños en la membrana. Este daño era mayor a medida que aumentaba la salinidad de los tratamientos (Figura 1.13).

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

El nivel de peroxidación de lípidos es un parámetro de estrés oxidativo que junto con otros parámetros se usa, normalmente, en los estudios de estrés ambiental con el fin de valorar el daño que un estrés determinado produce en la planta. El valor más alto de peroxidación de lípidos que mostraban las plantas sometidas al tratamiento de mayor CE (ARD3) era paralelo al hecho de que estas plantas murieron al final del periodo de estrés (fase I). La alteración de las membranas celulares es uno de los daños primarios causados por estreses como el salino o los hídricos y dichos daños están mediados por un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zhang y Kirkham, 1996; Faize *et al.*, 2011). En este sentido se ha descrito que, además del efecto tóxico y osmótico, la salinidad también produce un estrés oxidativo a nivel subcelular mediado por ROS (Hernández *et al.*, 1993, 1995, 2001). Estos mismos resultados se han descrito en ensayos similares en cuanto al periodo de exposición de plantas a distintos tratamientos de salinidad (López-Gómez *et al.*, 2007).

Respecto al efecto de la salinidad sobre la actividad de enzimas antioxidantes, los efectos fueron proporcionales a la concentración de sales presente en el agua de riego. En este sentido, los mayores cambios tenían lugar en plantas tratadas con los mayores niveles de salinidad (ARD2 y ARD3). En ambos casos, se observó un descenso de las enzimas del ciclo ASC-GSH, pero sobre todo en plantas ARD3. El ciclo ASC-GSH cumple una función importantísima en la eliminación de H_2O_2 y en el reciclaje de ascorbato reducido (ASC) y de glutatión reducido (GSH) (Noctor y Foyer, 1998; Asada 1999), por lo que un descenso de estas enzimas va a provocar una acumulación de H_2O_2 y de las formas oxidadas del ASC (DHA) y del GSH (GSSG). Además, en plantas tratadas con las aguas ARD2 y ARD3 tenía lugar un aumento de actividad POX, aunque se observó que el aumento de nuevo era mayor en las plantas tratadas con ARD3. Sin embargo, sólo en las plantas sometidas al tratamiento ARD3 se producía, además del fuerte aumento de actividad POX, un aumento de las actividades SOD y catalasa. Estos datos indicaban que en estas plantas podría estar teniendo lugar una mayor producción de los niveles de radicales $O_2^{\cdot-}$ y de H_2O_2 , ya que se ha descrito que una inducción de estas actividades puede estar mediada por una mayor generación de estas ROS (Hansson y Häggström 1983; Coego *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha descrito que la actividad POX, además de eliminar H_2O_2 también podría generarlo (Riedle-Bauer, 2000). Sin embargo, la inducción de las actividades SOD, POX y catalasa parecía no ser suficiente

4.- Capítulo 1. Aguas residuales depuradas en plantas de *E. myrtifolia*

para hacer frente al estrés oxidativo inducido a largo plazo por la salinidad en plantas tratadas con aguas ARD3, en las que además se producía, como se ha mencionado, un descenso muy acusado de las enzimas del ciclo ASC-GSH, sobre todo de las enzimas MDHAR (encargada de reciclar ASC) y GR (encargada de reciclar GSH). Este desequilibrio producido en el sistema de defensa antioxidante de las plantas tratadas con la más alta salinidad dio lugar a una situación de estrés oxidativo, que explica los daños provocados en las membranas, y que, finalmente, dio lugar a la muerte de dichas plantas.

**5.- Capítulo 2. Efecto del riego con aguas residuales
depuradas con distintos niveles de salinidad en el
comportamiento de *Myrtus communis* L.**

5.- Efecto del riego con aguas residuales depuradas con distintos niveles de salinidad en el comportamiento de *Myrtus communis* L.

5.- Introducción

Una alta concentración de sales en el agua de riego conduce a una acumulación excesiva de sales en la zona radicular, que inducirá un estrés hídrico debido a la disminución del potencial hídrico del medio (efecto osmótico) (Greenway y Munns, 1980; Neumann, 1997). Además, algunos iones como el sodio y el cloruro se pueden acumular en el tejido vegetal, donde alcanzan niveles tóxicos (toxicidad iónica) (Yadav *et al.*, 2002), y/o inducen desequilibrios en algunos nutrientes necesarios para el crecimiento de la planta (Munns y Tester, 2008; Cassaniti *et al.*, 2009; Flowers *et al.*, 2010). Para minimizar los efectos negativos del riego salino se suelen aplicar distintas estrategias tales como la elección de plantas tolerantes a la salinidad (Klougart, 1987; Morales *et al.*, 1998; Sánchez-Blanco *et al.*, 1998), ya que la tolerancia a la sal varía entre las especies (Cassaniti *et al.*, 2012) e incluso puede variar de un cultivar a otro (Matheny y Clark, 1998) o entre especies del mismo género (Sánchez-Blanco, 2002; Grieve *et al.*, 2011) Aunque también existen otras alternativas a considerar como actuaciones posibles ante el riego con agua salina, entre ellas, el manejo del riego, el control del drenaje, el aumento del volumen de drenaje, el mantenimiento de una humedad alta y constante en el sustrato y la mezcla de aguas de distinta calidad (Gori *et al.*, 2008; Bañón *et al.*, 2011).

En este ensayo se pretende estudiar el efecto que el uso de aguas regeneradas con distintos niveles de salinidad produce en el comportamiento de plantas de mirto, una especie mediterránea autóctona, potencialmente adaptada a condiciones adversas. También, se cambian las prácticas de riego con respecto al ensayo anterior, utilizándose una fracción de lavado de acuerdo con el nivel de salinidad de los tratamientos. Se analizan los cambios en los parámetros morfológicos y fisiológicos previamente estudiados en el anterior ensayo y se evalúa el nivel de recuperación de dichos parámetros.

5.2.- Material y métodos

5.2.1.- Material vegetal y condiciones experimentales

Se emplearon 120 plántulas de *Myrtus communis* L., las cuales fueron trasplantadas a macetas de 14 x 12 cm de diámetro (1,2 L), usando como sustrato una mezcla de fibra de coco, turba (negra y rubia) y perlita en proporción (8:7:1) y abonadas con osmocote plus (2 g L⁻¹ de sustrato) (14:13:13 N, P, K + microelementos). El ensayo se realizó en una cámara de crecimiento controlado, simulando los cambios naturales de temperatura (23°C/18°C día/noche), luz (350 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidad luminosa) y HR (55%-70%). Las plantas quedaron distribuidas en 3 bloques al azar, conteniendo, cada uno, 4 bandejas con 10 plantas (40 plantas por bloque). Cada una de estas 4 bandejas de un bloque recibía un tratamiento distinto.

5.2.2.- Tratamientos

Durante 4 meses (fase de aplicación de los distintos tratamientos, fase I), se aplicaron un tratamiento control donde la CE del agua de riego era de 0,8 dS m⁻¹ (indicando que su uso no es restrictivo o peligroso según las clasificaciones de la FAO) y 3 tipos de aguas residuales depuradas (ARD) procedentes de distintas estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) localizadas en Murcia (España): ARD1 (CE= 1,7 dS m⁻¹) localizada en Jumilla, ARD2 (CE= 4 dS m⁻¹) localizada en Campotejar y ARD3 (CE= 8 dS m⁻¹) localizada en mazarrón. Las clasificaciones de la FAO indican severas restricciones a la hora de usar las dos últimas aguas. En las EDAR se aplica un tratamiento convencional de fangos activos seguido de un tratamiento terciario con radiación ultravioleta. Al comienzo del periodo experimental se analizaron las propiedades químicas de las distintas aguas utilizadas. Las concentraciones de los iones Na⁺, Cl⁻ y B³⁺ fueron analizadas:

Control (Na= 140,70 mg L⁻¹; Cl= 184,20 mg L⁻¹; B= 0,13 mg L⁻¹), ARD1 (Na= 260 mg L⁻¹; Cl= 720 mg L⁻¹; B= 0,18 mg L⁻¹), ARD2 (Na= 362 mg L⁻¹; Cl= 862 mg L⁻¹; B= 0,55 mg L⁻¹) y ARD3 (Na= 1492 mg L⁻¹; Cl= 1557 mg L⁻¹; B= 1,26 mg L⁻¹).

Después de la fase de estrés (fase I), todas las plantas se sometieron a un periodo de recuperación de 2 meses, cuando las plantas fueron regadas con el mismo tipo de agua que las plantas control (fase de recuperación, fase II). A lo largo de las seis meses que duró el ensayo, todas las plantas se regaron dos

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

veces a la semana por encima de la capacidad de campo y la cantidad de riego se determinó en cada tratamiento cesando el riego en el caso de las plantas control cuando la fracción de lavado alcanzaba el 10% (v/v), en ARD1 cuando alcanzaba el 25% (v/v), en ARD2 hasta alcanzar el 45% (v/v) y en ARD3 en un 55% (v/v).

5.2.3.- Medidas relacionadas con el crecimiento

En tres momentos concretos: al inicio del ensayo (antes de imponer los tratamientos), al final de la fase I y al final de la fase II para cada tratamiento, se recogieron 6 plantas en las que el sustrato fue cuidadosamente eliminado de las raíces, quedando separado el material vegetal fresco de cada una de ellas. Con el fin de medir los distintos pesos secos, el material vegetal fresco se secó en la estufa a una temperatura de 80°C hasta alcanzar un peso constante. También, el cociente raíz / parte aérea se determinó en las mismas plantas dividiendo el peso seco de la raíz por el peso seco de la parte aérea (hojas más tallos). El número de hojas y el área foliar (cm²) se determinó en las mismas plantas usando un medidor de área foliar (AM 200; (ADC BioScientific Ltd., Herts, England). Con los datos obtenidos se calcularon los siguientes índices de crecimiento: SLA, (*Specific Leaf Area* o área específica foliar), LWR (*Leaf Weight Ratio* o la inversa de SLA) y LAR (*Leaf Area Ratio* o relación de superficie foliar).

A lo largo del ensayo se midió la altura de la planta utilizando 20 plantas por tratamiento y la tasa de crecimiento relativa que se calculó teniendo en cuenta el aumento de altura entre dos medidas consecutivas con respecto a la altura.

5.2.4.- Relaciones hídricas e intercambio gaseoso

Periódicamente se midieron cambios en el potencial hídrico foliar (Ψ_h), en el contenido relativo de agua (CRA), en la conductancia estomática (g_s) y en la tasa de fotosíntesis neta (P_n) en 6 plantas por tratamiento durante las horas centrales de iluminación. Los Ψ_h se estimaron de acuerdo con Scholander *et al.* (1965), usando una cámara de presión (Model 3000; Soil Moisture Equipment Co., Santa Barbara, CA, USA) en la que se colocaron las hojas recolectadas durante un intervalo de 20 s donde se sometieron a una presión a una tasa de 0,02 Mpa s⁻¹ (Turner, 1988). El CRA en las hojas se midió según Barrs (1968).

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

La g_s y la P_n se determinaron en hojas totalmente expandida usando un aparato de intercambio gaseoso portátil (LI-6400; LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA).

5.2.5.- Medidas relacionadas con la clorofila y el color.

La determinación de la cantidad relativa de clorofila (CRC) se hizo con un medidor Minolta SPAD-502 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) y las medidas de color se realizaron con un colorímetro de reflexión Minolta CR-10 colorimeter (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan).

5.2.6.- Análisis de las distintas aguas, contenido mineral, tasa de absorción, y análisis del sustrato

Las medidas de los contenidos de solutos inorgánicos y la CE de las distintas aguas utilizadas en el ensayo, se realizaron al inicio del ensayo (antes de aplicar los diferentes tratamientos). La CE se determinó utilizando el equipo multirango, Cryson-HI8734 (Crisom Instruments S.A. Barcelona, Spain). Las concentraciones de Na^+ y B^{3+} se determinaron mediante el uso del espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-ICAP 6500 DUO Thermo, England) y el cloruro se analizó por cromatografía iónica con un Metrhom Chromatograph (Switzerland).

Para el estudio del contenido mineral en las distintas partes de la planta, se emplearon el mismo número de plantas que para el crecimiento las cuales se separaron en hojas, tallos y raíces, los cuales se lavaron con agua destilada, se secaron a $80^{\circ}C$ y se almacenaron a temperatura ambiente para proceder al análisis de solutos inorgánicos. La concentración de Cl^- se analizó mediante el uso de un analizador de cloruros (Model 926 Chloride Analyser, Sherwood Scientific Ltd.). La concentración de Na^+ , B^{3+} , K^+ y Ca^{2+} se determinó mediante el uso del espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES IRIS INTREPID II XDL).

La tasa de absorción de los iones Na^+ , Cl^- , B^{3+} , K^+ y Ca^{2+} se calculó en las mismas plantas utilizadas para el análisis del contenido mineral al final de la fase I y al final de la fase II, según la fórmula descrita por Pitman (1975).

Ocho muestras de sustrato al final del periodo de salinidad (fase I) y diez muestras de sustrato al final del periodo de recuperación (fase II), se

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

almacenaron y enviaron a un laboratorio de análisis externo (Antonio Abellán Caravaca S.L. (Fitosoil)). El sustrato se secó a temperatura ambiente durante una semana. Los contenidos Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} se determinaron en un extracto saturado de agua con un plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) y el contenido de cloruros se analizó mediante cromatografía iónica. La CE se determinó sobre un extracto saturado de agua del sustrato con un conductivímetro.

5.2.7.- Metabolismo antioxidativo

Los análisis relacionados con el metabolismo antioxidativo y parámetros de estrés oxidativo se explican en el Apartado General de Material y Métodos. En este experimento los parámetros se midieron al final de la fase I en 6 plantas por tratamiento.

5.2.8.- Análisis estadístico de los datos

La significación de los efectos de las distintas aguas residuales (o de los diferentes tratamientos) fue analizada mediante un análisis de varianza simple (ANOVA) por medio del programa estadístico STATGRAPHICS PLUS para Windows. Las medias de los tratamientos fueron separadas con la Prueba de Rango Múltiple de Duncan ($P < 0.05$).

5.3.- Resultados

5.3.1.- Crecimiento y distribución de biomasa

Al final de la fase I, las plantas de mirto no modificaron negativamente su crecimiento (Tabla 2.1). Curiosamente, se produce un incremento del peso seco total en las plantas regadas con ARD2 debido a un aumento de la biomasa de las hojas (38%), de los tallos (56%) y de las raíces (69%). También, el área foliar y el número de hojas incrementaron de manera significativa en las plantas de ARD2 cuando las comparamos con el resto de las de los tratamientos. El tratamiento de ARD3 no presentó cambios significativos en los parámetros estudiados relacionados con la parte aérea de la planta con respecto al tratamiento control, pero sí se produjo un aumento del peso seco de la raíz, lo que indujo a un incremento del cociente entre el peso seco de la raíz y el peso seco la parte aérea (Tabla 2.1).

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

La distribución de la biomasa en los distintos órganos de la planta solamente se modificó en las raíces de los tratamientos con mayor CE (ARD2 y ARD3) (Figura 2.1).

Tabla 2.1- Efecto de los tratamiento con aguas residuales depuradas sobre diferentes parámetros de crecimiento en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I.

Parámetros	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	ARD3	
P.S. Hoja (g planta ⁻¹)	6,00±0,63a	5,53±0,31a	8,27±0,34b	5,84±0,56a	**
P.S. Tallo (g planta ⁻¹)	5,19±0,55a	5,47±0,46a	8,08±0,57b	5,00±0,42a	***
P.S. Aéreo (g planta ⁻¹)	11,20±1,15a	11,00±0,73a	16,35±0,74b	10,83±0,90a	***
P.S. Raíz (g planta ⁻¹)	5,45±0,69a	5,14±0,63a	9,19±0,21c	7,22±0,19b	***
P.S. Total (g planta ⁻¹)	16,64±1,74a	16,14±1,31a	25,54±0,56b	18,06±0,89a	***
P.S. Raíz/P.S. Aéreo	0,49±0,03a	0,46±0,03a	0,57±0,04ab	0,70±0,06b	**
P.S. Raíz/P.S. Hojas	0,91±0,07a	0,92±0,08a	1,13±0,07ab	1,32±0,15b	*
P.S. Raíz/P.S. Tallos	1,06±0,08a	0,93±0,06a	1,18±0,10a	1,51±0,12b	**
Número de hojas	685±36a	691±31a	918±34b	557±50a	***
Área foliar total (cm ²)	1109±98a	1119±88a	1640±56b	975±53a	***

Los datos representan los valores medios ± error estándar de 8 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

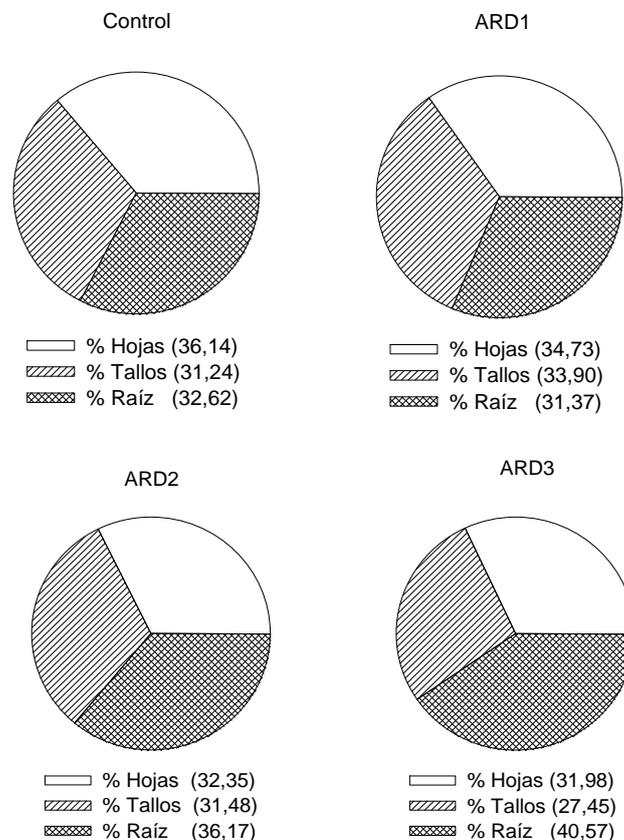


Figura 2.1.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas en la distribución de biomasa en las distintas partes de las plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I.

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

En el caso de los distintos índices de crecimiento calculados (SLA, LWR y LAR), sólo hubo diferencias significativas en el tratamiento más salino (ARD3) (Tabla 2.2.)

Tabla 2.2- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre diferentes índices de crecimiento estudiados en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I.

Índices	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	ARD3	
SLA x 10 ²	1,90±0,10ab	2,00±0,10b	2,00±0,00b	1,70±0,10a	**
LWR	54,04±2,14a	50,03±2,43a	50,36±0,76a	60,55±2,22b	**
LAR x 10 ²	0,70±0,00b	0,70±0,00b	0,60±0,00b	0,50±0,00a	**

Los datos representan los valores medios ± error estándar de al menos 8 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación ** $P < 0.01$.

Al final de la fase II, Las plantas sometidas al tratamiento ARD2 seguían presentando los valores más altos para cada uno de los parámetros estudiados, si bien en este caso las diferencias observadas en peso seco de hojas y tallos no eran significativas en relación al control. Durante esta misma fase las plantas regadas con en tratamiento de mayor salinidad (ARD3) tuvieron menor peso seco aéreo y menor área foliar que las plantas controles, presentando de nuevo el mayor valor del cociente peso seco raíz/peso seco parte aérea (Tabla 2.3).

Tabla 2.3- Efecto de los tratamiento con aguas residuales depuradas sobre diferentes parámetros de crecimiento en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase II.

Parámetros	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	ARD3	
P.S. Hoja (g planta ⁻¹)	5,89±0,36ab	5,43±0,51a	7,21±0,72b	5,19±0,46a	*
P.S. Tallo (g planta ⁻¹)	7,47±0,64b	6,70±0,60b	7,26±0,64b	4,41±0,56a	**
P.S. Aéreo (g planta ⁻¹)	13,36±0,82b	12,14±1,05ab	14,48±1,24b	9,60±0,89a	**
P.S. Raíz (g planta ⁻¹)	8,65±0,71a	8,26±0,43a	11,65±1,04b	8,91±1,04a	*
P.S. Total (g planta ⁻¹)	22,02±1,28ab	20,40±1,19a	26,13±2,25b	18,51±1,85a	*
P.S. Raíz/P.S. Aéreo	0,66±0,06a	0,74±0,08a	0,81±0,03ab	0,93±0,07b	*
P.S. Raíz/P.S. Hojas	1,50±0,14a	1,63±0,15a	1,66±0,11a	1,76±0,16b	*
P.S. Raíz/P.S. Tallos	1,21±0,11a	1,37±0,19a	1,62±0,08a	2,11±0,18b	***
Hojas Totales	629±35ab	610±48a	759±60b	616±40a	*
Área foliar total (cm ²)	2127±135b	2042±159b	2431±191b	1561±114a	**

Los datos representan los valores medios ± error estándar de 10 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

La distribución de la biomasa durante la fase II reveló que los tratamientos ARD2 y ARD3 presentaron un menor porcentaje de hojas que las plantas control (Figura 2.2). Además las plantas ARD3 tuvieron el menor porcentaje de tallos y la mayor proporción de raíces con respecto al total de la planta. (Figura 2.2).

Con respecto a los índices de crecimiento estudiados, SLA disminuía y su inverso el LWR aumentó en las plantas sometidas al tratamiento de mayor salinidad (ARD3) (Tabla 2.4).

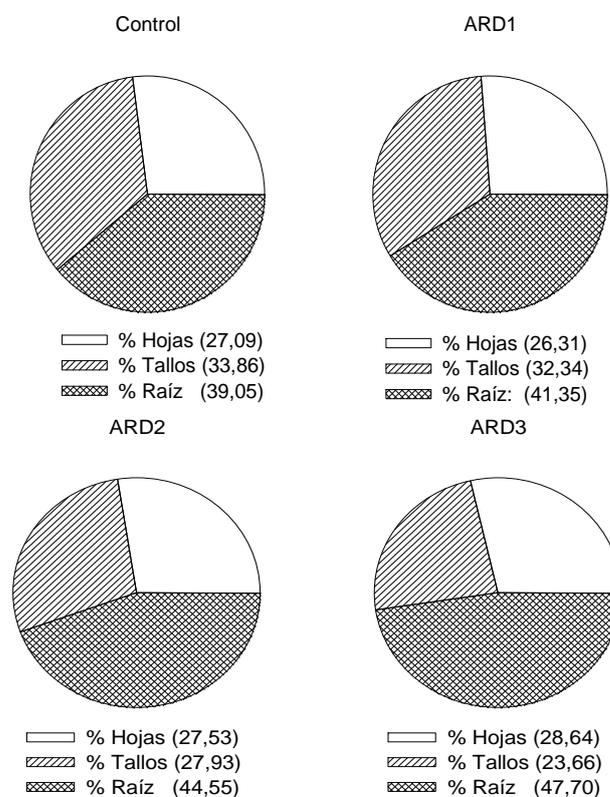


Figura 2.2.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas en la distribución de biomasa en las distintas partes de las plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase II.

Tabla 2.4- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre diferentes índices de biomasa en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase II.

Índices	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	ARD3	
SLA x 10 ²	3,60±0,20ab	3,80±0,20b	3,40±0,10ab	3,10±0,20a	*
LWR	27,92±1,12a	26,60±1,03a	29,65±1,33ab	33,91±2,79b	*
LAR x 10 ²	1,00±0,10	1,00±0,10	1,00±0,10	1,00±0,10	n.s

Los datos representan los valores medios ± error estándar de al menos 10 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$ y n.s: diferencias no significativas.

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

Atendiendo a la evolución de la altura sólo se observaron diferencias entre el tratamiento control y el tratamiento de ARD3 al final de la fase I, con menores valores de altura para este último tratamiento (31,8 cm) y el mayor valor para los controles (36,1 cm) (Figura 2.3A). Al final del ensayo (fase II) se mantuvieron las diferencias entre el control y el tratamiento ARD3 (Figura 2.3). Con respecto a la tasa de crecimiento relativa, en la fase I se produjo una disminución de la misma desde el comienzo del ensayo hasta la semana 8, un incremento entre la semana 8 y la semana 13 y de nuevo un descenso hasta el final de la semana 16. Durante la fase II se mantuvo constante hasta la última semana (25), dónde se observó por lo general un ligero incremento del valor de la tasa de crecimiento.

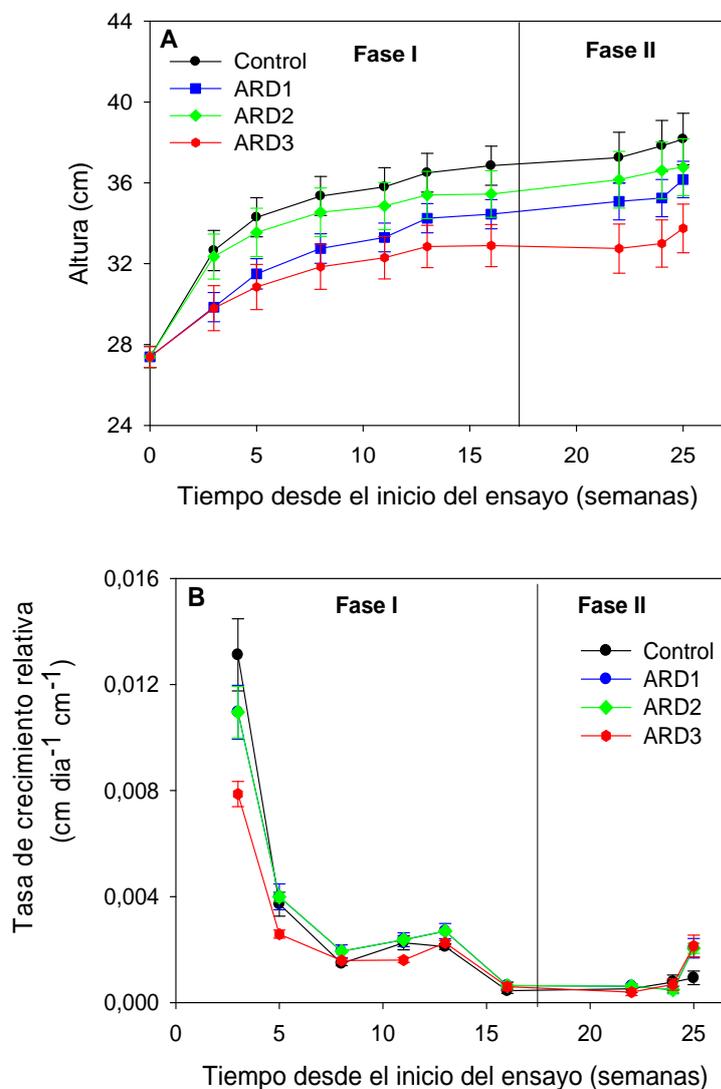


Figura 2.3.- Evolución de la altura (A) y tasa de crecimiento relativa (B) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo.

5.3.2.- Relaciones hídricas e intercambio gaseoso

En las primeras semanas desde la aplicación de los tratamientos, el potencial hídrico foliar (Ψ_h) resultó más negativo solamente para las plantas ARD3 (-1,1 MPa) (Figura 2.4A). Las plantas de los tratamientos ARD1 y ARD2 presentaron valores similares de Ψ_h (alrededor de - 0,9 MPa) y conforme avanzaba el ensayo hasta final de la fase I se producía separación de los tratamientos dependiendo del nivel de salinidad (Figura 2.4A). Al final de la fase II el tratamiento más salino (ARD3) no alcanzó valores a los del resto de los tratamientos. El CRA mostraba un comportamiento parecido al del potencial hídrico. El tratamiento ARD3 presentó los valores más bajos de CRA a lo largo de todo el ensayo (82%) (Figura 2.4B). El resto de tratamientos presentaron valores similares, destacando las plantas de ARD2 que durante gran parte del ensayo mostraron datos de CRA más altos que los mostrados por plantas tratadas con ARD1 (Figura 2.4B).

En relación a los parámetros de intercambio gaseoso, nada más empezar la fase I, se observó en todos los tratamientos con aguas residuales depuradas, una disminución en los valores de conductancia estomática (g_s) (Figura 2.5A) y en los valores de la fotosíntesis (P_n) (Figura 2.5B) que se mantuvo hasta el final de dicha fase al compararlos con los controles. Cabe destacar que dentro de los tratamientos con aguas residuales, el de mayor CE (ARD3) sufrió mayores descensos en la g_s y hacia el final de la fase I el tratamiento ARD1 en la P_n . Cuando comparamos el tratamiento ARD1 con el ARD2 resultó interesante observar una mejor respuesta del tratamiento ARD2. Durante la fase II las respuestas observadas para los tratamientos ARD1 y ARD3 se mantuvieron hasta el final del ensayo. Por el contrario, el tratamiento ARD2 mejoró en ambos parámetros, incluso tuvo valores más altos de P_n que los controles (Figuras 2.5A y 2.5 B).

Con respecto a las relacionadas estudiadas, al representar los valores de fotosíntesis frente a los de conductancia estomática (Figura 2.6A), se observó que las plantas de los tratamientos control y ARD2 tuvieron mayor apertura estomática. Lo contrario se produjo para los tratamientos ARD1 y ARD3. En relación a los valores de potencial hídrico foliar frente a los de conductancia estomática (Figura 2.6B), el tratamiento ARD1 a pesar de presentar valores de Ψ_h menos negativos mostraban valores de g_s menores en comparación con el tratamiento ARD2.

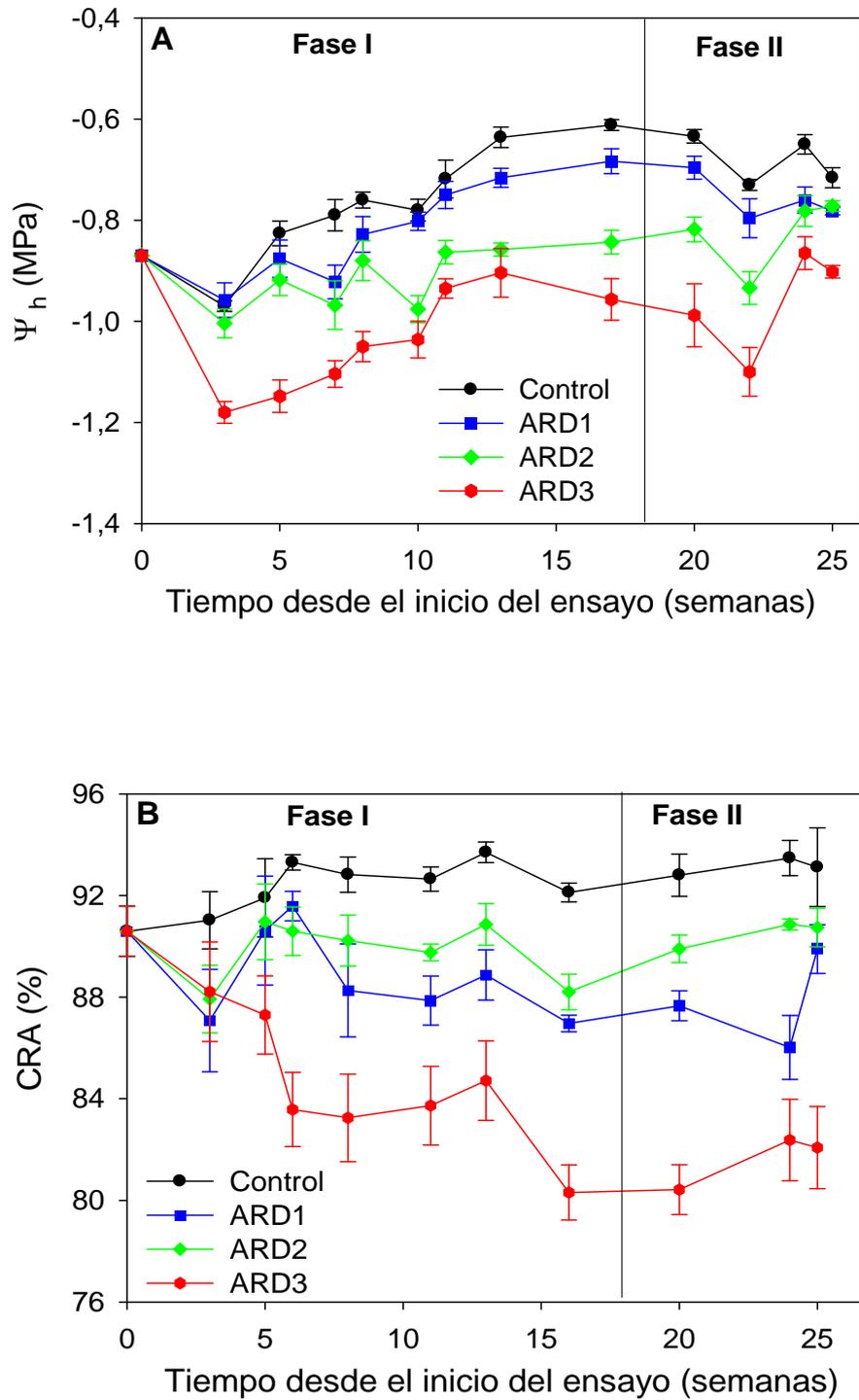


Figura 2.4.- Evolución del potencial hídrico (Ψ_h) (A) y del contenido relativo de agua (CRA) (B) en hojas de plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo.

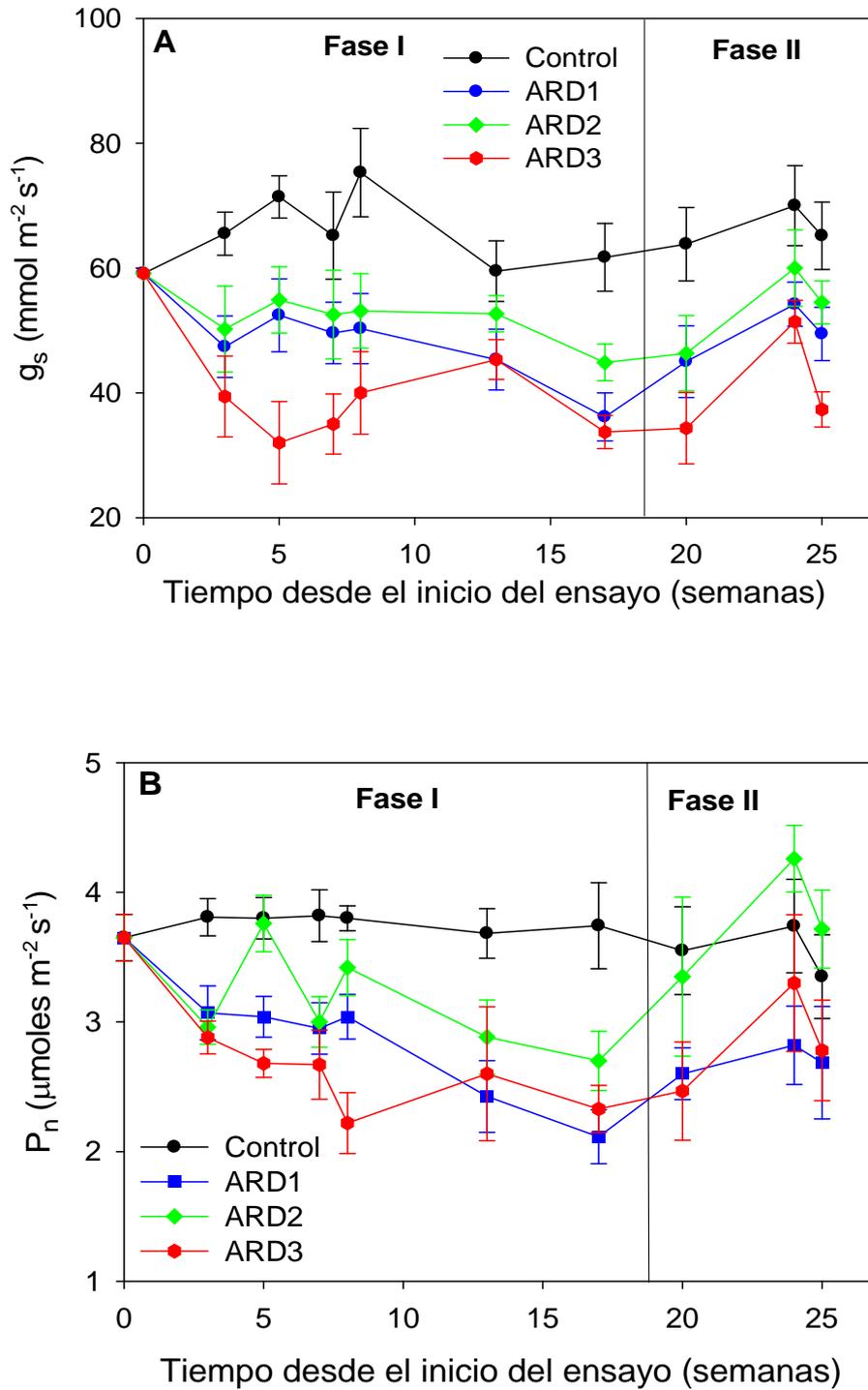


Figura 2.5.- Evolución de la conductancia estomática (g_s) (A) y de la fotosíntesis (P_n) (B) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo.

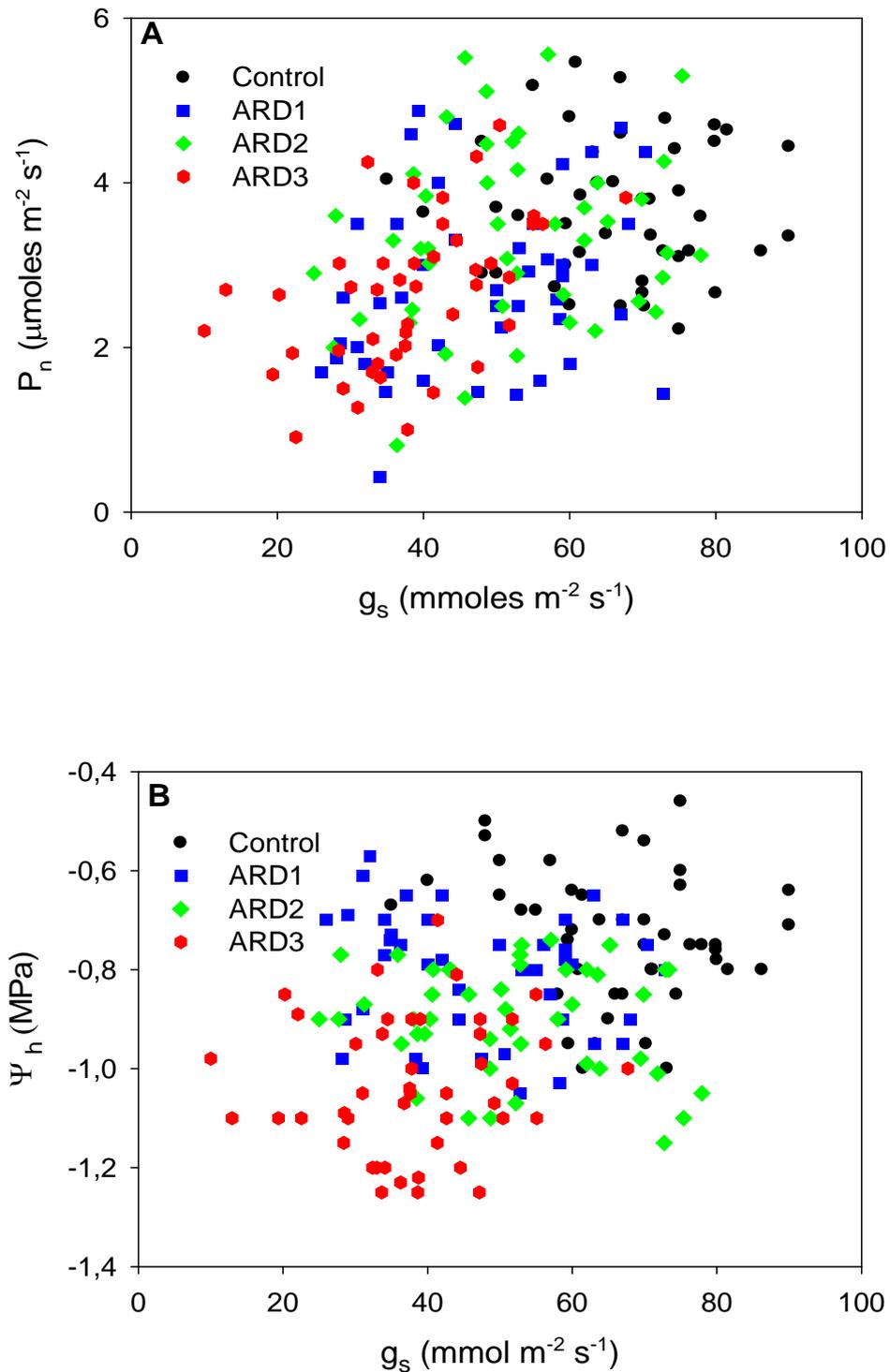


Figura 2.6.- Relación entre la fotosíntesis neta y la conductancia estomática (P_n/g_s) (A) y relación entre potencial hídrico foliar y conductancia estomática (Ψ_h/g_s) (B) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo.

5.3.3.- Contenido en clorofila y color de las hojas

El contenido en clorofila no se modificó por efecto de los distintos tratamientos de agua utilizados, ni en ninguna de las fases estudiadas (Figura 2.7 A y 2.7B).

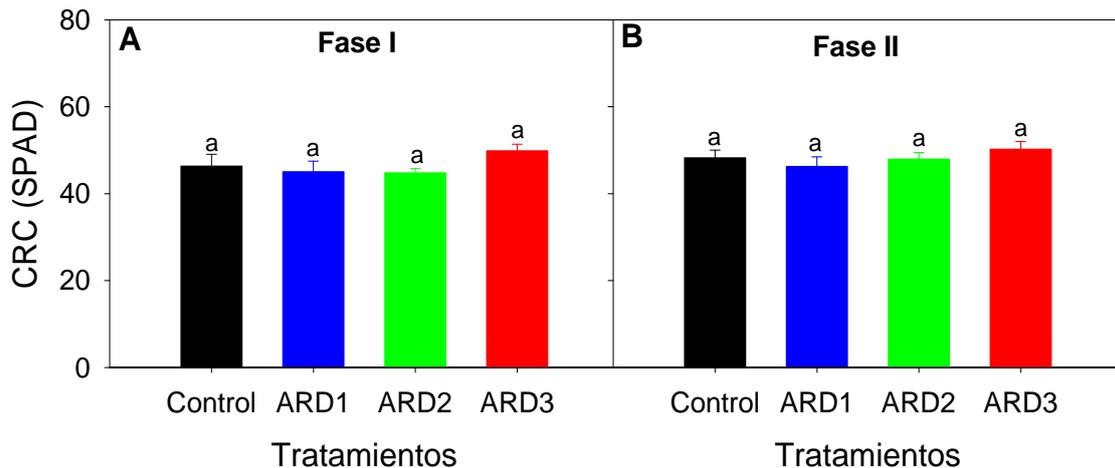


Figura 2.7.- Contenido relativo de clorofila (medido en unidades SPAD) en hojas en plantas *Myrtus communis* L. al final de la fase I (A) y de la fase II (B) sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo.

Los distintos parámetros de color (L, Croma y Hue) tampoco resultaron alterados cuando las plantas recibían tratamientos diferenciales de agua (fase I). En la fase II, se apreció que los tratamientos ARD2 y ARD3 presentaron valores similares entre ellos, pero los datos correspondientes a Croma y Luminosidad eran menores que los presentados por plantas Control y ARD1. Por otra parte, los valores del ángulo Hue eran mayores en las plantas ARD2 y ARD3, en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 2.8A, 2.8B y 2.8C).

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

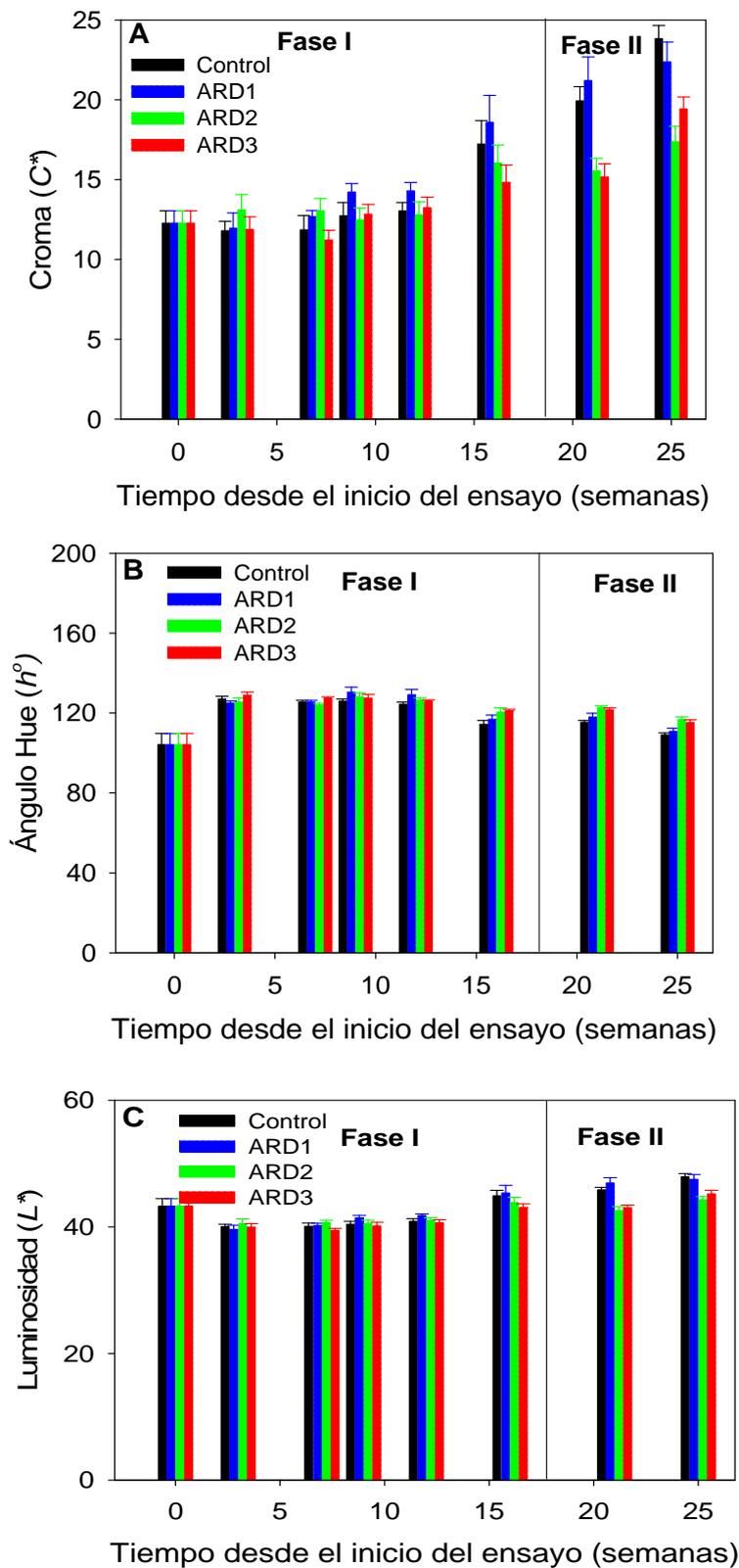


Figura 2.8.- Estudio de los distintos parámetros relacionados con el color de las hojas en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo.

5.3.4.- Absorción y distribución de nutrientes fitotóxicos en la planta (sodio, cloruro y boro)

Durante la fase I, la conductividad eléctrica (CE) del sustrato aumentaba de forma paralela al incremento de la CE del agua de riego aplicada (Tabla 2.5). Este aumento de CE era consecuencia, principalmente, de la acumulación de los iones Cl^- y Na^+ en el sustrato utilizado en el ensayo (Tabla 2.5).

Tabla 2.5.- Medida de la CE y el contenido iónico del sustrato de plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I.

Parámetros	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	ARD3	
CE (dS/m)	1,83±0,22a	3,30±0,33b	8,57±0,38c	8,33±0,23c	***
Cl^- mmol/Kg PS	7,53±1,11a	18,11±1,84b	55,65±2,92c	63,44±2,17d	***
Ca^{2+} mmol/Kg PS	1,03±0,09a	1,50±0,13a	6,26±0,40c	3,90±0,28b	***
Mg^{2+} mmol/Kg PS	0,83±0,11a	1,34±0,16a	8,99±0,43c	6,59±0,23b	***
Na^+ mmol/Kg PS	9,83±1,21a	21,61±2,12b	59,13±2,76c	63,57±1,75c	***

Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 8 plantas diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.001$.**

En la fase II, después de que todas las plantas se regaran con agua de baja conductividad (0,8 dS/m), la CE del sustrato se igualaba en los tratamientos de ARD, aunque el contenido en Na^+ seguía siendo mayor en el sustrato de las plantas ARD3 (Tabla 2.6). También conviene destacar que se observa una acumulación de sales en el sustrato del tratamiento control, en la fase II con respecto a la fase I, lo que podría ser debido al poco drenaje aplicado en este tratamiento. Sin embargo, en los sustratos de ARD2 y ARD3 se observaba un descenso en la acumulación de los iones Na^+ y Cl^- , probablemente debido al mayor drenaje aplicado en estos tratamientos con agua de buena calidad (Tabla 2.6).

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

Tabla 2.6.- Medida de la CE y el contenido iónico del sustrato de plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase II.

Parámetros	Tratamientos				
	Control	ARD1	ARD2	ARD3	P
CE (dS/m)	3,21±0,28	4,08±0,34	4,32±0,37	4,16±0,24	n.s
Cl ⁻ mmol/Kg PS	11,95±1,41a	16,31±1,62ab	19,50±2,80b	20,38±1,37b	*
Ca ²⁺ mmol/Kg PS	1,61±0,19a	1,96±0,16a	2,51±0,24b	1,84±0,12a	**
Mg ²⁺ mmol/Kg PS	1,41±0,18a	1,60±0,15a	3,03±0,32b	2,51±0,24b	***
Na ⁺ mmol/Kg PS	20,87±1,73a	27,85±2,32b	31,46±2,36bc	34,84±2,05c	***

Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 10 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y n.s: diferencias no significativas.

La absorción del ion sodio a través de las raíces, al final de la fase I, fue mayor en las plantas del tratamiento ARD3. Las plantas ARD1 y ARD2 tuvieron una tasa de absorción de Na⁺ más alta que la del control, pero las diferencias no fueron significativas (Figura 2.9A). En cuanto a la absorción del ion Cl⁻, sólo los tratamientos ARD2 y ARD3 mostraron valores estadísticamente mayores a los del control (Figura 2.9B). Respecto al B³⁺, todos los tratamientos ARD presentaban mayores tasas de absorción que las plantas control (Figura 2.9C). Con relación a la tasa de absorción del K⁺ sólo se observó un descenso claramente significativo en el tratamiento ARD3 (Figura 2.9D). En cuanto a la tasa de absorción del Ca²⁺ todos los tratamientos con aguas residuales presentaban valores mayores que los de las plantas control (Figura 2.9E).

Al final de la fase II, una vez que las plantas se regaron con agua control, las plantas ARD1 y ARD3 presentaron una mayor tasa de absorción de Na⁺ que el resto de tratamientos (Figura 2.9A). Por el contrario, en la tasa de absorción del ion Cl⁻ no se producían diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Figura 2.9B). En relación con el B³⁺, todos los tratamientos ARD presentaron valores más altos con respecto al control y concretamente ARD1 y ARD3 presentaron las tasas de absorción de B³⁺ más altas (Figura 2.9C). Los valores de absorción del K⁺ fueron mayores en la fase I que en la fase II. En esta fase los valores de absorción del K⁺ fueron más bajos en las plantas previamente regadas con aguas residuales que en las plantas control (Figura 2.9D). En cuanto a las respuestas observadas para la tasa de absorción del Ca²⁺ únicamente mostraron valores significativamente bajos las del tratamiento ARD2 (Figura 2.9E).

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

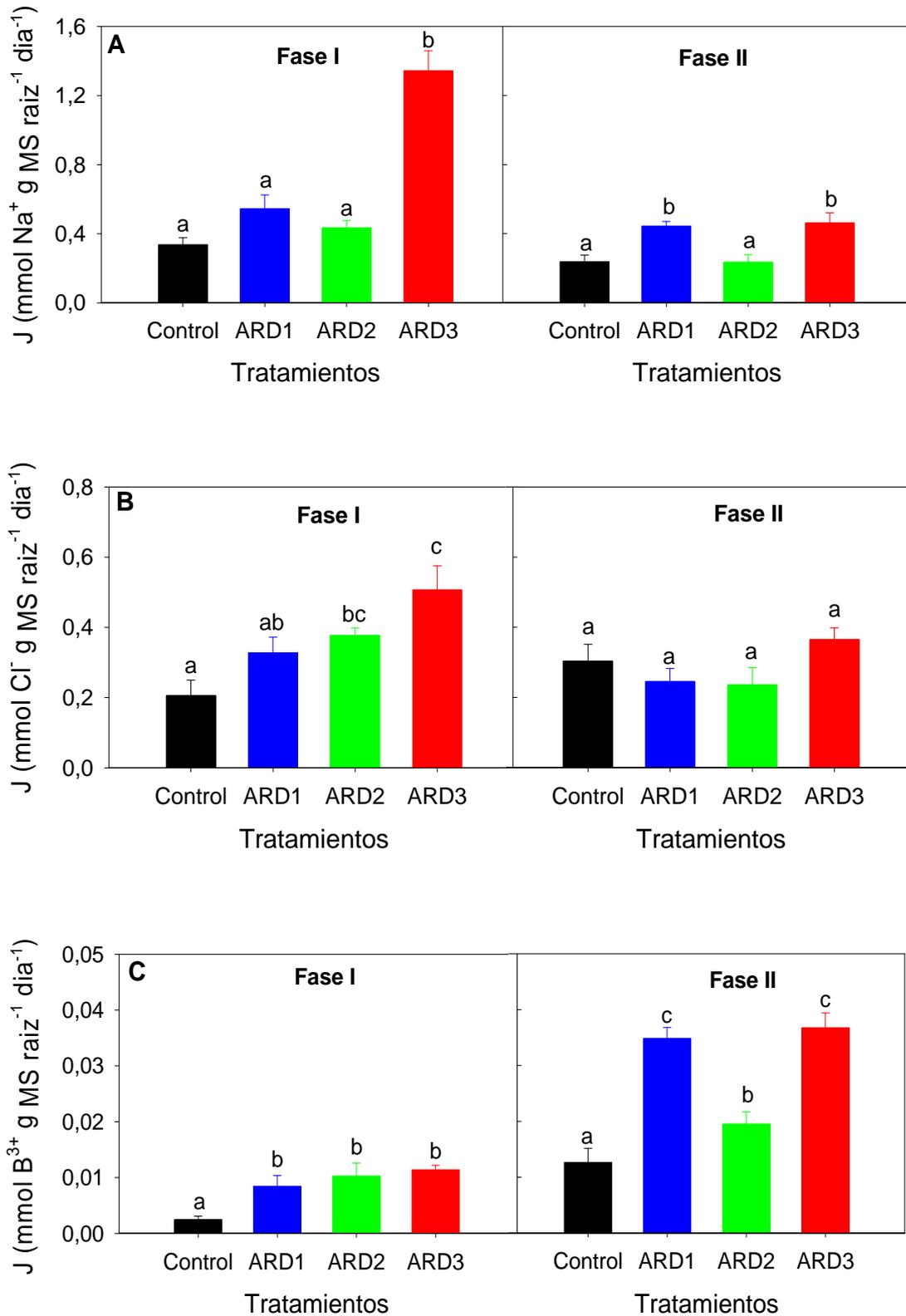


Figura 2.9A.- Tasa de absorción de los iones Na⁺ (A), Cl⁻ (B) y B³⁺ (C) en plantas de *Myrtus communis* en las diferentes fases del ensayo. Los datos representan los valores medios ± error estándar de al menos 8 plantas diferentes. Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

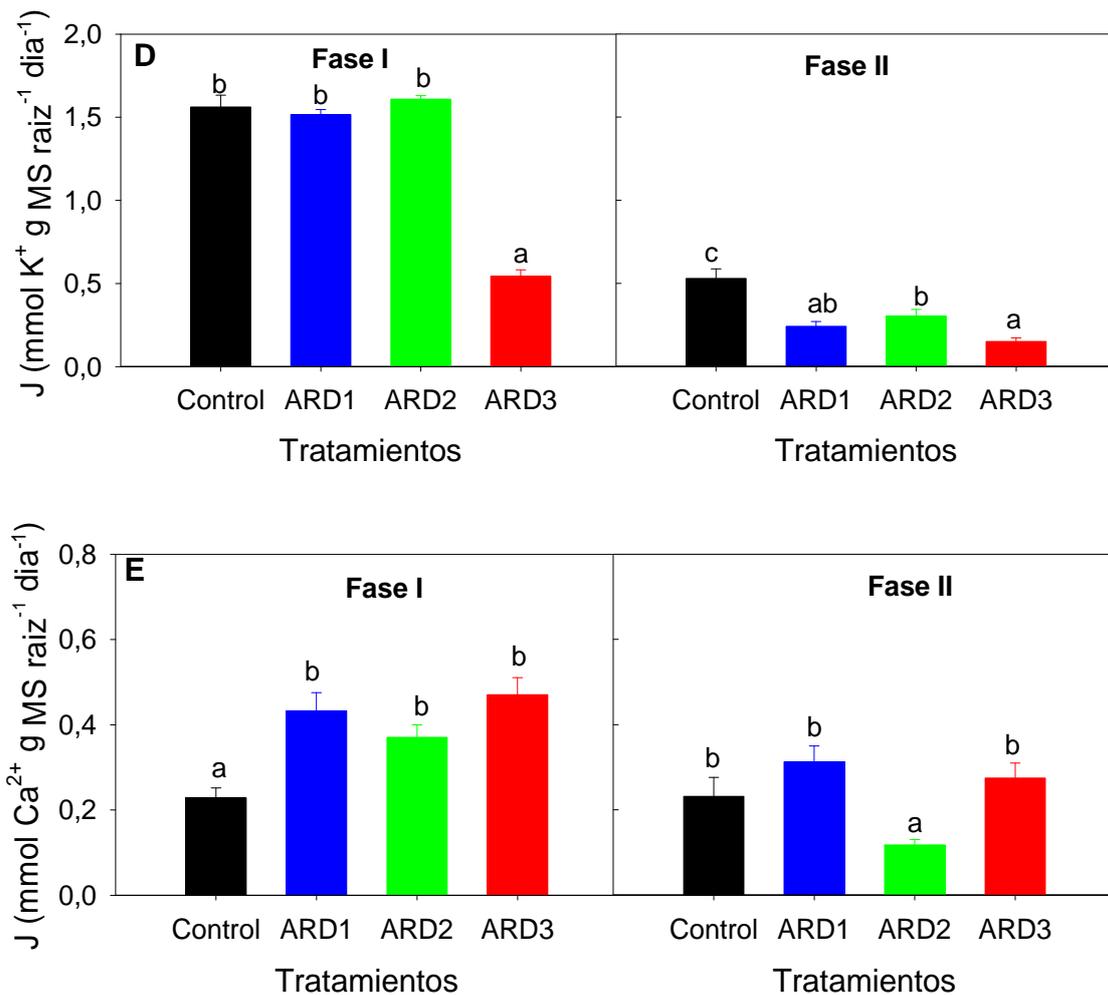


Figura 2.9B.- Tasa de absorción de los iones K^+ (D) y Ca^{2+} (E) en plantas de *Myrtus communis* en las diferentes fases del ensayo. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 8 plantas diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

Al final de la fase I, la acumulación de cloruros en hojas, tallos y raíces fue similar para las plantas ARD2 y ARD3. Sin embargo, la acumulación de Cl^- fue estadísticamente mayor en ARD3 con respecto al control, en todas las partes de la planta. En este sentido, los niveles de Cl^- aumentaron en un 62% en hojas, un 48% en tallos y en un 90% en raíces. En ARD2, si bien los contenidos de Cl^- era mayores que los de las plantas control, sólo se observaron diferencias significativas en la raíz. Las plantas control y ARD1 tuvieron valores similares de Cl^- en todas las partes de la planta (Tabla 2.7).

La acumulación de Na^+ fue estadísticamente mayor en todas las partes de las plantas ARD3 con respecto al control. El tratamiento ARD2 tuvo mayor acumulación de Na^+ en todas las partes de la planta pero solamente fue

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

significativa en hojas al compararlo con el control. Las plantas control y ARD1 tuvieron valores similares de Na^+ en todas las partes de la planta (Tabla 2.7).

En conjunto, podemos afirmar que la distribución de ambos iones tóxicos (Cl^- y Na^+) fue diferente. Los niveles de Cl^- eran bastante similares en todas las partes de la planta, en un mismo tratamiento. Sin embargo, la acumulación de Na^+ fue mucho mayor en raíces que en la parte aérea, lo que significaba que su transporte hasta los tallos y las hojas estaba limitado o restringido.

El boro se acumuló en mayor cantidad en las hojas de los tratamientos de mayor salinidad (ARD2 y ARD3) con respecto al control. Del mismo modo, el B^{3+} se acumulaba de forma significativa en los tallos de plantas ARD2 y en raíces de plantas ARD3. Las plantas control y ARD1 tuvieron valores similares de B^{3+} en todas las partes de la planta (Tabla 2.7).

Con respecto al K^+ fueron las plantas ARD2 las que acumularon mayores cantidades en todas las partes de la planta, sobre todo en hojas, si se las compara con el resto de tratamientos. Por el contrario, las plantas ARD3 acumularon K^+ en menores cantidades en todas las partes de la planta, al compararlas con los demás tratamientos, produciéndose un descenso de un 25% en hojas. De nuevo las plantas control y ARD1 tuvieron valores similares de K^+ en todas las partes de la planta (Tabla 2.7).

Finalmente, el Ca^{2+} se acumulaba de forma significativa en hojas y tallos de los tratamientos con mayor CE (ARD2 y ARD3), en comparación con los tratamientos control y ARD1, que acumularon cantidades similares. Con respecto a los valores encontrados para las raíces no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Tabla 2.7).

En la fase II, la acumulación de Cl^- en las distintas partes de la plantas fue estadísticamente similar en todos los tratamientos. Aunque si parecían acumularse mayores cantidades de Cl^- en hojas, conforme aumentaba la CE de los tratamientos (Tabla 2.8).

El Na^+ seguía acumulándose en todas las partes de la planta en el tratamiento ARD3. Las plantas ARD1 también presentaron valores estadísticamente más altos de Na^+ en hojas y raíces, no observándose diferencias significativas en tallos, con respecto a los controles. Las plantas ARD2 no mostraban diferencias significativas en ningún órgano de la planta al compararlas con los controles (Tabla 2.8).

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

Con relación al B^{3+} , este ión seguía acumulándose en las plantas que habían sido regadas con aguas regeneradas pero, sobre todo, en los tratamientos ARD1 y ARD3 (Tabla 2.8).

Con respecto al K^+ , se acumuló mayor cantidad en las hojas de los tratamientos control y ARD2. En los tallos y en las raíces se produjo un descenso en su contenido, a medida que aumentaba la CE de los tratamientos. En general, el tratamiento ARD3 presentó menores concentraciones de este ión en cada una de las distintas partes de la planta (Tabla 2.8).

Finalmente, la acumulación de Ca^{2+} fue estadísticamente menor en el tratamiento ARD2 en todas las partes de la planta si se compara con el resto de tratamientos ARD. Por otro lado, los niveles de Ca^{2+} eran mayores en las raíces de plantas ARD1 y en hojas de las plantas ARD1 y ARD3 (Tabla 2.8).

Tabla 2.7.-Concentración (expresada en mmoles/Kg peso seco) de los iones cloruro, sodio, boro, potasio y calcio en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I.

Iones	Órgano	Tratamientos				P
		Control	ARD1	ARD2	ARD3	
Cl ⁻	Hojas	74,37±10,96a	94,84±12,42ab	104,41±7,84ab	120,19±12,41b	*
	Tallos	66,85±4,99ab	57,84±7,40a	91,27±9,97bc	99,34±13,71c	*
	Raíz	64,60±1,90a	88,64±12,24ab	121,50±13,52b	123,19±17,48b	**
Na ⁺	Hojas	25,38±1,69a	36,80±3,38ab	59,35±6,41b	128,10±17,40c	***
	Tallos	60,38±6,25a	94,26±19,85a	86,72±7,63a	167,85±18,69b	***
	Raíz	162,13±16,53a	188,51±12,74a	184,88±18,67a	355,83±19,43b	***
B ³⁺	Hojas	8,02±0,16a	9,28±0,27ab	10,46±1,36b	10,58±0,34b	*
	Tallos	5,63±0,13a	6,21±0,28a	8,79±0,84b	6,13±0,13a	***
	Raíz	6,95±0,40a	7,29±0,47ab	6,80±0,55a	8,53±0,29b	*
K ⁺	Hojas	449,15±15,75b	456,52±26,24b	558,21±19,69c	333,28±8,20a	***
	Tallos	305,28±30,59a	311,52±51,30a	331,45±23,99b	232,69±16,82a	**
	Raíz	176,21±17,13ab	135,72±19,12a	202,93±11,15b	134,19±5,97a	**
Ca ²⁺	Hojas	108,73±6,90a	112,22±5,14a	161,32±15,59b	159,64±2,27b	***
	Tallos	113,04±12,21a	120,43±17,88a	120,06±16,54b	230,85±5,28b	***
	Raíz	119,60±11,56	101,30±17,86	111,66±7,70	99,09±0,11	n.s

Los datos representan los valores medios ± error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y n.s: diferencias no significativas.

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

Tabla 2.8.-Concentración (expresada en mmoles/Kg peso seco) de los iones cloruro, sodio, boro, potasio y calcio en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase II.

Iones	Órgano	Tratamientos				P
		Control	ARD1	ARD2	ARD3	
Cl ⁻	Hojas	69,86±14,89	75,72±12,11	84,73±15,55	96,00±14,52	n.s
	Tallos	71,89±16,28	82,70±12,05	83,38±13,58	77,97±9,24	n.s
	Raíz	75,72±14,06	58,82±5,67	59,61±7,03	68,96±7,81	n.s
Na ⁺	Hojas	31,62±4,57a	94,85±15,66b	39,92±8,52a	75,47±13,10b	***
	Tallos	98,80±17,59a	124,75±9,78ab	109,43±21,10a	167,60±16,13b	*
	Raíz	190,09±15,37a	282,83±13,48b	209,44±14,52a	274,95±22,27b	***
B ³⁺	Hojas	10,26±0,37a	12,96±0,55c	11,54±0,39b	14,11±0,41c	***
	Tallos	6,18±0,14a	7,67±0,19c	7,08±0,18b	7,79±0,19c	***
	Raíz	6,55±0,19a	9,09±0,22d	7,75±0,19b	8,45±0,15c	***
K ⁺	Hojas	401,14±6,85b	314,63±13,52a	419,56±17,44b	310,82±10,49a	***
	Tallos	298,96±16,77c	226,44±11,67b	203,87±16,06ab	181,85±5,86a	***
	Raíz	122,65±8,89b	99,13±7,13a	98,91±8,01a	87,58±7,40a	*
Ca ²⁺	Hojas	116,24±4,89ab	131,76±6,89bc	105,24±5,62a	135,96±4,76c	**
	Tallos	139,74±13,46b	136,11±10,84b	95,38±8,25a	139,14±11,49b	*
	Raíz	152,87±9,57a	202,81±17,07b	154,73±9,82a	164,18±13,10a	*

Los datos representan los valores medios ± error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y n.s: diferencias no significativas.

La relación entre el peso seco de la hoja y la concentración de iones Na⁺, Cl⁻, B³⁺ K⁺ y Ca²⁺ acumulados en la misma, se han representado en la (Figura 2.10).

Dicha relación, en el caso del Na⁺ al final de la fase I, indicaba una acumulación excesiva de este ión en el tratamiento ARD3, aunque no afectaba a la producción de biomasa. Al final de la fase II, se produjo una reducción de biomasa en los tratamientos ARD1 y ARD3 que fueron los tratamientos que presentaban mayores acumulaciones de este ión (Figura 2.10A). Destacó el comportamiento del tratamiento ARD2, que presentó, sobre todo al final de la fase I, mayor producción de biomasa (Figura 2.10A).

Con respecto al Cl⁻, a pesar de que se observó una mayor acumulación de dicho ion en el tratamiento ARD3 al final de la fase I y en los tratamientos ARD1 y ARD3 al final de la fase II, no parecía afectar claramente a la producción de biomasa seca (Figura 2.10B). Conviene destacar, de nuevo, la respuesta favorable al tratamiento ARD2, sobre todo al final de la fase I (Figura 2.10B).

La mayor acumulación de B³⁺ en el tratamiento ARD3, al final de la fase I, parecía no afectar a la producción de peso seco foliar. Al final de la fase II fueron los tratamientos ARD1 y ARD3 los que presentaron menor peso de

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

hojas y mayor acumulación de B^{3+} (Figura 2.10C). Se siguió observando una buena producción de biomasa para el tratamiento ARD2 (Figura 2.10C).

El comportamiento del K^+ podría explicar, en gran medida, la buena respuesta observada para el tratamiento ARD2 al final de las dos fases del ensayo. Se observó una gran acumulación de este ión, sobre todo al final de la Fase I que se correlacionaba con una mayor producción de biomasa. Por el contrario, el tratamiento ARD3 al final de la fase I y los tratamientos ARD1 y ARD3 al final de la fase II acumularon menos K^+ y presentaron una menor producción de biomasa (Figura 2.10D).

La relación observada para el Ca^{2+} al final de la fase I indicaría que las mayores acumulaciones observadas en los tratamientos ARD2 y ARD3 no afectaban a la producción de biomasa e, incluso, la favorecerían en ARD2. La respuesta al final de la fase II es totalmente contraria ya que las mayores acumulaciones de Ca^{2+} observadas en ARD1 y ARD3 eran paralelas a una reducción de biomasa, mientras que los tratamientos control y ARD2 presentaron un menor contenido en Ca^{2+} y un mayor crecimiento (Figura 2.10E).

Al final de la fase I los valores del cociente K^+/Na^+ disminuyeron significativamente en todos los órganos de las plantas ARD1, ARD2 y sobre todo ARD3, en comparación con el control (Tabla 2.9). Los valores del cociente K^+/Cl^- disminuyeron significativamente en el tratamiento ARD3 en hojas y tallos. En raíces fue estadísticamente diferente en los tres tratamientos con aguas residuales, al compararlos con el control (Tabla 2.9).

En cuanto al cociente Ca^{2+}/Na^+ , los valores en todos los tratamientos con aguas residuales también disminuyeron con relación al control, y en todas las partes de la planta, pero las diferencias fueron significativas solamente en el tratamiento ARD3 (Tabla 2.9).

Con respecto al cociente Ca^{2+}/Cl^- no hubo diferencias significativas en las hojas. En el tallo, los valores más altos correspondieron al tratamiento ARD1 y los más bajos al tratamiento ARD3. En las raíces los valores más altos correspondieron a los controles y los más bajos al tratamiento ARD2 (Tabla 2.9).

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

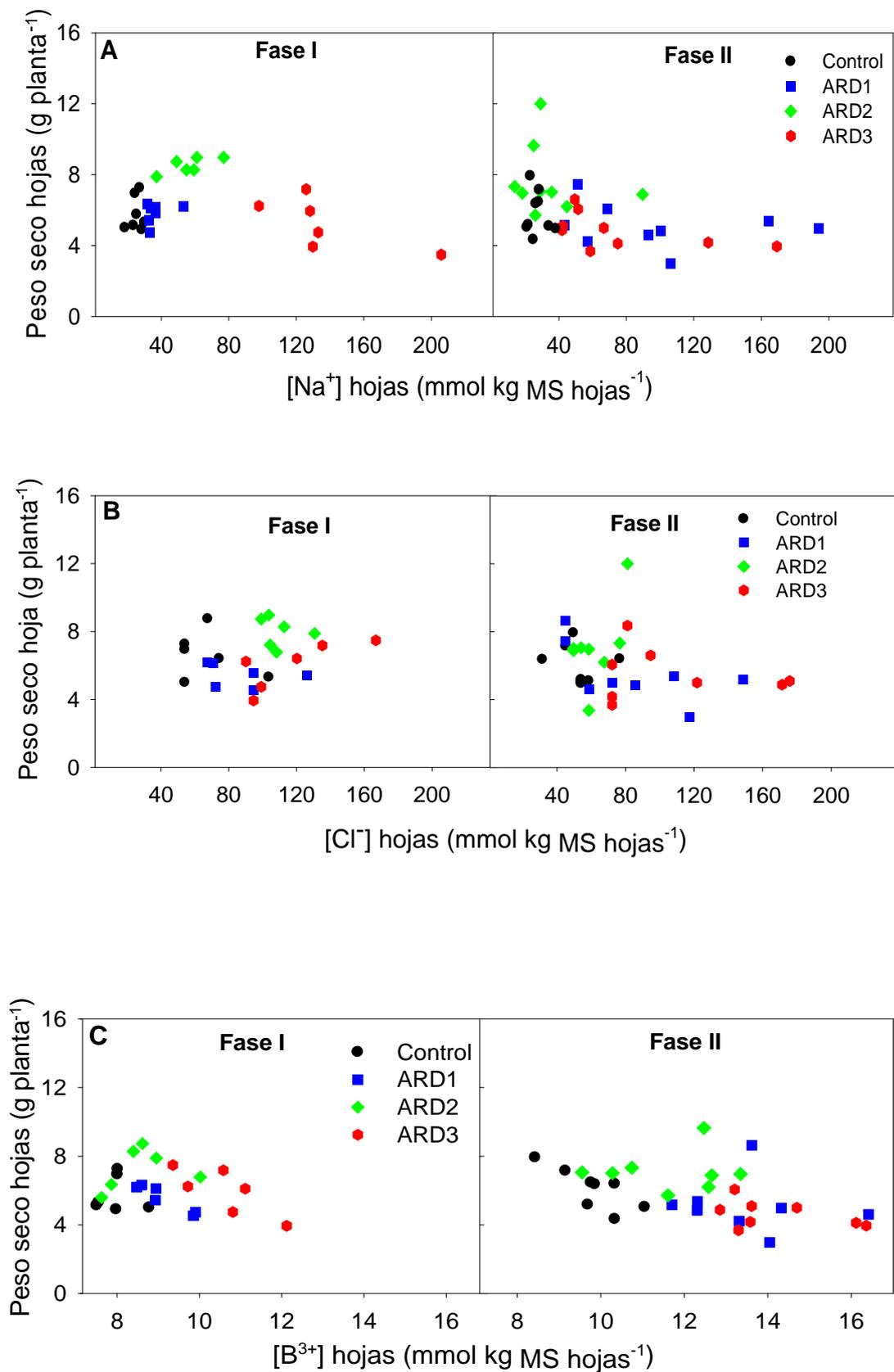


Figura 2.10A.- Relación entre el peso seco y la concentración en hojas de los iones Na^+ (A), Cl^- (B) y B^{3+} (C) en plantas de *Myrtus communis* L. en las diferentes fases del ensayo.

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

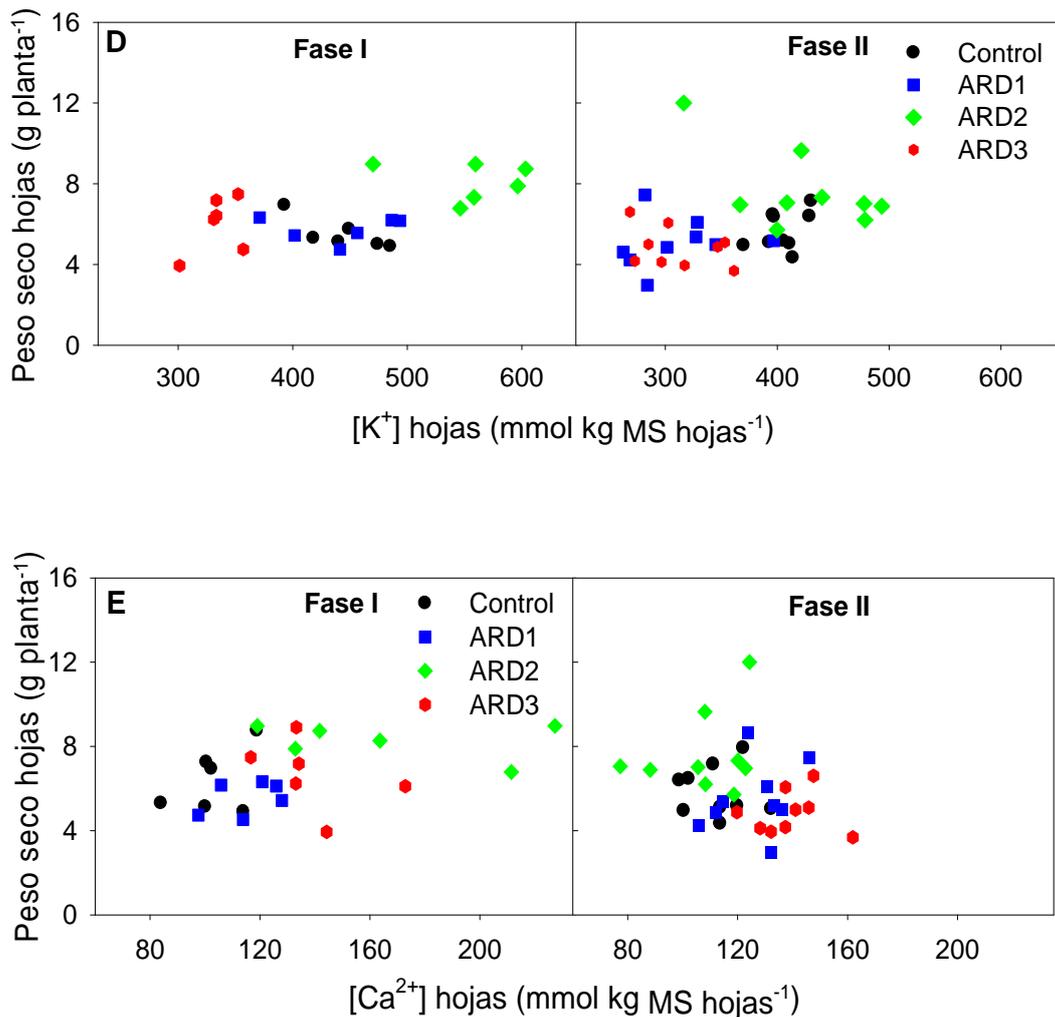


Figura 2.10B.- Relación entre el peso seco y la concentración en hojas de los iones, K⁺ (D) y Ca²⁺ (E) en plantas de *Myrtus communis* L. en las diferentes fases del ensayo.

Durante la fase I el cociente Na⁺/Cl⁻ en hojas aumentó conforme lo hacía la CE de los tratamientos, aunque sólo hubo diferencias significativas en el tratamiento ARD3. En tallos se observó una subida significativa en ARD3, mientras que en raíces se producía una bajada de este cociente solamente en ARD2 (Tabla 2.9).

Con respecto al cociente B³⁺/Na⁺ y al B³⁺/Cl⁻ los valores más bajos en todas las partes de la planta correspondieron al tratamiento ARD3 (Tabla 2.9). El cociente B³⁺/Na⁺ disminuía en hojas con el aumento de la salinidad, mientras que en tallos y raíz sólo se observó un descenso significativo en ARD3. Con respecto a la relación B³⁺/Cl⁻, también disminuía en hojas de plantas tratadas con aguas residuales. En tallo se observó un descenso en el cociente B³⁺/Cl⁻

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

sólo en plantas ARD3, mientras que en raíces disminuyó en los dos tratamientos de mayor CE. Al final de la fase II no hay una completa recuperación de los valores de dichos cocientes en ARD1 y sobre todo en ARD3. Por el contrario ARD2 presenta unos valores semejantes a los observados en los controles.

Tabla 2.9.-Cocientes de los iones representativos en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I.

Cocientes	Órgano	Tratamientos				P
		Control	ARD1	ARD2	ARD3	
K ⁺ /Na ⁺	Hojas	18,19±1,63c	12,99±1,42b	10,14±1,45b	2,84±0,36a	***
	Tallos	5,61±0,61c	3,68±0,80b	5,09±0,43bc	1,40±0,09a	***
	Raíz	1,21±0,12b	0,76±0,12a	1,23±0,21b	0,37±0,02a	***
K ⁺ /Cl ⁻	Hojas	6,68±0,91b	5,22±0,66b	5,55±0,60b	2,91±0,27a	**
	Tallos	5,05±0,71b	5,45±0,90b	4,78±0,27b	2,56±0,35a	*
	Raíz	2,76±0,29b	1,64±0,26a	1,77±0,20a	1,17±0,13a	***
Ca ²⁺ /Na ⁺	Hojas	4,18±0,36c	3,23±0,26b	3,01±0,33b	1,23±0,23a	***
	Tallos	1,75±0,15b	1,55±0,30b	1,76±0,22b	0,83±0,09a	*
	Raíz	0,75±0,04b	0,63±0,10ab	0,70±0,08b	0,44±0,01a	*
Ca ²⁺ /Cl ⁻	Hojas	1,55±0,22	1,30±0,14	1,69±0,19	1,22±0,13	n.s
	Tallos	1,59±0,19ab	2,27±0,31b	1,72±0,25ab	1,46±0,21a	*
	Raíz	1,70±0,12b	1,42±0,33ab	1,01±0,08a	1,36±0,12a	*
Na ⁺ /Cl ⁻	Hojas	0,37±0,04a	0,41±0,04a	0,57±0,05a	1,09±0,12b	***
	Tallos	0,95±0,14a	1,69±0,34ab	0,97±0,08a	1,90±0,34b	*
	Raíz	2,30±0,17b	2,21±0,31ab	1,51±0,18a	3,14±0,31b	**
B ³⁺ /Na ⁺	Hojas	0,32±0,02d	0,26±0,02c	0,17±0,02b	0,09±0,01a	***
	Tallos	0,10±0,01bc	0,07±0,01b	0,11±0,01c	0,04±0,00a	***
	Raíz	0,05±0,00b	0,04±0,00b	0,04±0,01b	0,02±0,00a	***
B ³⁺ /Cl ⁻	Hojas	0,12±0,01b	0,10±0,01a	0,09±0,01a	0,09±0,01a	*
	Tallos	0,09±0,01ab	0,11±0,01b	0,10±0,01b	0,07±0,01a	*
	Raíz	0,10±0,00b	0,08±0,01ab	0,06±0,01a	0,07±0,01a	**

Los datos representan los valores medios ± error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y n.s: diferencias no significativas.

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

Tabla 2.10.-Cocientes de los iones representativos en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase II.

Cocientes	Órgano	Tratamientos				P
		Control	ARD1	ARD2	ARD3	
K ⁺ /Na ⁺	Hojas	14,20±1,28b	4,14±0,70a	14,25±2,44b	5,05±0,70a	***
	Tallos	3,92±0,64c	1,98±0,26ab	2,64±0,53b	1,18±0,12a	***
	Raíz	0,71±0,11b	0,35±0,02a	0,49±0,04a	0,32±0,02a	***
K ⁺ /Cl ⁻	Hojas	7,12±0,87b	5,05±0,69ab	6,15±0,84b	3,84±0,51a	*
	Tallos	5,30±0,70b	3,30±0,48a	2,86±0,33a	2,63±0,32a	**
	Raíz	2,37±0,62	1,84±0,21	1,80±0,18	1,35±0,14	n.s
Ca ²⁺ /Na ⁺	Hojas	4,21±0,48b	1,72±0,26a	3,83±0,76b	2,19±0,28a	**
	Tallos	1,78±0,31b	1,18±0,15ab	1,18±0,22ab	0,86±0,06a	*
	Raíz	0,84±0,06b	0,72±0,05ab	0,74±0,02b	0,60±0,03a	*
Ca ²⁺ /Cl ⁻	Hojas	2,14±0,35	2,15±0,31	1,48±0,16	1,69±0,22	n.s
	Tallos	2,53±0,39	1,97±0,33	1,40±0,23	1,90±0,15	n.s
	Raíz	3,01±0,82	3,80±0,46	2,90±0,39	2,53±0,27	n.s
Na ⁺ /Cl ⁻	Hojas	0,54±0,08a	1,41±0,20b	0,64±0,18a	1,05±0,28ab	*
	Tallos	1,72±0,28	1,82±0,29	1,60±0,38	2,28±0,20	n.s
	Raíz	3,73±1,03	5,23±0,51	3,91±0,50	4,18±0,33	n.s
B ³⁺ /Na ⁺	Hojas	0,36±0,03b	0,16±0,02a	0,40±0,07b	0,22±0,02a	***
	Tallos	0,08±0,01ab	0,06±0,00ab	0,09±0,02b	0,05±0,00a	*
	Raíz	0,04±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00	n.s
B ³⁺ /Cl ⁻	Hojas	0,18±0,02	0,21±0,03	0,17±0,02	0,18±0,03	n.s
	Tallos	0,11±0,02	0,11±0,02	0,10±0,01	0,11±0,01	n.s
	Raíz	0,13±0,03	0,17±0,02	0,15±0,02	0,13±0,01	n.s

Los datos representan los valores medios ± error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y n.s: diferencias no significativas.

5.3.5.- Metabolismo antioxidativo

La pérdida de electrolitos (PE) se determinó para conocer si los tratamientos de riego inducían una alteración de la permeabilidad de las membranas celulares de las plantas (Figura 2.11). Tal y como se observa al final de la fase I (Figura 2.11A) no hubo diferencias significativas entre el tratamiento ARD2 y el control, siendo el tratamiento ARD3 el que presentaba los valores más altos para este parámetro. Al final de la fase II, (Figura 2.11B), los valores de pérdida de electrolitos seguían siendo estadísticamente elevados en el tratamiento ARD3.

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

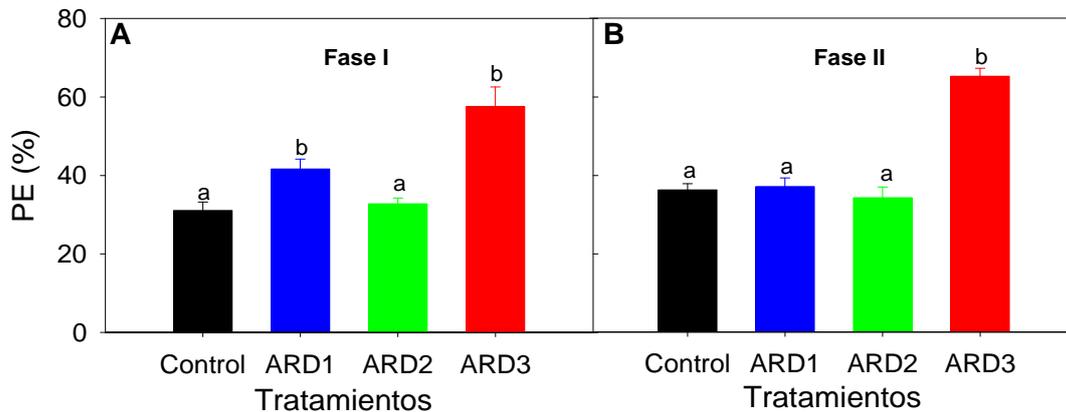


Figura 2.11.- Medida de la pérdida de electrolitos en plantas de *Myrtus communis* L. durante la fase I (A) y durante la fase II del ensayo (B).

También se estudió el efecto de los tratamientos de riego sobre la actividad de algunas enzimas antioxidantes, como la SOD, catalasa y POX y las enzimas del ciclo ASC-GSH (APX, MDHAR, DHAR y GR) Tabla 2.11, así como sobre los niveles de peroxidación de lípidos que es un parámetro de estrés oxidativo que puede servir como un marcador de daños en las membranas, al final de la Fase I (Figura 2.12). En este ensayo, la salinidad presente en el agua de riego de los distintos tratamientos no tuvo un efecto muy acusado en los niveles de peroxidación de los lípidos. Sólo con el uso de agua ARD3, la de máxima salinidad, al igual que ocurría con los datos de PE, se producía un aumento significativo de los valores de TBARS (Figura 2.12), pero de una magnitud muy inferior a lo mostrado en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. (Capítulo 1), indicando que los posibles daños producidos por la salinidad en las membranas en plantas de mirto eran menores.

Respecto a los niveles de las enzimas antioxidantes estudiadas, no se pudieron detectar las enzimas DHAR y MDHAR, implicadas en el reciclaje de ASC en el ciclo ASC-GSH. Para el resto de las enzimas, se observó un efecto en las mismas tanto con el nivel más bajo (ARD1) de salinidad como con el más alto (ARD3) (Tabla 2.11). Sorprendentemente, no se observaron cambios con el nivel intermedio de sales (ARD2). En plantas de mirto tratadas con el agua ARD1 ($1,5 \text{ dS m}^{-1}$) se producía un aumento de las enzimas SOD, POX y catalasa, mientras que la actividad APX disminuía en un 27% y la actividad GR no se modificaba (Tabla 2.11). En plantas tratadas con el agua de mayor salinidad (8 dS m^{-1}) se producía un aumento de las actividades SOD, POX, catalasa y GR, no presentando cambios la actividad APX (Tabla 2.11). Es de

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

destacar el fuerte aumento de actividad POX detectado en plantas regadas con el agua ARD3 (unas 3,2 veces de aumento) (Tabla 2.11).

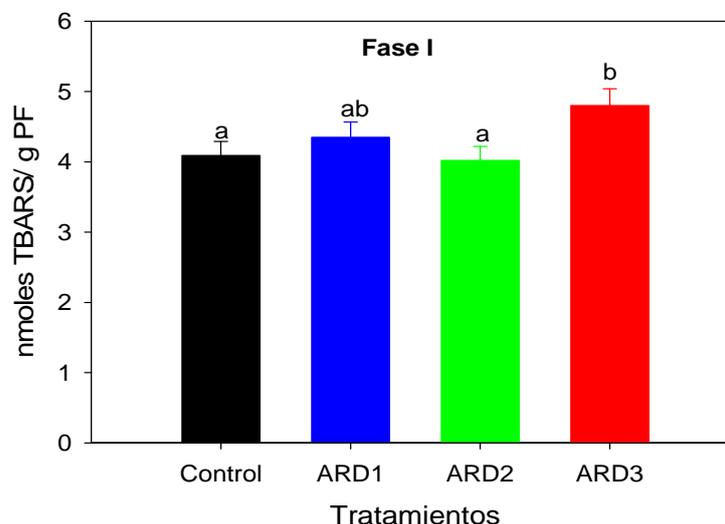


Figura 2.12.- Peroxidación lipídica medida en hojas como formación de TBARS en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

Tabla 2.11- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre la actividad de diferentes enzimas antioxidantes en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I.

Enzimas	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	ARD3	
CAT ($\mu\text{mol min}^{-1}/\text{g PF}$)	8,18a	13,92a	8,48a	11,77a	n.s
APX ($\text{nmol min}^{-1}/\text{g PF}$)	119,64a	86,43b	105,98ab	96,82ab	**
GR ($\text{nmol min}^{-1}/\text{g PF}$)	4,22ab	4,08ab	5,04a	3,74b	**
SOD (U/g PF)	35,75b	42,39a	35,05b	43,62a	**
POX ($\mu\text{mol min}^{-1}/\text{g PF}$)	49,97c	93,79b	47,55c	160,02a	***

Los datos representan los valores medios de 4 plantas diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y n.s: diferencias no significativas.

5.4.- Discusión

Las aguas residuales depuradas, según cual sea su origen, pueden tener un contenido en sales variable por lo que su uso pueda producir problemas de salinidad en las plantas, especialmente, cuando no se produce un buen manejo del riego. Por ello, uno de los aspectos a los que debe prestarse mayor interés para adecuar el uso de aguas de baja calidad consiste en seleccionar las técnicas de cultivo aplicables a las plantas ya que condicionan y afectan a su desarrollo, así como su comportamiento agronómico (Bañón *et al.*, 2012).

El manejo del riego mediante la regulación del drenaje es una herramienta válida para reducir los problemas de la salinidad del agua. Es decir, que cuanto menor sea la calidad del agua mayor drenaje hay que aplicar para evitar la acumulación de sales en el sustrato (Evans, 2004). En este ensayo se pudo constatar, de acuerdo con los resultados, que la aplicación de un drenaje, dependiendo de la conductividad eléctrica del agua de riego utilizada, minimizó los efectos negativos derivados de las sales. Así, después de cuatro meses de aplicar aguas con conductividades eléctricas entre 2-8 dS/m, se observó que no solamente no se producía un descenso de los parámetros de crecimiento estudiados, sino que incluso el tratamiento de ARD2 (4 dS/m) daba lugar a plantas con mayor peso seco de la parte aérea y de la raíz.

Puede argumentarse, entonces, que una de las ventajas del uso de aguas regeneradas se deriva de la propia composición del agua que puede presentar un mayor contenido en nutrientes y materia orgánica (Janssen *et al.*, 2005). Por tanto, es importante conocer la concentración de los solutos en el agua de riego que se utilice ya que los efectos tóxicos producidos en la planta por las altas concentraciones de Na^+ y Cl^- pueden ser contrarrestados por otros solutos tales como Mg^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} y Ca^{2+} . Así, en el análisis de agua procedente de aguas residuales depuradas se obtuvieron los mayores niveles de estos elementos y como consecuencia sus concentraciones en las plantas no se vieron disminuidas por el efecto del cloruro sódico, incluso aumentaron en el caso del P. También se encontraron los mayores niveles de Ca^{2+} y Mg^{2+} en el sustrato del tratamiento ARD2 (Gómez-Bellot *et al.*, 2013). Sin embargo, cabe destacar que las diferencias observadas entre las plantas objeto de estudio, por lo que respecta a algunos de los parámetros de crecimiento estudiados, se produjeron dos meses más tarde (fase II). Las plantas regadas

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

con ARD3 tuvieron menor biomasa y área foliar, indicando que, aunque se regaba con agua de buena calidad en la fase II, la acumulación de iones tóxicos durante el tiempo de este tratamiento puede ocasionar efectos negativos en el crecimiento. Con relación a la distribución de la biomasa, algunos autores han señalado que en algunas especies ornamentales, el crecimiento de los vástagos es más sensible a la salinidad que el de las raíces (Bañón *et al.*, 2011), tal como ocurría en las condiciones de este ensayo. De acuerdo con (Munns, 2002), el comportamiento de las raíces frente a los tratamientos salinos es sorprendentemente robusto en términos de tolerancia, cuando se comparan con otros tejidos vegetales.

El descenso del potencial hídrico y CRA en las plantas tratadas con ARD3 reflejan la mayor dificultad con la que se encuentran dichas plantas para tomar agua desde las primeras semanas del ensayo, como consecuencia de una mayor acumulación de sales en el sustrato (Álvarez *et al.*, 2012). Esto también se puso de manifiesto en los tratamientos ARD1 y ARD2 conforme avanzaba el ensayo. A pesar de la disponibilidad del agua en el sustrato, las sales promovieron un efecto osmótico cerca de la zona radicular, limitando la absorción del agua (Hardikar y Pandey, 2008). Este comportamiento se ha observado en otras especies ornamentales, cultivadas en condiciones similares (Navarro *et al.*, 2007; Miralles *et al.*, 2011). No obstante, la respuesta más marcada que se observó, consistía en un descenso en la conductancia estomática (g_s) como mecanismo para evitar pérdidas excesivas de agua (Munns y Tester, 2008). Ello ocurrió desde las primeras semanas de la aplicación de los tratamientos y de manera más evidente en el de mayor salinidad.

La tasa de fotosíntesis (P_n) no se vio tan claramente afectada, además las mayores tasas de P_n correspondieron a las plantas del tratamiento ARD2 que, a su vez, presentaban los mayores pesos secos. En muchos estudios, se ha visto que los efectos de la salinidad en P_n y g_s parecen ser dependientes de la especie estudiada, del nivel de salinidad y de la duración del estrés impuesto (Tattini *et al.*, 2002). El contenido en clorofila ha sido otro parámetro usado para detectar diferencias en la tolerancia a la salinidad de diferentes especies empleadas en paisajismo. En algunas especies se ha observado de forma paralela al aumento del nivel salino, una mayor reducción en el contenido de clorofila en las hojas y se correspondía con una menor tolerancia a dicho estrés (Cabrera, 2003). Sin embargo, en las condiciones descritas para este ensayo,

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

los contenidos de clorofila no se modificaron de forma significativa en los distintos tratamientos.

Con respecto a la permeabilidad de las membranas, solo se apreció una alteración para el tratamiento de 8 dS/m de CE en el agua de riego, junto con un aumento de la peroxidación lipídica. El valor estético es muy importante para las plantas ornamentales y los daños visibles a nivel foliar, tales como clorosis, necrosis, caída prematura de hojas, etc, producidos como respuesta al efecto de la salinidad son críticos para la evaluación de calidad de una planta. Todos estos síntomas no se presentaron en este ensayo, quizás las condiciones ambientales controladas de luz, temperatura y humedad, así como las prácticas de riego ayudaron a dicha respuesta (Fox *et al.*, 2005).

La inhibición de la fotosíntesis observada al final del ensayo se reflejó en la reducción de fotoasimilados y producción de materia seca en las plantas ARD3 (menor altura). Ello pudo estar relacionado con las mayores concentraciones de Na^+ y Cl^- en las hojas en comparación con el resto de los tratamientos (Álvarez *et al.*, 2012). No obstante, podría apuntarse que parecen más estrechamente relacionadas con los niveles de Na^+ acumulados ya que las plantas de ARD2 presentaron niveles similares al control y fueron las menos afectadas. Además los niveles de Cl^- fueron parecidos en todos los tratamientos. Sin embargo, no puede verse una relación clara entre la reducción de biomasa y la acumulación de los iones Na^+ , Cl^- y B^{3+} , quizás como consecuencia de que los rangos de acumulación de estos iones en las plantas no fueron muy altos.

En plantas glicófitas se ha descrito de forma general una relación inversa entre la absorción de sales y la tolerancia a la salinidad (Marschner, 1995). Las plantas de mirto acumularon Na^+ en sus raíces pero limitaban su transporte hasta la parte aérea de la planta. Por lo tanto, su nivel de tolerancia a la salinidad podría estar relacionado con la restricción del transporte de Na^+ a la parte aérea. Sin embargo, las plantas sometidas al tratamiento más severo acumularon mucho más Na^+ en todas las partes de la planta, especialmente en las raíces. La capacidad de las plantas para controlar la concentración de sales en la parte aérea, bien mediante su acumulación en las raíces, o mediante la reducción de su absorción por las raíces o limitando su transporte hacía los tallos y las hojas es un mecanismo importante para permitir la supervivencia de las plantas y su crecimiento en condiciones de estrés salino (Colmer *et al.*, 2005). Este mecanismo no evitaba la acumulación de Na^+ en hojas de

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

plantas ARD3, cuyos niveles eran de unas 2 veces superiores a los encontrados en plantas ARD2.

Por otro lado, las plantas tratadas mantuvieron unas relaciones K^+/Na^+ y Ca^{2+}/Na^+ relativamente altas en todas las partes de la planta, lo que se correlacionaba con la respuesta a la salinidad. En este sentido, tanto el K^+ como el Ca^{2+} cumplen una importante función para el crecimiento y el desarrollo vegetal, pero además son importantes en el mantenimiento del ajuste osmótico y en el turgor celular (Osakabe *et al.*, 2014).

Es evidente la ausencia de cambios en los niveles de peroxidación de lípidos en plantas de mirto regadas con los tratamientos ARD1 y ARD2. Sólo el tratamiento ARD3 producía un aumento significativo en los valores de TBARS, pero dicho aumento era mucho menor al observado en plantas de *E. myrtifolia* (ver Capítulo 1). Estas diferencias podrían estar motivadas por el tipo de especie usada en cada ensayo y por las condiciones de riego usadas en cada caso.

Respecto al efecto sobre las enzimas antioxidantes, cabe destacar el aumento de las mismas en plantas regadas con aguas que presentaban el menor contenido (ARD1) y el mayor contenido en sales (ARD3). Es sabido que el estrés salino induce un estrés oxidativo en plantas sensibles, mediado por radicales O_2^- y por H_2O_2 a nivel subcelular y que pueden mediar en la sintomatología producida por la salinidad (Hernández *et al.*, 1993, 1995, 2001). En este sentido, las plantas de mirto incrementan la actividad de algunas de sus enzimas antioxidantes en respuesta a la salinidad, por lo que parecen tener una mejor defensa frente a los ROS que pudieran generarse bajo dichas condiciones de estrés. Se ha descrito que la capacidad de inducción podría ser uno de los mecanismos de tolerancia de las plantas a la salinidad (Hernández *et al.*, 2000), pero también parece ser importante el compartimento celular donde tiene lugar el aumento y/o inducción de las enzimas antioxidantes (Bueno *et al.*, 1998, Hernández *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha descrito que la mayor tolerancia a NaCl requiere la inducción de enzimas antioxidantes específicos en una(s) organela(s) específica(s) (Hernández *et al.*, 1993, 1995, 2000; Gómez *et al.*, 1999; Mittova *et al.*, 2003).

Por otro lado, si comparamos los datos de las actividades antioxidantes en ambas especies vegetales son de destacar, en general, los mayores valores de actividad SOD, POX y GR presentados en plantas de mirto con respecto *E. myrtifolia* en condiciones control. En plantas tratadas con el mayor contenido

5.- Capítulo 2. Aguas residuales depuradas en plantas de *M. communis*

en sales, las plantas de mirto presentaron 3 veces más actividad SOD, 9 veces más de actividad GR, 1,3 veces más de actividad APX y 3 veces menos de actividad catalasa, así como 1,2 veces menos de actividad POX. Por ello no sólo parece ser importante la capacidad de inducción de las enzimas antioxidantes en la respuesta a la salinidad sino el mayor nivel constitutivo de las mismas que presente cada especie (Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Shalata y Tal, 1998; Tsugane *et al.*, 1999; Mittova *et al.*, 2000, Hernández *et al.*, 2003). Estos dos mecanismos parecen darse en plantas de mirto (mayor nivel constitutivo y capacidad de inducir actividades antioxidantes). Esto podría explicar, al menos en parte, los menores valores de peroxidación de lípidos y de pérdida de electrolitos encontrados en mirto con respecto a *E. myrtifolia*, sobre todo en el mayor nivel salino (ARD3). Por otro lado, también podrían estar influyendo las diferentes condiciones de riego impuestas en un caso y en otro. En este sentido, las plantas de mirto se sometieron a un drenaje en función del nivel salino usado en cada tratamiento que no se empleó en el caso de plantas de *E. myrtifolia*. Esto favorecería un mayor estrés salino en plantas de *E. myrtifolia* que en las de mirto, quedando reflejado tanto en los datos de crecimiento como en los valores de parámetros de estrés oxidativo y en los de las defensas antioxidantes.

6.- Capítulo 3. Efecto de los nutrientes y de la salinidad que aporta el agua de riego en la morfología, relaciones hídricas y cambios bioquímicos en plantas de *Myrtus communis* L.

6.- Efecto de los nutrientes y de la salinidad que aporta el agua de riego en la morfología, relaciones hídricas y parámetros bioquímicos y hormonales en plantas de *Myrtus communis* L.

6.1.- Introducción

Los desórdenes nutricionales en las plantas pueden ser consecuencia de los efectos que la salinidad provoca en la disponibilidad de los nutrientes, su absorción y transporte dentro de la planta, lo cual afecta a la calidad de los órganos vegetativos de la misma (Grattan y Grieve, 1994, 1999). La adición de nutrientes en el agua de riego (Asano y Pettygrove, 1987; Ferrini *et al.*, 2000) puede contrarrestar o reducir la incidencia de los daños producidos por las sales. En este ensayo se estudia si el riego con aguas regeneradas, supone realmente un beneficio para las plantas de mirto debido a los componentes presentes en las mismas, a pesar de que dichas aguas presentan un nivel de salinidad considerable. El agua regenerada procede de las estaciones depuradoras de Jumilla y Campo-Tejar, que presentaban unos valores de CE de 1,5-2 dS/m y 4-5 dS/m, respectivamente. Paralelamente, se estudió si la aplicación de una disolución de NaCl de 8 dS/m de CE tenía efectos tóxicos distintos a los observados con las aguas regeneradas usadas en el capítulo anterior (ARD3) que presentaba la misma CE. Por otra parte, en respuestas a situaciones de elevada salinidad, se producen cambios en la expresión de proteínas que pueden estar mediadas por fitohormonas tales como el ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), jasmonatos (JA) y ácido indol acético (AIA). Algunas de estas hormonas están relacionadas con la mitigación de los efectos osmóticos y salinos que se producen en respuesta a la salinidad.

Existen pocos trabajos en los que se relacionen la respuesta ecofisiológica y la inducción de fitohormonas en especies vegetales, en condiciones de estrés abiótico (Gómez-Cadenas *et al.*, 1998; Arbona y Gómez-Cadenas, 2008; Pérez-Clemente *et al.*, 2012) Por ello, además de tener en cuenta parámetros morfológicos y fisiológicos, se estudió el perfil hormonal que presentaban las plantas de mirto sometidas a diferentes tratamientos salinos durante tres meses en condiciones controladas.

6.- Capítulo 3. Plantas de *M.communis* regadas con aguas de diferente origen

6.2.- Material y métodos

6.2.1.- Material vegetal y condiciones experimentales

Se emplearon 120 plántulas de *Myrtus communis* L., las cuales fueron trasplantadas a macetas de 14 cm de diámetro (1,2 L), usando como sustrato una mezcla de fibra de coco, turba (negra y rubia) y perlita en proporción (8:7:1) (v/v/v). Estas macetas se trasladaron a una cámara de crecimiento controlado, simulando los cambios naturales de temperatura (23°C/18°C día/noche), luz (350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa) y HR (55%-70%). Las plantas quedaron distribuidas en 3 bloques al azar, conteniendo, cada uno, 4 bandejas con 10 plantas (40 plantas por bloque). Cada una de estas 4 bandejas de un bloque recibía un tratamiento distinto.

6.2.2.- Tratamientos

Durante el tiempo que duró el ensayo que fueron 3 meses (90 días) se aplicaron 2 tipos de aguas residuales depuradas (ARD), un tratamiento con agua control enriquecido con pastillas de NaCl (hasta alcanzar una CE de 8 dS/m) y un tratamiento control. El riego se aplicaba tres días por semana, pesando las macetas para que alcanzasen el valor umbral escogido para cada uno de los tratamientos, superándose la capacidad de campo, por lo que fue aplicado drenaje en función de la CE de los tratamientos. Concretamente se aplicó un drenaje entre un 10-15% para el tratamiento control, del 25-30% para ARD1, del 35-45% para ARD2 y del 50-60% para NaCl. El análisis de la composición de las distintas aguas aplicadas se muestra en la Tabla 3.1. Las aguas regeneradas presentaban mayores niveles de Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , P, S y SO_4^{2-} .

Tabla 3.1-Medida de la CE y análisis nutricional de las distintas aguas utilizadas en el ensayo.

Análisis nutricional del agua	Tratamientos			
	Control	ARD1	ARD2	NaCl
CE (dS/m)	0,80	1,50	4,50	8,00
B (mg/L)	0,13	0,30	1,05	0,08
Ca (mg/L)	45,35	138,90	215,30	25,75
K (mg/L)	11,22	33,06	53,27	9,14
Mg (mg/L)	24,13	66,37	136,43	13,99
Na (mg/L)	140,70	171,46	531,32	1531,20
P (mg/L)	<0,10	0,17	1,06	<0,10
S (mg/L)	87,72	162,22	424,25	56,43
Cl (mg/L)	84,20	235,17	800,38	2769,76
SO_4^{2-} (mg/L)	263,58	462,37	1056,65	199,99

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

6.2.3.- Medidas morfológicas y contenido mineral

En tres momentos concretos: al inicio del ensayo en 4 plantas por tratamiento, al mes y medio de aplicar los distintos tratamientos (45 días) y al final del ensayo a los 3 meses (90 días) en 6 plantas por tratamiento, se estimó el peso fresco, peso seco de las distintas partes de la planta y el área foliar total mediante un medidor AM 200 (ADC BioScientific Ltd.) así como los distintos índices de crecimiento (SLA, LWR y LAR).

Las concentraciones de Na^+ y B^{3+} se determinaron mediante el uso del espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-ICAP 6500 DUO Thermo, England) y el cloruro se analizó por cromatografía iónica con un Metrhom Chromatograph (Switzerland).

En los mismos periodos del ensayo y en las mismas plantas en las que se realizaron las medidas de crecimiento, se procedió a determinar el contenido mineral separando las distintas partes de la planta (hojas, tallos y raíces), los cuales se lavaron con agua destilada, se secaron a 80°C y se almacenaron a temperatura ambiente para proceder al análisis de solutos inorgánicos. La concentración de Cl^- se analizó mediante el uso de un analizador de cloruros (Model 926 Chloride Analyser, Sherwood Scientific Ltd.). La concentración de Na^+ , B^{3+} , K^+ y Ca^{2+} y los elementos S, P y Fe se midieron se determinó mediante el uso del espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES IRIS INTREPID II XDL).

La tasa de absorción de los iones Na^+ , Cl^- , B^{3+} , K^+ y Ca^{2+} se calculó a los 45 días y 90 días en las mismas plantas utilizadas para el análisis del contenido mineral, según la fórmula descrita por Pitman (1975).

6.2.4.- Medidas fisiológicas

Periódicamente a lo largo de todo el ensayo se midieron, en 6 plantas por tratamiento, durante las horas centrales de iluminación, cambios en el potencial hídrico foliar (Ψ_h), en el potencial osmótico actual de la hoja (Ψ_o), en el potencial de presión (Ψ_p), en el potencial osmótico a máxima saturación (Ψ_{os}), en la conductancia estomática (g_s), en la tasa de fotosíntesis neta (P_n) y en la temperatura de la hojas.

Los Ψ_h se estimaron de acuerdo con Scholander *et al.* (1965), usando una cámara de presión (Model 3000; Soil Moisture Equipment Co., Santa

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

Barbara, CA, USA). El potencial osmótico actual (Ψ_o) y a máxima saturación (Ψ_{os}) se midió usando un osmómetro de presión de vapor WESCOR 5520 (Wescor Inc., Logan, UT, USA) de acuerdo a Gucci *et al.* (1991). El potencial de presión se estimó como la diferencia entre el potencial hídrico foliar y el potencial osmótico actual.

Al final del período de estrés, a los 90 días de aplicar los distintos tratamientos se procedió al muestreo de hojas para la elaboración de curvas presión volumen (P-V), por medio de la técnica de libre transpiración para la obtención de curvas P-V (Tyree y Hammel, 1972), en cinco hojas por planta y 5 plantas por tratamiento. En el Apartado General de Material y Métodos se describe con más detalle el procedimiento utilizado.

Periódicamente a lo largo de todo el ensayo se midieron, en 6 plantas por tratamiento, la conductancia estomática (g_s) y la tasa de fotosíntesis neta (P_n). La g_s y la P_n se determinaron en hojas totalmente expandidas usando un aparato de intercambio gaseoso portátil (LI-6400; LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). Para las medidas de intercambio gaseoso se seleccionaron aquellas medidas que aproximadamente coincidieron con los 15 y 30 días de la fase de salinización y con la medida final de la fase de lavado.

Al final del ensayo a los 90 días de estrés, se midió en 6 plantas por tratamiento, la temperatura de las hojas a las 7 horas de iluminación en la cámara, mediante una cámara termográfica (NIR).

6.2.5.- Medidas bioquímicas y hormonales

Las determinaciones de L-prolina mediante espectrofotometría se realizaron en hojas a los 90 días de aplicar el estrés es decir al final del ensayo según Bates *et al.* (1973).

La concentración de Malondialdehído (MDA) se midió en hojas al final del ensayo siguiendo el procedimiento descrito en Hodges *et al.* (1999). La concentración de MDA en los extractos se calculó como en Arbona *et al.* (2008).

Por último se realizó un perfil hormonal en hojas al final del ensayo en donde se midieron ABA, AIA, JA y SA. Las hormonas vegetales se analizaron mediante HPLC acoplado a un espectrómetro de masas como se describe en Durgbanshi *et al.* (2005) y en Arbona y Gómez-Cadenas (2008). En el Apartado

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

General de Material y Métodos se describe con más detalle los distintos protocolos utilizados para cada una de las distintas medidas.

6.2.6.- Análisis estadístico de los datos

La significación de los efectos de las distintas aguas residuales (o de los diferentes tratamientos) fue analizada mediante un análisis de varianza simple (ANOVA) por medio del programa estadístico STATGRAPHICS PLUS para Windows. Las medias de los tratamientos fueron separadas con la Prueba de Rango Múltiple de Duncan ($P < 0.05$).

6.3.- Resultados

6.3.1.- Cambios morfológicos

Los parámetros que nos indican crecimiento de las plantas fueron determinados a los 45 días y los 90 días de comenzar la aplicación de los diferentes tratamientos. Aproximadamente al mes y medio del inicio de los distintos tratamientos, todas las plantas presentaron valores similares en casi todos los parámetros de crecimiento, a excepción del peso seco de la hoja y el área foliar del tratamiento de NaCl (8 dS/m), que mostraban una disminución de sus valores con respecto a los demás tratamientos. Por otra parte, el cociente entre el peso seco de las raíces y el peso seco de las hojas aumentó significativamente en las plantas tratadas con el mayor nivel de salinidad (Tabla 3.2).

Tabla 3.2- Efecto de los distintos tratamientos salinos sobre diferentes parámetros de crecimiento en plantas de *Myrtus communis* L. a los 45 días de aplicar el estrés.

Parámetros	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	NaCl	
Área foliar total (cm ²)	1732±225b	1785±272b	1907±165b	977±231a	*
Peso seco hoja (g pl ⁻¹)	2,25±0,32b	2,38±0,31b	2,17±0,14b	1,20±0,22a	**
Peso seco tallo (g pl ⁻¹)	3,05±0,47	3,37±0,29	3,03±0,20	2,93±0,42	n.s
Peso seco raíz (g pl ⁻¹)	3,61±0,43	4,39±0,30	3,75±0,39	3,50±0,62	n.s
Peso seco total (g pl ⁻¹)	8,92±1,18	10,14±0,80	8,95±0,65	7,63±1,20	n.s
P.S. Raíz /P.S. Aéreo	1,67±0,14a	1,99±0,23a	1,74±0,17a	3,07±0,37b	**
Suculencia (hoja)	2,47±0,05	2,46±0,13	2,61±0,23	2,39±0,30	n.s

Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y n.s: diferencias no significativas.

6.- Capítulo 3. Plantas de *M.communis* regadas con aguas de diferente origen

Estas mismas plantas presentaron menor biomasa de hojas y mayor biomasa de tallos con respecto al total de la planta (Figura 3.1), produciéndose una compensación que hace que el total de biomasa aérea en relación con el total de la planta no varíe.

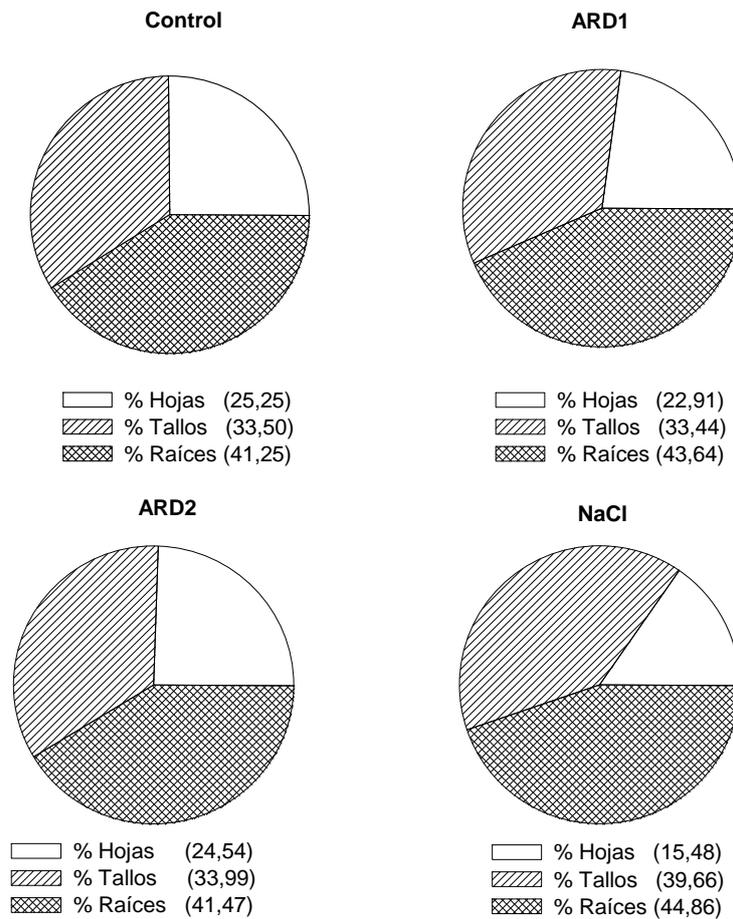


Figura 3.1.- Efecto de los distintos tratamientos salinos en la distribución biomasa en plantas de *Myrtus communis* L. a los 45 días de aplicar el estrés.

Los índices de crecimiento, área específica foliar (SLA) y relación de peso seco foliar (LWR) no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Solamente, el valor de la relación de área foliar (LAR) fue más bajo en el tratamiento de NaCl (Tabla 3.3).

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

Tabla 3.3- Efecto de los distintos tratamientos salinos sobre los diferentes índices de crecimiento en plantas de *Myrtus communis* L. a los 45 días de aplicar el estrés.

Índices	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	NaCl	
SLA x 10 ²	0,77±0,02	0,75±0,04	0,87±0,03	0,78±0,08	n.s
LWR	129,03±4,09	135,52±8,21	115,73±4,80	134,12±11,70	n.s
LAR x 10 ²	0,19±0,01b	0,17±0,01b	0,21±0,02b	0,12±0,01a	***

Los datos representan los valores medios ± error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, *** $P < 0.001$ y n.s: diferencias no significativas.

Al final del ensayo, después de tres meses de aplicación de los distintos tratamientos, se observaron diferencias significativas debidas a las distintas aguas de riego utilizadas (Tabla 3.4). Así, en la mayoría de los parámetros considerados, las plantas de ARD2 (4 dS/m) presentaban valores similares a los de las plantas control. Las plantas del tratamiento ARD1 presentaron un crecimiento intermedio entre las plantas controles y las de ARD2. El tratamiento de NaCl afectaba mucho más a las plantas de mirto, las cuales presentaban menor área foliar, menor peso seco de hoja, menor succulencia y mayor cociente entre la biomasa de las raíces y la parte aérea (Tabla 3.4).

Tabla 3.4- Efecto de los distintos tratamientos salinos sobre diferentes parámetros de crecimiento en plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicar del estrés (final del ensayo).

Parámetros	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	NaCl	
Área foliar total (cm ²)	1401±15b	1295±14ab	1478±17b	1048±11a	*
Peso seco hoja (g pl ⁻¹)	1,88±0,14b	1,96±0,23b	1,90±0,22b	1,14±0,22a	*
Peso seco tallo (g pl ⁻¹)	3,65±0,24ab	3,89±0,81ab	4,25±0,31b	2,70±0,30a	*
Peso seco raíz (g pl ⁻¹)	5,83±0,30	5,30±0,64	6,68±0,78	5,21±0,42	n.s
Peso seco total (g pl ⁻¹)	11,37±0,42ab	11,16±1,42ab	12,83±1,15b	9,06±0,90a	*
P.S. Raíz /P.S. Aéreo	1,07±0,08a	1,00±0,14a	1,08±0,08a	1,43±0,11b	*
Suculencia (hoja)	3,16±0,12b	2,85±0,14b	3,01±0,10b	2,20±0,29a	**

Los datos representan los valores medios ± error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

La acumulación de biomasa en las hojas con respecto a la biomasa total de la planta fue menor en plantas tratadas con NaCl en relación con las plantas control (Figura 3.2).

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

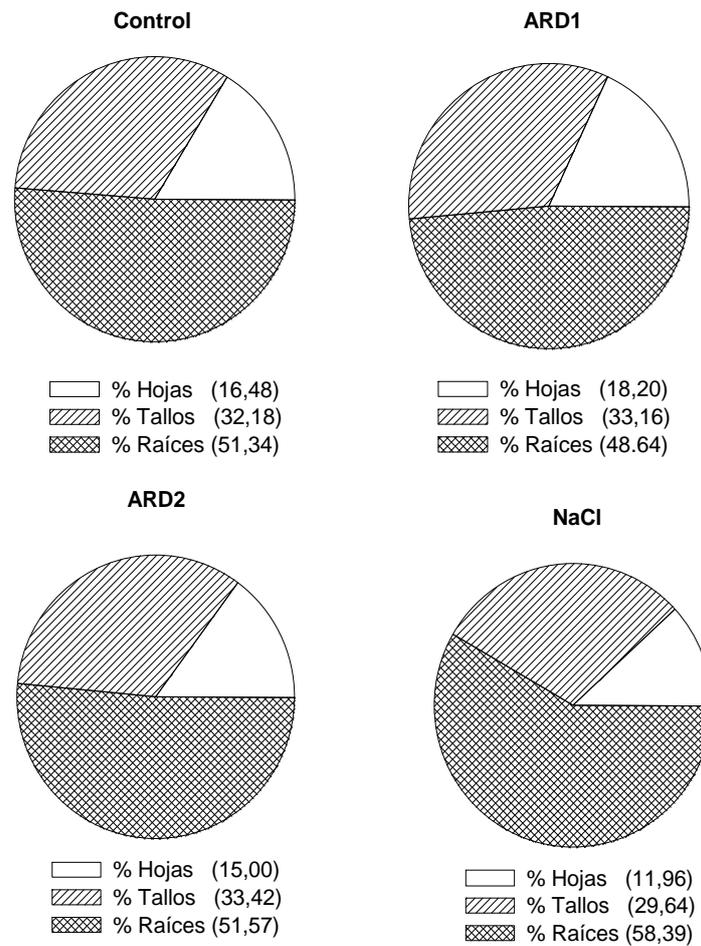


Figura 3.2.- Efecto de los distintos tratamientos salinos en la distribución de biomasa en plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicar del estrés (final ensayo).

Con respecto a los índices de crecimiento, al contrario de lo mostrado a mitad del ensayo (Tabla 3.3), SLA y LWR fueron estadísticamente diferentes en las plantas crecidas en presencia de NaCl (Tabla 3.5), mientras que en el índice LAR no hubo diferencias significativas.

Tabla 3.5- Efecto de los distintos tratamientos salinos sobre los diferentes índices de biomasa en plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicar del estrés (final del ensayo).

Índices	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	NaCl	
SLA x 10 ²	0,74±0,06a	0,67±0,03a	0,78±0,04a	1,05±0,14b	**
LWR	138,98±11,28ab	151,15±5,82b	129,04±7,21ab	108,43±17,01a	**
LAR x 10 ²	0,13±0,01	0,12±0,01	0,14±0,01	0,12±0,01	n.s

Los datos representan los valores medios ± error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, ** $P < 0.01$ y n.s: diferencias no significativas.

6.- Capítulo 3. Plantas de *M.communis* regadas con aguas de diferente origen

6.3.2.- Cambios fisiológicos

6.3.2.1.- Relaciones hídricas

El potencial hídrico foliar (Ψ_h) (Figura 3.3A) desde el inicio de los tratamientos disminuyó en las plantas sometidas a ARD2 y NaCl, aunque de una forma más clara en estas últimas plantas, a partir de la mitad del ensayo. Al final del ensayo, se producía un descenso de los valores de Ψ_h de manera paralela al nivel de salinidad aplicado en cada tratamiento, con valores de -0,6 MPa, -0,8 MPa, -1,1 MPa y -1,7 MPa para el control, ARD1, ARD2 y NaCl, respectivamente. Este mismo comportamiento se observó al considerar los valores de potencial osmótico Ψ_o (Figura 3.3B), produciéndose una caída importante de estos valores en el tratamiento de NaCl, que resultó progresiva con el paso del tiempo. Como consecuencia de esta respuesta, el potencial de presión o de turgencia (Ψ_p) aumentaba de manera considerable en estas plantas (Figura 3.3C). También, aunque en menor medida, las plantas de ARD2 tendieron a presentar una mayor turgencia foliar (Ψ_p) en algunos momentos del periodo experimental, si los comparáramos con los tratamientos control y de ARD1.

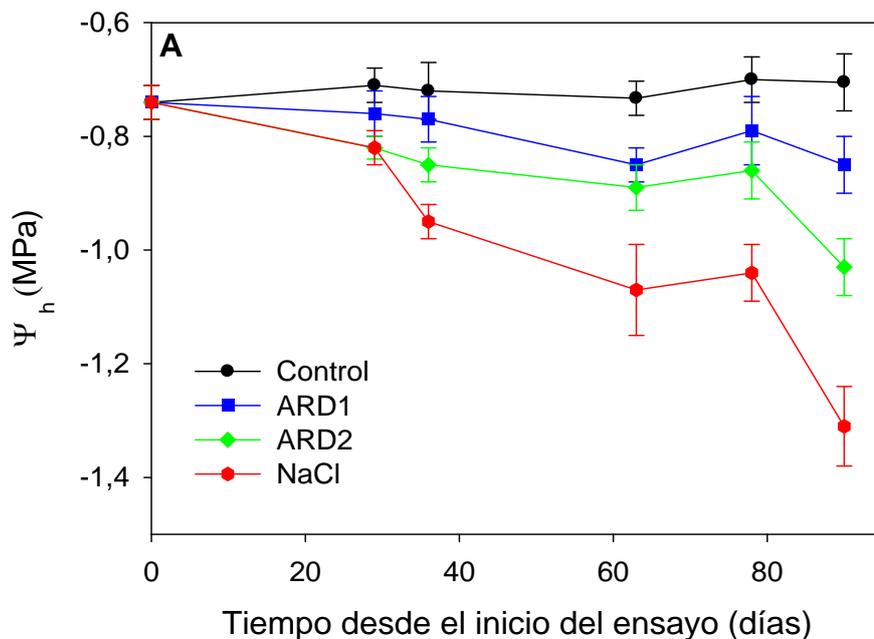


Figura 3.3A.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial hídrico foliar (Ψ_h , A) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a diferentes niveles de salinidad. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 6 plantas diferentes.

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

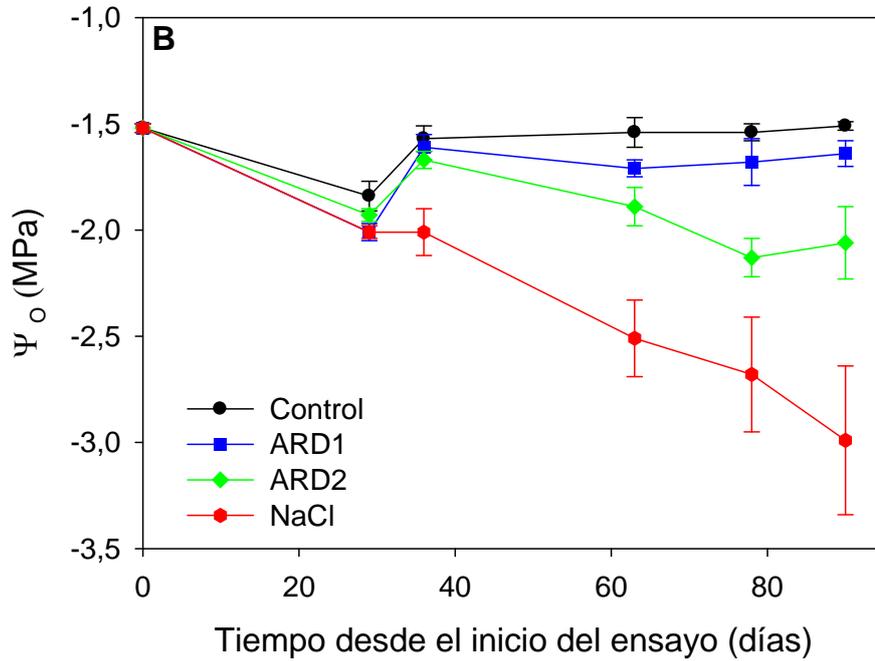


Figura 3.3B.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial osmótico actual (Ψ_o , B) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a diferentes niveles de salinidad. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 6 plantas diferentes.

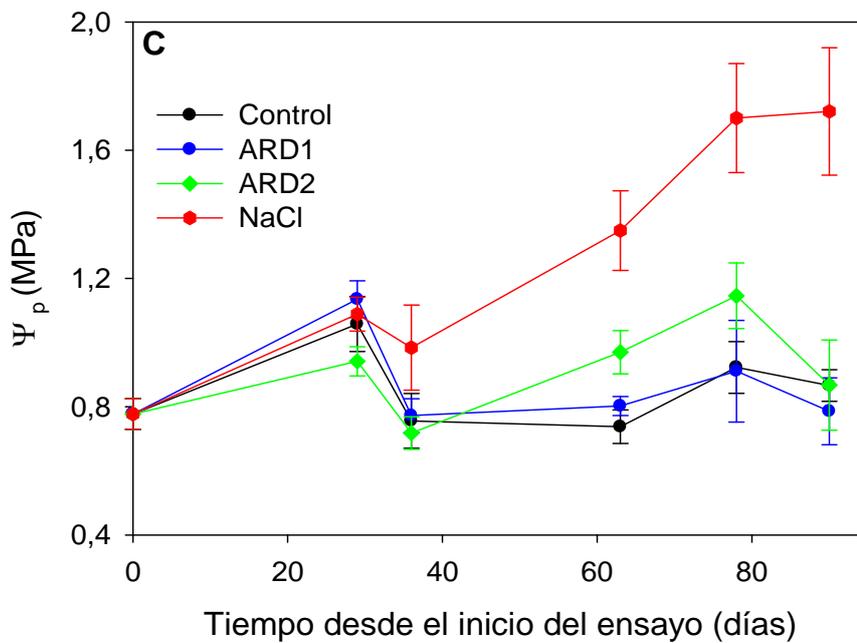


Figura 3.3C.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial de turgor o de presión (Ψ_p , C) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a diferentes niveles de salinidad. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 6 plantas diferentes.

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

El descenso del potencial osmótico en las plantas de los tratamientos de ARD2 y NaCl se debió a una acumulación activa de solutos. Esto se puede verificar si tenemos en cuenta la gráfica del potencial osmótico a máxima saturación (Ψ_{os}) (Figura 3.3D). Las plantas del tratamiento NaCl presentaban ajuste osmótico, descenso del potencial osmótico a máxima saturación con respecto al tratamiento control, sobre todo durante la última fase del ensayo (90 días).

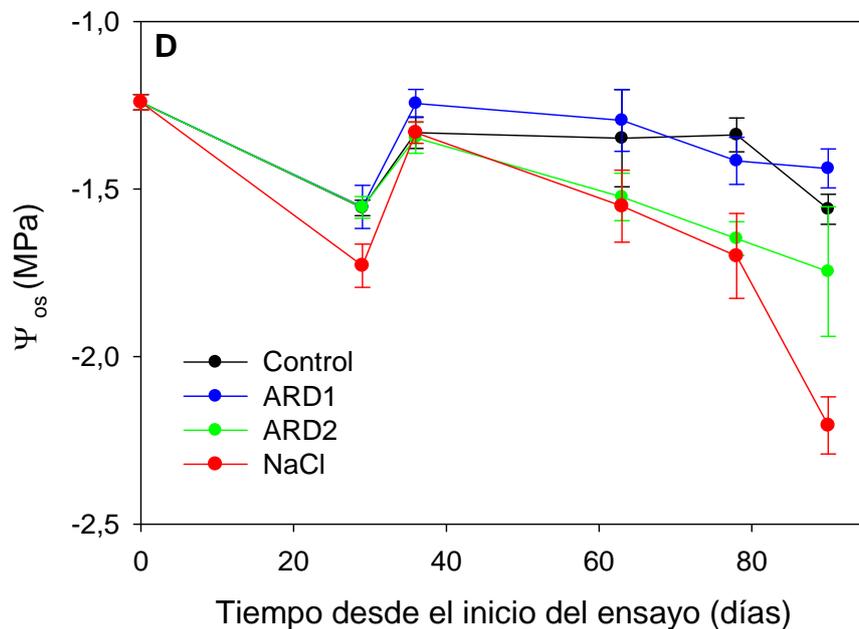


Figura 3.3D.- Evolución del potencial osmótico a 100% de saturación (Ψ_{os} , D) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a distintos niveles de salinidad. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 6 plantas diferentes.

En el análisis de las isothermas Presión-Volumen (P-V) se observó cómo el potencial hídrico en el punto de pérdida de turgencia (Ψ_{ppt}) presentó un descenso de sus valores en las plantas tratadas con NaCl con respecto a las plantas control (Tabla 3.6). Mientras, el punto de pérdida de turgencia ocurrió a un mayor valor de contenido relativo de agua (CRA_{ppt}), 81% frente al 70% para el control. Finalmente, los valores del módulo de elasticidad (ϵ) aumentaron de forma significativa en las plantas tratadas con los tratamientos más salinos (Tabla 3.6).

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

Tabla 3.6.-Parámetros derivados de las curvas P-V en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a distintos tratamientos salinos a los 90 días del ensayo (final del ensayo).

Parámetros	Tratamientos				P
	Control	ARD1	ARD2	NaCl	
CRA _{ppt} (%)	70,22±5,49a	71,58±7,24ab	71,85±10,54ab	81,30±1,79b	**
Ψ _{oppt} (MPa)	-1,78±0,40a	-2,25±0,50ab	-2,31±0,14ab	-2,55±0,54b	**
ε	4,03±1,80a	4,37±0,60a	5,19±1,40ab	7,48±2,61b	**

Los datos representan los valores medios ± error estándar de al menos 6 plantas diferentes. Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, ** $P < 0.01$.

6.3.2.2.- Intercambio gaseoso y termografía

Los parámetros de intercambio gaseoso, conductancia estomática (g_s) y fotosíntesis neta (P_n) medidos al final del ensayo quedan reflejados en las (Figuras 3.4A y 3.4B). Ambos parámetros disminuían de forma progresiva conforme aumentaba el nivel de salinidad de los tratamientos. La temperatura foliar aumento en las plantas coincidiendo con los menores valores de g_s , con una diferencia de aproximadamente un grado entre las plantas sometidas a NaCl y el resto de ellas (Figuras 3.4D).

En las Figuras 3.5A y 3.5B se representaron las relaciones entre P_n y Ψ_h con respecto a g_s . Dichas relaciones indicaban que los menores valores de P_n se correspondían con menores valores de g_s (Figura 3.5A). De forma similar, también se observaba que los valores de Ψ_h más negativo se correlacionaban con valores más bajos de g_s (Figura 3.5B), y en todos los casos correspondían al tratamiento de mayor salinidad.

6.- Capítulo 3. Plantas de *M.communis* regadas con aguas de diferente origen

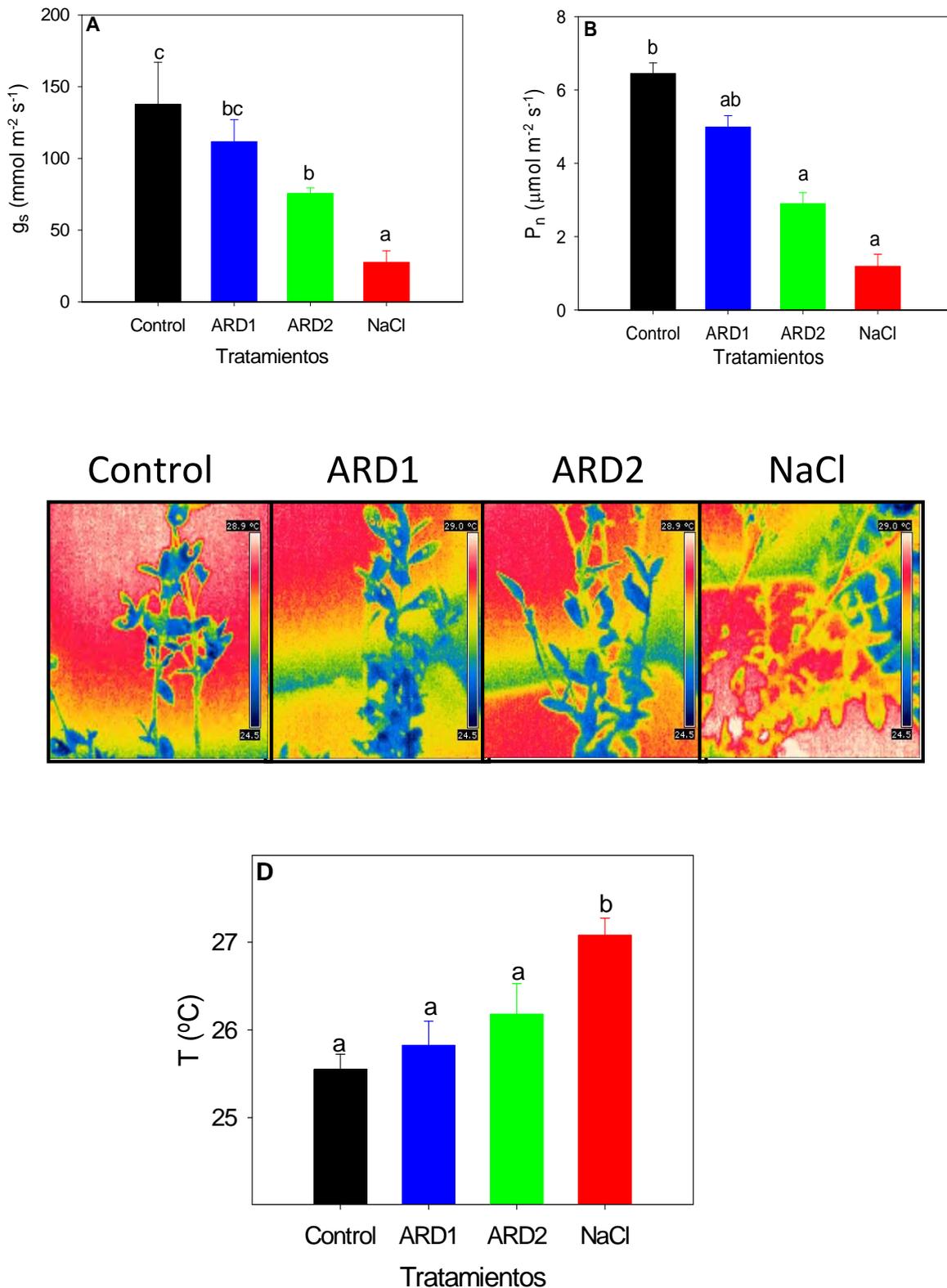


Figura 3.4.- Medidas al final del ensayo (90 días) de la conductancia estomática (g_s) (A), de la fotosíntesis (P_n) (B) y de la temperatura foliar (C y D) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a diferentes niveles de salinidad. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 5 plantas diferentes. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

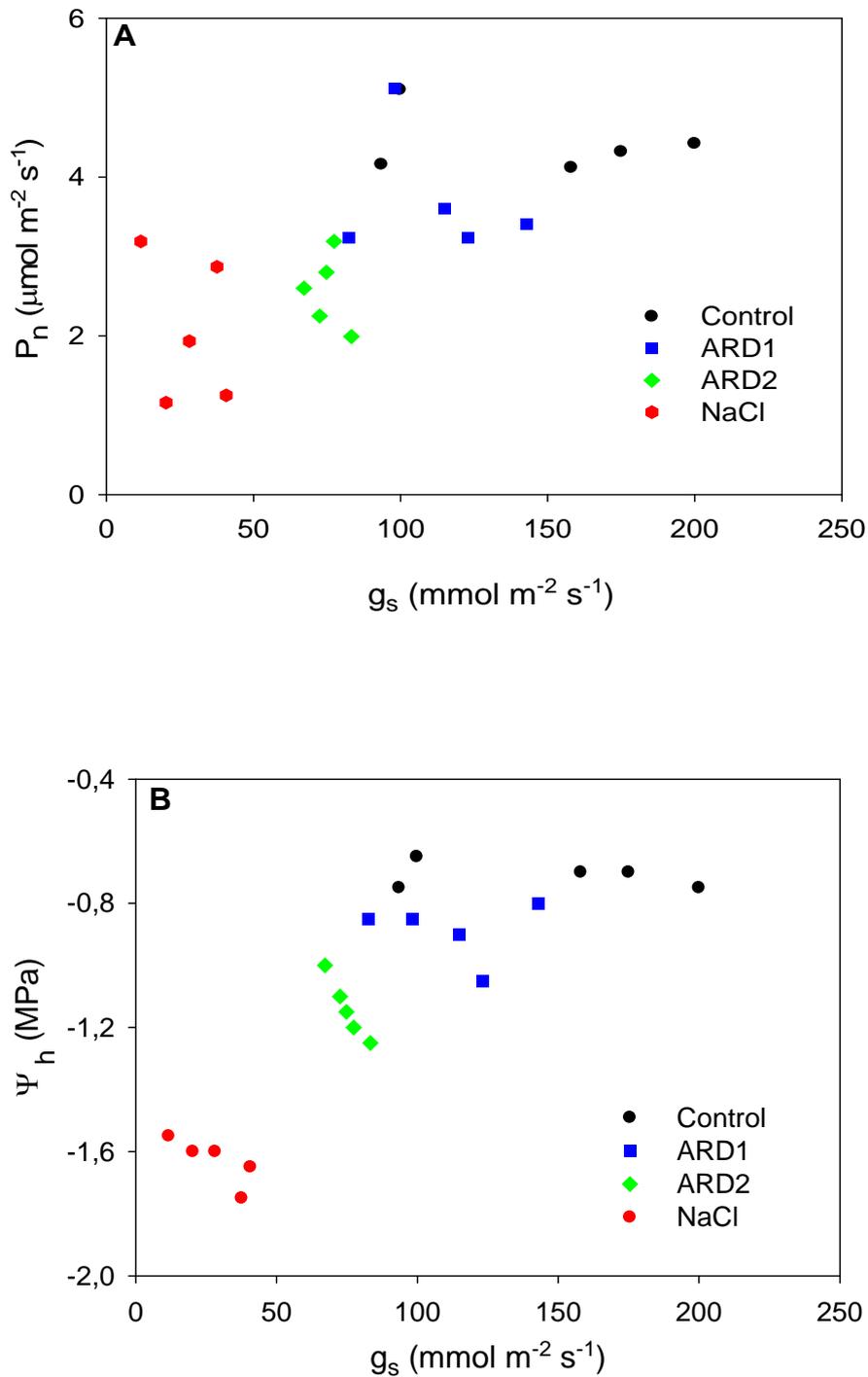


Figura 3.5.- Relación entre la fotosíntesis neta y la conductancia estomática (A) y relación entre potencial hídrico foliar y conductancia estomática (B) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a diferentes niveles de salinidad al final del ensayo. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 5 plantas diferentes.

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

6.3.3.- Cambios nutricionales

Como era de esperar, tanto a los 45 días de la aplicación de los tratamientos cómo a los 90 días (al final del ensayo), las mayores tasas de absorción de los iones Na^+ y Cl^- corresponden a las plantas del tratamiento de NaCl (Figuras 3.6A y 3.6B). Respecto al B^{3+} , no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, siendo el nivel de absorción de este elemento muy bajo a los 45 días. Al final del ensayo los mayores niveles se observan en los tratamientos ARD1 y ARD2 (Figura 3.6C). En relación a la tasa de absorción del K^+ , solo se observó un descenso claramente significativo en el tratamiento de NaCl a los 45 y 90 días y en general los valores disminuían con la duración del tratamiento (Figura 3.6D).

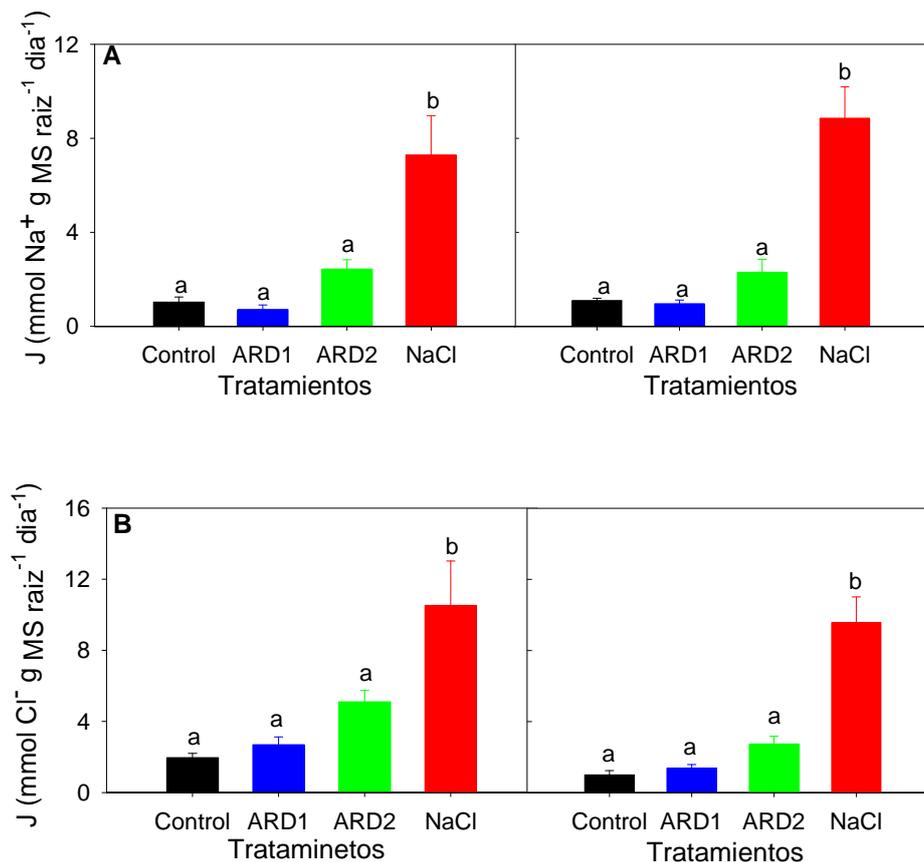


Figura 3.6A.-Tasa de absorción de los iones Na^+ (A), Cl^- (B), en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a salinidad a los 45 días (izquierda) y a los 90 días (final del ensayo, derecha). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

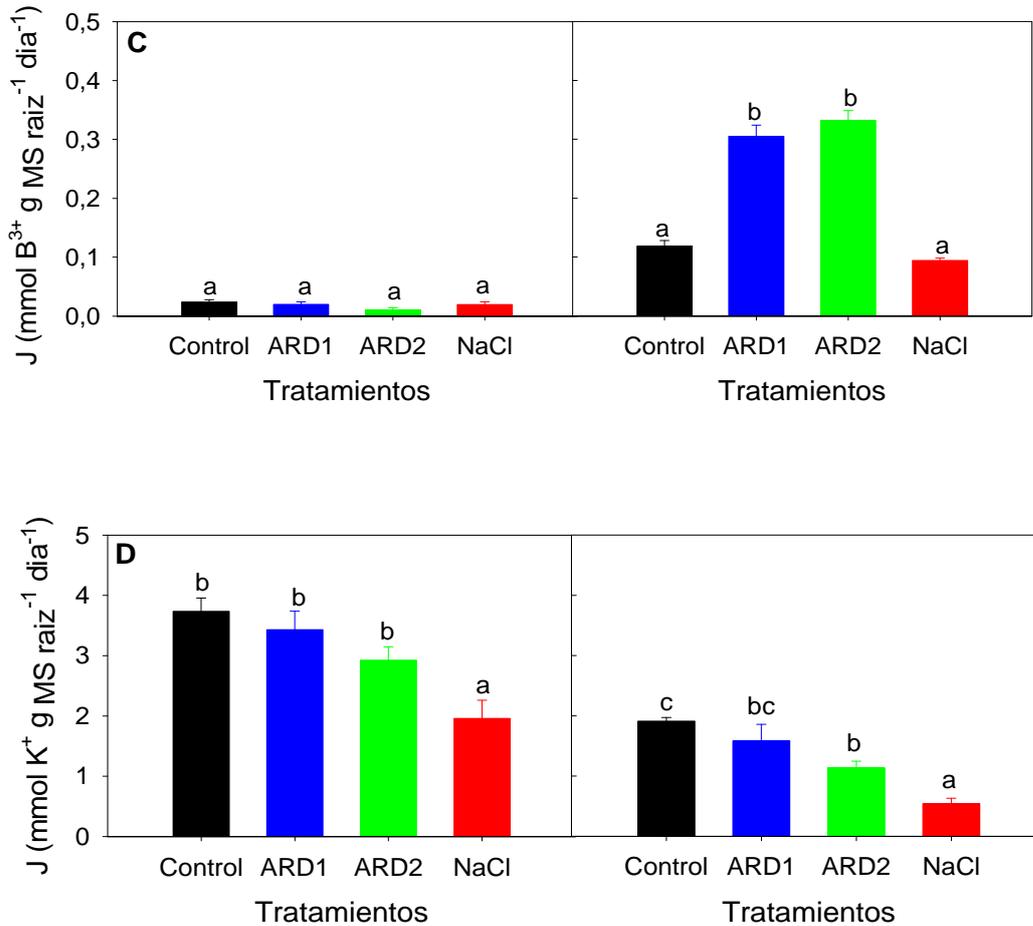


Figura 3.6B.- Tasa de absorción de los iones B³⁺ (C) y K⁺ (D) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a salinidad a los 45 días (izquierda) y a los 90 días (final del ensayo, derecha). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

La acumulación de Na⁺ y Cl⁻ a mitad del ensayo fue mayor en las hojas, tallos y raíces de las plantas de tratamiento de NaCl, siendo la acumulación de Cl⁻ en los tallos similar a la del tratamiento ARD2 (Tabla 3.7). Con relación a las acumulaciones de B³⁺ y Fe no se apreciaban diferencias significativas al comparar las distintas partes de la planta con los distintos tratamientos (Tabla 3.7). El contenido en Ca²⁺ Mg²⁺ y S fue mayor en las plantas de ARD2, mientras el contenido en P disminuyó en estas plantas. La concentración de K⁺ descendió en los tallos y raíces de las plantas de NaCl y en las raíces de las plantas tratadas con ARD2.

6.- Capítulo 3. Plantas de *M.communis* regadas con aguas de diferente origen

Tabla 3.7.-Concentración de los diferentes iones y elementos (expresada en mmoles/Kg peso seco) en plantas de *Myrtus communis* L. a los 45 días de la aplicación de los tratamientos salinos

Iones	Órgano	Tratamientos				P
		Control	ARD 1	ARD 2	NaCl	
Cl ⁻	Hojas	161,5±26,13a	191,6±46,64a	279,8±56,97a	773,7±183,6b	***
	Tallos	138,9±14,74a	208,5±24,12a	415,0±70,51b	499,5±98,99b	**
	Raíz	215,9±27,82a	208,5±16,13a	274,2±47,69a	454,5±18,32b	***
Na ⁺	Hojas	62,10±6,40a	53,89±3,94a	126,6±40,88a	482,6±125,4b	***
	Tallos	84,78±10,88a	89,32±9,00a	167,8±19,48a	364,8±54,57b	***
	Raíz	229,9±14,08a	196,8±13,86a	292,5±12,87b	413,5±10,39c	***
B ³⁺	Hojas	8,43±0,25	8,74±0,38	8,06±0,26	8,37±0,24	n.s
	Tallos	6,12±0,28	5,83±0,18	5,51±0,12	6,48±0,31	n.s
	Raíz	6,94±0,26	6,39±0,25	6,27±0,12	6,18±0,29	n.s
K ⁺	Hojas	374,38±9,28	371,28±14,31	375,85±11,34	396,79±7,87	n.s
	Tallos	325,2±9,75b	321,6±11,96b	308,3±15,31b	198,3±16,86a	***
	Raíz	257,4±11,92c	223,8±21,49bc	193,3±11,18b	153,4±9,48a	***
Ca ²⁺	Hojas	153,5±6,78a	181,3±14,94ab	195,1±9,87c	177,9±8,61ab	*
	Tallos	139,6±9,94a	135,5±2,93a	171,8±9,15b	123,7±10,09a	**
	Raíz	119,9±8,56ab	129,7±7,75ab	141,2±9,82b	115,0±4,57a	*
Mg ²⁺	Hojas	93,18±6,01a	103,37±5,65ab	115,72±3,81b	91,56±4,44a	**
	Tallos	37,61±2,81a	51,12±2,66b	68,54±4,04c	31,04±1,56a	***
	Raíz	42,08±2,64a	43,34±1,54a	54,98±2,8b	37,20±3,43a	***
S	Hojas	43,17±4,13a	47,73±3,00a	67,96±9,65b	33,84±1,44a	**
	Tallos	41,81±5,56a	54,63±3,18a	93,52±9,27b	40,47±2,41a	***
	Raíz	50,70±2,29b	51,33±3,11b	66,73±4,45c	40,33±1,51a	***
Fe	Hojas	0,74±0,05	0,88±0,06	0,72±0,05	0,83±0,06	n.s
	Tallos	0,45±0,03	0,50±0,05	0,44±0,03	0,53±0,04	n.s
	Raíz	1,59±0,11	1,32±0,09	1,55±0,13	1,27±0,20	n.s
P	Hojas	60,47±4,13b	61,24±10,60b	35,12±2,44a	43,38±4,17ab	**
	Tallos	24,80±0,72b	24,64±1,37b	19,73±0,61a	18,84±0,71a	***
	Raíz	45,95±5,88b	36,85±3,05ab	32,91±1,28a	36,42±1,46ab	*

Los datos representan los valores medios ± error estándar de al menos 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas, según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y n.s: diferencias no significativas.

Al final del ensayo, la acumulación de Na⁺ y Cl⁻ fue mayor en este periodo, especialmente en las plantas tratadas con NaCl, mientras que las plantas tratadas con ARD2 acumularon estos nutrientes de forma significativa sólo en raíces (Tabla 3.8).

El contenido de B³⁺ fue mayor en los tratamientos con aguas regeneradas (ARD1 y ARD2), observándose diferencias significativas en hojas, tallos y raíces cuando se la los comparaba con los otros tratamientos. En hojas, las concentraciones más bajas de B³⁺ se observaron en las plantas tratadas con NaCl (Tabla 3.8).

6.- Capítulo 3. Plantas de *M.communis* regadas con aguas de diferente origen

En el caso del ión Ca^{2+} , sorprendentemente se apreciaba unas concentraciones más altas en hojas, tallos y raíces para los tratamientos con mayor salinidad ARD2 y NaCl (Tabla 3.8). Con respecto al Mg^{2+} se observaron mayores acumulaciones, con diferencias significativas, en el tratamiento ARD2 en todas las partes de la planta, en comparación con el resto de tratamientos (Tabla 3.8). En relación al contenido de S, los valores más bajos correspondieron a hojas y tallos de las plantas control. La acumulación de S en raíces fue mayor en los tratamientos con aguas regeneradas (Tabla 3.8). Los contenidos de Fe fueron significativamente mayores en las hojas y las raíces del tratamiento NaCl. Con respecto a los tallos no se apreciaron diferencias en ninguno de los tratamientos estudiados (Tabla 3.8). En cuanto al P los contenidos más bajos en hojas, tallos y correspondieron a las plantas tratadas con los tratamientos de mayor CE (Tabla 3.8).

Tabla 3.8.- Concentración de los diferentes iones y elementos (expresada en mmoles/Kg peso seco) en plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicar los tratamientos salinos (final del ensayo).

Iones	Órgano	Tratamientos				P
		Control	ARD 1	ARD 2	NaCl	
Cl^-	Hojas	180,3±29,2a	225,4±39,03a	377,5±71,78a	1449,8±165,2b	***
	Tallos	163,4±15,6a	180,3±10,08a	291,1±30,01a	942,7±174,2b	***
	Raíz	200,9±21,3a	255,4±20,09a	398,1±38,56b	497,7±50,7b	***
Na^+	Hojas	64,36±5,24a	81,06±20,33a	214,6±88,25a	1286,7±167,6b	***
	Tallos	136,6±8,51a	158,1±26,87a	239,1±42,58a	827,1±140,3b	***
	Raíz	258,9±26,90a	288,4±10,24a	458,3±58,04b	565,4±47,6c	***
B^{3+}	Hojas	21,29±2,27b	39,44±2,27c	40,68±0,12c	16,35±0,32a	***
	Tallos	14,86±0,09a	34,72±1,86b	37,17±0,07b	13,67±0,14a	***
	Raíz	15,68±0,37a	33,96±2,26b	37,83±0,21c	14,33±0,15a	***
K^+	Hojas	441,5±9,57b	430,7±19,02b	424,47±20,28b	353,68±12,94a	**
	Tallos	333,9±13,23c	295,9±23,91bc	240,2±25,91b	154,5±14,22a	***
	Raíz	246,2±16,64c	208,3±30,70bc	151,1±16,49ab	119,2±10,78a	***
Ca^{2+}	Hojas	180,75±3,47a	200,29±13,11ab	227,60±9,66b	216,98±9,60b	*
	Tallos	140,30±5,75a	150,84±15,16ab	184,19±10,53b	176,75±9,54b	*
	Raíz	158,54±11,12ab	147,38±6,96a	186,39±12,64bc	209,42±12,12c	**
Mg^{2+}	Hojas	130,90±11,51a	175,12±23,58ab	184,68±9,64b	143,32±7,80ab	*
	Tallos	67,78±3,65a	96,53±11,32bc	104,44±7,48c	79,44±4,16ab	**
	Raíz	76,70±5,21a	91,72±4,99a	107,19±4,43b	87,42±5,59a	**
S	Hojas	74,69±3,43a	97,20±5,75b	94,93±5,75b	91,42±5,72b	*
	Tallos	88,62±8,36a	124,39±10,38b	129,08±7,12b	125,94±7,29b	**
	Raíz	76,90±5,45ab	92,78±11,54b	92,59±6,18b	68,52±4,10a	*
Fe	Hojas	1,14±0,08a	1,19±0,24ab	1,16±0,11a	1,96±0,30b	*
	Tallos	0,73±0,04	0,68±0,05	0,80±0,08	0,87±0,03	n.s
	Raíz	2,33±0,25a	2,07±0,21a	2,62±0,61a	5,84±0,96b	***
P	Hojas	114,2±8,86b	114,95±25,56b	55,42±9,73a	62,98±8,69a	**
	Tallos	38,38±1,56b	37,55±3,42b	29,40±2,04a	28,62±1,72a	**
	Raíz	75,41±5,98b	61,75±5,82ab	52,16±4,68a	69,65±2,81b	*

Los datos representan los valores medios ± error estándar de al menos 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas, según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y n.s: diferencias no significativas.

6.- Capítulo 3. Plantas de *M.communis* regadas con aguas de diferente origen

En cuanto a los valores de los distintos cocientes entre los distintos elementos vemos como a mitad del ensayo los valores del cociente K^+/Na^+ disminuyeron significativamente en todos los órganos de las plantas en los tratamientos ARD2 y sobre todo NaCl (Tabla 3.9). Los valores del cociente K^+/Cl^- disminuyeron significativamente en el tratamiento NaCl en hojas y raíces. En tallos, este cociente disminuyó con el aumento de la salinidad del agua de riego (Tabla 3.9). En cuanto al cociente Ca^{2+}/Na^+ , los valores disminuyeron significativamente en el tratamiento NaCl en todas las partes de la planta, con respecto al resto de tratamientos. En cuanto a los valores en el tallo también fueron estadísticamente más bajos los del tratamiento ARD2, con respecto a los controles y ARD1. En la raíz es de destacar que dicho cociente es mayor en ARD1, que en el resto de los tratamientos (Tabla 3.9).

Con respecto al cociente Ca^{2+}/Cl^- de nuevo se produjeron descensos significativos en todas las partes de la planta del tratamiento NaCl, al compararlo con el resto de tratamientos. En las hojas los valores también fueron significativamente más bajos en ARD2 comparado con los controles y ARD1. En los tallos los valores más altos correspondieron a los controles y al tratamiento ARD1 (Tabla 3.9). En cuanto al cociente Na^+/Cl^- los valores más altos en las hojas y en los tallos se apreciaron en el tratamiento con NaCl. En las raíces no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos comparados (Tabla 3.9).

Con respecto al cociente B^{3+}/Na^+ y al B^{3+}/Cl^- los valores más bajos en todas las partes de la planta correspondieron al tratamiento NaCl (Tabla 3.9). El cociente B^{3+}/Na^+ disminuía significativamente en hojas, tallos y raíces en los tratamientos con mayor salinidad. Con respecto a la relación B^{3+}/Cl^- , se observaron las mismas tendencias en hojas y en tallos. En raíces sólo se observó un descenso significativo en el cociente B^{3+}/Cl^- en plantas NaCl (Tabla 3.9).

Al final del ensayo las plantas control y las previamente tratadas con ARD1 presentaron los valores más altos en los diferentes cocientes estudiados y en, prácticamente, en todas las partes de la planta. Los valores más bajos se observaron en los tratamientos con NaCl. Por último, el tratamiento ARD2 presentó en la mayoría de los casos unos valores un poco más bajos a los observados en las plantas control y ARD1, mientras que fueron superiores cuando se comparaba con las plantas tratadas con NaCl.

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

Tabla 3.9.-Cocientes de los iones representativos en plantas de *Myrtus communis* L. a los 45 días de aplicar los tratamientos salinos.

Cocientes	Órgano	Tratamientos				P
		Control	ARD1	ARD2	NaCl	
K ⁺ /Na ⁺	Hojas	6,37±0,67c	6,81±0,58c	4,07±0,75b	1,44±0,60a	***
	Tallos	4,08±0,40c	3,80±0,40c	2,00±0,30b	0,62±0,12a	***
	Raíz	1,14±0,08c	1,13±0,05c	0,66±0,02b	0,37±0,03a	***
K ⁺ /Cl ⁻	Hojas	2,96±0,88b	2,62±0,82ab	1,52±0,17ab	0,76±0,22a	*
	Tallos	2,49±0,31c	1,66±0,21b	0,86±0,16a	0,49±0,12a	***
	Raíz	1,30±0,18b	1,15±0,23b	0,84±0,16b	0,34±0,02a	**
Ca ²⁺ /Na ⁺	Hojas	2,66±0,37b	3,46±0,36b	2,24±0,51b	0,70±0,33a	***
	Tallos	1,78±0,26c	1,59±0,14c	1,09±0,12b	0,38±0,07a	***
	Raíz	0,54±0,06b	0,66±0,03c	0,49±0,04b	0,28±0,01a	***
Ca ²⁺ /Cl ⁻	Hojas	1,23±0,27c	1,42±0,28c	0,81±0,12b	0,37±0,12a	**
	Tallos	1,07±0,15c	0,70±0,09b	0,46±0,06ab	0,30±0,07a	***
	Raíz	0,61±0,10b	0,67±0,11b	0,64±0,16b	0,26±0,02a	*
Na ⁺ /Cl ⁻	Hojas	0,50±0,17ab	0,38±0,10a	0,42±0,05a	0,61±0,06b	*
	Tallos	0,63±0,09ab	0,45±0,0a	0,44±0,06a	0,76±0,04b	**
	Raíz	1,21±0,24	1,01±0,18	1,26±0,23	0,91±0,03	n.s
B ³⁺ /Na ⁺	Hojas	0,15±0,02b	0,17±0,02b	0,09±0,02a	0,03±0,01a	***
	Tallos	0,08±0,01b	0,07±0,01b	0,03±0,00a	0,02±0,00a	***
	Raíz	0,04±0,01b	0,03±0,00b	0,02±0,00a	0,02±0,00a	**
B ³⁺ /Cl ⁻	Hojas	0,07±0,02b	0,07±0,02b	0,03±0,00ab	0,02±0,01a	*
	Tallos	0,05±0,01c	0,03±0,00b	0,02±0,00a	0,02±0,00a	***
	Raíz	0,04±0,01b	0,03±0,00ab	0,03±0,01ab	0,01±0,00a	*

Tabla 3.10.-Cocientes de los iones representativos en plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicar los tratamientos salinos (final del ensayo).

Cocientes	Órgano	Tratamientos				P
		Control	ARD1	ARD2	NaCl	
K ⁺ /Na ⁺	Hojas	7,07±0,53c	6,74±1,26c	3,22±0,69b	0,33±0,07a	***
	Tallos	2,50±0,19c	2,19±0,49b	1,32±0,39b	0,23±0,06a	***
	Raíz	0,69±0,03b	0,73±0,11b	0,36±0,06a	0,21±0,01a	***
K ⁺ /Cl ⁻	Hojas	2,70±0,33c	2,18±0,47c	1,19±0,15b	0,29±0,05a	***
	Tallos	2,15±0,23c	1,67±0,16c	0,92±0,19b	0,21±0,05a	***
	Raíz	1,28±0,15c	0,80±0,05b	0,40±0,06a	0,24±0,01a	***
Ca ²⁺ /Na ⁺	Hojas	2,89±0,21b	3,13±,45b	2,02±0,60b	0,19±0,03a	***
	Tallos	1,05±0,08b	1,06±0,17b	0,96±0,27b	0,25±0,05a	**
	Raíz	0,44±0,01	0,53±0,02	0,41±0,07	0,38±0,02	n.s
Ca ²⁺ /Cl ⁻	Hojas	1,11±0,15b	1,15±0,26b	0,70±0,11b	0,16±0,02a	***
	Tallos	0,90±0,09b	0,85±0,10b	0,67±0,11b	0,23±0,05a	***
	Raíz	0,82±0,08b	0,61±0,04a	0,45±0,09a	0,44±0,05a	**
Na ⁺ /Cl ⁻	Hojas	0,40±0,07a	0,43±0,14a	0,47±0,10a	0,88±0,03b	**
	Tallos	0,86±0,07	0,87±0,12	0,79±0,08	0,89±0,04	n.s
	Raíz	1,83±0,15b	1,16±0,10a	1,15±0,07a	1,16±0,05a	***
B ³⁺ /Na ⁺	Hojas	0,65±0,05b	0,62±0,12b	0,19±0,05a	0,01±0,00a	***
	Tallos	0,28±0,02b	0,26±0,05b	0,08±0,02a	0,02±0,00a	***
	Raíz	0,11±0,01b	0,12±0,01b	0,04±0,00a	0,03±0,00a	***
B ³⁺ /Cl ⁻	Hojas	0,25±0,03b	0,21±0,04b	0,07±0,01a	0,01±0,00a	***
	Tallos	0,24±0,02b	0,20±0,02b	0,05±0,01a	0,02±0,00a	***
	Raíz	0,20±0,02c	0,14±0,01b	0,04±0,00a	0,03±0,00a	***

Los datos representan los valores medios ± error estándar de al menos 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). P: nivel de significación, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y n.s: diferencias no significativas.

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

6.3.4.- Cambios bioquímicos y hormonales

Con el objeto de mejorar la interpretación de las observaciones realizadas en los estudios morfológicos, fisiológicos y nutricionales, se realizaron otras medidas para evaluar parámetros bioquímicos y hormonales relacionados con la adaptación de las plantas de mirto a los tratamientos aplicados.

Estos parámetros fueron: variaciones en la concentración de prolina en hojas como medida de ajuste osmótico, aparición y cambios en la concentración de malondialdehído (MDA) como indicador de daños en la permeabilidad de las membranas (consecuencia de un estrés oxidativo) y evaluación de un perfil hormonal, indicativo de la capacidad de respuesta y señalización de las plantas ante el estrés salino. Estos estudios se llevaron a cabo al final del ensayo.

6.3.4.1.- Medida de L-prolina

Al final del ensayo, el contenido de prolina en hojas fue similar en las plantas de los tratamientos control y ARD1, produciéndose un aumento significativo en las plantas sometidas a los tratamientos más salinos, siendo las plantas con NaCl las que presentaron una mayor acumulación de este aminoácido (Figura 3.7).

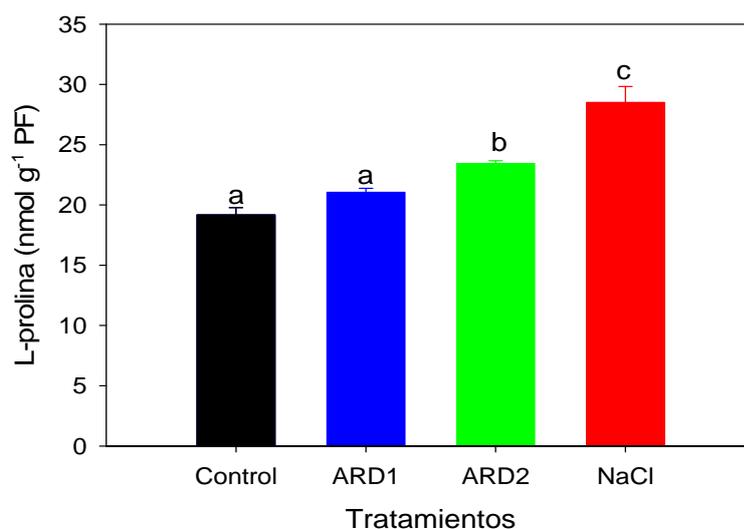


Figura 3.7.- Contenido de L-prolina en hojas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicación de los tratamientos salinos (final del ensayo). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

6.- Capítulo 3. Plantas de *M.communis* regadas con aguas de diferente origen

6.3.4.2.- Medida de MDA

Los daños estructurales a nivel de membrana fueron evidenciados por la acumulación de malondialdehído (MDA) (Figura 3.8), que mostró un aumento progresivo con el nivel de salinidad de los tratamientos aplicados.

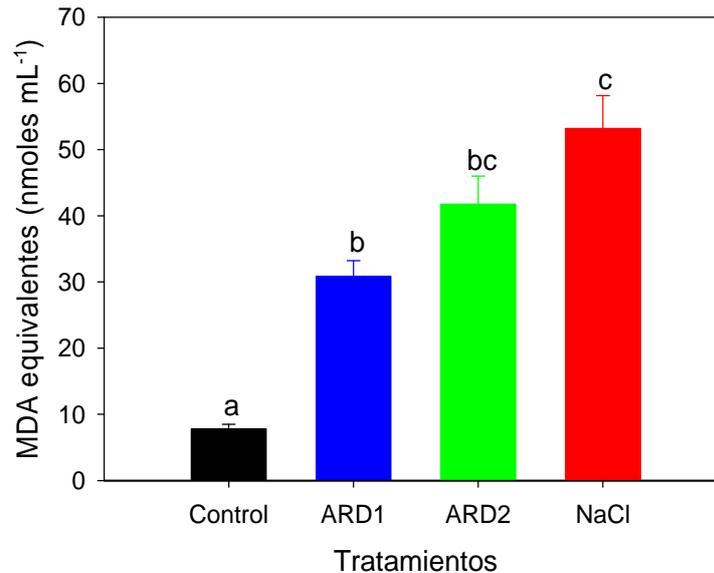


Figura 3.8.- Contenido de MDA en hojas de plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de la aplicación de los tratamientos salinos (final del ensayo). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

6.3.4.3.- Perfil hormonal

En cuanto a los cambios en el perfil hormonal se observa que el contenido en ácido abscísico (ABA) en hojas aumentó en las plantas de los tratamientos ARD2 y NaCl con respecto al control y de manera más clara en este último tratamiento (Figura 3.9A). También los niveles de ácido salicílico (SA) incrementaron proporcionalmente con el nivel de salinidad impuesto (Figura 3.9B). Por el contrario, se observaron descensos por efecto de la salinidad en ácido indolacético (AIA) (Figura 3.9C) y ácido jasmónico (JA) (Figura 3.9D).

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

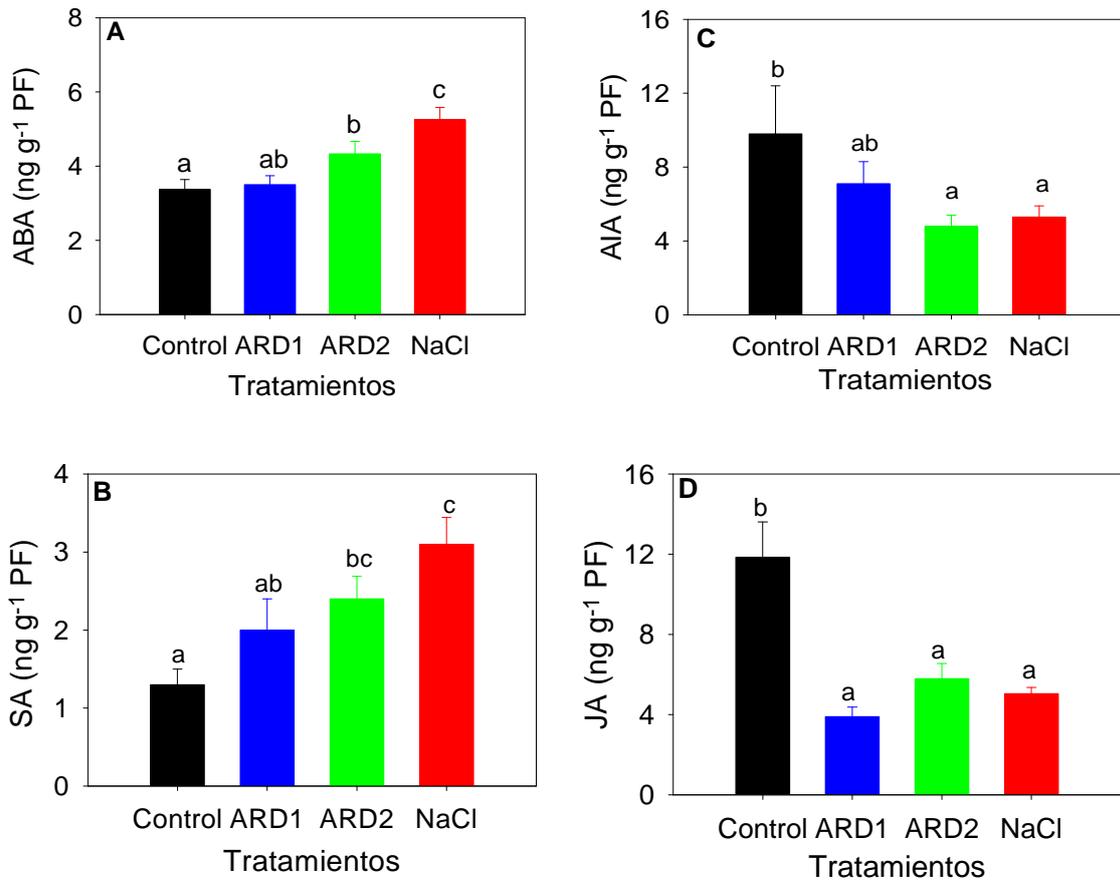


Figura 3.9.-Perfil hormonal obtenido a partir de hojas de plantas de *Myrtus communis* L. en el que se midieron ácido abscísico (ABA) (A), ácido salicílico (SA) (B), ácido indolacético (AIA) (C) y ácido jasmónico (JA) (D) a los 90 días de aplicación de los tratamientos salinos (final del ensayo). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

6.3.4.4.- Relaciones de interés

Con el objeto de interpretar mejor los resultados se realizaron una serie de relaciones entre distintos parámetros estudiados (K^+ vs ABA, K^+ vs g_s , Ca^{2+} vs g_s y ABA vs g_s) (Figuras 3.10). En la relación entre el ión K^+ y las concentraciones de ácido abscísico observadas en las hojas al final del ensayo, se apreció que la caída en los contenidos de K^+ iba acompañada de una subida en los niveles de ABA conforme aumentaba la salinidad de los tratamientos (Figura 3.10A). A su vez, los mayores niveles de ABA y menores contenidos en K^+ estaban asociados con menores valores de g_s (Figuras 3.10B y 3.10C). También, el mayor contenido en Ca^{2+} en hojas se relacionó con menores valores de g_s y mayores de ABA (Figuras 3.10D y 3.10E).

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

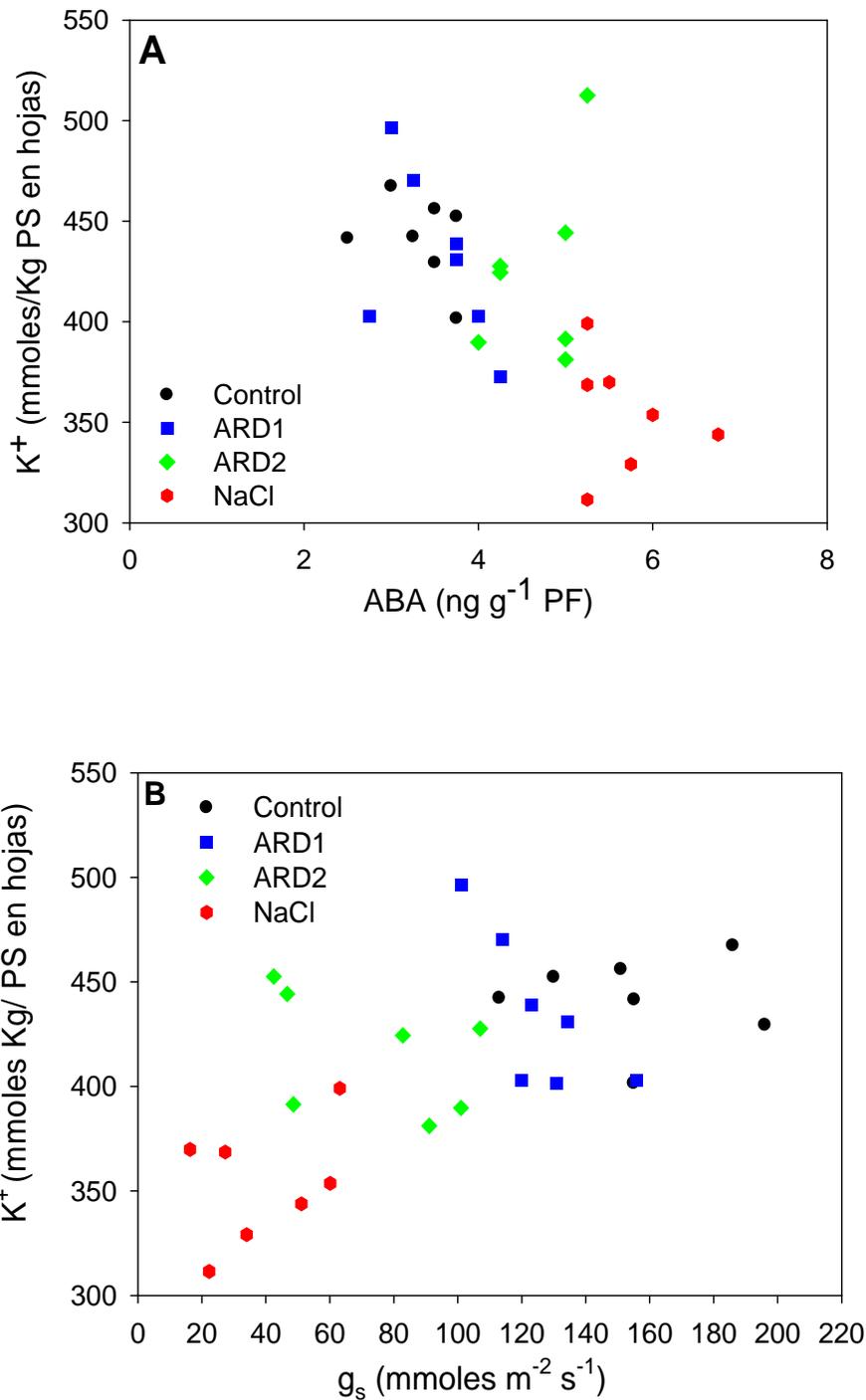


Figura 3.10A.- Relación entre el contenido en K^+ de las hojas y los niveles de abscísico ABA (A) y entre los contenidos de K^+ y los niveles de conductancia estomática (g_s) (B) en plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicación de los tratamientos salinos (final del ensayo). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

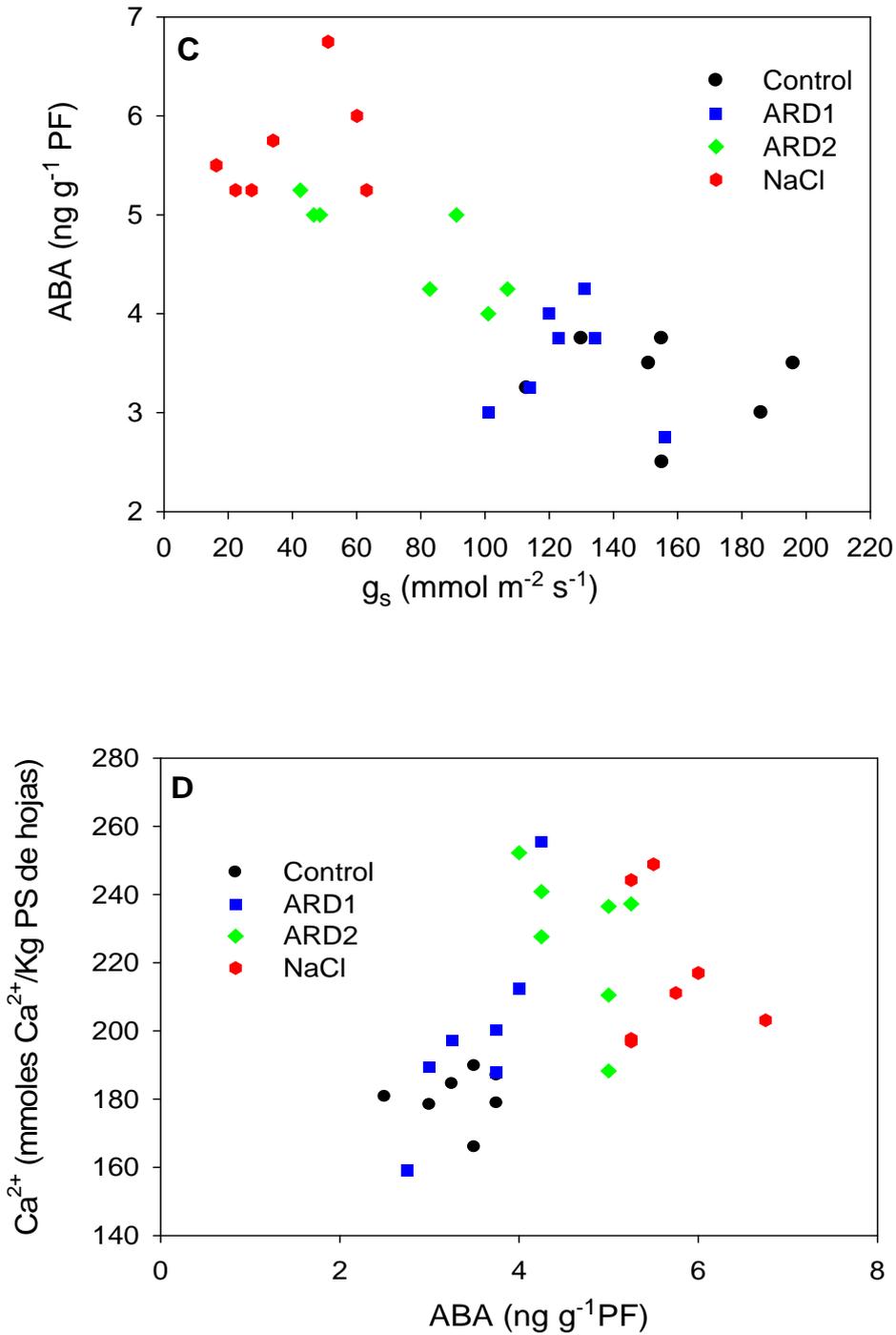


Figura 3.10B.- Relación entre la concentración de abcísico (ABA) y los niveles de conductancia estomática (g_s) (C) y entre los contenidos de Ca^{2+} y los niveles de ácido abcísico (D) en hojas de plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicación de los tratamientos salinos (final del ensayo). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

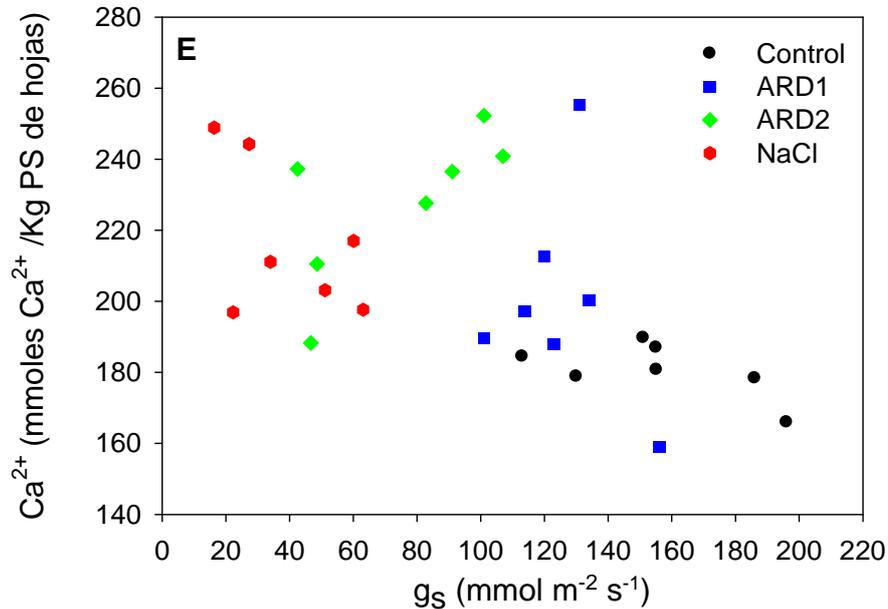


Figura 3.10C.- Relación entre los contenidos de Ca²⁺ y los niveles de conductancia estomática (g_s) (E) en hojas de plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicación de los tratamientos salinos (final del ensayo). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

6.4.- Discusión

En el ensayo anterior (capítulo 2) y nuevamente en este capítulo, se ha podido observar que los componentes de las aguas regeneradas (ARD2) producen un efecto beneficioso sobre la producción de las plantas de mirto y minimizan los efectos de los iones más tóxicos. Esto también se ha comprobado en algunas especies ornamentales (Fitzpatrick *et al.*, 1986), donde el mayor contenido de nutrientes en las aguas regeneradas supone un aumento del crecimiento de dichas plantas (Lubello *et al.*, 2004).

Sin embargo, en el caso de las plantas de mirto, regadas con aguas regeneradas procedentes de la estación depuradora de Campo-Tejar con una CE de aproximadamente 4 a 5 dS/m, el mayor crecimiento que se había visto en el ensayo anterior, no fue tan evidente en este ensayo, aunque sí se apreciaba que, en valor absoluto, los parámetros relacionados con la biomasa de estas plantas eran mayores que los de las plantas control. Hay que destacar que las concentraciones de Na⁺ y Cl⁻ en el agua del tratamiento ARD2 fueron mayores que en el ensayo anterior. La composición del agua procedente de

6.- Capítulo 3. Plantas de *M.communis* regadas con aguas de diferente origen

cualquier depuradora es variable en el tiempo, dependerá de la procedencia del agua. Por otra parte a los tres meses de aplicación de los tratamientos, las plantas de mirto regadas con la disolución de NaCl de 8 dS/m, se vieron afectadas por la salinidad produciendo plantas con menor biomasa aérea y menor área foliar.

De acuerdo con Cassaniti *et al.* (2009) la composición de una disolución salina aplicada (NaCl) puede aumentar tanto la toxicidad, debido a los iones presentes, cómo la deficiencia nutricional, debido a una mayor competencia entre los cationes o aniones (Shannon y Grieve, 1999). Así, se ha estudiado que añadiendo nutrientes a un medio salino se produce una mejora en la calidad del cultivo (Grattan y Grieve, 1999), como es el caso de la corrección del exceso de sodio con la adición de calcio (García-Legaz *et al.*, 2008). También, la aportación de nitratos puede reducir las incidencias del daño producido por el cloro. Con respecto a la presencia de boro, algunos estudios sugieren que los efectos combinados de la salinidad y el exceso de boro son antagónicos (López-Gómez *et al.*, 2007; Bañón *et al.*, 2012), minimizándose dichos efectos. En las condiciones experimentales estudiadas, ya a mitad del ensayo, se observaba que había un mayor contenido en Ca^{2+} , Mg^{2+} y S en las plantas de ARD2, como consecuencia de un mayor enriquecimiento de estos nutrientes en el agua, por lo que esto pudo ayudar a mitigar los efectos de las sales. Por tanto, la interacción entre los nutrientes y la salinidad afecta a la calidad de la planta, aunque de acuerdo con Grattan y Grieve (1999), la respuesta a dicha interacción dependerá del nivel de salinidad, de la composición de las sales presentes en los distintos tratamientos y de la especie que se esté estudiando.

Los ensayos realizados en este capítulo, permiten obtener diversas conclusiones de carácter agronómico, así como recomendaciones para seleccionar el tipo de aguas residuales depuradas que deben aplicarse con estas plantas arbustivas ornamentales. Además de las aplicaciones de índole agronómica, también se pueden disentir los resultados desde un punto de vista fisiológico, justificando los mecanismos de adaptación de las plantas de mirto a la salinidad.

En general, el estrés osmótico producido por la presencia de sales en el medio radicular se apreció por el descenso del potencial osmótico e hídrico en las hojas, sobre todo en el tratamiento de NaCl, lo que suele hacerse más evidente conforme avanzan los ensayos (Morales *et al.*, 1998). Pasado un

6.- Capítulo 3. Plantas de *M. communis* regadas con aguas de diferente origen

tiempo, después de un mes y medio, se pudo observar que la aplicación de los tratamientos producía un ajuste osmótico, lo cual permite aumentar la turgencia de las plantas tratadas con ARD2 y de forma más acusada las tratadas con NaCl a lo largo del ensayo (Figura 3.3D). El resultado puede relacionarse con el aumento en el contenido en prolina en las hojas (Figura 3.8) (Munns, 2002), así como de Na⁺ y Cl⁻, éste último en mayor medida (Tabla 3.7 y 3.8). La importante acumulación de estos iones y la de prolina permiten que estas plantas puedan usarlos como compuestos necesarios para bajar el potencial osmótico y mantener la turgencia celular (Álvarez *et al.*, 2012). Este comportamiento se ha descrito en algunas de estas especies mediterráneas (Castillo *et al.*, 2011), aunque en las plantas menos tolerantes, donde la capacidad para compartimentar los iones a nivel de la vacuola resulta limitada, dichos iones pueden acumularse en el citosol y originar daños en los cloroplastos y mitocondrias, como es el caso de *Arbutus unedo* (Navarro *et al.*, 2007). La habilidad para realizar ajuste osmótico por parte de las plantas conlleva que, en condiciones salinas, alcancen el punto de pérdida de turgencia a valores de potencial hídrico más negativos y dan lugar a mayores contenidos relativos de agua, como ocurre en este ensayo. También se producía una reducción en la elasticidad de las paredes celulares por la presencia de NaCl en el medio, como se mostraba por el aumento en el parámetro módulo de elasticidad (ϵ) (Bolaños y Longstrech, 1984; Navarro *et al.*, 2007). Esto indica que, además de la acumulación de solutos, hubo cambios en la rigidez de las paredes celulares lo que permite minimizar los efectos negativos producidos en el balance hídrico de las plantas de mirto.

Es conocido que la prolina se acumula en grandes cantidades en respuesta a estreses ambientales (Ashraf y Fooland, 2007; Bose *et al.*, 2014). Además de su función como osmolito para el ajuste osmótico, la prolina contribuye a la estabilización de las membranas y de las proteínas, secuestra ROS (¹O₂, H₂O₂, OH) y además puede actuar como un buffer redox celular bajo condiciones de estrés (Srinivas y Balasubramanian, 1995). La degradación de prolina puede proporcionar suficiente poder reductor para soportar la fosforilación oxidativa y la generación de ATP para la recuperación del estrés y la reparación de estructuras dañadas por dicho estrés (Hare *et al.*, 1998). En este sentido, especies halófitas hiperacumuladoras de prolina suprimen la actividad prolina deshidrogenasa (PDH), encargada del catabolismo de prolina, a diferencia de lo que ocurre en especies glicofitas como *Arabidopsis* (Kant *et*

6.- Capítulo 3. Plantas de *M.communis* regadas con aguas de diferente origen

al., 2006). Una homeostasis adecuada en el metabolismo de prolina es fundamental para la adaptación de las plantas de mirto a la salinidad. Bajo un estrés determinado, la acumulación de prolina se ha correlacionado con la tolerancia a dicho estrés en diferentes especies vegetales, y la concentración de prolina es mayor en plantas tolerantes que en plantas sensibles (Ashraf y Fooland, 2007).

Por otro lado, la conductancia estomática (g_s) se vio alterada en mayor medida en las plantas tratadas con el nivel salino más severo (Figura 3.4A). Este parámetro está en correlación estrecha con la absorción del agua y su transporte a la parte aérea. En general, las plantas presentan una tendencia a reducir la apertura estomática como respuesta al estrés salino (Navarro *et al.*, 2007; López-Climent *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2013). Los cambios estomáticos observados en las plantas de mirto expuestas a una mayor salinidad pueden ser un reflejo directo de la disminución en la capacidad para regular la conductividad hidráulica de las raíces y de una disminución del potencial hídrico foliar (Castillo *et al.*, 2011). La menor apertura estomática en las plantas sometidas a los tratamientos salinos también estuvo asociada con una menor tasa fotosintética (P_n) ya que este proceso puede verse afectado bien por una alteración de la conductancia estomática o por cambios en la capacidad metabólica de las células del mesófilo (Flexas *et al.*, 2004). Por otra parte, en presencia de NaCl, las hojas de mirto acumularon importantes cantidades del ión Cl^- , pero también de ión Na^+ , aunque fue el aumento en el transporte de Cl^- y Na^+ desde las raíces a los vástagos, lo que pudo estar relacionado con una disminución de la capacidad fotosintética y del crecimiento (Tavakkoli *et al.*, 2010).

Estos cambios pueden estar sometidos a una regulación hormonal y así, (Fricke *et al.*, 2006) describen la participación del ácido abscísico (ABA) como señalizador de los procesos de apertura y cierre estomáticos inducidos por la sal. En este ensayo se ha observado una relación inversa entre ambos parámetros: conductancia estomática (g_s) y ABA (Figuras 3.11). De este modo, se observa un incremento progresivo en el contenido de ABA y un descenso de la conductancia estomática en las hojas, al aumentar la salinidad del agua aplicada. Además, se observó una correlación entre el descenso de los niveles de K^+ en hojas y el aumento de los contenidos de ABA, junto con el cierre estomático, en plantas sometidas a estrés salino (Figuras 3.11). En cuanto al mecanismo mediante el que actúa el ABA, estudios recientes (demuestran que

6.- Capítulo 3. Plantas de *M.communis* regadas con aguas de diferente origen

tras la unión del ABA a su receptor (PYR/PYL/RCAR) se regulan los canales de K^+ y de Cl^- mediante la activación de los canales de Ca^{2+} por parte de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Wang *et al.*, 2013). Se ha descrito que el ABA induce la generación de H_2O_2 en las células oclusivas el cual inactiva el transporte de K^+ hacia el interior de dichas células y favoreciéndose el cierre de los estomas (Zhang *et al.*, 2001). Al mismo tiempo, el H_2O_2 puede mediar en la señalización del ABA al activar los canales de Ca^{2+} , aumentando su concentración en el citosol de las células oclusivas y activando el cierre de los estomas (Pei *et al.*, 2000). Estos datos están de acuerdo con el incremento de Ca^{2+} observado en hojas de plantas de mirto estresadas.

Por otra parte, también se pudo constatar que al final del ensayo la alta salinidad pudo inducir una pérdida de la funcionalidad de las membranas, incluyendo las de los cloroplastos, como consecuencia del estrés oxidativo, causando perturbaciones en su actividad (Dionisio-Sese y Tobita, 1998). Esto se pudo evaluar mediante el contenido en malondialdehído (MDA), especialmente en las plantas que sufrieron el tratamiento más salino. En este estudio no se ha determinado los contenidos de H_2O_2 , pero si se ha observado un fuerte aumento de los niveles de peroxidación lipídica, lo que es un indicio de la existencia de un estrés oxidativo. En este sentido, diferentes estudios han descrito la acumulación de ROS, incluyendo H_2O_2 , en plantas sometidas a estrés salino (Hernández *et al.*, 1993, 1995; Barba-Espín *et al.*, 2011). Además, los contenidos de Fe aumentaron en las hojas de plantas de mirto sometidas a estrés salino por NaCl, al final del ensayo. Este resultado, si bien parece sorprendente, también se ha descrito en otras especies vegetales, tales como guisante, tomate, soja, calabaza y arroz (Dahiya y Singh, 1976; Verma y Neue, 1984). El aumento de los contenidos de Fe puede resultar peligroso en sistemas vivos, ya que si parte de ese Fe se encuentra libre y no está unido a ninguna proteína (el denominado Fe catalítico), aunque sea en cantidades traza, puede fácilmente interaccionar con el H_2O_2 y generar radicales hidroxilo, mediante una reacción del tipo Fenton. Esta reacción es una de las causantes de ciertos estados patológicos o sintomáticos en plantas o en animales y está implicado en procesos de oxidación de lípidos y proteínas (Guterridge y Halliwell, 2000).

Como se ha descrito, las plantas expuestas a distintos niveles de salinidad incrementan su concentración en ABA y se ha propuesto que el ABA puede ser un mediador en la respuesta de la planta a los estreses, como una

6.- Capítulo 3. Plantas de *M.communis* regadas con aguas de diferente origen

señal interna que las plantas disponen para sobrevivir a las condiciones salinas (Keskin *et al.*, 2010). Pero no sería la única señal. También se ha descrito cambios en el nivel de ácido jasmónico, (JA) que utilizan las plantas como mecanismo de defensa en situaciones tanto de estreses bióticos como abióticos (Cheong y Choi, 2003). Concretamente, en distintos cultivares de tomate, la concentración de JA se modificó por efecto del estrés salino: incrementó en un cultivar tolerante desde el inicio de la aplicación de las sales, mientras que disminuyó en un cultivar sensible a la salinidad (Pedranzani *et al.*, 2003). Según estos autores los mayores niveles de JA en plantas tolerantes podrían actuar como mecanismo protector frente a la salinidad. Sin embargo, existe poca información acerca de cómo la salinidad afecta a los niveles endógenos de JA en las plantas. En el presente ensayo, el nivel de JA fue similar en los distintos tratamientos salinos por lo que no se le puede relacionar con los efectos que las sales producen en las plantas de mirto, ya que la medida se realizó al final del ensayo y no a más corto plazo.

El ácido salicílico (SA), por el contrario, aumentó proporcionalmente con el incremento de los niveles de salinidad. Parece ser que SA y JA tienen interacciones antagónicas (Thaler *et al.*, 1999) y se ha sugerido el cociente entre SA y JA como un marcador para indicar estrés salino. El SA tiene una importante función en la regulación del crecimiento y el desarrollo vegetal, así como en la maduración, floración y respuestas a estrés abiótico y biótico (He y Wolyn, 2005; Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011). Se ha sugerido que el SA posee un gran potencial agronómico para mejorar la tolerancia a estrés en cultivos de interés agronómico. Sin embargo, esta función es dependiente de la concentración de SA aplicada, el modo de aplicación y el estado fisiológico de la planta. De forma general, bajas concentraciones de SA alivian la sensibilidad a estreses abióticos, mientras que altos niveles de SA pueden inducir un estrés oxidativo, dando lugar a un descenso en la tolerancia a los estreses abióticos (Miura y Tada 2014). Algunos autores han descrito que la aplicación de SA (de 0,1 a 0,5 mM) alivian los daños producidos por salinidad en plantas de *Vigna radiata*, tales como el descenso de la fotosíntesis, aumento de los niveles foliares de Na⁺ y Cl⁻ o la acumulación de H₂O₂ (Nazar *et al.*, 2011). Sin embargo, altas concentraciones de SA (1 mM) provocaba un retardo del crecimiento (Nazar *et al.*, 2011).

Sin embargo, otros autores han descrito que el tratamiento con SA, incluso a bajas concentraciones, potencia los efectos negativos de la salinidad

6.- Capítulo 3. Plantas de *M.communis* regadas con aguas de diferente origen

en *Arabidopsis* y en plantas de guisante (Borsani *et al.*, 2001; Barba-Espín *et al.*, 2011). En el presente estudio, probablemente el aumento de los niveles de SA podría minimizar los efectos negativos de las plantas de mirto en su respuesta a la salinidad.

Además de las fitohormonas relacionadas con las situaciones de estrés (ABA, JA y SA), se han medido los niveles de ácido indolacético (AIA). El AIA, como auxina, juega un papel en la regulación del crecimiento, y también responde a la salinidad, observándose una reducción de sus niveles en plantas de arroz (Nilsen y Orcutt, 1996) y en raíces de tomate (Dunlap y Binzel, 1996), lo cual puede causar retrasos en la capacidad para generar crecimiento (Wang *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos con las plantas de mirto sugirieron que la disminución de su tamaño, dependiendo de la severidad del estrés salino al que se las sometió estaba correlacionada con los niveles más bajos de AIA.

A la vista de los resultados se puede comprobar como las fitohormonas estudiadas pueden tener un efecto aislado o por interacción de algunas de ellas en la respuesta de las plantas a las condiciones de salinidad. Sin embargo parece que los cambios en estas hormonas pueden ser diferentes dependiendo del periodo de crecimiento de las plantas. En este estudio, como se ha comentado, se analizó el perfil hormonal al final de la fase de estrés.

Probablemente, los resultados hubiesen sido diferentes entre los distintos tratamientos si las medidas se hubiesen realizado a más corto plazo.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de tolerancia a la salinidad de *Myrtus communis* L. y *Eugenia myrtifolia* L. Respuestas a corto y a largo plazo. Capacidad de recuperación

7.- Mecanismos de tolerancia a la salinidad de *Myrtus communis* L. y *Eugenia myrtifolia* L. Respuestas a corto y a largo plazo. Capacidad de recuperación.

7.1.- Introducción

Las plantas para adaptarse a las condiciones propias de un medio salino que las rodea deben activar múltiples mecanismos con objeto de aumentar la capacidad de obtener y/o retener agua, restituyendo la homeostasis iónica (Rejili *et al.*, 2007), lo cual va a producir cambios en las relaciones hídricas. Estos mecanismos de adaptación se reflejan en cambios en la velocidad de crecimiento (Munns, 2008), modificación de la relación parte aérea/raíz (Tattini *et al.*, 2006) y limitación de la expansión foliar (Cramer, 2002). A su vez, son consecuencia de procesos metabólicos (síntesis de ácido abscísico y solutos osmoprotectores) y fisiológicos como la alteración en las diferentes cadenas de transporte electrónico, sobre todo la fotosintética y la respiratoria, dando lugar a una sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en los tejidos verdes y también en las raíces (Hernández *et al.*, 1993, 1995; Miller *et al.*, 2008). Las respuestas adaptativas están gobernadas por señales moleculares que regulan la relación con el medio externo y así, se producen cambios en la actividad de los canales y transportadores situados en las membranas (Munns y Tester, 2008), junto con la activación y transcripción de genes, entre cuyos efectos está la modificación de rutas biosintéticas que dan lugar a un ajuste osmótico y a la protección de las estructuras celulares (Rejili *et al.*, 2007).

No obstante, la mayoría de estos cambios y procesos no son fáciles de adscribir, de manera independiente, a los efectos del estrés osmótico y/o a la toxicidad específica producidos por las sales (Munns, 2012). Además, estos efectos necesitan diferentes tiempos para poder desarrollarse, dependiendo de las especies vegetales objeto de estudio.

Es difícil cuantificar diferencias en la tolerancia a la salinidad entre especies estrechamente relacionadas. Por ejemplo, cuando se aplica la sal durante un periodo de tiempo corto, pueden no encontrarse diferencias en el comportamiento entre especies con distinto grado de sensibilidad a la salinidad (Munns, 1995). Por consiguiente, deberían de estudiarse con más profundidad, tanto el tiempo como la exposición de las plantas a la salinidad así como su relación con los distintos mecanismos implicados. También es importante y se

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

ha estudiado, la recuperación de los efectos salinos mediante el riego con agua de buena calidad, lo cual se ha descrito en pocas especies y es una práctica que se produce de manera natural y está estrechamente relacionada con la recuperación de la fotosíntesis y la capacidad de las plantas para reparar daños en las membranas (Chaves *et al.*, 2011).

Por todo ello, el objetivo de este capítulo fue estudiar los mecanismos de respuesta a la salinidad en plantas de *Myrtus communis* L. y en *Eugenia myrtifolia* L. y los cambios que dicho estrés producía sobre el crecimiento, nutrición, relaciones hídricas, intercambio gaseoso, anatomía de la hoja, fluorescencia de clorofilas y metabolismo antioxidativo, en ambas especies.

7.2.- Material y métodos

7.2.1.- Material vegetal y condiciones experimentales

Se emplearon 120 plántulas de *Myrtus communis* L. y de *Eugenia myrtifolia* L. las cuales fueron trasplantadas y crecieron en macetas de 14 x 12 cm de diámetro (1,2 l) que contenían una mezcla de sustrato con fibra de coco, turba y perlita en proporción (8:7:1). Las plantas fueron abonadas con Osmocote Plus (2 g l⁻¹ de sustrato) (14:13:13 N, P, K + microelementos). El ensayo se realizó en una cámara de crecimiento controlado, simulando los cambios naturales de temperatura (23°C/18°C día/noche), luz (350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa) y HR (55%-70%). Las plantas quedaron distribuidas en 3 bloques al azar, conteniendo, cada uno, 4 bandejas con 10 plantas (40 plantas por bloque). Cada una de estas 4 bandejas de un bloque recibía un tratamiento distinto.

7.2.2.- Tratamientos

Una vez que las plantas tenían un mes de edad se regaron con agua de buena calidad en el caso de las plantas control y con diferentes concentraciones de NaCl con una CE de 4 dS/m (S4), 8 dS/m (S8) 12 dS/m (S12), correspondientes a concentraciones de 44, 88 y 132 mM de NaCl respectivamente. Los tratamientos se prolongaron durante 30 días (fase de salinización o de estrés) y posteriormente se procedió a una fase de lavado o recuperación, durante un periodo de tiempo que no alcanzó el mes, mediante riegos con agua de buena calidad en los que se lavaron las sales del sustrato

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

para reducir la concentración de los iones fitotóxicos (Na^+ y Cl^-). En el caso de las plantas de *Myrtus communis* L una vez finalizado el estudio inicial con tres tratamientos (Control, S4 y S8), se utilizaron plantas controles sobrantes (con tres meses de edad) en las que se estudió la respuestas a la salinidad con la concentración más alta de NaCl (S12). En el caso de plantas de eugenia el tratamiento con mayor salinidad (S12) se aplicó desde el principio.

7.2.3.- Medidas relacionadas con el crecimiento

En tres momentos concretos: al inicio del ensayo (antes de imponer los tratamientos), al final de la fase de salinización y al final de la fase de lavado, se seleccionaron 5 plantas por tratamiento en las que el sustrato fue cuidadosamente eliminado de las raíces, quedando separado el material vegetal fresco de cada una de ellas. Con el fin de medir los distintos pesos secos, el material vegetal fresco se secó en una estufa a una temperatura de 80°C hasta alcanzar un peso constante. El cociente raíz / parte aérea se determinó en las mismas plantas dividiendo el peso seco de la raíz por el peso seco de la parte aérea (hojas más tallos). El área foliar (cm^2) se determinó en las mismas plantas usando un medidor de área foliar (AM 200; ADC BioScientific Ltd., Herts, England).

7.2.4.- Contenido mineral y tasas de absorción

El material seco y molido de las distintas partes de la planta se almacenó a temperatura ambiente para proceder al análisis de solutos inorgánicos. La concentración de Cl^- se analizó mediante el uso de un analizador de cloruros (Model 926 Chloride Analyser, Sherwood Scientific Ltd.). La concentración de los iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES IRIS INTREPID II XDL). Además de las medidas puntuales anteriormente comentadas se realizó, sólo en hojas de eugenia, un seguimiento detallado (cada dos o tres días) de la concentración de los distintos iones anteriormente descritos.

La tasa de absorción de los iones Na^+ , Cl^- , K^+ y Ca^{2+} se calculó al final de la fase de salinización y al final de la fase de lavado según la fórmula descrita por (Pitman, 1975).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

7.2.5.- Relaciones hídricas, determinación de L-prolina, intercambio gaseoso, fluorescencia de clorofilas y síntesis de clorofilas

Periódicamente a lo largo de todo el ensayo, se midieron en 6 plantas por tratamiento, durante las horas centrales de iluminación, cambios en el potencial hídrico foliar (Ψ_h), en el potencial de presión (Ψ_p) y en el potencial osmótico a máxima saturación (Ψ_{os}). El Ψ_h se estimó de acuerdo con Scholander *et al.* (1965), usando una cámara de presión (Model 3000; Soil Moisture Equipment Co., Santa Barbara, CA, USA).

El potencial osmótico actual (Ψ_o) y a máxima saturación (Ψ_{os}) se midió usando un osmómetro de presión de vapor WESCOR 5520 (Wescor Inc., Logan, UT, USA), de acuerdo con Gucci *et al.* (1991). El potencial de presión se estimó como la diferencia entre el potencial hídrico foliar y el potencial osmótico actual.

Las determinaciones de L-prolina mediante espectrofotometría se realizaron en hojas, cada 2-3 días, a lo largo de todo el ensayo de acuerdo con Bates *et al.* (1973), (ver apartado general de material y métodos).

Periódicamente, a lo largo de todo el ensayo se midieron en 6 plantas por tratamiento, la conductancia estomática (g_s) y la tasa de fotosíntesis neta (P_n). La g_s y la P_n se determinaron en hojas totalmente expandidas usando un aparato de intercambio gaseoso portátil (LI-6400; LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). Además, para las medidas de intercambio gaseoso se seleccionaron aquellas que, aproximadamente, coincidieron con los 15 y 30 días de la fase de salinización y con el final de la fase de lavado. La fluorescencia de clorofilas se determinó en al menos 4 plantas diferentes de los distintos tratamientos a los 15 días y a los 30 días de la fase de salinización y al final de lavado de acuerdo a lo redactado en el apartado de material y métodos general.

Las determinaciones de clorofilas mediante espectrofotometría se realizaron en hojas, cada 2-3 días, a lo largo de todo el ensayo, de acuerdo con Inskeep y Bloom (1985) (ver apartado general de material y métodos).

7.2.6.- Termografía

Periódicamente, a lo largo de todo el ensayo se midieron en 6 plantas por tratamiento, la temperatura de las hojas mediante una cámara termográfica (ThermaCam FLIR-e50 System, Inc., UK).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

7.2.7.- Estudio de cambios estructurales en las hojas por microscopía óptica de campo claro.

El efecto del riego con NaCl sobre la anatomía foliar se estudió al final de la fase de salinización y al final de la fase de lavado. En el apartado de material y métodos general se explican con más detalle los pasos realizados para estudiar los cambios anatómicos en las hojas por microscopía óptica de campo claro.

7.2.8.- Metabolismo antioxidativo

Los protocolos empleados para la determinación de enzimas antioxidantes, de moléculas antioxidantes no enzimáticas (ascorbato y glutatión), de los parámetros de estrés oxidativo (pérdida de electrolitos y peroxidación de lípidos) y para proceder a las tinciones histoquímicas para la detección de ROS se explican con más detalle en el apartado general de material y métodos.

7.2.9.-Análisis estadístico de los datos

La significación de los efectos de los distintos tratamientos salinos (o de los diferentes tratamientos), reflejado por el valor de F fue analizada mediante un análisis de varianza simple (ANOVA), por medio del programa estadístico SPSS para Windows. Las medias de los tratamientos fueron separadas en grupos homogéneos con la prueba de rango múltiple de Duncan ($P < 0.05$).

7.3.- Resultados

7.3.1.- *Myrtus communis* L.

7.3.1.1.- Crecimiento

El efecto de la salinidad sobre el crecimiento de plantas de mirto, a los 30 días de la aplicación de los distintos tratamientos, dependía del nivel del NaCl ensayado. En este sentido, un nivel moderado (4 dS/m; S4) producía un estímulo en el mismo, que se traducían en un aumento del peso seco de hojas, tallo y raíces (Tabla 4.1), siendo las diferencias significativas sólo en raíces (63% de incremento), lo que se traducían en una mayor producción de biomasa total por planta. Niveles de 8 dS/m (S8) no producían cambios significativos en

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

el crecimiento de hojas y tallos, pero si un aumento de un 54% en el peso seco de raíces y de un 25% en el peso seco total por planta (Tabla 4.1). Por el contrario, el tratamiento con un nivel salino de 12 dS/m reducía el peso seco de hojas y tallos en un 42% y en un 58%, respectivamente. Sin embargo, no hubo un efecto significativo en el peso seco de la raíz, aunque también aumentó el cociente Peso seco raíz/ Peso seco parte aérea (Tabla 4.1).

Tabla 4.1.- Respuestas frente a la salinidad en los diferentes parámetros de crecimiento estudiados en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase de salinización.

Parámetros medidos	Tratamientos			^a F	Tratamientos		
	Control	S4	S8		Control	S12	^a F
P.S. Hoja (g planta ⁻¹)	1,68±0,25	2,40±0,52	1,78±0,06	1,32 n.s	5,63±0,52b	3,27±0,44a	16,17**
P.S. Tallo (g planta ⁻¹)	1,91±0,32	2,43±0,28	1,90±0,14	1,34 n.s	5,87±0,55b	2,46±0,07a	46,45***
P.S. Raíz (g planta ⁻¹)	3,82±0,64a	6,24±0,96b	5,90±0,28ab	3,15 *	7,41±0,99	6,94±0,42	0,11n.s
P.S. Raíz / P.S. Aéreo	1,25±0,18a	1,59±0,32b	1,68±0,13b	3,48 *	0,64±0,06a	1,11±0,16b	27,77***

Los datos representan los valores medios ± error estándar de al menos 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los diferentes parámetros de crecimiento. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 99% (**), 95% (*) y n.s: no significativo.

Al final de la fase de lavado se observaron en las plantas S12 daños en la parte aérea y, además, a diferencia de la fase de salinización, el crecimiento de las raíces se vio afectado, ya que disminuyó en un 30%, siendo el cociente Peso seco Raíz/Peso seco parte aérea menor que en la fase anterior (Tabla 4.2).

Tabla 4.2.- Respuestas frente a la salinidad en los diferentes parámetros de crecimiento estudiados en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase de lavado.

Parámetros medidos	Tratamientos			^a F	Tratamientos		
	Control	S4	S8		Control	S12	^a F
P.S. Hoja(g planta ⁻¹)	4,11±0,38	2,71±0,39	3,30±0,72	1,82n.s	6,75±0,63b	4,25±0,27a	13,36**
P.S. Tallo(g planta ⁻¹)	4,16±0,39b	2,79±0,46a	2,44±0,42a	4,66*	7,22±0,68b	3,49±0,32a	24,92***
P.S. Raíz (g planta ⁻¹)	5,75±0,77	5,37±0,48	4,25±0,63	1,50n.s	9,37±1,29b	6,62±0,33a	4,27*
P.S. Raíz /P.S. Aéreo	0,69±0,06a	1,03±0,15b	0,78±0,08ab	3,15*	0,67±0,08a	0,87±0,05b	8,06*

Los datos representan los valores medios ± error estándar de al menos 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los diferentes parámetros de crecimiento. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99,9% (***), 99% (**), 95% (*) y ns: no significativo.

La concentración más baja de NaCl incrementó los valores de la tasa de crecimiento relativa (RGR) al final de la fase de salinización, no modificándose al final de la fase de lavado. Sin embargo, el nivel más severo de NaCl (S12) producía un descenso en RGR en ambas fases del ensayo (Tabla 4.3).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Tabla 4.3.- Respuestas frente a la salinidad en la tasa de crecimiento relativa (RGR) estudiada en plantas de *Myrtus communis* L. al final de ambas fases del ensayo (fase de salinización y fase de lavado).

Parámetros medidos	Tratamientos			^a F	Tratamientos		
	Control	S4	S8		Control	S12	^a F
RGR fase salinización	1,95±0,11a	2,34±0,15b	2,22±0,02ab	3,15*	2,91±0,10b	2,52±0,05a	12,26**
RGR fase lavado	2,61±0,10	2,36±0,09	2,26±0,16	2,50 n.s	3,11±0,13b	2,64±0,08a	17,30**

Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los diferentes parámetros de crecimiento. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99% (**), 95% (*) y n.s: no significativo.

7.3.1.2.- Cambios nutricionales

En valor absoluto, las tasas de absorción de Na⁺ y Cl⁻ fueron proporcionales a los niveles de salinidad empleados, pero los aumentos en la tasa de absorción de Na⁺, con respecto a sus respectivos controles, eran bastante parecidos, oscilando entre 2,2 y 2,5 veces (Figura 4.1A). Sin embargo, los cambios observados en la tasa de absorción de Cl⁻ dependían más del nivel de salinidad aplicado. Así, la tasa de absorción de Cl⁻ aumentó 1,5 veces en plantas S4, 1,7 veces en plantas a S8 y casi 2,2 veces en plantas regadas con S12 (Figura. 4.2A).

Respecto a la tasa de absorción del K⁺, los cambios no fueron significativos en plantas regadas con S4 y S8, pero se reducía de forma significativa en plantas tratadas con el mayor tratamiento salino (Figura 4.3A). Finalmente, la tasa de absorción del Ca²⁺ también se comportó de forma diferente dependiendo del nivel salino aplicado. En este sentido, estos valores aumentaron en plantas tratadas con S8 y no se modificaron en plantas S4 y S12 (Figura 4.4A).

Al final de la fase de lavado, las tasas de absorción de Na⁺ seguían siendo mayores en plantas previamente estresadas, con respecto a los controles. De este modo, estos valores eran un 65% mayores en plantas S4, un 74% en plantas S8 y un 32% en plantas S12 (Figura 4.1B). Los aumentos observados en la tasa de absorción de Cl⁻ eran mayores en plantas previamente tratadas con S12 que en las plantas S4 y S8 (Figura 4.2B).

La tasa de absorción de K⁺ no cambió en plantas S4 y S8, pero disminuyó un 50% en plantas previamente regadas con S12 (Figura 4.3B). La tasa de absorción de Ca²⁺ fue un 45% mayor en plantas S8, con respecto a su control y un 45% menor en plantas previamente tratadas con S12, comparado con sus controles (Figura 4.4B).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

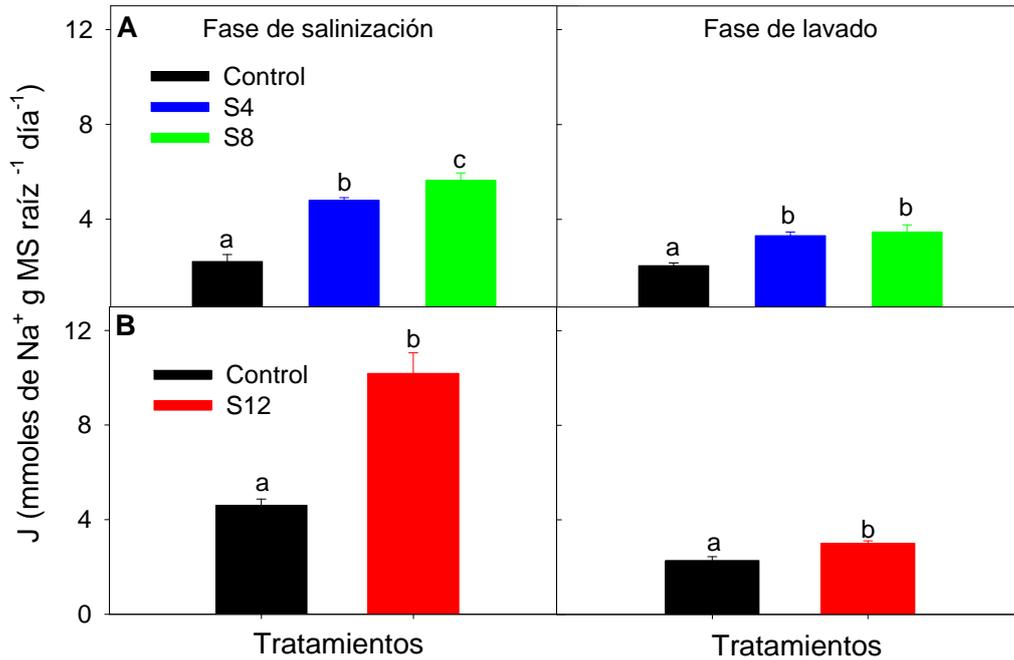


Figura 4.1.- Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre la tasa de absorción del ión sodio en plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 5 plantas. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

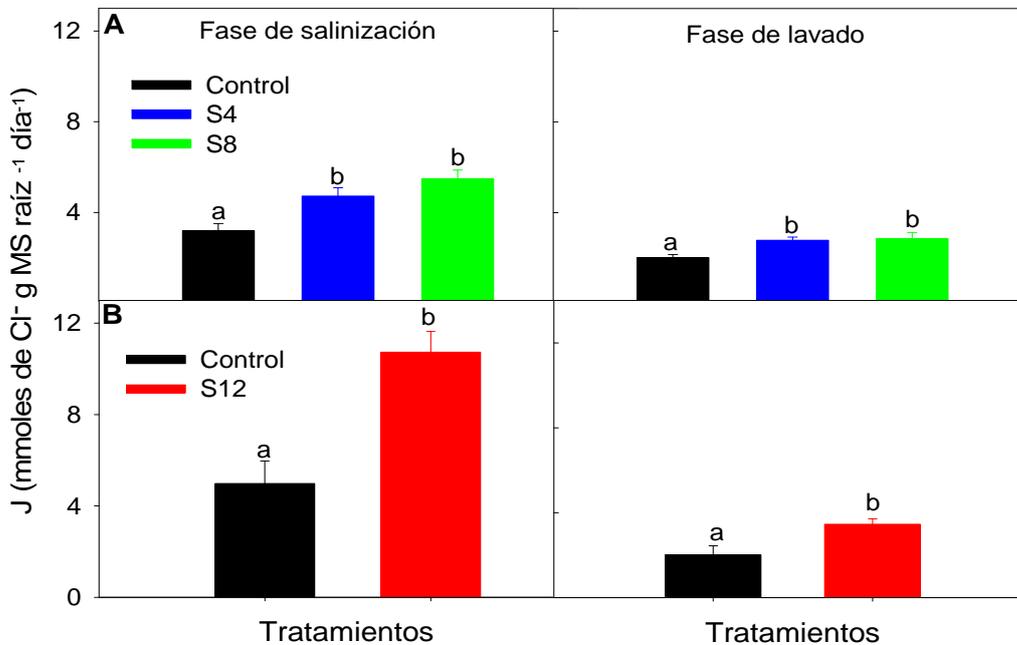


Figura 4.2.- Respuesta a diferentes concentraciones de (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre la tasa de absorción del ión cloruro en plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 5 plantas. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

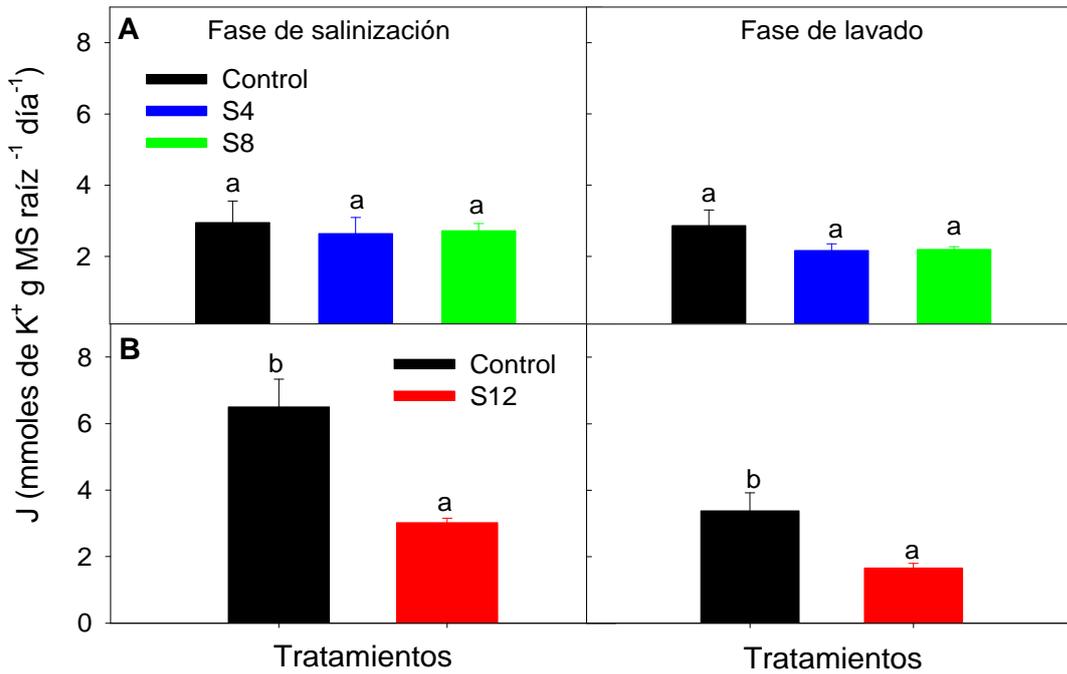


Figura 4.3.- Respuesta a diferentes concentraciones de (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre la tasa de absorción del ión potasio en plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 5 plantas. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

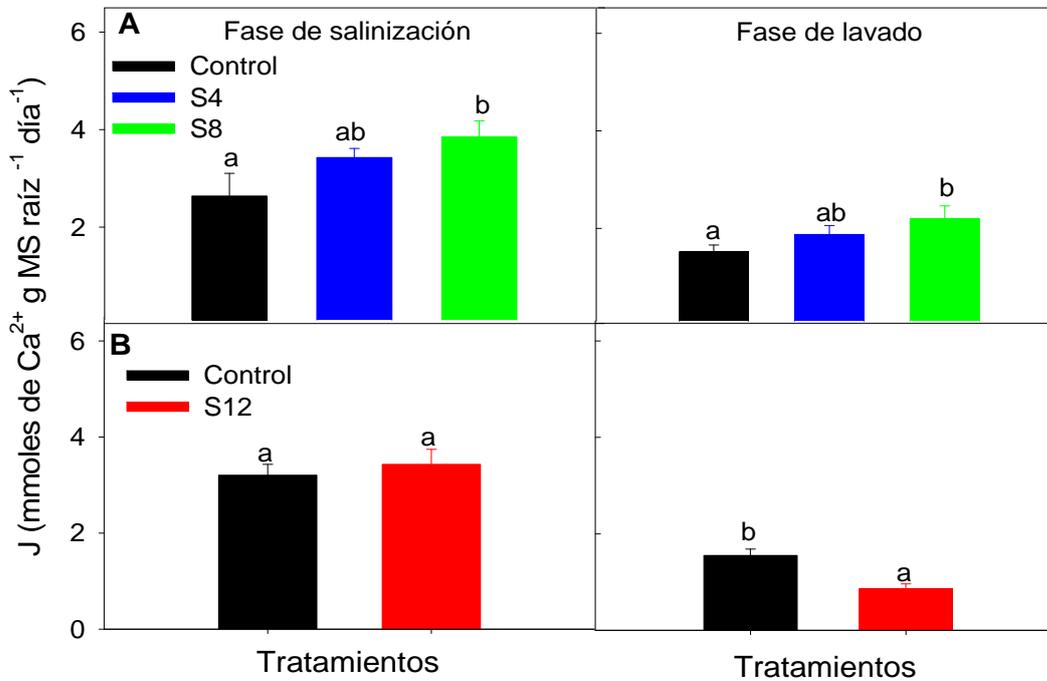


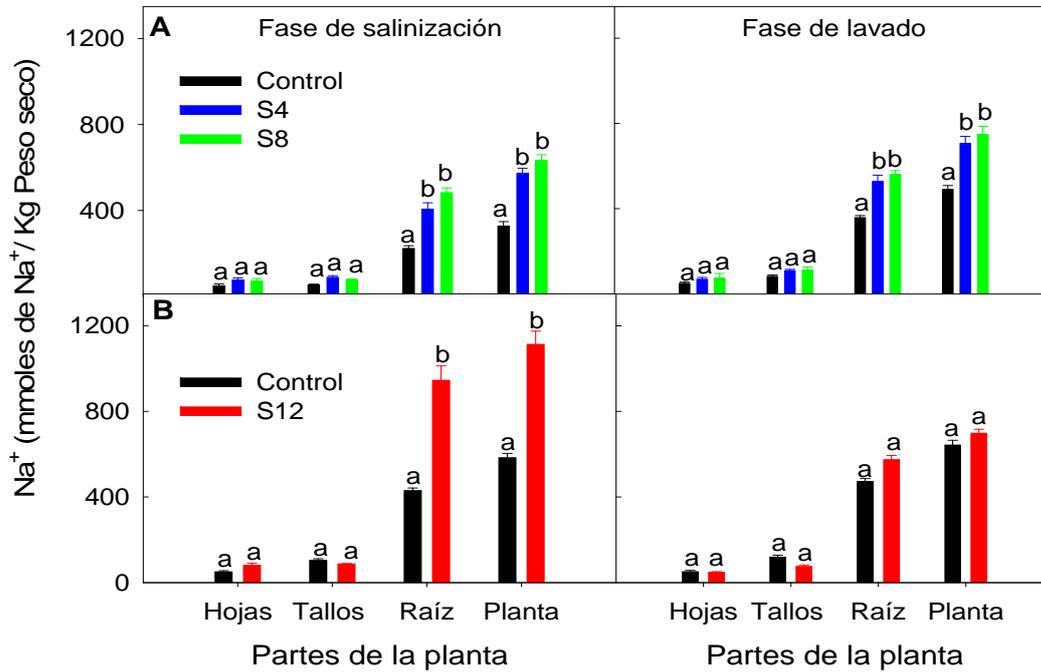
Figura 4.4.-Respuesta a diferentes concentraciones de (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre la tasa de absorción del ión calcio en plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 5 plantas. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

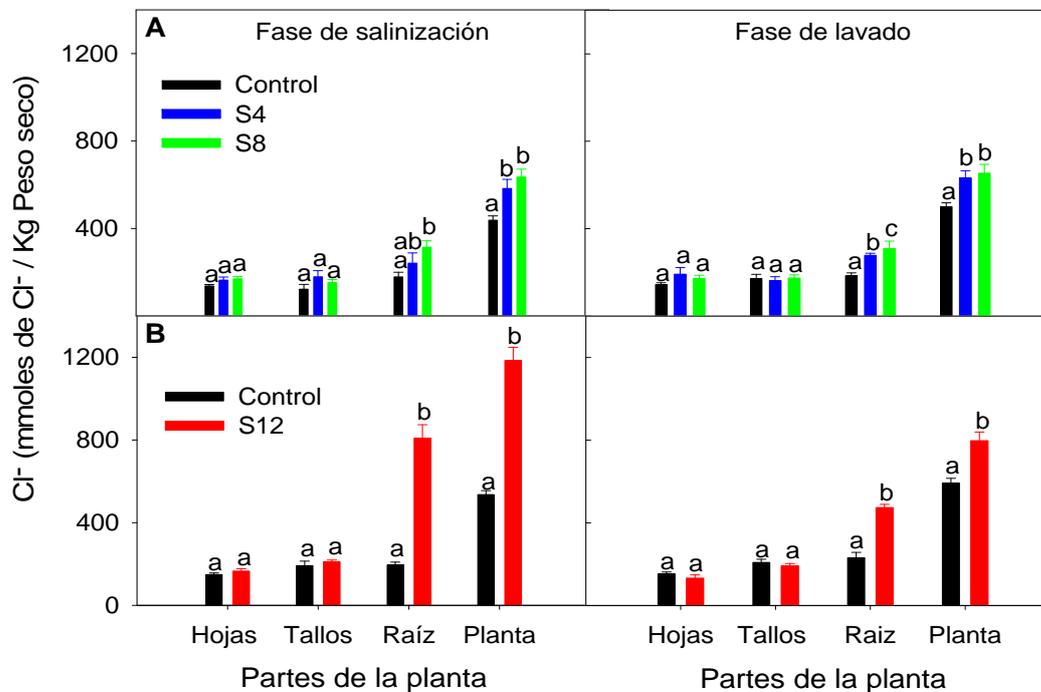
Niveles bajos (S4) y moderados (S8) de salinidad no afectaban de forma significativa los contenidos de Na^+ en hojas de mirto, mientras que los del tallo se incrementaron en ambos casos. El aumento de Na^+ en tallo era mayor en las plantas regadas con S4 (63%) que en las tratadas con S8 (41%). Sin embargo, la acumulación de Na^+ en raíz era paralela al nivel de salinidad usado en el tratamiento (Figura 4.5A). En plantas sometidas a un tratamiento más severo (S12) se producía una acumulación significativa de Na^+ solamente en raíces (Figura 4.5B). Al final de la fase de lavado, las plantas de mirto reducían el contenido de Na^+ a nivel de planta entera, sobre todo en raíces (Figura 4.5A). El ion Cl^- sólo se acumulaba de forma significativa en raíces de plantas de mirto tratadas con NaCl, siendo el aumento proporcional al nivel salino usado en el riego. Así, los aumentos fueron de un 35%, un 76% y de 4 veces para las plantas regadas con S4, S8 y S12, respectivamente (Figura 4.6A, 4.6B).

Al final de la fase de lavado, las raíces de las plantas previamente regadas con S4 y S8 presentaron niveles de Cl^- similares a los mostrados al final de la fase de salinización (Figura 6A). Sin embargo, en las plantas previamente sometidas al tratamiento S12, los niveles de Cl^- en la raíz eran 1,7 veces menores a los presentados al final de la fase de estrés, si bien todavía eran 2 veces mayores con respecto a las plantas control al final de la fase de lavado (Figura 4.6B). Los niveles de salinidad S4 y S8 no afectaron de forma significativa los contenidos de K^+ en ninguna parte de la planta (Figura 4.7A). Sin embargo, el tratamiento más salino redujo los contenidos de K^+ un 43% en hojas y un 21% en tallos, pero no afectaba a la raíz (Figura. 4.7B). Las plantas previamente regadas con S4 y S8 presentaron unos contenidos foliares de K^+ mayores que los observados al final de la fase de estrés, observándose un descenso significativo de K^+ sólo en raíces previamente regadas con S8 (Figura 4.7A). En contraste, en plantas previamente regadas con S12, tuvo lugar un descenso significativo de K^+ en hojas, tallos y raíces con respecto a los controles (Figura 4.7B). Los cambios provocados por el NaCl sobre los contenidos de Ca^{2+} en las diferentes partes de la planta no fueron estadísticamente significativos, pero se producía un incremento significativo en planta completa con los tratamientos S4 y S8 (Figura 4.8A). En las plantas previamente regadas con S8 se observó un aumento de Ca^{2+} sólo en raíces. En contraste, en plantas S12, los niveles de Ca^{2+} disminuyeron significativamente en hojas (38%), tallos (35%) y raíces (22%) (Figura 4.8B).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad



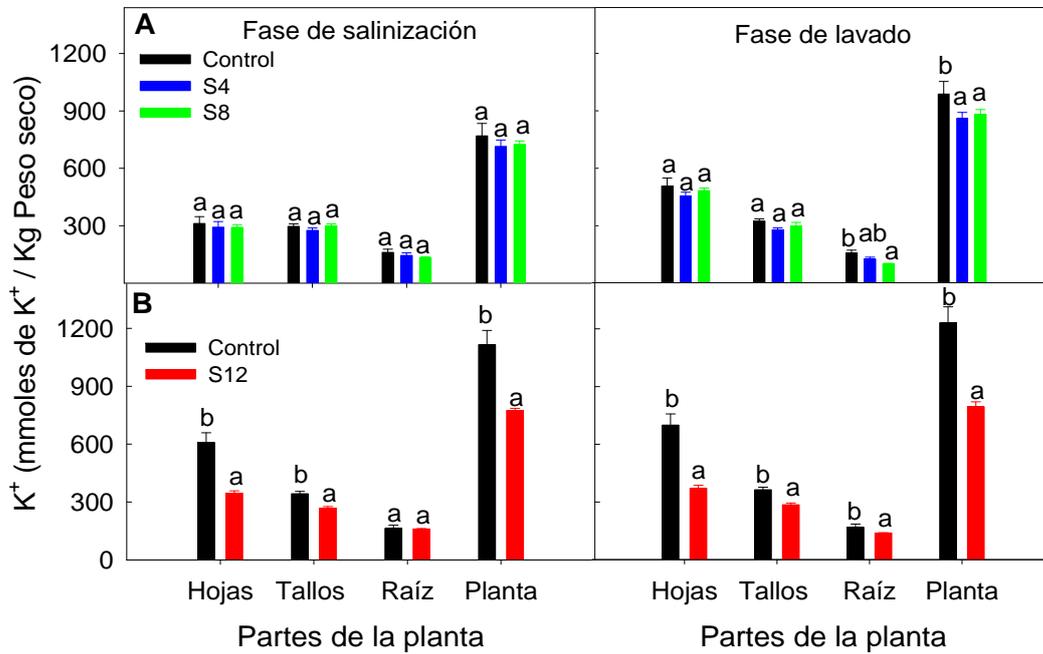
Figuras 4.5.- Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre los contenidos del ion sodio en diferentes órganos de plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 5 plantas. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).



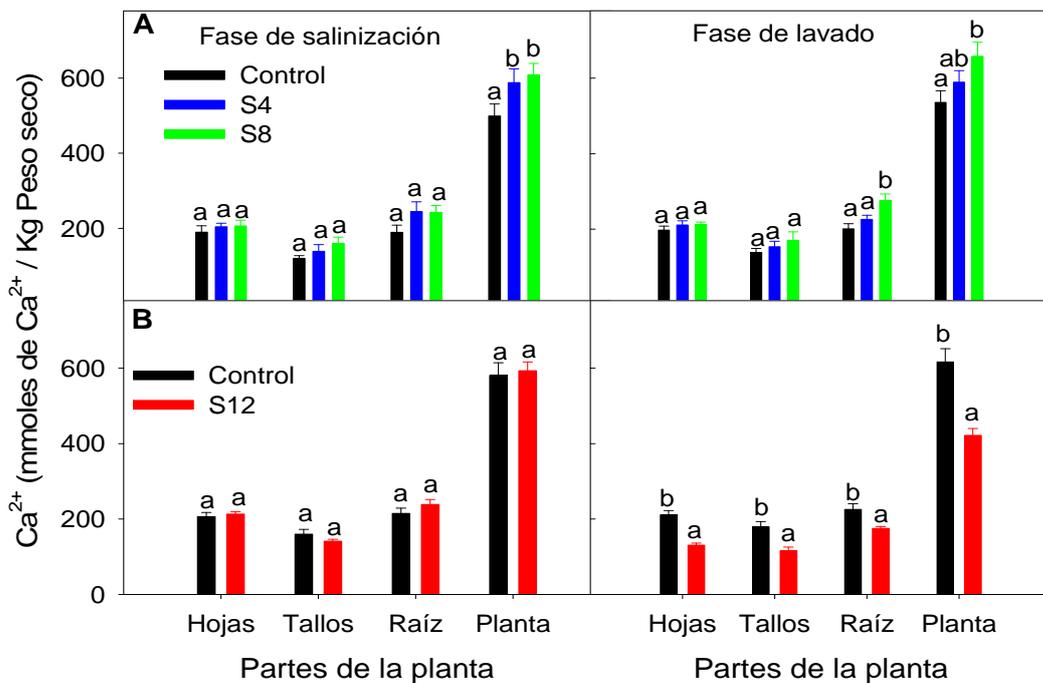
Figuras 4.6.- Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre los contenidos del ion cloruro en diferentes órganos de plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 5 plantas. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

los valores medios \pm error estándar de al menos 5 plantas. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).



Figuras 4.7.- Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre los contenidos del ion potasio en diferentes órganos de plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 5 plantas. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).



Figuras 4.8.- Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre los contenidos del ion calcio en diferentes órganos de plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 5 plantas. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

los valores medios \pm error estándar de al menos 5 plantas. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$).

El cociente K^+/Na^+ disminuyó en hojas de mirto de manera paralela a la salinidad. El descenso en tallos era mayor en plantas tratadas con S4 que en las regadas con S8, no cambiando en plantas sometidas a S12. Respecto a las raíces, el descenso en la relación K^+/Na^+ oscilaba entre 50-60% (Tabla 4.4).

El cociente K^+/Cl^- no sufrió cambios importantes en hojas y tallos de plantas tratadas con S4 y S8, a diferencia de las plantas regadas con S12, donde el cociente K^+/Cl^- se reducía un 48% en hojas y un 30% en tallos (Tabla 4.4). El efecto de la salinidad en ese cociente fue más evidente en raíces, mostrando un descenso paralelo al aumento de la salinidad (Tabla 4.4).

El cociente Ca^{2+}/Na^+ disminuyó en hojas, con independencia del nivel salino aplicado, siendo el descenso cercano al 30%. El efecto en raíces era proporcional al nivel de estrés impuesto. De este modo, los descensos eran de un 28%, un 39% y un 50% para raíces de plantas tratadas con S4, S8 y S12, respectivamente (Tabla 4.4).

Los cocientes Ca^{2+}/Cl^- y Na^+/Cl^- no mostraron cambios significativos en plantas regadas con S4 y S8. En plantas tratadas con el mayor nivel salino, el cociente Ca^{2+}/Cl^- disminuyó un 37% en raíces (Tabla 4.4). Finalmente, en estas mismas plantas, el cociente Na^+/Cl^- aumentaba en hojas pero disminuía en tallos y raíces (Tabla 4.4).

Al final de la fase de lavado, en plantas previamente tratadas con S4 y S8 se seguía observando un descenso en el cociente K^+/Na^+ en los diferentes órganos analizados, siendo dicho descenso de una magnitud similar a la presentada al final de la fase de salinización. Igualmente, el efecto era más patente en raíces. En plantas S12, el cociente K^+/Na^+ disminuía en hojas y raíces, no cambiando en tallos (Tabla 4.5).

El cociente K^+/Cl^- disminuyó en raíces de plantas previamente sometidas a los tratamientos salinos, con descensos de un 47% en S4 y cercanos al 60% en S8 y S12. Además, en plantas S12, el cociente K^+/Cl^- también disminuyó en hojas (Tabla 4.5).

El cociente Ca^{2+}/Na^+ se redujo en raíces de plantas S4 y en raíces y hojas de plantas S12. El cociente Ca^{2+}/Cl^- también disminuyó en raíces de plantas S4 y especialmente en plantas S12, donde el descenso alcanzó el 64%. Finalmente, el ratio Na^+/Cl^- no se modificó en plantas previamente

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

sometidas a los tratamientos S4 y S8, pero sufría un descenso en tallos y raíces de las plantas S12 (Tabla 4.5).

Tabla 4.4.- Efecto del NaCl (4, 8 y 12 dS/m) sobre los diferentes cocientes de iones estudiados en este ensayo en los distintos órganos de plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase de salinización.

Cocientes	Órgano	Tratamientos			ªF	Tratamientos		
		Control	S4	S8		Control	S12	ªF
K ⁺ /Na ⁺	Hojas	6,71±0,78b	4,02±0,48a	4,62±0,84ab	3,86*	12,51±1,03b	4,61±0,58a	44,75***
	Tallos	5,47±0,29b	3,20±0,31a	3,98±0,33a	14,00***	3,35±0,18	3,09±0,08	1,87n.s
	Raíz	0,75±0,11b	0,36±0,03a	0,28±0,01a	13,10***	0,38±0,03b	0,17±0,01a	40,88***
K ⁺ /Cl ⁻	Hojas	2,14±0,13	1,94±0,36	1,79±0,20	0,50n.s	4,17±0,39b	2,16±0,22a	19,71***
	Tallos	2,77±0,44	1,76±0,27	2,10±0,27	2,35n.s	1,85±0,16b	1,29±0,08a	10,02**
	Raíz	0,95±0,10c	0,68±0,08b	0,44±0,03a	10,59***	0,86±0,11b	0,20±0,01a	38,25***
Ca ²⁺ /Na ⁺	Hojas	4,32±0,57b	2,84±0,37a	3,11±0,44ab	3,11*	4,34±0,45b	2,83±0,34a	7,05*
	Tallos	2,23±0,18	1,59±0,20	2,12±0,27	2,45n.s	1,56±0,11	1,63±0,09	0,22n.s
	Raíz	0,84±0,06b	0,60±0,05a	0,51±0,04a	11,53***	0,50±0,02b	0,25±0,01a	124,91***
Ca ²⁺ /Cl ⁻	Hojas	1,41±0,16	1,32±0,17	1,25±0,13	0,26n.s	1,39±0,04	1,33±0,13	0,18n.s
	Tallos	1,10±0,17	0,86±0,15	1,12±0,19	0,78n.s	0,89±0,13	0,67±0,01	2,68n.s
	Raíz	1,19±0,23	1,28±0,34	0,80±0,08	1,10n.s	1,12±0,09b	0,30±0,01a	88,86***
Na ⁺ /Cl ⁻	Hojas	0,34±0,03	0,53±0,13	0,44±0,07	1,23n.s	0,34±0,04a	0,50±0,07b	4,22*
	Tallos	0,50±0,06	0,55±0,08	0,52±0,02	0,22n.s	0,56±0,05b	0,42±0,02a	7,07*
	Raíz	1,36±0,19	2,00±0,40	1,58±0,08	1,59n.s	2,24±0,13b	1,18±0,01a	70,02***

Los datos representan los valores medios ± el error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

ªValores de F del análisis ANOVA de una vía para los diferentes parámetros de crecimiento. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 99% (**), o 95% (*) y n.s; diferencias no significativas.

Tabla 4.5.- Efecto del NaCl (4, 8 y 12 dS/m) sobre los diferentes cocientes de iones estudiados en este ensayo en los distintos órganos de plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase de lavado.

Cocientes	Órgano	Tratamientos			ªF	Tratamientos		
		Control	S4	S8		Control	S12	F
K ⁺ /Na ⁺	Hojas	10,55±1,06b	6,98±0,73a	7,97±1,35ab	3,11*	14,17±1,42b	8,08±1,01a	12,26**
	Tallos	3,96±0,25b	2,57±0,20a	2,88±0,44a	5,37*	3,10±0,20	3,85±0,24	5,89*
	Raíz	0,44±0,04b	0,24±0,02a	0,18±0,01a	21,70***	0,36±0,04b	0,24±0,01a	10,08
K ⁺ /Cl ⁻	Hojas	3,60±0,43	2,57±0,32	2,93±0,3	2,14n.s	4,67±0,54b	3,01±0,41a	6,01*
	Tallos	1,97±0,20	1,79±0,18	11,79±0,21	0,27n.s	1,78±0,15b	1,52±0,11a	2,00n.s
	Raíz	0,88±0,13b	0,46±0,05a	0,35±0,05a	11,22**	0,75±0,06	0,29±0,01	58,44***
Ca ²⁺ /Na ⁺	Hojas	4,22±0,53	3,26±0,43	3,51±0,58	0,92n.s	4,40±0,56	2,80±0,19	7,45*
	Tallos	1,69±0,15	1,40±0,11	1,57±0,20	0,86n.s	1,52±0,13	1,54±0,09	0,09n.s
	Raíz	0,56±0,03b	0,43±0,01a	0,49±0,02ab	8,14**	0,48±0,03b	0,31±0,02a	29,30***
Ca ²⁺ /Cl ⁻	Hojas	1,37±0,05	1,18±0,15	1,29±0,14	0,65n.s	1,38±0,05	1,03±0,08	13,24**
	Tallos	0,87±0,16	0,96±0,08	0,99±0,11	0,29n.s	0,86±0,03	0,60±0,04	27,41***
	Raíz	1,11±0,10b	0,82±0,03a	0,93±0,08ab	3,62*	1,04±0,16	0,37±0,01	17,22**
Na ⁺ /Cl ⁻	Hojas	0,35±0,05	0,40±0,07	0,42±0,09	0,24n.s	0,34±0,05a	0,37±0,03b	0,34n.s
	Tallos	0,50±0,05	0,70±0,07	0,66±0,08	2,33n.s	0,58±0,03b	0,40±0,04a	13,33**
	Raíz	1,97±0,14	1,91±0,12	1,91±0,20	0,05n.s	2,16±0,25b	1,23±0,08a	12,74**

Los datos representan los valores medios ± el error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

ªValores de F del análisis ANOVA de una vía para los diferentes parámetros de crecimiento. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 99% (**), o 95% (*) y n.s; diferencias no significativas.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

7.3.1.3.- Cambios fisiológicos

7.3.1.3.1.- Relaciones hídricas y síntesis de L-prolina

Con respecto al potencial hídrico foliar (Ψ_h) solamente unas dos horas después de realizar el primer riego se pudieron apreciar diferencias significativas entre el control y los tratamientos salinos S4 y S8 (Figura. 4.9A). Las diferencias fueron más claras a los dos días de aplicar los tratamientos y se mantuvieron hasta el final de la fase de salinización (Figura 4.9A). Cuando comenzó la fase de lavado, y habían transcurrido siete días de la misma, las diferencias eran aún más claras, sobre todo para el tratamiento S8. Al final del ensayo, las diferencias fueron estadísticamente significativas sólo para las plantas S8 (Figura 4.9A). Cuando se compararon las plantas control y las S12, se apreciaron grandes diferencias a los siete días de tratamiento. Estas diferencias se incrementaron conforme avanzaba la fase de salinización, alcanzando las mayores diferencias al final de la misma (Figura 4.9B). Una vez aplicados los primeros lavados se observó una cierta recuperación de los valores de Ψ_h en las plantas S12, aunque nunca alcanzaron a los observados en las plantas control (Figura 4.9B).

Las mayores diferencias con respecto al potencial de presión (Ψ_p) se observaron durante los primeros días de la fase de salinización, donde los valores más bajos correspondían a las plantas S8 (Figura 4.10A). Durante la fase de lavado las mayores diferencias se observaron a los 35 días, pero también se apreciaron diferencias considerables a los 37 y 42 días. Al final del ensayo (a los 53 días) se invirtieron las tendencias, observándose los valores más bajos en las plantas control y los valores más altos en las plantas S4 y S8 (Figura 4.10A). Al comparar plantas control con plantas S12, las diferencias más relevantes en Ψ_p se producían al final de la fase de salinización donde los valores más bajos correspondían al tratamiento S12 (Figura 4.10B).

Con respecto al potencial osmótico saturado (Ψ_{os}), se apreciaron ciertas fluctuaciones en los datos de forma similar a lo observado para el potencial de presión. Sin embargo, durante muchos momentos de la fase de salinización, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, donde las plantas S4 y S8 presentaron los valores más bajos, indicando un cierto ajuste osmótico.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Durante la fase de lavado se apreció una tendencia similar durante los primeros días, observándose diferencias significativas entre los controles y los

tratamientos S4 y S8. Sin embargo, al final de la fase de lavado, hay un cambio de tendencia en los tratamientos S4 y S8 (Figura 4.11A).

Durante todo el estudio comparativo entre plantas control y S12, se observó que las plantas S12 mostraban valores más bajos, indicando que estas plantas realizaban un ajuste osmótico a lo largo de todo el ensayo (Figura 4.11B).

Los contenidos de L-prolina no mostraron cambios importantes entre los tratamientos S4 y S8 durante el periodo de salinización (Figura 4.12 A). Una respuesta similar ocurría en la fase de lavado, donde los únicos cambios tenían lugar al final de la misma, con un aumento de los niveles de prolina en plantas S8 (Figura 4.12A). Con respecto al tratamiento más severo S12, sus niveles de prolina siempre fueron más elevados que los de las plantas control, desde el inicio del ensayo, tanto en la fase de salinización como en la fase de lavado (Figura 4.12B).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

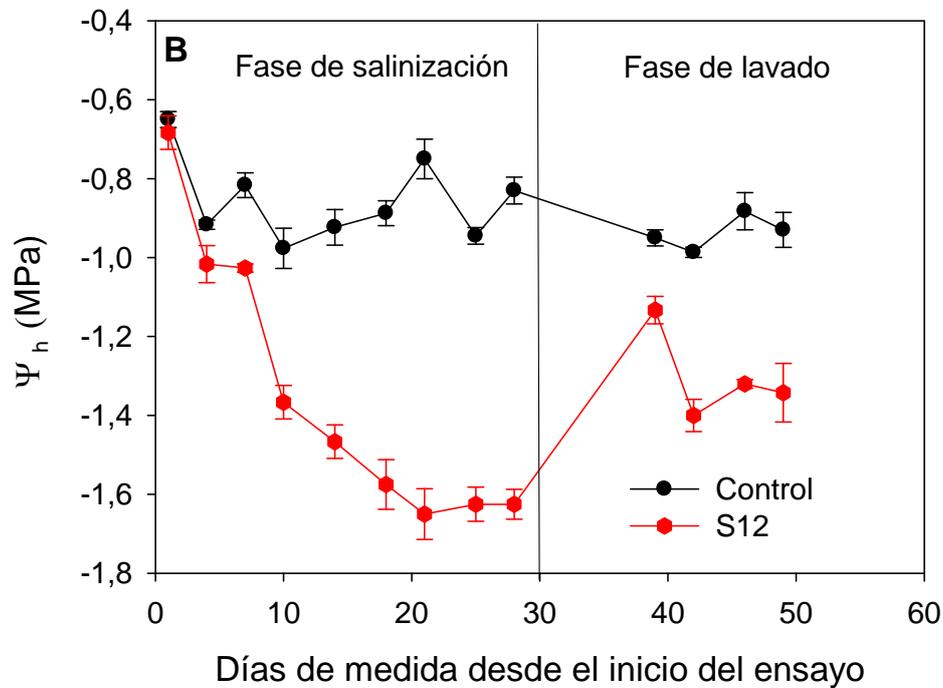
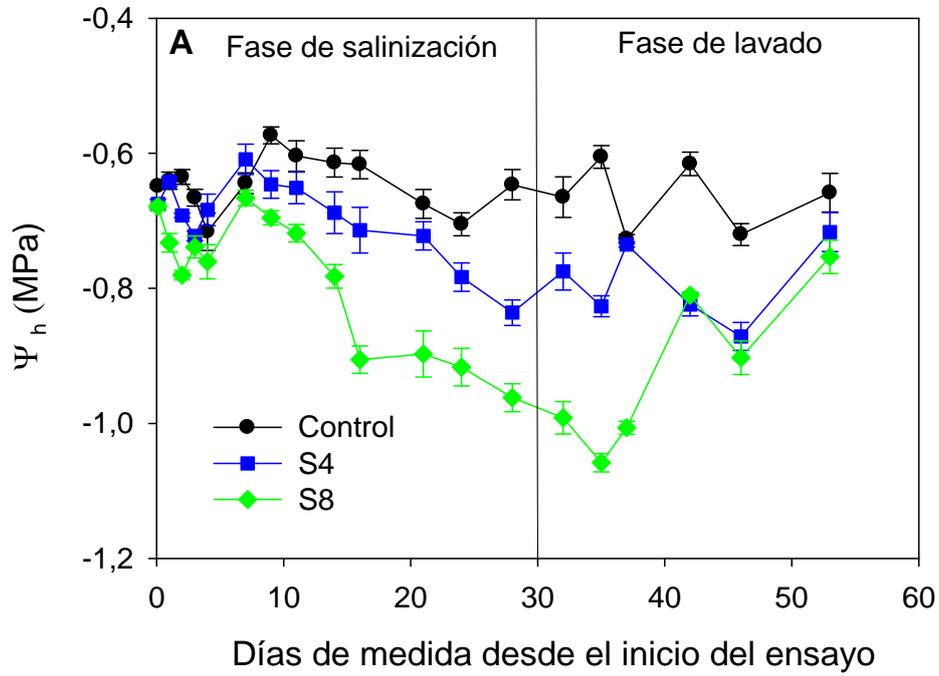


Figura 4.9.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial hídrico foliar (Ψ_h), (Control, S4 y S8; A) y (Control y S12; B) en plantas de *Myrtus communis* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

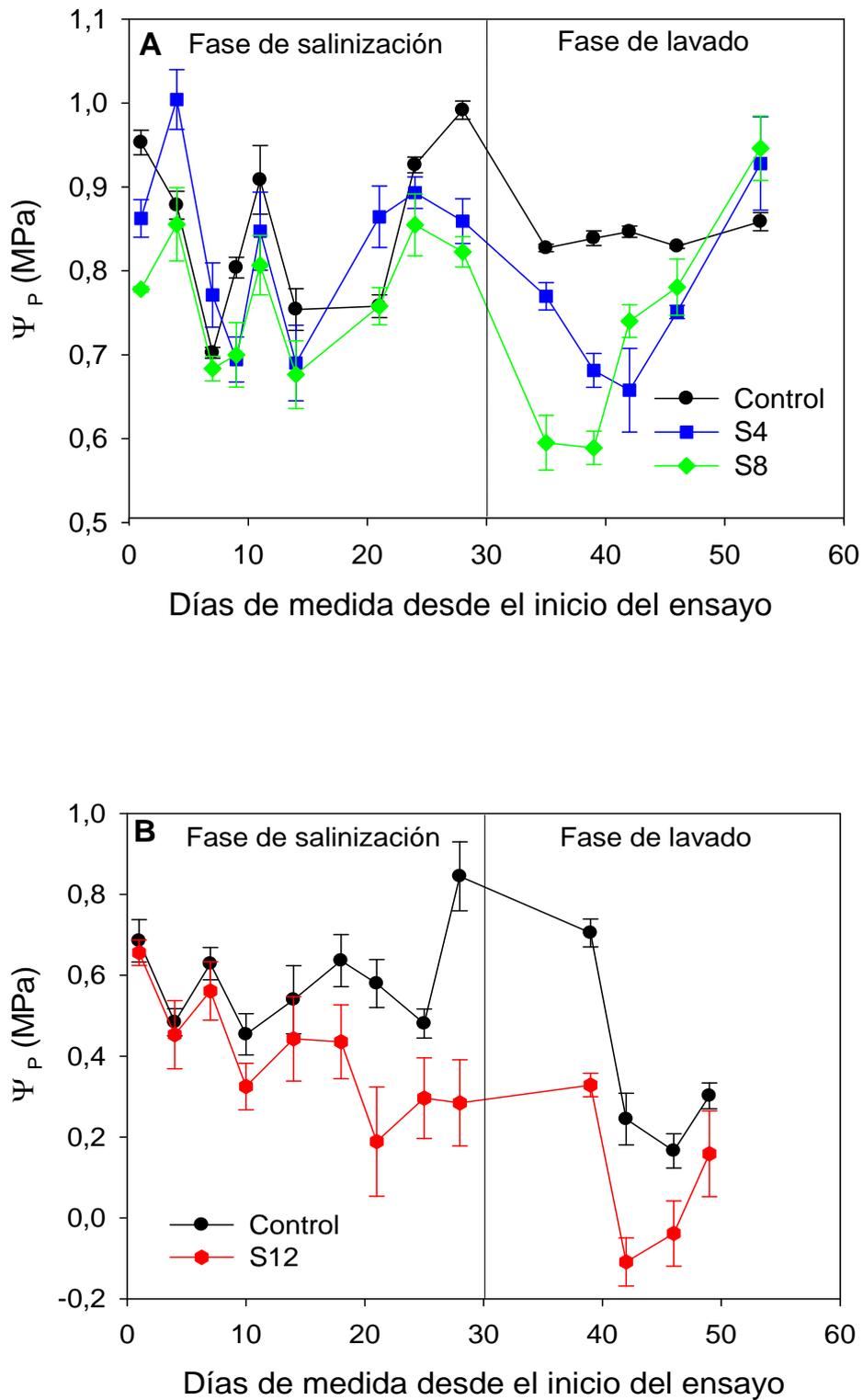


Figura 4.10.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial de presión (Ψ_p) (Control, S4 y S8; A) y (Control y S12; B) en plantas de *Myrtus communis* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

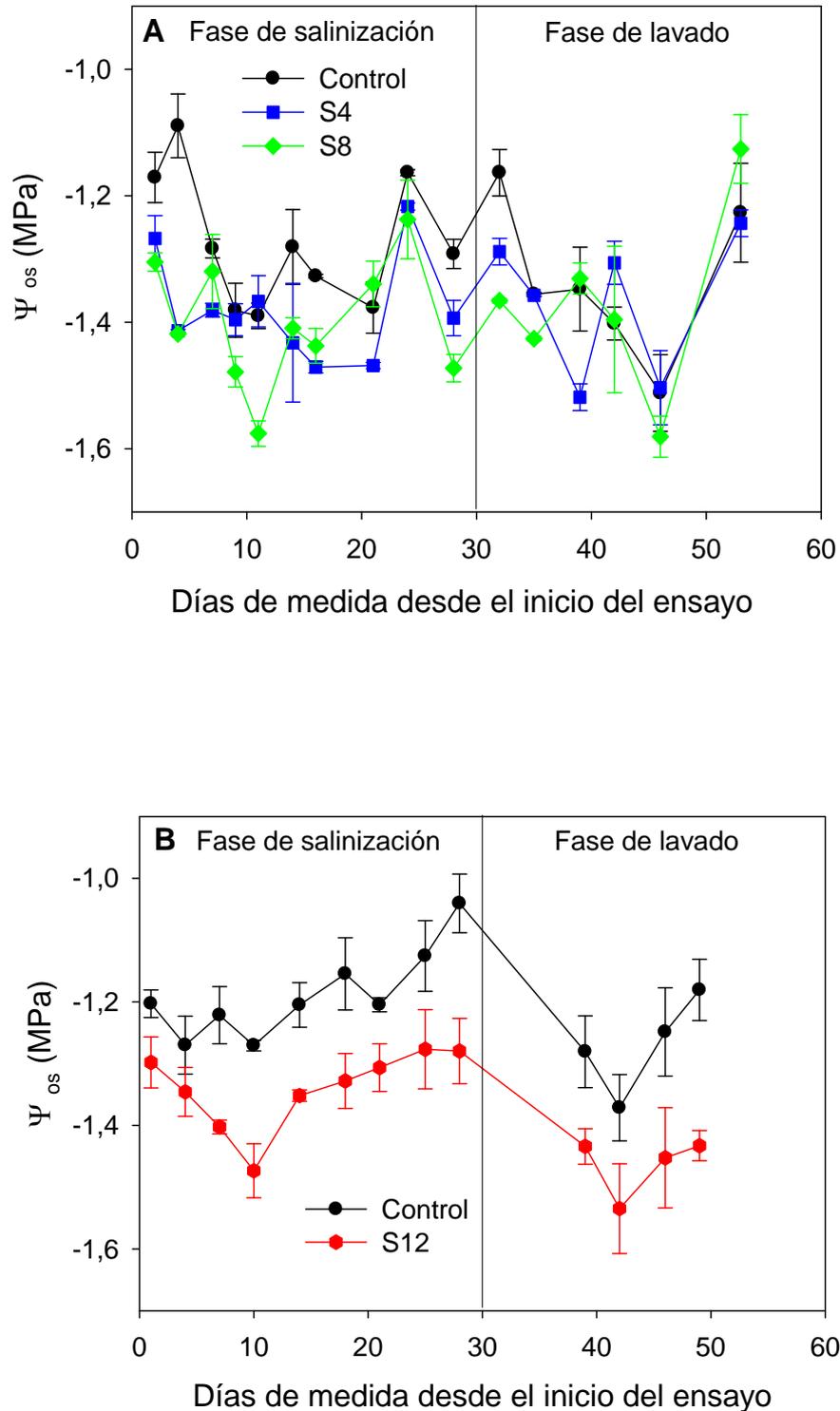


Figura 4.11.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial osmótico a máxima saturación (Ψ_{os}) (Control, S4 y S8; A) y (Control y S12; B) en plantas de *Myrtus communis* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

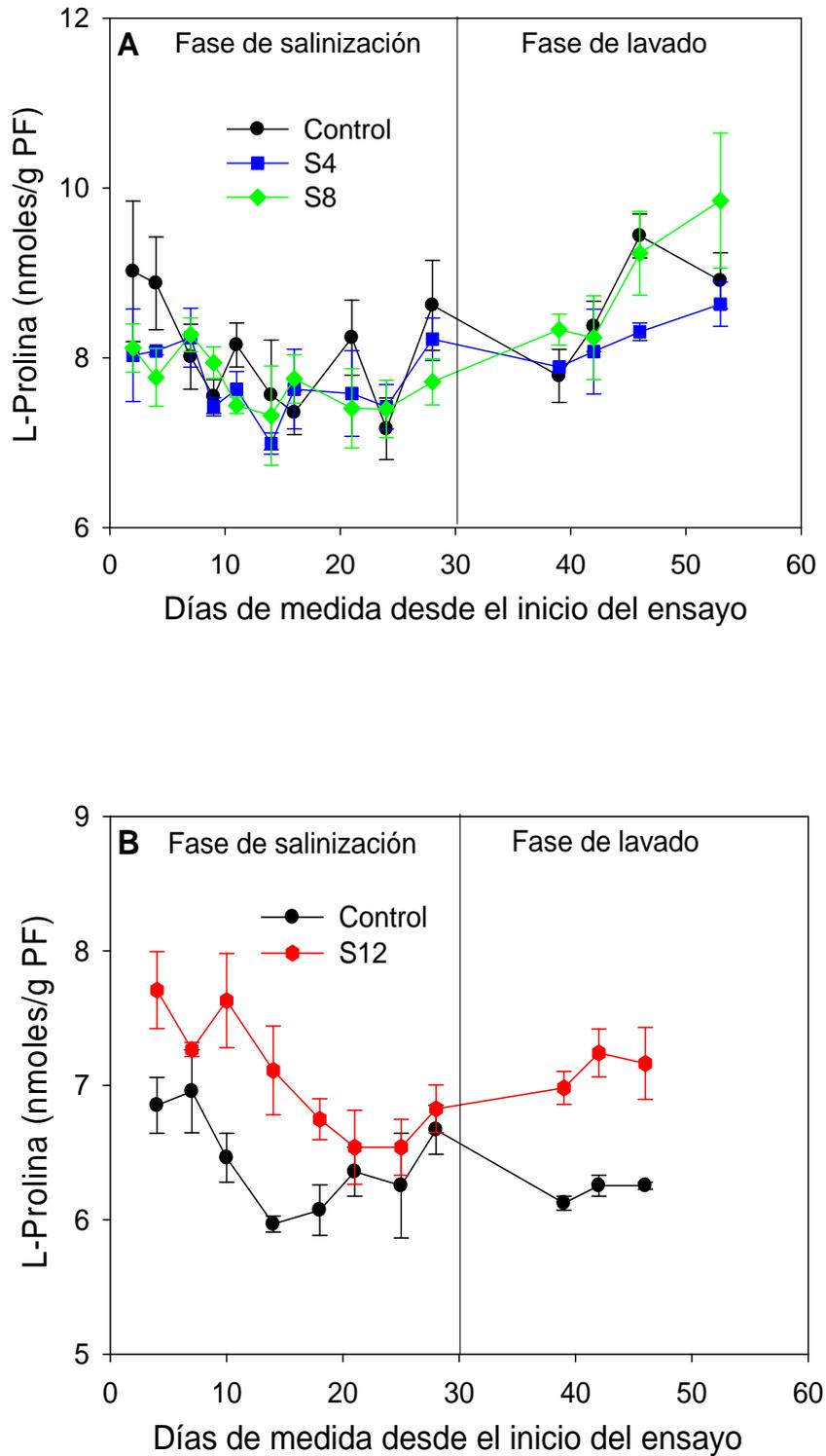


Figura 4.12.- Evolución a lo largo del ensayo de la acumulación de L-prolina (Control, S4 y S8; A) y (Control y S12; B) en hojas en plantas de *Myrtus communis* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes.

7.3.1.3.2.- Intercambio gaseoso

Después de una semana de aplicación de los tratamientos, los cambios observados en g_s y P_n no fueron significativos en ninguno de los tratamientos. En la primera mitad de la fase de salinización (15-16 días), los valores de g_s no se modificaron en plantas tratadas con NaCl, a pesar de este hecho, los valores de P_n disminuyeron un 35% en plantas S4 y un 42% en plantas S8, lo que hizo disminuir el WUE (Tabla 4.6). A más largo plazo, después de 30 días de estrés, la salinidad no afectó a la conductancia estomática en plantas tratadas con S4, pero se reducía un 54% en plantas tratadas con S8. Al final de la fase de salinización, los valores de P_n se reducían en un 52% en plantas tratadas con 8 dS/m, no afectando significativamente a las plantas S4 ni a los valores de WUE (Tabla 4.6). Finalmente, después del periodo de recuperación, los valores de g_s eran menores en plantas previamente tratadas con NaCl que en plantas controles, si bien el descenso era mayor en plantas previamente tratadas con el nivel S8 que en plantas tratadas con el nivel S4 (Figura 14A). Este comportamiento estaba correlacionado, de nuevo, con un descenso en los valores de P_n . En este sentido, los valores de P_n para las plantas tratadas con el menor nivel salino (S4) eran más bajos que los controles, aunque las diferencias no fueron significativas. En contraste, los cambios presentados por las plantas tratadas con el mayor nivel salino (S8) eran significativamente más bajos (Tabla 4.6). Como consecuencia de estos cambios en el periodo de recuperación, los valores de WUE fueron muy parecidos en los tres tratamientos (Tabla 4.6).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

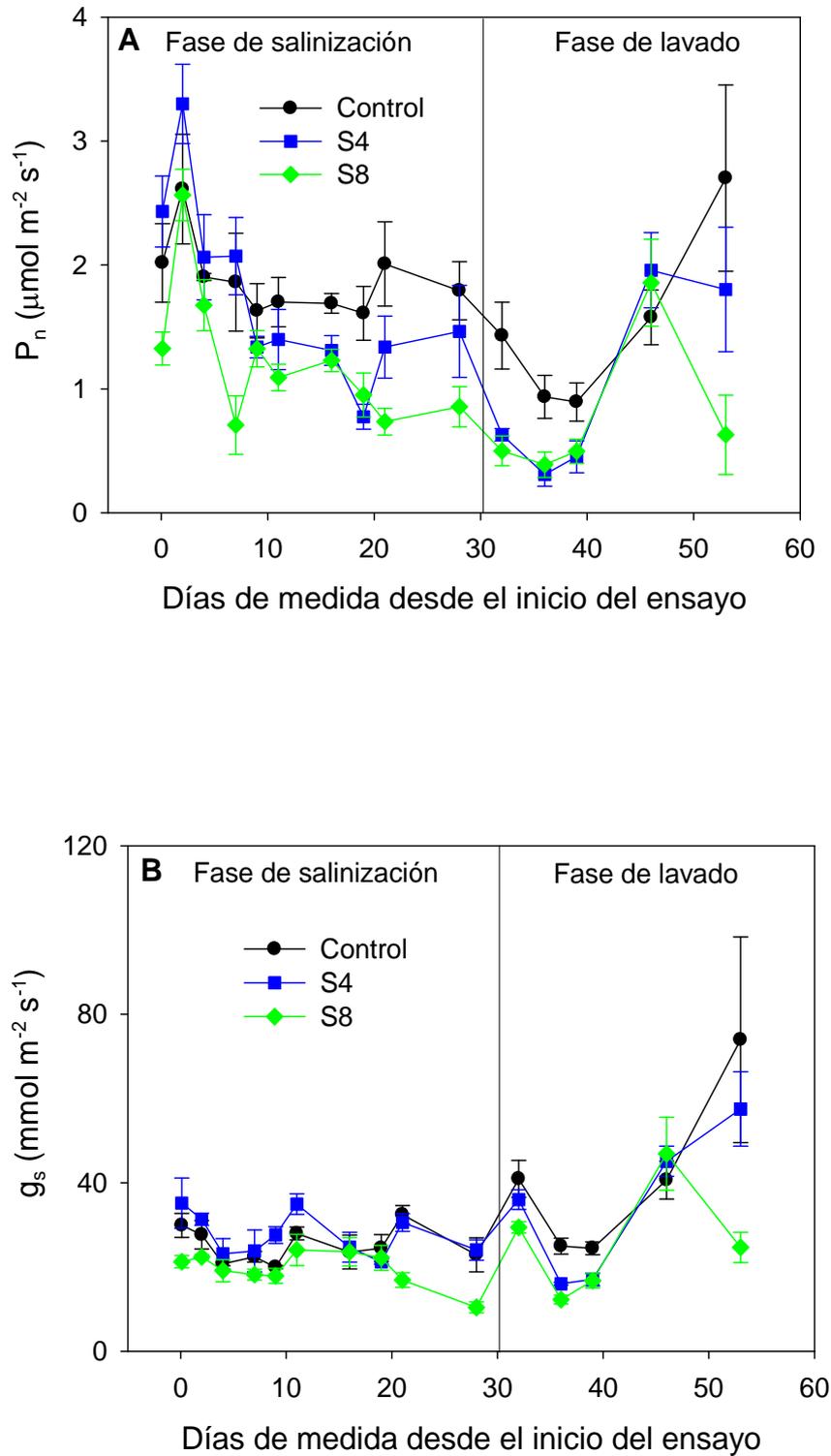


Figura 4.13.- Evolución a lo largo del ensayo de la tasa de fotosíntesis neta (P_n , A) y la conductancia estomática (g_s , B) en plantas de *Myrtus communis* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Tabla 4.6.- Respuestas a la salinidad en plantas de *Myrtus communis* L. regadas con diferentes concentraciones de NaCl sobre la tasa de fotosíntesis neta (P_n), sobre la conductancia estomática (g_s) y en el uso eficiente del agua (WUE) después de 15 y 30 días de tratamientos y una vez finalizada la fase de lavado.

Intercambio Gaseoso	P_n ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	g_s ($\text{mmoles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	WUE
15 Días			
Control	1,09±0,08b	23,57±4,02a	51,35±9,96b
S4	0,71±0,12a	24,71±3,54a	28,86±3,74a
S8	0,63±0,09a	23,62±3,38a	26,71±1,50a
^a F	6,33*	0,03n.s	4,84*
30 Días			
Control	1,79±0,33b	22,89±4,04b	12,78±4,04b
S4	1,46±0,37ab	24,05±2,42b	24,05±2,42b
S8	0,86±0,16a	10,43±1,30a	10,43±1,30a
^a F	4,90*	3,81*	3,53*
Fase de lavado			
Control	2,70±0,75b	73,94±24,40b	25,08±1,00
S4	1,80±0,50ab	57,51±8,83b	32,68,±2,04
S8	0,63±0,32a	24,67±3,61a	25,92±8,90
^a F	4,09*	3,51*	0,94n.s

Los datos representan los valores medios \pm el error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los parámetros P_n , g_s y WUE. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 95% (*). ns: no significativo.

7.3.1.3.3.- Fluorescencia de clorofilas y síntesis de clorofilas

En plantas de mirto, se observó un aumento en los parámetros relacionados con procesos fotoquímicos a los 15 días de estrés salino. Así, observamos un aumento significativo en los parámetros qP, Y(II) y Fv/Fm en plantas tratadas con el riego salino moderado (4 dS/m) y un aumento significativo en los parámetros Y(II) y Fv/Fm en plantas tratadas con el riego de 8 dS/m. Respecto a los parámetros relacionados con procesos no fotoquímicos, el hecho más destacado fue un aumento significativo de los parámetros NPQ y Y(NPQ) en plantas tratadas con 8 dS/m (Tabla 4.7; Figura 4.14). Sin embargo, a los 30 días, en ambos tratamientos salinos se producía un descenso en el parámetro qP, mientras que en el tratamiento de 8 dS/m disminuía también el rendimiento cuántico Y(II), pero se incrementaron los parámetros de *quenching* no fotoquímico (Tabla 4.7; Figura 4.14).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Una vez terminada la fase de lavado, las plantas previamente estresadas (4 y 8 dS/m) presentaron un qP significativamente mayor que las plantas control. Sin embargo, las plantas que fueron tratadas con un riego salino de 4 dS/m, presentaron también un mayor rendimiento cuántico, así como una disminución en los parámetros de *quenching* no fotoquímico (Tabla 4.7; Figura 4.14). Las plantas de mirto presentaban bajos valores de tasa de transporte electrónico (ETR). Estos datos se analizaron a los 30 días de estrés y en plantas recuperadas del estrés salino. El máximo de ETR tiene lugar en intensidades luminosas muy bajas (entre 56-111 PAR), decreciendo rápidamente para intensidades mayores (Figura 4.15). A los 30 días de estrés, tanto los controles como las plantas estresadas presentaban valores de ETR parecidos, si bien las plantas tratadas con 4 dS/m parecían presentar un mayor transporte electrónico, aunque las diferencias no parecen ser significativas ya que observamos un solapamiento de los errores (Figura. 4.15). Durante la fase de lavado, los valores de ETR eran mayores que los observados a 30 días de estrés, presentando máximos de ETR para intensidades de 111-186 PAR. A intensidades de 111 PAR, las plantas regadas con agua de buena calidad presentaron valores de ETR mayores que las plantas control (Fig. 4.15), datos que estaban correlacionados con los mayores valores de qP observados (Tabla 4.7).

Los datos observados de ETR ponen de manifiesto que las plantas de mirto parecen estar adaptadas a un crecimiento con bajas intensidades luminosas. Este hecho queda reflejado en los datos de evolución de P_n analizados en plantas crecidas en cámara de crecimiento o con una baja intensidad luminosa (Figura. 4.15A). En este sentido, podemos comprobar cómo los datos de P_n eran mayores en las plantas adaptadas al crecimiento con baja intensidad luminosa que en plantas crecidas en cámara cuando se aplicaban intensidades luminosas de hasta 800 PAR en las medidas. Estos valores se igualaron para valores de PAR más elevados (1000 PAR) (Figura. 4.15B).

La salinidad afectaba a los niveles de clorofila dependiendo del nivel de NaCl empleado en el riego. Durante el periodo de estrés, las plantas regadas con 8 dS/m presentaron niveles de clorofila mayores que los de las plantas control, durante todo el tiempo que duró el experimento (Figura. 4.16 A). Estas diferencias eran más evidentes durante la fase de lavado. En esta fase, las plantas previamente regadas con el nivel de NaCl 4 dS/m presentaron también

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

mayores contenidos de clorofila que las plantas control, alcanzando niveles parecidos al de las plantas S8 al final de esta fase (Figura. 4.16A). Sin embargo cuando las plantas de mirto se regaron con niveles de NaCl 12 dS/m, los contenidos foliares de clorofila disminuyeron. Este efecto se observó durante la fase de salinización y durante la fase de lavado, siendo las diferencias más acusadas al final de ambos periodos (Figura. 4.16B).

Tabla 4.7.- Efecto de la salinidad en parámetros de fluorescencia de hojas de *Mirtus communis* L. después de 15 y 30 días de tratamientos y una vez finalizada la fase de lavado.

Fluorescencia	qP	Y(II)	Fv/Fm	qN	NPQ	Y(NPQ)
15 Días						
Control	0,667a	0,288a	0,670a	0,755b	0,370a	0,396a
S4	0,720b	0,382c	0,702b	0,700a	0,378a	0,411a
S8	0,697ab	0,352b	0,717b	0,796b	0,535b	0,553b
^aF	3,15*	25,46**	9,16***	10,25**	8,82***	6,61**
30 Días						
Control	0,712b	0,372b	0,683a	0,649a	0,268a	0,318a
S4	0,636a	0,344b	0,706a	0,658a	0,282a	0,342a
S8	0,643a	0,279a	0,692a	0,815b	0,505b	0,472b
^aF	4,69*	11,87**	0,97n.s	58,87**	69,47**	44,66**
Fase de lavado						
Control	0,588a	0,275a	0,670a	0,711b	0,450b	0,480c
S4	0,684b	0,355b	0,693a	0,670a	0,284a	0,338a
S8	0,666b	0,275a	0,666a	0,763b	0,380b	0,415b
^aF	8,33***	12,10**	1,35n.s	12,10**	10,11**	12,81**

Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ($P < 0.05$), $n=50$.

^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los diferentes parámetros de fluorescencia medidos. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 99% (**), o 95% (*). n.s: no significativo.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

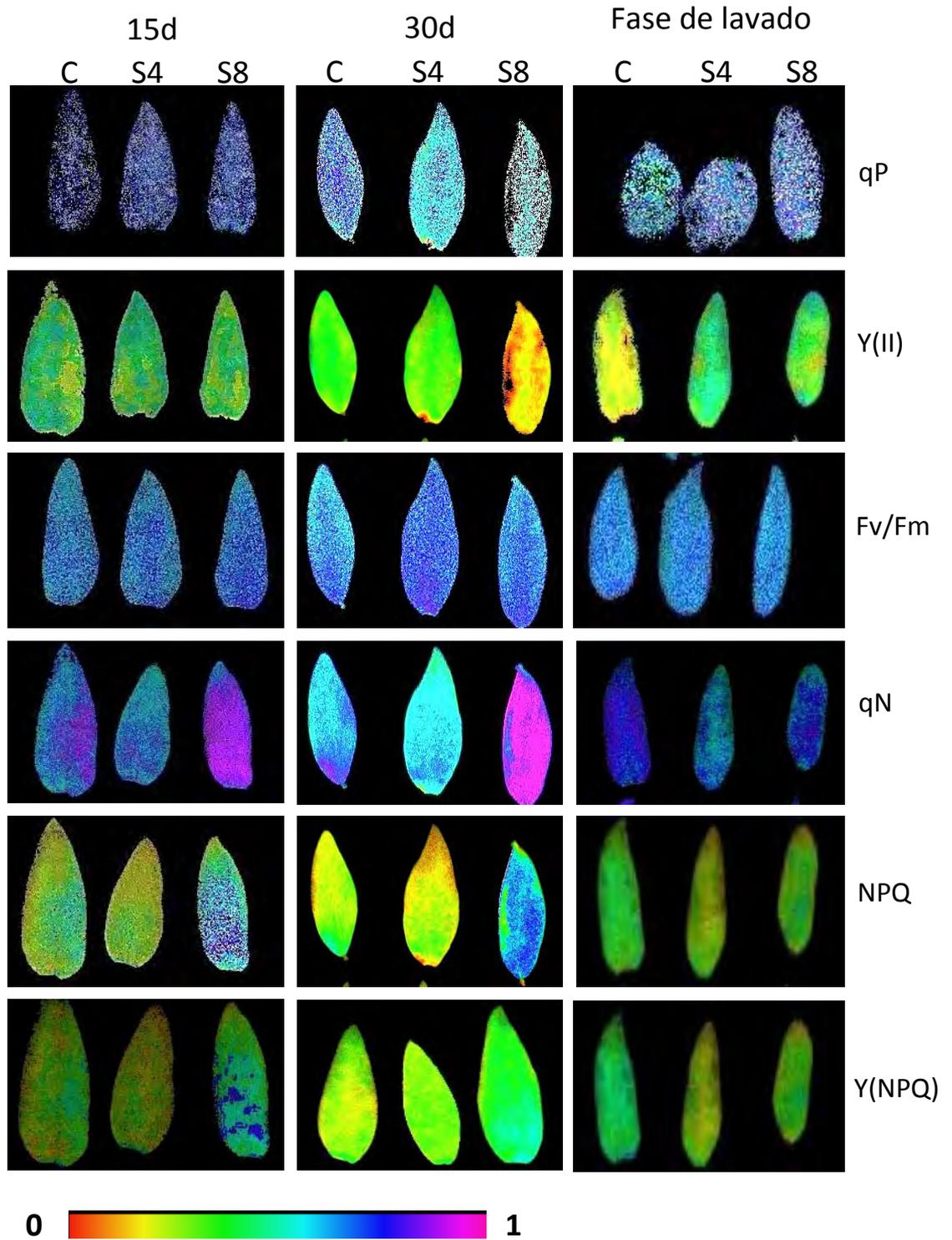


Figura 4.14.- Imágenes de diferentes parámetros de fluorescencia en hojas de plantas de *Myrtus communis* L. crecidas en ausencia y en presencia de diferentes niveles de NaCl (Control, S4 y S8) durante 15 y 30 días, así como al final de la fase de lavado.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

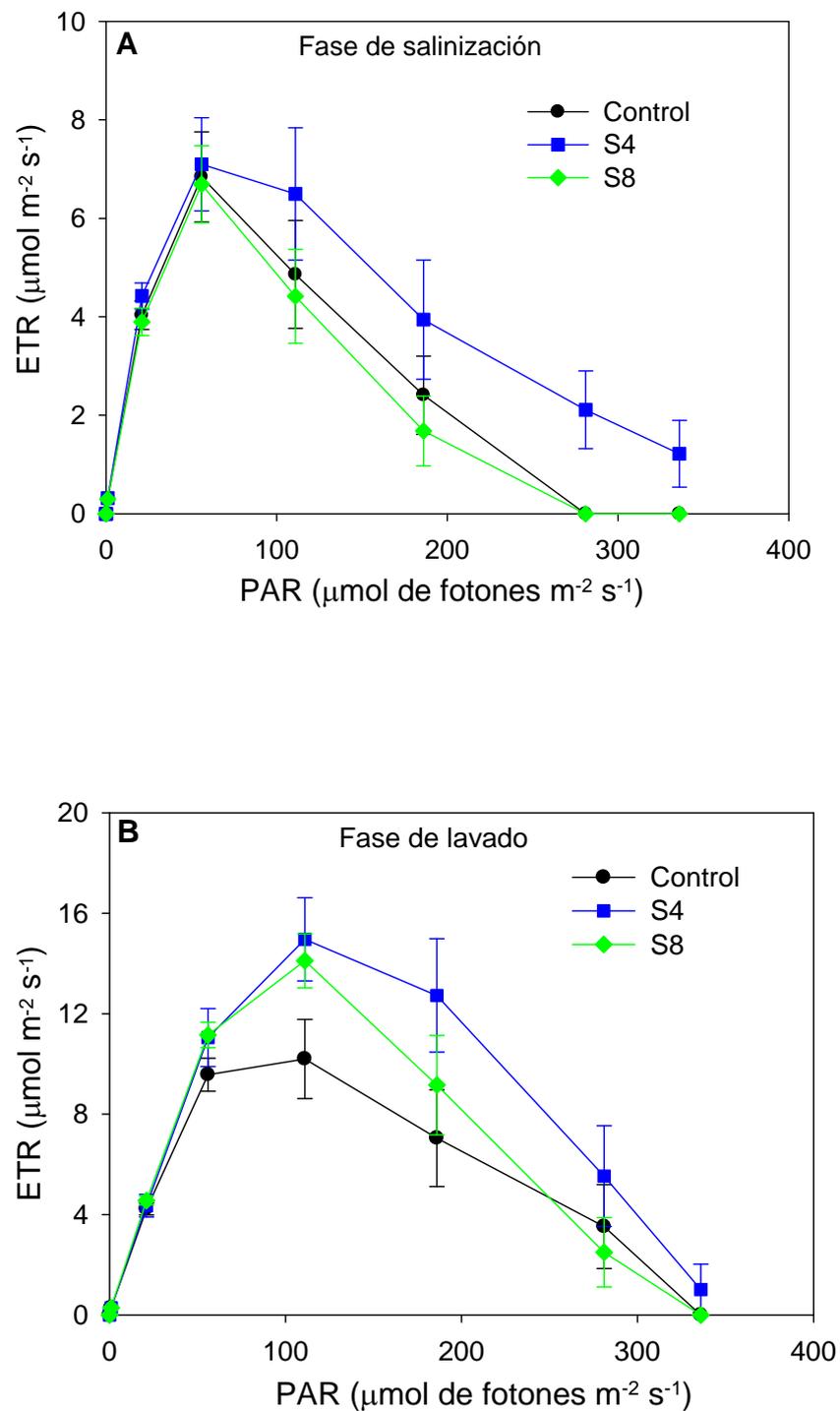


Figura 4.15.-Efecto de la salinidad sobre la tasa de transporte electrónico (ETR) en plantas de *Myrtus communis* L. crecidas en ausencia y en presencia de diferentes niveles de NaCl durante 30 días de estrés salino (Control, S4 y S8; A) y una vez finalizada la fase de lavado o de recuperación (Control, S4 y S8; B). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

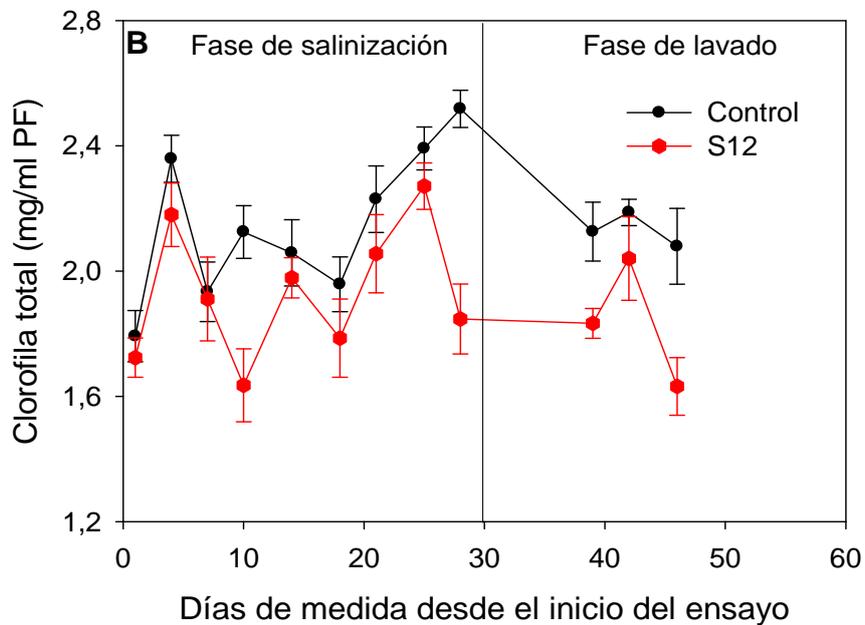
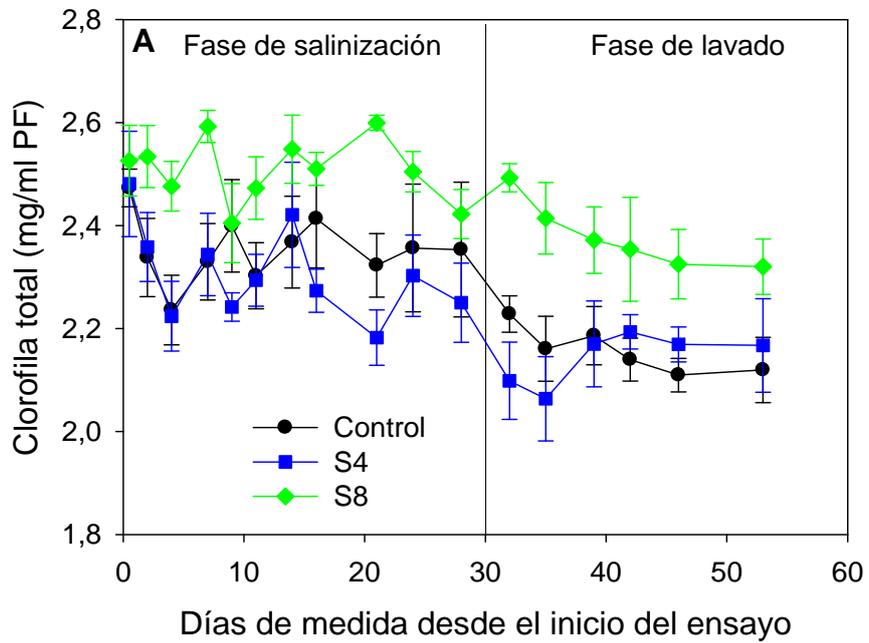


Figura 4.16.-Evolución a lo largo del ensayo de la síntesis de clorofilas en hojas en plantas de *Myrtus communis* L. (Control, S4 y S8; A) y (Control y S12; B). La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Las plantas de mirto crecen mejor en zonas sombreadas, no tolerando muy bien altas intensidades luminosas. En este sentido, se estudió el efecto de altas intensidades luminosas sobre los parámetros de fluorescencia de clorofilas. Para ello, un lote de plantas creció durante dos meses directamente en el laboratorio, con una baja intensidad luminosa (50 PAR), mientras que otro lote de plantas, creció durante el mismo tiempo en un invernadero (500-2000PAR) y se les sometió a un tratamiento de alta intensidad luminosa por incubación en el exterior a pleno sol durante 4 días. En estos ensayos, se analizaron tanto hojas apicales como hojas tomadas de la parte central de la planta (referidas como hojas basales). En primer lugar, es de destacar, que la incubación en el exterior provocó un aumento en la pigmentación de las hojas apicales, que prácticamente enmascaró a las clorofilas (ver Figura. 4.17). Uno de los resultados más llamativos fue que las plantas sometidas a estrés lumínico presentaron un descenso en el parámetro F_v/F_m , que fue de un 20% en las hojas apicales, con respecto a los valores encontrados en las hojas apicales de plantas sometidas a una baja intensidad luminosa (Tabla 4.8).

Sin embargo, las hojas basales de las plantas estresadas presentaron una mayor qP que el resto de hojas ensayadas. Sin embargo, en hojas apicales, la alta intensidad luminosa hizo que parámetros de *quenching* no fotoquímico se redujeran de forma significativa (Tabla 4.8).

Tabla 4.8.- Efecto de alta intensidad luminosa sobre algunos parámetros de fluorescencia de hojas de *Myrtus communis* L. Un lote de plantas permaneció en el laboratorio durante 2 meses (50 PAR), mientras que otro lote de plantas permaneció en el exterior a pleno sol durante 4 días, sometidas a una intensidad luminosa que oscilaba entre 500-2000 PAR.

Iluminación	Tipo de Hoja	qP	Y(II)	Fv/Fm	qN	NPQ	Y(NPQ)
50 PAR	Apical	0,434a	0,240a	0,712c	0,762c	0,392c	0,392c
	Basal	0,444a	0,246ab	0,716c	0,659b	0,280b	0,280b
Exterior	Apical	0,465a	0,249b	0,587a	0,620a	0,193a	0,194a
	Basal	0,639b	0,274b	0,659b	0,780c	0,409c	0,409c
^a F		32,46***	8,00***	41,13***	48,17***	71,03***	67,54***

Los datos representan los valores medios \pm el error estándar de al menos 50 medidas independientes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los distintos parámetros de fluorescencia estudiados. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9%. (99,9***).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

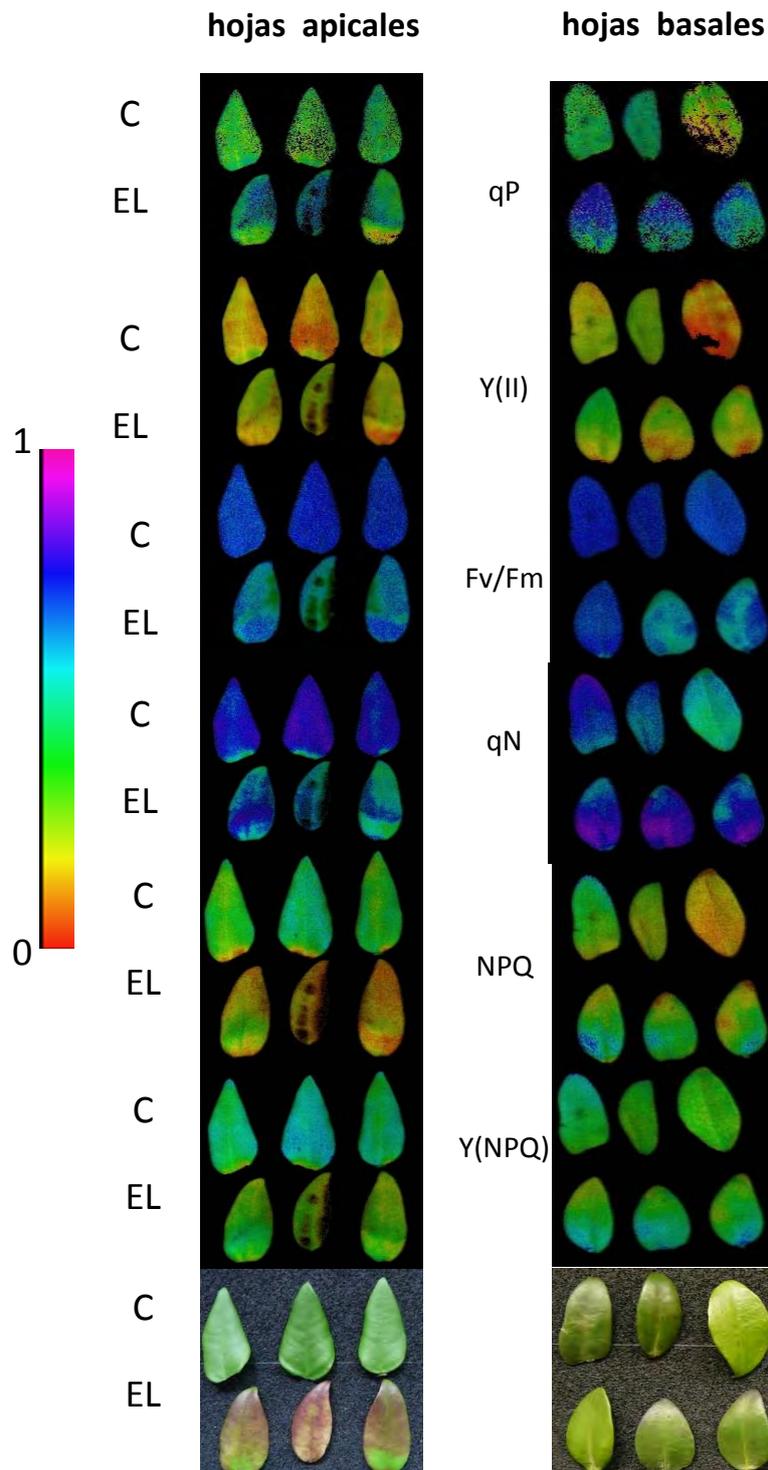


Figura. 4.17.- Imágenes de diferentes parámetros de fluorescencia en hojas apicales y basales de *Myrtus communis* L. sometidas a baja y alta intensidad luminosa (EL). En la parte inferior se muestran fotografías de las hojas apicales y basales donde se observa el aspecto de las hojas tras el estrés por alta intensidad luminosa.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

En este experimento también se determinó la tasa de transporte electrónico (ETR) tanto en plantas sometidas durante 4 días a una alta intensidad luminosa como en plantas sometidas a una baja intensidad luminosa. Los datos se tomaron tanto en hojas apicales (más expuestas a la iluminación) como en hojas basales (menos expuestas). Estas plantas presentaron valores máximos de ETR en intensidades comprendidas entre (56-111 PAR). Los datos mostraron que las hojas que presentaban un mayor valor de q_P (hojas basales de plantas sometidas a alta intensidad luminosa) eran las que presentaban también un mayor valor de ETR, tanto a intensidades de (56 PAR) como a (111 PAR), e incluso en intensidades mayores (186 PAR). Por el contrario, las hojas apicales de plantas sometidas a alta intensidad luminosa fueron las que menor valor de ETR mostraron (Figura. 4.18).

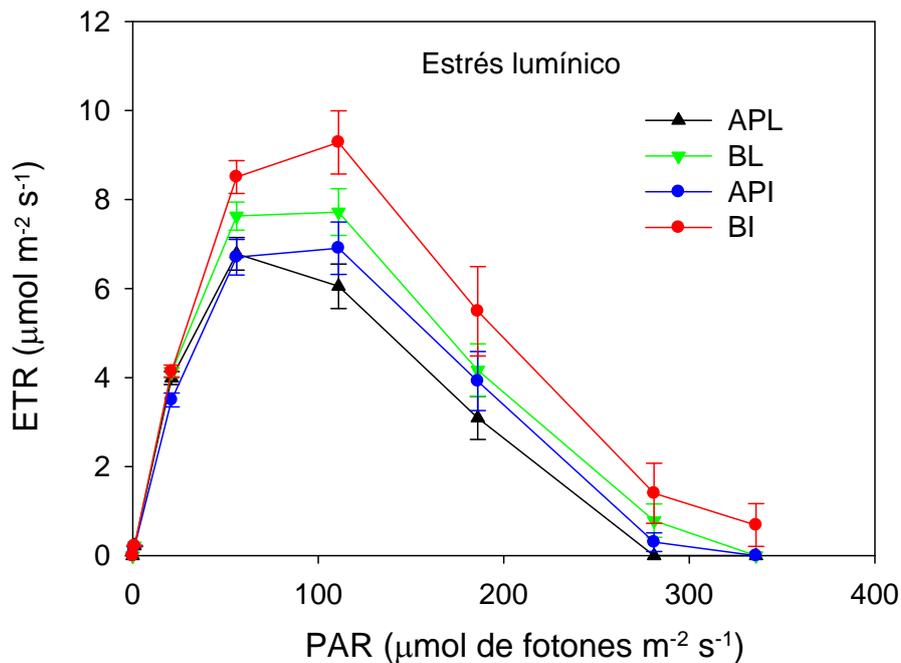


Figura 4.18.-Efecto de la salinidad sobre la tasa de transporte electrónico (ETR) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a diferentes intensidades de luz (APL: apicales laboratorio; BL: basales laboratorio; API: apicales invernadero; BI: basales invernadero). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

7.3.1.4.- Termografía

Los valores de la temperatura de las hojas de mirto no se modificaron durante la primera mitad del periodo de estrés. Los únicos cambios ocurrían en el día 19 y al final de dicho periodo, donde la temperatura se incrementó 0,6°C en hojas del tratamiento S4 y 0,65°C en hojas del tratamiento S8 (Figura 4.19). Estas diferencias también se apreciaron al principio de la fase de lavado y al final de la misma, en la que las hojas de las plantas S8 mostraron un aumento de la temperatura de 0,32°C.

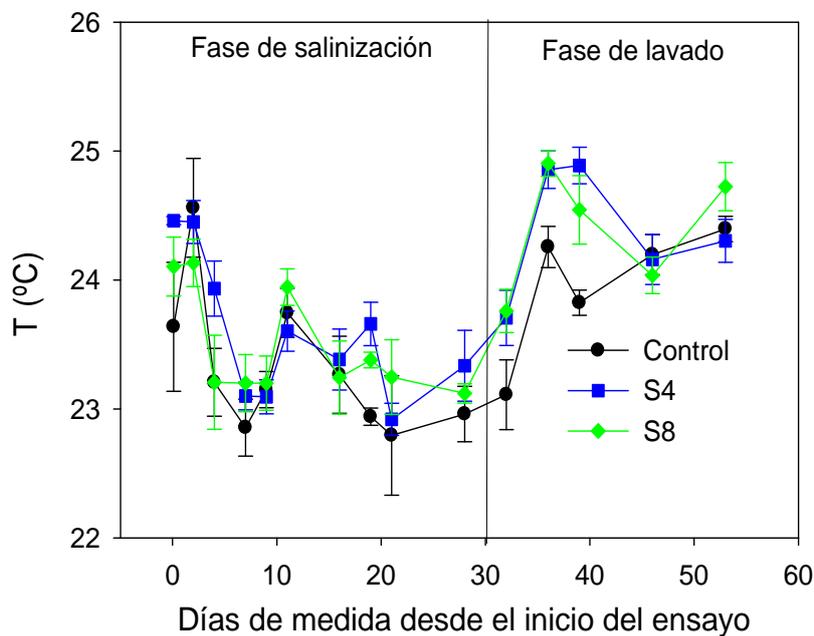


Figura 4.19.- Respuestas a la salinidad estimadas sobre la evolución en la temperatura foliar medida en plantas de *Myrtus communis* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes.

7.3.1.5.- Microscopía

Después de 30 días de tratamiento con los niveles de NaCl S4 y S8, las hojas de mirto experimentaron cambios en la estructura anatómica de sus hojas, que afectaban sobre todo al parénquima esponjoso y a los espacios intercelulares. Estos cambios sólo eran significativos con el tratamiento S8, que provocó un descenso en el porcentaje del parénquima esponjoso y un aumento en los espacios intercelulares, no afectando a la zona del parénquima empalizada (Tabla 4.9, Figura 4.20). En algunos cortes se observaban

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

grupos de células aisladas que se diferencian del resto por su morfología. Estas células se denominan idioblastos y están especializadas en la síntesis de diferentes compuestos que puede ser resinas, mucílagos, taninos, bálsamos, aceites, gomas e incluso sustancias cristalizables, que almacenan en el interior de la estructura (ver figura 4.20).

Tabla 4.9.- Respuesta a la salinidad estimadas sobre distintos parámetros relacionados con la anatomía de las hojas de plantas *Myrtus communis* L. al final de la fase de salinización.

Microscopía	Tratamientos			^a F
	Control	S4	S8	
Parénquima en empalizada	22,51±0,83	22,40±0,80	24,36±0,48	1,88 n.s
Parénquima esponjoso	49,57±1,38b	48,62±1,22b	42,35±1,29a	7,96**
Espacio intercelular	27,92±0,58a	28,99±0,89a	33,28±1,51b	7,06**

Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ($P < 0.05$). ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los parámetros parénquima en empalizada, parénquima en esponjoso y espacio intercelular. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99% (**) y n.s: no significativo.

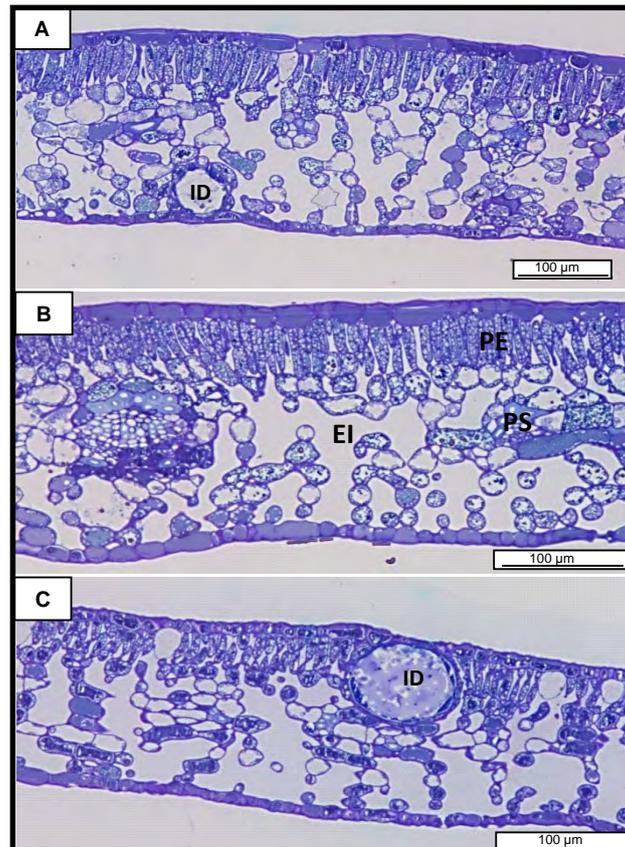


Figura 4.20.- Imágenes al microscopio óptico de campo claro de secciones semifinas de hojas de plantas de *Myrtus communis* L. teñidas con azul de toluidina al final de la fase de salinización (A: Control, B: S4, C: S8). PE, parénquima en empalizada; PS, parénquima esponjoso; EI, espacios intercelulares; ID, idioblastos.

7.3.1.6.- Metabolismo Antioxidativo

7.3.1.6.1.- Pérdida de electrolitos y peroxidación lipídica

La pérdida de electrolitos se analizó en plantas sometidas a estrés salino durante 15 y 30 días y al final de la fase de lavado. A los 15 días de estrés, los resultados mostraron que la salinidad no tenía efectos significativos sobre la pérdida de electrolitos en hoja. A los 30 días de estrés, se observó que los bajos niveles de salinidad no afectaban de forma significativa a este parámetro. Sin embargo, el tratamiento con 8 dS/m producía un aumento en la pérdida de electrolitos en hoja, lo que reflejaba un daño en membranas (Tabla 11). Curiosamente, se apreció un aumento significativo en la pérdida de electrolitos en plantas recuperadas del estrés salino, tanto en plantas previamente tratadas con 4 dS/m como en plantas tratadas con 8 dS/m (Tabla 11). De forma paralela, se analizó el efecto de la salinidad sobre la peroxidación de lípidos de membrana mediante reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA), por lo que realmente se determinan sustancias que reaccionan con el TBA (TBARS). Los datos obtenidos estaban bastante correlacionados con los correspondientes de pérdida de electrolitos. Así, a los 15 días de estrés, la salinidad no tenía efecto sobre la peroxidación de lípidos, mientras que a los 30 días, sólo el mayor nivel salino afectaba a este parámetro (Tabla 4.10), lo que corroboraba daños en las membranas. Finalizada la fase de lavado, al igual que lo obtenido en la pérdida de electrolitos, los valores de peroxidación lipídica eran mayores en las plantas que previamente se habían tratado con NaCl, pero las diferencias sólo fueron significativas para las plantas S8. Esto indicaba que, a pesar del periodo de lavado (recuperación), las plantas de mirto tratadas con una salinidad de 8 dS/m seguían presentando daños en membrana.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Tabla 4.10.- Efecto de diferentes niveles de salinidad sobre la pérdida de electrolitos y la peroxidación de lípidos de membranas de hojas de mirto después de 15 y 30 días de tratamientos y al final de la fase de lavado

Parámetros de estrés oxidativo	Pérdida Electrolitos (%)	Peroxidación de Lípidos (nmoles TBARS/g PF)
15 Días		
Control	29,70±1,25a	5,60±0,21a
S4	30,62±0,85a	6,20±0,43a
S8	30,47±0,77a	5,82±0,28a
^a F	1,53n.s	0,93n.s
30 Días		
Control	34,43±1,20a	5,97±0,14a
S4	36,27±0,54a	5,95±0,20a
S8	39,73±0,97b	7,51±0,55b
^a F	8,07**	6,55*
Fase de lavado		
Control	28,04±1,70a	7,14±0,45a
S4	37,10±1,22b	7,67±0,49ab
S8	41,54±2,20b	8,65±0,15b
^a F	15,39***	6,63*

*Los datos representan los valores medios ± el error estándar de al menos 4 muestras diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan ($p < 0.05$). ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los parámetros de pérdida de electrolitos y peroxidación lipídica. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 99% (**), o 95% (*). ns: no significativo.*

7.3.1.6.2.- Detección de ROS por técnicas histoquímicas

La tinción histoquímica con DAB, para detectar acumulación de H₂O₂, dio lugar a una débil tinción en las venas principales tanto en plantas control como en plantas tratadas con 4 dS/m (Figura 4.21A, 4.21B). Esta tinción era un poco más intensa en plantas tratadas con el mayor nivel de salinidad (Figura 4.21 C). La tinción parecía ser debida al H₂O₂, ya que era totalmente eliminada en presencia de ascorbato (Figura 4.22 D). Las hojas de mirto también se incubaron en presencia de NBT, con el fin de detectar acumulación de radicales superóxido. Sin embargo, en plantas estresadas durante 15 días no se pudo observar tinción con NBT (Figura 4.22).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

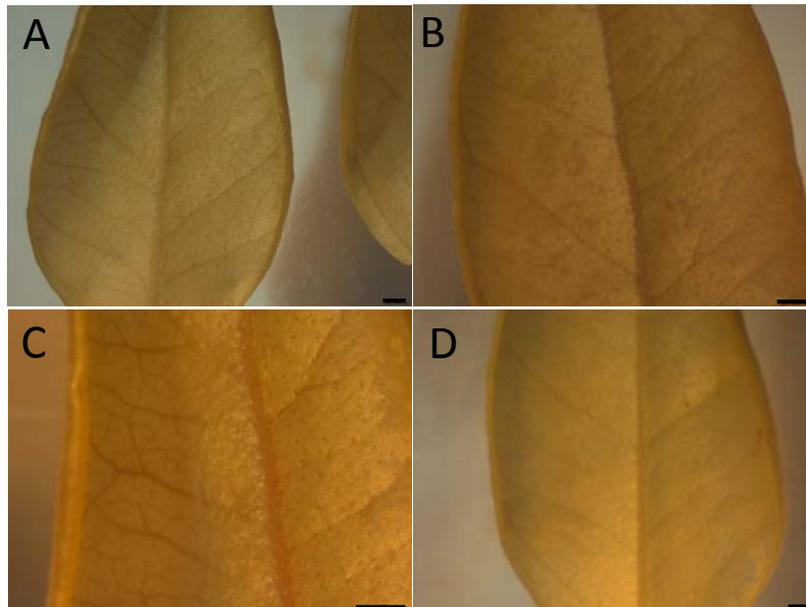


Figura 4.21.- Efecto de la salinidad en la acumulación de H_2O_2 en hojas de *Myrtus communis* L. después de 15 días de tratamiento. El H_2O_2 se detectó mediante tinción histoquímica con DAB. A, control; B, 4 dS/m; C, 8 dS/m; D, control con ascorbato. Barra: 1 mm.

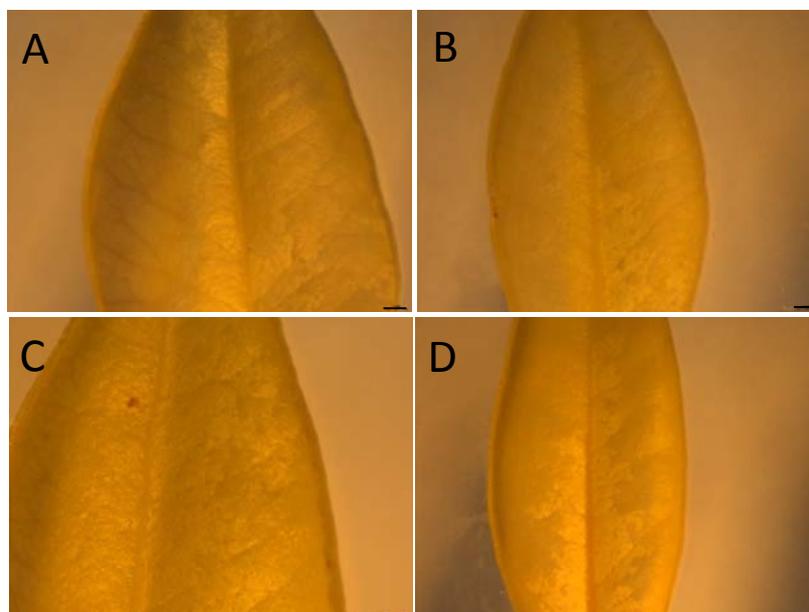


Figura 4.22.- Efecto de la salinidad en la acumulación de radicales superóxido en hojas de *Myrtus communis* L. después de 15 días de tratamiento. Los radicales superóxido se detectaron mediante tinción histoquímica con NBT. A, control; B, 4 dS/m; C, 8 dS/m; D, control con ascorbato. Barra: 1 mm.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

A los 30 días de estrés, la tinción con DAB puso de manifiesto una acumulación de H_2O_2 en las venas principales, que era más intensa con el aumento del estrés salino (Figura 4.23). En hojas de plantas tratadas con 8 dS/m se observó la tinción de unas zonas circulares con DAB, lo que ponía de manifiesto la acumulación de H_2O_2 en dichas zonas (Figura 4.23D). Sin embargo, se desconoce qué función podrían cumplir estas zonas circulares y a qué podría ser debido esta acumulación de H_2O_2 . Con respecto a la incubación de hojas de mirto con NBT, se apreció una débil tinción en las venas principales, que parecía ser más intensa con el nivel de salinidad (Figura.4.24).

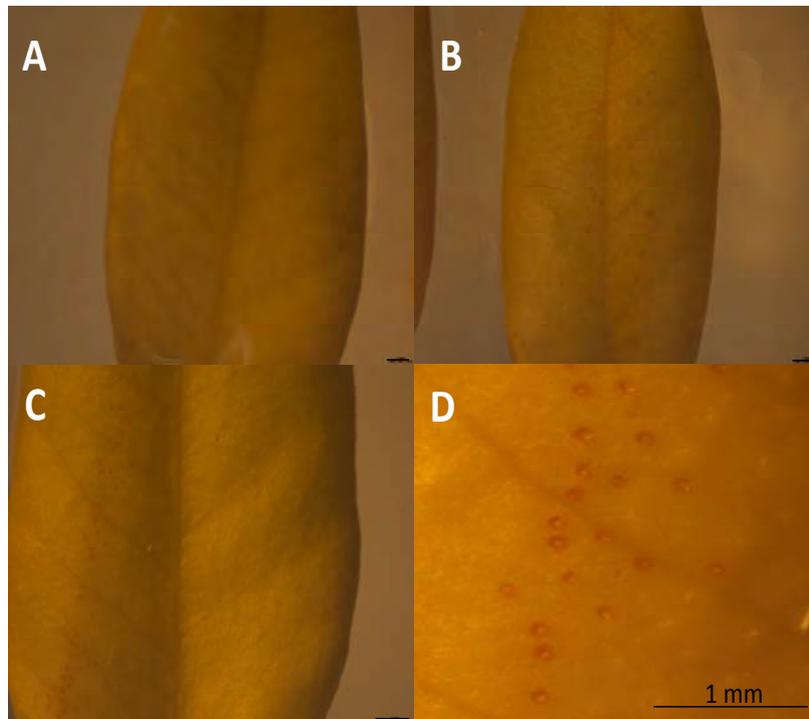


Figura 4.23.- Efecto de la salinidad en la acumulación de H_2O_2 en hojas de *Myrtus communis* L. después de 30 días de tratamiento. El H_2O_2 se detectó mediante tinción histoquímica con DAB. A, control; B, 4 dS/m; C, 8 dS/m; D, detalle de C mostrando las estructuras redondeadas teñidas. Barra: 1 mm.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

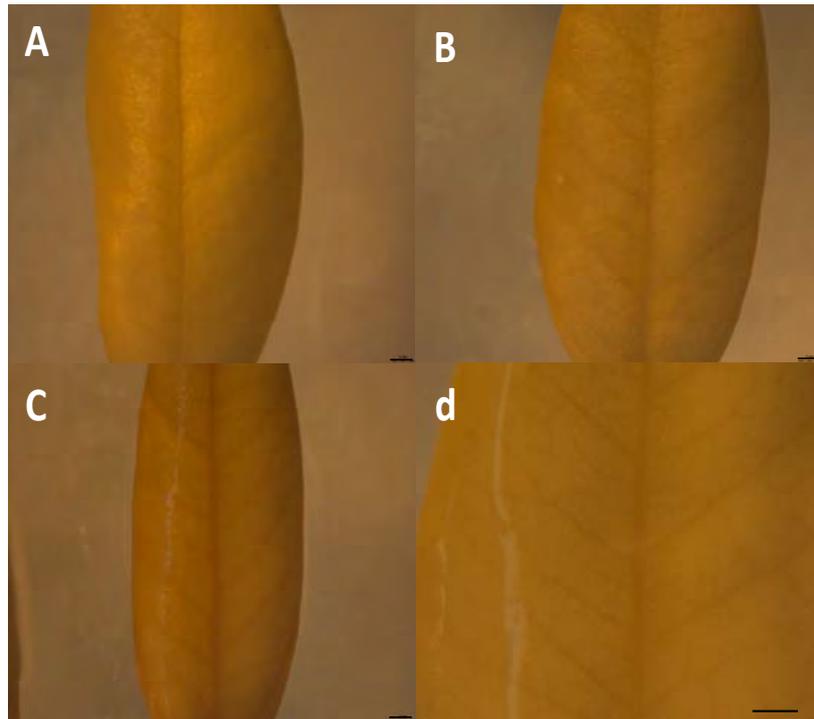


Figura 4.24.- Efecto de la salinidad en la acumulación de radicales superóxido en hojas de *Myrtus communis* L. después de 30 días de tratamiento. Los radicales superóxido se detectaron mediante tinción histoquímica con NBT. A, control; B, 4 dS/m; C, 8 dS/m; D, detalle de una hoja tratada con 8 dS/m para mostrar acumulación de radicales superóxido en las venas principales. Barra: 1 mm.

7.3.1.6.3.- Enzimas antioxidantes

Al mismo tiempo, se analizó el efecto de la salinidad sobre la actividad de algunas enzimas antioxidantes después de 15 y 30 días de tratamiento salino, así como en plantas después de la recuperación (Tabla 4.11). En primer lugar, es de destacar la dificultad para analizar dichas enzimas, al menos en este sistema experimental, en el que las plantas tenían una edad de un mes cuando se empezaron a someter al tratamiento salino. Igualmente, hay que destacar que las hojas empleadas en los análisis presentaban niveles muy bajos de proteínas, los cuales fueron muy difíciles de detectar con el reactivo de Bradford. Por este motivo, los datos se presentan en base a peso fresco. Por otro lado, algunas de las enzimas antioxidantes no se pudieron detectar, como las actividades peroxidasa (POX) o deshidroascorbato-reductasa (DHAR).

A los 15 días de estrés, el nivel más bajo de salinidad provocó un descenso de la actividad catalasa y un aumento de la actividad GR. Sin

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

embargo, el tratamiento con 8 dS/m producía un descenso de las enzima catalasa y APX (encargadas de la eliminación del H_2O_2) y de la actividad SOD (enzima responsable de la eliminación de radicales $O_2^{\cdot-}$) así como un aumento de la actividad GR (Tabla 4.11). A los 30 días de estrés, los cambios más notables producidos por la salinidad fueron un aumento de 2 veces la actividad catalasa y un descenso de la actividad APX (un 60%) en plantas tratadas con el nivel de salinidad 4 dS/m. El riego con el nivel de salinidad 8 dS/m disminuyó las actividades APX (un 60%) y SOD (un 30%), pero estimulaba la actividad MDHAR (Tabla 4.11).

La ausencia de actividad POX soluble a los 15 días de estrés en plantas de mirto llevó a adoptar una estrategia diferente en las plantas sometidas a estrés durante 30 días. El hecho de no haber detectado actividad POX podría haber sido debido a que ésta podría estar fuertemente unida a la pared celular. Por ello, se sometió el precipitado obtenido, tras las extracciones para analizar la actividad de las enzimas antioxidantes, a una nueva extracción con un tampón con mayor fuerza iónica. En este sentido, se añadió 1 ml de tampón Tris-Acetato 50 mM conteniendo 0,2 M KCl a los precipitados de cada muestra obtenida para la medida de enzimas antioxidantes. Este precipitado se sometió a agitación intensa con un vortex e fue incubado durante una hora en baño de hielo, sometidos a agitación cada 10 minutos. A continuación, se centrifugaron durante 15 minutos a 12.000 rpm y se recuperó el sobrenadante, que se sometió a diálisis mediante filtración por columnas de Sephadex NAP-10. Estas muestras se emplearon para la determinación de actividad POX unida a pared celular. Sin embargo, los resultados fueron de nuevo negativos, no pudiendo detectar la actividad POX. Probablemente, hubiera sido necesaria una extracción con una mayor fuerza iónica.

Tras los 30 días de recuperación, se volvió a analizar la actividad de las enzimas antioxidantes previamente analizadas tras los periodos de estrés. Globalmente, y excepto la actividad catalasa, los valores obtenidos fueron menores a los observados a los 15 y 30 días de estrés salino. Incluso, la actividad GR no fue detectada. Las plantas recuperadas, que previamente habían sido tratadas con 4 dS/m, presentaban un aumento de unas 3 veces de actividad catalasa, así como un descenso de un 35% en la actividad APX, respecto a los controles (Tabla 4.11). En las plantas recuperadas del estrés de 8 dS/m también se observó un aumento de un 62% en la actividad catalasa y un descenso de un 54% de la actividad APX (Tabla 4.11). Respecto a las

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

actividades MDHAR y SOD, no se observaron diferencias significativas, si bien los niveles de actividad MDHAR eran ligeramente mayores en plantas recuperadas del estrés de 8 dS/m que en plantas recuperadas del tratamiento con menor salinidad (Tabla 4.11).

Tabla 4.11.- Efecto de la salinidad en la actividad de enzimas antioxidantes de hojas de *Mirto communis* L. después de 15 y 30 días de tratamiento y al final de la fase de lavado

Enzimas antioxidantes	CAT $\mu\text{mol min}^{-1}/\text{gPF}$	APX $\text{nmol min}^{-1}/\text{gPF}$	MDHAR $\text{nmol min}^{-1}/\text{gPF}$	GR $\text{nmol min}^{-1}/\text{gPF}$	SOD U/gPF
15 Días					
Control	462,2±6,8b	90,0±2,7b	180,0±18,7a	28,4±1,7a	35,5±1,2b
S4	363,6±10,5a	88,0±4,3b	140,1±5,7a	43,8±3,1c	36,4±4,6b
S8	370,3±16,8a	76,1±1,9a	134,0±13,1a	36,2±2,5b	26,1±1,6a
^a F	31,49***	8,97*	2,96n.s	10,78**	3,88*
30 Días					
Control	306,4±10,5a	29,8±2,4b	171,2±22,0a	20,7±3,4a	25,5±1,8b
S4	628,6±14,5b	11,4±0,7a	186,9±9,3a	29,0±6,1a	25,3±2,2b
S8	321,2±24,5a	11,3±1,4a	239,9±6,2b	31,9±3,6a	17,9±1,0a
^a F	81,01***	36,24***	7,22**	1,65n.s	6,53*
Fase de lavado					
Control	402,2±91,2a	12,9±0,9c	8,6±0,5b	nd	12,6±2,9a
S4	1247,5±63,7c	8,4±0,6b	7,5±0,6a	nd	10,5±0,4a
S8	654,1±54,1b	5,9±0,6a	7,8±0,8ab	nd	13,8±0,8a
^a F	36,96***	23,28***	3,18*		1,04n.s

Los datos reflejan la media de al menos tres muestras biológicas diferentes. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ($P < 0.05$). nd, no detectado.

^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para las diferentes enzimas medidas. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 99% (**), o 95% (*). n.s: no significativo.

Junto con los mecanismos antioxidantes enzimáticos, se intentó estudiar el efecto de la salinidad sobre los antioxidantes no enzimáticos ascorbato y glutatión. Sin embargo, no se pudieron detectar con los métodos de análisis empleados, probablemente por hallarse en muy baja concentración en las hojas de mirto.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

7.4.- Discusión

7.4.1.- *Myrtus communis* L.

Las plantas de mirto están consideradas como especies moderadamente tolerantes a niveles de 1,5 g/l de NaCl (equivalente a unos 25 mM de NaCl) (Cassaniti *et al.*, 2012). Sin embargo, en el presente estudio se emplearon concentraciones de NaCl mayores de 25 mM. La salinidad, a bajas concentraciones, no afectó de forma significativa al crecimiento de las plantas de mirto, e incluso se producía una estimulación del mismo en presencia de bajos niveles de NaCl (S4). Una respuesta común en plantas tratadas con los niveles S4 y S8 fue el aumento del peso seco de la raíz. Esto hizo aumentar el cociente peso seco raíz/parte aérea que es un parámetro que valora la adaptación que presentan las plantas para absorber más agua y nutrientes y minimizar el efecto negativo de las sales en el crecimiento de la parte aérea (Marschner, 1995). En general, en presencia de sales, el crecimiento de la parte aérea se afecta más que el de las raíces (Termaat y Munns, 1986), si bien la elongación de las raíces puede verse afectada por la aplicación de altas concentraciones de NaCl junto con un descenso de los niveles de Ca^{2+} (Cramer *et al.*, 1988), tal y como ocurre en plantas regadas con el mayor nivel de NaCl (12 dS/m). Estos resultados demuestran que las plantas de mirto pueden tolerar concentraciones de NaCl superiores a 25 mM, al menos en las presentes condiciones experimentales, por lo que se pueden considerar como tolerantes al NaCl.

La tolerancia de ciertas plantas ornamentales a la salinidad se ha descrito que está relacionada con una efectiva restricción del transporte de Na^+ y Cl^- a la parte aérea, así como con una retención de iones tóxicos en las raíces (Cassaniti *et al.*, 2009). Este mecanismo de acumulación de Na^+ y Cl^- en raíces, así como, una limitación de su transporte a las hojas se observó en las plantas de mirto, sobre todo para el Na^+ . Este comportamiento hace que los niveles de Na^+ y Cl^- no sean muy altos en las hojas, lo que permite el crecimiento de las plantas a concentraciones elevadas de NaCl. Después de la fase de lavado los contenidos de Na^+ y Cl^- no disminuyeron en ninguno de los órganos estudiados de las plantas previamente regadas con los tratamientos S4 y S8. Sin embargo, en las plantas regadas con S12 tanto el Na^+ como el Cl^- disminuyeron en raíces, probablemente debido a las condiciones de lavado aplicadas.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

La reducción en el crecimiento también puede producirse por la inhibición de la absorción de nutrientes, su transporte y su utilización por la planta. Por esta razón, el ión Cl^- puede actuar inhibiendo la absorción de NO_3^- , mientras que el Na^+ puede inhibir la absorción de otros cationes como el K^+ , Mg^{2+} o el Ca^{2+} (Marschner, 1995). En plantas de mirto los niveles más bajos de NaCl no afectaron a los contenidos de K^+ ni de Ca^{2+} durante la fase de salinización. Sin embargo, el nivel más elevado de NaCl (S12) sí redujo los niveles de K^+ en la parte aérea pero no afectó a los niveles de Ca^{2+} . Es conocida la importancia del Ca^{2+} en respuesta a la salinidad (La Haye y Epstein, 1971) y un efecto similar se ha descrito en algunas especies del género *Citrus* (Bañuls *et al.*, 1991) o en plantas de níspero y membrillero (Hernández *et al.*, 2003), donde la adición de Ca^{2+} al agua de riego redujo los contenidos de Na^+ y Cl^- en hojas. El Na^+ puede desplazar al Ca^{2+} en sus sitios de unión a las membranas de las células de raíz (Lynch *et al.*, 1987), afectando a la homeostasis del Ca^{2+} y a su función como segundo mensajero (Rengel, 1992).

Otros mecanismos son los que están relacionados con el mantenimiento del estado hídrico de las plantas. A concentraciones elevadas de sales se ha puesto de manifiesto la dificultad que presentan las plantas para tomar agua desde el sustrato (Navarro *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2012). Esto coincide con las respuestas observadas en las plantas de mirto, conforme aumentaban los niveles de salinidad aplicados se producían descensos en el potencial hídrico foliar (Ψ_h). Otro mecanismo que presentan las plantas para protegerse de las altas concentraciones de sales y que ayuda al mantenimiento de la turgencia celular de los tejidos es el ajuste osmótico observado sobre todo en los tratamientos regados con el mayor nivel de salinidad (S12). A pesar de las bajas concentraciones de los iones fitotóxicos presentes en las hojas, estos deben compartimentalizarse en el interior de las vacuolas, lo que dará lugar a una reducción del Ψ_{os} (Koyro, 2006). Este comportamiento de los iones fitotóxicos como osmolitos coincide con otros ensayos llevados a cabo en otras plantas de interés en paisajismo (Sánchez-Blanco *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2007, 2008). El ajuste osmótico observado en las plantas de mirto S12 también está provocado por un incremento en la síntesis del aminoácido L-prolina. Este aminoácido actuaría como un soluto osmocompatible (Ashraf y Foolad, 2007; Planchet *et al.*, 2014) que protegería al citoplasma como respuesta a la salinidad. (Munns, 2002).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

La salinidad provocaba un descenso en la fotosíntesis neta en mirto, sobre todo en las plantas tratadas con los mayores niveles de salinidad. El efecto negativo de la salinidad sobre la fotosíntesis de plantas de mirto también fue descrito previamente por (Tattini, 2006). Estos datos eran similares a los obtenidos en este trabajo. Sin embargo, estos autores emplearon condiciones diferentes a las descritas en este capítulo: una mayor concentración de NaCl (200 mM) y un mayor tiempo de tratamiento (2 meses). El efecto negativo de la salinidad sobre P_n también quedó patente en otra especie arbustiva, el lentisco, si bien presentaba un mejor comportamiento que el mirto.

A los 15 días de estrés, no se observa una correlación entre los datos de P_n y los parámetros de fluorescencia. Los parámetros de *quenching* fotoquímico aumentaban en mirto para ambos tratamientos, mientras que los valores de *quenching* no fotoquímico (NPQ, Y(NPQ)) aumentaron en plantas tratadas con la mayor salinidad. Estos datos sugerían una protección del aparato fotosintético con el fin de evitar daños fotooxidativos.

A los 30 días de estrés, el ligero descenso de P_n observado en plantas S4 estaba correlacionado con la disminución de qP y de Y(II), parámetros que hacen referencia a la eficiencia del PSII. La reducción en P_n puede ser vista como una estrategia para reducir la formación de ROS (Rizhski *et al.*, 2002), ya que los cloroplastos son una fuente de generación de ROS en condiciones de estrés salino (Hernández *et al.*, 1995; Gómez *et al.*, 1999). En estas condiciones, el cloroplasto aumenta la producción de radicales superóxido, los cuales dismutan a H_2O_2 , favoreciendo la inhibición de algunas enzimas del ciclo de Calvin (Foyer *et al.*, 1992). A los 30 días de estrés, tanto las plantas S4 como las S8 presentan bajos niveles de actividad APX. Si bien se ha analizado la actividad APX total, cabe esperar también un descenso de la actividad APX en cloroplastos, por lo que una de las principales defensas contra el H_2O_2 cloroplastídico se encuentra debilitada, lo que podría explicar, al menos parcialmente, el descenso de P_n . En respuesta a este problema, las plantas S4 y S8 ponen en marcha mecanismos de respuesta adaptativos a la salinidad, sobre todo las plantas S8. Por un lado aumentan los mecanismos de disipación del exceso de poder reductor en la cadena de transporte fotosintética, y por otro se producen cambios anatómicos en la hoja. Estos cambios, que incluían disminución del parénquima esponjoso y aumento de los espacios intercelulares, parecen estar encaminados a reducir la resistencia de la llegada del CO_2 al parénquima en empalizada, zona que concentra la mayor parte de

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

los cloroplastos. Por otro lado, las plantas S4, mantienen los valores de los parámetros de *quenching* no fotoquímico e incrementan la actividad de la enzima catalasa. Se ha descrito una correlación entre los niveles de actividad catalasa y la tasa de fotosíntesis, de modo que el aumento de esta enzima reduce la pérdida del CO₂ fotorrespiratorio (Brisson *et al.*, 1998).

En la fase de lavado, se producía una recuperación parcial de P_n, sobre todo en plantas S4. Esta falta de recuperación podría ser también debida a que los valores de g_s eran muy bajos, como ocurre en plantas S8. Las plantas de mirto activan mecanismos de defensa para evitar una fotooxidación y para una disipación efectiva del exceso de energía luminosa en condiciones de estrés, dependiendo del nivel salino usado. Al igual que ocurría a los 30 días de estrés, en esta fase de lavado se sigue observando un descenso en la actividad APX, pero en cambio, la actividad catalasa, como se mencionó anteriormente, aumenta en ambos casos, sobre todo en plantas S4, que se correlaciona con un mejor valor de P_n que en plantas S8.

En plantas de mirto sometidas a una alta intensidad luminosa los parámetros de fluorescencia respondían de forma diferente dependiendo de la posición de las hojas en la planta. En este sentido, las hojas apicales presentaban un descenso en F_v/F_m, indicativo de un estado de fotoinhibición, y de los parámetros de *quenching* no fotoquímico. Esta disminución indicaba una menor capacidad de disipación del exceso de energía luminosa en forma de calor, lo que favorece la generación de ROS en el cloroplasto por la cesión de esta energía al oxígeno. La respuesta en las hojas basales fue algo diferente, ya que si bien presentaban una disminución en F_v/F_m, menor a la mostrada por las hojas apicales, se observaron mayores valores de qP y de los parámetros de *quenching* no fotoquímico.

Esta respuesta les asegura una disipación del exceso de energía de excitación de forma controlada, al menos durante el periodo de estrés por alta intensidad llevado a cabo en este experimento. El efecto de alta intensidad luminosa sobre la fotosíntesis y el parámetro F_v/F_m fue descrito previamente por (Tattini, 2006) en plantas de mirto y lentisco. En este caso, las plantas crecieron con una intensidad luminosa de un 20% o un 100% de luz solar durante un periodo de 8 semanas, en ausencia y en presencia de 200 mM NaCl. Si bien en los experimentos no se han analizado parámetros de estrés oxidativo, los datos observados en la fluorescencia de clorofilas permiten sugerir igualmente que en estas condiciones de exceso de intensidad luminosa

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

se produce un daño al aparato fotosintético que va a dar lugar a una mayor generación de ROS en el cloroplasto, y, por consiguiente, un estrés oxidativo. Estos datos se complementan con el hecho de que las plantas de mirto presentan una ETR máxima a una intensidad luminosa de aproximadamente 100 PAR, siendo prácticamente de cero para intensidades de 300-350 PAR. Algunos estudios utilizan el descenso en los valores en la eficiencia máxima del PS II en hojas adaptadas a la oscuridad (F_v/F_m) como un aceptable diagnóstico de fotoinhibición en respuesta a diferentes estreses. Se ha sugerido que valores por debajo de 0,83 normalmente se asocian con plantas estresadas (Maxwell y Johnson, 2000). Sin embargo, otros investigadores sugieren que las plantas no deben de considerarse estresadas hasta que se alcancen valores mucho más bajos del parámetro F_v/F_m (Colom y Vazzana, 2003; Percival *et al.*, 2006; Bacelar *et al.*, 2007). En este sentido, en plantas de guisante, altas intensidades luminosas de $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provocaban una fotoinhibición reflejada en un fuerte descenso de F_v/F_m hasta valores de aproximadamente 0,5 (Hernández *et al.*, 2006). Resultados similares se describieron con la incubación de hojas de guisante cortadas, sometidas a un estrés lumínico de $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Hernández *et al.*, 2004).

Los tratamientos salinos utilizados no producían daños en membrana a corto plazo, tal y como reflejan los datos de parámetros de estrés oxidativo, lo que sugería que a corto plazo, las plantas de mirto eran tolerantes al tratamiento salino. Sin embargo, al final del periodo de estrés, las plantas de mirto tratadas con el nivel 8 dS/m presentaron un aumento de los valores de pérdida de electrolitos y de TBARS, lo que sugería el establecimiento de un estrés oxidativo bajo dichas condiciones, de forma similar a lo descrito en otras especies vegetales. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por otros autores en condiciones de estrés salino, tanto en plantas herbáceas, como en leñosas o en cultivos *in vitro* (Hernández y Almansa, 2002; Hernández *et al.*, 2003; Diaz-Vivancos *et al.*, 2013).

Estos daños en membrana se hicieron evidentes en la fase de lavado, incluso en plantas que se habían tratado previamente con el menor nivel salino, ya que dichas plantas presentaron un mayor valor de pérdida de electrolitos que los controles. Las plantas tratadas con el nivel salino S8 presentaron un mayor valor tanto de pérdida de electrolitos como de TBARS, marcadores de estrés oxidativo. Esta respuesta podría ser debida a que el nivel de 8 dS/m produjese daños irreversibles en las plantas o bien a que estas plantas, una

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

vez adaptadas al crecimiento con la concentración más elevada de sal, pudieran detectar el riego con agua de buena calidad (condiciones controles) como una nueva situación de estrés, al menos durante el periodo de recuperación estudiado. Probablemente, las plantas de mirto necesiten más de un mes de recuperación para poder volver a comportarse como plantas controles. Esta respuesta también se ha descrito en plantas herbáceas (Hernández y Almansa, 2002). Estas nuevas condiciones de riego podrían ser percibidas por la planta como una situación de estrés hipo-osmótico, como también se describió en células de tabaco (Cazalé *et al.*, 1998).

Un resultado destacable observado en hojas de mirto fue la ausencia de la actividad DHAR, una de las enzimas encargada del reciclaje del ascorbato, lo que sugiere que estas plantas reducen el ascorbato vía NADH y no vía GSH.

A corto plazo, la salinidad producía un descenso de la actividad catalasa en ambos tratamientos, y de APX y SOD en S8, lo que sugiere que el metabolismo antioxidativo de las planta de mirto aún no se había adaptado a la nueva situación de crecimiento, pero le ha permitido evitar daños en membrana, tal y como se observa en los datos de los parámetros de estrés oxidativo. A los 30 días de estrés, las plantas S4 aumentaron los valores de actividad catalasa y mantenían los niveles de SOD y GR, mientras que las plantas S8 mantenían los niveles de actividad catalasa pero su actividad SOD disminuía. En ambos casos, la actividad APX se redujo por efecto del estrés salino, siendo una de las enzimas más afectada por la salinidad. El aumento y/o mantenimiento de la actividad catalasa sugería una respuesta adaptativa de las plantas de mirto al estrés salino, ya que esta enzima normalmente se reduce en respuesta a salinidad, tal y como se ha descrito en especies sensibles, como guisante oníspero (Corpas *et al.*, 1993; Hernández *et al.*, 2003). Sin embargo, cultivares de algodón y de tomate tolerantes a salinidad contienen altos niveles de actividad catalasa (Gosset *et al.*, 1994; Shalata y Tal, 1998). La respuesta de la actividad APX a condiciones salinas es dependiente de la especie vegetal y del nivel salino empleado. En un trabajo reciente, han observado un aumento de actividad APX en un cultivar de arroz sensible a 100 mM NaCl, mientras que el cultivar resistente no mostró variaciones (Lee *et al.*, 2013). En cultivares de guisante susceptibles a salinidad, los niveles de APX disminuyen por efecto del estrés salino tanto en hoja como en fracciones subcelulares, como el cloroplasto (Hernández *et al.*, 1995). Sin embargo, en cultivares de guisante tolerantes a salinidad, la actividad APX se incrementó

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

en mitocondrias, cloroplastos y en citosol (Gómez *et al.*, 1999, Hernández *et al.*, 2000). El descenso de la actividad APX también se ha descrito por efecto del NaCl en especies leñosas como el níspero (Hernández *et al.*, 2003).

Los datos de las actividades antioxidantes contrastan con los observados en plantas de mirto regadas con aguas recicladas (ARD1, ARD2 y ARD3) durante 4 meses (ver capítulo 2), en las que las plantas de mirto presentaron valores menores de actividad catalasa y GR y un mayor nivel de actividad APX que los registrados en el presente estudio. Además, en esas plantas se pudo detectar actividad POX. Las diferencias halladas podrían ser debidas al diferente estado fisiológico de las plantas en uno y otro caso, ya que las plantas tratadas con aguas regeneradas tenían una edad de 5 meses al final del periodo de estrés frente a los dos meses que tenían las plantas de mirto después de los 30 días de estrés por NaCl.

Uno de los resultados más destacables en plantas recuperadas, con respecto a las enzimas antioxidantes, fue el fuerte aumento de la actividad catalasa, sobre todo en plantas S4. La mayor actividad catalasa en todos los periodos sugiere una activación del proceso fotorrespiratorio. Durante la fotorrespiración tiene lugar una elevada producción de H₂O₂ en el peroxisoma por acción de la glicolato oxidasa (Siedow y Day, 2000). La fotorrespiración tiene una función de válvula de escape ya que permite el reciclaje de moléculas aceptoras de electrones para la cadena de transporte electrónico fotosintética. En este sentido, durante el proceso fotorrespiratorio se generan ADP y NAD(P)⁺, y además de libera CO₂ y NH₃ procedente de la reacción de la glicina descarboxilasa. El NH₃ es reasimilado para la síntesis de glutamato en el cloroplasto, por acción de las enzimas GS/GOGAT y empleando como poder reductor ferredoxina reducida. La ferredoxina oxidada es usada de nuevo en la cadena de transporte electrónico. El CO₂ liberado, en la descarboxilación de la glicina, puede ser reciclado para que el ciclo de Calvin siga funcionando. Se ha calculado que la tasa de liberación de CO₂ fotorrespiratorio puede alcanzar un valor que oscila entre un 18 y un 27% de la tasa de fijación de CO₂ fotosintético (Siedow y Day, 2000).

Sin embargo, y de acuerdo con los datos de crecimiento, las plantas de mirto parecían adaptarse al periodo de estrés salino, ya que el nivel 4 dS/m incluso estimulaba su crecimiento. El nivel S8 estimulaba el crecimiento de las raíces y el peso total de la planta. En la fase de recuperación, al contrario de lo que podría esperarse, se producía un efecto negativo en el crecimiento de las

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

plantas de mirto, que era proporcional al nivel salino usado previamente. Este comportamiento podría deberse, probablemente, a que las plantas han tenido que adaptarse al estrés salino y a que el periodo de recuperación aplicado no fue suficiente como para volver a comportarse como plantas control.

Las plantas de mirto apenas presentaron acumulación de ROS en sus hojas. Sólo observamos una débil acumulación de H_2O_2 a los 15 días de estrés con el mayor nivel salino y de H_2O_2 y de O_2^- a los 30 días de estrés en las venas mayores y con el mismo nivel salino. En este caso, y habida cuenta de la escasa tinción observada después del periodo de estrés, no se analizó la acumulación de ROS después del periodo de recuperación.

7.3.- Resultados

7.3.2.- *Eugenia myrtifolia* L.

7.3.2.1.- Crecimiento

Los parámetros de crecimiento medidos en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase de salinización indican que los niveles relativamente bajos de salinidad (S4) favorecieron el crecimiento de dichas plantas, los niveles intermedios (S8) no lo afectaban y los de mayor salinidad (S12) inducían descensos significativos en el crecimiento cuando se comparaban con el resto de tratamientos (Tabla 5.1). Concretamente, el área foliar se incrementó significativamente un 20% en S4 mientras que se producía una importante caída en las plantas tratadas con S12 (41%). En el peso seco de las hojas y tallos no se observaron cambios significativos en las plantas S4 y S8, pero sí un descenso en los pesos secos de las hojas (43%) y tallos (44%) de las plantas S12, en relación con las plantas control. En el caso del peso seco de la raíz, aunque no se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados, si se observó en los valores una tendencia a disminuir conforme aumentaba la salinidad. El valor del cociente entre el peso seco de la raíz y el de la parte aérea fue más alto para el tratamiento S12. Los niveles bajos de salinidad (S4) aumentaron el porcentaje de biomasa de las hojas y redujeron el de la raíz, mientras que la salinidad más elevada (S12) daba lugar a plantas con un mayor porcentaje de las raíces que de la parte aérea (Tabla 5.1).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Tabla 5.1.- Respuestas frente a la salinidad en los diferentes parámetros de crecimiento estudiados en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase de salinización.

Parámetros medidos	Tratamientos				^a F
	Control	S4	S8	S12	
Ár. foliar total (cm ²)	925±44b	1105±63c	775±10b	549±55a	27,14***
P.S. Hoja (g planta ⁻¹)	5,1±0,5bc	6,1±0,3c	4,3±0,2b	2,9±0,2a	15,89***
P.S. Tallo (g planta ⁻¹)	1,61±0,32b	1,70±0,14b	1,33±0,05ab	0,90±0,05a	4,18*
P.S. Raíz (g planta ⁻¹)	3,17±0,56	2,59±0,10	2,34±0,18	2,22±0,09	3,48 n.s
P.S. Raíz / P.S. Aéreo	0,47±0,03b	0,33±0,01a	0,48±0,02b	0,59±0,04c	17,41***

Los datos representan los valores medios ± error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los diferentes parámetros de crecimiento. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 95% (*) y ns: no significativo.

Una vez que todas las plantas se lavaron con agua de buena calidad (Fase de lavado), las plantas que habían estado sometidas al nivel de salinidad mayor (S12) seguían presentando menor área foliar y menor peso seco en todas sus partes (hoja, tallo y raíz), cuando se las comparaban con las plantas control (Tabla 5.2). En las plantas S8 el área foliar fue menor que en los controles, sin que se observasen diferencias en el peso seco de las distintas partes. Los valores del cociente entre el peso seco de la raíz y la parte aérea de la planta fueron similares para casi todos los tratamientos, aunque las plantas S4 presentaban los valores más bajos (Tabla 5.2).

Tabla 5.2.- Respuestas frente a la salinidad en los diferentes parámetros de crecimiento estudiados en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase de lavado.

Parámetros medidos	Tratamientos				^a F
	Control	S4	S8	S12	
Ár. foliar total (cm ²)	826±67c	1102±39d	637±29b	480±62a	35,00***
P.S. Hoja (g planta ⁻¹)	6,39±0,59b	8,98±0,45c	5,38±0,06b	3,46±0,66a	21,30***
P.S. Tallo (g planta ⁻¹)	2,12±0,14b	2,97±0,23c	1,84±0,10ab	1,27±0,28a	12,42**
P.S. Raíz (g planta ⁻¹)	3,64±0,34b	3,73±0,34b	3,53±0,26b	2,41±0,37a	4,48*
P.S. Raíz / P.S. Aéreo	0,43±0,05ab	0,31±0,01a	0,51±0,03b	0,52±0,06b	4,86*

Los datos representan los valores medios ± error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los diferentes parámetros de crecimiento. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 99% (**), o 95% (*).

Con respecto al crecimiento, también se calcularon las tasas de crecimiento relativo (RGR) para cada tratamiento y al final de cada fase del ensayo, observándose un incremento de la misma en los tratamientos S4 y un descenso progresivo conforme aumentaba la salinidad de los tratamientos en las plantas S8 y S12, si las comparamos con las RGR de los controles.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Concretamente, durante la fase de salinización, se producían incrementos no significativos del 3,5% en S4, mientras que se observaron descensos no significativos del 8,4% en S8 y estadísticamente relevantes del 21% en S12. En la fase de lavado se apreciaron descensos significativos únicamente en las plantas S12 (22%). Los valores más altos se volvían a presentar en las plantas S4 pero sin diferencias estadísticas con las plantas control. Las plantas S8, al final del ensayo, presentaban respuestas intermedias comportándose mejor que las plantas S12 pero peor que las plantas S4 y los controles (Tabla 5.3).

Tabla 5.3.- Respuestas frente a la salinidad en la tasa de crecimiento relativa (RGR) estudiada en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases del ensayo (fase de salinización y fase de lavado).

Parámetros medidos	Tratamientos				^a F
	Control	S4	S8	S12	
RGR fase salinización	2,25±0,16b	2,33±0,05b	2,06±0,05ab	1,78±0,05a	7,81**
RGR fase lavado	2,49±0,05bc	2,74±0,06c	2,37±0,02b	1,93±0,17a	13,20**

Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los diferentes parámetros de crecimiento. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99% (**).

7.3.2.2.- Cambios Nutricionales

En la evolución del contenido de nutrientes en hojas se pudo observar que desde el primer día de la fase de salinización se producía una tendencia al aumento en los niveles de los iones Na⁺ y Cl⁻. Con respecto a la evolución de los contenidos de Cl⁻, las plantas sometidas al riego con 12 dS/m presentaron unos contenidos estadísticamente superiores a los controles, desde los primeros días de aplicación del tratamiento. Al final de la fase de salinización, se observaba una tendencia a incrementar los niveles foliares de Cl⁻ con la salinidad. Hay que remarcar que, en este periodo, las plantas S12 presentaron un 80% más de contenido de Cl⁻ que los controles.

Durante la fase de lavado, sólo se observaron, al final de la misma, cambios significativos en los contenidos foliares de Cl en los tratamientos S8 y S12. Así las plantas previamente regadas con los tratamientos S8 y S12 presentaron valores de contenido de Cl⁻ un 40% y un 56% superiores al control, respectivamente (Figura 5.1A).

Al final de la fase de salinización, se observó que la tasa de absorción del ión cloruro aumentaba significativamente conforme lo hacía la salinidad de

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

los tratamientos. Concretamente unas 2 veces en las plantas S4, unas 5,3 veces en las plantas S8 y unas 7 veces en las plantas S12, respectivamente (Figura 5.1B).

Al final de la fase de lavado disminuían drásticamente la tasa de absorción del ión cloruro para todos los tratamientos, si bien seguían existiendo mayores tasas para los tratamientos más severos (S8 y S12), si se los comparaba con los controles (Figura 5.1B).

La acumulación de Cl^- en las hojas fue estadísticamente mayor (1,9 veces), en plantas tratadas con el mayor nivel de salinidad, al compararlas con el resto de los tratamientos. En los tallos y en las raíces se observaron mayores acumulaciones de Cl^- en las plantas S8 (1,68 veces en los tallos y 2,8 veces en las raíces) y en las plantas S12 (2,2 veces en los tallos y 3,4 veces en las raíces), con relación a las plantas control. Sin embargo, en plantas S4 el ión Cl^- sólo aumentó de forma significativa (52%) en las raíces (Figura 5.1C).

Al final de la fase de lavado, aunque los valores para el ión cloruro en los tratamientos más salinos (S8 y S12) fueron estadísticamente diferentes a los del control, aquellos bajaron considerablemente con respecto a la fase de salinización. El ión Cl^- , sólo se acumulaba en las raíces a medida que aumentaba la salinidad de los tratamientos. En este sentido, la acumulación del Cl^- era de 1,7 veces, 2,9 veces y 3,1 veces en las raíces de las plantas previamente sometidas a los tratamientos S4, S8 y S12 respectivamente. En las hojas y en los tallos no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Es de destacar que las plantas de *E. myrtifolia* acumularon más Cl^- en las raíces que en la parte aérea (Figura 5.1C).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

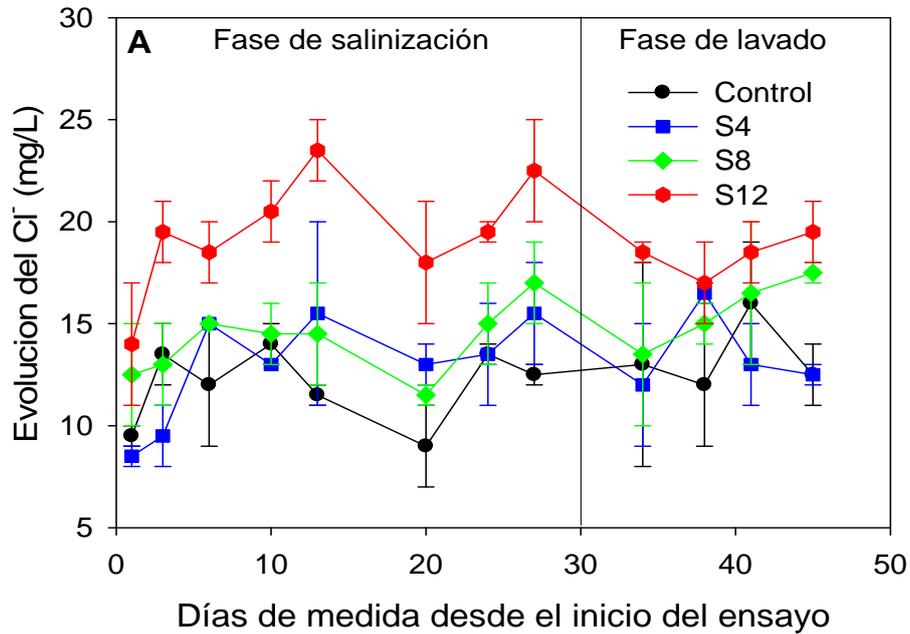


Figura 5.1A.- Evolución a lo largo del ensayo de la concentración del ión cloruro en hojas de la zona media de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes.

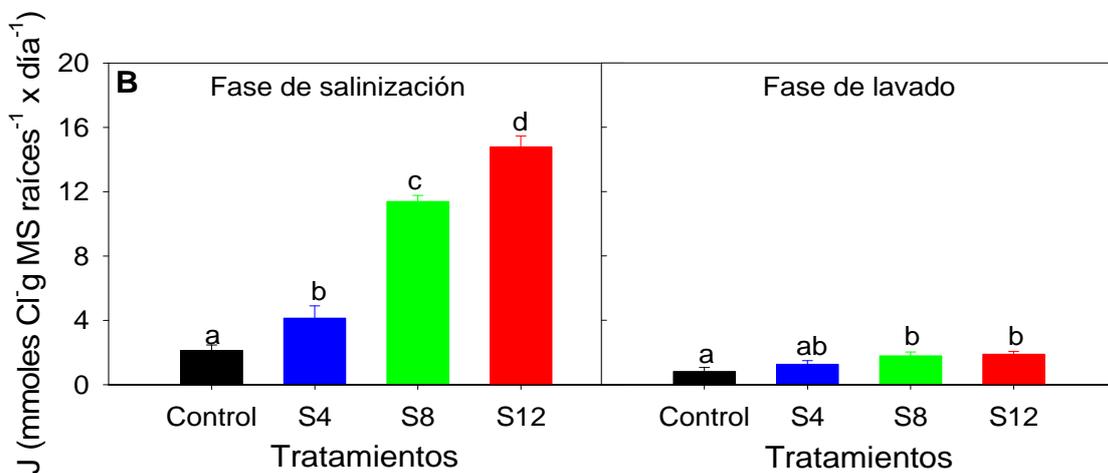


Figura 5.1B.- Cambios en la tasa de absorción del ión Cl^- en todos los tratamientos estudiados en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

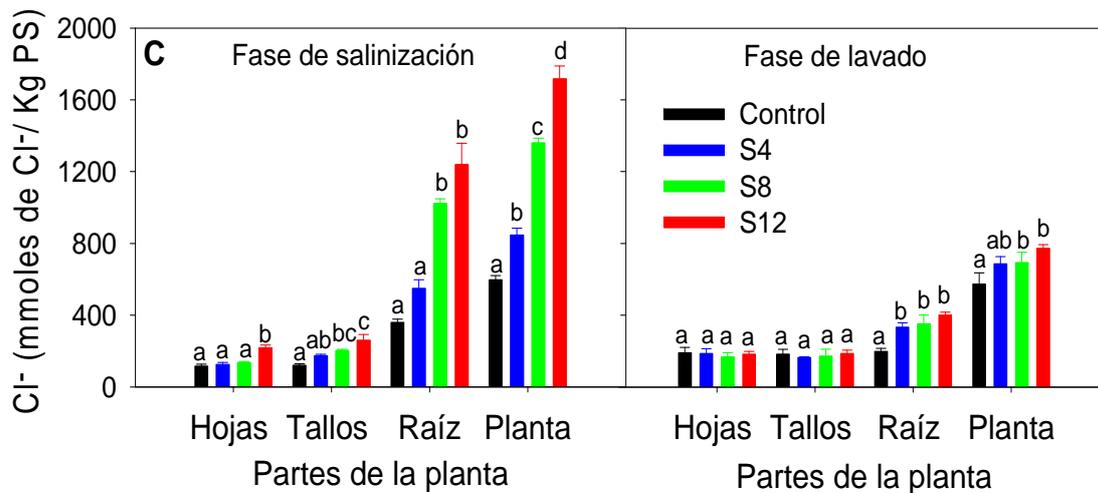


Figura 5.1C.- Cambios en la concentración del ión cloruro, en todos los tratamientos estudiados, en las diferentes partes de la planta y a nivel de planta entera en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

En el caso del Na^+ , se observaba que a los 3 días se producía un pico en sus contenidos foliares para estabilizarse posteriormente. Las diferencias en los contenidos foliares de Na^+ empezaron a ser significativas a partir de la segunda semana de tratamiento en el caso de las plantas sometidas a los dos niveles mayores de salinidad. Sin embargo, al final de este periodo, los niveles de Na^+ , si bien eran más altos en las plantas S8 y S12, tendían a igualarse en todos los tratamientos (Figura 5.2A).

Durante la fase de lavado, las diferencias en los contenidos de Na^+ no fueron estadísticamente significativas, excepto al final de esta fase, donde las plantas previamente regadas con el tratamiento S8 presentaron un contenido de Na^+ mayor que los controles y las plantas S4, siendo similares a los observados para las plantas previamente tratadas con el mayor nivel salino. En este caso, si bien las plantas S12 mostraron un mayor contenido foliar de Na^+ que los controles, las diferencias no resultaron significativas (Figura 5.2A).

Al final de la fase de salinización la respuesta más sorprendente, con respecto al ión Na^+ , se produjo en el tratamiento S4, donde la tasa de absorción era prácticamente igual a la de las plantas control. Un comportamiento más lógico se producía en los tratamientos S8 y S12 en donde los valores de absorción de Na^+ eran significativamente más altos (Figura 5.2B).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Al final de la fase de lavado se produjo una reducción en la tasa de absorción de este ión para todos los tratamientos. Además no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos estudiados (Figura 5.2B).

Las menores concentraciones de Na^+ en hojas correspondieron a las plantas tratadas con S4, mientras que los tratamientos más salinos (S8 y S12) presentaron mayores contenidos foliares de este ión. En tallos sólo se observaron aumentos significativos de Na^+ (32%) en plantas tratadas con S12. Al igual que ocurría para el Cl^- , en raíces se apreció una masiva acumulación de Na^+ en los tratamientos de mayor salinidad (Figura 5.2C).

Al final de la fase de lavado las acumulaciones de Na^+ observadas en las hojas fueron muy parecidas a las de la fase anterior, aunque con una ligera caída en las plantas S12. Se observó una acumulación significativa de Na^+ en tallos y raíces de las plantas previamente sometidas a los tratamientos S8 y S12, que oscilaba entre 25% y 35%, respectivamente (Figura 5.2C).

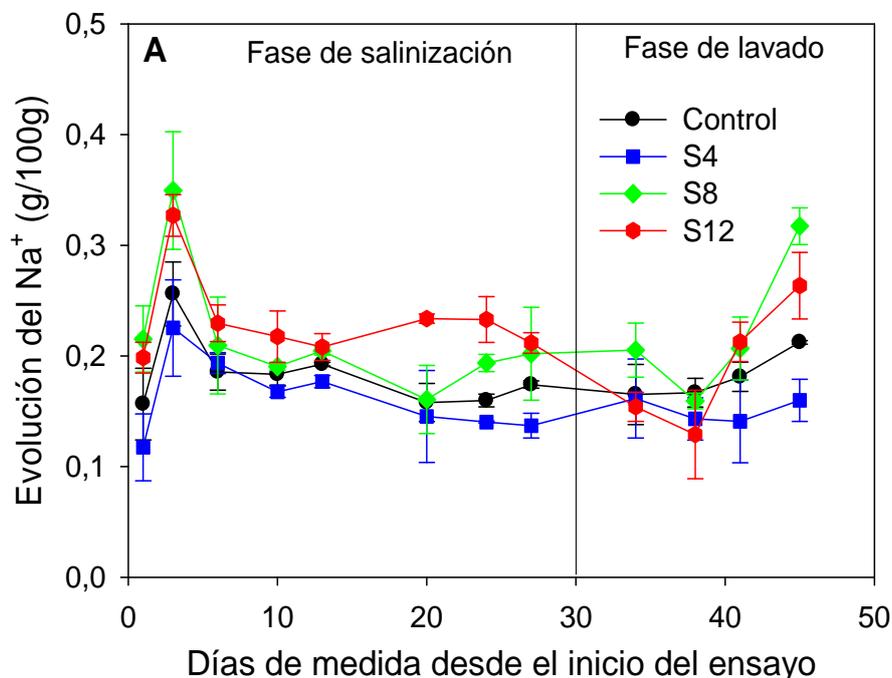


Figura 5.2A.- Evolución a lo largo del ensayo de la concentración del ión sodio en hojas de la zona media de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

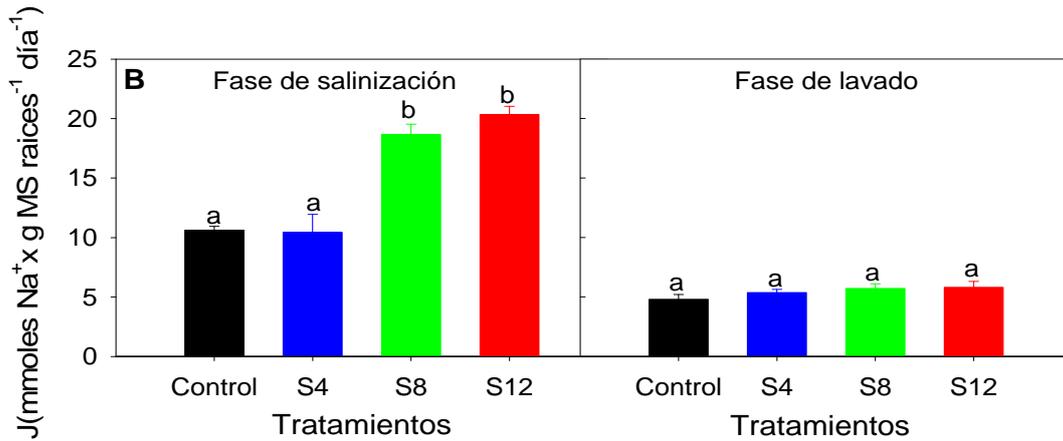


Figura 5.2B.- Cambios en la tasa de absorción del ión Na⁺ en todos los tratamientos estudiados en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

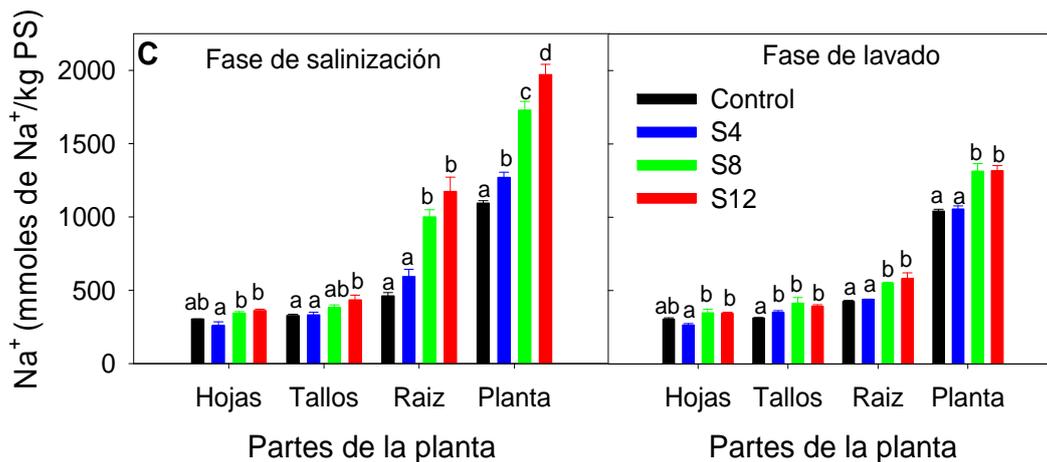


Figura 5.2C.- Cambios en la concentración del ión sodio, en todas las partes de la planta y a nivel de planta entera en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

Hasta la primera semana de estrés se puede observar en todos los tratamientos una subida en los niveles foliares de K⁺, para después descender durante la segunda semana y de nuevo volver a subir en las dos últimas semanas de tratamiento, donde los niveles en cada caso se mantenían más o menos estables. En la fase de estrés se observó una tendencia a reducir los niveles foliares de K⁺ con la salinidad. En la primera semana, los descensos fueron significativos en plantas S8, mientras que en la segunda semana lo fueron en plantas S4. En las dos últimas semanas de estrés (3^a y 4^a), los

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

descensos observados en los niveles de K^+ , de un 50% y un 37%, respectivamente, correspondieron a las plantas tratadas con el riego S12 (Figura 5.3A).

Durante las primeras semanas de la fase de lavado, los contenidos de K^+ eran menores en las plantas previamente estresadas, pero las diferencias fueron estadísticamente significativas en aquellas que fueron regadas con el tratamiento S12. Al final de la fase de lavado, todas las plantas previamente tratadas con NaCl presentaban un descenso significativo de los contenidos foliares de K^+ . En este sentido, los descensos fueron de un 37%, un 42% y un 58%, para las plantas S4, S8 y S12, respectivamente, con respecto a los controles (Figura 5.3A).

Los valores de absorción del K^+ al final de la fase de salinización disminuían de una forma similar en todos los tratamientos, observándose diferencias significativas entre las plantas control y el resto de los tratamientos salinos (Figura 5.3B).

Las tendencias observadas al final de la fase de lavado para la tasa de absorción del K^+ fueron similares a las de la fase anterior, pero con valores de tasa de absorción mucho más bajos en todos los casos, siendo las plantas control las que presentaban la mayor tasa de absorción (Figura 5.3B).

En el contenido en K^+ se produjo una tendencia a disminuir en las distintas partes de la planta conforme aumentaba la salinidad de los distintos tratamientos. Dichas respuestas fueron muy evidentes en hojas y en raíces donde los mayores descensos se producían en los tratamientos de mayor salinidad (Figura 5.3C).

Al final de la Fase de lavado se reducían los niveles de K^+ en hojas de las plantas S4 y en todas las partes de la planta en los tratamientos S8 y S12 (Figura 5.3C).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

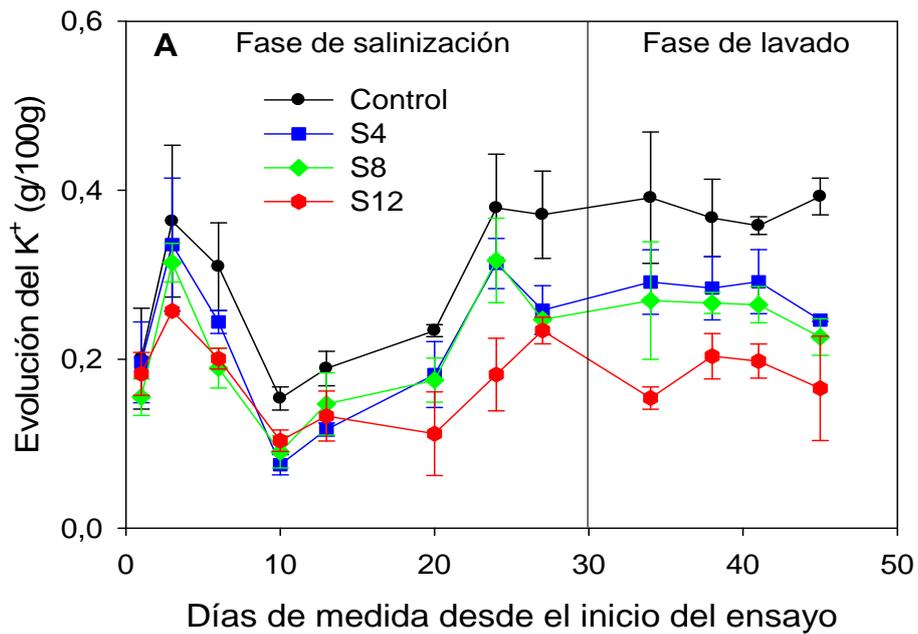


Figura 5.3A.- Evolución a lo largo del ensayo de la concentración del ión potasio en hojas de la zona media de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes.

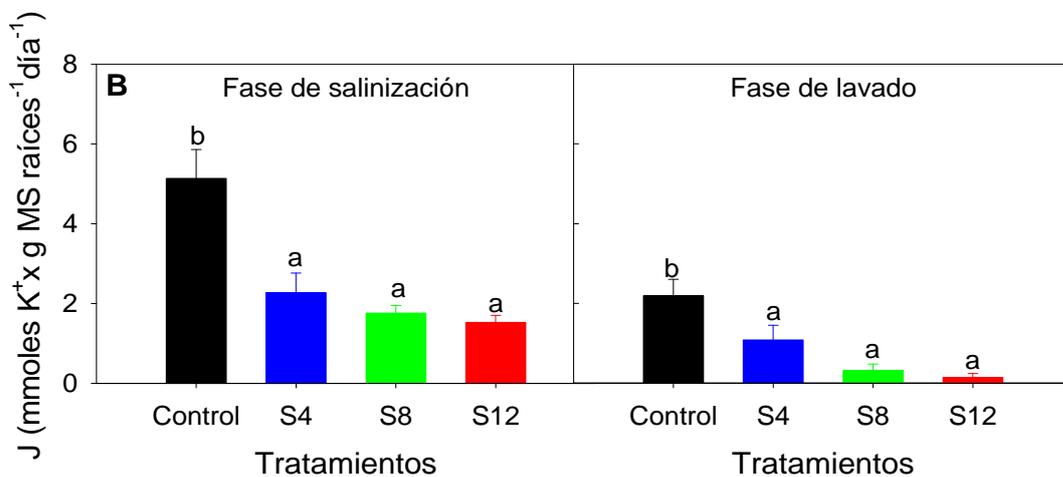


Figura 5.3B.- Cambios en la tasa de absorción del ión K⁺ en todos los tratamientos estudiados en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

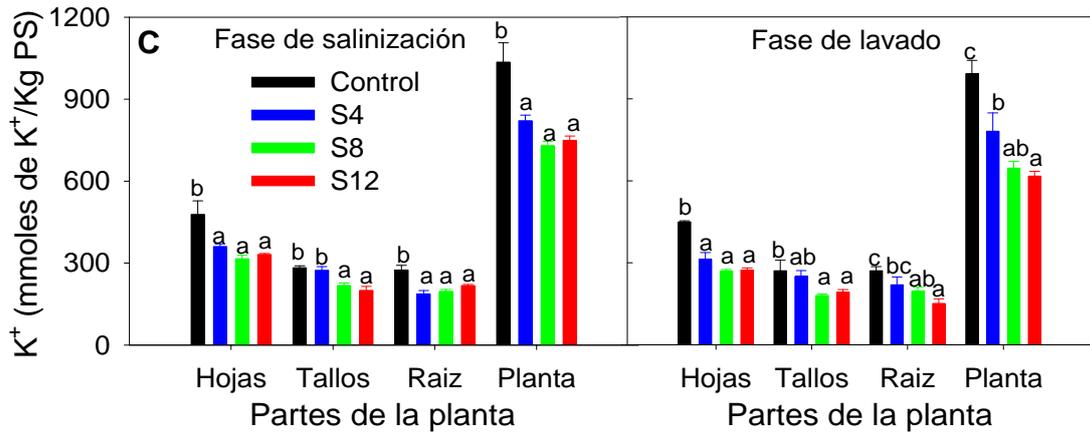


Figura 5.3C.- Cambios en la concentración del ión potasio, en todos los tratamientos estudiados, en las diferentes partes de la planta y a nivel de planta entera en *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

Los contenidos foliares de Ca^{2+} presentaron un pico a los 3 días de tratamiento y otro nuevo pico, algo menor, a las tres semanas de la fase de estrés, siendo en la mayoría de los casos las plantas más estresadas (S12) las que presentaron los mayores niveles de Ca^{2+} . Sin embargo, los cambios no eran significativos. A partir de la tercera semana de la fase de salinización y hasta el final de la fase de lavado, los niveles de Ca^{2+} se estabilizaron (Figura 5.4A). En la fase de lavado, si bien las diferencias no fueron significativas, de nuevo las plantas que previamente se habían sometido al estrés salino presentaron los niveles de Ca^{2+} más altos (Figura 5.4A).

Con respecto a la tasa de absorción del Ca^{2+} , ésta aumentaba con la salinidad de los tratamientos, sobre todo en los tratamientos más salinos (Figura 5.4B).

En la fase de lavado, al igual que lo observado en el caso del Cl^- se apreció una disminución en los valores de la tasa de absorción del Ca^{2+} , pero estos valores fueron mayores en plantas previamente sometidas a estrés salino que en plantas control (Figura 5.4B).

Con respecto a la distribución del Ca^{2+} , tanto en la fase de salinización como en la fase de lavado, se observaron aumentos significativos en los diferentes órganos de la planta, entre los controles y las plantas sometidas a algún tratamiento salino con NaCl , (Figura 5.4C).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

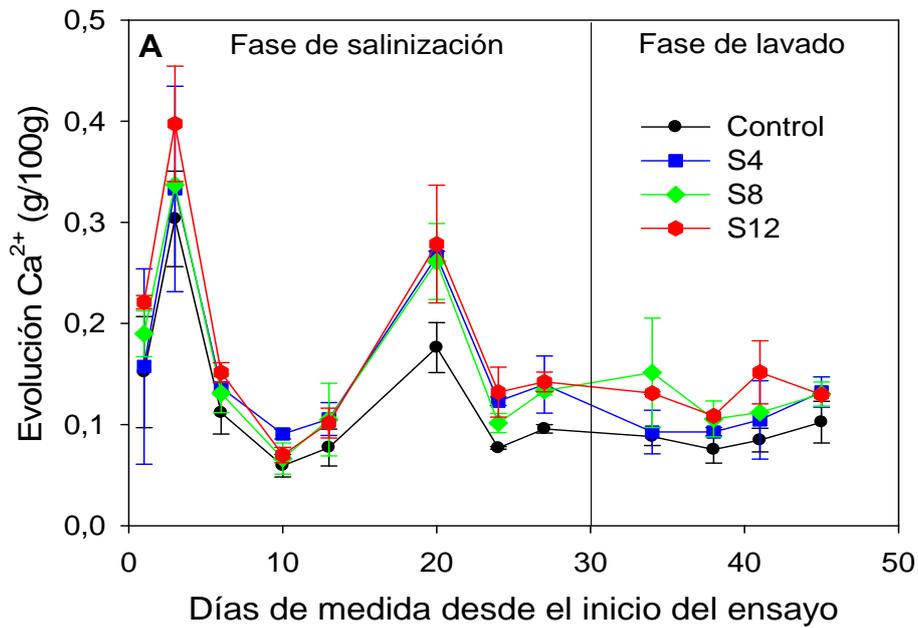


Figura 5.4A.- Evolución a lo largo del ensayo de la concentración del ión calcio en hojas de la zona media de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes.

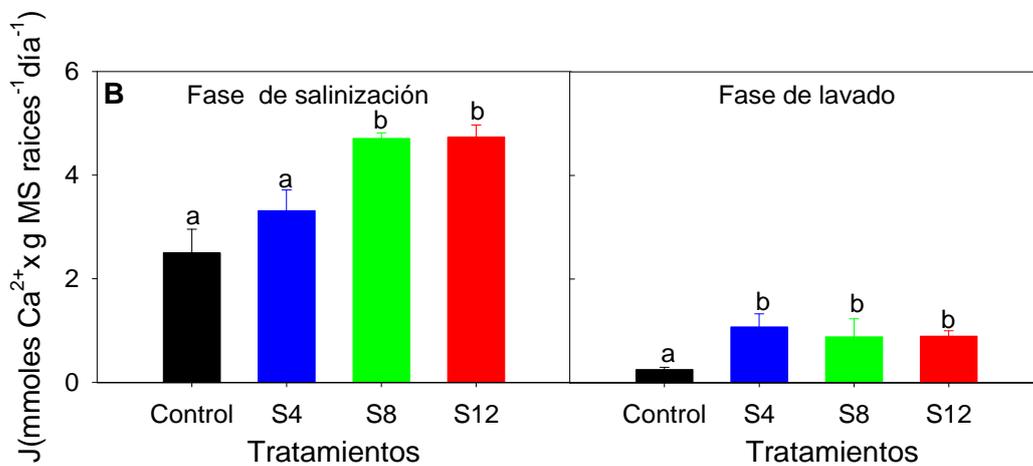


Figura 5.4B.- Cambios en la tasa de absorción del ión Ca^{2+} en todos los tratamientos estudiados en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

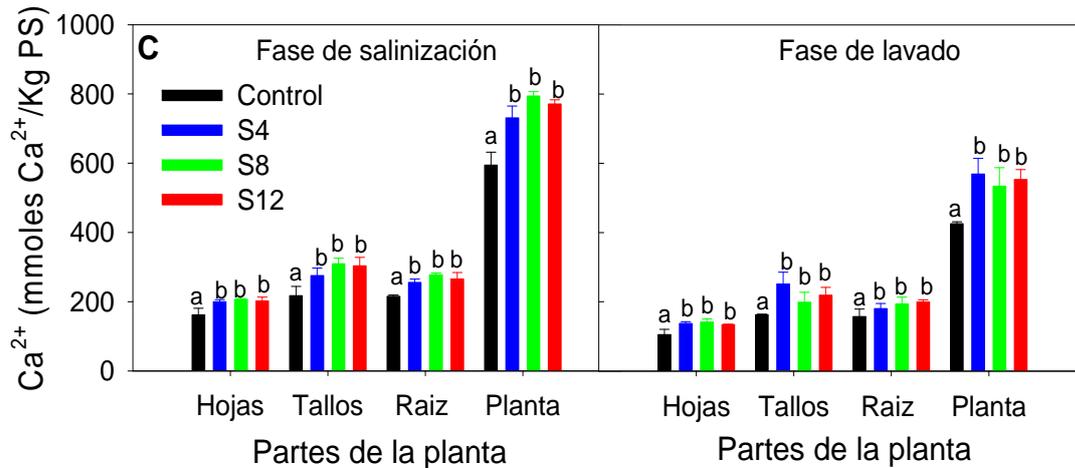


Figura 5.4C.- Cambios en la concentración del ión calcio, en todos los tratamientos estudiados, en las diferentes partes de la planta y a nivel de planta entera en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según el Test de Duncan.

Al final de la fase de salinización se observó un descenso estadísticamente significativo en el cociente K^+/Na^+ en hojas para los tratamientos más salinos, de aproximadamente un 41%, con respecto al control. En los tallos, la mayor disminución se apreció en las plantas S12 (45%) mientras que en las raíces se produjeron caídas en dicho cociente dependientes de la salinidad de los tratamientos, resultando 1,8 veces, 2,9 veces y 3,1 veces, respectivamente (Tabla 5.4A).

En las hojas, se observó una disminución en el cociente K^+/Cl^- conforme aumentaba la salinidad, siendo los descensos estadísticamente diferentes para los tratamientos S8 (45%) y S12 (64%), con relación a los controles. En los tallos y las raíces las tendencias fueron similares en todos los tratamientos, pero el descenso era mucho mayor en plantas regadas con 8 y 12 dS/m. Concretamente, en tallos se produjeron descensos en el ratio K^+/Cl^- de 1,5 veces en S4, de 2,2 veces en S8 y 2,9 veces en S12, respectivamente. En raíces se apreciaron descensos que eran mayores con la salinidad de los tratamientos. En concreto, el ratio K^+/Cl^- disminuyó 2,2 veces en S4, 4 veces en S8 y 4,2 veces en S12 (Tabla 5.4A).

El cociente Ca^{2+}/Na^+ disminuyó en las hojas de todos los tratamientos, así como en las raíces de las plantas regadas con los mayores niveles de salinidad. En concreto unas 1,7 veces en las plantas S8 y 2 veces en las plantas S12 con respecto al control (Tabla 5.4A).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

En los valores del cociente $\text{Ca}^{2+}/\text{Cl}^-$ se observó un descenso significativo en raíces de las plantas S8. Sin embargo, el tratamiento con el mayor nivel salino provocó un descenso del cociente $\text{Ca}^{2+}/\text{Cl}^-$ en todas las partes de la planta, que fue mayor en raíces (63%) que en la parte aérea (aproximadamente un 33%) (Tabla 5.4A).

En general, al observar los cocientes estudiados hasta ahora, se pudo constatar que los iones fitotóxicos Na^+ y Cl^- , se acumulaban en mayor proporción en las raíces con respecto a los tallos y las hojas, en los que se aprecia que los cocientes son más altos (Tabla 5.4A).

Por último, con relación al cociente Na^+/Cl^- se puede destacar que los cocientes más bajos en todas las partes planta se obtuvieron para los tratamientos S12 indicando que, conforme aumentaba la salinidad de los tratamientos, la acumulación de cloruro era mayor que la de Na^+ (Tabla 5.4A).

Al final de la fase de lavado, las diferencias más importantes entre tratamientos se produjeron en los cocientes en los que estaba implicado el K^+ . En general, se apreciaron unos cocientes más bajos en todas las partes de la planta para todos los tratamientos estudiados al final de esta fase, lo que indicaría una mayor permanencia de los iones fitotóxicos en estos órganos. Sin embargo, estos valores eran más altos en las raíces cuando se los compara con los del final de la fase de salinización. Entre los distintos tratamientos y en las distintas partes de la planta, los descensos de los cocientes K^+/Na^+ y K^+/Cl^- más acusados se producían en los tratamientos con mayor CE (S8 y S12). De la misma manera a lo acontecido en la fase de salinización, se produjo una.

Con respecto a los cocientes en los que está implicado el Ca^{2+} no se apreciaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Aunque resulta ser interesante que los cocientes en todos los tratamientos y órganos estudiados al final de la fase de lavado presentaban valores más bajos que los observados al final de la fase de salinización (Tabla 5.4B).

Respecto al cociente Na^+/Cl^- , este valor sólo disminuyó significativamente en raíces, debido sobre todo a la mayor acumulación de Cl^- (Tabla 5.4B).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Tabla 5.4A.- Estudio de los diferentes cocientes estudiados en los distintos órganos y tratamientos de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase de salinización.

Cocientes	Órgano	Tratamientos				^a F
		Control	S4	S8	S12	
K ⁺ /Na ⁺	Hojas	1,57±0,16b	1,40±0,10b	0,92±0,03a	0,92±0,01a	12,34**
	Tallos	0,86±0,03b	0,83±0,07b	0,57±0,01ab	0,47±0,04a	15,12***
	Raíz	0,59±0,04c	0,32±0,04b	0,20±0,01a	0,19±0,01a	42,43***
K ⁺ /Cl ⁻	Hojas	4,24±0,75c	2,96±0,24bc	2,35±0,19ab	1,54±0,10a	7,74**
	Tallos	2,40±0,26c	1,59±0,05b	1,08±0,03a	0,82±0,17a	19,77***
	Raíz	0,76±0,07c	0,35±0,05b	0,19±0,01a	0,18±0,01a	46,03***
Ca ²⁺ /Na ⁺	Hojas	0,53±0,06a	0,78±0,05b	0,60±0,02a	0,56±0,04a	5,75*
	Tallos	0,66±0,08	0,83±0,03	0,81±0,03	0,70±0,04	2,76 n.s
	Raíz	0,47±0,03b	0,44±0,04b	0,28±0,01a	0,23±0,01a	18,88***
Ca ²⁺ /Cl ⁻	Hojas	1,41±0,22b	1,64±0,12b	1,54±0,07b	0,95±0,12a	4,66*
	Tallos	1,80±0,09b	1,61±0,19b	1,53±0,03ab	1,20±0,10a	4,68*
	Raíz	0,60±0,04c	0,47±0,05c	0,27±0,01b	0,22±0,01a	33,52***
Na ⁺ /Cl ⁻	Hojas	2,65±0,22b	2,12±0,10ab	2,56±0,20b	1,68±0,11a	7,30*
	Tallos	2,78±0,27b	1,95±0,19a	1,90±0,06a	1,71±0,12a	6,94*
	Raíz	1,28±0,03c	1,08±0,01b	0,98±0,04a	0,95±0,01a	31,84***

Los datos representan los valores medios ± el error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan. ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los diferentes parámetros de crecimiento. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 99% (**), o 95% (*) y n.s; diferencias no significativas.

Tabla 5.4B.- Estudio de los diferentes cocientes estudiados en los distintos órganos y tratamientos de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase de lavado.

Cocientes	Órgano	Tratamientos				^a F
		Control	S4	S8	S12	
K ⁺ /Na ⁺	Hojas	1,48±0,03c	1,19±0,11b	0,79±0,07a	0,78±0,01a	25,76**
	Tallos	0,87±0,12c	0,72±0,08bc	0,49±0,05ab	0,44±0,02a	6,79*
	Raíz	0,64±0,03c	0,50±0,07bc	0,36±0,02ab	0,26±0,04a	13,60**
K ⁺ /Cl ⁻	Hojas	2,97±0,26b	1,91±0,26a	1,48±0,18a	1,41±0,10a	11,39**
	Tallos	1,72±0,43	1,51±0,10	1,14±0,21	0,94±0,06	2,09 n.s
	Raíz	1,37±0,08c	0,65±0,05b	0,57±0,04ab	0,38±0,06a	54,51***
Ca ²⁺ /Na ⁺	Hojas	0,35±0,05	0,52±0,01	0,41±0,05	0,39±0,01	3,49 n.s
	Tallos	0,52±0,05	0,72±0,12	0,50±0,11	0,56±0,05	1,44 n.s
	Raíz	0,37±0,06	0,41±0,03	0,35±0,03	0,35±0,03	0,52 n.s
Ca ²⁺ /Cl ⁻	Hojas	0,70±0,13	0,84±0,12	0,79±0,13	0,70±0,05	0,41 n.s
	Tallos	1,01±0,11	1,52±0,22	1,29±0,34	1,10±0,22	0,92 n.s
	Raíz	0,82±0,18	0,55±0,06	0,57±0,11	0,50±0,03	1,66 n.s
Na ⁺ /Cl ⁻	Hojas	2,02±0,21	1,610,19	1,91±0,24	1,78±0,11	0,83 n.s
	Tallos	1,93±0,21	2,13±0,11	2,53±0,35	1,93±0,20	1,43 n.s
	Raíz	2,16±0,15b	1,33±0,09a	1,62±0,22a	1,45±0,07a	6,42*

Los datos representan los valores medios ± error estándar de al menos 4 plantas diferentes. Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas según el Test de Duncan. ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los diferentes parámetros de crecimiento. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 99% (**), o 95% (*) y n.s; diferencias no significativas.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

7.3.2.3.- Cambios fisiológicos

7.3.2.3.1.- Relaciones Hídricas y síntesis de L-prolina

Después de tres días de aplicación de los tratamientos, ya se apreciaban unos valores significativamente más negativos en el potencial hídrico foliar (Ψ_h) de las plantas sometidas al mayor tratamiento de salinidad. Las diferencias entre estas plantas y el resto de los tratamientos fueron cada vez más acusadas, presentando los valores más bajos del ensayo al final de los 30 días de estrés. La separación de las plantas S8 con respecto a los controles se produjo a los 9 días de aplicación de los tratamientos y el de las de las plantas S4 a los 13 días. En el periodo de lavado de sales se observó un aumento de los valores del potencial hídrico, sobre todo en las plantas S12. Sin embargo, al final de la fase de lavado si bien todos los tratamientos salinos tendían a recuperarse no llegaron nunca a alcanzar los valores de las plantas control (Figura 5.5A).

Durante todo el periodo de la fase de salinización los valores de potencial de presión (Ψ_p) de las plantas de los distintos tratamientos son similares entre sí, a excepción de algunos momentos de medida. Concretamente a los 24 y a los 27 días desde la aplicación de los tratamientos se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, presentando los valores más altos las plantas control y S4 y los valores más bajos las plantas sometidas a los mayores niveles de salinidad. Dichas diferencias significativas desaparecen a lo largo de la fase de lavado, presentando todos los tratamientos valores similares entre ellos (Figura 5.5B).

Durante la fase de salinización, las plantas sometidas a los tratamientos salinos más severos realizan un claro ajuste osmótico, presentando valores más bajos de potencial osmótico a máxima saturación (Ψ_{os}) que los de las plantas control y S4. Sorprendentemente cuando las condiciones son, en principio, más óptimas todas las plantas que habían sido regadas con diferentes niveles de salinidad presentan un acusado ajuste osmótico si se las compara con las plantas control. Entre los tratamientos S4, S8 y S12 no hubo diferencias significativas al final de la fase de lavado (Figura 5.5C).

De forma paralela al estudio en la evolución de los diferentes parámetros de relaciones hídricas, se estudió la evolución en los contenidos foliares de L-prolina. Los niveles de L-prolina aumentaron en hojas de *E. myrtifolia* a partir de una semana de tratamiento salino, sobre todo en plantas S8 y S12. Tras

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

este momento los niveles de Pro siempre fueron mayores en plantas tratadas con sal, si bien las diferencias fueron estadísticamente significativas en plantas S12 en todo el periodo de estrés con respecto al control y para las plantas S8 sólo durante la primera y segunda semanas de estrés así como al final del mismo. Durante la fase de lavado, de nuevo las plantas previamente sometidas al riego con NaCl presentaron mayores niveles de Pro que las plantas control. Estas diferencias fueron significativas para plantas S8 y S12 durante toda esta fase y para las S4 al principio de la fase de lavado, en concreto a los 3 días del inicio de la fase de lavado (Figura 5.5D).

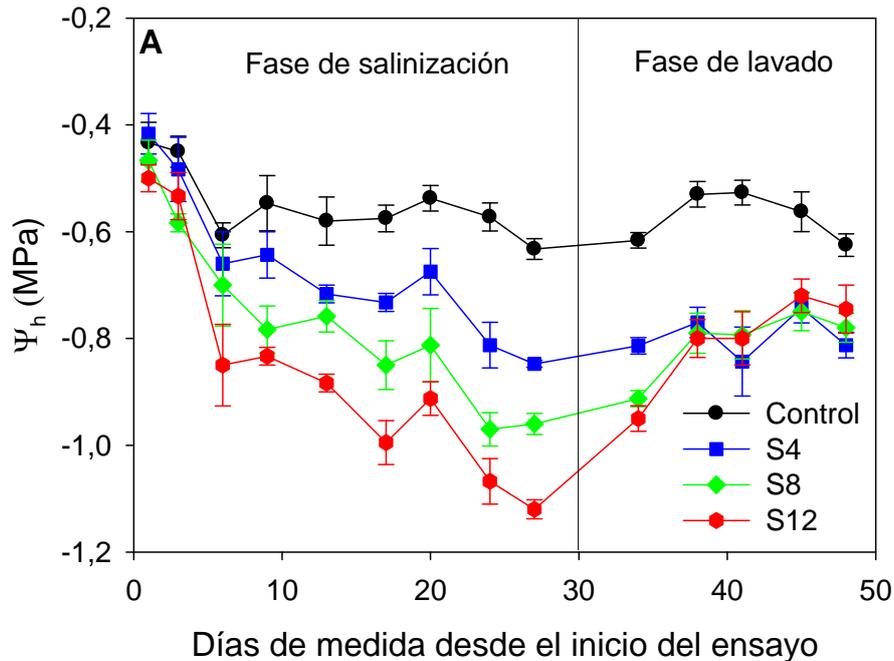


Figura 5.5A.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial hídrico foliar (Ψ_h) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

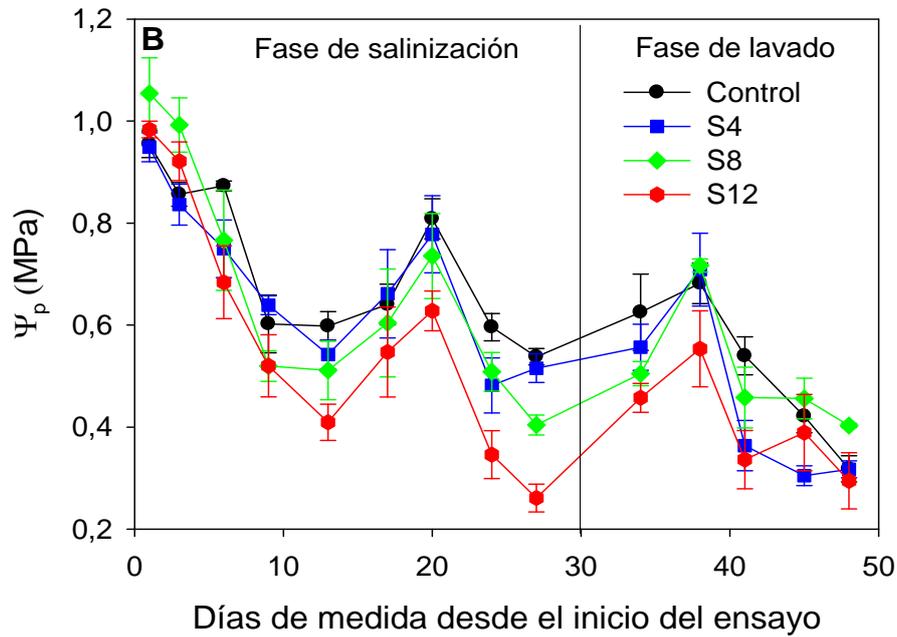


Figura 5.5B.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial de presión foliar (Ψ_p) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes.

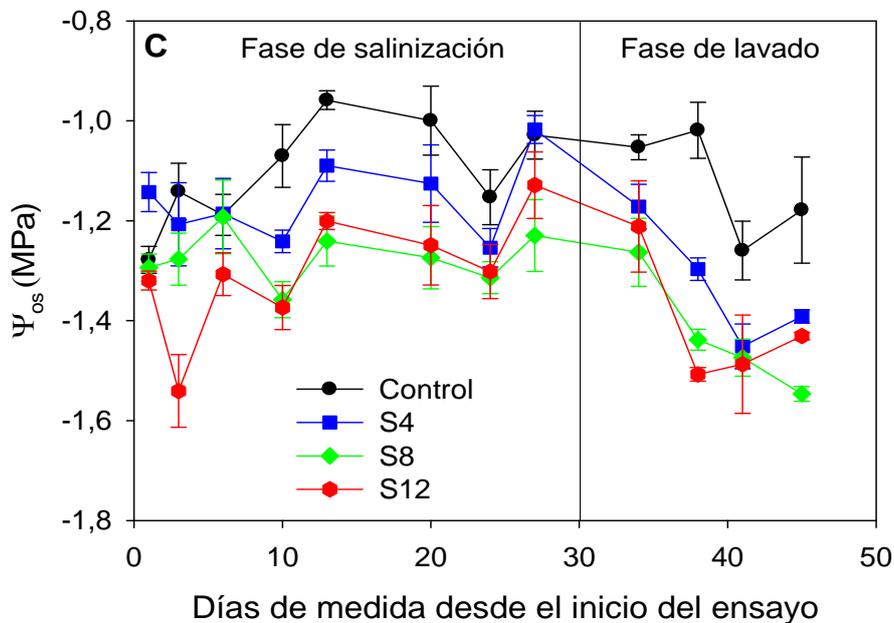


Figura 5.5C.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial osmótico saturado foliar (Ψ_{os}) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

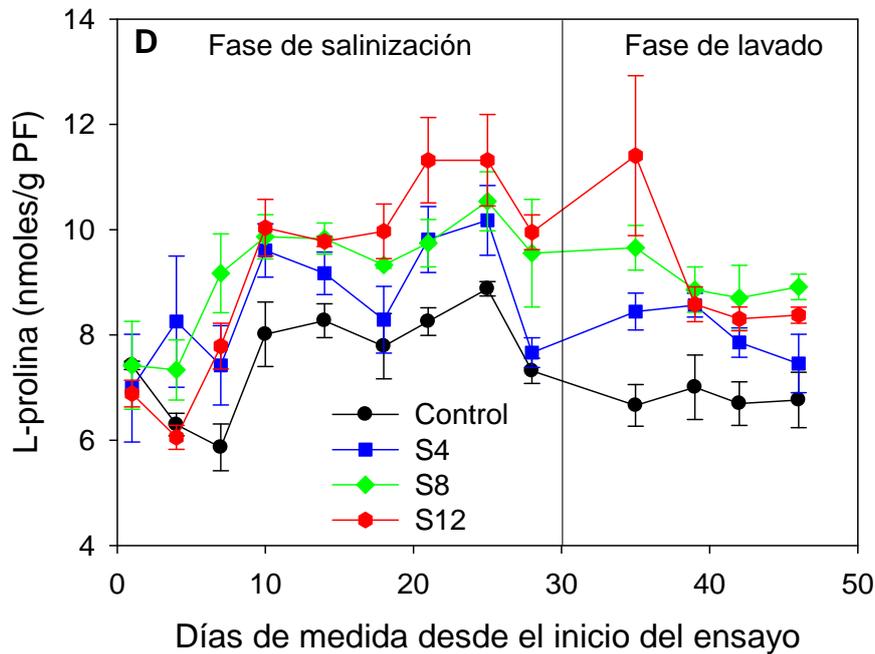


Figura 5.5D.- Evolución a lo largo del ensayo de la acumulación de L-prolina en hojas en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes.

7.3.2.3.2.- Intercambio gaseoso

La salinidad producía cambios a muy corto plazo en la tasa neta de fotosíntesis. A los 3 días de tratamiento tenía lugar un descenso en los valores de la tasa de fotosíntesis neta (P_n) y de la conductancia estomática (g_s) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. Los descensos en g_s fueron de aproximadamente un 15% para los tratamientos S4 y S12 y de un 25% para el tratamiento con la concentración media de NaCl (S8). Sin embargo, el descenso en P_n fue menor en plantas tratadas con el tratamiento S8 (13%) que con los tratamientos S4 (18%) y S12 (25%). Como consecuencia, las plantas sometidas al tratamiento S8 presentaron valores más altos en el uso eficiente del agua (WUE). A la semana de estrés, los valores de g_s presentaron un valor aproximado al 30% en todos los tratamientos, pero el efecto sobre P_n no fue el mismo para los diferentes tratamientos. En este sentido, el tratamiento S4 producía un descenso de un 10% en este parámetro, siendo las disminuciones de un 19% y de un 25% para los tratamientos S8 y S12, respectivamente. Como consecuencia, se producía un aumento del WUE en todos los tratamientos (Figuras 5.6A y 5.6B).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

A los 15 días de aplicación de los tratamientos se observaba de nuevo un descenso de g_s que era paralelo al aumento de la salinidad en el agua de riego (32%, 46% y 59% de descenso, respectivamente). Un comportamiento parecido tenía lugar con P_n , siendo el tratamiento S4 el que menos se afectaba y S12 el que mayor descenso sufría (35%) (Tabla 5.5). Los descensos en g_s provocaron, igualmente, un aumento en los valores del WUE en todos los casos. A los 30 días de estrés, parecía producirse una cierta adaptación de las plantas sometidas al tratamiento S4. En este sentido, el valor de g_s era un 10% mayor que el de las plantas control, mientras que en plantas tratadas con S8 y S12, los descensos en g_s eran menores a los registrados a los 15 días de estrés (37% y 28% de descenso, respectivamente) (Tabla 5.5). Con respecto a los valores de P_n , éstos no presentaron cambios importantes en plantas tratadas con S4 pero disminuyeron un 25% en plantas sometidas a los tratamientos S8 y S12 (Tabla 5.5). De nuevo se observaba un aumento en los valores del WUE en las plantas sometidas a los mayores niveles de estrés.

Finalmente, en la fase de lavado, los datos de g_s se incrementaron en todos los tratamientos, con relación a los datos presentados a los 30 días de estrés. Las plantas previamente tratadas con el menor nivel salino (S4) presentaron valores de g_s unos 70% mayores que el control. Sin embargo, los tratamientos S8 y S12 todavía dieron lugar a valores de g_s menores que las plantas control. En este sentido, las plantas previamente regadas con el tratamiento S8 presentaron un descenso el 34% en g_s y de sólo un 11% en las plantas previamente tratadas con S12. El aumento de g_s observado en plantas previamente tratadas con la menor salinidad dio lugar a un aumento de P_n de un 38%, mientras que en las plantas tratadas con el nivel medio de sal P_n se reducía un 12% y en las plantas previamente regadas con el mayor nivel salino P_n se incrementó un 23%. Como resultado, el WUE disminuía en el tratamiento S4 y aumentó, al igual que a los 30 días de estrés, en las plantas tratadas con S8 y S12 (Tabla 5.5).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

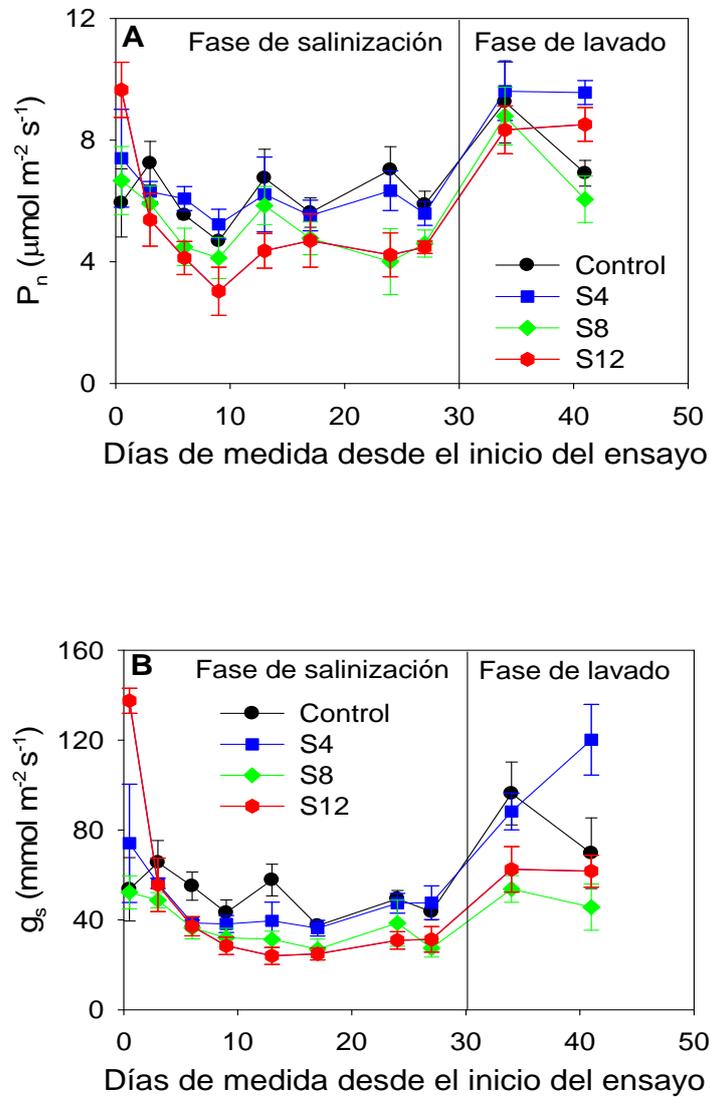


Figura 5.6.- Evolución a lo largo del ensayo de la tasa de fotosíntesis neta (P_n , A) y de la conductancia estomática (g_s , B) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Tabla 5.5.-Respuestas a la salinidad en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. regadas con diferentes concentraciones de NaCl sobre la tasa de fotosíntesis neta (P_n), sobre la conductancia estomática (g_s) y en el uso eficiente del agua (WUE) después de 15 y 30 días de tratamientos salinos así como al final de la fase de lavado.

Intercambio gaseoso	P_n ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	g_s ($\text{mmoles m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	WUE
15 Días			
Control	6,76±0,75b	57,74±7,07b	123±14a
S4	6,20±0,77b	39,54±8,30a	169±11b
S8	5,83 ±0,21ab	31,33±3,65a	197±17c
S12	4,37±0,22a	23,99±2,62a	189±12bc
^a F	3,35*	6,07**	8,82**
30 Días			
Control	5,88±0,43b	43,60±2,50b	135±6ab
S4	5,58±0,39ab	47,62±4,38b	121± 12a
S8	4,60±0,44a	27,42±2,79a	170±11b
S12	4,48±0,15a	31,32± 2,81a	148± 15ab
^a F	3,66*	9,08**	3,22*
Fase de lavado			
Control	6,92±0,42a	69,64± 11,64a	108±13ab
S4	9,56±0,19b	120,16±11,52b	82±8a
S8	6,06±0,76a	45,70± 6,37a	139±16b
S12	8,52± 0,35ab	61,66±4,50a	142±12b
^a F	10,89***	12,57***	4,99*

Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ($P<0.05$).^a Valores de F del análisis ANOVA de una vía para los parámetros P_n , g_s y WUE. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 99% (**), o 95% (*).

7.3.2.3.3.- Fluorescencia de clorofilas y síntesis de clorofila

Con respecto a los parámetros de fluorescencia, en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. regadas con los mayores niveles de salinidad 8 y 12 dS/m, se producía a los 15 días de aplicación de los tratamientos un descenso en los parámetros de *quenching* fotoquímico qP e $Y(II)$, aumentando de forma paralela los parámetros de *quenching* no fotoquímico [qN , NPQ e $Y(NPQ)$]. Sin embargo, a los 30 días de estrés aplicación del estrés tenía lugar una respuesta inversa: aumento de los parámetros de *quenching* fotoquímico [qP e $Y(II)$] y descenso de los parámetros de *quenching* no fotoquímico [qN , NPQ e $Y(NPQ)$]. Finalmente, después de la fase de lavado se pudo observar una alteración en el PSII de las plantas que previamente habían sido tratadas con NaCl, especialmente las S8 y S12, ya que tanto qP como los parámetros de *quenching* no fotoquímico, encargados de la disipación del exceso de energía en forma de calor, también disminuyeron (Tabla 5.6) y (Figura 5.7).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Los datos de fluorescencia de clorofilas están totalmente correlacionados con los observados para ETR (tasa de transporte electrónico) (Figuras 5.8). En este sentido, después de 15 días de estrés, la ETR era inferior en plantas tratadas con 8 y 12 dS/m que en las plantas control o las tratadas con el nivel más bajo de NaCl. Estos datos eran paralelos con los descensos observados en los parámetros qP e $Y(II)$. Además, la ETR se saturaba mucho antes en las plantas más estresadas, de modo que con una intensidad luminosa de unos 400 PAR no había transporte de electrones (Figura 5.8A). A los 30 días de estrés, la situación cambia totalmente, ya que en este caso, y de forma paralela al aumento de qP e $Y(II)$, la ETR era mayor en plantas tratadas con NaCl que en plantas control. En este caso, la ETR se saturaba mucho antes en las plantas tratadas con las mayores concentraciones de NaCl, siendo las plantas S4 las que presentaban un mayor transporte electrónico para intensidades luminosas superiores a 400 PAR (Figura 5.8A).

Después de la fase de lavado, los valores de ETR eran menores que los observados a 15 y 30 días de estrés (Figura 5.8C). Esto puede ser debido a que las plantas una vez finalizada la fase de lavado presentan una edad mayor que las plantas estresadas. En este caso, si bien qP era menor en las plantas recuperadas de los tratamientos más salinos (S8 y S12), de forma sorprendente, estas plantas presentaron un mayor ETR, lo cual estaba correlacionado con una mayor F_v/F_m y un menor valor de los parámetros de *quenching* no fotoquímico. Del mismo modo, en todos los tratamientos de plantas recuperadas se producía una rápida saturación del ETR, de modo que a una intensidad de 336 PAR, no había prácticamente transporte electrónico, excepto para las plantas S12. A intensidades menores (186 PAR), las plantas control y las previamente tratadas con 4 dS/m, presentaron valores de ETR muy bajos, siendo de cero para un PAR 281 (Figura 5.8B).

En respuesta a la salinidad, las plantas de *E. myrtifolia* incrementaron sus niveles de clorofila. Estos cambios fueron significativos en la primera semana de estrés para todos los tratamientos y en la segunda semana para las plantas tratadas con el mayor nivel salino. En la tercera y cuarta semanas, los niveles de clorofila también fueron mayores en las plantas estresadas, pero las diferencias no fueron significativas. En la fase de lavado fue donde más diferencias se apreciaron en los niveles de clorofila totales. Al final de esta fase las plantas previamente sometidas a los estreses S8 y S12 presentaron unos niveles de clorofila un 50 % superior a las plantas control (Figura 5.9).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Tabla 5.6. Efecto de la salinidad en parámetros de fluorescencia de hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de 15 y 30 días de tratamientos y al final de la fase de lavado.

Fluorescencia	qP	Y(II)	Fv/Fm	qN	NPQ	Y(NPQ)
15 Días						
Control	0,773c	0,473c	0,761b	0,620a	0,273a	0,273a
S4	0,765bc	0,463ab	0,751a	0,639a	0,271a	0,278a
S8	0,754ab	0,469b	0,765c	0,663b	0,313b	0,302b
S12	0,745a	0,419a	0,758b	0,717c	0,368c	0,344c
^a F	5,54***	19,98***	28,69***	33,44***	36,84***	28,80***
30 Días						
Control	0,754a	0,401a	0,744b	0,743c	0,396c	0,365c
S4	0,829d	0,453b	0,705a	0,644b	0,260bc	0,276b
S8	0,769b	0,470c	0,764c	0,633b	0,272b	0,275b
S12	0,805c	0,480c	0,741b	0,606a	0,240a	0,252a
^a F	67,71***	56,59***	86,00***	57,34***	82,38***	69,41***
Fase de lavado						
Control	0,715b	0,295a	0,682b	0,832c	0,522d	0,476c
S4	0,735b	0,291a	0,647a	0,820c	0,461c	0,458c
S8	0,622a	0,299a	0,706c	0,765b	0,404b	0,431b
S12	0,648a	0,343b	0,730d	0,725a	0,367a	0,391a
^a F	15,32***	9,70***	49,87***	61,21***	43,55***	19,57***

Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ($P < 0.05$). ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los diferentes parámetros de fluorescencia. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

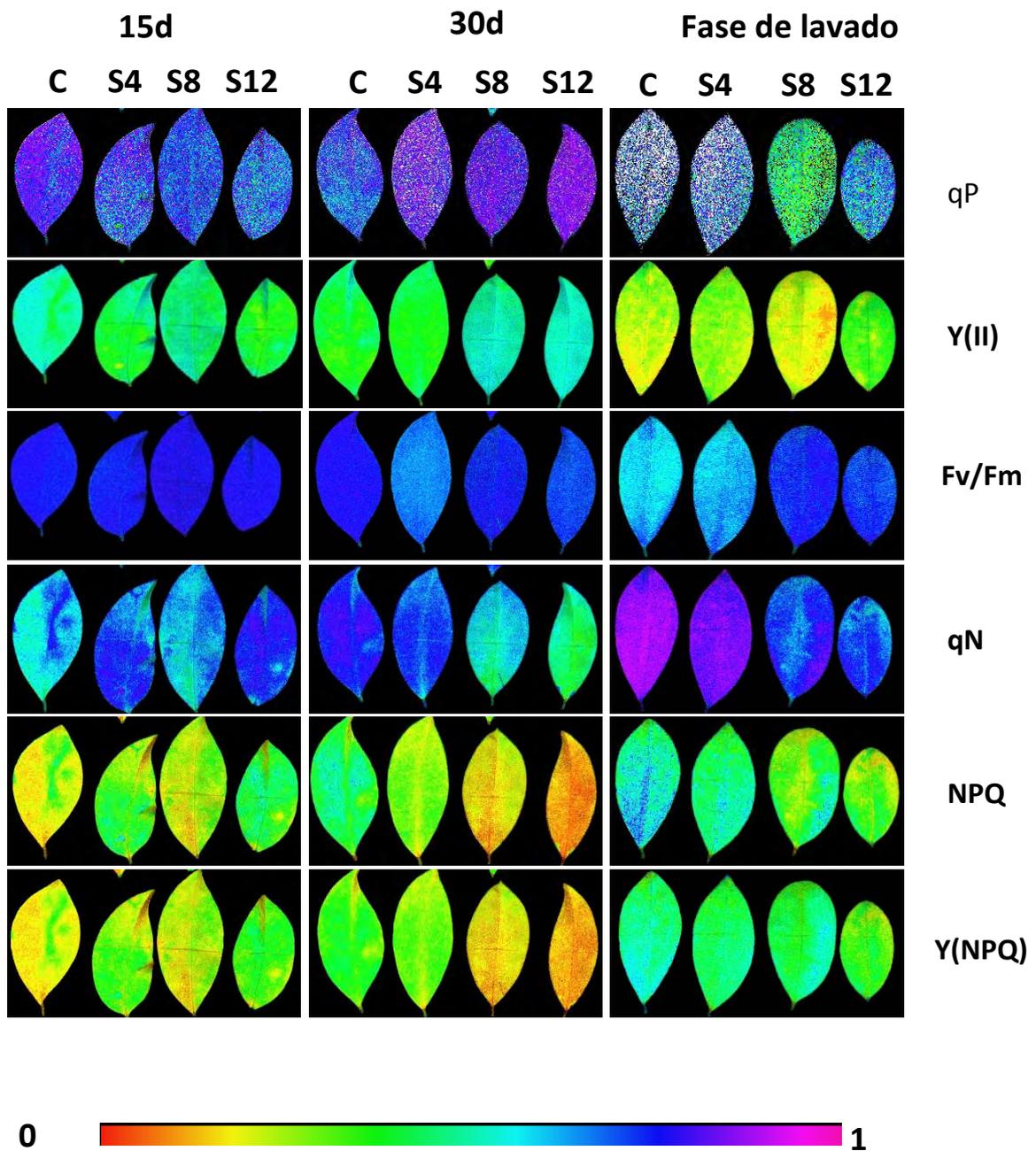


Figura 5.7.- Imágenes de diferentes parámetros de fluorescencia en hojas de *Eugenia myrtifolia* L. crecidas en ausencia y en presencia de diferentes niveles de NaCl (Control, S4, S8 y S12) durante 15 y 30 días de tratamientos salinos, así como al final de la fase de lavado.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

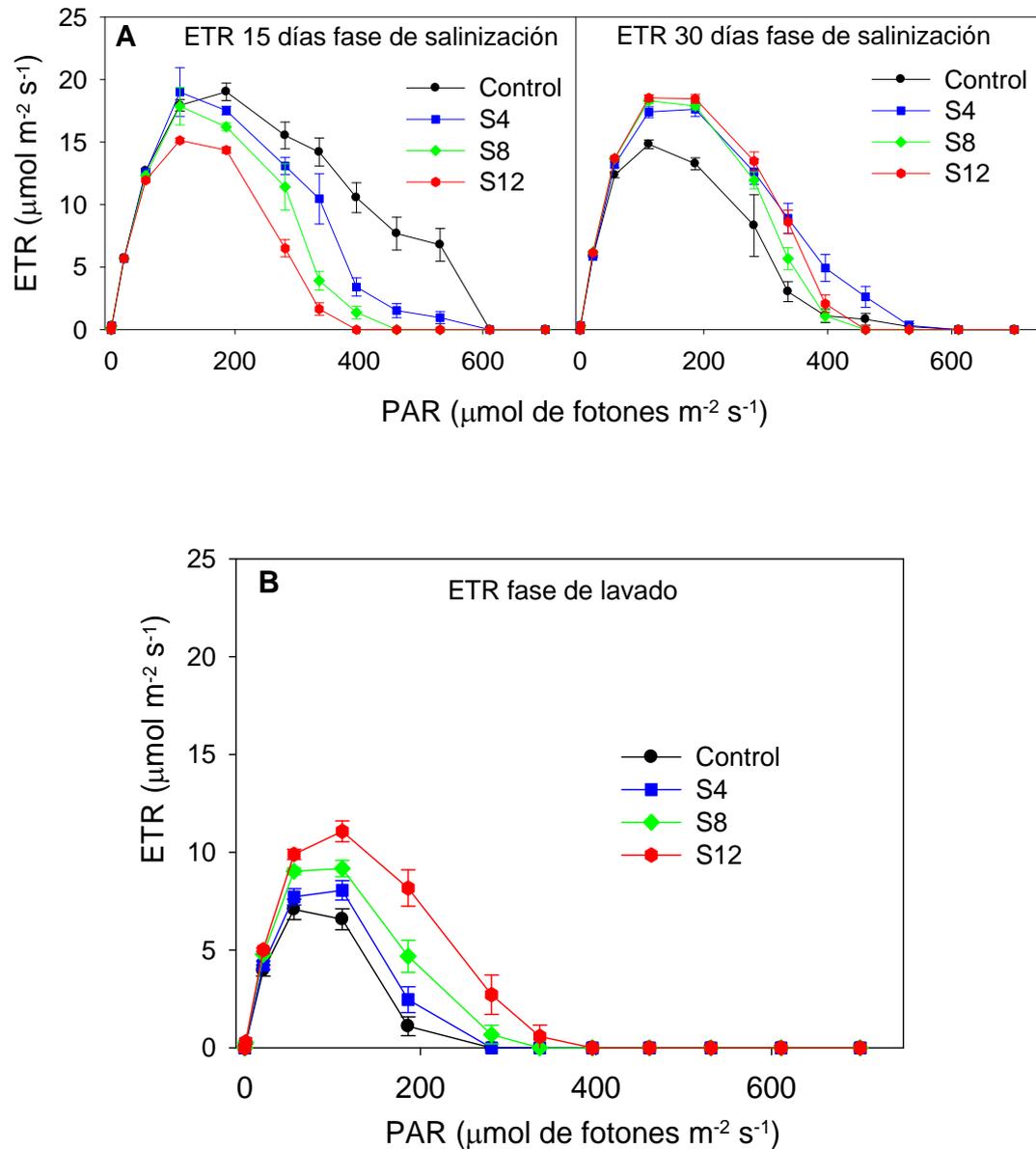


Figura 5.8.-Efecto de la salinidad sobre la tasa de transporte electrónico (ETR) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. crecidas en ausencia y en presencia de diferentes niveles de NaCl (Control, S4, S8 y S12) durante 15 y 30 días de tratamientos (A), así como al final de la fase de lavado (B). Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

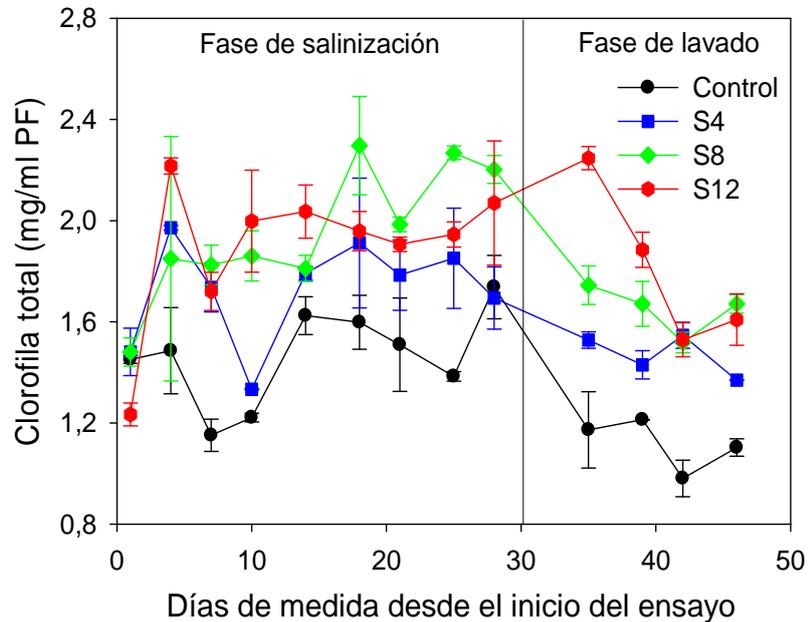


Figura 5.9.- Evolución a lo largo del ensayo de la síntesis de clorofilas en hojas en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 4 plantas diferentes.

7.3.2.4.- Termografía

En la Figura 5.10 se muestra una evolución de los datos de termografía foliar en las plantas de *E. myrtifolia*. Al final de la fase de salinización se produjo una separación entre los diferentes tratamientos. En este sentido, las hojas de las plantas control y las S4 presentaban una menor temperatura que las hojas de las plantas S8 y S12. Esta separación era todavía más clara al final de la Fase de lavado en la que de nuevo las plantas S8 y S12 presentaban una temperatura foliar casi un grado centígrado mayor que las plantas control y S4.

En los procesos de eliminación de energía en forma de calor también participan los mecanismos de quenching no fotoquímico, incluyendo procesos de disipación controlados [qN, NPQ, Y(NPQ)] y no controlados [Y(NO)]. Los datos de los primeros se muestran en la Tabla 5.6 y en la Figura 5.11 se muestra una imagen de los valores de Y(NO), en la que se puede apreciar un aumento de este parámetros con la salinidad. Todos estos parámetros pueden contribuir a un aumento de la temperatura de la hoja.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

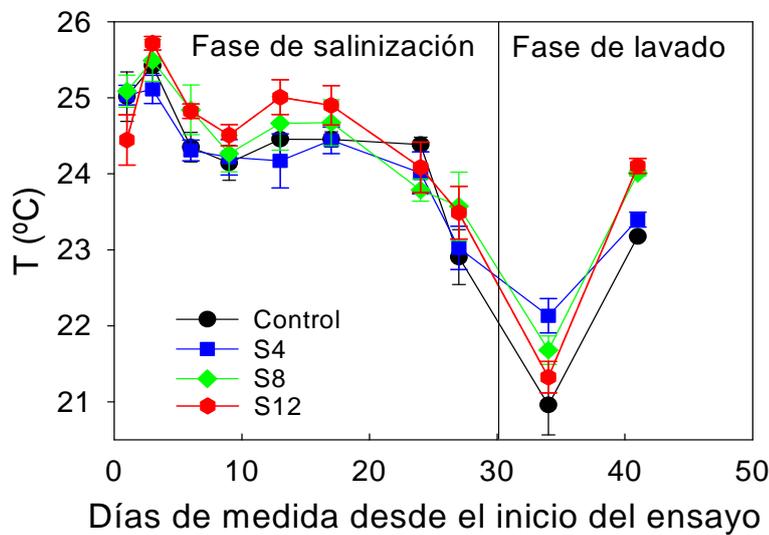


Figura 5.10.- Respuestas a la salinidad estimadas sobre la evolución en la temperatura foliar medida en plantas de *Eugenia myrtiflora* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. Los datos representan los valores medios \pm error estándar de al menos 6 plantas diferentes.

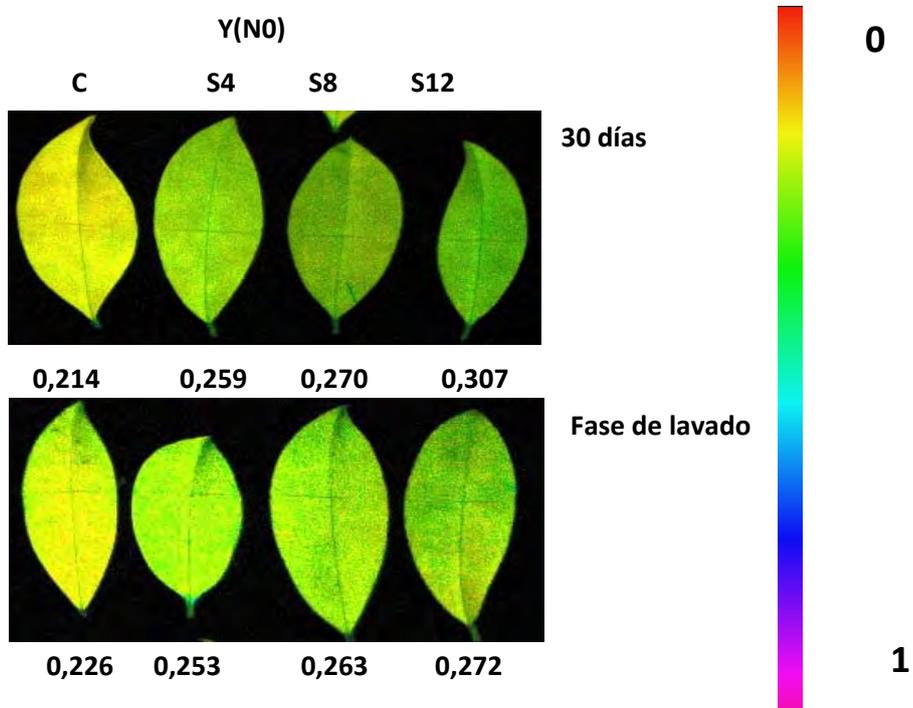


Figura 5.11.- Imágenes del parámetro de fluorescencia Y (NO) en hojas de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. a los 30 días de aplicar tratamientos y al final de la fase de lavado.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

7.3.2.5.- Microscopía

Con respecto a los parámetros de microscopía, a los 30 días de aplicación de los tratamientos se observó un mayor porcentaje de parénquima en empalizada en las plantas S8, comparadas con el resto de tratamientos. Estas mismas plantas presentaron también los porcentajes más bajos de parénquima esponjoso, siendo las diferencias significativas cuando se comparan con el resto de los tratamientos. Los espacios intercelulares fueron significativamente mayores en todas las plantas sometidas a salinidad.

Al final de la fase de lavado, todas las plantas que previamente habían sido sometidas a salinidad presentaron mayores porcentajes de parénquima en empalizada y menores porcentajes de parénquima esponjoso, con respecto a los controles. Sólo las plantas previamente sometidas al tratamiento S4 presentaron mayores porcentajes de espacios intercelulares.

Tabla 5.7A.- Respuesta a la salinidad estimadas sobre distintos parámetros relacionados con la anatomía de las hojas de plantas *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase de salinización.

Microscopía	Tratamientos				^a F
	Control	S4	S8	S12	
P. empalizada	36,92±0,68a	36,16±1,08a	45,71±0,74b	36,31±0,95a	14,64***
P. esponjoso	46,57±0,70b	40,93±1,80b	31,41±1,91a	42,92±1,35b	9,83***
E. intercelular	16,34±0,83a	21,94±0,97b	22,89±1,55b	20,78±0,75b	6,41**

Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ($P < 0.05$). ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los parámetros parénquima en empalizada, parénquima en esponjoso y espacio intercelular. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99% (**) y 99.9% (***).

Tabla 5.7B.- Respuesta a la salinidad estimadas sobre distintos parámetros relacionados con la anatomía de las hojas de plantas *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase de lavado.

Microscopía	Tratamientos				^a F
	Control	S4	S8	S12	
P. empalizada	33,85±0,87a	44,94±0,83c	43,04±0,79c	39,27±1,28b	22,94***
P. esponjoso	49,60±1,42d	30,67±1,09a	39,79±1,78b	43,88±0,19c	40,51***
E. intercelular	16,53±0,65a	24,43±0,93b	17,33±1,49a	16,86±0,17a	12,34***

Letras diferentes entre filas indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ($P < 0.05$). ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los parámetros parénquima en empalizada, parénquima en esponjoso y espacio intercelular. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

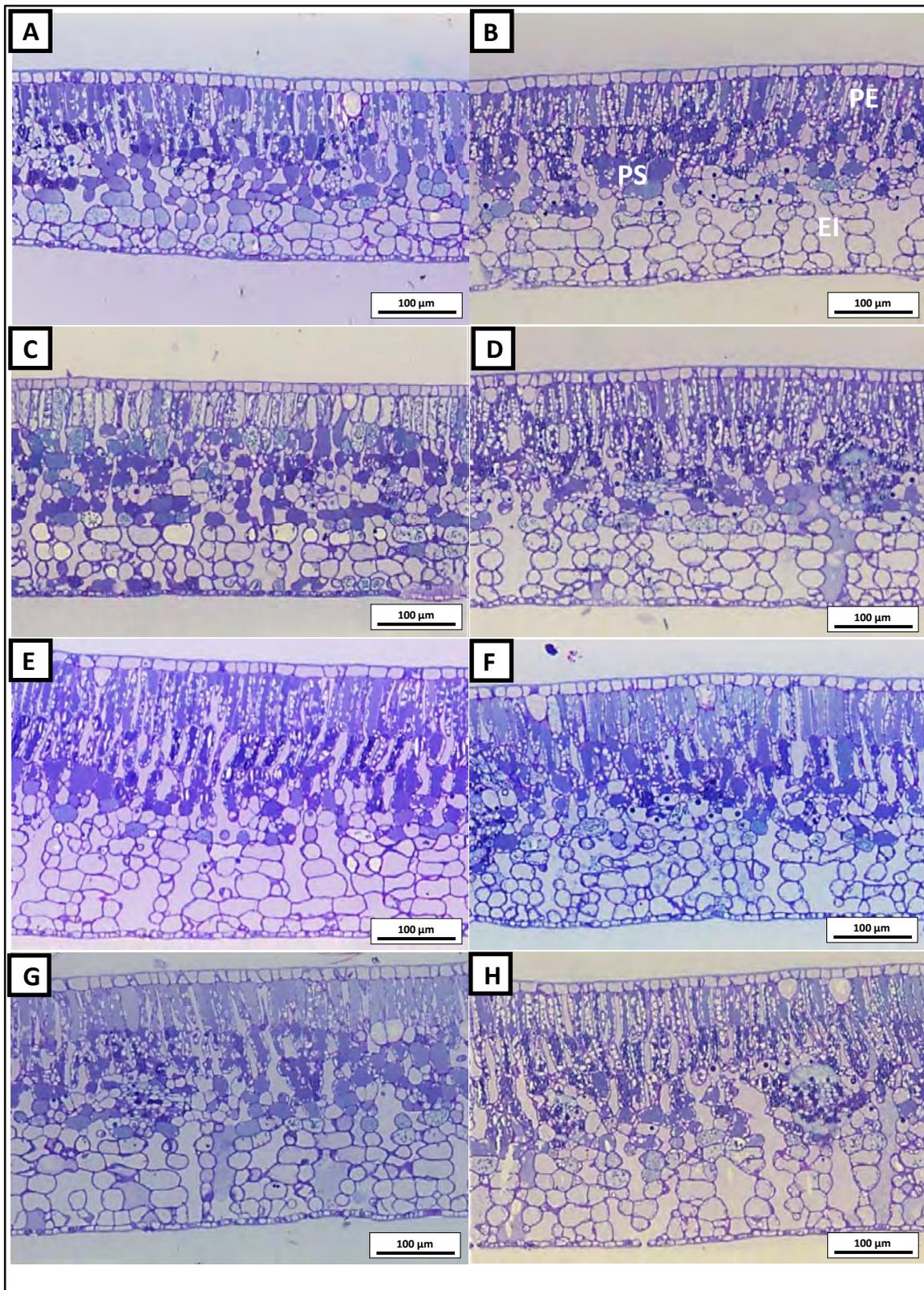


Figura 5.12.-Secciones semifinas de hojas de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. vistas al microscopio óptico de campo claro y teñidas con azul de toluidina al final de la fase de salinización (A: Control, C: S4, E:S8 y G:S12) y al final de la fase de lavado (B: Control, D:S4, F:S8 y H:S12). PE parénquima en empalizada; PS, parénquima esponjoso y EI, espacio intercelular.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

7.3.2.6.- Metabolismo antioxidativo

7.3.2.6.1.- Pérdida de electrolitos y peroxidación lipídica

La pérdida de electrolitos se analizó en plantas sometidas a estrés salino durante 15 y 30 días y en la fase de lavado. Los resultados mostraron que niveles de salinidad bajos no afectaban de forma significativa a este parámetro. Sin embargo, el tratamiento S8 producía un aumento en la pérdida de electrolitos en hoja. Este efecto era todavía mayor en plantas sometidas a un mayor estrés (S12), donde la pérdida de electrolitos llegó a aumentar hasta un 25% con respecto a plantas no tratadas. Estos datos, reflejaban que tanto en los tratamientos S8 como en los S12 se producía un daño en las membranas (Tabla 5.8). En la fase de lavado, no se observaron cambios significativos en la pérdida de electrolitos en plantas que previamente habían sido tratadas con un nivel salino de 8dS/m (Tabla 5.8). Sin embargo, en las plantas recuperadas del estrés, previamente regadas con el mayor nivel de salinidad (12 dS/m), seguían presentando un valor de pérdida de electrolitos significativamente superior al de las plantas control (Tabla 5.8).

Los datos de pérdida de electrolitos se complementaron con datos de peroxidación de lípidos de membranas (medido como TBARS). Estos datos estaban bastante correlacionados con los obtenidos para la pérdida de electrolitos. En este sentido, después de 15 días de tratamiento salino, los tratamientos S8 y S12 presentaron un aumento significativo de TBARS. Un comportamiento similar ocurría después de 30 días de salinidad (Tabla 5.8). En la fase de lavado, a diferencia de lo observado para la pérdida de electrolitos, se seguía observando un aumento de TBARS en plantas previamente tratadas con 8 y 12 dS/m, lo que indicaba que podrían seguir presentando daños en las membranas (Tabla 5.8).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Tabla 5.8.- Respuesta frente a diferentes niveles de salinidad en la pérdida de electrolitos y la peroxidación de lípidos de membranas de hojas de *Eugenia myrtifolia* L. a los 15 y tras 30 días de tratamientos y al final de la fase de lavado.

Parámetros de estrés oxidativo	Pérdida Electrolitos (%)	Peroxidación Lipidos (nmoles TBARS/g PF)
15 Días		
Control	32,70±0,34a	2,87±0,07a
S4	33,52±0,45a	3,29±0,1ab
S8	38,75±0,69b	3,82±0,26b
S12	39,45±0,44b	4,23±0,38b
^a F	16,49***	6,33*
30 Días		
Control	33,65±0,64a	3,20±0,22b
S4	34,33±0,54a	3,52±0,19b
S8	39,66±0,99b	4,12±0,26a
S12	42,11±1,22b	4,51±0,31a
^a F	21,35***	4,92*
Fase de lavado		
Control	34,07±1,44a	4,87±0,16a
S4	34,35±0,32a	4,45±0,14a
S8	35,26±0,59a	5,78±0,28b
S12	40,48±1,07b	6,05±0,35b
^a F	19,85***	10,85**

Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ($P < 0.05$). ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los diferentes parámetros de estrés oxidativo medidos, pérdida de electrolitos y peroxidación de lípidos. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 99% (**) y 95% (*).

7.3.2.6.2.- Detección de ROS por técnicas histoquímicas

La tinción histoquímica con 3,3' diaminobencidina (DAB) mostró una acumulación de H₂O₂ en las venas principales tanto en plantas tratadas con 4 dS/m como en plantas regadas durante 15 días con una salinidad 8dS/m. Sin embargo, esta tinción pudo prevenirse en presencia de ácido ascórbico 10 mM, lo que reflejaba la especificidad de la tinción con DAB (Figura 5.13). La tinción con NBT puso de manifiesto la presencia de una acumulación de radicales superóxido en puntos aislados de las hojas de plantas salinas. Esta tinción se podía prevenir por la incubación en presencia de 10 mM MnCl₂, lo que igualmente reflejaba la especificidad de la tinción de radicales O₂⁻ con NBT (Figura 5.14).

A los 30 días de estrés salino también incluimos en estos análisis plantas sometidas a un mayor estrés (S12) con el fin de comprobar si había una correlación entre los valores de pérdida de electrolitos y de peroxidación

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

lipídica y una mayor acumulación de ROS en hojas. En plantas tratadas con el nivel bajo de NaCl se observó una pequeña presencia de H_2O_2 en las venas, niveles que eran un poco más intensos en hojas de plantas tratadas con 8dS/m. Sin embargo, en plantas tratadas con el mayor nivel de NaCl se observaban acúmulos de H_2O_2 en las hojas cerca del nervio principal (Figura 5.15 D, E).

La tinción en presencia de NBT no mostraba acumulación de radicales $O_2^{\cdot -}$ en plantas tratadas con al menor concentración de NaCl. Sin embargo, en plantas tratadas con 8 dS/m NaCl se apreciaba una débil tinción con NBT que era más intensa en hojas de plantas regadas con el mayor nivel salino (S12) (Figura 5.16).

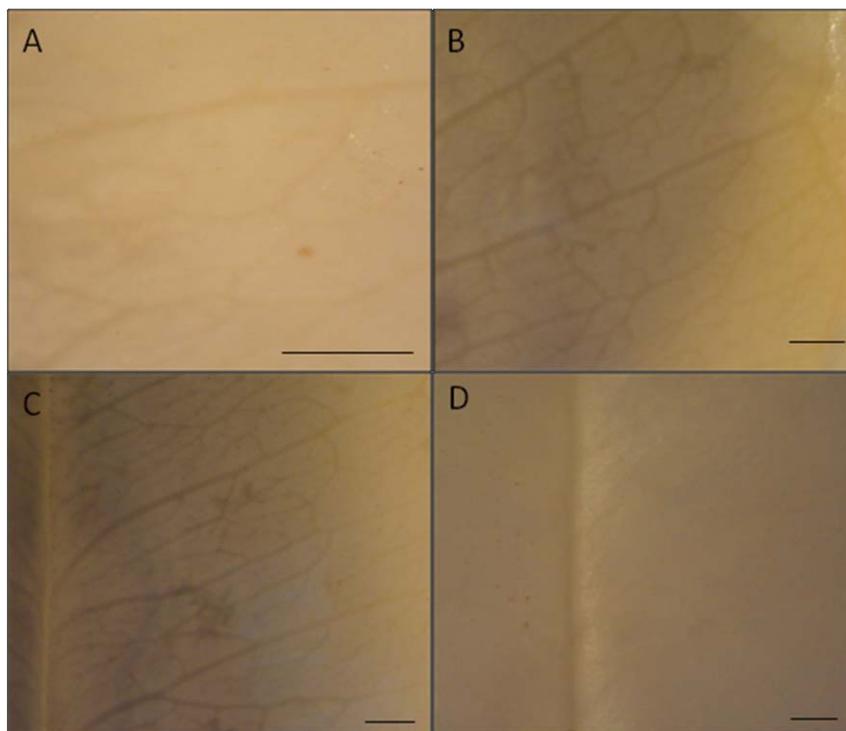


Figura 5.13.- Efecto de la salinidad en la acumulación de H_2O_2 en hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de 15 días de tratamiento. El H_2O_2 se detecta mediante tinción histoquímica con DAB. A: Control, B: S4, C: S8, D: tinción en presencia de 10 mM ascorbato Barra: 0,5 mm.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

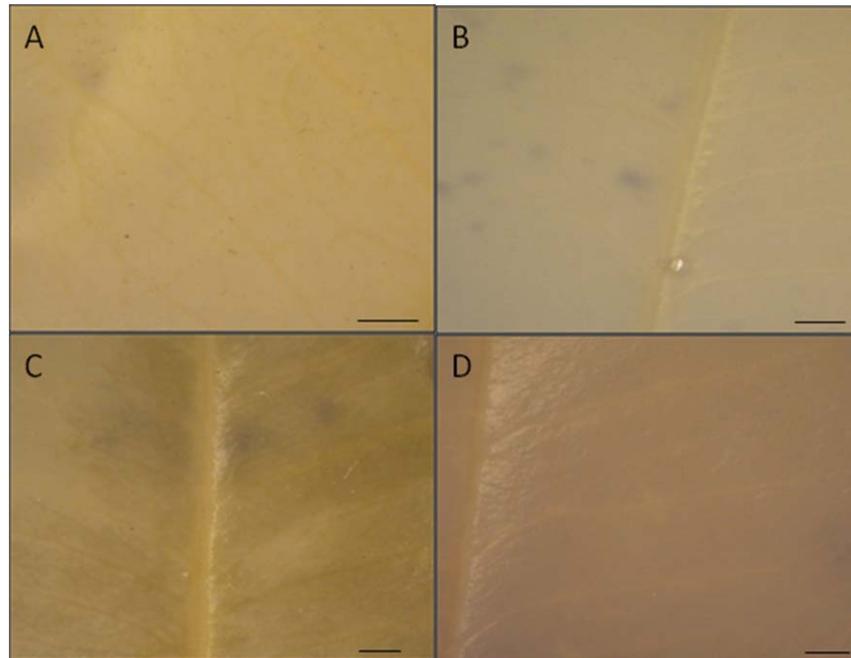


Figura 5.14.- Efecto de la salinidad en la acumulación de radicales superóxido en hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de 15 días de tratamiento. Los radicales $O_2^{\cdot -}$ se detectaron mediante tinción histoquímica con NBT. A: Control, B: S4, C: S8 y D: tinción en presencia de 10 mM $MnCl_2$. Barra: 0,5 mm.

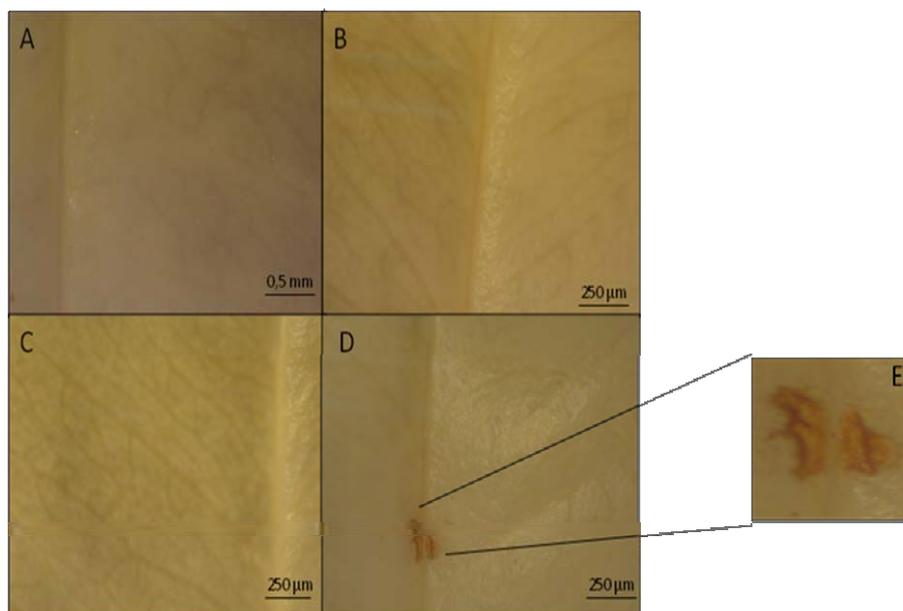


Figura 5.15.- Efecto de la salinidad en la acumulación de H_2O_2 en hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de 30 días de estrés. El H_2O_2 se detectó mediante tinción histoquímica con DAB. A: Control, B: S4, C: S8, D: S12 y E: detalle de la lesión mostrada en D.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

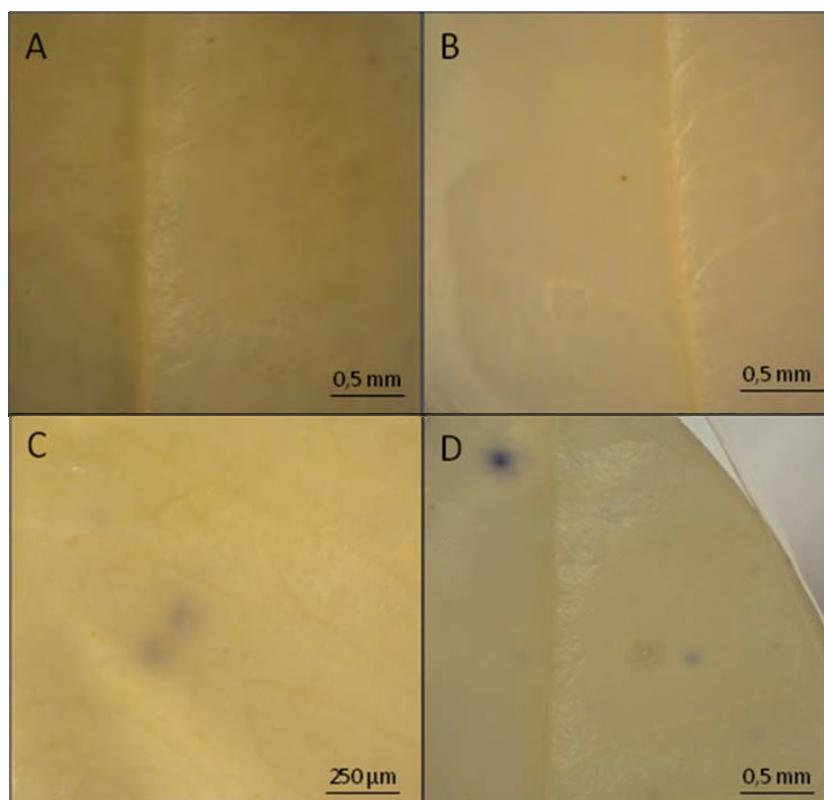


Figura 5.16.- Efecto de la salinidad en la acumulación de radicales superóxido en hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de 30 días de tratamiento. Los radicales superóxido se detectaron mediante tinción histoquímica con NBT. A: Control, B: S4; C: S8, D: S12.

En la fase de lavado se observó una acumulación de H_2O_2 en el nervio central en todos los tratamientos, si bien las plantas previamente tratadas con el nivel más alto de salinidad seguían presentando pequeños acúmulos de H_2O_2 (Figura 5.17). Una respuesta similar tenía lugar después de la tinción con NBT, ya que las hojas de plantas previamente estresadas con el mayor nivel salino seguían presentando acumulación de radicales superóxido (Figura 5.18). Esta respuesta que presentaban las plantas previamente tratadas con NaCl 12 dS/m, con acumulación de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$, estaba correlacionada con los datos de pérdida de electrolitos y de peroxidación lipídica, los cuales todavía eran mayores en plantas S12 recuperadas que en los controles o en las plantas previamente tratadas con niveles más bajos de NaCl.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

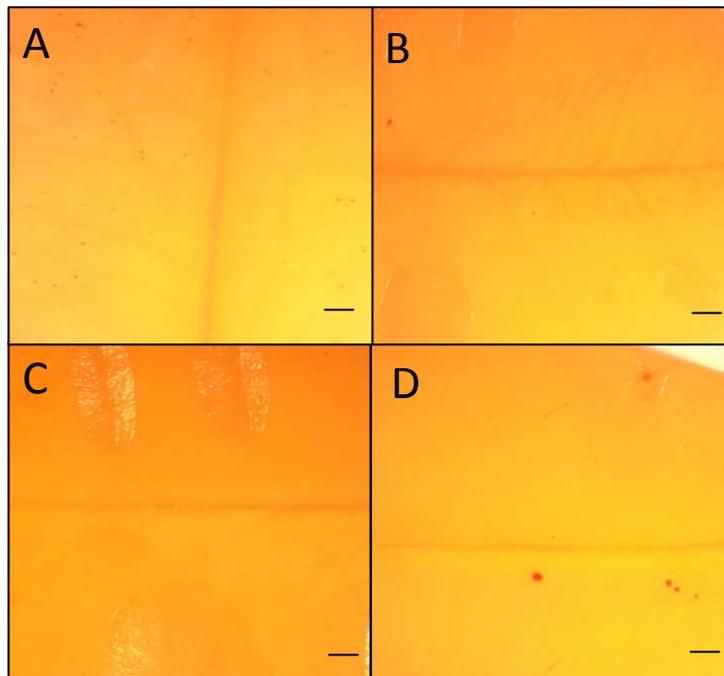


Figura 5.17.- Efecto de la salinidad en la acumulación de H_2O_2 en hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de la fase de lavado. El H_2O_2 se detectó mediante tinción histoquímica con DAB. A: Control, B: S4, C: S8, D: S12.

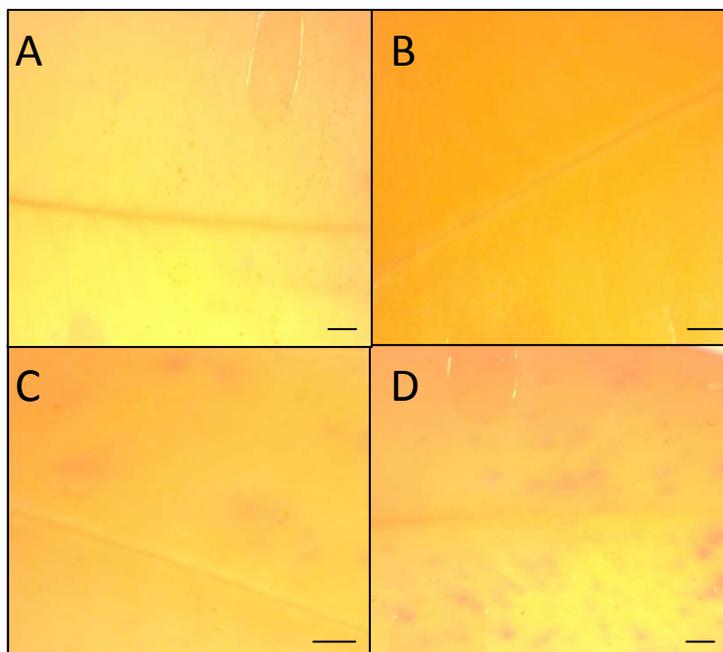


Figura 5.18.- Efecto de la salinidad en la acumulación de $O_2^{\cdot -}$ en hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de la fase de lavado. Los radicales superóxido se detectaron mediante tinción histoquímica con NBT. A: Control, B: S4, C: S8, D: S12.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

7.3.2.6.3.- Enzimas antioxidantes

De forma paralela, se analizó el efecto de la salinidad sobre la actividad de algunas enzimas antioxidantes después de 15 y 30 días de tratamiento salino, así como en la fase de lavado. Después de 15 días de tratamiento se observó un aumento de la actividad catalasa tanto en el tratamiento S4 (2.4 veces) como en S8 (1.8 veces). El aumento de actividad catalasa en plantas S4 estaba acompañado de un descenso de un 44% de actividad APX. No se observaron cambios en las actividades MDHR ni GR. El nivel de salinidad S8 producía un aumento de 2 veces de la actividad SOD, pero sin embargo reducía en unas 3.2 veces la actividad POX soluble (Tabla 5.9).

A los 30 días de estrés, en las plantas S4 se producía un aumento de actividad catalasa, no observándose cambios en las plantas S8 con respecto a las plantas control. Además, se observó un descenso progresivo de actividad APX con el nivel de salinidad. Así, el descenso era de un 41% después de 30 días en el tratamiento con S4, y de unas 3 veces en las plantas S8. Por otro lado, el nivel S4 aumentó la actividad GR (70%), mientras que el nivel S8 inducía las actividades MDHAR (1,5 veces), SOD (27%), y de nuevo presentaban una fuerte reducción de la actividad POX (3,5 veces) (Tabla 5.9).

En plantas recuperadas del estrés, tenía lugar un aumento de la actividad catalasa (30% para plantas S4 y 38% para plantas S8) así como una recuperación de los niveles de actividad APX, con respecto a los niveles de plantas controles. Por otro lado, las actividades MDHAR y GR decrecieron en plantas S4, mientras que la actividad SOD fue 1,4 y 1,8 veces mayor en plantas recuperadas del tratamiento S4 y S8, respectivamente (Tabla 5.9). Finalmente, si bien la actividad POX presentó un descenso generalizado en todos los tratamientos en las plantas recuperadas, sus niveles eran significativamente mayores en el tratamiento S8, con respecto a los controles (Tabla 5.9).

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Tabla 5.9.- Efecto de la salinidad en la actividad de enzimas antioxidantes de hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de 15 y 30 días de tratamiento salino y al final de la fase de lavado.

Enzimas antioxidantes	CAT	APX	MDHAR	GR	SOD	POX
15 Días						
Control	51,1 ±4,1a	43,3±0,1b	564,4±29,2a	34,8±2,0a	71,4±3,1a	182,3±24,1b
S4	124,6±23,2b	24,4±2,9a	560,1±29,3a	37,5±4,4a	85,1±2,6a	152,9±12,4b
S8	94,0±2,0b	37,4±1,8ab	646,5±35,8a	39,5±8,2a	146,9±12,1b	56,4±5,4a
^a F	9,0**	15,4**	2,4n.s	0,1n.s	13,0**	11,9**
30 Días						
Control	83,8±7,2ab	39,6±3,2a	274,9±15,9a	23,1±2,4a	100,9±2,8b	159,0±15,9b
S4	109,1±14,8b	21,2±2,9b	283,0±19,5a	39,6±2,3b	119,0±6,2a	153,1±4,6b
S8	69,9±2,7a	11,0±2,1b	402,0±20,5b	26,7±1,3a	127,3±8,3a	45,6±4,6a
^a F	4,1*	20,3***	18,2***	16,2**	5,6*	30,9***
Fase de lavado						
Control	128,6±6,4b	22,9±1,4a	244,7±21,2b	38,5±6,3b	168,2±7,8a	30,7±1,2b
S4	167,4±3,4a	24,3±2,0a	188,1±5,5a	20,6±4,4a	232,1±11,1b	31,4±2,9ab
S8	177,1±3,8a	24,8±4,3a	233,6±15,7b	32,0±2,8b	295,8±5,6c	37,9±2,4a
^a F	22,1***	3,3ns	4,6*	4,19*	41,26***	3,2*

Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ($P < 0.05$). ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para las diferentes enzimas analizadas. Las enzimas CAT y POX se expresan en $\mu\text{mol min}^{-1}$ / g PF, las actividades APX, MDHAR y GR se expresan en nmol min^{-1} / g PF y la actividad SOD se expresa en U/g PF. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 99% (**), o 95% (*). n.s: no significativo

7.3.2.6.4.- Antioxidantes no enzimáticos

En plantas de *Eugenia myrtifolia* L. se estudió el efecto de la salinidad sobre los niveles de glutatión y ascorbato presentes en hojas. Al igual que para las enzimas antioxidantes, no se analizaron las plantas regadas con el nivel más alto de salinidad. A corto plazo, la salinidad producía un aumento en los niveles de glutatión reducido (GSH), que era de 5 veces en plantas regadas con 4 dS/m y de 2,5 veces en plantas S8 (Tabla 5.10). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en los niveles del glutatión oxidado (GSSG), si bien estos valores eran más altos en plantas control. El aumento en GSH se vio reflejado en los niveles de glutatión totales, siendo los aumentos de 2,5 y de 1,4 veces, en comparación con los niveles del control (Tabla 5.10). El menor nivel de GSH detectado en plantas controles, hizo que éstas presentasen un estado rédox del glutatión más bajo que las plantas tratadas con NaCl (Tabla 5.10).

A largo plazo, las plantas de S4 y S8 presentaron mayores contenidos de GSH que las plantas control, pero los cambios solamente fueron significativos en plantas tratadas con S8, cuyos niveles eran de 2,7 veces los valores control (Tabla 5.10). En este periodo, de forma sorprendente las plantas control acumularon más GSSG que las plantas estresadas. En

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

concreto, las plantas tratadas con 4 y 8 dS/m de NaCl presentaron valores de GSSG un 24% y un 37% menor que el de las plantas controles, respectivamente (Tabla 5.10). Debido al aumento de GSSG en plantas controles, los niveles de glutatión total fueron muy parecidos en todos los tratamientos. La salinidad hizo disminuir el estado redox del glutatión en los tres tratamientos, pero todavía seguía siendo más alto en plantas estresadas que en plantas controles (Tabla 5.10). Después de la fase de lavado, de nuevo, las plantas previamente tratadas con NaCl presentaron mayor contenido de GSH que las plantas controles. Estos aumentos oscilaron entre unas 2,4 veces y 3,2 veces para plantas tratadas con 4 y 8 dS/m, respectivamente (Tabla 5.10). Al igual que lo observado en plantas estresadas durante 30 días, las plantas control acumularon más GSSG que las plantas previamente estresadas. En este sentido, dichas plantas presentaron unos valores de GSSG un 35% más bajo que las plantas control (Tabla 5.10). Esta acumulación de GSSG en las plantas control y el mayor nivel de GSH en plantas estresadas hizo que los niveles de glutatión total fuesen estadísticamente similares en los tres tratamientos (Tabla 5.10). La acumulación de GSSG en plantas control dio lugar a un bajo estado redox del glutatión. Este parámetro se recuperó parcialmente en plantas previamente tratadas con 4 dS/m y se mantuvo en niveles similares a los 30 días de estrés en plantas previamente tratadas con 8 dS/m (Tabla 5.10). De forma paralela, se analizaron los niveles de ascorbato en hoja. En este caso, los niveles de ascorbato oxidado no se detectaron. Por este motivo, sólo se presentan datos de la forma reducida del ascorbato (ASC). A corto plazo, la salinidad producía un aumento de los contenidos de ASC, pero las diferencias sólo fueron significativas en plantas tratadas con la menor concentración de NaCl, donde los niveles eran 1,4 veces mayores a los observados en plantas control (Tabla 5.10).

Sin embargo, a largo plazo tenía lugar un comportamiento contrario. En este caso, y a diferencia de los observados para el GSH, la salinidad producía un descenso de los niveles de ASC (Tabla 5.10). En plantas recuperadas, los niveles de ASC subieron fuertemente en los tres tratamientos. Sin embargo, estos niveles fueron mucho mayores en plantas control que en plantas recuperadas del estrés salino. En este sentido, las plantas recuperadas presentaron unos niveles de ASC entre 3 (4 dS/m) y 4 veces menores (8 dS/m) que las plantas controles, respectivamente (Tabla 5.10). Es de destacar el aumento de ASC con el tiempo en plantas de *Eugenia myrtifolia* L.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Tabla 5.10.- Efecto de la salinidad en los niveles de glutatión y ascorbato de hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de 15 y 30 días de tratamiento y una vez finalizada la fase de lavado.

Antioxidantes no enzimáticos	GSH (nmol/ g PF)	GSSG (nmol/ g PF)	GSHT (nmol/ g PF)	E. Redox GSH/GSHT	Ascorbato (μmol/ g PF)
15 Días					
control	1,07±0,12a	1,62±0,15a	2,68±0,12a	0,40	6,20±0,09ba
S4	5,35±0,13c	1,55±0,26a	6,73±0,13c	0,79	8,91±0,46b
S8	2,64±0,35b	1,12±0,07a	3,76±0,35b	0,70	7,56±0,40ab
^a F	41,89***	3,02n.s	40,84***		6,80*
30 Días					
control	0,83±0,25a	3,58±0,07b	4,13±0,25a	0,20	9,61±0,28b
S4	1,02±0,20a	2,73±0,18a	3,73±0,19a	0,27	6,94±0,20a
S8	2,29±0,26b	2,26±0,21a	4,54±0,26a	0,50	7,50±0,78a
^a F	10,31**	15,29**	3,00n.s		9,32**
Fase de lavado					
control	0,86±0,19a	4,01±0,16b	4,87±0,23a	0,18	48,04±8,31b
S4	2,09±0,28b	2,66±0,34a	4,74±0,28a	0,44	15,83±3,93a
S8	2,73±0,33b	2,55±0,23a	5,28±0,32a	0,52	11,89±1,88a
^a F	7,88**	8,00**	0,78n.s		12,65**

Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Duncan ($P < 0.05$). ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los niveles de ascorbato y glutatión. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 99% (**), o 95% (*). n.s: no significativo.

7.4.- Discusión

Los diferentes niveles de salinidad aplicados produjeron respuestas distintas en el crecimiento de las plantas. Los niveles más bajos de NaCl (4 dS m⁻¹) estimularon el crecimiento de las plantas durante el ensayo, los niveles intermedios de NaCl (8 dS m⁻¹) no afectaron de forma significativa, aunque al final del ensayo se producía un descenso en el área foliar mientras que con los niveles más altos, (12 dS m⁻¹) de NaCl todos los parámetros de crecimiento estudiados se vieron afectados negativamente. Este comportamiento constituye un mecanismo para limitar la pérdida de agua por transpiración (Savé *et al.*, 1994), lo que viene avalado por el incremento de los valores del cociente entre el peso seco de la raíz y la parte aérea en los tratamientos S8 y S12. Bajo condiciones de salinidad, este cociente también podría mejorar la capacidad de las plantas de limitar la acumulación de iones fitotóxicos en la parte aérea (Munns y Tester, 2008), como se corrobora con los tratamientos más severos. En este sentido, en algunas especies ornamentales se han descrito las reducciones en el crecimiento y en la acumulación de materia seca como un mecanismo de respuesta a la salinidad (Bañón *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2012;

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

Cassaniti *et al.*, 2009, 2012) aunque, como se ha comprobado en este ensayo y en otros, las respuestas positivas o negativas dependerán principalmente del nivel de salinidad aplicado y del tipo de planta empleada en el estudio.

Toda esta información sugiere que las plantas de *E. myrtifolia* se comportaban como tolerantes a niveles bajos y moderados de NaCl en las condiciones experimentales empleadas, sobre todo si se tiene en cuenta que el riego aplicado durante la fase de salinización se realizó sin drenaje alguno. Estos datos están de acuerdo con los observados previamente por (Cassaniti, 2009), los cuales han clasificado la sensibilidad o la tolerancia de diferentes especies ornamentales en función del efecto de la salinidad sobre la tasa de crecimiento relativa (RGR), considerando un rango de 10-70 mM en NaCl. De acuerdo con este criterio, consideraron a las diferentes especies estudiadas: a) como sensibles si mostraban más de un 75% de reducción en el RGR; b) moderadamente sensibles si mostraban una reducción en RGR comprendida entre 50-75%; c) moderadamente tolerantes, entre 25-50% de reducción y d) tolerantes si mostraban una reducción en RGR menor del 25%. En dicho estudio, las plantas de *E. myrtifolia* se clasificaron como tolerantes a la salinidad, ya que su crecimiento apenas se vio afectado después de dos meses de tratamiento con niveles de salinidad de hasta 70 mM de NaCl (Cassaniti *et al.*, 2009). Estos datos son parecidos a los observados en este capítulo, si bien la edad de las plantas, nivel de salinidad y el tiempo de aplicación de las mismas fueron diferentes.

Las plantas que crecen en maceta y están sometidas a estrés salino tienen diversas respuestas para enfrentarse a un incremento en la concentración de NaCl en el sustrato. Algunas de ellas pueden provocar una acumulación excesiva de los iones fitotóxicos en todas las partes de la planta, como sería el caso de plantas de madroño y callistemon (Navarro *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2013). Otras, acumulan más o menos Na⁺ y/o Cl⁻ en las raíces o en las hojas, o valores similares en ambos órganos (Cassaniti *et al.*, 2009). En cualquier caso, la retención tanto de iones Na⁺ como de Cl⁻ en las raíces o en las hojas se ha propuesto como una característica relacionada con la tolerancia de las plantas al estrés salino (Boursier y Läuchli, 1990; Pérez-Alfocea *et al.*, 2000). En definitiva, la capacidad de las plantas para controlar la concentración de las sales en la parte aérea, mediante su acumulación en las raíces o mediante una reducida tasa de absorción y/o translocación a las hojas, constituye un mecanismo importante para su supervivencia en condiciones de

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

estrés salino (Colmer *et al.*, 2005; Murillo-Amador *et al.*, 2006). En este ensayo se pudo ver como *E. myrtifolia* acumulaba elevadas concentraciones de iones Cl^- y Na^+ en la raíz, comparadas con las que se acumulaban en hojas y tallos. Este comportamiento también se ha observado en otras especies ornamentales como *Cestrum fasciculatum*, *Rutlya fruticosa* o *Viburnum lucidum*, con tratamientos de NaCl de hasta 70 mM durante dos meses (Cassaniti *et al.*, 2009). Además la habilidad de algunas especies para favorecer la retención de un ión fitotóxico u otro, como el Na^+ y el Cl^- , es un aspecto poco estudiado y en el que se necesita profundizar más (Munns y Tester, 2008; Cassaniti *et al.*, 2009).

En las plantas de *E. myrtifolia* tratadas con el mayor nivel de salinidad la evolución en el contenido de Cl^- fue mayor que en el resto de tratamientos durante todo el experimento, mientras que la acumulación de Na^+ era menos evidente, siendo esta acumulación más clara al final de la fase de lavado. Es de resaltar, que si bien se observaba una tendencia al aumento de los niveles de Na^+ y Cl^- durante todo el ensayo, los niveles totales de ambos iones no fueron muy elevados en hoja, de modo que desde el inicio de la fase de salinización las plantas de eugenia limitaban su transporte hasta la parte aérea.

Junto al aumento de los niveles de Na^+ y Cl^- , la salinidad provocaba una disminución de los contenidos de K^+ y un incremento en los del Ca^{2+} en los diferentes órganos de la planta. En general, una elevada absorción de NaCl compite con la absorción de otros nutrientes, especialmente el K^+ , lo que puede ocasionar deficiencias en este nutriente. Otros nutrientes que pueden disminuir en condiciones de salinidad son el Ca^{2+} y el Mg^{2+} (Marschner, 1995). En *E. myrtifolia* la salinidad aumentaba los contenidos de Ca^{2+} , al igual que ocurre en otras especies, como mirto (ver Capítulo 2 y 3) o en *Vicia faba* (Gadallah, 1999). Si bien, la salinidad disminuye los niveles de K^+ en los diferentes órganos de la planta, éstos no eran muy acentuados. Resulta interesante observar cómo la evolución de los contenidos de Ca^{2+} mostraba dos picos claramente diferenciados en todos los tratamientos, siendo los valores más elevados en las plantas sometidas a estrés salino que en las plantas control. Respecto a la función que podría desempeñar la aparición de ambos picos no está muy clara, pero podría tener alguna relación con la función del Ca^{2+} como segundo mensajero y en el ajuste osmótico (Marschner, 1995). Por ello, el incremento en los contenidos de Ca^{2+} , junto con el limitado descenso del K^+ , podría tener importantes repercusiones en la respuesta de las plantas a la

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

salinidad, ya que ambos iones tienen una importante función en el crecimiento y desarrollo así como en el cierre de los estomas y en el turgor celular (Marschner, 1995; Osakabe *et al.*, 2014).

Con respecto a lo observado en la fase de lavado, las condiciones de riego aplicadas por medio de un mayor porcentaje de drenaje determinaron que sólo en las plantas S12 se produjeron los mayores descensos de Na^+ y Cl^- en las raíces. El drenaje aplicado no fue lo suficientemente eficaz para evitar cierta absorción de los iones fitotóxicos hacia las partes aéreas y provocó otros efectos ya que se redujo la absorción de iones como el K^+ y el Ca^{2+} que son necesarios para el correcto crecimiento y desarrollo de las plantas. Por otra parte, la distribución de los iones fitotóxicos, en esta fase resultó diferente en algunos aspectos. Por ejemplo, los niveles de ambos iones eran bastante altos en las raíces y, sin embargo, el Na^+ se acumulaba más en las hojas y en los tallos que el Cl^- . Esto significaba que, en la fase de lavado, el transporte de Na^+ hacia las partes aéreas estaba favorecido o menos restringido si se le comparaba con el transporte del Cl^- , aunque a medida que aumentaba la salinidad de los tratamientos, la presencia porcentual de Cl^- en las distintas partes de la planta era mayor que la del Na^+ .

Continuando con el análisis de los mecanismos de respuesta a la salinidad, también debe prestarse atención a lo que sucede con los parámetros que afectan a las relaciones hídricas. Así, con respecto a los descensos en el potencial hídrico foliar (Ψ_h) observados, estos podrían ser consecuencia de una mayor dificultad de las plantas para tomar agua desde el sustrato. En algunas especies expuestas a condiciones salinas, se ha observado un incremento a la resistencia al flujo de agua desde el sustrato a la planta (Navarro *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2012). Estos resultados concuerdan con lo observado en este ensayo, desde el inicio ya se empieza a apreciar un descenso de Ψ_h y una separación entre los tratamientos conforme aumentaba la salinidad. Además, otra respuesta de las plantas a la salinidad fue la realización de ajuste osmótico, lo que indujo a un mantenimiento de la turgencia celular en las plantas más salinizadas. Los iones fitotóxicos, a pesar de alcanzar bajas concentraciones en las hojas comparadas con las de la raíz, también se pueden comportar como osmolitos, compartimentalizándose dentro de las vacuolas de las células vegetales y contribuyendo a reducir los valores del Ψ_{os} (Koyro, 2006). En tal sentido, estas respuestas coinciden con las descritas en diferentes estudios realizados con otras plantas ornamentales

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

sometidas a estrés salino (Sánchez-Blanco *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2007, 2008). También se ha documentado que el ajuste osmótico actúa como un mecanismo de adaptación al estrés salino (Morgan, 1984). Sin embargo, los resultados obtenidos con plantas de *E. myrtifolia*, determinan que los iones fitotóxicos no son los únicos responsables de dicho ajuste. Las plantas, también acumulaban prolina, que es un soluto orgánico que actuaría como osmoprotector del citoplasma en situaciones de estrés salino, a pesar de que el coste energético de sintetizar solutos orgánicos es relativamente alto comparado con la compartimentalización intracelular de los iones nocivos (Munns, 2002). Se ha descrito que este aminoácido actúa como una molécula osmoprotectora y antioxidante protegiendo la estructura de las macromoléculas durante la deshidratación así como para almacenar y transferir poder reductor proporcionando tolerancia a diferentes estreses abióticos (Ashraf y Foolad, 2007; Planchet *et al.*, 2014).

Las plantas de eugenia presentaron un descenso progresivo de la tasa de fotosíntesis neta (P_n) y de la conductancia estomática (g_s) cuando aumentaba la concentración de NaCl presente en el agua de riego. Con respecto a la g_s , (Koyro, 2006) sugiere que este comportamiento es un mecanismo adaptativo de las plantas para enfrentarse a la salinidad, especialmente desarrollado para evitar una excesiva pérdida de agua por transpiración a través de los estomas. Un descenso en g_s también se ha observado en plantas de *Viburnum tinus* (Bañon *et al.*, 2012) y en *Euonymus japonica* (Gómez-Bellot *et al.*, 2013). Las respuestas de los estomas a la salinidad están inducidas por un efecto osmótico de las sales que están rodeando a las raíces, y a su vez, estarían probablemente reguladas por señales radiculares (Davies *et al.*, 2005). Sin embargo, debido a que el descenso en P_n fue menor que el descenso en g_s , se producía un aumento en el WUE, sobre todo con las dos mayores concentraciones de NaCl usadas. En plantas del género *Callistemon* (Vernieri *et al.*, 2006) se ha observado un comportamiento similar y en estudios como los de (James, 2002; Munns y Tester, 2008) se describe que las tasas de P_n por unidad de área en plantas sometidas a salinidad, a menudo no se ven tan afectadas, en comparación con los descensos observados en g_s . En el caso de las plantas de *E. myrtifolia*, al finalizar la fase de lavado, se obtenía un resultado similar en el WUE, pero en este caso se debía tanto a una subida de P_n como al hecho de que todavía los valores de g_s eran menores a los de las plantas control. El descenso de P_n y

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

de g_s por efecto del estrés salino se ha descrito tanto en tratamientos a corto como a largo plazo (Huang *et al.*, 2005; Moradi e Ismail, 2007; Barba-Espín *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2013). Los descensos en P_n parecen no ser tan dependientes de la mayor o menor tolerancia a la salinidad, como se describe en plantas de *Viburnum tinus*, especie sensible a la salinidad (Bañon *et al.*, 2012) o en *Althenera betzickiana*, una planta ornamental tolerante a la salinidad (Ali *et al.*, 2012). Sin embargo, el descenso de estos parámetros suele ser menos acusado en especies más tolerantes a la salinidad que en especies sensibles a la salinidad (Duarte *et al.*, 2013).

La fluorescencia de clorofilas es una técnica ampliamente usada con el fin de estudiar el efecto del estrés ambiental sobre la eficiencia del fotosistema II (PSII) obteniéndose información sobre el funcionamiento del proceso de fotosíntesis. En general, la salinidad produce un descenso en los parámetros de *quenching* fotoquímico en especies sensibles a salinidad, y en ocasiones también en los parámetros de *quenching* no fotoquímico (Huang *et al.*, 2005; Moradi e Ismail, 2007; Lee *et al.*, 2013). Diferentes trabajos han descrito la importancia del ASC para el proceso fotosintético. El ASC es un cofactor de la violaxantina de-epoxidasa (Fedoroff, 2006) que cataliza la interconversión entre violaxantina y zeaxantina, en el ciclo de las xantofilas, cuya función es la disipación del exceso de energía de excitación en forma de calor que se producen en los parámetros de *quenching* no fotoquímico (Demmig-Adams y Adams, 1992), de modo que existe una correlación entre los contenidos de ASC y el parámetro NPQ (Huang *et al.*, 2005). Estos resultados están de acuerdo con los resultados presentados, ya que las plantas tratadas con NaCl tanto al final de la fase de salinización, como al final de la fase de lavado presentaron un menor nivel de ASC y de forma paralela una disminución en NPQ, lo que sugiere una menor capacidad para la disipación del exceso de energía en forma de calor.

A corto plazo las plantas de eugenia respondían a la salinidad con un descenso en qP y $Y(II)$ pero un aumento de los parámetros de *quenching* no fotoquímico, lo que sugiere que las plantas de eugenia presentan una capacidad segura para eliminar el exceso de energía de excitación en forma de calor. A más largo plazo de estrés (30 días) la respuesta era diferente, las plantas parecían adaptarse a la situación de estrés. En este sentido, las plantas con distintos tratamientos de NaCl presentaron un mayor valor de qP y de $Y(II)$ que las plantas control, sin embargo, los parámetros de *quenching* no

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

fotoquímico disminuyeron. Una vez finalizada la fase de lavado ocurría lo mismo con los parámetros de *quenching* no fotoquímico, pero a diferencia de lo que había sucedido tras los 30 días de estrés, los parámetros de *quenching* fotoquímico mostraron un descenso en qP y un aumento de F_v/F_m en plantas previamente tratadas con los dos niveles de NaCl más altos. Esta respuesta sugería que una vez aplicados los correspondientes lavados las plantas de nuevo se veían afectadas negativamente por las nuevas condiciones de riego. El mantenimiento o incremento de los valores de *quenching* no fotoquímico, como qN o NPQ está asociado con una respuesta protectora con el fin de evitar daños fotooxidativos en los centros de reacción (Rahoutei *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha descrito que una disminución en qP está acompañada con un aumento en la probabilidad de formación de clorofila en estado triplete, que está asociado a la formación de oxígeno singlete (1O_2) (Foyer *et al.*, 1994). De acuerdo con todo esto, las plantas sometidas a estrés durante 30 días compensan la disminución en qN y NPQ con un aumento en los parámetros de *quenching* fotoquímico. En contraste, una vez finalizada la fase de lavado, tanto qP como qN y NPQ disminuyen, lo que sugiere que podría producirse un incremento en la generación de ROS con el consiguiente aumento de daños fotooxidativos en los cloroplastos. Sin embargo, esto no se reflejaba en la fotosíntesis neta, ya que se produce una recuperación de los datos de P_n . Además, la subida de las actividades catalasa y SOD y la recuperación de la actividad APX podrían estar haciendo frente a esta situación de estrés oxidativo. De hecho, la catalasa, presente en peroxisomas, tiene una función importante en la eliminación de H_2O_2 durante el proceso de fotorrespiración, que actúa como un mecanismo de válvula de escape en situaciones de sobrerreducción de la cadena de transporte electrónico. En este sentido, la fotorrespiración aporta aceptores para la cadena fotosintética de transporte electrónico (NADP⁺ y ferredoxina oxidada (Fd_{ox})) y además es capaz de reciclar el CO_2 procedente de la descarboxilación de la glicina, permitiendo tanto el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico como el ciclo de Calvin.

Con respecto a los datos de microscopía obtenidos al final de la fase de salinización, los cambios estructurales observados en hojas en los tratamientos S8 podrían estar relacionados con los descensos en los valores de g_s medidos al final de este periodo. Al producirse un mayor cierre estomático, para favorecer el poco CO_2 que pudiera entrar a través de los estomas las hojas

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

desarrollaron una serie de cambios anatómicos que facilitan la fijación de CO₂ en los cloroplastos de las células del parénquima en empalizada, lugar donde se encuentran la mayor parte de los mismos. En este sentido, las plantas S8 no sólo presentaban más espacios intercelulares sino que también disminuían el porcentaje de parénquima esponjoso y aumentaban el del parénquima en empalizada (Olmos *et al.*, 2007).

Al final de la fase de lavado, se observó que todas las plantas previamente regadas con distintos niveles de salinidad habían desarrollado una serie de cambios anatómico-estructurales (ver resultados) con respecto al final de la fase de estrés (fase de salinización). Dichos cambios, hacen que las plantas S4 sean muy poco eficientes como queda reflejado en el valor del WUE. Las plantas S12 tienden a presentar una estructura foliar más parecida a los controles. Estas plantas eran muy eficientes, ya que presentaban, además, altos valores de P_n y una apertura estomática relativamente baja si se la compara con las de las plantas S4 (perdían menos H₂O por transpiración presentando un mayor valor WUE). El comportamiento anatómico de las plantas S8 era similar al de las plantas S12. Sin embargo, las plantas S8 eran tan eficientes como las S12 porque presentaban menores valores de g_s (Olmos *et al.*, 2007).

Toda la información detallada anteriormente permite afirmar que, otro mecanismo de adaptación a la salinidad desarrollado por de *Eugenia myrtifolia* L. estaría constituido por cambios anatómicos observables en la hoja, tales como, el aumento en el porcentaje de parénquima en empalizada (células con un mayor número de cloroplastos) y de espacio intercelular compensados por un descenso en el porcentaje de parénquima esponjoso (Olmos *et al.*, 2007).

Los cambios anatómicos y las variaciones en la apertura estomática afectan al proceso de transpiración que es uno de los mecanismos que presentan las hojas para refrigerarse (Kluitenberg *et al.*, 1992; Sirault *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2013). En este sentido, los datos de termografía (NIR) estaban correlacionados con los valores de g_s, sobre todo a más largo plazo (final fase de salinización) y en plantas regadas con agua de buena calidad (fase de lavado).

Los datos de pérdida de electrolitos y de peroxidación de lípidos mostraron que las plantas sometidas a mayor nivel de salinidad (S8 y S12) producían un estrés oxidativo en las plantas de *E. myrtifolia*, tanto a los 15

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

como a los 30 días de estrés. Estos parámetros, como ya se ha comentado previamente, son marcadores de daños a membranas, por lo que se puede concluir que la salinidad tiene un efecto negativo sobre las membranas celulares de las plantas de *E. myrtifolia*.

El tratamiento de recuperación no alivió los daños producidos sobre las membranas en las plantas tratadas con el mayor nivel salino, ya que estos parámetros de estrés oxidativo seguían siendo estadísticamente superiores a los mostrados por las plantas control. Esta respuesta podría deberse a que la salinidad produce daños irreversibles en las plantas o bien, una vez adaptadas al crecimiento con las concentraciones más elevadas de NaCl, pudieran detectar el riego en ausencia de NaCl (fase de lavado) como una nueva situación de estrés, al menos durante el periodo de recuperación que se ha estudiado. Este efecto se ha descrito en plantas herbáceas (Hernández y Almansa 2002), observándose que, tanto durante las primeras horas de estrés salino como durante las primeras horas del período de recuperación se producía un estrés oxidativo, que podría ser debido al cambio de condiciones de cultivo, que podría ser percibido por la planta como una situación de estrés hipo-osmótico, como también se describió en células de tabaco (Cazalé *et al.*, 1998).

En plantas de guisante, el aumento en los parámetros de estrés oxidativo era paralelo a la acumulación de ROS, produciéndose una mayor acumulación de H_2O_2 y O_2^- a medida que aumentaba la concentración salina (Hernández *et al.*, 2001). Una respuesta similar se observó en plantas de eugenia. También en plantas recuperadas (fase de lavado), todavía se observaba una acumulación de ROS en aquellas plantas que previamente habían sido tratadas con la mayor concentración salina.

Para completar este estudio, los niveles de enzimas antioxidantes se analizaron en plantas tratadas de *E. myrtifolia* con niveles bajos y moderados de estrés salino (S4 y S8), de forma similar a lo realizado en los experimentos previos con aguas regeneradas. A medio plazo (15 días) la salinidad reducía la actividad APX pero aumentaba la actividad catalasa en ambos casos, mientras que a más largo plazo (30 días) la respuesta fue diferente: en plantas S4 se estimulaban las enzimas catalasa, SOD y GR, mientras que en las S8 aumentaba MDHAR y SOD pero disminuía la enzima POX. Además, en ambos casos, se producía un descenso de APX, sobre todo en las plantas tratadas con S8.

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

En numerosas especies vegetales tolerantes a la salinidad (o relativamente tolerantes) se ha descrito un aumento en las enzimas antioxidantes, mientras que en especies sensibles, de forma general se han descrito descensos en las mismas (Gosset *et al.*, 1994; Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1999, 2000; 2003). Es destacable que con ambos tratamientos se producía una disminución de APX, pero dicho descenso no era muy marcado en plantas S4, en las que, además, aumentaba la actividad de la catalasa y de la SOD. Esto sugiere que las plantas sometidas al tratamiento más bajo de sal tienen un mejor control del metabolismo del H₂O₂. En este sentido, se ha descrito una posible función del H₂O₂ en el crecimiento vegetal, y este efecto se ha descrito en diferentes modelos experimentales (Barba-Espín *et al.*, 2010, 2011a; Clemente-Moreno *et al.*, 2012; Faize *et al.*, 2013).

Sin embargo, en la fase de lavado, de nuevo se producía un aumento en las actividades de las enzimas catalasa y SOD. Además, la actividad APX, que disminuyó por efecto del NaCl, se recuperaba. El hecho de que durante esta fase tuviese lugar de nuevo un incremento en algunas enzimas antioxidantes indicaba que en este periodo también se está produciendo un estrés oxidativo. Un hecho interesante, respecto a la respuesta de las enzimas antioxidantes, es que en casi todas las situaciones, las actividades catalasa y SOD fueron mayores en plantas estresadas que en los controles. El aumento de la actividad catalasa, podría indicar una activación de la fotorrespiración, mientras que la SOD está considerada como la primera barrera o línea de defensa frente a situaciones de estrés oxidativo en las plantas (Bose *et al.*, 2014).

Con respecto a lo observado con los antioxidantes no enzimáticos, se puede concluir que la biosíntesis de ASC podría estar afectada por el estrés salino. De hecho, diferentes autores han mostrado un efecto negativo de la salinidad en los niveles de ASC y de GSH sugiriendo una función importante de estas moléculas antioxidantes en la tolerancia a salinidad (Hernández *et al.*, 1999, 2000; Barba-Espín *et al.*, 2011b; Diaz-Vivancos *et al.*, 2013). En un trabajo reciente, se ha descrito que en líneas de ciruelo que sobreexpresan Cu, Zn-SOD y/o APX en el citosol, presentaban un mayor contenido de ASC y de GSH y presentaban una mayor tolerancia a 100 mM NaCl en condiciones *in vitro* (Diaz-Vivancos *et al.*, 2013). Es de resaltar el espectacular aumento de ASC observado en las plantas una vez finalizada la fase de lavado, en comparación con los niveles mostrados al final del periodo de salinización. Las plantas al final de la fase de lavado mostraron un mayor nivel de actividad

7.- Capítulo 4-5. Mecanismos de respuesta del mirto y de la eugenia frente a la salinidad

catalasa y SOD, con respecto a la observada al final de la fase de salinización. Además, las plantas previamente tratadas con un nivel de NaCl de 8 dS/m presentaron al final de la fase de lavado una mayor actividad APX que la presentada después de 30 días de estrés.

Hay que destacar que no existen muchos datos en la bibliografía acerca de la recuperación de estreses, pero en los escasos trabajos disponibles se han descrito respuestas similares a las observadas en este estudio. (Hernández y Almansa, 2002).

8.- Conclusiones

Capítulo 1. Efecto del riego con aguas residuales depuradas, con distintos niveles de salinidad, en el comportamiento de *Eugenia myrtifolia* L.

1.1.- El uso de aguas regeneradas supone un beneficio para la nutrición de las plantas, a la vez que se pueden contrarrestar los efectos negativos de las sales presentes en el agua.

1.2.- Los elevados niveles de Na^+ pueden interferir en la absorción del catión B^{3+} presente en las aguas regeneradas. Los síntomas asociados a la acumulación de Na^+ y Cl^- pueden mitigar los típicos daños producidos por exceso de B^{3+} .

1.3.- La acumulación progresiva de las sales en un volumen reducido de sustrato (maceta) provoca una disminución en la biomasa de la parte aérea de la planta, sin afectar a las raíces. Dicha reducción está relacionada con el nivel de salinidad del agua de riego, así como con la acumulación de Cl^- y, en mayor medida, de Na^+ en las hojas.

1.4.- El efecto osmótico, una limitación en la conductividad hidráulica de las raíces, el descenso del potencial hídrico y en el contenido relativo de agua, son cambios que se hacen más evidentes en las plantas regadas con el mayor nivel de salinidad. La disminución en la fotosíntesis que se observa en estas plantas, está motivada tanto por factores estomáticos (descenso de g_s) como no estomáticos (acumulación de iones tóxicos).

1.5.- Cuando los niveles de salinidad presentes en el agua de riego utilizada superan los 4 dS/m de CE, se observa que, después de un período de lavado de las sales acumuladas en el sustrato, la recuperación de la fotosíntesis y, en consecuencia del crecimiento, son sólo parciales.

1.6.- Los daños provocados en las membranas celulares por la salinidad están correlacionados con un descenso paulatino de las enzimas del ciclo ASC-GSH, lo que sugiere una menor capacidad para eliminar H_2O_2 y regenerar ascorbato y glutatión reducidos.

Capítulo 2. Efecto del riego con aguas residuales depuradas, con distintos niveles de salinidad, en el comportamiento de *Myrtus communis* L.

2.1.- Las aguas regeneradas, que pueden presentar distintos niveles de salinidad, no afectan de forma negativa al crecimiento de las plantas de mirto cuando en la aplicación del riego se utiliza una fracción de lavado proporcional al nivel de salinidad presente. Incluso, puede observarse que unos niveles moderados de salinidad (ARD2) estimulan el crecimiento de dichas plantas.

2.2.- Durante el lavado de sales se produce una disminución del crecimiento de las plantas previamente regadas con los niveles más elevados de salinidad (ARD3), debido probablemente a una mayor acumulación de los iones fitotóxicos (sobre todo Na^+) y a un descenso de los valores de los cocientes K^+/Na^+ y K^+/Cl^- .

2.3.- Se observa un descenso en la conductancia estomática desde las primeras semanas de la aplicación de los tratamientos y, de manera más evidente, en las plantas más salinizadas. La tasa de fotosíntesis no se ve tan claramente afectada, correspondiendo los mayores niveles observados a las plantas del tratamiento ARD2 que, a su vez, presentaban los mayores pesos secos.

2.4.- La salinidad afecta a la funcionalidad de las membranas de las plantas de mirto regadas con las aguas de mayor salinidad ($\text{CE} = 8 \text{ dS/m}$), lo cual está relacionado con los valores obtenidos en la pérdida de electrolitos y en la peroxidación de lípidos.

2.5.- En las plantas de los tratamientos ARD1 y ARD3 se produce una inducción de las enzimas SOD, POX y el mantenimiento de las actividades CAT y GR, lo cual podría explicar el menor nivel de daños observados en mirto por efecto de la salinidad, junto con el efecto positivo del drenaje aplicado en este ensayo.

Capítulo 3. Efecto de los nutrientes y de la salinidad que aporta el agua de riego en la morfología, relaciones hídricas y parámetros bioquímicos y hormonales en plantas de *Myrtus communis* L.

3.1.- Después de un mes de aplicación de los tratamientos se produce un ajuste osmótico, relacionado con el aumento en el contenido de prolina en las hojas y con la acumulación de los iones Na^+ y Cl^- , lo cual permite aumentar la turgencia de las plantas tratadas con ARD2 (CE= 4-5 dS/m) y de forma más acusada en las plantas tratadas con NaCl (CE= 8 dS/m).

3.2.- Paralelamente a la acumulación de solutos se producen cambios en la rigidez de las paredes celulares lo que permite minimizar los efectos negativos en el balance hídrico de las plantas sometidas a altos niveles de sales.

3.3.- El cierre de los estomas está relacionado con un descenso de los contenidos de K^+ , una subida de los niveles de ABA y el establecimiento de un estrés oxidativo.

3.4.- La salinidad produce un aumento progresivo de los contenidos de SA y no afecta a los de JA (efecto antagónico). Valores altos del cociente entre SA y JA son buenos marcadores del estrés salino que sufre la planta.

3.5.- La disminución del tamaño de las plantas de mirto sometidas al mayor nivel de salinidad está relacionada con un descenso de los niveles de AIA.

Capítulo 4-5. Mecanismos de tolerancia a la salinidad de *Myrtus communis* L. y *Eugenia myrtifolia* L. Respuestas a corto y a largo plazo. Capacidad de recuperación.

4-5.1.- Como respuesta al incremento en la salinidad, las plantas de eugenia reducen la superficie transpirante y desarrollan un ajuste osmótico, lo cual se relaciona con una mayor síntesis de prolina para mantener la turgencia foliar. En el caso de las plantas de mirto, aquellas que están sometidas a una mayor salinidad son las que responden con estos mecanismos.

4-5.2.- En el caso de las plantas de eugenia, conforme avanza el tiempo de aplicación de las sales, se produce una adaptación en el control estomático y en la actividad fotosintética, lo que implica un aumento de la eficiencia fotosintética (P_n/g_s). Este hecho está relacionado con un aumento en el porcentaje de células del parénquima en empalizada, un descenso en el parénquima esponjoso y un aumento en los espacios intercelulares. En el caso del mirto, los cambios anatómicos observados no afectan al parénquima en empalizada, mientras que se observa una disminución en el porcentaje de células del parénquima esponjoso, con un aumento en los espacios intercelulares.

4-5.3.- Las plantas de mirto acumulan el Na^+ en la raíz, restringiendo su translocación a la parte aérea. Además, limitan la absorción de Cl^- , pero no su transporte a las hojas. En contraste, las plantas de eugenia tienden a acumular más el Cl^- en la raíz y a limitar su transporte a la parte aérea.

4-5.4.- Al final de la fase de salinización, las plantas de eugenia aumentan los parámetros de *quenching* fotoquímico y disminuyen los de *quenching* no fotoquímico, siendo la respuesta inversa en mirto. El primer caso hace referencia a una mayor eficiencia fotosintética, mientras que el segundo caso indica un mecanismo seguro de disipación del exceso de energía luminosa en forma de calor.

4-5.5.- Las plantas de mirto presentan mayores niveles de actividad catalasa, mientras que las de eugenia presentan mayores niveles basales de las actividades SOD, POX y MDHAR.

4-5.6.- En ambas especies se produce una aclimatación durante el periodo de salinización. La fase de lavado, durante la cual las plantas reciben agua de buena calidad, la perciben como una nueva situación de estrés.

9.- Bibliografía

- Abdul-Jaleel, C., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R., Panneerselvam, R.** 2007. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60: 110-116.
- Aebi, H.** 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105: 121-126.
- Alegre-Batlle, L.** 2000. Regulación de las respuestas fisiológicas de las plantas al estrés. V Simposium Hispano-Portugués de Relaciones Hídricas en las plantas. Alcalá de Henares, España. Libro de Comunicaciones. 43-47.
- Ali, A., Iqbal, N., Ali, F., Afzal, B.** 2012. *Alternanthera bettzickiana* (Regel) G. Nicholson, a potential halophytic ornamental plant: Growth and physiological adaptations. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 207: 318-321.
- Álvarez, S., Navarro, A., Nicolás, E., Sánchez-Blanco, MJ.** 2011. Transpiration, photosynthetic responses, tissue water relations and dry mass partitioning in *Callistemon* plants during drought conditions. *Scientia Horticulturae*, 129: 306-312.
- Álvarez, S., Gómez-Bellot, MJ., Castillo, M., Bañón, S., Sánchez-Blanco, MJ.** 2012. Osmotic and saline effect on growth, water relations, and ion uptake and translocation in *Phlomis purpurea* plants. *Environmental and Experimental Botany*, 78: 138-145.
- Álvarez, S., Sánchez-Blanco, MJ.** 2014. Long-term effect of salinity on plant quality, water relations, photosynthetic parameters and ion distribution in *Callistemon citrinus*. *Plant Biology*, 16: 757-764.
- Andersen, MN., Jersen, CR., Lösch, R.** 1991. Derivations of pressure volume curves by a non-linear regression procedure and determination of apoplastic water. *Journal of Experimental Botany*, 42: 159-165.
- Anderson, J., Adin, A., Crook, J., Davis, C., Hultquist, R., Jimenez-Cisneros, B., Kennedy, W., Sheik, B., Van der Merwe, B.** 2001. Climbing the ladder: a step by step approach to international guidelines for water recycling. *Water Science and Technology*, 43: 1-8.

- APHA.**1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16th edition. American Public Health Association, Washington, D.C, USA.
- Arbona, V., Gómez-Cadenas, A.** 2008. Hormonal modulation of citrus responses to flooding. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27: 241–250.
- Arbona, V., Hossain, Z., López-Climent, MF., Pérez-Clemente, RM., Gómez-Cadenas, A.** 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiologia Plantarum*, 132: 452-466.
- Ariza, FA., Pelegrin, MB., Ruiz, RG., Ruiz, SR., Nuñez, DR., Miras, AR.** 1997. Flora básica de la región de Murcia. Sociedad cooperativa de enseñanza “Severo Ochoa”. Murcia, España. 252p.
- Arrigoni, O., Dipierro, S., Borraccino, G.** 1981. Ascorbate free radical reductase: a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Letters*, 125: 242-244.
- Asada, K.** 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *The Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 601-639.
- Asano, T., Pettygrove, GS.** 1987. Using reclaimed municipal wastewater for irrigation. *California Agriculture*, 41 (3/4): 15-18.
- Asano, T.** 2006. Water Reuse: Issues, Technologies and Applications. MetCalf & Eddy y AECOM. McGraw-Hill, Publishing Company Ltd, New York, USA.
- Ashraf, M., Fooland, MR.** 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 206–216.
- Azcón-Bieto, J.** 1987. Respuesta fotosintética de las plantas en condiciones de estrés, agua, luz y temperatura. En: Guardiola, JL.; Monerri, C. (Eds), Fisiología Vegetal 85. Universidad Politécnica de Valencia, España. p 81-96.
- Azza Mazher, AM., Fatma El-Quesni, EM., Farahat, MM.** 2007. Responses of ornamental plants and woody trees to salinity. *World Journal of Agricultural Science*, 3: 386-395.

- Bacelar, EA., Santos, DL., Moutinho-Pereira, JM., Lopes, JI., Gonçalves, BC., Ferreira, TC., Correia, CM.** 2007. Physiological behaviour, oxidative damage and antioxidative protection of olive trees grown under different irrigation regimes. *Plant and Soil*, 292: 1-12.
- Bailenger, J.** 1979. Mechanisms of parasitological concentration in coprology and their practical consequences. *Journal American Medicine and Technology*, 41: 65-71.
- Bañón, S., Fernández, JA., Ochoa, J., Sánchez-Blanco, MJ.** 2005. Paclobutrazol as an aid to reduce some effects of salt stress in oleander seedlings. *European Journal of Horticultural Science*, 70: 43-49.
- Bañón, S., Miralles, J., Franco, JA., Ochoa, R., Sánchez-Blanco, MJ.** 2011. Effects of diluted and pure treated wastewater on the growth, physiological status and visual quality of potted lantana and polygala plants. *Scientia Horticulturae*, 129: 869-876.
- Bañón, S., Miralles, J., Ochoa, J., Sánchez-Blanco, MJ.** 2012. The effect of salinity and high boron on growth, photosynthetic activity and mineral contents of two ornamental shrubs. *Horticultural Science*, 39: 188-194.
- Bañuls, J., Legaz, F., Primo-Millo, E.** 1991. Salinity calcium interactions on growth and ionic concentration of Citrus plants. *Plant and Soil*, 133: 39-46.
- Barba-Espin, G., Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, MJ., Albacete, A., Faize, L., Faize, M., Pérez-Alfocea, F., Hernández, JA.** 2010. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. *Plant, Cell and Environment*, 33: 981-994.
- Barba-Espín, G., Clemente-Moreno., MJ, Álvarez S., García-Legaz, MF., Hernández, JA., Díaz-Vivancos, P.** 2011. Salicylic acid negatively affects the response to salt stress in pea plants: effects on PR1b and MAPK expression. *Plant Biology*, 13: 909-917.
- Barba-Espín, G., Diaz-Vivancos, P., Job, D., Belghazi, M., Job, C., Hernández, JA.** 2011. Understanding the role of H₂O₂ during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach. *Plant, Cell and Environment*, 34: 1907-1919.

- Barrs, HD.** 1968. Determination of water deficit in plant tissues. Water deficits and plant growth, vol 1. Academic Press, New Delhi, India.
- Bates, LS., Waldren, RP., Teare, ID.** 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205–207.
- Bolaños, JA., Longstretch, DJ.** 1984. Salinity effects on water potential components and bulk elastic modulus of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. *Plant Physiology*, 75: 281-284.
- Borsani, O., Valpuesta, V., Botella, MA.** 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, 126: 1024-1030.
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., Shabala, S.** 2014. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 65: 1241-1257.
- Botequilha-Leitão, A., Ahern., J.** 2002. Applying landscape ecological concepts and metrics in sustainable landscape planning. *Landscape and Urban Planning*, 59: 65-93.
- Boursier, P., Läuchli, A.** 1990. Growth responses and mineral nutrient relations of salt-stressed sorghum. *Crop Science*, 30: 1226-1233.
- Brar, MS., Mahli, SS., Singh, AP., Arora, CL., Gill, KS.** 2000. Sewer water irrigation effects on some potentially toxic trace elements in soil and potato plants in northwestern India. *Canadian Journal of Soil Science*, 80: 465-471.
- Bray, EA.** 1997. Plant responses to water déficit. *Trends in Plant Science*, 2: 48-54.
- Briskin, DP.** 2010. Mineral nutrition. En: *Plant Physiology*, Fifth edition (Taiz, L and Zeiger, E eds.) Sinauer Ass. Publishers, Sunderland, MA, USA.
- Brisson, LF., Zelitch, I., Havir, EA.** 1998. Manipulation of catalase levels produces altered photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology*, 116: 259-269.
- Bueno, P., Piqueras, A., Kurepa, J., Savouré, A., Verbruggen, N., Van Montagu, M., Inzé, D.** 1998. Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Science*, 138: 27-34.

- Cabrera, RI.** 2003. Growth, quality and nutrient responses of azalea hybrids to salinity. *Acta Horticulturae*, 609: 241-245.
- Cakmak, I., Horst, WJ.** 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83: 463-468.
- Camejo, D., Rodríguez, P., Morales, MA., Dell'Amico, JM., Torrecillas, A., Alarcón, JJ.** 2005. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *Journal of Plant Physiology*, 162: 281–289.
- Cani, MR.** 1996. Osservazioni sulla biologia e valutazione della biodiversità naturale per la domesticazione de *Myrtus communis*. Tesis de licenciatura. Facultad di Agraria. Università degli Studio di Sassari, Italia.
- Carvajal, M., Martinez, V., Alcaraz, CF.**1999. Physiological function of water channels as affected by salinity in roots of paprika pepper. *Physiologia Plantarum*, 105: 95–101.
- Cassaniti, C., Leonardi, C., Flowers, TJ.** 2009. The effects of sodium chloride on ornamental shrubs. *Scientia Horticulturae*, 122: 586–593.
- Cassaniti, C., Romano, D., Flowers, TJ.** 2012. The Response of Ornamental Plants to Saline Irrigation Water. En *Irrigation Water Management, Pollution and Alternative Strategies*. Garcia-Garizabal, I. (Ed.), InTech Europe, University Campus STeP Ri, Rijeka, Croatia, pp 234.
- Cassaniti, C., Romano, D., Hop, M., Flowers, TJ.** 2013. Growing floricultural crops with brackish water. *Environmental and Experimental Botany*, 92: 165-175.
- Castillo. M.** 2011. Establecimiento de los niveles de tolerancia al riego deficitario y empleo de agua salina en plantas autóctonas mediterráneas con fines ornamentales. Tesis Doctoral, UPCT Cartagena.
- Catalán, BG.** 1985. Semillas de árboles y arbustos forestales. Monografía 17. ICONA, Madrid, España. 392 p.
- Cazale, AC., Rouet-Mayer, MA., Barbier-Brygoo, H., Mathieu, Y., Lauriere, C.** 1998. Oxidative burst and hypo-osmotic stress in tobacco cell suspensions. *Plant Physiology*, 116: 659-669.

- Chaparzadeh, N., Khavari-Nejad, RA., Navari-Izzo, F., Izzo, A.** 2003. Water relations and ionic balance in *Calendula officinalis* L. under salinity conditions. *Agrochimica*, XLVII. (1-2): 69-79.
- Chapin, FS., Bloom, AJ., Field, CB., Waring, RH.** 1987. Plant responses to multiple environmental factors. *Bioscience*, 37: 49-57.
- Chaves, MM., Flexas, J., Pinheiro, C.** 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103: 551-560.
- Chaves, MM., Costa, JM., Madeira Saibo, NJ.** 2011. Recent advances in photosynthesis under drought and salinity. *Advances in Botanical Research*, 57: 49-104.
- Cheeseman, JM.** 1988. Mechanisms of Salinity Tolerance in Plants. *American Society of Plant Biologists*, 87: 547-550.
- Cheong, JJ., Choi, YD.** 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics*, 19: 409-413.
- Cheung, YNS., Tyree, MT., Dainty, J.** 1975. Water relations parameters on single leaves obtained in a pressure bomb and some ecological interpretations. *Canadian Journal of Botany*, 53: 1342-1346.
- Cheung, YNS., Tyree, MT., Dainty, J.** 1976. Some possible sources of error in determining bulk elastic moduli and other parameters from pressure-volume curves of shoots and leaves. *Canadian Journal of Botany*, 54: 758-765.
- Clemente-Moreno, MJ., Díaz-Vivancos, P., Piqueras, A., Hernández, JA.** 2012. Plant growth stimulation in *Prunus* species plantlets by BTH or OTC treatments under *in vitro* conditions. *Journal of Plant Physiology*, 169: 1074-1083.
- Coego, A., Ramirez, V., Ellul, P., Mayda, E., Vera, P.** 2005. The H₂O₂-regulated Ep5C gene encodes a peroxidase required for bacterial speck susceptibility in tomato. *Plant Journal*, 42: 283-293.
- Colmer, TD., Muñiz, R., Flowers, TJ.** 2005. Improving salt tolerance of wheat and barley: future prospects. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45: 1425-1443.

- Colom, MR., Vazzana, C.** 2003. Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought-sensitive weeping lovegrass plants. *Environmental and Experimental Botany*, 49: 135-144.
- Corcuera, L.** 2003. Comparación de dos métodos para generar curvas presión-volumen en especies del género *Quercus*. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*, 12: 111-121.
- Corpas, FJ., Gómez, M., Hernández, JA., del Río, LA.** 1993. Metabolism of activated oxygen in peroxisomes from two *Pisum sativum* L. cultivars with different sensitivity to sodium chloride. *Journal of Plant Physiology*, 141: 160-165.
- Costa, PJC., Sánchez, LA.** 2001. Manual para la identificación y reproducción de semillas de especies vegetales autóctonas de Andalucía (Tomos I y II). Consejería de Medio Ambiente, Sevilla, España.
- Costa, JM., Grant, OM., Chaves, MM.** 2013. Thermography to explore plant-environment interactions. *Journal of Experimental Botany*, 64: 3937-3949.
- Cramer, GR., Epstein, E., Läuchli, A.** 1988. Kinetics of roots elongation of maize in response to short-term exposure to NaCl and elevated calcium concentrations. *Journal of Experimental Botany*, 39: 1513-1522.
- Cramer, GR., Quarrie, SA.** 2002. Abscisic acid is correlated with the leaf growth inhibition of four genotypes of maize differing in their response to salinity. *Functional Plant Biology*, 29: 111-115.
- Dahiya, SS., Singh, M.** 1976. Effect of salinity, alkalinity and iron application on the availability of iron, manganese, phosphorus and sodium in pea (*Pisum sativum* L.) crop. *Plant and Soil*, 44: 697-702.
- Dalton, DA., Baird, LM., Langeberg, L., Taugher, CY., Anyan, WR., Vance, CV., Sarath, G.** 1993. Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* L. Merr.) root nodules. *Plant Physiology*, 102: 481-489.
- Davies, SD., Money, HM.** 1986. Tissue water relations on four co-occurring chaparral shrubs. *Oecologia*, 70: 527-535.

- Davies, WJ., Kudoyarova, G., Hartung, W.** 2005. Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24: 285-95.
- Delgado-Díaz, S.** 2003. Tendencias en la reutilización de aguas. El caso de Tenerife. *Tecnología del Agua*, 236: 30-42.
- Del Río, LA., Gómez, M., Leal, A., López-Gorgé, J.** 1977. A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. Application to the kinetic study of the pea leaf enzyme. *Analytical Biochemistry*, 80: 409-515.
- Demmig-Adams B, Adams III WW.** 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. The *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 599-626.
- Diaz-Vivancos, P., Dong, YP., Ziegler, K., Markovic, J., Pallardó, F., Pellny, TK, Verrier, P., Foyer, CH.** 2010. Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defenses field. *Plant Journal*, 64: 825-838.
- Diaz-Vivancos, P., Faize, M., Barba-Espin, G., Faize, L., Petri, C., Hernández, JA., Burgos, L.** 2013. Ectopic expression of cytosolic superoxide dismutase and ascorbate peroxidase leads to salt stress tolerance in transgenic plums. *Plant Biotechnology Journal*, 11: 976-985.
- Dionisio-Sese, ML., Tobita, S.** 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135: 1-9.
- Duarte, B., Santosa, D., Marques, JC., Caçadora, I.** 2013. Ecophysiological adaptations of two halophytes to salt stress: Photosynthesis, PS II photochemistry and anti-oxidant feedback – Implications for resilience in climate change. *Plant Physiology and Biochemistry*, 67: 178–188.
- Duncan, RR., Carrow, R., Huck, MT.** 2009. Turfgrass and landscape irrigation water quality: assessment and management. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA, 464p.
- Dunlap, JR., Binzel, ML.** 1996. NaCl reduces Indole-3-acetic acid levels in the roots of tomato plants independent of stress-induced abscisic acid. *Plant Physiology*, 112: 379-384.

- Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, JV., Gómez-Cadenas, A.** 2005. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8437-8442.
- Edelstein, M., Ben-Hur, M., Cohen, R., Burger, Y., Ravina, I.** 2005. Boron and salinity effects on grafted and non-grafted melon plants. *Plant and Soil*, 269: 273-284.
- Edwards, EA., Rawsthorne, S., Mullineaux, PM.** 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 180: 278-284.
- El-Motaium, R., Hu, H., Brown, PH.** 1994. The relative tolerance of six *Prunus* rootstocks to boron and salinity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119: 1169–1175.
- ESAMUR**, 2005. I Jornadas Técnicas de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales, Murcia, España.
- ESAMUR**, 2012. Entidad Regional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales [on line]. www.esamur.com, last update (December 2012).
- Evans, R.** 2004. Hands-on irrigation training for nursery growers. *Growing Points*, 8: 4-5.
- Farnham, DS., Hasek, RF., Paul, JL.** 1985. Water quality: its effects on ornamental plants. Agriculture and Natural Resources. Cooperative extension Leaflet No. 2995. University of California, Richmond, California, USA. 14p.
- Faize, M., Burgos, L., Faize, L., Piqueras, A., Nicolás, E., Barba-Espín, G., Clemente-Moreno, MJ., Alcobendas, R., Artlip, T., Hernández, JA.** 2011. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought. *Journal of Experimental Botany*, 62: 2599-2613.
- Faize, M., Faize, L., Petri, C., Barba-Espin, G., Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, MJ., Koussa, T., Rifai, LA., Burgos, L., Hernandez, JA.** 2013. Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase enhanced in vitro shoot multiplication in transgenic plum. *Journal of Plant Physiology*, 170: 625-632.

- Fedoroff, N.** 2006 Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses. *Annals of Botany*, 98: 289–300.
- Feigin, A., Pressman, E., Imas, P., Miltau O.** 1991. Combined effects of KNO₃ and salinity on yield and chemical composition of lettuce and Chinese cabbage. *Irrigation Science*, 12: 223-230.
- Fernández-Rufete, J., Plana, V.** 2007. Utilización en xerojardinería de algunas especies autóctonas de la Región de Murcia. Ed. Consejería de Agricultura y Agua. Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, Murcia, España.
- Ferrini, F., Nicese, FP., Mancuso, S., Giuntoli, A.** 2000. Effect of nursery production method and planning techniques on tree establishment in urban sites: preliminary results. *Journal of Arboriculture*, 26: 1-4.
- Fitzpatrick, G., Donselman, H., Carter, NS.** 1986. Interactive effects of sewage effluent irrigation and supplemental fertilization on container-grown trees. *Horticultural Science*, 21: 92-93.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., Sharkey, TD.** 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*, 6: 269-279.
- Flowers, TJ., Galal, HK., Bromham, L.** 2010. Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology*, 37: 604-612.
- Foyer, CH.** 1992. Interactions between electron transport and carbon assimilation in leaves. Co-ordination of activities and control. In photosynthesis: Photoreactions to Plant Productivity. Abrol, YP., Mohanty, P. Govindjee, eds, Oxford and IBH Publishing Co, PVT Ltd, New Delhi, India, p199-224.
- Foyer, CH., Harbison, J.** 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In: Causes of Photooxidative Stresses and Amelioration of Defense Systems in Plants. Foyer, CH and Mullineaux, P, eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, p1-42
- Fox, LJ., Grose, N., Appleton, BL., Donohue, SJ.** 2005. Evaluation of treated effluent as an irrigation source for landscape plants. *Journal of Environmental Horticulture*, 23: 174-178.

- Fricke, W., Akhilarova, G., Wei, W., Alexandersson, E., Miller, A., Kjellbom, PO., Richardson, A., Wojciechowski, T., Schreiber, L., Veselov, D., Kudoyarova, G., Volkov, V.** 2006. The short-term growth response to salt of the developing barley. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1079–1095.
- Gadallah, MAA.** 1999. Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* responses to salt stress. *Biologia Plantarum*, 42: 249-257.
- García-Fayos, P., Gulias, J., Martínez, J., Marzo, A., Melero, JP., Traveset, A., Veintimilla, P., Verdú, M., Cerdán, V., Gasque, M., Medrano, H.** 2001. Bases ecológicas para la recolección, almacenamiento y germinación de semillas de especies de uso forestal de la Comunidad Valenciana. Banc de Llavors Forestals (Consellería de Medi Ambient de la Generalitat Valenciana), Valencia, España. 82 p.
- García-Legaz, MF., López-Gómez, E., Mataix-Beneyto, J., Navarro, A., Sánchez-Blanco, MJ.** 2008. Physiological behaviour of loquat and anger rootstocks in relation to salinity and calcium addition. *Journal of Plant Physiology*, 165: 1049–1060.
- Gómez, JM., Hernández, JA., Jiménez, A., Del Río, LA., Sevilla, F.** 1999. Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radical Research*, 31: S11-S18.
- Gómez-Bellot, MJ., Álvarez, S., Castillo, M., Bañón, S., Ortuño, MF., Sánchez-Blanco, MJ.** 2013a. Water relations, nutrient content and developmental responses of *Euonymus* plants irrigated with water of different degrees of salinity and quality. *Journal of Plant Research*, 126: 567–576.
- Gómez-Bellot, MJ., Álvarez, S., Bañón, S., Ortuño, MF., Sánchez-Blanco, MJ.** 2013b. Physiological mechanisms involved in the recovery of *euonymus* and *laurustinus* subjected to saline waters. *Agricultural Water Management*, 128: 131-139.
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, FR., Primo-Millo, E., Talon, M.** 1998. Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of citrus seedlings to salt shock. *Physiologia Plantarum*, 103: 475–484.

- Gori, R., Ferrini, F., Nicese, FP., Lubello, C.** 2000. Effect of reclaimed wastewater on the growth and nutrient content of three landscape shrubs. *Journal of Environmental Horticulture*, 18: 108-114.
- Gori, R., Lubello, C., Ferrini, F., Nicese, FP., Coppini, E.** 2008. Reuse of industrial wastewater for the irrigation of ornamental plants. *Water Science and Technology*, 57: 883-889.
- Gosset, DR., Millhollon, EP., Lucas, MC.** 1994. Antioxidant responses to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science*, 34: 706-714.
- Grant, OM., Chaves, MM., Jones, HG.** 2006. Optimizing thermal imaging as a technique for detecting stomatal closure induced by drought stress under greenhouse conditions. *Physiologia Plantarum*, 127: 507–518.
- Grattan, SR., Grieve, CM.** 1994. Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments. En *Handbook of Plant and Crop Stress*. Pessarakli M. (ed.), Marcel Dekker, New York, USA, pp: 203–226.
- Grattan, SR., Grieve, CM.** 1999. Salinity mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 78: 127–157.
- Greenway, H., Munns, R.** 1980. Mechanism of salt tolerance in non-halophytes. *The Annual Review of Plant Physiology*, 31: 149-190.
- Grieve, C., Wu, L., Rollins, L., Harivandi, A.** 2008. Tolerance by landscape plants of salinity and of specific ions (Chapter V). In: A comprehensive literature review on salt management guide for landscape irrigation with recycled water in coastal southern California, Dec. 2009. <http://www.salinitymanagement.org>
- Griffith, OW.** 1985. Glutathione and glutathione disulfide. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HU, (ed). Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, pp 521–529.
- Grzesiak, MT., Grzesiak, S., Skoczowski, A.** 2006. Changes of leaf water potential and gas exchange during and after drought in triticale and maize genotypes differing in drought tolerance. *Photosynthetica*, 44: 561–568.

- Gucci, R., Xiloyannis, C., Munns, R., Flore, JA.** 1991. Gas exchange parameters, water relations and carbohydrate partitioning in leaves of field-grown *Prunus domestica* following fruit removal. *Physiologia Plantarum*, 83: 497–505.
- Gueta-Dahan, Y., Yaniv, Z., Zilinskas, BA., Ben-Hayyim, G.** 1997. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in *Citrus*. *Planta*, 203: 460-469.
- Gutteridge, JMC., Halliwell, B.** 2000. Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899: 36–147.
- Hansson, L., Häggström, MH.** 1983. Metabolic effects of paraquat on *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Microbiology*, 13: 81-83.
- Hardikar, SA., Pandey, AN.** 2008. Growth, water status and nutrient accumulation of seedling of *Acacia senegal* (L.) Willd. in response to soil salinity. *Anales de Biología*, 30: 17-28.
- Hare, PD., Cress, WA., Staden, JV.** 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, 21: 535–553.
- Hasegawa, PM., Bressan, RA., Zhu, JK., Bhnert, HJ.** 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *The Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463-499.
- He, CY., Wolyn, DJ.** 2005. Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxysporum* f. sp. asparagi. *Plant Pathology*, 54: 227-232.
- Hernández, JA., Corpas, FJ., Gómez, M., Del Río, LA., Sevilla, F.** 1993. Salt induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Plant Physiology*, 89: 103-110.
- Hernández, JA., Olmos, E., Corpas, FJ., Sevilla, F., Del Río, LA.** 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants. *Plant Science*, 105: 151-167.
- Hernández, JA., Campillo, A., Jiménez, A., Alarcón, JJ., Sevilla, F.** 1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytologist*, 141: 241-251.

- Hernández, JA., Jiménez, A., Mullineaux, PM., Sevilla, F.** 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. *Plant, Cell and Environment*, 23: 853-862.
- Hernández, JA., Talavera, JM., Martínez-Gómez, P., Dicenta, F., Sevilla, F.** 2001a. Response of antioxidative enzymes to *plum pox virus* in two apricot cultivars. *Physiologia Plantarum*, 111: 313-321.
- Hernández, JA., Ferrer, MA., Jiménez, A., Ros-Barceló, A., Sevilla, F.** 2001b. Antioxidant systems and O_2^-/H_2O_2 production in the apoplast of *Pisum sativum* L. leaves: its relation with NaCl-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*, 127: 817-831.
- Hernández, JA., Almansa, MS.** 2002. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum*, 115: 251–257.
- Hernández, JA., Aguilar, A., Portillo, B., López-Gómez, E., Mataix-Beneyto, J., García-Legaz, MF.** 2003. The effect of calcium on the antioxidant enzymes from salt-treated loquat and anger plants. *Functional Plant Biology*, 30: 1127-1137.
- Hernández, JA., Escobar, C., Creissen, G., Mullineaux, PM.** 2004. Role of hydrogen peroxide and the redox state of ascorbate in the induction of antioxidant enzymes in pea leaves under excess light stress. *Functional Plant Biology*, 31: 359-368.
- Hernández, JA., Escobar, C., Creissen, G., Mullineaux, P.** 2006. Antioxidant enzymes induction in pea plants under excess light stress. *Biologia Plantarum*, 50: 400-404.
- Hinckley, TM., Duhme, F., Hinckley, AR., Richter, H.** 1980. Water relations of drought hardy shrubs: osmotic potential and stomatal reactivity. *Plant Cell and Environment*, 3: 131-140.
- Hiner, ANP., Rodríguez-Lopez, JN., Arnao, MB., Lloyd Raven, E., García-Canovas, F., Acosta, M.** 2000. Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, 348: 321-328

- Hodges, DM., DeLong, JM., Forney, CF., Prange, RK.** 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207: 604–611.
- Hossain, MA., Asada, A.** 1984. Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant and Cell Physiology*, 25: 1285-1295.
- Hsiao, TC., Acevedo, F., Fereres, E., Henderson, DW.** 1976. Water Stress, Growth, and Osmotic Adjustment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 273: 479-500
- Huang, C., He, W., Guo, J., Chang, X., Su, P., Zhang, L.** 2005. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient Arabidopsis mutant. *Journal of Experimental Botany*, 422: 3041–3049.
- Inskip, WP., Bloom, PR.** 1985. Extinction Coefficients of Chlorophyll *a* and *b* in *N,N*-Dimethylformamide and 80% Acetona. *American Society of Plant Biologists*, 77: 483-485.
- Jacoby, B.** 1994. Mechanisms involved in salt tolerance by plants. En: *Handbook of Plant and Crop Stress*. Pessarakli, M. (ed), Marcel Dekker, New York, USA. p97-123.
- James, RA., Rivelli, AR., Munns, R., Von Caemmerer, S.** 2002. Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. *Functional Plant Biology*, 29: 1393–1403.
- Janssen, BH., Boesveld, H., Justo-Rodriguez, M.** 2005. Some theoretical considerations on evaluating wastewater as a source of N, P and K for crops. *Journal of Irrigation and Drainage*, 54: S35-S47.
- Jones, HG., Stoll, M., Santos, T., de Sousa, C., Chaves, MM., Grant, OM.** 2002. Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2249–2260.
- Jones, HG.** 2004. Application of thermal imaging and infrared sensing in plant physiology and ecophysiology. *Advances in Botanical Research*, 41: 107–163.

- Kant, S., Kant, P., Raveh, E., Barak, S.** 2006. Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na⁺ uptake in *T. halophila*. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1220–1234.
- Keskin, BC., Sarikaya, AT., Yüksel, B., Memon, AR.** 2010. Abscisic acid regulated gene expression in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Australian Journal of Crop Science*, 4: 617-625.
- Kikuta, SB., Kyriakopoulos, E., Ritcher, H.** 1985. Leaf hygrometer vs pressure chamber: a comparison of pressure-volume data obtained on single leaves by alternating measurements. *Plant, Cell and Environment*, 8: 363-367.
- Klougart, A.** 1987. Exploration, adaptation, evaluation, amelioration. *Acta Horticulturae*, 205: 3–12.
- Kluitenberg, GJ., Biggar, JW.** 1992. Canopy temperature as a measure of salinity stress on sorghum. *Irrigation Science*, 13: 115–121.
- Koyro, HW.** 2006. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). *Environmental and Experimental Botany*, 56: 136–146.
- Lafuente, MT., Belver, A., Guye, MG., Saltveit Jr, ME.** 1991. Effect of the temperature conditioning on chilling injury of cucumber cotyledons. *Plant Physiology*, 95: 443-449.
- La Haye, PA., Epstein, E.** 1971. Calcium and salt tolerance by bean plants. *Physiologia Plantarum*, 25: 213-218.
- Lee, MH., Cho, EJ., Wi, SG., Bae, H., Kim, JE., Cho, JY., Lee, S., Kim, JH., Chung, BY.** 2013. Divergences in morphological changes and antioxidant responses in salt-tolerant and salt-sensitive rice seedlings after salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70: 325-335.
- Leinonen, I., Grant, OM., Tagliavia, CPP., Chaves, MM., Jones, HG.** 2006. Estimating stomatal conductance with thermal imagery. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1508–1518.
- Levitt, J.** 1980. Responses of plant to environmental stresses. 2nd Edn. Academic Press, New York, USA. p607.

- Lichtenthaler, HK.** 1998. The stress concept in plants: an introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 30: 187-198.
- López-Climent, MF., Arbona, V., Pérez-Clemente, RM Gómez-Cadenas A.** 2008. Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 176–184.
- López-Gómez, E., Sanjuán, MA., Diaz-Vivancos, P., Mataix-Beneyto, J., García-Legaz, MF., Hernández, JA.** 2007. Effect of salinity and rootstocks on antioxidant systems of loquat plants (*Eriobotrya japonica* Lindl.): Response to supplementary boron addition. *Environmental and Experimental Botany*, 160:151-158.
- López-González, GA.** 2004. Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares. Mundi-prensa, Madrid, España. p1727.
- Lubello, C., Gori, R., Nicese, FP., Ferrini, F.** 2004. Municipal-treated wastewater reuse for plant nurseries irrigation. *Water Research*, 38: 2939–2947.
- Lynch, J., Cramer, GR., Läuchli, A.** 1987. Salinity reduces membrane-associated calcium in corn root protoplasts. *Plant Physiology*, 83: 390–394.
- Mabberley, DJ.** 1993. The plant book. A portable dictionary of the higher plants. Cambridge University Press. Londres. Uk. pp707.
- Manafi, M., Kneifel, W.** 1989. A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of total coliforms and *E. coli* in water. *Zentralbl Hyg* 189: 225–234.
- Marschner, H.** 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed.,Academic Press, San Diego, USA.
- Martínez-Sánchez, JJ., Franco-Leemhuis, JA., Vicente-Colomer, MJ., Muñoz-Muñoz, M., Bañón-Arias, S., Conesa-Gallego, E., Fernández Hernández, JA., Valdés-Illán, R., Miralles-Crespo, J., Ochoa-Rego, J., Aguado-López, M., Esteva-Pacual, J., López Marín, J., Aznar Morell, L.** 2008. Especies silvestres mediterráneas con valor ornamental: selección, producción viverística y utilización en jardines. Dirección General de Patrimonio Natural y Biodiversidad. Consejería de Agricultura y Agua. Región de Murcia, Murcia, España. 224p.

- Matheny, N., Clark, R.** 1998. Trees and Development: A Technical Guide to Preservation of Trees During Land Development. *International Society of Arboriculture*, Champaign, IL, USA, pp183
- Maxwell, K., Johnson, GN.** 2000. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659-668.
- McCammom, TA., Marquart-Pyatt, ST., Kopp, KL.** 2009. Water-conserving landscapes: an evaluation of homeowner preference. *Journal of Extension*, 47: 1-10.
- McCord, JM., Fridovich, I.** 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244: 6049-6055.
- McGuire, RG.** 1992. Reporting of Objective Color Measurements. *HortScience*, 27: 1254-1255.
- McKersie, BD., Leshem, YY.** 1994. Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 79-100
- Mendes, MM., Gazarini, LC., Rodrigues, ML.** 2001. Acclimation of *Myrtus communis* to contrasting Mediterranean light environments-effects on structure and chemical composition of foliage and plant water relations. *Environmental and Experimental Botany*, 45: 165–178
- Metcalf y Eddy.** 1995. Wastewater engineering: Treatment, disposal, and reuse. McGraw-Hill Publishing Company Ltd. New York: USA.
- Miller, G., Shulaev, V., Mittler, R.** 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, 133: 481-489.
- Miralles, J., Valdés, R., Franco, JA., Sánchez-Blanco, MJ., Bañón, S.** 2011. Irrigation of hydrangea with saline reclaimed wastewater: effects of fresh water flushing. *Acta Horticulturae*, 1000: 229-236.
- Mitrakos K.** 1981. Temperature germination responses in three Mediterranean evergreen sclerophylls. In: Components of productivity of Mediterranean-climate regions. Basic and applied aspects. Margaris, NS., Money, HA. (eds.). Dr W. Junk Publishers, The Hague, The Netherlands. 277-279pp

- Mittova, V., Volokita, M., Tal, M.** 2000. Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennelli*. *Physiologia Plantarum*, 110: 42-51.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., Guy, M.** 2003. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant, Cell and Environment*, 26: 845-856.
- Miura, K., Tada, Y.** 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science*, 5: 4-16.
- Moradi, F., Ismail, AM.** 2007. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Annals of Botany*, 99: 1161-1179.
- Morales, MA., Sánchez-Blanco, MJ., Olmos, E., Torrecillas, A., Alarcón, JJ.** 1998. Changes in growth, leaf water relations and cell ultrastructure in *Argyranthemum coronopifolium* plants under saline conditions. *Journal of Plant Physiology*, 153: 174-180.
- Morgan, JM.** 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *The Annual Review in Plant Physiology*, 35: 299-319.
- Mujeriego, R.** 2000. Regeneración de aguas residuales: avances tecnológicos. Química e Industria. Febrero: 98-104.
- Munns, R., Schachtman, DP., Condon, AG.** 1995. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 561–569.
- Munns, R.** 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25: 239–250.
- Munns, R.** 2008. Strategies for crop improvement in saline soils. In: Ashraf, M., Athar, HR. (Eds), *Salinity and Water Stress: Improving Crop Efficiency*. Springer. *Tasks for Vegetation Sciences*, 44: 99-110.
- Munns, R., Tester, M.** 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *The Annual Review of Plant Biology*, 59: 651-681.

- Munns, R., James, RA., Xu, B., Athman, A., Conn, SJ., Jordans, C., Byrt, CS., Hare, RA, Tyerman, SD., Tester, M., Plett, D., Gilliam, M.** 2012. Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nature Biotechnology*, 30: 360–364.
- Murillo-Amador, B., Troyo-Diéguez, E., García-Hernández, JL., López-Aguilar, R., Ávila-Serrano, NY., Zamora-Salgado, S., Rueda-Puente, EO., Kaya, C.** 2006. Effect of NaCl salinity in the genotypic variation of cowpea (*Vigna unguiculata*) during early vegetative growth. *Scientia Horticulturae*, 108: 423–431.
- Navarro, A., Bañón, S., Olmos, E., Sánchez-Blanco, MJ.** 2007. Effects of sodium chloride on water potential components, hydraulic conductivity, gas exchange and leaf ultrastructure of *Arbutus unedo* plants. *Plant Science*, 72: 473–480.
- Navarro, A., Bañón, S., Conejero, W., Sánchez-Blanco, MJ.** 2008. Ornamental characters, ion accumulation and water status in *Arbutus unedo* seedlings irrigated with saline water and subsequent relief and transplanting. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 364–370.
- Nazar, R., Iqbal, N., Syeed, S., Khan, NA.** 2011. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. *Journal of Plant Physiology*, 168: 807–815.
- Neumann, P.** 1997. Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant, Cell and Environment*, 20: 1193-1198.
- Niknam, SR., McComb, J.** 2000. Salt tolerance screening of selected Australian woody species: a review. *Forest Ecology and Management*, 139: 1-19.
- Nilsen, ET., Orcutt, DM.** 1996. Physiology of plants under stress. Abiotic factors. John Wiley & Sons, NY.USA. pp 385.
- Nilu, X., Bressan, RA., Hasegawa, PM., Prado, JM.** 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology*, 109: 735–742.
- Niu, G., Rodriguez, DS.** 2006. Relative salt tolerance of five herbaceous perennials. *HortScience*, 41: 1493-1497.

- Niu, G., Rodriguez, DS., Aguinaga, L.** 2007. Growth and landscape performance of ten herbaceous species in response to saline water irrigation. *Journal of Environmental Horticulture*, 25: 204-210.
- Niu, G., Cabrera, RI.** 2010. Growth and physiological responses of landscape plants to saline water irrigation: a review. *HortScience*, 45: 1605-1609.
- Nobel, PS.** 1991. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Academic Press, New York, USA. p488.
- Noctor, G., Foyer, CH.** 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping active oxygen under control. *The Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249-279.
- Olmos, E., Sánchez-Blanco, MJ., Ferrández, T., Alarcón, JJ.** 2007. Subcellular Effects of Drought Stress in *Rosmarinus officinalis*. *Plant Biology*, 9: 77–84.
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Phan-Tran, LS.** 2014. ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytologist*, 202: 35-49.
- Parsons, LR., Wheaton, TA., Castle., WS.** 2001. High application rates of reclaimed water benefit citrus tree growth and fruit production. *HortScience*, 36: 1273-1277.
- Pedranzani, H., Racagni, G., Alemano, S., Miersch, O., Ramírez, I., Peña-Cortés, H., Taleisnik, E., Machado-Domenech, E., Abdala, G.** 2003. Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regulation*, 41: 149-158.
- Pedrero, F., Alarcón, JJ.** 2009. Effects of treated wastewater irrigation on lemon trees. *Desalination*, 246: 631–639.
- Pedrero, F., Kalavrouziotis, I., Alarcón, JJ., Koukoulakis, P., Asano, T.** 2010. Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture. Review of some practices in Spain and Greece. *Agricultural Water Management*, 97: 1233–1241.
- Pedrero, F., Allende, A., Gil, MI., Alarcón, JJ.** 2012. Soil chemical properties, leaf mineral status and crop production in a lemon tree orchard irrigated with two types of wastewater. *Agricultural Water Management*, 109: 54–60.

- Pei, ZM., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, GJ., Grill, E., Schroeder, JI.** 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406: 731–734.
- Percival, GC., Kearby, IP., Al-Habsib, S.** 2006. An assessment of the drought tolerance of *Fraxinus* genotypes for urban landscaping plantings. *Urban For Urban Green*, 5: 17-27.
- Pérez-Alfocea, F., Balibrea, ME., Alarcón, JJ., Bolarín, MC.** 2000. Composition of xylem and phloem exudates in relation to the salt-tolerance of domestic and wild tomato species. *Journal of Plant Physiology*, 156: 367–374.
- Pérez-Clemente, RM., Montoliu, A., Izquierdo-Zandalinas, S., De Ollas, C., Gómez-Cadenas, A.** 2012. Carrizo citrange plants do not require the presence of roots to modulate the response to osmotic stress. *The Scientific World Journal*: Article ID 795396, 13 pages.
- PHCS.** 1995. Plan Hidrológico de la Cuenca del Segura, Murcia, España.
- Piotto, B.** 1992. Semi di alberi e arbusti coltivati in Italia. Società Agricola e Forestale. Roma
- Pitman, MG.** 1975. Ion transport in whole plants. In: *Ion transport in plant cells and tissues*. Baker, DA., Hall, JL. (eds) North-Holland Publishing Co, Amsterdam, The Netherlands, p267-308.
- Planchet, E., Verdu, I., Delahaie, J., Cukier, C., Girard, C., Morère-Le Paven, MC., Limami, AM.** 2014. Abscisic acid-induced nitric oxide and proline accumulation in independent pathways under water-deficit stress during seedling establishment in *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 65: 2161-2170.
- Queval, G., Noctor, G.** 2007. A plate-reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione and ascorbate in tissue extracts: application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Analytical Biochemistry*, 363: 58-69.
- Quist, TM., Williams, C., Robinson, ML.** 1999. Effects of varying water quality on growth and appearance of landscape plants. *Journal of Environmental Horticulture*, 17: 88–91.

- Rahoutei, J., García-Luque, I., Barón, M.** 2000. Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiologia Plantarum*, 110: 286–292.
- Ramos, C., Kaufman, MR.** 1979. Hydraulic resistance of rouge lemon roots. *Physiologia Plantarum*, 45: 311-314.
- Rascio, A., Cedola, MC., Toponi, M., Flagella, Z., Wittmer, G.** 1990. Leaf morphology and water status in *Triticum durum* under water stress. *Physiologia Plantarum*, 78: 462-467.
- Rejili, M., Vadel, AM., Guetet, A., Neffatti, M.** 2007. Effect of NaCl on the growth and the ionic balance K^+/Na^+ of two populations of *Lotus creticus* (L.) (Papilionaceae). *South African Journal of Botany*, 73: 623–631.
- Rengel, Z.** 1992. The role of calcium in salt toxicity. *Plant, Cell and Environment*, 15: 625-632.
- Riedle-Bauer, M.** 2000. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. *Journal of Phytopathology*, 148: 297–302.
- Ritcher, H., Duhme, F., Glatzel, G., Hinckley, TM., Karlic, TM.** 1979. Some limitations and applications of the pressure-volume technique in ecophysiological research. En: *Plants and their Atmospheric Environment* (Grace, J., Ford, ED., Jarvis, PG., eds.). Blackwell, Boston, USA, p263-272.
- Rivas-San Vicente, M., Plasencia, J.** 2011. Salicylic acid beyond defense: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 62: 3321-3338.
- Rizhsky, L., Hallak-Herr, E., Van-Breusegem, F., Rachmilevitch, S., Rodermeil, S., Inzé, D., Mittler, R.** 2002. Double antisense plants with suppressed expression of ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants with suppressed expression of ascorbate peroxidase or catalase. *Plant Journal*, 32: 329-342.
- Rodríguez, P., Torrecillas, A., Morales, MA., Ortuño, MF., Sánchez-Blanco, MJ.** 2005. Effects of NaCl salinity and water stress on growth and leaf water relations of *Asteriscus maritimus* plants. *Environmental and Experimental Botany*, 53: 113-123.

- Romani, A., Coinu, R., Carta, S., Pinelli, P., Galardi, C., Vincieri, FF., Franconi, F.** 2004. Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. *Free Radical Research*, 38: 97-103.
- Ros-Barceló, A.** 1998. The generation of H₂O₂ in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme. *Planta*, 207: 207-216.
- Rosúa-Campos JL., López de Hierro-López, L., Martín-Molero, JC., Serrano- Bernardo, FA., Sánchez-Lancha, A.** 2001. Procedencias de las especies vegetales autóctonas de Andalucía utilizadas en restauración de la cubierta vegetal. Tomos I, II. Junta de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente, Sevilla, España.
- Ruiz, A., Sammis, TW., Picchioni, GA., Mexal, JG., Mackay, WA.** 2006. An irrigation scheduling protocol for treated industrial effluent in the Chihuahuan desert. *Journal of the American Water Works Association*, 98: 122–133.
- Salisbury, FB., Ross, CW.** 1994. Plant physiology (4th Edition) Wadsworth Publishing Company. Belmont, California. USA.
- Sánchez-Blanco, MJ., Morales, MA., Torrecillas, A., Alarcón, JJ.** 1998. Diurnal and seasonal osmotic potential changes in *Lotus creticus* plants grown under saline stress. *Plant Science*, 136: 1–10.
- Sánchez-Blanco, MJ., Rodríguez, P., Morales, MA., Ortuño, MF., Torrecillas A.** 2002. Comparative growth and water relations of *Cistus albidus* and *Cistus monspeliensis* plants during water deficit conditions and recovery. *Plant Science*, 162: 107–113.
- Sánchez-Díaz, M., Aguirreolea, J.** 1991. Respuestas fisiológicas al estrés en leguminosas adaptadas a ambientes con clima mediterráneo. En: López, G. (ed), Fijación y movilización biológica de nutrientes. C.S.I.C, Madrid, España, p1-18.
- Santakumari, M., Berkowitz, GA.** 1989. Protoplast volume: water potential relationship and bound water fraction in spinach leaves. *Plant Physiology*, 91: 13-18.
- Sarawatari, HW., Davies, SD.** 1989. Tissue water relations of three chaparral shrub species after wildfire. *Oecologia* (Berlin), 80: 303-308.

- Savé, R., Olivilla, C., Biel, C., Adillón, J., Rabella, R.** 1994. Seasonal patterns of water relationships, photosynthetic pigments and morphology of *Actinidia deliciosa* plants of the Hayward and Tomuri cultivars. *Plant Physiology*, 2: 121-126.
- Scholander, PF., Hammel, HT., Bradstreet, ED., Hemingsen, EA.** 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science*, 148: 339-346.
- Shalata, A., Tal, M.** 1998. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum*, 104: 169-174.
- Shannon, MC., Grieve, CM.** 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae*, 78: 5-38.
- Siedow, JN., Day, DA.** 2000. Respiration and photorespiration. En *Biochemistry and molecular biology of plants*. Buchanan *et al.* (eds). American Society of Plant Physiologist, Monona Drive, Rockville, MD, USA p676-728.
- Singh, JS., Singh, S., Raghubanshi, AS., Singh, S., Kashyap, AK.** 1996. Methane flux from rice/wheat agroecosystem as affected by crop phenology, fertilization and water level. *Plant and Soil*, 183: 323–327.
- Sirault, XRR., James, RA., Furbank, RT.** 2009. A new screening method for osmotic component of salinity tolerance in cereals using infrared thermography. *Functional Plant Biology*, 36: 970–977.
- Spurr, AR.** 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26: 31–43.
- Srinivas, V., Balasubramanian, D.** 1995. Proline is a protein-compatible hydrotrope. *Langmuir*, 11: 2830–2833.
- Tanji, KK.** 2002. Salinity in the soil environment. In: *Salinity: Environment–plants–molecules*. Lauchli, A., Luttge, U. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p21–51.
- Tattini, M., Montagni, G., Traversi, ML.** 2002. Gas exchange, water relations and osmotic adjustment in *Phillyrea latifolia* grown at various salinity concentrations. *Tree Physiology*, 22: 403-412.

- Tattini, M., Remorini, D., Pinelli, P., Agati, G., Saracini, E., Traversi, ML., Massai, R.** 2006. Morpho-anatomical, physiological and biochemical adjustments in response to root zone salinity stress and high solar radiation in two Mediterranean evergreen shrubs, *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus*. *New Phytologist*, 170: 779–794.
- Tavakkoli, E., Rengasamy, P., McDonald, GK.** 2010. High concentrations of Na⁺ and Cl⁻ ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. *Journal of Experimental Botany*, 61: 4449-4459.
- Termaat, A., Munns, R.** 1986. Use of concentrated macronutrient solutions to separate osmotic from NaCl-specific effects on plant growth. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 509-522.
- Thaler, JS., Fidantsef, AL., Duffey, SS., Bostock, RM.** 1999. Tradeoffs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration using chemical elicitors of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology*, 25: 1597–1609.
- Thayer, RL.** 1976. Visual ecology: Revitalizing the aesthetics of landscape architecture. *Landscape*, 20: 37–43.
- Tracy, FE., Gilliam, M., Dodd, AN., Webb, AAR., Tester, M.** 2008. NaCl-induced changes in cytosolic free Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant, Cell and Environment*, 31: 1063–1073.
- Traveset, A., Riera, N., Mas, RE.** 2001. Ecology of fruit-colour polymorphism in *Myrtus communis* and differential effects of birds and mammals on seed germination and seedling growth. *Journal of Ecology*, 89: 749–760.
- Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K.** 1999. A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell*, 11: 1195-1206.
- Tudela, D., Tadeo, FR.** 1993. Respuestas y adaptaciones de las plantas al estrés. En: *Fisiología y Bioquímica vegetal*. Azcón-Bieto, J., y Talón, M. (eds.). Interamericana McGraw-Hill. Madrid. España. pp. 537-553
- Turner, NC., Sterm, WR., Evans, P.** 1987. Water relations and osmotic adjustment of leaves and roots of lupins in response to water deficit. *Crop Science*, 27: 977-983.

- Turner, NC.** 1988. Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation Science*, 9: 289–308.
- Tyree, MT., Hammel, HT.** 1972. The measurement of the turgor pressure and the water relations of plants by the pressure-bomb technique. *Journal of Experimental Botany*, 23: 267-282.
- UDWR (Utah Division of Water Resources).** 2003. Utah State Water Plan: Uintah Basin. Utah Board of Water Resources, Salt Lake City, Utah.
- Valdés, B., Talavera, S., Fernández-Galiano, E.** 1987. *Flora Vascular de Andalucía Occidental*. Tomos I, II y III. Ed. Ketres, Barcelona. España.
- Valdés, R., Miralles, J., Ochoa, J., Sánchez-Blanco, MJ., Bañón, S.** 2012. Saline reclaimed wastewater can be used to produce potted weeping fig (*Ficus benjamina* L.) with minimal effects on plant quality. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10: 1167-1175.
- Veljović-Jovanović, S., Pignocchi, C., Noctor, G., Foyer, CH.** 2001. Low ascorbic acid in the vtc-1 mutant of Arabidopsis Is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiology*, 127: 426-435.
- Verma, TS., Neue, HU.** 1984. Effect of soil salinity level and zinc application on growth, yield, and nutrient composition of rice. *Plant and Soil*, 82: 3-14.
- Vernieri, P., Mugnai, S., Borghesi, E., Petrognani, L., Serra, G.** 2006. Non-chemical growth control of potted *Callistemon laevis*. *Agricultural Medical*, 160: 85–90.
- Wang, XQ., Ullah, H., Jones, AM., Assmann, SM.** 2001. G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. *Science*, 292: 2070–2072.
- Wang, Y., Chen, Z., Zhang, B., Hills, A., Blatt, MR.** 2013. PYR/PYL/RCAR ABA receptors regulate K⁺ and Cl⁻ channels through reactive oxygen species-mediated activation of Ca²⁺ channels at the plasma membrane of intact Arabidopsis guard cells. *Plant Physiology*, 163: 566–577.
- Wenkert, W., Lemon, ER., Sinclair, TR.** 1978. Water content-potential relationships in soya bean: changes in components potentials for mature and immature leaves under field conditions. *Annals of Botany*, 42: 295-307.

- Wilson, JR., Fisher, MJ., Schulze, ED., Dolby, GR., Ludlow, MM.** 1979. Comparison between pressure-volume and dew point-hygrometry techniques for determining the water relations characteristics of grass and legume leaves. *Oecologia*, 41: 77-88.
- Wilson, JR., Ludlow, MM., Fischer, MJ., Schulze, ED.** 1980. Adaptation to water stress of the leaf water relations of four tropical foragespecies. *Australian Journal of Plant Physiology*, 7: 207-220.
- Wu, L., Chen, J., Lin, H., Van Mantgem, P., Harivandis, MA., Harding, JA.** 1995. Effects of regenerant wastewater irrigation on growth and ion uptake of landscape plants. *Journal of Environmental Horticulture*, 13: 92-96.
- Wu, L., Guo, X., Harivandi, A.** 2001. Salt tolerance and salt accumulation of landscape plants irrigated by sprinkler and drip irrigation systems. *Journal of Plant Nutrition*, 24: 1473–1490.
- Wu, KM., Guo, YY.** 2005. The evolution of cotton pest management practices in China. *The Annual Review of Entomology*, 50: 31–52.
- Yadav, RK., Goyal, B., Sharma, RK., Dubey, SK., Minhas, PS.** 2002. Post-irrigation impact of domestic sewage effluent on composition of soils, crops and ground water: a case study. *Environment International*, 28: 481-486.
- Yeo, A.** 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, 49: 915-929.
- Yoon, TM., Ritcher, H.** 1990. Seasonal changes in stomatal responses of sweet cherry and plum to water states in detached leaves. *Physiologia Plantarum*, 80: 520-526.
- Yermiyahu, U., Ben-Gal, A., Keren, R., Reid, RJ.** 2008. Combined effect of salinity and excess boron on plant growth and yield. *Plant and Soil*, 304: 73-87.
- Xing Y, Jia W, Zhang J.** 2008. AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 54: 440–451.
- Zhang, J., Kirkham, MB.** 1996. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist*, 132: 361–373.

- Zhang X, Miao, YC, An, GY, Zhou, Y, Shangguan, ZP, Gao, JF, Song, CP.** 2001. K⁺ channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in *Vicia* guard cells. *Cell Research*, 11: 95–202.
- Zhang, QY., Wang, LY., Kong, FY., Deng, YS., Li, B., Meng, QW.** 2012. Constitutive accumulation of zeaxanthin in tomato alleviates salt stress-induced photoinhibition and photooxidation. *Physiologia Plantarum*, 146: 363–373.

10.- Índice de tablas, figuras y fotografías

Índice de tablas

- Tabla A.1.- Tipos de E.D.A.R. conocidos hasta 2012, cuya gestión y mantenimiento controla ESAMUR. **19**
- Tabla A.2.- Número de E.D.A.R. y magnitudes de explotación estudiadas desde el año 2009 hasta el año 2012. **20**
- Tabla MM.1.- Mezcla de reacción utilizada para la curva de calibrado de la L-prolina. **44**
- Tabla 1.1.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre diferentes parámetros de crecimiento en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I **68**
- Tabla 1.2.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre diferentes índices de crecimiento en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I. **69**
- Tabla 1.3.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre diferentes parámetros de crecimiento en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase II. **70**
- Tabla 1.4.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre diferentes índices de biomasa en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase II. **72**
- Tabla 1.5.- Medida de la CE y el contenido iónico del sustrato, en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I. **81**
- Tabla 1.6.- Influencia de los tratamientos de riego en la concentración (expresada en mmoles/Kg peso seco) de los iones cloruro, sodio, boro, potasio y calcio en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I. **84**
- Tabla 1.7.- Influencia de los tratamientos de riego en la concentración (expresada en mmoles/Kg peso seco) de los iones sodio, cloruro y boro en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase II. **85**
- Tabla 1.8A.- Cocientes entre los iones representativos en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I. **88**
- Tabla 1.8B.- Cocientes entre los iones representativos en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase II. **89**

10.- Índice de tablas, figuras y fotografías

- Tabla 1.9.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre la actividad de diferentes enzimas antioxidantes en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I. **91**
- Tabla 2.1.- Efecto de los tratamiento con aguas residuales depuradas sobre diferentes parámetros de crecimiento en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I. **106**
- Tabla 2.2.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre diferentes índices de crecimiento estudiados en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la Fase I. **107**
- Tabla 2.3.- Efecto de los tratamiento con aguas residuales depuradas sobre diferentes parámetros de crecimiento en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase II. **107**
- Tabla 2.4.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre diferentes índices de biomasa en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase II. **108**
- Tabla 2.5.- Medida de la CE y el contenido iónico del sustrato de plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I. **116**
- Tabla 2.6.- Medida de la CE y el contenido iónico del sustrato de plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase II. **117**
- Tabla 2.7.- Concentración (expresada en mmoles/Kg peso seco) de los iones cloruro, sodio, boro, potasio y calcio en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I. **121**
- Tabla 2.8.- Concentración (expresada en mmoles/Kg peso seco) de los iones cloruro, sodio, boro, potasio y calcio en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase II. **122**
- Tabla 2.9.- Cocientes de los iones representativos en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I. **126**
- Tabla 2.10.- Cocientes de los iones representativos en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase II. **127**
- Tabla 2.11.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas sobre la actividad de diferentes enzimas antioxidantes en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I. **129**

10.- Índice de tablas, figuras y fotografías

- Tabla 3.1.- Medida de la CE y análisis nutricional de las distintas aguas utilizadas en el ensayo. **138**
- Tabla 3.2.- Efecto de los distintos tratamientos salinos sobre diferentes parámetros de crecimiento en plantas de *Myrtus communis* L. a los 45 días de aplicar el estrés. **141**
- Tabla 3.3.- Efecto de los distintos tratamientos salinos sobre los diferentes índices de crecimiento en plantas de *Myrtus communis* L. a los 45 días de aplicar el estrés. **143**
- Tabla 3.4.- Efecto de los distintos tratamientos salinos sobre diferentes parámetros de crecimiento en plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicar del estrés (final del ensayo). **143**
- Tabla 3.5.- Efecto de los distintos tratamientos salinos sobre los diferentes índices de biomasa en plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicar del estrés (final del ensayo). **144**
- Tabla 3.6.- Parámetros derivados de las curvas P-V en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a distintos tratamientos salinos a los 90 días del ensayo (final del ensayo). **148**
- Tabla 3.7.- Concentración de los diferentes iones y elementos (expresada en mmoles/Kg peso seco) en plantas de *Myrtus communis* L. a los 45 días de la aplicación de los tratamientos salinos. **153**
- Tabla 3.8.- Concentración de los diferentes iones y elementos (expresada en mmoles/Kg peso seco) en plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicar los tratamientos salinos (final del ensayo). **154**
- Tabla 3.9.- Cocientes de los iones representativos en plantas de *Myrtus communis* L. a los 45 días de aplicar los tratamientos salinos. **156**
- Tabla 3.10.- Cocientes de los iones representativos en plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicar los tratamientos salinos (final del ensayo). **156**
- Tabla 4.1.- Respuestas frente a la salinidad en los diferentes parámetros de crecimiento estudiados en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase de salinización. **176**

- Tabla 4.2.- Respuestas frente a la salinidad en los diferentes parámetros de crecimiento estudiados en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase de lavado. **176**
- Tabla 4.3.- Respuestas frente a la salinidad en la tasa de crecimiento relativa (RGR) estudiada en plantas de *Myrtus communis* L. al final de ambas fases del ensayo (fase de salinización y fase de lavado). **177**
- Tabla 4.4.- Efecto del NaCl (4, 8 y 12 dS/m) sobre los diferentes cocientes de iones estudiados en este ensayo en los distintos órganos de plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase de salinización. **184**
- Tabla 4.5.- Efecto del NaCl (4, 8 y 12 dS/m) sobre los diferentes cocientes de iones estudiados en este ensayo en los distintos órganos de plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase de lavado. **184**
- Tabla 4.6.- Respuestas a la salinidad en plantas de *Myrtus communis* L. regadas con diferentes concentraciones de NaCl sobre la tasa de fotosíntesis neta (P_n), sobre la conductancia estomática (g_s) y en el uso eficiente del agua (WUE) después de 15 y 30 días de tratamientos y una vez finalizada la fase de lavado. **193**
- Tabla 4.7.- Efecto de la salinidad en parámetros de fluorescencia de hojas de *Mirtus communis* L después de 15 y 30 días de tratamientos y una vez finalizada la fase de lavado. **195**
- Tabla 4.8.- Efecto de alta intensidad luminosa sobre algunos parámetros de fluorescencia de hojas de *Mirtus communis* L. Un lote de plantas permaneció en el laboratorio durante 2 meses (50 PAR), mientras que otro lote de plantas permaneció en el exterior a pleno sol durante 4 días, sometidas a una intensidad luminosa que oscilaba entre 500-2000 PAR. **199**
- Tabla 4.9.- Respuesta a la salinidad estimadas sobre distintos parámetros relacionados con la anatomía de las hojas de plantas *Mirtus communis* L. al final de la fase de salinización. **203**

- Tabla 4.10.- Efecto de diferentes niveles de salinidad sobre la pérdida de electrolitos y la peroxidación de lípidos de membranas de hojas de *Mirtus communis* L. después de 15 y 30 días de tratamientos y al final de fase de lavado. **205**
- Tabla 4.11.- Efecto de la salinidad en la actividad de enzimas antioxidantes de hojas de *Mirtus communis* L. después de 15 y 30 días de tratamientos y al final de fase de lavado. **210**
- Tabla 5.1.- Respuestas frente a la salinidad en los diferentes parámetros de crecimiento estudiados en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase de salinización. **219**
- Tabla 5.2.- Respuestas frente a la salinidad en los diferentes parámetros de crecimiento estudiados en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase de lavado. **219**
- Tabla 5.3.- Respuestas frente a la salinidad en la tasa de crecimiento relativa (RGR) estudiada en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases del ensayo (fase de salinización y fase de lavado). **220**
- Tabla 5.4A.- Estudio de los diferentes cocientes estudiados en los distintos órganos y tratamientos de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase de salinización. **232**
- Tabla 5.4B.- Estudio de los diferentes cocientes estudiados en los distintos órganos y tratamientos de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase de lavado. **232**
- Tabla 5.5.- Respuestas a la salinidad en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. regadas con diferentes concentraciones de NaCl sobre la tasa de fotosíntesis neta (P_n), sobre la conductancia estomática (g_s) y en el uso eficiente del agua (WUE) después de 15 y 30 días de estrés así como al final de la fase de lavado. **239**
- Tabla 5.6.- Efecto de la salinidad en parámetros de fluorescencia de hojas de *Eugenia myrtiflora* L. después de 15 y 30 días de tratamientos y al final de la fase de lavado. **241**

- Tabla 5.7A.- Respuesta a la salinidad estimadas sobre distintos parámetros relacionados con la anatomía de las hojas de plantas *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase de salinización. **246**
- Tabla 5.7B.- Respuesta a la salinidad estimadas sobre distintos parámetros relacionados con la anatomía de las hojas de plantas *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase de lavado. **246**
- Tabla 5.8.- Respuesta frente a diferentes niveles de salinidad en la pérdida de electrolitos y la peroxidación de lípidos de membranas de hojas de *Eugenia myrtifolia* L. a los 15 y tras 30 días de tratamientos y al final de la fase de lavado. **249**
- Tabla 5.9.- Efecto de la salinidad en la actividad de enzimas antioxidantes de hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de 15 y 30 días de tratamientos salinos y al final de la fase de lavado. **255**
- Tabla 5.10.- Efecto de la salinidad en los niveles de glutatión y ascorbato de hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de 15 y 30 días de tratamiento y una vez finalizada la fase de lavado o recuperación. **257**

Índice de figuras

- Figura A.1.- Distribución mundial de las mirtáceas. **8**
- Figura A.2.- Calidad relativa del agua según el uso y tratamiento. **18**
- Figura A.3.- Efecto de las sales sobre las plantas. **22**
- Figura A.4.- Concepto general de las fases secuenciales y respuestas inducidas en plantas por exposición al estrés. **25**
- Figura 1.1.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas en la distribución de biomasa en las distintas partes de las plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I. **69**
- Figura 1.2.- Efecto del tratamiento con aguas residuales depuradas en la distribución de biomasa en las distintas partes de las plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase II. **71**

- Figura 1.3.- Evolución durante el ensayo de la altura (A) y de la tasa de crecimiento relativa (B) en plantas de *Eugenia myrtiflora* L. sometidas a distintos tratamientos de riego. **73**
- Figura 1.4.- Conductividad hidráulica de las raíces (L_p) al final de la fase I (A) y al final de la fase II (B) en raíces de *Eugenia myrtifolia* L. **74**
- Figura 1.5.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial hídrico foliar (Ψ_h) (A) y del contenido relativo de agua (CRA) (B) en hojas de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. sometidas a distintos tratamientos de riego. **75**
- Figura 1.6.- Evolución de la conductancia estomática (g_s) (A) y de la fotosíntesis (P_n) (B) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo. **76**
- Figura 1.7.- Relación entre la fotosíntesis neta y la conductancia estomática (P_n/g_s) (A) y relación entre potencial hídrico foliar y conductancia estomática (Ψ_h/g_s) (B) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo. **77**
- Figura 1.8.- Contenido relativo de clorofila (medido en unidades SPAD) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo. **78**
- Figura 1.9.- Eficiencia fotosintética del fotosistema II, medida como el cociente F_v/F_m , en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo. **79**
- Figura 1.10.- Estudio de los distintos parámetros relacionados con el color de las hojas a lo largo del ensayo en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. regadas con diferentes niveles de salinidad. **80**
- Figura 1.11A.- Tasa de absorción de los iones Na^+ (A) y Cl^- (B) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. en las diferentes fases del ensayo **82**
- Figura 1.11B.- Tasa de absorción de los iones, B^{3+} (C), K^+ (D) y Ca^{2+} (E) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. en las diferentes fases del ensayo. **83**

- Figura 1.12A.- Influencia de los diferentes tratamientos de riego en la relación entre el peso seco de las hojas y la concentración de los iones Na^+ (A) y Cl^- (B) en hojas de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. en las diferentes fases del ensayo. **86**
- Figura 1.12B.- Relación entre el peso seco y la concentración en hojas de los iones, B^{3+} (C), K^+ (D) y Ca^{2+} (E) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. sometidas a diferentes tratamientos en las diferentes fases del ensayo. **87**
- Figura 1.13.- Peroxidación lipídica medida en las hojas como formación de TBARS en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase I. **90**
- Figura 2.1.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas en la distribución de biomasa en las distintas partes de las plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I. **106**
- Figura 2.2.- Efecto de los tratamientos con aguas residuales depuradas en la distribución de biomasa en las distintas partes de las plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase II. **108**
- Figura 2.3.- Evolución de la altura (A) y tasa de crecimiento relativa (B) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo. **109**
- Figura 2.4.- Evolución del potencial hídrico (Ψ_h) (A) y del contenido relativo de agua (CRA) (B) en hojas de plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo. **111**
- Figura 2.5.- Evolución de la conductancia estomática (g_s) (A) y de la fotosíntesis (P_n) (B) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo. **112**
- Figura 2.6.- Relación entre la fotosíntesis neta y la conductancia estomática (P_n/g_s) (A) y relación entre potencial hídrico foliar y conductancia estomática (Ψ_h/g_s) (B) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo. **113**

- Figura 2.7.- Contenido relativo de clorofila (medido en unidades SPAD) en hojas en plantas *Myrtus communis* L. al final de la fase I (A) y de la fase II (B) sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo. **114**
- Figura 2.8.- Estudio de los distintos parámetros relacionados con el color de las hojas en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a distintos tratamientos de riego durante el ensayo. **115**
- Figura 2.9A.- Tasa de absorción de los iones Na^+ (A), Cl^- (B) y B^{3+} (C) en plantas de *Myrtus communis* L. en las diferentes fases del ensayo. **118**
- Figura 2.9B.- Tasa de absorción de los iones K^+ (D) y Ca^{2+} (E) en plantas de *Myrtus communis* L. en las diferentes fases del ensayo. **119**
- Figura 2.10A.- Relación entre el peso seco y la concentración en hojas de los iones Na^+ (A), Cl^- (B) y B^{3+} (C) en plantas de *Myrtus communis* L. en las diferentes fases del ensayo. **124**
- Figura 2.10B.- Relación entre el peso seco y la concentración en hojas de los iones, K^+ (D) y Ca^{2+} (E) en plantas de *Myrtus communis* L. en las diferentes fases del ensayo. **125**
- Figura 2.11.- Medida de la pérdida de electrolitos en plantas de *Myrtus communis* L. durante la fase I (A) y durante la fase II del ensayo (B). **128**
- Figura 2.12.- Peroxidación lipídica medida en hojas como formación de TBARS en plantas de *Myrtus communis* L. al final de la fase I. **129**
- Figura 3.1.- Efecto de los distintos tratamientos salinos en la distribución de biomasa en plantas de *Myrtus communis* L. a los 45 días de aplicar el estrés. **142**
- Figura 3.2.- Efecto de los distintos tratamientos salinos en la distribución de biomasa en plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicar del estrés (final ensayo). **144**
- Figura 3.3A.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial hídrico foliar (Ψ_h , A) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a diferentes niveles de salinidad. **145**

- Figura 3.3B.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial osmótico actual (Ψ_o , B) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a diferentes niveles de salinidad. **146**
- Figura 3.3C.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial de turgor o de presión (Ψ_p , C) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a diferentes niveles de salinidad. **146**
- Figura 3.3D.- Evolución del potencial osmótico a 100% de saturación (Ψ_{os} , D) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a distintos niveles de salinidad. **147**
- Figura 3.4.- Medidas al final del ensayo (90 días) de la conductancia estomática (g_s) (A), de la fotosíntesis (P_n) (B) y de la temperatura foliar (C y D) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a diferentes niveles de salinidad. **149**
- Figura 3.5.- Relación entre la fotosíntesis neta y la conductancia estomática (A) y relación entre potencial hídrico foliar y conductancia estomática (B) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a diferentes niveles de salinidad al final del ensayo. **150**
- Figura 3.6A.-Tasa de absorción de los iones Na^+ (A), Cl^- (B), en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a salinidad a los 45 días (izquierda) y a los 90 días (final del ensayo, derecha). **151**
- Figura 3.6B.- Tasa de absorción de los iones B^{3+} (C) y K^+ (D) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a salinidad a los 45 días (izquierda) y a los 90 días (final del ensayo, derecha). **152**
- Figura 3.7.- Contenido de L-prolina en hojas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicación de los tratamientos salinos (final del ensayo). **157**
- Figura 3.8.- Contenido de MDA en hojas de plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de la aplicación de los tratamientos salinos (final del ensayo). **158**

- Figura 3.9.- Perfil hormonal obtenido a partir de hojas de plantas de *Myrtus communis* L. en el que se midieron ácido abscísico (ABA) (A), ácido salicílico (SA) (B), ácido indolacético (AIA) (C) y ácido jasmónico (JA) (D) a los 90 días de aplicación de los tratamientos salinos (final del ensayo). **159**
- Figura 3.10A.- Relación entre el contenido en K^+ de las hojas y los niveles de abscísico ABA (A) y entre los contenidos de K^+ y los niveles de conductancia estomática (g_s) (B) en plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicación de los tratamientos salinos (final del ensayo). **160**
- Figura 3.10B.- Relación entre la concentración de abscísico (ABA) y los niveles de conductancia estomática (g_s) (C) y entre los contenidos de Ca^{2+} y los niveles de ácido abscísico (D) en hojas de plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicación de los tratamientos salinos (final del ensayo). **161**
- Figura 3.10C.- Relación entre los contenidos de Ca^{2+} y los niveles de conductancia estomática (g_s) (E) en hojas de plantas de *Myrtus communis* L. a los 90 días de aplicación de los tratamientos salinos (final del ensayo). **162**
- Figuras 4.1.- Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre la tasa de absorción del ion sodio en plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). **178**
- Figuras 4.2.- Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre la tasa de absorción del ion cloruro en plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). **178**
- Figuras 4.3.- Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre la tasa de absorción del ion potasio en plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). **179**

- Figuras 4.4.- Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre la tasa de absorción del ion calcio en plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). **179**
- Figuras 4.5.- Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre los contenidos del ion sodio en diferentes órganos de plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). **181**
- Figuras 4.6.- Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre los contenidos del ion cloruro en diferentes órganos de plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). **181**
- Figuras 4.7.- Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre los contenidos del ion potasio en diferentes órganos de plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). **182**
- Figuras 4.8.- Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl (Control, S4, S8) (A) y (Control, S12) (B) sobre los contenidos del ion calcio en diferentes órganos de plantas de mirto después de la fase de salinización (izquierda) y después de la fase de lavado (derecha). **182**
- Figura 4.9.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial hídrico foliar (Ψ_h), (Control, S4 y S8; A) y (Control y S12; B) en plantas de *Myrtus communis* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **187**
- Figura 4.10.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial de presión (Ψ_p) (Control, S4 y S8; A) y (Control y S12; B) en plantas de *Myrtus communis* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **188**

Figura 4.11.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial osmótico a máxima saturación (Ψ_{os}) (Control, S4 y S8; A) y (Control y S12; B) en plantas de *Myrtus communis* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **189**

Figura 4.12.- Evolución a lo largo del ensayo de la acumulación de L-prolina (Control, S4 y S8; A) y (Control y S12; B) en hojas en plantas de *Myrtus communis* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **190**

Figura 4.13.- Evolución a lo largo del ensayo de la tasa de fotosíntesis neta (P_n , A) y la conductancia estomática (g_s , B) en plantas de *Myrtus communis* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **192**

Figura 4.14.- Imágenes de diferentes parámetros de fluorescencia en hojas de *Myrtus communis* L. crecidas en ausencia y en presencia de diferentes niveles de NaCl (Control, S4 y S8) durante 15 y 30 días, así como al final de la fase de lavado. **196**

Figura 4.15.- Efecto de la salinidad sobre la tasa de transporte electrónico (ETR) en plantas de *Myrtus communis* L. crecidas en ausencia y en presencia de diferentes niveles de NaCl durante 30 días de estrés salino (Control, S4 y S8; A) y una vez finalizada la fase de lavado (Control, S4 y S8; B). **197**

Figura 4.16.- Evolución a lo largo del ensayo de la síntesis de clorofilas en hojas en plantas de *Myrtus communis* L. (Control, S4 y S8; A) y (Control y S12; B). La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **198**

Figura. 4.17.- Imágenes de diferentes parámetros de fluorescencia en hojas apicales y basales de *Myrtus communis* L. sometidas a baja y alta intensidad luminosa (EL). En la parte inferior se muestran fotografías de las hojas apicales y basales donde se observa el aspecto de las hojas tras el estrés por alta intensidad luminosa. **200**

Figura 4.18.- Efecto de la salinidad sobre la tasa de transporte electrónico (ETR) en plantas de *Myrtus communis* L. sometidas a diferentes intensidades de luz (APL: apicales laboratorio; BL: basales laboratorio; API: apicales invernadero; BI: basales invernadero). **201**

Figura 4.19.- Respuestas a la salinidad estimadas sobre la evolución en la temperatura foliar medida en plantas de *Myrtus communis* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **202**

Figura 4.20.- Imágenes al microscopio óptico de campo claro de secciones semifinas de hojas de plantas de *Myrtus communis* L. teñidas con azul de toluidina al final de la fase de salinización (A: Control, B: S4, C: S8). PE, parénquima en empalizada; PS, parénquima esponjoso; EI, espacios intercelulares; ID, idioblastos. **203**

Figura 4.21.- Efecto de la salinidad en la acumulación de H₂O₂ en hojas de *Myrtus communis* L. después de 15 días de tratamiento. El H₂O₂ se detectó mediante tinción histoquímica con DAB. A, control; B, 4 dS/m; C, 8 dS/m; D, control con ascorbato. Barra: 1 mm. **206**

Figura 4.22.- Efecto de la salinidad en la acumulación de radicales superóxido en hojas de *Myrtus communis* L. después de 15 días de tratamiento. Los radicales superóxido se detectaron mediante tinción histoquímica con NBT. A, control; B, 4 dS/m; C, 8 dS/m; D, control con ascorbato. Barra: 1 mm. **206**

Figura 4.23.- Efecto de la salinidad en la acumulación de H₂O₂ en hojas de *Myrtus communis* L. después de 30 días de tratamiento. El H₂O₂ se detectó mediante tinción histoquímica con DAB. A, control; B, 4 dS/m; C, 8 dS/m; D, detalle de C mostrando las estructuras redondeadas teñidas. Barra: 1 mm. **207**

Figura 4.24.- Efecto de la salinidad en la acumulación de radicales superóxido en hojas de *Myrtus communis* L. después de 30 días de tratamiento. Los radicales superóxido se detectaron mediante tinción histoquímica con NBT. A, control; B, 4 dS/m; C, 8 dS/m; D, detalle de una hoja tratada con 8 dS/m para mostrar acumulación de radicales superóxido en las venas principales. Barra: 1 mm. **208**

Figura 5.1A.- Evolución a lo largo del ensayo de la concentración del ión cloruro en hojas de la zona media de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **222**

Figura 5.1B.- Cambios en la tasa de absorción del ión Cl^- en todos los tratamientos estudiados en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. **222**

Figura 5.1C.- Cambios en la concentración del ión cloruro, en todos los tratamientos estudiados, en las diferentes partes de la planta y a nivel de planta entera en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. **223**

Figura 5.2A.- Evolución a lo largo del ensayo de la concentración del ión sodio en hojas de la zona media de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **224**

Figura 5.2B.- Cambios en la tasa de absorción del ión Na^+ en todos los tratamientos estudiados en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. **225**

Figura 5.2C.- Cambios en la concentración del ión sodio, en todos los tratamientos estudiados, en las diferentes partes de la planta y a nivel de planta entera en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. **225**

Figura 5.3A.- Evolución a lo largo del ensayo de la concentración del ión potasio en hojas de la zona media de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **227**

Figura 5.3B.- Cambios en la tasa de absorción del ión K^+ en todos los tratamientos estudiados en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de la fase de salinización y al final de la fase de lavado.

227

Figura 5.3C.- Cambios en la concentración del ión potasio, en todos los tratamientos estudiados, en las diferentes partes de la planta y a nivel de planta entera en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. **228**

Figura 5.4A.- Evolución a lo largo del ensayo de la concentración del ión calcio en hojas de la zona media de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **229**

Figura 5.4B.- Cambios en la tasa de absorción del ión Ca^{2+} en todos los tratamientos estudiados en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. **229**

Figura 5.4C.- Cambios en la concentración del ión calcio, en todos los tratamientos estudiados, en las diferentes partes de la planta y a nivel de planta entera en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. al final de ambas fases. **230**

Figura 5.5A.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial hídrico foliar (Ψ_h) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **234**

Figura 5.5B.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial de presión foliar (Ψ_p) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **235**

Figura 5.5C.- Evolución a lo largo del ensayo del potencial osmótico saturado foliar (Ψ_{os}) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **235**

- Figura 5.5D.- Evolución a lo largo del ensayo de la acumulación de L-prolina en hojas en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **236**
- Figura 5.6.- Evolución a lo largo del ensayo de la tasa de fotosíntesis neta (P_n , A) y de la conductancia estomática (g_s , B) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **238**
- Figura 5.7.- Imágenes de diferentes parámetros de fluorescencia en hojas de *Eugenia myrtifolia* L. crecidas en ausencia y en presencia de diferentes niveles de NaCl (Control, S4, S8 y S12) a los 15 y 30 días de tratamientos salinos, así como al final de la fase de lavado. **242**
- Figura 5.8.- Efecto de la salinidad sobre la tasa de transporte electrónico (ETR) en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. crecidas en ausencia y en presencia de diferentes niveles de NaCl (Control, S4, S8 y S12) durante 15 y 30 días de tratamientos (A), así como al final de la fase de lavado (B). **243**
- Figura 5.9.- Evolución a lo largo del ensayo de la síntesis de clorofilas en hojas en plantas de *Eugenia myrtifolia* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **244**
- Figura 5.10.- Respuestas a la salinidad estimadas sobre la evolución en la temperatura foliar medida en plantas de *Eugenia myrtiflora* L. La línea vertical separa el final de la fase de salinización y el comienzo de la fase de lavado. **245**
- Figura 5.11.- Imágenes del parámetro de fluorescencia Y (NO) a los 30 días de aplicar el estrés y al final de la fase de lavado o recuperación en hojas de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. **245**

Figura 5.12.- Secciones semifinas de hojas de plantas de *Eugenia myrtifolia* L. vistas al microscopio óptico de campo claro y teñidas con azul de toluidina al final de la fase de salinización (A: Control, C: S4, E: S8 y G: S12) y al final de la fase de lavado (B: Control, D: S4, F: S8 y H: S12). PE parénquima en empalizada; PS, parénquima esponjoso y EI, espacio intercelular. **247**

Figura 5.13.- Efecto de la salinidad en la acumulación de H_2O_2 en hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de 15 días de tratamiento. El H_2O_2 se detecta mediante tinción histoquímica con DAB. A: Control, B: S4, C: S8, D: tinción en presencia de 10 mM ascorbato Barra: 0,5 mm. **250**

Figura 5.14.- Efecto de la salinidad en la acumulación de radicales superóxido en hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de 15 días de tratamiento. Los radicales $O_2^{\cdot-}$ se detectaron mediante tinción histoquímica con NBT. A: Control, B: S4, C: S8 y D: tinción en presencia de 10 mM $MnCl_2$. Barra: 0,5 mm. **251**

Figura 5.15.- Efecto de la salinidad en la acumulación de H_2O_2 en hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de 30 días de estrés. El H_2O_2 se detectó mediante tinción histoquímica con DAB. A: Control, B: S4, C: S8, D: S12 y E: detalle de la lesión mostrada en el nervio principal de la hoja en D. **251**

Figura 5.16.- Efecto de la salinidad en la acumulación de radicales superóxido en hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de 30 días de tratamiento. Los radicales superóxido se detectaron mediante tinción histoquímica con NBT. A: Control, B: S4; C: S8, D: S12. **252**

Figura 5.17.- Efecto de la salinidad en la acumulación de H_2O_2 en hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de la fase de lavado. El H_2O_2 se detectó mediante tinción histoquímica con DAB. A: Control, B: S4, C: S8, D: S12. **253**

Figura 5.18.- Efecto de la salinidad en la acumulación de $O_2^{\cdot -}$ en hojas de *Eugenia myrtifolia* L. después de la fase de lavado. Los radicales superóxido se detectaron mediante tinción histoquímica con NBT. A: Control, B: S4, C: S8, D: S12. **253**

Índice de fotografías

- Fotografía A.1.- Plantas de *Myrtus communis* L. **9**
- Fotografía A.2.- Flores blancas en plantas de mirto. **11**
- Fotografía A.3.- Plantas de *Eugenia myrtifolia* L. **14**
- Fotografía MM.1.- Plantas de mirto en bandejas multialveolares. **29**
- Fotografía MM.2.- Plantas de mirto en la cámara de crecimiento. **30**
- Fotografía MM.3.- Medidor de área foliar AM 200. **33**
- Fotografía MM.4.- ICP-OES (dispositivo de plasma acoplado inductivamente). **34**
- Fotografía MM.5.- Cromatógrafo iónico. **34**
- Fotografía MM.6.- Analizador automático de cloruros modelo 926. **35**
- Fotografía MM.7.- Colorímetro Minolta CR 10. **36**
- Fotografía MM.8.- Medidor de clorofila Minolta SPAD-502. **37**
- Fotografía MM.9.- Cámara de presión Soil Moisture mod. 3000. **38**
- Fotografía MM.10.- Osmómetro de presión de vapor Wescor 5520. **39**
- Fotografía MM.11.- Medida de la conductividad hidráulica de las raíces. **42**
- Fotografía MM.12.- Aparato de intercambio gaseoso portátil LI-COR Inc., LI-6400. **44**
- Fotografía MM.13.- Fluorímetro portátil OS-30. **45**
- Fotografía MM.14.- Fluorímetro IMAGIM-PAM. **46**
- Fotografía MM.15.- Cámara termográfica ThermaCam. **48**
- Fotografías MM.16.- Discos foliares con 10 ml de manitol 0,3 M. **49**
- Fotografías MM.17.- Espectrofotómetro UV/V de doble haz. **52**

11.- Abreviaturas y símbolos

Alfabetizables

A	Antecedentes
ABA	Ácido abcísico
Abs	Absorbancia
ADP	Adenosin difosfato
AIA	Ácido indolacético
ANOVA	Análisis de varianza simple
AO	Ascorbato oxidado
APX	Ascorbato peroxidasa
ARD	Aguas residuales depuradas
ASC	Ascorbato reducido
ATP	Adenosin trifosfato
C	Control
C*	Croma
CAT	Catalasa
CE	Conductividad eléctrica
CEBAS	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura
CRA	Contenido relativo de agua
CRA _a	Contenido relativo de agua apoplástica
CRA _{ppt}	Contenido relativo de agua en el punto de pérdida de turgencia
CRC	Contenido relativo de clorofila
DAB	Diaminobenzidina
DHA	Ascorbato oxidado o dehidroascorbato
DHAR	Dehidro ascorbato reductasa
dm ³	Decímetro cúbico (equivalente a L)
DMF	Dimetilformamida
DNTB	Dinitro-2,2'-ditio-5,5'-benzoico

11.- Abreviaturas y símbolos

dS	DeciSiemen
DTT	Ditiotreitol
EDAR	Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales
EDTA	Ácido etilendiamino
EI	Espacios intercelulares
ETR	Electron transport rate (Tasa de transporte electrónico)
F	Nivel de significación en estadística
Fd _{ox}	Ferredoxina oxidada
Fd _{red}	Ferredoxina reducida
F _v /F _m	Eficiencia del fotosistema II
g	Gravedad
GR	Glutación reductasa
g _s	Conductancia estomática
GS/GOGAT	Glutamato sintasa/Glutamina oxoglutarato aminotransferasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HR	Humedad relativa
HUE	Ángulo hue
J	Tasa de absorción de iones; Velocidad de flujo de agua
JA	Ácido jasmónico
KPa	Kilopascal
ICP	Dispositivo de plasma acoplado inductivamente
ID	Idioblastos
L	Litro

11.- Abreviaturas y símbolos

L*	Luminosidad
L-Pro	Aminoácido L-prolina
LAR	Leaf area ratio (Relación de superficie foliar)
L _p	Conductividad hidráulica de las raíces
LWR	Leaf weight ratio (La inversa del SLA)
M	Molaridad
m	Molalidad
MM	Material y métodos
MDA	Malonildialdehido
MDHAR	Monodehidro ascorbato reductasa
MPa	Megapascal
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada y reducida.
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada y reducida.
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NIR	Near infrared reflectance (Reflexión en el infrarrojo cercano)
NPQ	Quenching no fotoquímico
O ₂ ⁻	Anión superóxido
P	Presión; Nivel de significación en estadística
PAR	Photosynthetic active radiation
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDH	Prolina deshidrogenasa
PE	Pérdida de electrolitos
PE	Parénquima en empalizada
PF (P _F)	Peso fresco
pH	Menos logaritmo de la concentración de protones (-log [H ⁺])

11.- Abreviaturas y símbolos

PL	Peroxidación lipídica
P_n	Tasa de fotosíntesis neta
P_n/g_s	Eficiencia fotosintética
POX	Peroxidasa
PS (P_s)	Peso seco
PS	Parénquima esponjoso
PS II	Fotosistema II
PT (P_T)	Peso turgente
P-V	Presión-volumen
PVPP	Polivinilpirrolidona
qN	Coeficiente de <i>Quenching</i> no fotoquímico
qP	Coeficiente de <i>Quenching</i> fotoquímico
RGR	Relative growth rate (Tasa de crecimiento relativo)
ROS	Reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Ácido salicílico
SDT	Sólidos disueltos totales
SLA	Specific leaf area (Área foliar específica)
SOD	Superóxido dismutasa
SPAD	Unidades SPAD
SPSS	Programa de estadística
T	Transpiración
T^a	Temperatura
TBA	Thiobarbituric acid (ácido tiobarbitúrico)
TBARS	Thiobarbituric acid-reactive substances (Sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico)
TCA	Trichloroacetic acid (ácido tricloroacético)

TPK	Tampón fosfato potásico
TPNa	Tampón fosfato sodio
V	Volumen
Vs	Versus
W	Peso seco del sistema radical
WUE	Eficiencia productiva en el uso del agua
Y(II)	Rendimiento cuántico
Y(NO)	Disipación de calor no controlada
Y(NPQ)	Rendimiento del quenching no fotoquímico

No alfabetizables

Ψ	Potencial hídrico
Ψ_h	Potencial hídrico foliar
Ψ_{ppt}	Potencial hídrico en el punto de pérdida de turgencia
Ψ_o	Potencial osmótico foliar
Ψ_{os}	Potencial osmótico a máxima saturación
Ψ_p	Potencial de presión
μm	Micrometro
μmol	Micromol
Δ	Variación
ε	Módulo de elasticidad
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados

Unidades SI (Sistema Internacional) básicas

m	Metro
g	Gramo
s	Segundo
mol	Mol

