

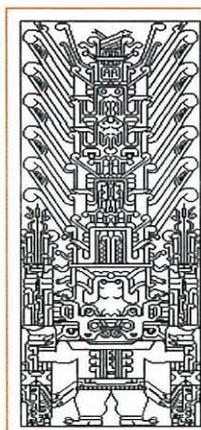


**Instituto de Recursos Naturales y Agrobiológicos de Sevilla
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

**Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Decana de América (1551)
Lima – Perú**



**Universidad Nacional Federico Villarreal
Facultad de Ingeniería Geográfica y Ambiental**



**MEMORIA DEL XLII CURSOS INTERNACIONAL DE
EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA VEGETAL**

**TOLERANCIA AL NaCl DE PLANTAS ANDALUZAS DE VID
SILVESTRE (*Vitis vinifera* L., ssp *silvestris* (Gmelin) Hegi)**

Paula Ermila Rivasplata Varillas

2005

M/CI-42

2005

RIVASPLATA

Mi muy sincero agradecimiento al Dr. Manuel Cantos Barragán. Fue muy difícil para mí hacer la elección del tema de investigación, mas que tema buscaba la persona idónea para que me dirigiera en el proyecto, y creo que lo encontré, gracias a Dios en el Dr. Manuel Cantos Barragán. A él le debo la realización no solo de este trabajo sino la concretización de muchas de mis inquietudes personales, acá en España. Ha sido gracias a su ayuda y apoyo incondicional el principal artífice de una estancia muy productiva y exitosa en España, esencial para mi futuro profesional.

También agradezco a la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), al Dr. Clemente Salas, Director de C. S. I. C. (I. R. N.A. S), al Al Dr. Antonio Troncoso de Arce, Profesor de Investigación del C.S.I.C. (I.R.N.A.S), por permitirme realizar el presente el trabajo en el Departamento que dirige. A la señora Juana Liñán Benjumea, por estar siempre dispuesta a orientarme en la manipulación del material de laboratorio y por orientarme ante cualquier duda.

Agradezco también, a mi amigo Jesús Escobedo, por sus consejos y aliento. Te estimo mucho!!! A Eloy Mundi Zapata por su alegría y espontaneidad, a Peter Pieruschka por su compañía y a mi familia por estar siempre conmigo.



INDICE

1 INTRODUCCION

1.1 El Efecto de la Salinidad en las Plantas	7
1.1.1. Efecto osmótico	7
1.1.2 Efecto específico por iones	8
1.2. Defensa de la planta frente el estrés salino.	9
1.3. El cultivo <i>in vitro</i> y la salinidad.	11
1.4 La vid silvestre	13
1.4.1 Caracteres botánicos	13
1.4.2. Criterios de discriminación entre vides silvestres y cultivadas.	14
1.4.3 Hábitats	16
1.4.4 Usos	16
1.4.5 La vid silvestre como recurso fitogenético	18

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General	19
----------------------	----

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas de poblaciones de vid silvestre en concentraciones crecientes de NaCl.	20
3.1.1 Material vegetal	20
3.1.2 Medio de cultivo	20
3.1.3 Toma de datos.	22
3.2 Ensayo de tolerancia a la sal de plantas en macetas en cámara de cultivo	23
3.2.1 Material vegetal	23
3.2.2 Medio de cultivo y diseño experimental.	24

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ensayo <i>in vitro</i> de plantas de poblaciones de vid silvestre en concentraciones crecientes de NaCl.	26
4.1.1 Supervivencia	26
4.1.2. Pesos fresco y seco relativos y porcentaje de hidratación de las plantas sometidas a estrés salino <i>in vitro</i> .	30
4.1.3 Longitud media del tallo.	32
4.1.4. Número medio de brotes	36
4.1.5 Número medio de yemas	38
4.1.6 Porcentaje de emisión radicular.	42
4.1.7 Número medio de raíces.	44
4.1.8 Longitud media de raíces.	46
4.1.9. Influencia de la concentración de NaCl sobre el contenido de N, K, Ca y Na en plantas de vid silvestre cultivadas <i>in vitro</i> .	48
4.2 Ensayo en cámara de cultivo de plantas de poblaciones de vid silvestre en concentraciones crecientes de NaCl.	53
4.2.1. Supervivencia.	53
4.2.2. Longitud del tallo	54
4.2.3. Número medio de brotes	58
4.2.4. Número medio de yemas	60
5. BIBLIOGRAFÍA	63

1 INTRODUCCION

1.1 El Efecto de la Salinidad en las Plantas

Entre las causas principales que afectan al crecimiento de las plantas, se encuentra el estrés generado por diferentes factores de naturaleza tanto biótica como abiótica, de tal manera que la planta no puede desarrollarse debidamente y, en consecuencia, reproducirse en forma adecuada. El estrés salino es uno de los factores abióticos más extendidos, que, además, como es bien conocido, es uno de los máximos responsables de la limitación e incluso de la inhibición del desarrollo de las plantas. A grandes rasgos se puede distinguir entre plantas glicofitas, sensibles a la salinidad, y plantas halofitas o tolerantes a la salinidad.

La salinidad tiene un doble efecto sobre las plantas: un efecto osmótico, debido al incremento de presión osmótica como consecuencia de la concentración de sales y un efecto específico debido al exceso de iones Na^+ y Cl^- .

1.1.1 Efecto osmótico

La entrada de agua en la planta depende por una parte, del gradiente de potencial hídrico, que es la fuerza que mueve al agua a penetrar dentro de la misma y por otra, de la resistencia de la raíz a la entrada del agua. La entrada se hace siguiendo potenciales hídricos decrecientes. Si se incrementa la concentración de sales en la disolución del suelo, aumenta la presión osmótica en dicha disolución, lo que provoca un descenso en el potencial hídrico de la misma y, por tanto, una disminución del gradiente de potencial. El resultado es un descenso en la absorción de agua por la planta. La absorción de solutos inorgánicos del suelo o la síntesis de solutos orgánicos, como respuesta a este estrés osmótico, causa la reducción de la producción de materia seca por la planta.

También hay que considerar el efecto depresor que sobre la síntesis de proteínas tiene el exceso de sales en los tejidos (Strogonov, 1964). Si los niveles de salinidad en el suelo siguen subiendo, se produce una alteración del balance hormonal en los vegetales. El exceso en la acumulación de ácido abscísico (ABA) es una típica respuesta a las condiciones de déficit hídrico provocadas por falta de agua o por alta concentración salina en el medio (Romero-Aranda et al., 1998).

1.1.2 Efecto específico por iones

El efecto más importante del exceso de iones en suelos salinos sobre la planta, es el ejercido sobre las relaciones nutricionales en la misma y viene determinado por dos aspectos relacionados. Por un lado, la acumulación excesiva de iones dominantes en la solución del suelo, como Cl^- o Na^+ , que puede alcanzar niveles tóxicos (Bernstein y Hayward, 1958; Iyengar et al., 1977; Greenway y Munns, 1980; Ashraf et al., 1986; Troncoso et al., 1999; cantos et al., 2002). Por otro, los desequilibrios nutricionales que ocasiona la acumulación preferente de unos determinados iones frente al resto (Grattan y Grieve, 1992). Así, la acumulación de Cl^- puede inhibir la absorción del nitrato y provocar una deficiencia de N en la planta (Aslam et al., 1984; Ward et al., 1986; Klobus et al., 1988). La disponibilidad de fósforo para la planta disminuye en un suelo salino, ya que la concentración de P en el suelo está estrechamente controlada por procesos de desorción y por la solubilidad de los minerales de Ca-P (Grattan y Grieve 1992), la cual desciende conforme aumenta la salinidad (Sharpley et al., 1992). El Na^+ interfiere en la absorción de K^+ , por competencia en los mecanismos de absorción, por lo que se puede provocar la deficiencia de este elemento en la planta como se ha descrito para la vid (García y Charbaji, 1993). La relación Na/K se ha considerado como un buen indicador para el estrés salino en plantas en campo (Devitt et al., 1981; Aslam et al., 1988) e incluso para vides *in vitro*. Troncoso et al., 1999, encuentran una relación directa entre la concentración de sal en el medio y el cociente Na/K en variedades de vid tolerantes y sensibles cultivadas *in vitro*. También se ha observado que el Na^+ puede causar desajustes en la nutrición del Ca^{2+} (Lynch y Läuchli, 1985), especialmente cuando las concentraciones de Ca en la disolución del suelo son bajas o cuando hay problemas de aireación como ocurre en suelos sódicos (taponamiento de poros) pese a que las relaciones Ca/Na sean elevadas. Las interacciones entre los iones Na^+ y Ca^{++} desembocan en una serie de desórdenes fisiológicos que afectan fundamentalmente al crecimiento y funcionamiento de la raíz (Kent y Läuchli 1985; Mass y Grieve 1987; Cramer et al., 1987; Grieve y Mass, 1988).

Varios autores indican que el incremento catiónico, considerado como el principal factor de inhibición del desarrollo de la planta por la sal (Arbabzadeh y Dutt, 1987), se debe principalmente al Na^+ (Dowton, 1977; Bartolini, et al., 1991; García y Charbaji 1993). Siendo el Cl^- , concretamente para la vid, menos responsable del estrés salino (Arbabzadeh y Dutt, 1987; Walker, 1994).

1.2. Defensa de la planta frente el estrés salino.

En los suelos salinos, los iones más comunes son el Na^+ y Cl^- , pues en el pasado la mayoría de los suelos estuvieron bajo mar. Sin embargo, las plantas aún no han desarrollado suficiente tolerancia a los medios salinos y generalmente mueren en situaciones de alta concentración de sal en el suelo, como ya se ha indicado. No obstante, las plantas están genéticamente dotadas para soportar determinadas concentraciones de sal en el suelo, acometiendo, con éxito, el estrés salino, mediante diversas tácticas de adaptación. La más inmediata es el descenso del potencial hídrico en la raíz, de tal manera que el gradiente de entrada de agua se mantenga más o menos constante, lo que se consigue acumulando solutos orgánicos o inorgánicos en el jugo celular (Gale et al., 1967; Termaat et al., 1985). Este mecanismo de defensa se llama “ajuste osmótico” y es el primer mecanismo que afecta a la pérdida de rendimiento.

Otro mecanismo de respuesta es el cierre estomático para compensar el estrés hídrico al que se encuentra sometida la planta, disminuyendo la transpiración (Walker, 1994), lo que también mermaría la producción al aumentar la resistencia a la entrada del CO_2 (Munns, 1993) y, en consecuencia alteración de la fotosíntesis (Bongi y Loreto, 1989; Delfine et al., 1998, 1999). Unidos a la menor conductancia estomática, la planta posee otros mecanismos morfológicos de defensa frente a la sal, como la disminución del número de estomas por unidad de superficie. Cuando las condiciones de salinidad aumentan o persisten puede darse la reducción de la superficie foliar, llegando incluso a la muerte de las hojas (Marschner, 1986).

Un tercer mecanismo de defensa consiste en determinadas modificaciones foliares como el aumento de espesor de la cutícula o disminución de la relación parte aérea/raíz (Papadopoulos y Rending, 1983), presencia de pelos o laminillas en la superficie de la célula, que dificultan el intercambio de vapor; la succulencia, que reduce el número de estomas por unidad de superficie (Bongi y Loreto, 1989; Cantos et al., 2000) y las células especializadas en la excreción de la sal (Marchner, 1986; Cano 1991), así como la formación de metabolitos protectores, como azúcares (Lessani, 1969; Munns y Weir, 1981); glicerol y mentol (Gimmler y Moller, 1981); sorbitol (Wyn Jones, 1981) y prolina (Guerrier, 1989). Los altos niveles de ácido abscísico (ABA) en las hojas favorecen el ajuste osmótico de una manera rápida por

acción sobre la transpiración, ya que inducen el cierre de estomas (Dowton y Loveys, 1981) y la acumulación de aminoácidos en las hojas. Sin embargo, esta acumulación llega a ser nociva para la planta y parece la causa de muchos de los síntomas del exceso de sales. Los altos niveles de algunas hormonas como ácido abscísico, ácido giberélico, parecen estar implicados en la reducción del crecimiento y en la aceleración de la senescencia de las hojas (por inhibición de la síntesis de proteínas y por aumento de la velocidad de degradación de la clorofila).

Como consecuencia de todo lo indicado, la capacidad de respuesta de las plantas al estrés salino controlando de alguna forma aspectos como energía, hidratación y nutrición conduce al concepto de tolerancia, que fue definida por Berstein (1963) como el grado con el que la planta ajusta su potencial osmótico, con un sacrificio mínimo de su crecimiento o, por Shannon (1979), como la capacidad de una planta para soportar los efectos de una solución salina concentrada en la zona radicular.

La vid se ha considerado, en general, (Maas y Hoffman, 1977) como moderadamente tolerante a la salinidad, provocando ésta en la planta desde leves síntomas como disminución del crecimiento (Dowton y Crompton, 1979; García et al., 1993; Francois y Clark, 1979; Prior et al., 1993; Al Saidi et al., 1988) hasta la muerte por una extrema toxicidad que se inicia con una clorosis foliar que llega a convertirse en necrosis (Dowton, 1977 a y Walker et al., 1981). Los tratamientos salinos producen cambios en la vid similares a los reseñados antes como métodos de defensa de plantas superiores ante la sal. Así, hay modificaciones en la conductancia estomática (Kriedemann et al., 1975), para realizar el ajuste osmótico (Walker et al., 1981) que, según Dawton y Millhouse (1983, 1985) contribuye al mantenimiento de la turgencia por la planta ante el estrés salino impidiendo de este modo la disminución de la fotosíntesis.

Los cambios citados en la conductancia estomática como consecuencia de los tratamientos salinos, en el caso de la vid, también están relacionados con los niveles de ácido abscísico (Kriederman et al., 1975; Daeton y Lovelys (1981).

Cuando la sal está compuesta por el catión Na^+ el incremento en la concentración catiónica en los tejidos se debe principalmente a este elemento (García y Charbaji, 1993). Para el caso de la vid el antagonismo Na-K fue puesto de manifiesto por García y Charbaji,

1989), mientras que Dowton (1985) indicó una reducción en el nivel de Ca^{2+} en planta de vid tratadas con NaCl debida a la interacción con iones Na^+ .

Se conoce (Kishore et al., 1985), que en el caso de la vid, diferentes sales en el medio producen distintos efectos en la planta, siendo los cloruros los más dañinos comparados con carbonatos y sulfatos y, entre los cationes, el sodio fue el que causó la mayor reducción del crecimiento de la planta.

1.3. El cultivo *in vitro* y la salinidad.

El cultivo *in vitro* de tejidos y células vegetales, debido a la posibilidad que ofrece esta técnica de evaluar un determinado factor manteniendo constante el resto de variables, es una herramienta útil para estudios relacionados con la salinidad, en especial para la caracterización de líneas tolerantes, ya sean mutantes espontáneos o inducidos (Sumaryati et al., 1992; Kuo et al., 1994; Morabito et al., 1994; Hafizur-Rahman et al., 1995; Zhang y Donnelly, 1997; Cano et al., 1998; Kirdmanee et al., 1998; Khrais et al., 1998; Liua y Baob, 1998; Ochatt et al., 1999; Troncoso et al., 1999; Cantos et al., 2002; Troncoso et al., 2003; Troncoso et al., 2004).

Sin embargo, a diferencia de los numerosos trabajos sobre la tolerancia de plantas a la salinidad realizados en condiciones de campo o de invernadero, hay muy pocos estudios en los que se aplica el cultivo de tejidos *in vitro* a la selección de plantas tolerantes a la sal y ninguno sobre el efecto de la sal sobre vid silvestre. Debido a la importancia que presenta la salinización, junto a la dificultad de alcanzar resultados prácticos en la selección convencional, y a la facilidad de aplicación de estrés salino a cualquier sistema *in vitro*, es interesante potenciar estos estudios (Cano, 1991) y, particularmente en la vid silvestre. No obstante, de acuerdo con Skene y Barlass (1988) y Troncoso et al., (1999a), los resultados obtenidos *in vitro* deben ser contrastados en experimentos realizados en condiciones externas.

Una de las primeras investigaciones sobre el efecto de la sal en material vegetal cultivado *in vitro*, fue realizado por Babaeva et al., (1968) utilizando callos de raíz de zanahoria (*Daucus carota* L.), cultivados en concentraciones crecientes de NaCl. De este modo, se observaron diferentes niveles de tolerancia a la salinidad según el material obtenido.

Melchers (1972), discutió las ventajas de la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* para seleccionar mutantes resistentes a la sal. Esta aproximación, la aplicó posteriormente con éxito Zenk (1974), que seleccionó una línea celular aislada de haploides de *Nicotiana sylvestris* L., capaz de crecer sobre medio conteniendo 0,17 mM de NaCl, resistencia que se mantuvo estable después de varios subcultivos en medio salino.

Uno de los principales problemas del uso del cultivo *in vitro* como herramienta de selección de plantas tolerantes a la sal es que la planta regenerada a partir de células vegetales, material poco diferenciado, no implica garantía absoluta de que sea una copia exacta de la línea parental utilizada, de modo que no siempre la tolerancia en el ámbito celular ha sido expresada en la planta regenerada (Tal, 1985; Flowers et al., 1985). Esto es debido a la variación somaclonal (Scowcroft y Larkin, 1982) que es una manera de aumentar la variabilidad genética, dando lugar a un cambio genético (características cualitativas y cuantitativas) que se puede mantener en las plantas regeneradas (Cano, 1991). Los estudios sobre cultivo *in vitro* de tejidos, material más diferenciado y, en consecuencia, menos susceptible de ser modificado genéticamente que las células o callos, para la caracterización de clones tolerantes a la sal son todavía más escasos. Alhag Dow et al., (1999) consideraron las interacciones de la sal con el estado nutritivo de plantas de patata obtenidas por micropropagación y Cano et al., (1998) evaluaron la tolerancia a sal de diferentes especies de tomate silvestre, resaltando que los parámetros de enraizamiento de las plántulas desarrolladas a partir de los ápices pueden ser buenos indicadores para una evaluación rápida de la tolerancia a la sal.

Uno de los primeros trabajos, efectuado con yemas de vid (*Vitis vinifera* L.), fue realizado por Barlass y Skene en 1981, encontrando que la tolerancia *in vitro* al NaCl es dependiente de la variedad. Aunque, constataron que la metodología era aplicable a la selección, en trabajos posteriores Skene y Barlass, (1988), como se ha indicado, observaron que la selección *in vitro* de material de vid por su tolerancia a la salinidad necesitaba ser contrastada con ensayos realizados en condiciones externas. Posteriormente, (Troncoso et al., 1999a), estudiaron la respuesta de once portainjertos de vid a concentraciones crecientes de NaCl en el medio de cultivo, tanto *in vitro*, usando yemas apicales y axilares, como en cámara de crecimiento. Los resultados obtenidos permitieron, por un lado, clasificar las variedades estudiadas de acuerdo con su tolerancia a la salinidad en medio controlado y confirmar dicho comportamiento en condiciones externas, y por otro, estudiar las alteraciones nutricionales

provocadas por la adición de NaCl en el medio de cultivo, encontrando incrementos claros de los niveles de N, Na y Cl y reducciones importantes de P y K.

1.4 La vid silvestre

I.4.1 Caracteres botánicos

La vid pertenece al género botánico *Vitis*, incluido en la familia de las Vitáceas o Ampelidáceas, comprendida dentro del orden Ramnales o Ramnidas (carpelos de flor cerrados), subclase Rosidas con flores que presentan pétalos libres (Dialipétalas), con ovario súpero Superovaricas, clase Dicotiledóneas (semillas con dos cotiledones), subtipo Angiospermas (semillas encerradas en el fruto) y tipo Fanerógamas (por tener flores).

Las plantas de la familia (Vitáceas) son lianas o arbustos trepadores de tallo herbáceo o sarmentoso. Comprende catorce géneros, entre los que se encuentra *Vitis*, originario de las zonas templadas del hemisferio norte (América, Europa y Asia). Sus flores son de cáliz corto, sépalos reducidos a dientes y pétalos soldados en el ápice. Está dividido en dos subgéneros: *Vitis* y *Muscadinia*. El subgénero *Vitis* agrupa nueve series y comprende unas treinta especies, distribuidas por América, Europa y Asia. Siendo *Vitis vinifera*, L. subespecie *sativa* la vid cultivada.



Figura 1.- Planta de vid silvestre.

Las poblaciones espontáneas, es decir, no cultivadas, de vid silvestre europea corresponden al taxón *Vitis vinifera* L. subespecie *sylvestris* (Gmelin) Hegi, (figura 1)

parental dioico de las variedades de cultivo hermafroditas, aparecidas por mutación y seleccionadas por el hombre. A la subespecie *sylvestris* pertenecen los ejemplares espontáneos que aparecen distribuidos por Europa Meridional y Central, Norte de África, Oriente Medio y otras regiones asiáticas, situadas entre el Mar Negro y el macizo del Hindu Kush (figura 2).

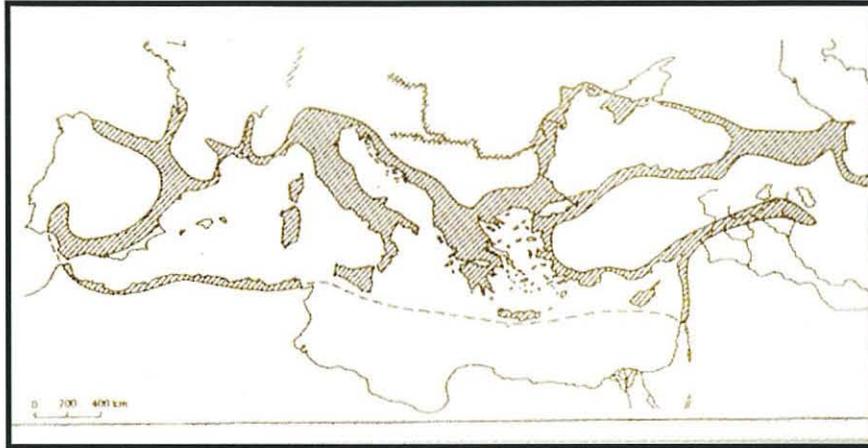


Figura 2. Distribución mundial de la vid silvestre.

Las actuales poblaciones euroasiáticas de vid silvestre se consideran como un pequeño vestigio de aquellas existentes antes de las glaciaciones cuaternarias. En España, la vid silvestre se conoce también con los nombres de "labruscas", "parras bravas" o "parrones" (Ceballos y Martín Bolaños, 1930; Ceballos y Vicioso, 1933; Lázaro, 1920; Pardo Sastrón, 1902).

1.4.2.- Criterios de discriminación entre vides silvestres y cultivadas.

Las vides silvestres suelen tener las hojas más pequeñas que las variedades de cultivo, bastante vigor y, salvo excepciones, una elevada resistencia/tolerancia a plagas, enfermedades, encharcamiento y a la caliza activa (Ocete *et al.*, 1997a y b). No obstante, el carácter más inmediato de discriminación entre vid cultivada y silvestre es la flor, hermafrodita en la primera (figura 3) y dioica en la segunda (figura 4).

Sin embargo, en la actualidad, para caracterizar cualquier clase de vid y poder distinguir entre ambas subespecies, la forma más fiable es el empleo de técnicas

quimiotaxonómicas, basadas en el estudio de los isoenzimas o marcadores moleculares, tipo RAPDs (Random Amplified Polimorphic DNA) o microsatélites de ADN (STMs), (Perret, 1997; Bowers et al., 1999; This et al, 2001).

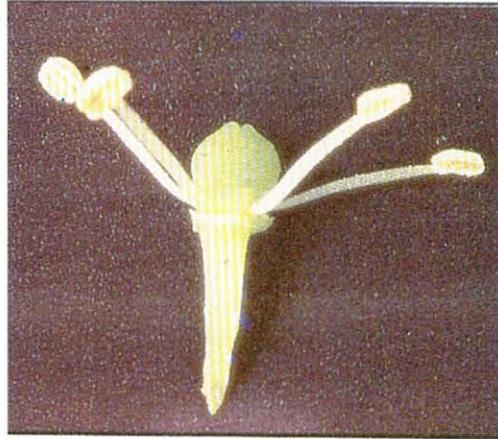


Figura 3. Flor hermafrodita de vid (var. Palomino de Jerez)



Figura 4. Detalle de una flor masculina (izquierda) y de una femenina (derecha)

1.4.3 Hábitats

En Andalucía, los hábitats preferidos por esta vitácea (figura 5), donde se encuentran casi todas las poblaciones estudiadas, forman parte de bosques en galería, o de ribera. Se desarrollan, por tanto, en torno a corrientes de agua, como ríos y arroyos (Pirone, 1995).



Figura 5. Aspecto del hábitat de vid silvestre Pantano de la Minilla (Sevilla) Población SE1.

Un hecho a resaltar es que, dentro de Andalucía, concretamente en los *canutos* del actual Parque Natural de Los Alcornocales, la vid silvestre se encuentra en un ambiente calificable como subtropical (Blanco et al., 1998)

1.4.4 Usos

Antiguamente, la vid silvestre se utilizaba como alimento. Rivera y Walker (1989), citan el hecho de que dentro de la Península Ibérica, en épocas prehistóricas e históricas, sus bayas contribuyeron directamente a la alimentación humana. Lógicamente, antes de la llegada de las variedades hermafroditas aportadas por los fenicios, griegos y romanos, los racimos silvestres constituyeron la materia prima del vino. En ciertas zonas europeas, como Alemania y Austria, dicha producción se ha mantenido hasta épocas recientes. Además, en ciertas regiones de Italia y Alemania, los racimos silvestres se mezclaban con los cultivados para abaratar la producción de vinos caseros en el medio rural (Anzani *et al.*, 1993; Schaumann, 1971).

Dentro de España, en la Sierra de Cazorla, Cuenca del río Rumbler (Zocueca) y Sierra de Grazalema (El Bosque, Prado del Rey y Zahara de la Sierra), se mantuvo dicha actividad a nivel doméstico hasta hace unas tres décadas..

En cuanto a usos medicinales, se pueden encontrar varias referencias en diversos textos españoles antiguos. Respecto a la savia que brota durante la etapa de "lloro", Quer (1784) refirió sus aplicaciones diuréticas y oftalmológicas. Referente al uso de sus racimos antes de la maduración, el mismo autor indica que éstos se han empleado para fabricar una especie de refresco digestivo denominado agraz.

A nivel enológico en la Sierra de Cazorla, el mosto de uvas tintas ha servido para colorear vinos blancos (Ocete *et al.*, 2000 a).

Lógicamente, el aporte del fruto silvestre servía para disminuir el pH del mosto, al aumentar el contenido de ácidos, facilitando una buena conservación del vino, mientras que los volátiles contenidos en las flores conferían a la mezcla un aroma afrutado.

Respecto a sus características enológicas, citando literalmente a Ocete *et al.*, 2000, *en muestras evaluadas recientemente procedentes de poblaciones de El Bosque, se observa que la intensidad de color indica que el vino es de buena capa (tinto bien marcado) siendo la tonalidad característica de un vino joven con pH 3,5, que no ha iniciado todavía ningún proceso de envejecimiento. La acidez total es alta por no haber sufrido aún la fermentación maloláctica. Siendo la concentración de ácido málico contenida en el vino debida a un régimen climático lluvioso con temperaturas moderadas de la zona de recolección de la uva. El pH mantiene una lógica relación con la acidez total y está bien equilibrado con el grado alcohólico, dándole frescura y posibilidad de crianza, con una buena defensa ante microorganismos perjudiciales y oxidaciones excesivas.*

Respecto a los polifenoles totales, la cifra obtenida indica que se trata de un vino con una dotación polifenólica alta y, por tanto capacitado para soportar una crianza larga. La concentración de antocianos indica que la uva tiene una vocación tintorera potente.

En resumen, los datos analíticos reflejan un gran equilibrio en la composición del vino de vid silvestre, que reúne las cualidades inherentes de los caldos que se pueden convertir en crianza o reserva.

1.4.5 La vid silvestre como recurso fitogenético

Aparte de los usos reseñados, la vid silvestre constituye un importante recurso fitogenético, ya que ha venido evolucionando libre de la selección artificial humana efectuada desde los comienzos de la viticultura, y que, en consecuencia, ha introducido una creciente erosión genética o pérdida de variabilidad (agrobiodiversidad), es decir, la base genética sobre la que actúa la selección natural. Ello aumenta de forma alarmante la vulnerabilidad de los diferentes cultivares a nuevos cambios ambientales o a la aparición de nuevas plagas y enfermedades (Esquinas-Alcázar, 1993). Así debe tenerse muy en cuenta que las formas autóctonas espontáneas contienen una diversidad de base para realimentar a los parientes actuales empleados en los cultivos (This et al., 2001).

A continuación se exponen algunas de las características genéticas conocidas de interés agronómico y enológico que poseen las vides silvestres:

- Elevada capacidad de floración de los individuos masculinos y de algunos femeninos.
- Escasa incidencia de plagas y enfermedades, aunque en la totalidad de las poblaciones muestreadas existen síntomas causados por el oídio, mildiu y ácaro de la erinosis. El material vegetal procedente de aquellos ejemplares menos sensibles podría tener interés en la mejora de viníferas. La ausencia de síntomas provocados por hongos de madera debe ser destacada, ya que este es uno de los principales problemas, de difícil solución, a los que se enfrenta la viticultura actual.
- Gran vigor, capacidad de resistencia al encharcamiento, a la caliza activa y a los hongos responsables de la podredumbre de la raíz. Por tanto, el material recolectado podría ser ensayado como portainjerto en suelos que sufran encharcamiento, previo análisis del grado de prendimiento con distintas viníferas. Asimismo, podrían, también, evaluarse determinados portainjertos obtenidos por hibridación con especies americanas.

Sin embargo, la supervivencia de estas parras está extremadamente amenazada debido a la agresión antrópica de sus hábitats. En efecto, las obras públicas (trazado de carreteras, puentes, embalses), la expansión de las zonas urbanizadas, las explotaciones forestales de índole comercial, el aumento de pastizales, la destrucción de los bosques de ribera y la presión ejercida en ciertas zonas por el exceso de carga ganadera y cinegética son algunas de las principales causas que amenazan a esta subespecie. A todo ello cabe añadir la importación de ciertas especies de vid de origen norteamericano, usadas como portainjerto para recuperar el viñedo dañado tras la invasión filoxérica, que desplazan a los ejemplares silvestres de sus hábitats (Terpó, 1962; 1969 y 1974). En consecuencia, este estado de conservación de la vid silvestre ha llevado a esta subespecie a figurar dentro de la lista roja publicada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 1997), por lo que sería necesario contar con una figura de protección adecuada para su conservación y posterior reintroducción de las parras en el medio natural. De esa manera se contribuiría a restaurar los bosques de ribera, que constituyen unos de los ecosistemas más degradados de Andalucía.

En España, se encuentran diversas poblaciones situadas en Andalucía, Asturias, Cantabria, País Vasco, Castilla y León, Castilla-La Mancha y Extremadura.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El presente trabajo pretende caracterizar la vid silvestre andaluza de acuerdo con su tolerancia a la sal, cultivando *in vitro*, en medio con concentraciones crecientes de NaCl, yemas apicales y subapicales de plantas de poblaciones andaluzas. También se comprobarán los resultados obtenidos efectuando pruebas similares en condiciones externas de cámara de cultivo.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Cultivo *in vitro* de plantas de poblaciones de vid silvestre en concentraciones crecientes de NaCl.

3.1.2 Material vegetal

Como material vegetal de partida se usaron explantos obtenidos a partir de plantas *in vitro*, a su vez procedentes de sarmientos de las poblaciones de vid silvestre CA2, CA10, CO1, CO3, CO6, CO7, CO9, HU3, J1, J2, J3, MA1 y SE1 cuya situación se indica en la figura 6. Al provenir los explantos de plantas obtenidas mediante micropropagación, no necesitaron esterilización.

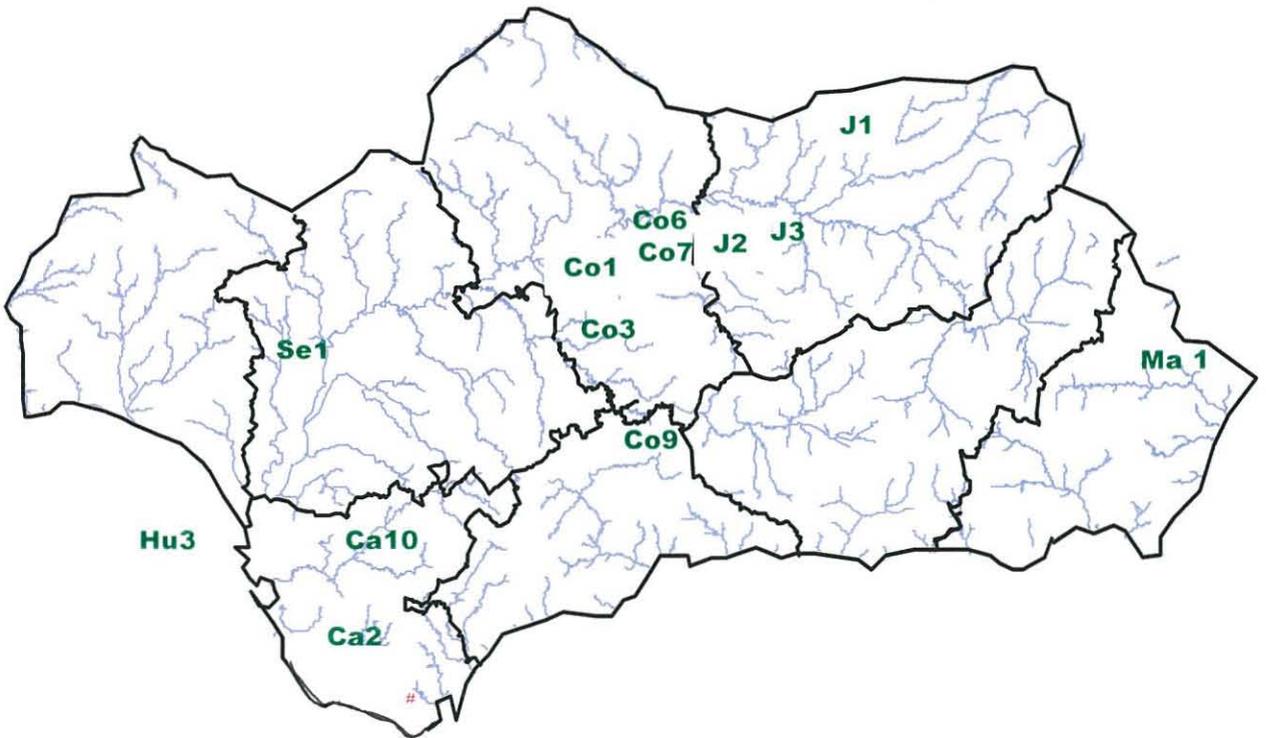


Figura 6.- Distribución espacial de las poblaciones de vid silvestre estudiadas.

3.1.3 Medio de cultivo

Para un primer experimento orientativo, se subcultivaron explantos, de entre 0,5 y 1 cm de longitud y 1 yema, de las poblaciones CO1, J2 y SE1, en tubos de Wit conteniendo 8 c.c. de cada uno de los siguientes medios de cultivo:

- 30 explantos de cada población medio VID (Troncoso et al., 1990) (tabla 1) (control) (2,13 mS/cm de C.ε).
- 30 explantos de cada población en medio VID más 3 gL⁻¹ (50 mM) de NaCl. (5,94 mS/cm de C.ε).
- 24 explantos de cada población en medio VID más 5 gL⁻¹ (85 mM) de NaCl. (8,87 mS/cm de C.ε).
- 24 explantos de cada población en medio VID más 7 gL⁻¹ (120 mM) de NaCl (11,79 mS/cm de C.ε).
- 24 explantos de cada población en medio VID más 9 gL⁻¹ (155 mM) de NaCl. (13,75 mS/cm de C.ε).

De acuerdo con los resultados obtenidos en las poblaciones del primer experimento para el resto (CA2, CA10, CO3, CO6, CO7, CO9, HU3, J1, J2 y MA1), se ensayaron los siguientes medios y número de repeticiones:

- 24 explantos de cada población en medio VID (Troncoso et al., 1990) (control)
- 24 explantos de cada población en medio VID más 3 gL⁻¹ (50 mM) de NaCl.
- 24 explantos de cada población en medio VID más 5 gL⁻¹ (85 mM) de NaCl.
- 12 explantos de cada población en medio VID más 7 gL⁻¹ (120 mM) de NaCl.
- 12 explantos de cada población en medio VID más 9 gL⁻¹ (155 mM) de NaCl.

En todos los casos, los explantos se incubaron en cámara de cultivo a 24±2°C de temperatura, 18 horas de fotoperíodo y 30 μE m⁻² s⁻¹ de intensidad luminosa.

Tabla 1.- Composición del medio de cultivo vid. (Troncoso et al., 1990)

MACRONUTRIENTES			
		mg/l	mM
Nitrato potásico	KNO ₃	800	7.91
Nitrato cálcico	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	300	1.27
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	800	10.00
Fosfato ácido de potasio	KH ₂ PO ₄	170	1.25
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ 7H ₂ O	370	1.50
Sulfato de hierro	FeSO ₄ 7H ₂ O	27.1	0.097
EDTA Na ₂ EDTA		37.3	0.10
MICRONUTRIENTES			
		mg/l	μM
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ H ₂ O	0.85	5.0
Acido bórico	H ₃ BO ₃	6.2	100.0
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6	30.0
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25	1.03
Sulfato de cobre	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	0.100
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	0.105
VITAMINAS			
		mg/l	μM
Tiamina		1	2.96
Mioinositol		100	555.00
REGULADORES			
BAP		0.072 mg/l	0.32 μM
ANA		0.024 mg/l	0.13 μM
	Agar		0.6%
	pH		5.7

3.1.3 Toma de datos.

Transcurridos 30 días de incubación en cámara de cultivo y una vez superados en 8 de las 13 poblaciones el 50% de plantas muertas en las concentraciones de 7 gL⁻¹ y en 10 de las 13 en la concentración de 9 gL⁻¹, se determinó en cada uno de los casos el porcentaje de supervivencia, longitud del tallo, número de brotes, número de yemas, porcentaje de enraizamiento, número y longitud de las raíces. Finalizada la prueba a los 60 días de incubación, se calculó el nivel de hidratación (H) mediante la fórmula $H (\%) = [(pf-ps)/pf] \cdot 100$ donde p.f. = peso fresco y p.s. = peso seco.

Para las determinaciones analíticas, también a los 60 días de finalizada la prueba, cada una de las muestras se lavó con agua y detergente y se enjuagó cuidadosamente con agua destilada. Para su desecación, se envolvió en un papel de filtro y se introdujo en una estufa con circulación de aire a 60 °C, durante 2 ó 3 días. Una vez seca se molió en un molinillo y el polvo se introdujo en un sobre de papel debidamente etiquetado.

El procedimiento para la determinación de N consistió en pesar 0.2 g de cada muestra vegetal e introducirlos en tubos de vidrio Kjeldahl. Se les añadieron 0.5 g de K_2SO_4 desecado y selenio (catalizadores de digestión), y 5 ml de H_2SO_4 . Los tubos se colocaron en un bloque digestor y se sometieron a una digestión elevando la temperatura hasta 380 °C. Después del ataque se les añadió agua destilada y cuando se enfriaron se pasaron a matraces de 25 ml y se enrasaron. Así, las muestras quedaron preparadas para leerlas en el autoanalizador frente a una curva patrón.

La concentración de Na, K y Ca en las plantas de cada una de las concentraciones de NaCl se realizó mediante emisión de plasma (ICP-OES). (Wallinga et al., 1995).

Los tratamientos estadísticos utilizados fueron para la comparación de medias el test-t de Student y para los análisis de la varianza el de Bonferroni usando, en ambos casos, el programa estadístico Statistix ver. 1.0. La relación entre variables se realizó mediante el coeficiente de correlación lineal (r).

3.2 Ensayo de tolerancia a la sal de plantas en macetas en cámara de cultivo

3.2.1 Material vegetal

Se usó como material vegetal plantas de la población de vid silvestre J3 procedentes de propagación *in vitro*, que se trasplantaron individualmente desde *in vitro* a contenedores de polipropileno de 330 cc de capacidad, con sustrato compuesto por arena inerte (AQUARAMA), saturada de humedad. Para ello, se extrajo la planta del tubo y, una vez eliminados todos los posibles restos de agar, se introdujo el sistema radicular en el sustrato. El conjunto, vaso y planta, se cubrió con una bolsa de plástico transparente también impregnada de agua en su interior mediante pulverización y se colocó en una cámara de adaptación (16 horas de fotoperiodo, $111 \mu Em^{-2}s^{-1}$ suministrados con tubos fluorescentes luz día (PHYLLIPS

TL 40w/54 Rs). Tras 7 días en esas condiciones se comenzó a cortar los picos de la envuelta de plástico hasta que poco a poco, en el intervalo de días, se eliminó la cubierta y se logró el contacto total de la planta con el ambiente (Cantos et al., 1993).

3.2.2 Medio de cultivo y diseño experimental.

En la tabla 2 se indican las concentraciones de NaCl y el número de plantas en cada una de las tesis ensayadas una vez superado el proceso de adaptación.

Tabla 2.- Solución de riego y niveles de NaCl ensayados en plantas de J3 cultivadas en cámara de cultivo.

Solución de riego	Conductividad eléctrica (C.ε) (mS/cm)	n° de plantas de J3
Solución Hoagland (20%) (control)	0,779	16
Solución Hoagland (20%) + 3 gL ⁻¹ NaCl	5,10	14
Solución Hoagland (20%) + 5 gL ⁻¹ NaCl	8,07	15
Solución Hoagland (20%) + 7 gL ⁻¹ NaCl	11,06	15
Solución Hoagland (20%) + 9 gL ⁻¹ NaCl	13,27	15

Al comenzar la prueba, cada clon estaba compuesto por las plantas que se indican en la tabla anterior, las de los grupos control se siguieron regando sólo con solución nutritiva, mientras que los restantes grupos de plantas, se trataron con la misma solución nutritiva y adiciones crecientes de NaCl según se relaciona en la tabla 2. El riego se llevó a cabo cada dos días, aumentando la concentración de NaCl a razón de 1 gL⁻¹ en cada riego hasta conseguir la conductividad eléctrica requerida para cada caso. Estos riegos se realizaron en todos los casos con abundante solución hasta conseguir que el percolado obtenido tuviera la misma conductividad eléctrica que la solución de riego suministrada. En consecuencia, en cada riego se midió la conductividad de la solución de riego y del percolado de cada maceta.

Tabla 3. Concentraciones de NaCl y días de duración hasta conseguir cada una de las concentraciones salinas de cada tratamiento.

NaCl	3 gL ⁻¹	5 gL ⁻¹	7 gL ⁻¹	9 gL ⁻¹
Número de Riegos	3	5	7	9
Días duración	6	10	14	18

En cada riego se evaluó el efecto de los tratamientos salinos con un seguimiento visual del estado y comportamiento de la planta, mientras que las medidas de crecimiento, consistentes en longitud del tallo, número de yemas y número de brotes, se realizaron a los 30 días de alcanzar la conductividad eléctrica requerida para cada tesis (tabla 3).

Los tratamientos estadísticos utilizados fueron para la comparación de medias el test-t de Student y para los análisis de la varianza el de Bonferroni usando, en ambos casos, el programa estadístico Statistix ver. 1.0. La relación entre variables se realizó mediante el coeficiente de correlación lineal (r).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ensayo *in vitro* de plantas de poblaciones de vid silvestre en concentraciones crecientes de NaCl.

En la tabla 4 se indica el número de plantas sobre las que se ha efectuado el estudio, una vez eliminadas las que resultaron contaminadas.

Tabla 4.- Número de plantas estudiadas de las distintas poblaciones.

Salinidad	POBLACIONES												
	CA6	CA10	CO1	CO3	CO6	CO7	CO9	HU3	J1	J2	J3	MA1	SE1
0 g/l	11	19	21	18	5	21	17	19	11	28	22	12	25
3 g/l	7	11	25	17	2	15	15	15	8	26	26	3	26
5 g/l	5	13	21	15	6	17	14	13	8	26	23	7	27
7 g/l	6	10	21	5	3	14	10	9	6	29	8	9	27
9 g/l	3	7	18	8	3	12	10	9	6	19	8	7	26

4.1.1 Supervivencia

En la tabla 5 se indican los porcentajes de supervivencia obtenidos cuando se cultivan *in vitro* con concentraciones crecientes de NaCl durante 30 días, plantas de las distintas poblaciones de vid silvestre. Se observa en dicha tabla que, salvo una pérdida en la población CA10 (5,6%, tabla 5) sin diferencias estadísticas respecto al resto todas las poblaciones presentan niveles muy elevados de supervivencia cuando no se adicionó NaCl al medio de cultivo. Este resultado indica, de nuevo, la idoneidad del medio de cultivo y condiciones de crecimiento usados y, en consecuencia, las pérdidas observadas en niveles mayores de NaCl solamente pueden imputarse al efecto de la sal añadida al medio de cultivo.

En la misma tabla se puede comprobar que ya en la concentración más baja ensayada, 3gL^{-1} , se observan descensos en la supervivencia debidos a la sal, que en algunas poblaciones llegan a ser importantes, como en el caso de J3, donde muere el 50% de las plantas, descenso significativo a nivel estadístico, (tabla 5). También significativo es el porcentaje de pérdidas en este nivel salino en la población J2, que reduce sus plantas vivas a un 65,38%. Así mismo, también hay bajas, aunque sin significación estadística en las plantas de las poblaciones CO9, CO3 y CA10 con porcentajes del 86,66, 88,24 y 90,9 % respectivamente de plantas supervivientes.

Con el tratamiento de 5gL^{-1} comienzan las reducciones importantes en la supervivencia de las plantas estudiadas, acumulando ya las poblaciones CA10, J2 y J3 porcentajes de supervivencia del 46,1; 38,47 y 15,79 % respectivamente para cada una de las poblaciones citadas, siendo estadísticamente significativas las pérdidas respecto a la concentración anterior, 3gL^{-1} , en las poblaciones J2 y J3. En consecuencia, el porcentaje muy bajo de supervivencia registrado en las plantas de la población J3, 15,79% es inferior a nivel estadístico al de otras poblaciones que han resistido mejor este nivel de NaCl, como las que mantienen el 100% de plantas vivas, caso de CA6 y CO7 o las de muy alta supervivencia como CO1 (95,6%); HU3 (92,3%); MA1 (85,72%); SE1 (85,18%); CO3 (75,33%) y CO9 (71,42%). Se considera una excepción el caso de las plantas de la población CO6, que poseen una elevada supervivencia, 83,3%, pero no difieren estadísticamente del 15,72% de J3, situación explicable por el bajo número de muestras, 6 de la citada población.

El tratamiento de 7gL^{-1} de NaCl produce descensos de supervivencia muy claros en la mayoría de las poblaciones, encontrándose algunas como J3, que se ha venido significando como la más sensible a lo largo de la prueba, con la totalidad de las plantas muertas. También resultan muy afectadas las plantas de J2 con un 37% de supervivencia, estadísticamente inferior al porcentaje contabilizado en 5gL^{-1} . De igual modo, sufren pérdidas importantes en esta concentración salina las plantas de SE1 con 14,81%; CA6 con 16,6%; CA10 con 20% y CO6 con 33%. Sin embargo, existen todavía poblaciones cuyas plantas superan o igualan el 50% de supervivencia como CO1 (57,14%); CO9 y J1 (50%); HU3 (55,56%) y MA1 (66,75). Destacan por su elevada supervivencia las plantas de las poblaciones CO3 (80%) y, sobre todo, CO7

(92,85%) superior estadísticamente al primer grupo de 6 plantas considerado como más sensible.

En la concentración más alta de NaCl, 9 gL^{-1} , las poblaciones CO1; CO6; CO9; J2; J3 y SE1 no resisten y, por consiguiente, presentan una mortandad del total de las plantas. Niveles muy bajos de plantas vivas supervivientes y, en consecuencia, similares estadísticamente a los anteriores tienen CA10 (14,5%); J1 (16,67%); HU3 (33,3%); CO3 (40%) y CO6 (66,6%). Destacan por sus elevadas supervivencias las plantas de las poblaciones MA1 y CO7 con un 57,14 y 75% respectivamente de plantas vivas, porcentajes significativamente superiores al mostrado por el resto de poblaciones.

Tabla 5.- Porcentaje de supervivencia de las distintas poblaciones estudiadas a los 30 días de cultivo.

Salinidad	POBLACIONES												
	CA6	CA10	CO1	CO3	CO6	CO7	CO9	HU3	J1	J2	J3	MA1	SE1
0 g/l	100 a B	94,4 a C	100 a C	100 a B	100 a B	100 a B	100 a C	100 a C	100 a B	100 a D	100 a C	100 a A	100 a B
3 g/l	100 ac B	90,9 ac BC	100 c C	88,24 bc B	100 abc B	100 bc B	86,66 abc BC	100 bc C	100 bc B	65,38 ab C	50 a B	100 ac A	100 c B
5 g/l	100 bc B	46,1 abc AB	95,6 c C	73,33 bc AB	83,3 abc B	100 c B	71,42 bc BC	92,3 c BC	62,5 abc AB	38,47 ab B	15,79 a A	85,72 bc A	85,18 c B
7 g/l	16,66 abc A	20 ab A	57,14 bc B	80 abc AB	33,3 abc AB	92,85 c AB	50 abc B	55,56 abc AB	50 abc AB	3,7 a A	0 ab A	66,7 bc A	14,81 ab A
9 g/l	66,6 abc AB	14,5 ab A	0 a A	40 abc A	0 ab A	75 c A	0 a A	33,3 abc A	16,67 ab A	0 a A	0 ab A	57,14 bc A	0 a A

Letras minúsculas diferentes leídas en filas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre poblaciones.

Letras mayúsculas diferentes leídas en columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre diferentes concentraciones salinas.

4.1.2. Pesos fresco y seco relativos y porcentaje de hidratación de las plantas sometidas a estrés salino *in vitro*.

En la tabla 6 se indican el peso fresco y seco relativo, ambos en miligramos, y los porcentajes medios de hidratación de la planta, en relación con el nivel de salinidad del medio de cultivo, de las plantas de cada una de las poblaciones CA6, CA10, CO3, CO9, HU3, J3, MA1 y SE1, así como la media del conjunto para cada uno de los 3 parámetros citados.

Se observa en dicha tabla que la acción de la sal sobre la biomasa de la planta, se caracterizó por una disminución de los pesos fresco y seco relativos en las plantas de todas las poblaciones a medida que aumentó el nivel de NaCl del medio y, en consecuencia, existió una relación inversa muy significativa ($p < 0.05$) entre las medias de ambos parámetros ($r = -0.875$ y $r = -0.905$) y la sal. Como consecuencia de este comportamiento similar mostrado entre ambos pesos, el grado de hidratación de los tejidos no se vio afectado por la sal de forma severa y, por consiguiente, no existió una relación muy significativa entre la sal y el porcentaje de hidratación para la media de las poblaciones, ($r = -0.593$). Es decir, aunque el grado de hidratación tiene cierta influencia, las pérdidas y bajos desarrollos encontrados en las plantas por encima de 3 gL^{-1} , no se pueden asociar exclusivamente a desequilibrios hídricos provocados en la planta por cambios en el potencial osmótico de la célula.

Tabla 6. Valores medios de biomasa (pesos fresco y seco en mg) y de porcentajes de hidratación de planta completa, de las poblaciones de vid silvestre CA6, CA10, CO3, CO9, HU3, J3, MA1 y SE1, tras desarrollarse *in vitro* en medio con niveles crecientes de sal durante 60 días.

Parámetros	Niveles de sal	POBLACIONES								
		CA6	CA10	CO3	CO7	CO9	HU3	J3	MA1	Media
peso fresco relativo 0	0	0.09	0.828	1.528	1.284	1.336	1.225	0.466	1.8	1.069
peso seco relativo 0	0	0.084	0.092	0.127	0.130	0.1005	0.127	0.061	0.113	0.104
% hidratación	0	6.349	88.866	91.639	89.836	92.477	89.561	86.854	93.703	90.210
peso fresco 3	3	0.04	0.230	0.833	0.225	0.07	0.557	0.145	0.186	0.286
peso seco 3	3	0.027	0.033	0.0764	0.027	0.018	0.051	0.017	0.03	0.035
% hidratación	3	32.1428	85.433	90.825	87.619	73.469	90.789	87.862	83.928	87.650
peso fresco 5	5	0.02	0.097	0.284	0.082	0.07	0.137	0.016	0.047	0.094
peso seco 5	5	0.002	0.018	0.042	0.015	0.015	0.053	0.003	0.008	0.019
% hidratación	5	89	81.102	85.211	81.756	77.777	60.893	82.051	81.818	79.002
peso fresco 7	7	0.091	0.0388	0.12	0.043	0.032	0.077	0.033	0.028	0.058
peso seco 7	7	0.005	0.0066	0.012	0.011	0.011	0.017	0.006	0.006	0.009
% hidratación	7	94.545	82.857	89.583	73.684	64.285	77.142	81.481	76.923	83.315
peso fresco 9	9	0.01	0.054	0.056	0.026	0.018	0.041	0.003	0.167	0.04
peso seco 9	9	0.008	0.011	0.011	0.007	0.005	0.01	0.001	0.001	0.007
% hidratación	9	13.333	78.947	80	71.875	68.181	75.675	66.666	99.148	84.83

4.1.3 Longitud media del tallo.

En la tabla 7 se indican los resultados obtenidos al medir, en centímetros, la longitud del tallo de plantas de poblaciones de vid silvestre andaluza desarrolladas *in vitro* durante 30 días, en ausencia de sal y en concentraciones crecientes de NaCl.

Se observa en la tabla, un desarrollo muy elevado de las plantas cuando el medio de cultivo carece de sal, 5,52 cm. En este apartado de salinidad y para las plantas control, destaca un grupo de poblaciones, formado por HU3; SE1; CO3 y CO1 cuyas plantas presentan unos desarrollos medios muy elevados, 8,95; 8,82; 8,53 y 7,30 centímetros respectivamente. Con menos longitud media, aunque similares estadísticamente a los anteriores se encuentran CO6; CO9 y CA6 con 6,5; 6,37 y 5,41 centímetros respectivamente. Con crecimientos inferiores y ya, diferentes estadísticamente al grupo de 4 con mayor crecimiento están las plantas de CO7 (3,91 cm), J3 (3,79 cm) y MA1 (2,87 cm). Para finalizar, las plantas con medias de crecimiento más bajas y estadísticamente diferentes al resto son las de CA10 (2,44 cm) y J2 (2,6 cm).

Cuando aparece la sal en el medio de cultivo, se observa un descenso en el crecimiento, que ya en la concentración menor de NaCl, 3 gL⁻¹, es muy acusado. Así, las plantas de poblaciones que ya mostraban en medio carente de NaCl buenos desarrollos en la parte aérea como SE1 y HU3, también en esta concentración de sal presentan los mayores crecimientos 4,49 y 3,39 cm respectivamente, sin embargo las alturas alcanzadas están muy por debajo de las observadas en ausencia de sal 8,82 y 8,95 cm respectivamente y, por consiguiente, con alta significación estadística respecto a aquéllos como se observa en la tabla 7. La longitud de las plantas de las poblaciones CA6; CA10; CO1; CO3; J2 y J3 están entre estos valores y los crecimientos prácticamente nulos, si se tiene en cuenta que el tamaño del explanto inicial fue de 1 cm aproximadamente, de las poblaciones CO6 (1 cm); CO7 (0,69 cm); CO9 (0,88 cm) y J1 (1,01 cm).

Cuando se estudia el desarrollo medio del tallo en la concentración de sal de 5 gL⁻¹, se observa que las plantas continúan con una reducción en tamaño, destacando la longitud de SE1 con 2,89 cm superior estadísticamente al resto de las poblaciones,

excepción hecha de J3 con 1,16 cm., valores que se reparten entre los 1,65 cm de CO1 y la ausencia de crecimiento respecto a la longitud inicial, que presentan las plantas de un número considerable de poblaciones: CA6 (0,74 cm); CO6 y CO9 (0,92 cm), MA1 con 0,71 cm y J2 con 0,52 cm de longitud media.

Al nivel salino de 7 gL^{-1} de NaCl no hay prácticamente crecimiento en las plantas de ninguna de las poblaciones. Destacan, no obstante, 1,79 cm de longitud media en SE1 y 1,35 cm de CO1, sin embargo, no existen diferencias a nivel estadístico en ninguna de las 13 poblaciones ensayadas.

A la concentración de 9 gL^{-1} no se presentan crecimientos en la parte aérea a excepción de CA10 con 2,5 cm y de SE1 con 1,87 cm, pero iguales a nivel estadístico debido al bajo número de muestras que han quedado vivas a este nivel salino máximo.

Tabla 7.- Longitud media (cm) del tallo de las distintas poblaciones estudiadas a los 30 días de cultivo.

Salinidad	POBLACIONES												
	CA6	CA10	CO1	CO3	CO6	CO7	Co9	HU3	J1	J2	J3	MA1	SE1
0 g/l	5,41 be A	2,44 a A	7,30 e B	8,53 e B	6,5 cde B	3,19 ab B	6,37 de B	8,95 e C	5,04 bd B	2,6 a A	3,79 abc A	2,87 ab B	8,82 e D
3 g/l	1,71 ab B	1,45 ab A	1,90 ab A	2,18 ab A	1 ab A	0,69 a A	0,88 a A	3,39 bc B	1,01 a A	1,93 ab A	1,96 ab A	1,66 ab AB	4,96 c C
5 g/l	0,74 a B	1,16 a A	1,65 a A	1,17 a A	0,92 a A	1,26 a A	0,92 a A	1,5 a A	0,52 a A	1,55 a A	1,16 ab A	0,71 a AB	2,89 b B
7 g/l	0,5 a B	1 a A	1,35 a A	1,12 a A	0 a A	1,08 a A	0,54 a A	1,4 a A	0,86 a A	2 a A	0 a A	1,16 a AB	1,79 a A
9 g/l	0,3 a B	2,5 a A	1 a A	0,8 a A	0 a A	1,17 a A	0 a A	0,4 a A	0,1 a A	0 a A	0 a A	1 a A	1,87 a A

Letras minúsculas diferentes leídas en filas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre poblaciones.

Letras mayúsculas diferentes leídas en columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre diferentes concentraciones salinas.

4.1.4. Número medio de brotes

En la tabla 8 se indica el número medio de brotes por planta de las diferentes poblaciones de vid silvestre andaluza. En ausencia de NaCl, se obtienen plantas con una media de brotes igual o superior a 2, en las poblaciones CO1 (2,67); CO3 (2,22); HU3 (2,1) y CO6 (2). El resto de poblaciones, excepto CO9, presentan plantas con un número medio de brotes comprendido entre 2 y 1, siendo, las plantas de la población CO9, las menos ramificadas con 1,06 brotes por planta, cifra inferior significativamente al grupo de 4 poblaciones con media de ramificaciones superior a 2.

En la concentración de sal de 3 gL^{-1} , se observa una reducción importante del número de ramificaciones o brotes desarrollados. Destacan como las de número de brotes más elevado, aunque sin significación estadística respecto al resto, las medias de las plantas de las poblaciones SE1 y CO3 con 1,57 y 1,56. De las poblaciones restantes solamente CO1, CA10, J2, J3, HU3 y J1 presentan algún desarrollo de brotes laterales, con 1,36; 1,22; 1,17; 1,15; 1,13 y 1,12 ramificaciones por planta respectivamente. Las plantas de las poblaciones CA6, CO6, CO7, CO9 y MA1, no desarrollan ningún brote y se mantienen con el brote inicial con que contaba del explanto en el momento de la siembra.

Por tanto, el descenso de brotes en esta concentración de sal es importante respecto al obtenido en ausencia de sal, siendo las poblaciones CO1, CO3 y HU3 donde se encuentran diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores obtenidos cuando el medio carece de NaCl.

Las concentraciones más altas de NaCl ensayadas, 5, 7 y 9 gL^{-1} , como era de esperar aún limitan más el desarrollo de las ramificaciones, siendo en la mayoría de los casos inexistente los brotes (tabla 8). Solamente en el nivel de 5 gL^{-1} , las poblaciones HU3, CO7, CO3, CO1 y SE1 presentan valores medios de 1,15; 1,14; 1,12; 1,05 y 1,04 sin diferencias estadísticas con el resto y, ya todos los valores son significativamente diferentes a los obtenidos en 0 y 3 gL^{-1} de NaCl. En adelante, solamente existe un valor claramente fuera de la tendencia marcada y corresponde a las plantas de la población MA1, en la concentración de 9 gL^{-1} con una media de brotes por planta de 1,25, aunque igual estadísticamente al resto de valores medios contabilizados, en esa concentración salina.

Tabla 8.- Número medio de brotes de las distintas poblaciones estudiadas a los 30 días de cultivo.

Salinidad	POBLACIONES												
	CA6	CA10	CO1	CO3	CO6	CO7	CO9	HU3	J1	J2	J3	MA1	SE1
0 g/l	1,63 abc A	1,64 abc A	2,67 c B	2,22 bc B	2 abc A	1,23 ab A	1,06 a A	2,1 abc B	1,27 ab A	1,6 ab A	1,87 abc A	1,33 ab A	1,48 ab B
3 g/l	1 ab A	1,22 ab A	1,36 ab A	1,56 ab A	1 ab A	1 a A	1 a A	1,13 ab A	1,12 ab A	1,17 ab A	1,15 b A	1 ab A	1,57 ab B
5 g/l	1 a A	1 a A	1,05 a A	1,14 a A	1 a A	1,12 a A	1 a A	1,15 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1,04 a A
7 g/l	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A
9 g/l	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1,25 a A	1 a A

Letras minúsculas diferentes leídas en filas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre poblaciones.

Letras mayúsculas diferentes leídas en columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre diferentes concentraciones salinas.

4.1.5 Número medio de yemas

En la tabla 9 se expresa el número medio de yemas por planta obtenido tras 30 días de cultivo *in vitro* en medio VID con concentraciones crecientes de NaCl. Se observa en dicha tabla que, se obtiene un elevado número, (9,92) de éstas cuando no se le añade sal al medio. Sin embargo, existen diferencias entre poblaciones (tabla 9). Así, se encuentran poblaciones con una elevada organogénesis de yemas como: CO1 (17,56); CO3 (16,11); HU3 (15,05); CO6 (13,2) y SE1 (11,72) y, en concreto los valores de CO1 y CO3 son diferentes estadísticamente de los obtenidos en plantas de otras poblaciones como J3 (9,5); CA6 (9,18); CO9 (8,68) y J2 (7,57). El menor desarrollo de yemas corresponde a las plantas de las poblaciones J1 (5,36); CO7 (5,23); CA10 (5,11) y MA1 (4,75) y los valores de CA10 y CO7 son estadísticamente inferiores a los obtenidos en el resto de poblaciones.

Los resultados obtenidos cuando se adiciona sal al medio a concentraciones relativamente bajas, 3 gL^{-1} , indican una caída importante en la aparición de yemas, tabla 9, lo que corrobora la tolerancia relativamente baja de la vid silvestre a la sal en condiciones *in vitro*. Este descenso es muy significativo, a nivel estadístico, en las plantas de las poblaciones de mayor crecimiento en ausencia de sal. Así, las plantas de CO1 pasan de 17,56 yemas por planta a 4,4; las de CO3 de 16,11 a 5,81; las de HU3 de 15,05 a 4,73; las de SE1 de 11,72 a 7,57; las de CO6 de 9,18 a 2,5 y las de CO9 de 8,68 a 1,46, incluso alguna de las de menor número de yemas en la concentración 0 de sal, también reducen significativamente el número de las mismas, son los casos de CA10, de 5,11 a 2,67 y MA1 de 4,75 a 1,67. Esta fuerte reducción del número de yemas en todas las poblaciones al aumentar a 3 gL^{-1} la concentración de sal, hace que sean muy similares para este parámetro, solamente las plantas de la población SE1 con 7,57 yemas por planta en esta concentración de NaCl, son diferentes a las de menor número de yemas como CA10 (2,67); CA6 (2,5); J1 (1,5) y CO9 (1,46).

Al aumentar la concentración salina en el medio de cultivo, la inhibición del desarrollo de yemas se va haciendo más intensa encontrando poblaciones en la concentración de 5 gL^{-1} de NaCl, como J1, cuyas plantas no desarrollan ninguna yema. Un grupo formado por las poblaciones CA6, MA1, CO6, CA10, CO9 y CO1, no consiguen duplicar el número de yemas en sus plantas, presentando valores de 1,2; 1,33;

1,4; 1,5; 1,6 y 1,9 respectivamente. Desarrollan un mayor número de yemas superando las 2 yemas por planta CO7 (2); HU3 (2,46); J2 (2,6); CO3 (2,92) o incluso las 3 como las de J3 (3,33) y SE1 (3,34). Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas entre ellas.

Hay que destacar que la adición de 5 gL^{-1} de NaCl produce fuertes reducciones en el número de yemas respecto a la concentración inmediatamente anterior (3 gL^{-1}) siendo muy significativo este descenso en los casos de CA10 y SE1 que pasan de 2,67 a 1,5 y de 7,57 a 3,34 yemas por planta respectivamente.

En el nivel de NaCl de 7 gL^{-1} desarrollan algunas yemas las plantas de 6 poblaciones, concretamente SE1 (2,33); CO1 (2,08); CO7 (1,77); CO3 (1,75); CA10 (1,5) y CO6 (1,4), sin diferencias estadísticas entre ellas. En la concentración máxima de sal, 9 gL^{-1} , son cinco las poblaciones cuyas plantas desarrollan yemas, MA1 (2,25); CA6 (2), población que no desarrolló ninguna yema en la concentración inmediatamente anterior, CA10 (2); CO7 (1,56) y CO3 (1,5).

Tabla 9.- Número medio de yemas de las distintas poblaciones estudiadas a los 30 días de cultivo.

Salinidad	POBLACIONES												
	CA6	CA10	CO1	CO3	CO6	CO7	CO9	HU3	J1	J2	J3	MA1	SE1
0 g/l	9,18 abcd B	5,11 a B	17,56 e B	16,11 de B	13,2 abcde A	5,23 a B	8,68 abc B	15,05 cde B	5,36 ab B	7,57 ab B	9,5 abc B	4,75 ab B	11,72 bcde C
3 g/l	2,5 a A	2,67 a B	4,4 ab A	5,81 ab A	3 ab A	1,33 ab A	1,46 a A	4,73 ab A	1,5 a A	4 ab AB	2,61 abc A	1,67 ab A	7,57 bcde B
5 g/l	1,2 a A	1,5 a A	1,9 a A	2,92 a A	1,4 a A	2 a A	1,6 a A	2,46 a A	1 a A	2,6 a AB	3,33 a A	1,33 a A	3,34 a A
7 g/l	1 a A	1,5 a A	2,08 a A	1,75 a A	1 a A	1,77 a A	1,4 a A	1 a A	1 a A	2 a A	1 a A	2 a A	2,33 a A
9 g/l	2 a A	2 a A	1 a A	1,5 a A	1 a A	1,56 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	1 a A	2,25 a A	1 a A

Letras minúsculas diferentes leídas en filas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre poblaciones.

Letras mayúsculas diferentes leídas en columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre diferentes concentraciones salinas.

4.1.6 Porcentaje de emisión radicular.

En la tabla 10 se expresa el porcentaje medio de emisión radicular en plantas de las poblaciones de vid silvestre andaluza estudiadas, en relación con los niveles de sal adicionados al medio de cultivo. Se observa en dicha tabla que el porcentaje de enraizamiento, cuando se cultiva la vid silvestre en medio sin sal, es muy elevado, (media 86,7%). Sin embargo, hay que señalar que la población J2, se destaca del conjunto de las poblaciones por el bajo enraizamiento de sus plantas (29,63%) y, con diferencia significativa ($p \leq 0.01$) respecto al resto.

Al igual que ocurriera para la parte aérea, cuando el cultivo se realiza en concentraciones de sal de 3 gL^{-1} , todas las poblaciones (tabla 10), a excepción de SE1 que mantiene el 100% de plantas con raíz, presentan una clara disminución en el porcentaje de plantas enraizadas, siendo estadísticamente significativos, respecto a la ausencia de sal, los descensos en CA10 (de 100% a 44,4%); CO1 (de 100% a 76%); CO3 (de 88,89% a 62,5%); CO6 (de 80% a 28,57%); CO7 (de 90,47% a 20%); J1 (de 90% a 37%); J3 (de 85,7% a 21,43%) y MA1 (de 75% a 33%). Estos resultados hacen que el porcentaje de enraizamiento en las plantas de la población SE1 sea estadísticamente superior a los de J2 (29,41%); CO6 (28,57%); J3 (21,43) y CO7 (20%).

Las concentraciones de sal en el medio superiores, 5, 7 y 9 gL^{-1} originan un efecto muy negativo sobre la emisión radicular de todas las plantas ensayadas, no encontrándose plantas con raíz en 8 de las 13 poblaciones en la concentración de NaCl de 5 gL^{-1} . En esta concentración las plantas de SE1 con un 82,61% son las que siguen manteniendo una alta capacidad de enraizamiento, claramente superior ($p \leq 0.01$) a otras poblaciones que han emitido raíz, como CO7 (29,41%); CO1 (23,81%) y HU3 (15%). No obstante, las plantas de la población CO6 con un 60% de plantas enraizadas, también inferior al de SE1, no presenta diferencias estadísticamente significativas con el porcentaje de emisión radicular de esta población. Ya en el nivel salino de 7 gL^{-1} sólo emiten raíces las plantas de la población J1 con un 33,3 % y en el nivel máximo de sal (9 gL^{-1}) en ninguna de las plantas ensayadas de las poblaciones estudiadas se encuentran raíces.

Tabla 10.- Porcentaje de enraizamiento de las distintas poblaciones estudiadas a los 30 días de cultivo.

Salinidad	POBLACIONES												
	CA6	CA10	CO1	CO3	CO6	CO7	CO9	HU3	J1	J2	J3	MA1	SE1
0 g/l	100 b B	100 b B	100 b C	88,89 b B	80 ab B	90,47 b B	87,5 b B	100 b B	90 b B	29,63 a A	85,71 b B	75 b C	100 b B
3 g/l	85,71 abc B	44,44 abc A	76 bc B	62,5 abc B	28,57 ab A	20 a A	69,23 abc B	80 abc B	37 abc A	29,41 ab A	21,43 ab A	33 abc B	100 c B
5 g/l	0 ab A	0 ab A	23,81 a A	0 ab A	60 ab AB	29,41 ab A	0 ab A	15 a A	0 ab A	0 ab A	0 ab A	0 ab A	82,61 b B
7 g/l	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	33,3 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
9 g/l	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A

Letras minúsculas diferentes leídas en filas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre poblaciones.

Letras mayúsculas diferentes leídas en columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre diferentes concentraciones salinas.

4.1.7 Número medio de raíces.

En la tabla 11 se indica el número medio de raíces de las plantas de las poblaciones en estudio a los 30 días de cultivo en medio VID con adición de concentraciones crecientes de NaCl.

El número medio de raíces por planta, en el tratamiento control, es decir, sin sal en el medio, presenta un valor medio en el total de la prueba de 4,49, destacando las plantas de la población HU3 con 8,36 raíces por planta, valor estadísticamente superior a los de CA6 (3,63); CA10 (3,76); CO1 (3,47); CO3 (4,12); CO7 (5,31); J2 (2,44); J3 (3,83); MA1 (3,44) y SE1 (3,40). También menores, pero en este caso, sin diferencias significativas, son los números medios de raíces de CO6 (5,25); CO9 (5,57) y J1 (5,8).

Como se viene discutiendo en los ensayos de salinidad *in vitro* de plantas de vid silvestre, cuando se añade sal al medio de cultivo, aunque sea a la concentración menor ensayada, 3 gL⁻¹, se observa una acción negativa del efecto de la sal sobre cualquiera de los parámetros estudiados, también en el número de raíces esta acción queda muy patente, descendiendo en todas las poblaciones. En consecuencia, el cómputo final queda entre las 3,4 raíces por planta de J2 y 1 de CO6, sin diferencias estadísticas entre las 13 poblaciones que se han considerado en la prueba. Sí se observa, que la disminución comentada respecto a la hipótesis control es significativa en las plantas de la población HU3, que poseía el mayor número de raíces por planta, 8,36 y al añadir esta concentración de sal se reduce a 3. La población CO9 con 5,57 raíces en la concentración 0 de sal, pasa a 2,56; CO6 de 5,25 pasa a solamente una raíz por planta, y CO1 de 3,47 pasa a 2.

En el nivel de 5 gL⁻¹, solamente 5 poblaciones, como se comentó en el apartado de emisión radicular, han emitido raíz estando el número de las mismas (tabla 11) entre las 5,5 de HU3, que vuelve a tener de nuevo una posición destacada en este parámetro, aunque sin significación estadística respecto al resto, y 1,33 de CO6. Las concentraciones superiores de 7 y 9 gL⁻¹ inhiben prácticamente en su totalidad la emisión radicular salvo la población J1, cuyas plantas emiten una raíz de media.

Tabla 11.- Número medio de raíces de las distintas poblaciones estudiadas a los 30 días de cultivo.

Salinidad	POBLACIONES												
	CA6	CA10	CO1	CO3	CO6	CO7	CO9	HU3	J1	J2	J3	MA1	SE1
0 g/l	3,63 a A	3,76 a A	3,47 a B	4,12 a A	5,25 ab A	5,31a A	5,57 ab B	8,36 b B	5,8 ab A	2,44 a A	3,83 a A	3,44 a A	3,4 a A
3 g/l	2 a A	1,5 a A	2 a A	3 a A	1 a A	3,33 a A	2,56 a A	3 a A	2 a A	3,4 a A	3,33 a A	2 a A	3,03 a A
5 g/l	0 a A	0 a A	1,4 a A	0 a A	1,33 a A	2,8 a A	0 a A	5,5 a AB	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	2,21 a A
7 g/l	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	1 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
9 g/l	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A

Letras minúsculas diferentes leídas en filas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre poblaciones.

Letras mayúsculas diferentes leídas en columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre diferentes concentraciones salinas.

4.1.8 Longitud media de raíces.

En la tabla 12 se indican las longitudes medias de las raíces emitidas en el control y en cada una de las concentraciones salinas ensayadas a los 30 días de cultivo *in vitro*.

En el control se observa que la longitud media de las raíces, considerando la totalidad de las poblaciones es de 4,75 cm. Destacan las longitudes registradas en HU3 con 5,82 cm, aunque sin diferencias estadísticamente significativas con los valores medidos en las plantas de CO6 (6); CO9 (5,35); CO6 (5,3); J1 (5,12); CO3 (4,97); MA1 (4,85) y CO1 (4,61). Estadísticamente inferiores a estas longitudes son las de SE1 (4,47); CO7 (4,41); CA10 (4,18); J3 (3,41) y J2 (3,28).

En el nivel de 3 gL^{-1} , desciende la longitud de las raíces de las plantas de todas las poblaciones, situándose los valores más altos entre los 4,53 cm de SE1 y los 2 cm de CO6 sin diferencias estadísticas entre ellos. Las dos longitudes medias más elevadas (SE1; 4,53 cm y CO1; 3,25 cm) son significativamente superiores a las de CA10 (1,87 cm y CO9 1,34 cm) siendo esta última inferior a la media de raíces de HU3 (4,1 cm) y CO1 (3,35 cm).

Las longitudes de las plantas que han emitido raíz en la concentración salina de 3 gL^{-1} , no presentan diferencias entre sí, desde el valor de 3,35 cm de SE1 al menor de 1,5 cm de CO7. En los niveles salinos más altos, como se ha venido discutiendo en los apartados de desarrollo radicular solamente en el nivel de 7 gL^{-1} de NaCl, las plantas de la población J1 induce raíces con una longitud media de 1,5 cm.

Es de interés comentar el hecho de que las plantas, en las condiciones de cultivo ensayadas, poseen una relación directa entre número y longitud de raíces ($r=9958$), lo que está en contraposición con lo manifestado generalmente en la bibliografía, es decir, las plantas que poseen menor número de raíces también son las que tienen mayor longitud. La relación directa encontrada en el presente trabajo debe atribuirse a un fuerte efecto de la sal, que induce un sistema radicular muy pobre.

Tabla 12.- Longitud media (cm) de las raíces de las distintas poblaciones estudiadas a los 30 días de cultivo.

Salinidad	POBLACIONES												
	CA6	CA10	CO1	CO3	CO6	CO7	CO9	HU3	J1	J2	J3	MA1	SE1
0 g/l	5,3 cd B	4,18 abc A	4,61 abcd B	4,97 bcd B	6 cd A	4,41 abc B	5,35 cd B	5,82 d B	5,12 bcd B	3,28 ab A	3,41 a A	4,85 abcd B	4,47 abc C
3 g/l	3,3 abc AB	1,87 ab A	3,35 bc B	3,25 c AB	2 abc A	4 abc B	1,34 a A	4,1 bc AB	2,33 abc A	2,6 abc A	3,23 abc A	3,5 abc B	4,53 c C
5 g/l	0 a A	0 a A	2,6 a AB	0 a A	2,97 a A	1,5 a A	0 a A	2,75 a AB	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	3,35 a B
7 g/l	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	1,5 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A
9 g/l	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A	0 a A

Letras minúsculas diferentes leídas en filas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre poblaciones.

Letras mayúsculas diferentes leídas en columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre diferentes concentraciones salinas.

4.1.9. Influencia de la concentración de NaCl sobre el contenido de N, K, Ca y Na en plantas de vid silvestre cultivadas *in vitro*.

En la tabla 13 se indican los contenidos de N, K, Ca y Na (% de m.s.) en plantas de cada una de las poblaciones de vid silvestre CA6, CA10, CO3, CO9, HU3, J3, MA1 y SE1, en relación con los niveles de NaCl ensayados. Hay que destacar la circunstancia de que solamente se pudieron analizar las plantas de vid silvestre hasta el nivel de 5 gL^{-1} (50 mM), dado que por encima de este nivel la supervivencia de las plantas de vid silvestre cultivadas *in vitro* fue prácticamente nula (tabla 5).

En la tabla 13 se observa que los valores medios de Na^+ para las plantas de las distintas poblaciones son de 0.168 % de m.s. cuando la planta crece en ausencia de sal, 1.92 % m.s. cuando se añaden al medio 3 gL^{-1} de NaCl y 2,3 % m.s. con la concentración de 5 gL^{-1} . Es decir, el contenido de Na en la planta (media de todas las poblaciones) aumenta de forma significativa ($r=0.9711$) ($p \leq 0.05$) cuando se incrementan los niveles de NaCl en el medio de cultivo. En consecuencia, esta relación es alta en las plantas de todas las poblaciones y, en particular muy significativa ($p \leq 0.05$) en la población SE1 ($r=0.9971$), lo que de acuerdo con Kishore et al., 1985, incide en la baja supervivencia observada en la vid silvestre.

Tabla 13. Contenidos de N, K, Ca y Na (% de m.s.), relación Na/K en plantas de poblaciones de vid silvestre CA6, CA10, CO3, CO9, HU3, J3, MA1 y SE1, tras desarrollarse *in vitro* en medio con niveles crecientes de sal durante 60 días.

	Poblaciones	CA6	CA10	CO3	CO9	HU3	J3	MA1	SE1	Media
Niveles Na	0	0,145	0,163	0,182	0,167	0,138	0,134	0,188	0,227	0,168
	3	1,33	1,27	1,82	1,49	1,52	1,71	1,33	4,89	1,92
	5	1,47	1,18	1,66	1	1,67	1,46	1	8,96	2,3
Coef. Corr. Sal-Na		0,95162071	0,88611664	0,87885396		0,94932517	0,84897335		0,9971303	0,97115384
Niveles K	0	1,3	1,52	1,58	1,49	1,29	1,28	1,48	1,51	1,43125
	3	0,781	1,05	1,1	0,748	1,03	1,03	0,452	1,66	0,981375
	5	0,39	0,55	0,574		0,45	0,49		1,73	0,69733333
Coef. Corr. Sal-K		-0,99942447	-0,99119302	-0,99002608		-0,94556927	-0,94803028	1	-1	-0,99989103
Relación Na/K		0,11153846	0,10723684	0,11518987	0,11208054	0,10697674	0,1046875	0,12702703	0,15033113	0,11688351
		1,70294494	1,20952381	1,65454545	1,99197861	1,47572816	1,66019417	2,94247788	2,94578313	1,94789702
		3,76923077	2,14545455	2,89198606		3,71111111	2,97959184		5,17919075	3,44609418
		0,98204603	0,99769749	0,99863428		0,9681894	0,99771734		0,99872396	0,99835835
Niveles Ca	0	0,384	0,347	0,384	0,317	0,534	0,652	0,326	0,281	0,403125
	3	0,486	0,232	0,329	0,385	0,413	0,372	0,35	0,318	0,360625
	5	0,553	0,255	0,212		0,346	0,349		0,316	0,3385
Coef. Corr. Sal-Ca		0,99999182	-0,82830553	-0,94918926		-0,99878115	-0,942617	-1	0,89750678	-0,99788207
Niveles N	0		2,73	2,34	2,79	2,51	1,61	3,1	2,55	2,51857143
	3		3,47	2,47	3,49	2,94	1,89		2,55	2,80166667
	5		2,71	2,71		3,41			2,74	2,8925
Coef. Corr. Sal-N			0,09174183	0,95967596		0,99012995			0,80295507	0,98496798

En la citada tabla 13, se puede observar que los niveles de K (% de m.s.) van desde 1,43 cuando no hay sal en el medio, hasta 0,98 y 0,69 cuando se aumentan los niveles de sal a 3 y 5 gL⁻¹ respectivamente. En consecuencia, queda también muy clara la relación entre niveles crecientes de NaCl al medio de cultivo y la disminución de K en los tejidos de la planta completa de vid silvestre. Así, en la media de todas las poblaciones el coeficiente de correlación entre ambos parámetros es altamente significativo ($r = -0.9998$). En este sentido destacan las plantas de la población CA6 con una relación claramente inversa ($p \leq 0.05$) entre ambos parámetros ($r = -0.99994$), lo que está de acuerdo con lo observado por García y Charbaji, 1993. Por consiguiente, los valores discutidos de Na y K confirman el antagonismo Na/K (tabla 13) también observada por Troncoso et al., 1999 para variedades y portainjertos de vid cultivados *in vitro* en concentraciones crecientes de sal. Varios autores (Devitt et al., 1981; Aslam et al., 1988) proponen esta relación como un buen indicador de tolerancia a la sal en la vid en condiciones de campo y Troncoso et al., 1999 la confirman para las condiciones de cultivo *in vitro* de vid. Todo ello, lleva a una relación directa altamente significativa ($p > 0.05$) entre las medias de dicho cociente 0,1168; 1,947 y 3,446 y sus respectivos niveles de sal 0, 3 y 5 gL⁻¹ (tabla 13), con un coeficiente de correlación de $r = 0.9983$. Por consiguiente, varias poblaciones presentan plantas donde esta relación está muy relacionada con la sal del medio y, por tanto, presentan coeficientes de correlación altamente significativos ($p \leq 0.05$) como CA10 ($r = 0.997$); CO3 ($r = 0.9986$); J3 ($r = 0.9977$) y SE1 ($r = 0.9987$).

Respecto al contenido en Ca⁺, no se observa una relación clara entre la concentración de calcio y salinidad. Hay que destacar el comportamiento mostrado por las plantas de las poblaciones CA6 y CO9. En el primer caso existe una clara acumulación de Ca²⁺ a medida que aumenta la concentración salina (tabla 13), que incluso resulta muy significativo a nivel estadístico ($r = 0.9999$), en el segundo también los datos de que se dispone indican una tendencia a la acumulación de Ca cuando se aumenta el nivel de sal a 3 gL⁻¹. Sin embargo, en el conjunto de los valores obtenidos, los porcentajes medios de contenido en Ca para las plantas de las poblaciones en consideración y para concentraciones salinas de 0, 3 y 5 gL⁻¹ son de 0,403; 0,360 y 0,338 respectivamente (tabla 13), lo que representa un porcentaje de correlación de $r = -0.997$ muy significativo ($p \leq 0.05$), y, por tanto, en general, los niveles de este

elemento disminuirían de manera directamente proporcional al aumento de la concentración salina del medio, lo que estaría de acuerdo con lo indicado por Troncoso et al., 1999 para variedades de vid cultivada, esta relación vendría muy marcada por las plantas de la población HU3 donde esta relación inversa es muy clara y, por tanto, significativa, ($r=0,9987$). En consecuencia, ante el carácter contrapuesto de los resultados obtenidos, sería de interés realizar nuevos experimentos para aclarar el comportamiento de dicho elemento respecto a la sal.

Las plantas de vid silvestre estudiadas presentan unos valores medios de N de 2,51; 2,8 y 2,89 % de m.s. (tabla 13). Aunque estos valores son fisiológicamente idénticos, sí presentan una relación directa ($r= 0.984$) con los incrementos de sal en el medio de cultivo. Sin embargo, esta relación no es significativa como en el caso de los nutrientes anteriormente discutidos y, en consecuencia, tampoco ninguna de las poblaciones estudiadas presenta una correlación tan elevada como en casos anteriores. También otros autores (Troncoso et al., 1999) han encontrado un comportamiento similar del N en situaciones de niveles crecientes de NaCl en el medio de cultivo en condiciones *in vitro* para la vid, que relacionan con un menor desarrollo de la planta.

En consecuencia, y como resumen del comportamiento de vid silvestre andaluza cultivada *in vitro* en medio VID con concentraciones crecientes de NaCl, se deduce un nivel de tolerancia *in vitro* a NaCl, comprendido entre 5 y 7 gL⁻¹ (foto 6), donde se encuentran importantes diferencias estadísticas respecto a la concentración de 3 gL⁻¹. Sin embargo, existen, en el global del ensayo, poblaciones muy sensibles como J3, cuyas plantas no superan en absoluto el nivel de 7 gL⁻¹ y con pérdidas muy considerables (50 %) al nivel de 3 gL⁻¹ y, en consecuencia estarían dentro de las consideradas como no tolerantes de acuerdo con la clasificación efectuada por Troncoso et al., 1999 o muy tolerantes como es el caso de CO7, con un 75% de supervivencia en el nivel de 9 gL⁻¹. Estas tendencias se vuelven a encontrar en los parámetros estudiados, sufriendo, en la generalidad de las poblaciones, tanto en la parte aérea (tablas 8, 9 y 10) como radicular (tablas 11,12 y 13) daños importantes por encima de los 5 gL⁻¹ sin encontrar diferencias estadísticas entre poblaciones.



Foto 6.- Plantas de vid silvestre creciendo *in vitro* en las distintas concentraciones salinas ensayadas.

Como se indicó en el apartado 4.1.1 las pérdidas y bajos desarrollos encontrados en las plantas por encima del nivel de NaCl de 3 gL⁻¹, no se pueden asociar exclusivamente a desequilibrios hídricos provocados en la planta por cambios en el potencial osmótico de la célula, sino también al efecto tóxico que producen los elevados niveles de Na⁺ en los tejidos de las plantas, con una correlación muy clara con niveles bajos de K⁺, por otro lado, aunque de forma menos significativa, los niveles de N también sufren aumentos cuando se aumenta el nivel de sal en el medio.

La emisión de raíces y su desarrollo en los niveles mas bajos de sal, junto con un adecuado desarrollo de la parte aérea, vuelve a confirmar el buen comportamiento que el medio de cultivo (VID, Troncoso et al., 1990) (tabla 1) tiene para el cultivo de la vid, volviéndose a destacar la capacidad de este medio para, en una misma fase, procurar un desarrollo idóneo de la parte aérea y de la parte radicular.

4.2 Ensayo en cámara de cultivo de plantas de poblaciones de vid silvestre en concentraciones crecientes de NaCl.

En la tabla 14 se indica el número de plantas de la población J3 de vid silvestre, sobre las que se ha efectuado el ensayo en cámara de cultivo en cada una de las concentraciones salinas ensayadas, una vez superada la fase de adaptación a condiciones externas.

Tabla 14.- Número de plantas estudiadas de la población J3.

Concentración de NaCl gL ⁻¹	Nº de plantas
0	13
3	14
5	14
7	15
9	15

4.2.1. Supervivencia.

En la tabla 15 se indican los porcentajes de supervivencia de las plantas de la población J3 de vid silvestre cultivadas en cámara de cultivo con concentraciones crecientes de NaCl durante 30 días.

Tabla 15.- Porcentaje de supervivencia obtenidos en plantas de la población J3 de vid silvestre cuando se cultivan durante 30 días en cámara de cultivo en concentraciones crecientes de sal.

Niveles de NaCl	Nº de plantas	Nº de plantas vivas (30 días)	% de supervivencia
0	13	0	100 B
3	14	11	78,57 B
5	14	2	14,28 A
7	15	1	6,25 A
9	15	2	13,13 A

En dicha tabla se observa que existe una relación inversa entre las concentraciones salinas adicionadas al medio de cultivo y los porcentajes de supervivencia ($r=-0.9062$) de las plantas de esta población, aunque este coeficiente de correlación no es significativo a nivel estadístico, debido, posiblemente, al porcentaje de plantas supervivientes (13,13) encontrado en la mayor concentración de sal, 9 gL^{-1} , ligeramente superior al obtenido en el nivel salino de 7 gL^{-1} , 6,25%. Se observa en la tabla 15 que el umbral de daño que la sal produce en las plantas de vid silvestre de la población de J3 cultivadas en cámara de cultivo, se encuentra en los 3 gL^{-1} (78,57%) por encima del cual la supervivencia se ve muy afectada ($p \leq 0.01$) disminuyendo al 14,28% al nivel de 5 gL^{-1} . Estos resultados coinciden en gran parte con los obtenidos para plantas de esta población cultivadas *in vitro* durante el mismo período de tiempo, 30 días, (tabla 5), ya que, en este último caso, aunque la supervivencia desciende algo más que en maceta, hasta el 50% en el nivel salino de 3 gL^{-1} , también se observa un descenso muy acusado en las concentraciones más elevadas de 5, 7 y 9 gL^{-1} . Así, en el nivel de 5 gL^{-1} , el porcentaje de supervivencia *in vitro* (15,79) es muy similar al obtenido en cámara de cultivo, 13,13, mientras que a niveles mayores de sal en tubo de ensayo, todas las plantas mueren.

4.2.3. Longitud del tallo

En la tabla 16 se expresa la evolución de la longitud del tallo, medida en centímetros, de plantas de la población J3 de vid silvestre cultivadas en cámara de cultivo en condiciones crecientes de NaCl. Para ello, en la citada tabla se indican los valores de las mediciones efectuadas al inicio de la prueba, una vez alcanzados los niveles salinos requeridos en cada caso y los tomados a los 30 días, en que se consideró finalizada la prueba dado el bajo índice de supervivencia observado transcurrido en ese tiempo. Asimismo, se indican los incrementos de crecimiento calculados transcurrido dicho período y los valores medios de dichos

incrementos para cada una de las concentraciones salinas. Se observa en dicha tabla que el incremento medio de crecimiento de las plantas cuando la solución de riego se compone de la solución nutritiva Hoagland sin adición de sal, es de 19,59 cm, (foto 7) valor muy superior ($p \leq 0.01$) (tabla 16) al hallado cuando se añade sal al medio a cualquiera de las concentraciones ensayadas. Es decir, con el nivel de 3 gL^{-1} de NaCl el incremento medio de longitud de la parte aérea es de 1,6 cm, (foto 8) y para las concentraciones de 5,7 y 9 gL^{-1} de NaCl, todos los incrementos (0,17; 0,82 y 0,68 cm respectivamente) son inferiores a la unidad. En consecuencia, la acción de la sal es muy negativa para las plantas de la población J3 de vid silvestre, con un coeficiente de correlación de $r = -0,8123$, no significativo estadísticamente debido al incremento muy bajo encontrado en la concentración salina de 5



Foto 7. Desarrollo de plantas de la población J3 en ausencia de NaCl.



Foto 8. Desarrollo de plantas de la población J3 con adición de NaCl (3 gL^{-1}).

gL^{-1} (foto 9), inferior a los contabilizados para las de 7 (foto 10) y 9. Esta tendencia es la observada también en el caso del ensayo *in vitro*, que aunque sin diferencias estadísticas entre la longitud de las plantas de esta población (tabla 7), en las diferentes concentraciones salinas, sí sufre un descenso de casi el 50% cuando se añaden 3 gL^{-1} de sal al medio y no existe desarrollo alguno cuando la concentración salina es de 7 y 9 gL^{-1} .



Foto 9. Desarrollo de plantas de la población J3 con adición de NaCl (5 gL^{-1}).



Foto 10. Desarrollo de plantas de la población J3 con adición de NaCl (7 gL^{-1}).

Tabla 16.- Evolución de la longitud del tallo de plantas de la población J3 de vid silvestre al inicio de la prueba y a los 30 días de cultivo en concentraciones crecientes de NaCl.

0 gl ⁻¹		3 gl ⁻¹		5 gl ⁻¹		7 gl ⁻¹		9 gl ⁻¹		Incrementos					
0 días	30 días	0 gl ⁻¹	3 gl ⁻¹	5 gl ⁻¹	7 gl ⁻¹	9 gl ⁻¹									
10	15.5	16	16	10.2	10.2	13	13	5.9	7.5	5.5	0	0	0	1.6	
9.4	20	8.3	9.3	10.5	10.5	10.5	13.4	11	11	10.6	1	0	2.9	0	
8.2	39.5	13.1	13.6	3.5	4	10	11.5	13.9	15	31.3	0.5	0.5	1.5	1.1	
10.2	55.8	3		9.2	9.5	8.6	10	6	7.3	45.6		0.3	1.4	1.3	
7.5	15.5	9.5	9.5	9.2	9.2	7	7.1	12.4	13	8	0	0	0.1	0.6	
12	27	11.5	15.5	8.3	8.3	5.5	5.6	10.2	11.1	15	4	0	0.1	0.9	
13	33.7	13.5	14.7	9.2	9.2	8.5	8.8	9	9.5	20.7	1.2	0	0.3	0.5	
11	38.2	13.5	16	11.5	12	8.5	10.5	7.5	7.5	27.2	2.5	0.5	2	0	
12	37.6	12	13.5	8.5	8.5	12	12	9	9	25.6	1.5	0	0	0	
11.3	22.3	14.5	18.4	12.3	12.3	3.6	5.4	12.5	14	11	3.9	0	1.8	1.5	
11	25	13.5	14	7	8	10.5	10.5	12	12	14	0.5	1	0	0	
12	59.7	10.5	12.6	8.6	8.8	1	1	6.8	6.8	47.7	2.1	0.2	0	0	
10	30	11	13	10.6	10.6	3.1	4.5	7	8.5	20	2	0	1.4	1.5	
11.5	18			10	10	10.5	10.6	5.5	6.7	6.5		0	0.1	1.2	
9.8	15					9.8	10.5	11	11	5.2			0.7	0	
7	18.5									11,5					
Media	10,36	29,45	11,53	13,84	9,18	9,36	8,14	8,96	9,31	9,99	19,08 B	1,6 A	0,178 A	0,82 A	0,68 A

Letras mayúsculas diferentes leídas en filas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre diferentes concentraciones salinas.

4.2.4. Número medio de brotes

En la tabla 17 se indica la evolución del número medio de brotes de plantas de la población J3 de vid silvestre cultivadas en cámara de cultivo con niveles crecientes de NaCl. Para ello, a semejanza de la tabla anterior se expresan los valores del número medio de ramificaciones contabilizados al inicio de la prueba, una vez alcanzados los niveles salinos requeridos en cada caso y los cuantificados a los 30 días. Asimismo, al igual que ocurriera para la longitud, se indican los incrementos en el número medio de brotes habidos en el período de tiempo indicado y los valores medios de dichos incrementos para cada una de las concentraciones salinas ensayadas. En ausencia de NaCl, se obtienen plantas con una media de brotes de 11,25 (tabla 17) a los 30 días de cultivo, lo que representa un incremento respecto al valor medido al inicio de la prueba de 9,93, al igual que ocurriera con la longitud, cuando se añaden a la solución de riego 3 gL^{-1} de NaCl, hay una reducción muy significativa ($p \leq 0.01$) (tabla 17), pasando el número medio de brotes a 4, lo que representa un incremento de 2,33. A concentraciones mayores de sal, no hay desarrollo de brotaciones laterales, a excepción de un incremento de 0,2 brotes que aparece en la concentración de 9 gL^{-1} de NaCl. En consecuencia, existe una correlación inversa ($r = -0,8693$) significativa ($p \leq 0.05$) entre el número de brotes y las concentraciones salinas empleadas.

Las plantas de esta población de nuevo presentan un comportamiento similar al estudiado en condiciones *in vitro* (tabla 8), pues en aquella ocasión mostraron un número medio de brotes por planta de 1,87, y aunque sin diferencias estadísticas, con la adición de 3 gL^{-1} de NaCl dicho número se redujo hasta 1,15, para no desarrollar ningún brote nuevo en las concentraciones de $5,7$ y 9 gL^{-1} .

Tabla 17.- Evolución del número medio de brotes de plantas de la población J3 de vid silvestre al inicio de la prueba y a los 30 días de cultivo en concentraciones crecientes de NaCl.

0 g ^l ⁻¹		3 G ^l ⁻¹		5 g ^l ⁻¹		7 g ^l ⁻¹		9 g ^l ⁻¹		Incrementos				
0 días	30 días	0 g ^l ⁻¹	3 g ^l ⁻¹	5 g ^l ⁻¹	7 g ^l ⁻¹	9 g ^l ⁻¹								
2	13	3	3	1	1	1	1	2	2	11	0	0	0	0
3	9	2	3	1	1	1	1	1	2	6	1	0	0	1
1	6	1	2	2	2	3	3	2	2	5	1	0	0	0
1	7	1		1	1	1	1	1	1	6		0	0	0
2	10	4	6	3	3	1	1	2	2	8	2	0	0	0
3	12	1	6	1	1	1	1	3	4	9	5	0	0	1
1	12	1	3	1	1	1	1	1	1	11	2	0	0	0
1	12	1	4	1	1	1	1	3	3	11	3	0	0	0
1	7	2	5	2	2	1	1	1	1	6	3	0	0	0
1	11	1	8	1	1	1	2	3	3	10	7	0	1	0
1	18	1	2	4	4	1	1	1	1	17	1	0	0	0
1	11	2	3	1	1	1	1	1	2	10	1	0	0	1
3	16	1	3	1	1	2	2	2	2	13	2	0	0	0
1	16			2	2	1	1	1	1	15		0	0	0
2	13					2	2	2	2	11			0	0
3	7													
Media 1,68	11,25	1,61	4	1,57	1,57	1,26	1,33	1,73	1,93	9.93 C	2.33 B	0 A	0.06 A	0.2 AB

Letras mayúsculas diferentes leídas en filas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre diferentes concentraciones salinas.

4.2.5. Número medio de yemas

En la tabla 18 se indica la evolución del número medio de yemas de plantas de la población J3 de vid silvestre cultivadas en cámara de cultivo con concentraciones crecientes de NaCl en el agua de riego. Para ello, como se ha indicado, en dicha tabla se expresan los valores del número medio de yemas contados al inicio de la prueba, es decir, una vez alcanzado cada nivel salino final y los contabilizados a los 30 días de cultivo en esas condiciones. Se observa en la tabla que, como se ha comentado para la longitud media del tallo y número medio de brotes, cuando la solución de riego carece de NaCl, el número medio de yemas obtenido en las plantas de la población de vid silvestre J3, transcurridos 30 días es de 46,12, lo que representa un incremento de 35 nuevas yemas respecto al medido al inicio de la prueba, número muy superior estadísticamente ($p \leq 0.01$) (tabla 18) al observado en las plantas de la concentración salina de 3 g l^{-1} , que es de 18,33, y supone un incremento de solamente 3,91 yemas respecto al medido al inicio de la prueba. De nuevo, todas las plantas desarrolladas en los niveles superiores de NaCl ensayados, 5, 7 y 9 g L^{-1} , presentan, a los 30 días, números de yemas (11,5; 7,6 y 10,1) muy similares a sus respectivos controles (11,5; 7,2 y 9,8) e inferiores al obtenido en ausencia de sal, no encontrándose diferencias estadísticas entre ellos. Por ello, existe una correlación inversa, $r = -0.8123$, entre el número medio de yemas por planta y los niveles de salinidad empleados, aunque al igual que ocurriera con la longitud media y, por la misma razón, no sea significativo a nivel estadístico. En esta ocasión, número medio de yemas por planta, la semejanza con lo que ocurriera *in vitro* es aún mayor que para la longitud media y el número de brotes, ya que también en ese caso (tabla 9) se encuentran diferencias significativas entre el número de yemas por planta en ausencia de sal (9,5) y el obtenido en la concentración de 3 g L^{-1} (2,61).

Tabla 18.- Evolución del número de yemas de plantas de la población J3 de vid silvestre al inicio de la prueba y a los 30 días de cultivo en concentraciones crecientes de NaCl

0 g ^l ⁻¹		3 g ^l ⁻¹		5 g ^l ⁻¹		7 g ^l ⁻¹		9 g ^l ⁻¹				incrementos			
0 días	30 días	0 g ^l ⁻¹	3	5	7	9									
9	47	15	15	9	9	8	8	8	8	38	0	0	0	0	
10	32	16	16	11	11	9	9	10	11	22	0	0	0	1	
11	27	12	15	8	8	12	12	12	12	16	3	0	0	0	
10	31	3	M	10	10	7	7	6	6	21		0	0	0	
10	42	30	30	14	14	7	7	12	12	32	0	0	0	0	
16	53	14	21	9	9	6	6	17	17	37	7	0	0	0	
10	41	11	16	9	9	8	8	9	9	31	5	0	0	0	
10	45	10	15	10	10	5	7	11	11	35	5	0	2	0	
11	40	15	17	14	14	11	11	7	7	29	2	0	0	0	
12	46	12	26	11	11	3	6	15	15	34	14	0	3	0	
10	65	10	13	24	24	9	9	8	8	55	3	0	0	0	
10	44	18	20	11	11	1	1	5	9	34	2	0	0	4	
13	68	10	16	9	9	6	8	8	8	55	6	0	2	0	
12	63			12	12	8	8	7	7	51		0	0	0	
11	46					8	8	12	12	35			0	0	
15	48														
Media										35 B	3.91 A	0 A	0.46 A	0.33 A	

Letras mayúsculas diferentes leídas en filas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$, t Student) entre diferentes concentraciones salinas.

En resumen para el ensayo de tolerancia a NaCl en cámara de cultivo para plantas de la población J3 de vid silvestre, se puede indicar que todos los parámetros estudiados indican una baja tolerancia de las mismas para concentraciones superiores a 3 gL^{-1} de NaCl, ya que en dicho nivel salino, todos los parámetros medidos presentan descensos importantes en sus valores respecto a la situación de ausencia de sal en la solución de agua de riego. Este comportamiento coincide con el observado en plantas de dicha población cultivadas *in vitro*.

Por tanto, como discusión final del trabajo, se puede indicar que el nivel de tolerancia de vid silvestre a NaCl se encuentra entre 3 y 5 gL^{-1} , aunque las condiciones de cultivo *in vitro* parecen inducir una ligera mayor tolerancia, ya que los daños observados, producidos mas por el efecto tóxico de los iones Na^+ que por un efecto osmótico, son mayores a la concentración de 5 gL^{-1} de NaCl, este comportamiento se puede atribuir a la alta humedad relativa existente en el tubo de ensayo, que permite a la planta mantener un mayor grado de hidratación y al desarrollo de la raíz en el propio medio de cultivo en condiciones salinas, a diferencia de lo ocurrido en la cámara de cultivo, donde la raíz ya está formada y al proceso de adaptación a condiciones *ex vitro*, debe añadir la defensa ante el estrés salino. Sin embargo en ambas situaciones, cultivo de tejidos y cámara de cultivo, tanto la supervivencia, como cualquiera de los parámetros medidos están muy afectados por concentraciones superiores a los 5 gL^{-1} de sal, por lo que se vuelve a demostrar la posibilidad del uso del cultivo *in vitro* como indicador de la tolerancia de plantas de vid a condiciones de estrés salino, lo que está de acuerdo con los trabajos de Barlass y Skene, 1981 y Troncoso et al., 1999.

5. Bibliografía

- Alhagdow,-M.M.; Barthakur,-N.N.; Donnelly,-D.J.** 1999. "Salinity stress and sodium-potassium interactions in micropropagated potatoes." *Potato-res.* v. 42 (1) p. 73-78.
- Al Saidi, I.H.; Shakir, I.A.; Hussein, A.J.** 1988: Rooting of some grapevine cuttings as affected by salinity. *Annals of Agricultural Science, Ain Shams University* **33**, 479-499.
- Anzani, R., Failla, O., Scienza, A. y De Micheli, L.,** 1993. Individuazione e conservazione del germoplasma di vite selvatica (*Vitis vinifera silvestris*) in Italia. *Vignevigne*, 6: 51-60.
- Arbabzadeh, F. And Dutt, G.** 1987. Salt tolerance of grape rootstock under greenhouse conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**: 95-99.
- Ashraf M., McNeily T. y Bradshaw A.D.** 1986. The response of selected salt-tolerant and normal lines of four grass species to NaCl in sand culture. *The New Phytology.* 104: 453-461.
- Aslam M., Huffaker R.C. y Rain, D.W.** 1984. Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. *Plant Physiol.* 76: 321-335.
- Aslam, M.; Barret-Lennard, E.G. Greenway, H.** 1988: Effects of external concentration of (K^+Na^+) and K^+/Na^+ on the growth and ion relations of *Atriplex amnicola*. *J. Plant Physiol.*, **133**: 228-234.
- Babaeva, Zh.A. Butenko, R.G. y Strogonov. B.P.** 1968. Influence on salinization of the nutrient medium on the growth of isolated carrot tissue. *Soviet Plant Physiol.*, 15: 75-82.
- Barlass, M. And Skene, K.G.M.** 1981. Relative NaCl Tolerances of Grapevine Cultivars and Hybrids in vitro. *Z. Pflanzenphysiol. Bd. 102.* S. 147-161.
- Bartolini G, Mazuelos C, Troncoso A.** (1991). Influence of Na_2SO_4 and NaCl salts on survival, growth and mineral composition of young olive plants in inert sand culture. *Advances in Horticultural Science*, 5: 73-76.
- Bernstein L. y Hayward H.E.** 1958. Physiology of salt tolerance. *Annual Review of plant Physiology*, 9: 25-46.
- Bernstein L.** 1963. Osmotic adjustment of plant to saline media. II. Dinamyc phase . *American Journal of Botany*, 50: 360-370.
- Blanco, E., Casado, M.A., Costa, M., Escribano, R., García, M., Génova, M., Gómez, A, Gómez, F., Moreno, J.C., Morla, C., Regato, P, y Sainz, H.,** 1998. *Los bosques ibéricos: una interpretación geobotánica.* Ed.Planeta. Barcelona.
- Bongi G, y Loreto F.** 1989. Gas-exchange properties of salt-stressed olive (*Olea europea* L.) leaves. *Plant Physiol* 90: 1408-1416.
- Bowers, J.E., Dangl, G.S., Meredith, C.P.** 1999. Development and characterisation of additional microsatellite DNA markers for grape., *Am. J. Enol. Vitic.* 50 : 243-246.
- Cano V.M.A.** 1991. Evaluación y caracterización in vitro e in vivo, de la tolerancia a la salinidad de *Lycopersicon* spp. *Tesis Doctoral.* Universidad de Murcia, pp.267.

Cano E.A., Perez-Alfocea F., Moreno V., Caro M. y Bolarin M.C. 1998 Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through *in vitro* shoot apex culture. *Plant-cell,-tissue-organ-cult*, v. 53, 1: 19-26.

Cantos.M., Ales.G., y Troncoso.A. 1993. Morphological and anatomical aspects of a cleft micrografting of grape explants *in vitro*. International Symposium of Viticulture and Enology: Rootstock, Varieties and New Enological Issues. Córdoba.

Cantos, M.; Troncoso, J.; Liñán, J.; Rapoport, H. and Troncoso, A. 2002. Obtaining salt (NaCl) tolerant olive plants: i) some physiological and anatomical characteristics of olive plants growing in harsh saline zones. *Acta Horticulturae*, 586. 441-444.

Ceballos, L. y Martín Bolaños, M., 1930. Estudio sobre la vegetación forestal de la provincia de Cádiz. Madrid.

Ceballos, L. y Vicioso, C. 1933. Estudio sobre la vegetación y la flora forestal de la provincia de Málaga. Madrid.

Cramer G.R. Lynch J. Läuchli A. y Epstein E. 1987. Influx of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ into roots of salt-stressed cotton seedlings. Effects of supplemental Ca. *Plant Physiol*, 83: 510-516.

Downton W.J.S.y Millhouse, J. 1983. Turgor maintenance during salt stress prevents loss of variable fluorescence in grapevine leaves. *Plant Science Letters* 31: 1-7.

Downton W.J.S.y Millhouse, J. 1985. Chlorophyll fluorescence and water relations of salt-stressed plants. *Plant Science Letters*, 37: 205-212.

Delfine S, Alvino A, Zacchini M, Loreto, F 1998 Consequences of salt stress on conductance to CO₂ diffusion, Rubisco characteristics and anatomy of spinach leaves. *Aust J Plant Physiol* 25: 395-402

Delfine, S, Alvino, A, Villani, M.C. y Loreto, F. 1999. Restrictions to Carbon Dioxide Conductance and Photosynthesis in Spinach Leaves Recovering from Salt Stress. *Plant Physiol*. 119: 1101-1106.

Devitt, D., Jarrell, W.M. Stevens, K.L.; 1981: Sodium-potassium ratios in soil solution and plant response under saline conditions. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45: 80-86.

Downton, W.J.S. 1977. Photosynthesis in salt-stressed grapevines. *Aust. J. Plant. Physiol.* 4: 183-192.

Downton, W.J.S.; Crompton A.W.;1979: Budburst in Sultana grapevine as influenced by salinity and rootstocks. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*19: 749-752.

Downton, W.J.S.; 1985: Growth and mineral composition of the Sultana grapevine as influenced by salinity and rootstock. *Aust. J. Agric. Res.* 36: 425-434.

Downton W.J.S. y Loveys, B.R.1978 Abscisic acid content and osmotic relations of salt-stressed grapevine leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 8: 443-452.

Esquinas-Alcázar, J.T., 1993. La diversidad genética como material básico para el desarrollo agrícola en la agricultura del siglo XXI, Cubero, J.I. y Moreno, M.T. (Coords.). Ed. Mundi-Prensa. Madrid. Pp. 79-100.

Flowers T.J., Lachn D.R., Flowers S.A. y Yeo A.R. 1985. Some effects of sodium chloride on cells of rice cultured *in vitro*. *Plant Science*, 39: 205-221.

- François, L.E. y Clark, R.A.** 1979: Accumulation of sodium and chloride in leaves of sprinkler irrigated grapes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104: 11-13.
- Garcia, M.E., Fallot, J., Charbaji, T. y Ronson, J.P.** (1993). Action du chlorure de sodium sur la composition des baies de vigne cultivées en hors-sol. *Vitis* 32 (4): 215-255.
- Garcia M. E., and Charbaji, T.** 1989. Influence de la teneur en chlorure de sodium du milieu sur la composition minerale de la vigne. *Agrochimica* 33 (6): 412-423.
- Gale H., Kohl H.C. y Hagan R.H.** 1967. Changes in the water balance and photosynthesis of onion bean and cotton plants under saline conditions. *Physiologia plantarum* 20: 408-420.
- Gimmler, H. y Moller, J.C.** 1981. Salinity dependent regulation of starch and glycerol metabolism in *Dunaliella parva*. *Plant. Cell. Environ.*, 4: 367-375.
- Grattan, S.R. and Grieve, C.M.** 1992. Mineral element acquisition and growth response of plants grown in saline environments. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 38: 275-300.
- Greenway H. y Munns R.** 1980. Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Annual Review Plant Physiology*, 31: 149-190.
- Grieve C.M. y Mass E.V.** 1988. Diferential effects of sodio on sorghum genotypes. *Crop Sci*, 28: 659-665
- Guerrier, G.** 1989. Interet, principes et problemes poses lors de l'obtention des plantes adaptées au NaCl. *Rev. Cyt. Veg. Bot.*, 12: 3-15.
- Hafizur-Rahman M., Krishnaraj S. y Thorpe T.A.** 1995. Selection for salt tolerance in vitro using microspore-derived embryos of *Brassica napus* cv. topas, and the characterization of putative tolerant plants. *In-vitro-cell-dev-biol,-Plant*, v 31, 2: 116-121.
- Kent L.M. y Läuchli A.** 1985. Germination and seedling growth of cotton: Salinity-calcium interactions. *Plant Cell and Environment*, 8: 155-159.
- Kirchmeier, F.**, 1955. Ueber das Vorkommen der wilden Weinrebe in Niederösterreich und Mähren. *Zeitschrift für Botanik*, Bd 43: 279-307.
- Kishore D.K., Pandey, R.M. y Singh R.** 1985. Effect of salt on growth characteristics of Perlette grapevines. *Prog. Hort.* 17: 289-297.
- Khrais T., Leclerc Y. y Donnelly D.J.** 1998. Relative salinity tolerance of potato cultivars assessed by in vitro screening. *Am J Potato Res*, v 75, 5: 207-210.
- Klobus G., Ward M.R. y Huffaker R.C.** 1988. Characteristics of injury and recovery of net NO₃⁻ transport of barley seedlings from treatments of NaCl. *Plant Physiol*, 87: 878-882.
- Kuo Y.J., Smith M.A.L. y Spomer L.A.** 1994. Merging callus level and whole plant micro-culture to select salt-tolerant 'Seaside' creeping bentgrass. *J-plant-nutr*, v 17, 4: 549-560.
- Kriedemann P.E., Lovelys B.R. y Downton W.J.S.** 1975. Internal control of stomatal physiology and photosynthesis. II. Photosyntetic responses to phaseic acid. *Aust. J. Plant. Physiol.* 2: 553-567.
- Lázaro, B.**, 1920. Compendio de la flora española (3ª ed.) (II). Imprenta Clásica Española. Madrid.

- Lessani, H.** 1969 Recherches sur le comportement physiologique de la luzerne en presence de NaCl. Etude de quelques aspects de la nutrition minérale et dy métabolisme respiratoire. Tesis Doctoral. Paris. pp 152.
- Liua P. y Baob W.** 1998. Cell types in the wild type callus of rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by screening for salt tolerant lines with selection pressure. *Plant Sci*, v 131, 2: 195-202.
- Lynch J. y Läuchli A.** 1985. Salt stress disturbs the calcium nutrition of barley (*Hordeum vulgare* L). *New Phytol*, 99: 345-354.
- Marschner, H.** 1986. Mineral nutrition of Higher Plants. Academic Press, London, 674 pp.
- Mass E.V. y Hoffman G.J.** 1977. Crop salt tolerance: current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division*. ASCE. Vol 103. N°IR2. Proc. Paper 12993. 115-134.
- Mass E.V. y Grieve C.M.** 1987. Sodium-induced calcium deficiency in salt-stressed corn. *Plant Cell Environ.* 10: 559-564.
- Melchers G.** 1972. Haploid higher plants for plant breeding. *Z. Pflanzenzüchtg*, 67: 19-32.
- Morabito D., Mills D., Prat D. y Dizengremel P.** 1994. Response of clones of *Eucalyptus microtheca* to NaCl in vitro. *Tree-physiol*, v 14, 2: 201-210.
- Munns R.** 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypothesis. *Plant, Cell and Environment*, 16: 15-24.
- Munns R. y Weir R.** 1981. Contribution of sugars to osmotic adjustment in elongating and expanding zones of wheat leaves during moderate water deficit at two light levels. *Aust. J. Plant Physiol.* 8: 93-105.
- Ocete, R., López, M.A., Lara, M. y Del Tío, R.,** 1997a. The sanitary state of a phylogenetic resource: the Spanish wild grapevine, *Vitis vinifera sylvestris* Gmelin (Hegi), populations. *Plant Genetic Resources Newsletter (FAO)*, 110: 5-12.
- Ocete, R., López, M.A., Pérez, M.A., Arnold, C. y Ferragut, F.,** 2000 a. Prospección de los artrópodos fitófagos, auxiliares y enfermedades en poblaciones europeas de vid silvestre, *Vitis vinifera* L. subesp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi. *Bol. San Veg. Plagas* 26 (2): 173-186.
- Ochatt S.J., Marconi P.L., Radice S., Arnozis P.A. y Caso O.H.** 1998/1999. In vitro recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. *Plant-cell,-tissue-organ-cult*, v. 55, 1: 1-8.
- Papadopoulos I. y Rendig V.V.** 1983. Tomato plant response to soil salinity. *Agronomy Journal*, 75: 696-700.
- Pardo Sastrón, J.,** 1902. *Catálogo de las plantas de Torrecilla de Alcañiz*. Zaragoza.
- Perret, M.,** 1998. Polymorphisme des génotypes sauvages et cultivés de *Vitis vinifera* L. détecté à l'aide de marqueurs RAPD. *Bull. Soc. Neuchâteloise Sci. Nat.*, 120: 45-54.
- Pirone, G.,** 1995. *Alberi, arbusti e liane d'Abruzzo*. Cogecstre Edizioni, Penne: 542 pp.
- Prior, L.D.; Grieve, A.M. Slavich, P.G. Cullis, B.R.** 1992. Sodium chloride and soil texture interactions in irrigated field grown Sultana grapevines. II. Plant mineral content, growth and physiology. *Aust. J. Agric. Res.* 43: 1067-1083.

Quer, J., 1784. *Continuación de la Flora Española ó Historia de las plantas de España*. Joaquín Ibarra. Impresor de Cámara de S.M. Madrid.

Rivera, D. y Walker, M.J., 1989. A review of paleobotanical findings of early *Vitis* in the Mediterranean and on the origin of cultivated grape-vines, with special reference to new pointers to prehistoric exploitation in the Western Mediterranean. *Rev. of Paleobotany*, 6: 205-237.

Romero-Aranda, R.; Moya, J.L.; Tadeo, F.R.; Legaz, F.; Primo-Millo, E.; Talon, M. 1998. Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations. *Plant-cell-environ.* 21 (12): 1243-1253.

Scowcroft W.R. y Larkin P.J. 1982. Somaclonal variation: a new option for plant improvement. In: *Plant improvement and somatic cell genetics* (Vasil I.K. Scowcroft W.R. and Fry K.J. ed.) Academic Press. New York.

Shannon M.C. 1979. In quest of rapid screening techniques for plant salt tolerance. *HortScience*. 14: 587-589.

Sharpley A.N., Meisinger, J.J. Power, J.F. y Suárez, D.L. 1992. Root extraction of nutrients associated with long-term soil management. In: B. Steward (Editor). *Advances in Soil Science*, Springer, New York.

Schumann, F., 1971. Berichte über die Verwendung der *Wildrebe Vitis vinifera* L. Var. *silvestris* Gmelin. *Die Wein-Wissenschaft*, 26:212-218.

Skene K.G.M. And Barlass M. 1988. Response to NaCl of Grapevine regenerated from Multiple Shoot Cultures Exhibiting Mild Salt Tolerance In Vitro. *Am. J. Enol. Vitic*, v. 39, 2: 125-128.

Strogonov, B.P. 1962. Physiological basics of salt tolerance of plants. Israel Program Sci. Transl. Jerusalén. pp. 279.

Sumaryati S., Negrutiu I. y Jacobs M. 1992. Characterization and regeneration of salt- and water-stress mutants from protoplast culture of *Nicotiana plumbaginifolia* (Viviani). *Theor. Appl. Genet.* v. 83, 5: 613-619.

Tal M. 1985. Genetics of salt tolerance in higher plants: theoretical and practical considerations. *Plant Soil*, 89: 199-226.

Termaat A., Passioura J.B., Munns R. 1985. Shoot turgor does not limit growth of NaCl affected wheat and barley. *Plant Physiology*, 77: 869-872.

Terpo, A., 1962. Adatok a hazai vadontermő *Vitis*-ek ismeretéhez. *Annales Acad. Horti. Et Viticulturae* 26(1): 161-174.

Terpo, A., 1969. A *Vitis silvestris* Magyar Középhegységi termőhelyi Viszonyainak vizsgálata. *Bot. Közlem* 56 (1): 27-35.

Terpo, A., 1974. A ligeti szőlő- *Vitis vinifera* L (Taxonomic key of the wild and feral vine species occurring in Hungary). *Magyarország Kultúrflórája*. Budapest, 4: 15-16.

This, P., Roux, C., Parra, P., Siret, R., Bourse, T., Adam, A., Yvon, M., Lacombe, T., David, J., y Boursiquot, J.M., 2001. Caractérisation de la diversité d'une population de vignes sauvages du Pic Saint – Loup (Hérault) et relations avec le compartiment cultivé. *Genet. Sel. Evol.*, 33 (1): S289-S304.

Troncoso, J.; Liñán, J.; Cantos, M.; García-Liñán, M. Y Troncoso, A. .2003. Influencia de la salinidad del medio en la germinación y el desarrollo del embrión de olivo *in vitro*. V Reunión Nacional de la Sociedad Española de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales. Pamplona. 29 junio a 2 julio.

J. Troncoso, J. Liñán, M. Cantos, J.L. García, A. Troncoso. 2004. *In vitro* selection of salt-tolerant olive clones. 5 th. International Symposium on Olive Growing. Izmir (Turquía). 27 Septiembre- 2 Octubre.

Troncoso A., Matte C., Cantos M. y Lavee S. 1999 a. Evaluation of salt tolerance *in vitro*-grown grapevine rootstock varieties. *Vitis*, v. 38, 2: 55-60.

Troncoso A., Villegas A., Mazuelos C., Cantos, M. 1990. Growth and mineral composition of grape-vine rootstock cultured "in vitro" with different levels of ammonium nitrate. Plant Nutrition, physiology and applications. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

Walker R.R., Torokfalvy E. Y Scott N.S. y Kriedemann. 1981. An analysis of photosynthetic response to salt treatment in *Vitis vinifera*. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 8: 359-374.

Walker, R.R.; 1994.: Réaction de la vigne à la salinité. Mémoire/report. Bull OIV (Off. Int. Vigne Vin): 635-661.

Wallinga, I.; Van der Lee, J.J.; Houba, V.J.G.; van Vark, W.; and Novozamsky, I. 1995. Plant Analysis Manual. Kluwer. Dordrech. Netherlands.

Ward M.R., Aslam M. y Huffaker R.C. 1986. Enhancement of nitrate uptake and growth of barley seedlings by calcium under saline conditions. *Plant Physiol*, 80: 520-524.

Wyn Jones, R.J. 1981. Salt Tolerance. In: Environmental factor limiting plant productivity (Johnson ed.) C.B. London.

Zenk, M.H. 1974. Haploids in physiological and biochemical research. In: Haploids in Higher Plants: Advances and Potential (K.J. Kasha, ed.) pp. 339-354: Univ. Guelph Press. Guelph.

Zhang Y. y Donnelly D.J. 1997. *In vitro* bioassays for salinity tolerance screening of potato. *Potatoes*. v. 40, 3: 285-295.