

## RESUMEN.

Se ha abordado el estudio de la influencia de la fertilización nitrogenada sobre la tolerancia a heladas en olivo y los cambios asociados en el perfil proteico de las hojas. Se han llevado a cabo dos ensayos, uno con árboles adultos localizados en la finca “La Mina”, en Cabra, donde se seleccionaron árboles con N en hoja: deficiente (1,1 - 1,3%), adecuado (1,4 - 1,6%) o en exceso (1,7 - 1,8%). Paralelamente se ha llevado a cabo un ensayo con plantas jóvenes en umbráculo, situado en el Campus de Rabanales de la Universidad de Córdoba. Las plantas, cultivadas en macetas de 1,1 litros de capacidad, se abonaron quincenalmente con diferentes dosis de N hasta que se observaron diferencias significativas en el crecimiento. En este ensayo, se escogieron plantas con 4 dosis diferentes de N (0, 50, 100 o 400 ppm de N). De ambos ensayos se recogieron hojas de los árboles desde octubre a mayo. De las hojas se obtuvieron discos de 7 mm de diámetro que fueron introducidos en tubos de ensayo y sometidos a temperaturas de congelación (de 0 a -24° C) en un baño con glicol. Tras la congelación, se midió la conductividad eléctrica en cada tubo (CEi), y los discos se introdujeron en un autoclave para provocar la rotura completa de los tejidos y se volvió a medir la conductividad (CEa). La conductividad relativa (CEr) se calculó como el porcentaje de la  $(CEi / CEa) * 100$ . La CEr en función de la temperatura describe una curva sigmoideal cuyo punto de inflexión predice la temperatura letal de helada (LT50). Los menores valores de LT50 se obtuvieron cuando las plantas estaban aclimatadas al frío (noviembre - enero), sin que hubiera diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones de N en hojas. En octubre, antes de que éstas entrasen en reposo invernal, las plantas con exceso de N presentaron valores más bajos de LT50, invirtiéndose este hecho en primavera, época en la que esas plantas fueron las más sensibles a las heladas. El análisis proteómico reveló un aumento en la cantidad de proteínas en los meses más fríos (diciembre y enero), en las hojas procedentes del ensayo de campo, manteniéndose hasta abril. El análisis por electroforesis en una dimensión reveló la existencia de diferencias en el patrón de bandeo e intensidad de la banda, observando una banda predominante a 55 kDa, y otra de intensidad variable en función de los meses a 40-43 kDa, siendo estas proteínas de la familia de la deshidrinas, y en menor medida, bandas de peso molecular de 30 y 21,5 kDa. Tras realizar la espectrometría de masas se encontró que la proteína

predominante fue la subunidad grande de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (55 kDa). Tras los resultados obtenidos, no se puede relacionar la concentración de N en hoja con el mayor o menor contenido proteico, estando condicionado el contenido de proteínas más por la estacionalidad que por el estado nutritivo de la planta.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of nitrogen fertilization in olive trees frost tolerance and associated changes in the protein profile of its leaves. Two tests have been carried out; in the first one, samples were collected from mature trees located in "La Mina" (Cabra), where trees were selected according to its leaves N content: poor (1.1 to 1.3 %), adequate (1.4 - 1.6%) or excessive (1.7 to 1.8 %). Concurrently, we made another trial with young plants in a greenhouse placed in the campus of Rabanales (University of Cordoba). The plants grown in pots of 1.1 liters and were fertilized once every two weeks with different doses of N until significant differences in growth were demonstrated. In this trial, plants recruitment was based on 4 different N doses (0, 50, 100 or 400 ppm of N). In both trials, trees leaves were collected from October to May. Leaves discs of 7 mm diameter were introduced in test tubes and subjected to freezing temperatures (0 to -24 ° C) in a bath of glycol. After being frozen, electrical conductivity was measured in each tube (EC<sub>i</sub>), discs were placed in an autoclave to cause the complete tissues breakdown and remeasure its conductivity (EC<sub>a</sub>). The relative conductivity (EC<sub>r</sub>) was calculated as the percentage of the (EC<sub>i</sub> / EC<sub>a</sub>) \* 100. The EC<sub>r</sub> based on the temperature describes a sigmoidal curve whose inflection point predicts frost lethal temperature (LT<sub>50</sub>). The lowest LT<sub>50</sub> values were obtained when plants were acclimated to cold (November-January), with no statistically significant differences between the diverse leaf N concentrations. In October, just before the invernial inactivity, plants with excessive N had the lowest LT<sub>50</sub> values; this fact reversed in spring, when these plants turned out to be the most sensitive to frosts. Proteomic analysis revealed a protein increasement in the coldest months (December and January) in the field trial leaves, remaining this fact until April. One dimension electrophoresis analysis revealed diversity in the banding pattern and intensity of the band, observing a predominant band at 55 kDa, and one of variable intensity depending on the months at 40-43 kDa, being these proteins related to the dehydrins family, and to a lesser extent , bands of 30 and 21.5 kDa molecular weight. After performing mass spectrometry, it was found out that the predominant protein was the large subunit of ribulose-1, 5 - bisphosphate carboxylase oxygenase (55 kDa). Based on the results, leaf N concentration cannot be related to the highest or lowest protein content; while protein content is more conditioned by seasonality than by the nutritional status of the plant.