

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Producción Vegetal

**CONDUCTANCIA HIDRÁULICA EN
PATRONES DE CÍTRICOS**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

Juan Rodríguez Gamir

DIRECTORA:

M^a Ángeles Forner Giner

TUTOR ACADÉMICO:

Carlos Mesejo Conejos

Valencia, Septiembre 2012

INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

Apartado oficial 46113, Moncada (Valencia)

Dña. M^a Ángeles Forner Giner, Doctora Ingeniera Agrónoma y Colaborador Científico Adjunto del IVIA,

INFORMA que:

Juan Rodríguez Gamir, Ingeniero Agrónomo, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que, con título “Conductancia hidráulica en patrones de cítricos”, presenta para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente documento en Moncada a 5 de Septiembre de 2012

M^a Ángeles Forner Giner

RESUMEN

La conductancia hidráulica determina la capacidad de transporte de agua afectando a las relaciones hídricas de la planta así como a la eficiencia de absorción de agua y nutrientes. Los patrones de cítricos difieren en su conductancia hidráulica debido a diferencias en la anatomía de los elementos vasculares o en la distribución del sistema radical pudiendo ser el principal factor que regula el desarrollo de los frutos y la respuesta de la planta a situaciones de estrés. Las relaciones hídricas pueden verse alteradas por estreses abióticos como el déficit hídrico, la salinidad o la asfixia radical. Recientes estudios realizados en especies no cítricas demuestran que las acuaporinas intervienen de manera importante en las relaciones hídricas de la planta y que los estímulos ambientales pueden regular su expresión. Ésta, a su vez, puede estar regulada por el pH citosólico.

Por tanto, el principal objetivo de la presente tesis fue estudiar la conductancia hidráulica de los patrones de cítricos, determinando su influencia en la transpiración, los factores que la regulan y su papel en la respuesta de la planta a las situaciones de estrés abiótico.

En los ensayos realizados, se utilizaron distintos patrones injertados y sin injertar. Se observaron diferencias en la capacidad de absorción de agua de los diferentes patrones, la cual tuvo una marcada influencia en el proceso de transpiración de la planta. La conductancia hidráulica se relacionó tanto con la expresión de acuaporinas como con la anatomía del xilema. Por otra parte, en condiciones de estrés hídrico se demostró que las características hidráulicas del patrón pueden determinar el grado de tolerancia de la planta a este estrés. Al someter las plantas a estrés salino se observó que la diferencia en la expresión de acuaporinas entre genotipos de cítricos afecta a la exclusión de cloruro de las hojas, determinando así su tolerancia a la salinidad. Por último, en condiciones de asfixia radical se demostró que la acidosis inducida por este estrés inhibe la expresión de las acuaporinas causando una reducción de la conductancia hidráulica que provoca el cierre estomático.

RESUM

La conductància hidràulica determina la capacitat de transport d'aigua afectant a les relacions hídriques de la planta així com l'eficiència d'absorció d'aigua i nutrients. Els patrons de cítrics difereixen en la seua conductància hidràulica a causa de diferències en l'anatomia dels elements vasculars o en la distribució del sistema radical podent ser el principal factor que regula el desenvolupament dels fruits i la resposta de la planta a situacions de estrès. Les relacions hídriques es poden veure alterades per estressos abiòtics com el dèficit hídric, la salinitat o l'asfíxia radical. Recents estudis realitzats en espècies no cítriques demostren que les aquaporines intervenen de manera important en les relacions hídriques de la planta i que els estímuls ambientals poden regular la seua expressió. Aquesta, al seu torn, pot estar regulada pel pH del citosol.

Per tant, el principal objectiu d'aquesta tesi va ser estudiar la conductància hidràulica dels patrons de cítrics, determinant la seua influència en la transpiració, els factors que la regulen i el seu paper en la resposta de la planta a les situacions d'estrès abiòtic.

En els assaigs realitzats, es van utilitzar diferents patrons empeltats i sense empeltar. Es van observar diferències en la capacitat d'absorció d'aigua dels diferents patrons, que va influir marcadament en el procés de transpiració de la planta. La conductància hidràulica es va relacionar tant amb l'expressió de aquaporines com amb l'anatomia del xilema. D'altra banda, en condicions d'estrès hídric es va demostrar que les característiques hidràuliques del patró poden determinar el grau de tolerància de la planta a aquest estrès. En sotmetre les plantes a estrès salí es va observar que la diferència en l'expressió de aquaporines entre genotips de cítrics afecta l'exclusió de clorur de les fulles, determinant així la seua tolerància a la salinitat. Finalment, en condicions d'asfíxia radical es va demostrar que l'acidosi induïda per aquest estrès inhibeix l'expressió de les aquaporines causant una reducció de la conductància hidràulica que provoca el tancament dels estomes.

ABSTRACT

Hydraulic conductance determines the capacity of water transport affecting plant water relations as well as the water and nutrient absorption efficiency. Differences in citrus rootstock hydraulic conductance have been related to xylem anatomy and root distribution. Additionally, hydraulic conductance can be the main factor determining fruit development and the plant response to stress conditions. Water relations can be affected by abiotic stresses such as drought stress, salinity and anoxia. Recent studies show that, in non-citrus species, aquaporins are significantly involved in plant water relations and environmental stimuli can regulate their expression. This, in turn, may be regulated by the cytosolic pH.

Therefore, the main objective of this thesis was to study the hydraulic conductance of citrus rootstocks, determining its influence on the transpiration, factors that regulate it and its role in the plant response to abiotic stresses.

In the experiments, seedlings of different rootstocks and plants grafted on different rootstocks were used. Differences in the water absorption capacity between rootstocks were observed. Hydraulic conductance had a marked influence on the plant transpiration and was related to both the expression of aquaporins as xylem anatomy. On the other hand, results showed that, under water stress conditions hydraulic characteristics could determine the degree of plant tolerance to this stress. By subjecting plants to salt stress, differences between citrus genotypes in aquaporin expression were observed, thereby determining their salinity tolerance. Finally, acidosis induced by anoxic stress caused down-regulation of aquaporin expression, thus decreasing hydraulic conductance which results in stomatal closure.

Índice

	pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS CÍTRICOS	19
2. PATRONES DE CÍTRICOS.....	20
2.1 Descripción de patrones de cítricos	22
Citrange Carrizo	22
<i>Poncirus trifoliata</i>	22
Mandarino Cleopatra.....	23
Forner-Alcaide 5	23
Forner-Alcaide 13	24
3. RELACIONES HÍDRICAS EN CÍTRICOS	24
3.1. Influencia del patrón en las relaciones hídricas.....	26
4. ESTRESSES ABIÓTICOS QUE AFECTAN A LOS CÍTRICOS.....	27
4.1. Estrés hídrico	27
4.2. Salinidad	30
4.3. Asfixia	32

5. CONDUCTANCIA HIDRÁULICA.....	34
5.1. Conductancia hidráulica en cítricos	35
5.2. Influencia de los factores anatómicos en la conductancia hidráulica.....	36
5.3. Acuaporinas y su relación con la conductancia hidráulica	37
5.4. Conductancia hidráulica y estreses abióticos	39
5.4.1. <i>Conductancia hidráulica y estrés hídrico</i>	39
5.4.2. <i>Conductancia hidráulica y salinidad</i>	40
5.4.3. <i>Conductancia hidráulica y encharcamiento</i>	41
OBJETIVOS.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO	49
2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	51
2.1. Influencia de la conductancia hidráulica en la transpiración	51
2.2. Influencia de las características hidráulicas del patrón en la transpiración y su relación con la anatomía de la raíz	52
2.3. Influencia de la conductancia hidráulica en la respuesta de los cítricos a estreses abióticos	54
2.3.1 <i>Estrés hídrico</i>	54
2.3.2 <i>Salinidad</i>	58
2.3.3 <i>Asfixia</i>	61
3. METODOLOGÍA	65
3.1. Conductancia hidráulica	65
3.2. Medidas de intercambio gaseoso	66
3.3. Determinación de las relaciones hídricas de la hoja	67
3.4. Transpiración de la planta completa	67
3.5. Microscopía óptica	68
3.6. Microscopía de fluorescencia	69

3.7. Extracción de la savia del xilema.....	69
3.8. Análisis de ABA.....	69
3.9. Medida del pH de la savia del xilema.....	70
3.10. Expresión de acuaporinas.....	70
3.10.1. Clonación de fragmentos específicos para PIP1 y PIP2.....	70
3.10.2. Extracción de RNA.....	71
3.10.3. Análisis Northern.....	72
3.11. Análisis de cloruros.....	72
3.12. Determinación del porcentaje de transporte apoplástico.....	72
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	73
RESULTADOS.....	75
1. INFLUENCIA DE LA CONDUCTANCIA HIDRÁULICA EN LA TRANSPIRACIÓN.....	77
<i>Biomasa de las plantas y transpiración.....</i>	<i>77</i>
<i>Conductancia hidráulica de la raíz, de la componente aérea y de la planta completa.....</i>	<i>78</i>
<i>Relación de la transpiración de la planta completa con la conductancia hidráulica de la raíz, de la componente aérea y de la planta completa.....</i>	<i>82</i>
2. INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS HIDRÁULICAS DEL PATRÓN EN LA TRANSPIRACIÓN Y SU RELACIÓN CON LA ANATOMÍA DE LA RAÍZ.....	84
<i>Biomasa y conductancia hidráulica de la raíz de los diferentes genotipos....</i>	<i>84</i>
<i>Relación entre la transpiración instantánea y conductancia hidráulica.....</i>	<i>85</i>
<i>Influencia de la conductancia hidráulica en la relación de la transpiración de la planta completa con la biomasa foliar.....</i>	<i>86</i>
<i>Características anatómicas de la raíz y su relación con la conductancia hidráulica.....</i>	<i>87</i>
3. INFLUENCIA DE LA CONDUCTANCIA HIDRÁULICA EN LA RESPUESTA DE LOS CÍTRICOS A ESTRESSES ABIÓTICOS.....	91
3.1 Estrés hídrico.....	91
3.1.1. Fisiología del estrés hídrico.....	91
<i>Efecto del estrés hídrico en la conductancia estomática y transpiración.....</i>	<i>91</i>

<i>Efecto del estrés hídrico en las relaciones hídricas</i>	92
<i>Efecto del estrés hídrico en el contenido de ABA</i>	94
<i>Efecto del estrés hídrico en la conductancia hidráulica</i>	96
<i>Efecto del estrés hídrico en el pH de la savia del xilema</i>	97
<i>Efecto del pH y del ABA en la conductancia estomática</i>	97
3.1.2 Influencia de las características hidráulicas del patrón en la respuesta de los cítricos a estrés hídrico	99
<i>Efecto del estrés hídrico en la biomasa y relaciones hídricas</i>	99
<i>Efecto del estrés hídrico en los parámetros de intercambio gaseoso</i>	102
<i>Efecto del estrés hídrico en la expresión de acuaporinas</i>	105
<i>Efecto del estrés hídrico en la conductancia hidráulica</i>	106
3.2. Salinidad	107
<i>Efecto de la salinidad en la conductancia hidráulica de la raíz, transpiración, acumulación de Cl⁻ en hojas, expresión de acuaporinas y acumulación de suberina en la hipodermis</i>	107
<i>Efecto de la salinidad y del mercurio en la conductancia hidráulica de la raíz, transpiración, acumulación de Cl⁻ en hojas y expresión de acuaporinas</i>	110
3.4. Asfixia	112
<i>Efecto de la asfixia en la conductancia estomática y transpiración</i>	112
<i>Efecto de la asfixia en las relaciones hídricas</i>	112
<i>Efecto de la asfixia en el contenido de ABA en raíces y en la savia del xilema</i>	115
<i>Efecto de la asfixia en el contenido de ABA en hojas</i>	116
<i>Efecto de la defoliación parcial</i>	117
<i>Efecto de la asfixia en la conductancia hidráulica de la raíz</i>	118
<i>Efecto de la asfixia en la transpiración de la planta completa y en el transporte apoplástico</i>	119
<i>Efecto de la asfixia en la expresión de acuaporinas</i>	120
<i>Efecto de la asfixia en el pH de la savia del xilema</i>	121
<i>Efecto del pH en la conductancia hidráulica y en la conductancia estomática</i>	121

DISCUSIÓN.....	125
1. CARACTERÍSTICAS HIDRÁULICAS DE LOS PATRONES DE CÍTRICOS Y SU RELACIÓN CON LA TRANSPIRACIÓN	127
2. FACTORES QUE AFECTAN A LA CONDUCTANCIA HIDRÁULICA EN CÍTRICOS....	131
2.1. Anatomía de la raíz.....	131
2.2. Efecto de la expresión de acuaporinas.....	132
2.3. pH	134
3. INFLUENCIA DE LA CONDUCTANCIA HIDRÁULICA EN LA RESPUESTA DE LOS CÍTRICOS A ESTRESSES ABIÓTICOS	135
3.1. Estrés hídrico	135
3.1.1 <i>Influencia de las características hidráulicas del patrón en la respuesta al estrés hídrico</i>	141
3.2. Salinidad	146
3.3. Asfixia	148
 CONCLUSIONES	 153
 BIBLIOGRAFÍA.....	 159

INTRODUCCIÓN

1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS CÍTRICOS

Los cítricos se cultivan en más de un centenar de países de climas tropicales y subtropicales, alcanzando una producción superior a 123 millones de toneladas en el año 2010. La producción fue mayoritariamente de naranjas, que constituyeron el 56,12% del total, seguida de mandarinas, tangerinas, clementinas e híbridos similares (23,28%), limas y limones (11,43%) y otros (9,87%) (FAO 2012).

A nivel de producción, España ocupa el sexto lugar en el mundo con 5,46 millones de toneladas, detrás de China con 23,94, Brasil con 21,33, India con 10,39, Estados Unidos con 9,99 y México con 6,86 (FAO 2012). Sin embargo, estos otros cinco países tienen como mínimo una superficie cuatro veces superior a la española, por lo que la producción con respecto a la superficie del país es bastante superior en España que en el resto de países, lo que pone de manifiesto la importancia de la citricultura en España.

Por productos, la producción de naranjas supone el 53,42% de la producción de cítricos españoles, la de mandarinas un 34,92% y la de limones un 10,77% (MAGRAMA 2012). España, según los datos publicados por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, cuenta con un total de 316.623 hectáreas plantadas de cítricos. De las cuales, 182.951 hectáreas se encuentran en la Comunidad Valenciana donde se produce, respectivamente, el 57,55 y 79,88% de las naranjas y mandarinas. Andalucía cuenta con 83.333 hectáreas y produce el 34,20 y 12,05% de las naranjas y mandarinas, respectivamente, y casi la totalidad de producción de naranjas amargas. La región de Murcia dedica una superficie de 37.804 hectáreas al cultivo de cítricos, siendo la mayor productora de limones y pomelos seguida por Andalucía y la Comunidad Valenciana (MAGRAMA 2012).

El principal destino de los cítricos españoles es la exportación, dedicándose a este fin un 46,17% de la producción, seguida por el consumo interior en fresco (36%) y por la transformación (17,7%). España es el primer país exportador de cítricos dedicados al consumo de fruta fresca, seguido por Sudáfrica, Brasil y

EE.UU. (FAO 2012) aunque en los últimos años, la competencia con otros países productores ha aumentado, principalmente por razones de precio y no por calidad observándose una tendencia a disminuir la exportación y a incrementar el porcentaje de consumo fresco interior y el de transformación.

2. PATRONES DE CÍTRICOS

En la actualidad, los cítricos se cultivan injertando la variedad deseada sobre un patrón, el cual influirá de manera importante en el comportamiento del árbol, puesto que, los patrones, además de proporcionar resistencia o tolerancia a las enfermedades, afectan al vigor, cosecha y características del fruto (Albrigo 1977, Syvertsen et al. 2000, Barry et al. 2004, Romero et al. 2006) y confiere a la plantación de una serie de ventajas como pueden ser: la adaptación frente a estreses abióticos, mayor precocidad de la plantación para la entrada en producción, mayor uniformidad en la plantación, ampliación de la época de recolección y resistencia o tolerancia frente a plagas (Castle 1987).

La evolución del uso de patrones en la citricultura ha estado ligada a la aparición de enfermedades (Agustí 2000). Algunas de éstas han tenido gran repercusión en la mayoría de las áreas cítricas del mundo, como es el caso de la gomosis producida por el hongo *Phytophthora* spp. (Timmer 1988) o la tristeza causada por el virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus Tristeza Virus*, CTV) (Bar-Joseph et al. 1989). En España, la aparición de estas enfermedades ha obligado a realizar cambios importantes en la citricultura, fundamentalmente, a la sustitución de patrones sensibles por otros tolerantes a dichas enfermedades. La gomosis, que apareció en la segunda mitad del siglo XIX (Bou 1879) tuvo efectos dramáticos en la citricultura e hizo que a partir de entonces se utilizase como patrón el naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.) tolerante a dicho hongo (Giner 1893). Posteriormente, en 1957 la aparición de la tristeza de los cítricos obligó a la utilización de patrones tolerantes a esta enfermedad, fundamentalmente mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) y los citranges Troyer y Carrizo

(*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck), citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) y *Citrus volkameriana* V. Ten. & Pasq. (Forner 1985).

En España, los trabajos de mejora genética orientados específicamente a la obtención de nuevos patrones se iniciaron por JB Forner en 1974 en el antiguo Centro Regional de Investigación y Desarrollo Agrario (CRIDA 07) del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA), en Burjassot (Valencia), actualmente Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) de Moncada (Valencia). A través de este programa se pretende resolver algunos de los problemas que se presentan en la citricultura y que son de difícil solución por medio de los patrones existentes hasta el momento. Entre las características deseadas de los patrones de este programa de mejora se encuentran:

- Ser de fácil multiplicación y poseer buen comportamiento en semillero y vivero.
- Poseer buena adaptación a todo tipo de suelos y ser tolerante a los factores edáficos desfavorables (caliza, salinidad, asfixia).
 - Conferir resistencia al frío a la variedad injertada.
 - Poseer buena afinidad con las variedades injertadas.
 - Ser tolerante a las virosis que afectan a los cítricos. De todas éstas, en España, es imprescindible la tolerancia a tristeza.
- Ser resistente a nematodos y a otras plagas que puedan afectar a los patrones.
 - Inducir en las variedades injertadas una rápida entrada en producción, así como maximizar la productividad y la calidad del fruto.
 - Que no den lugar a copas de excesivo tamaño que dificulten y encarezcan las labores de cultivo y las tareas de recolección.

Fruto del programa de mejora del IVIA ha sido la obtención de un gran número de patrones híbridos, algunos de los cuales presentan mejores características que

los patrones utilizados hasta el momento. Otros muchos aún están en fase de evaluación para determinar su comportamiento agronómico. De los híbridos obtenidos en este programa de mejora, existen varios registrados en la Unión Europea y comerciales en España como el Forner Alcaide 5, Forner Alcaide 13, Forner Alcaide 517 y Forner Alcaide 418.

2.1 Descripción de patrones de cítricos

A continuación se describe las principales características agronómicas de los patrones utilizados en los experimentos de la presente tesis:

Citrange Carrizo

El citrange Carrizo es híbrido de *P. trifoliata* y *C. sinensis* obtenido por WT Swingle, en Florida, a finales del siglo pasado y es el patrón empleado mayoritariamente en España.

Es sensible a los suelos salinos y calcáreos (Stannard 1973). Es tolerante al virus de la tristeza (Grant et al. 1961) y a xyloporosis (Salibe y Moreira 1965). Son menos resistentes que *P. trifoliata* a la gomosis producida por *Phytophthora* spp. (Feichtenberger et al. 1994) y sensibles al nematodo de los cítricos, *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. y al nematodo *Radopholus similis* Cobb. (O'Bannon y Ford 1978).

Poncirus trifoliata

P. trifoliata es originario de China, donde fue utilizado con finalidades medicinales. Su primera referencia como patrón se cita en el libro Han Yen-chih's escrito en 1178 (Hodgson 1967).

Es tolerante a xyloporosis y resistente a tristeza (Salibe y Moreira 1965) pero sensible a la exocortis (Fawcett y Klotz 1948). Es resistente a *Phytophthora* spp. (Feichtenberger et al. 1978), así como al nematodo de los cítricos y sensible a *R. similis* (O'Bannon y Ford 1978).

Es muy resistente al frío y a la asfixia radical. Su principal inconveniente es su sensibilidad a la caliza activa y a la salinidad (Peinado y Young 1969).

Mandarino Cleopatra

El mandarino Cleopatra es una especie originaria de la India que pertenece al grupo de mandarinos de fruto pequeño (Hodgson 1967). Es resistente al frío (Platt y Bitters 1971), sensible a la asfixia radical (Platt y Bitters 1971, Forner et al. 1983) y resistente a caliza (Cooper et al. 1954, Newcomb 1978). Se considera resistente a la salinidad (Cooper 1961, Platt y Bitters 1971).

Frente a *Phytophthora* spp. presenta resultados variables: Platt y Bitters (1971) lo consideran sensible, mientras que para otros autores es resistente (Klotz et al. 1968, Newcomb 1978). Feichtenberger et al. 1994 lo consideran de resistencia intermedia. Por otro lado, es sensible a *Armillaria Mellea* (Vahl) Quel. (Platt y Bitters 1971).

El mandarino Cleopatra presenta algunos problemas como patrón. Las variedades injertadas sobre éste tardan más en entrar en producción que injertadas en otros patrones. También la maduración de los frutos es más tardía en árboles injertados en este patrón y los frutos son de menor tamaño que los obtenidos con otros patrones. A pesar de esto, este patrón da lugar a frutos de calidad óptima (Pompeu Jr 2005).

Forner-Alcaide 5

Es híbrido de mandarino Cleopatra y *P. trifoliata* y fue obtenido en 1978 dentro del programa de mejora de patrones del IVIA y registrado en la Unión Europea en 2005.

Es un patrón resistente a tristeza (Forner et al. 2003) y tolera en mayor grado que el Carrizo la clorosis férrica (Forner et al. 2003, Llosá et al. 2009, González-Más et al. 2009) y el encharcamiento de los suelos (Forner et al. 1996). Posee una buena resistencia a hongos del género *Phytophthora* y es resistente a *T. semipenetrans* (Verdejo-Lucas et al. 1997, Verdejo-Lucas et al. 2000, Forner et al.

2003). Se considera tolerante a salinidad (López-Climent et al. 2008, Forner-Giner et al. 2009, Forner-Giner et al. 2011). En estas condiciones, presenta mayor exclusión de iones y menor reducción de los parámetros de intercambio gaseoso que *P. trifoliata* y mandarina Cleopatra (Forner-Giner et al. 2009). Por otro lado, es más tolerante que *P. trifoliata* y mandarina Cleopatra a estrés hídrico (Rodríguez-Gamir et al. 2010).

Induce muy buena productividad, claramente superior a la de citrange Carrizo, siendo la calidad de la fruta entre ambos patrones muy similar (Forner y Alcaide, 1997, Forner et al. 2003, Forner-Giner et al. 2003).

Forner-Alcaide 13

Patrón también obtenido en el programa de mejora de patrones del IVIA en 1978 y registrado en la Unión Europea en 2007. Es híbrido de mandarina Cleopatra y *P. trifoliata*. Es resistente a tristeza y a *Phytophthora* spp., tolera muy bien el encharcamiento e induce muy buena productividad y calidad de fruta (Forner et al. 2003, Forner-Giner et al. 2003). Presenta mayor tolerancia a la salinidad que *P. trifoliata* y mandarina Cleopatra (Forner-Giner et al. 2009) y es menos tolerante que citrange Carrizo y Forner Alcaide 5 a las clorosis férrica (Forner et al. 2003, Llosá et al. 2009). Hojas de naranjo dulce (*C. sinensis* (L.) Osb.) de la variedad Valencia Late injertada sobre este patrón presentan mayores tasas de transpiración y de asimilación de CO₂ que injertadas sobre mandarina Cleopatra (Jover et al. 2012) *P. trifoliata* y FA-5 (Forner-Giner et al. 2009).

3. RELACIONES HÍDRICAS EN CÍTRICOS

Las relaciones hídricas en la planta están determinadas por la absorción de agua de las raíces, su transporte por el xilema y su movimiento desde las hojas hacia la atmósfera. De esta manera, la transpiración juega un papel crucial en los procesos fisiológicos de las plantas, afectando a su crecimiento y productividad (Lo Gullo et al. 2003, Solari et al. 2006b). El gradiente de potencial del agua

existente entre la raíz y la parte aérea genera un flujo de transpiración facilitando el transporte de agua e iones (Fiscus et al. 1983).

Cada día las hojas de los cítricos transpiran una cantidad de agua muy superior a su masa fresca (Syvertsen y Lloyd 1994). La regulación de la absorción de agua, su papel en el crecimiento y sus pérdidas por transpiración constituyen la principal respuesta de la planta a las condiciones ambientales.

El mecanismo de apertura y cierre de los estomas tienen una función decisiva en el intercambio gaseoso de la planta. Cuando están totalmente abiertos, el valor de la resistencia a difusión del CO_2 y H_2O es mínimo. Cuando están completamente cerrados, la resistencia estomática crece infinitamente impidiendo prácticamente la entrada de CO_2 y la pérdida de H_2O . La dinámica de los estomas es el mecanismo más rápido de que la planta dispone para ajustarse a las variaciones ambientales a las que está sometida. Esta regulación de la apertura estomática ocurre por mecanismos complejos, que parecen dirigirse siempre en el sentido de minimizar las pérdidas de agua y maximizar la asimilación de CO_2 (Cowan 1977)

De esta manera, la apertura estomática, que posibilita la entrada de CO_2 , expone, a su vez, a la superficie húmeda de la cavidad subestomática a la atmósfera, originando una pérdida de agua por transpiración dependiente del gradiente de concentración de agua entre la superficie interna del estoma y la atmósfera. El vapor de agua se difunde según la ley de Fick $E=(e_i-e_a) g_s/P$ donde g_s es la conductancia estomática; e_i-e_a/P la diferencia de la concentración de vapor de agua entre el interior de la cavidad subestomática y la atmósfera; e_i , la presión de vapor en el interior de la cámara subestomática donde la humedad relativa es próxima a 100%; e_a , la presión de vapor en el aire y P la presión atmosférica (10^5 Pa a nivel del mar).

La relación entre la tasa de fijación de CO_2 (A_{CO_2}) y la transpiración (E) cuantifica la eficiencia en el uso de agua (WUE) ($WUE= A_{\text{CO}_2}/E$) y, a pesar de que las tasas de fotosíntesis de los cítricos sean menores que las de muchas especies

C3, su eficiencia del uso del agua es muy alta comparada con otras especies (Medina et al. 1999).

3.1 Influencia del patrón en las relaciones hídricas

En cítricos, las relaciones hídricas dependen, en gran medida, de las características del patrón sobre el que se injerta la variedad. A su vez, la respuesta de la planta a estreses abióticos, los cuales tienen una gran influencia en las relaciones hídricas, depende también de las características del patrón, el cual puede inducir tolerancia a estos estreses (Syvertsen y Levy 2005).

Entre las características del patrón que afectan a las relaciones hídricas, se encuentran la distribución del sistema radicular, la eficiencia de absorción de agua y nutrientes (Castle y Krezdorn 1975) y la anatomía de los elementos vasculares (Vasconcellos y Castle 1994). Estas características se asocian con diferencias en la conductancia hidráulica de la raíz (Sinclair y Allen 1982, Syvertsen y Graham 1985), la cual determina la capacidad del patrón para aportar agua y nutrientes a la planta. Dicha capacidad podría ser el principal factor en el desarrollo de frutos en cítricos y determinar tanto el vigor de la variedad injertada como la tolerancia de la planta a estreses (Syvertsen y Lloyd 1994, Medina y Machado 1998).

La capacidad de absorción de agua se ve influenciada por la densidad de raíces fibrosas. El limón Rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.) tiene un sistema radical más desarrollado que citrange Carrizo, permitiéndole absorber agua de un mayor volumen de suelo. Diferencias en el estado hídrico de plantas injertadas en estos dos patrones ponen de manifiesto que el limón Rugoso es más eficiente en la absorción de agua debido a su mayor densidad radicular (Castle y Krezdorn 1977) y/o mayor conductancia hidráulica (Syvertsen y Graham 1985).

Por otro lado, la transpiración y la tasa de asimilación de CO₂ del árbol están influenciadas por el patrón (Camacho-B et al. 1974, Crocker et al. 1974, Syvertsen y Graham 1985, Yelenosky 1991, Medina y Machado 1998). Por ejemplo, Ongun y Wallace (1958) observaron que en hojas jóvenes de naranjo Washington Navel, la tasa de transpiración decrece en el siguiente orden según los patrones utilizados:

limón Rugoso> *P. trifoliata*> citrange Troyer> pomelo (*C. paradisi* Macf.)> naranjo dulce> mandarino Cleopatra> naranjo amargo.

4. ESTRESSES ABIÓTICOS QUE AFECTAN A LOS CÍTRICOS

En cítricos, tanto el crecimiento vegetativo como el reproductivo, así como las relaciones hídricas de la planta están claramente influenciados por las condiciones ambientales (Gómez-Cadenas 1996). Cuando dichas condiciones se alejan de un óptimo para su desarrollo, se pueden producir fenómenos de estrés en la planta. Entre los principales estreses que afectan a los cítricos se encuentran el estrés hídrico, el estrés salino, la asfixia radical, las bajas temperaturas y el déficit nutricional. Un caso concreto de este último estrés y de gran importancia en la citricultura es la clorosis férrica que se puede dar tanto por un bajo contenido de hierro en el suelo como por encontrarse el hierro en estado férrico que es insoluble y no puede ser asimilado por la planta.

A continuación se hace una descripción de los estreses que han sido objeto de investigación en la presente tesis.

4.1. Estrés hídrico

El estrés hídrico se produce en plantas cuando las condiciones ambientales impiden que la absorción de agua sea suficiente para reemplazar las pérdidas de la misma por transpiración (Davies y Albrigo 1994). En cítricos, el déficit hídrico reduce el crecimiento vegetativo, la cosecha, el tamaño del fruto y, algunas veces, la calidad, causando importantes pérdidas económicas en las explotaciones (Hilgeman y Sharp 1970, Levy et al. 1978, 1979, Castel y Buj 1990, Ginestar y Castel 1996, González-Altozano y Castel 1999, Romero et al. 2006).

Cuando la carencia de agua llega a producir un funcionamiento subóptimo de la planta se inducen determinadas respuestas frente a la deficiencia hídrica: marchitamiento de la hoja, reducción del potencial hídrico, reducción de la conductancia estomática, transpiración y asimilación de CO₂ (Sinclair y Allen 1982,

Syvertsen et al. 1988, Davis y Albrigo 1994, Gómez-Cadenas et al. 1996, Arbona et al. 2005, Pérez-Pérez et al. 2007, García-Sánchez et al. 2007). Los regímenes de deficiencia hídrica severa causan una inhibición total del crecimiento vegetativo y abscisión de las hojas (Tudela y Primo-Millo 1992).

El principal mecanismo por el cual las plantas limitan la pérdida de agua por transpiración bajo condiciones de estrés hídrico es el cierre estomático (Turner 1979, Sinclair y Allen 1982, Davies y Zhang 1991, Gómez-Cadenas et al. 1996, Arbona et al. 2005, Comstock 2002, García-Sánchez et al. 2007) que, además de reducir el grado de estrés hídrico, también reduce la asimilación neta de CO₂ (Davies y Albrigo 1994, Arbona et al. 2005, Syvertsen et al. 1988, García-Sánchez et al. 2007).

La reducción de la conductancia estomática y de la asimilación de CO₂ en los cítricos está atribuida a una gran diferencia de la presión de vapor entre la hoja y el aire. Cuando el agua del suelo no está disponible, los cítricos son más sensibles a temperaturas del aire elevadas y a altos déficits de presión de vapor, lo que resulta en un cierre estomático y en una reducción de la asimilación de CO₂ (Brakke y Allen 1995).

El potencial hídrico de las hojas puede aumentar cuando los estomas se cierran (Levy 1980, Levy y Syvertsen 1981). Hilgeman et al. (1969) sugirieron que cuando existe una alta demanda evaporativa, el cierre de los estomas permite que los cítricos puedan reducir el uso del agua y evitar el estrés. Además, los cítricos pueden almacenar dentro de sí, grandes cantidades de agua en la madera y en la fruta, lo que retrasa el descenso de los potenciales hídricos hasta valores críticos (Davis y Albrigo, 1994).

En respuesta al estrés hídrico, el sistema radical puede enviar señales a las hojas, en las cuales se induce el cierre estomático para evitar la pérdida de agua (Davies y Zhang 1991). Una de estas señales es la producción de ácido abscísico (ABA) en las raíces, el cual es transportado a través del xilema a las hojas (Zeevaart y Boyer 1984, Zhang et al. 1987, Zhang y Davies 1987, 1989a, 1990) Gómez-Cadenas et al. 1996). Existen estudios que confirman esto, realizados

tanto en plantas expuestas a condiciones de déficit hídrico (Zhang y Davies 1989a, 1990) como en plantas tratadas con Polietilén Glicol (PEG) (Hoad 1975, Neales et al. 1989, Davies y Zhang 1991, Neales y McLeod 1991, Comstock 2002). El incremento de la concentración de ABA en la savia del xilema de plantas con estrés hídrico puede ser rápido (Hoad 1975) y el cierre estomático se puede producir incluso antes de que se detecte cualquier cambio en el contenido relativo de agua o en el potencial de turgencia de la hoja (Gollan et al. 1986, Gowing et al. 1990, Zhang y Davies 1990, Trejo y Davies 1991). En hojas de plantas sometidas a estrés hídrico, la concentración de ABA se incrementa a medida que disminuye la turgencia (Zhang y Davies 1989b). Así, estos órganos podrían ser una fuente potencial de ABA que contribuiría incrementar su transporte a través del flujo del xilema. En este sentido, algunos estudios realizados en otras especies no cítricas sugieren que el ABA derivado de las hojas estresadas se transporta hacia las raíces, vía floema, y después es liberado al xilema (Hoad 1973, 1978, Wolf et al. 1990).

Aunque el ABA transportado por el xilema desde las raíces a la parte aérea y recibido en las células guarda parece ser el principal factor en la regulación del cierre estomático en hojas de plantas sometidas a estrés hídrico (Davies y Zhang 1991, Wilkinson 2004, Christmann et al. 2005, 2006, Israelsson et al. 2006), hay también considerables evidencias de que las plantas son capaces de responder directamente a señales hidráulicas originadas por el déficit hídrico (Cochard et al. 2002, Brodribb y Holbrook 2003b, Christmann et al. 2007). Tales señales podrían estar involucradas en las respuestas de los estomas a la disminución del potencial hídrico de la hoja (Saliendra et al. 1995, Comstock y Mencuccini 1998) o a la reducción de la conductancia hidráulica durante el estrés (Sperry et al. 2002). También cambios en el pH de la savia del xilema o en el del apoplasto pueden estar implicados en la dinámica de los estomas en condiciones de estrés hídrico (Wilkinson 1999, Bahrún et al. 2002, Sharp y Davies 2009).

Otras respuestas de la planta al estrés hídrico, además del cierre estomático, son (1) el incremento del ratio raíz/parte aérea (Sánchez-Díaz et al. 1990), (2)

reducción del número de hojas y del área foliar (Zhang y Davies 1989b, Yin et al. 2005, Lei et al. 2006), (3) el ajuste osmótico que consiste en incrementar la concentración de solutos en hojas permitiendo a éstas mantener la turgencia necesaria para que los estomas permanezcan abiertos y así mantener niveles adecuados de fotosíntesis (Syvertsen y Smith 1983, Morgan 1984, Delauney y Verma 1993, Nolte et al. 1997, McNeil et al. 1999, Pérez-Pérez et al. 2007, García-Sánchez et al. 2007) o (4) incrementar la actividad de enzimas relacionados con el estrés oxidativo en células de las hojas (Lei et al. 2006). También, en cítricos se ha descrito alteraciones de la expresión de genes como consecuencia del estrés hídrico (Gimeno et al 2009).

Por otra parte, los patrones de cítricos también determinan la respuesta de la planta a estrés hídrico (Castle y Krezdorn 1975, 1977, Syvertsen y Graham 1985, Zekri y Parsons 1989). Frente a estrés hídrico, la lima Rangpur presenta una marcada resistencia (Forner 1981, 1984, 1985, Iriarte-Martel et al. 1999), citrumelo Swingle se considera tolerante a sequía (Wutscher 1981, Forner 1984) mandarina común, mandarina Cleopatra y naranjo amargo se consideran de resistencia intermedia (Agustí 2000) mientras que *P. trifoliata* y los citranges Carrizo y Troyer se consideran sensibles (Forner 1984, 1985).

4.2. Salinidad

Los cítricos están considerados como un cultivo sensible a la salinidad. Con concentraciones salinas moderadas sufren desórdenes fisiológicos que impiden el crecimiento de la planta y reducen significativamente la producción (Maas y Hoffman 1977). Además, al ser sensibles a temperaturas frías, se cultivan en áreas cálidas con elevada demanda evaporativa y precipitación inadecuada por lo que requieren de riego adicional para obtener cosechas económicamente viables. En estas áreas, muchos suelos y el agua utilizada contienen alta cantidad de sales, existiendo incluso intrusión de agua salada en regiones costeras que pueden inhibir el crecimiento y la producción de los cítricos (Levy y Syvertsen 1981, Levy y Syvertsen 2004, Murkute et al. 2005).

Altas concentraciones de cloruro (Cl^-) en hojas originan desórdenes fisiológicos en cítricos y, en ocasiones, daños morfológicos (Cooper y Shull 1953). También las altas concentraciones de sodio (Na^+) en las hojas tienen efectos perjudiciales en la fotosíntesis y transpiración (Behboudian et al. 1986). Estos desórdenes fisiológicos disminuyen el crecimiento y la producción antes de que los daños morfológicos por sal sean evidentes. Cole (1985) sugirió que en naranjo dulce, por cada incremento de $100 \mu\Omega/\text{cm}$ (EC) en el agua utilizada para el riego por encima de 400 EC, la cosecha se reduce en un 6%, aunque esto puede estar modificado y/o influenciado por el patrón utilizado.

La reducción de la fotosíntesis de las hojas de cítricos con una dosis de riego normal pero con agua con alta concentración de NaCl ha sido asociada con la toxicidad específica del Cl^- y/o del Na^+ más que a factores estomáticos (Storey y Walker 1999, García-Sánchez y Syvertsen 2006). De estos dos iones, el Cl^- está considerado más importante que el Na^+ en la limitación de la fijación de CO_2 de los cítricos (Bañuls et al. 1997, Bañuls y Primo-Millo 1992). Adicionalmente, el estado hídrico de la planta se ve alterado por la salinidad debido al estrés osmótico, el cual impide la absorción de agua. Estas alteraciones disparan mecanismos específicos que controlan el ajuste osmótico de la célula evitando la pérdida de agua (Walker et al. 1983). Sin embargo, en el caso de estrés salino, la inhibición de la capacidad fotosintética es más importante que el estrés osmótico y la reducción de la conductancia estomática en la limitación de la tasa de asimilación de CO_2 (Bañuls y Primo-Millo 1992, Levy y Syvertsen 2004). Aún así, la absorción de Cl^- en cítricos, y de este modo, la tolerancia y/o sensibilidad a la salinidad ha sido relacionada con el crecimiento de la planta, con el uso del agua (Castle y Krezdorn 1975, Syvertsen et al. 1988) y con la transpiración (Moya et al. 1999, 2003).

Los patrones de cítricos pueden regular la cantidad de Cl^- acumulado en las hojas de la variedad injertada (Levy y Syvertsen, 2004). De esta manera, la tolerancia de los cítricos a la salinidad depende principalmente del patrón (Maas 1993) el cual determina la capacidad de exclusión de cloruro (Ream y Furr 1976,

Walker et al. 1983, Bañuls y Primo-Millo 1995), que es la habilidad de restringir su absorción y/o su transporte de las raíces a las hojas (Flowers y Colmer 2008).

Los patrones de cítricos varían ampliamente en su capacidad para restringir la acumulación de Cl^- en la parte aérea (Sykes 1985). El patrón mandarino Cleopatra está considerado como un excluidor de Cl^- mientras que citrange Carrizo se considera acumulador de Cl^- (Cooper 1961, Bañuls et al. 1977). *P. trifoliata*, los citranges y el naranjo dulce son sensibles a la salinidad, mientras que el *C. macrophylla* Wester y Forner-Alcaide 5 se muestran resistentes. El mandarino común, el *C. volkameriana* y Forner-Alcaide 418 poseen resistencia media (Forner 1979, Forner et al. 1996).

4.3. Asfixia

La asfixia radicular se da cuando el agua desplaza el oxígeno del suelo creando condiciones de hipoxia (bajos niveles de oxígeno) o anoxia (ausencia de oxígeno). El encharcamiento, generalmente se produce debido a una mala capacidad de drenaje del suelo combinado con un exceso de lluvias o de riego. Una causa frecuente del encharcamiento es la pérdida de una estructura adecuada del suelo por los altos niveles de Na^+ intercambiable, lo que provoca la dispersión de los agregados del suelo disminuyendo la porosidad del mismo (Ghassemi et al. 1995). Estos efectos contribuyen a impedir el movimiento de agua y de aire en el suelo, causando un agotamiento de O_2 y la acumulación de CO_2 . Estas alteraciones en las condiciones químicas del suelo en condiciones de encharcamiento han sido ampliamente descritas (Ponnamperuma 1984).

Los efectos del encharcamiento en las plantas están relacionados principalmente con el descenso de la respiración aeróbica de la raíz que impide la síntesis de ATP, alterando su metabolismo (Bailey-Serres y Voesenek 2008). Por otra parte, la asfixia radical provoca una serie de disfunciones fisiológicas que alteran el crecimiento de plantas, como son: desequilibrios hormonales, alteración de la distribución de carbohidratos o deficiencias en la absorción de nutrientes. Algunas especie han desarrollado mecanismos de tolerancia a la

anoxia o han adquirido algunas características de adaptación a las condiciones anaeróbicas (Bailey-Serres y Voesenek 2008). Entre las estrategias de las plantas para crecer y sobrevivir durante largos periodos de encharcamiento se incluyen cambios bioquímicos, anatómicos y morfológicos (Colmer y Voesenek 2009).

Los cítricos sometidos a asfixia radical presentan, generalmente, escaso número de hojas, retraso en el crecimiento y menor producción de frutos (Davies y Albrigo 1994). Sin embargo, la respuesta fisiológica de éstos al encharcamiento es anterior a la aparición de síntomas morfológicos o a la reducción de la cosecha. En este sentido, la asimilación de CO₂ y la transpiración disminuyen dentro de las 24 horas posteriores al inicio del encharcamiento y se mantienen a valores inferiores a los normales mientras continúa éste (Phung y Knipling 1976). La conductancia estomática disminuye como mecanismo para reducir la transpiración (García-Sánchez et al. 2007, Ortuño et al. 2007, Ruiz-Sanchez et al. 1996, Vu y Yelenoski 1991), según Syvertsen et al. (1983) debido a que la conductancia hidráulica de las raíces disminuye, reduciéndose la absorción de agua. Sin embargo, este mecanismo de supervivencia reduce la asimilación neta de CO₂ que supone un descenso del crecimiento de la parte aérea y de la producción. En muchas ocasiones los árboles no mueren pero permanecen prácticamente improductivos hasta que el suelo ha drenado. Además, el encharcamiento, aparte de debilitar al árbol, conduce a la proliferación de hongos como *Phytophthora* spp. que pueden causar la muerte de los árboles (Davies y Albrigo 1994)

Algunas revisiones se han centrado en las señales que desencadenan la respuesta de las plantas al encharcamiento (Dat et al. 2004, Kozlowski 1997, Sairam et al. 2008). En cítricos, se han detectado incrementos del contenido de ABA en hojas de plantas encharcadas (Arbona y Gómez-Cadenas 2008). Algunos autores han sugerido que la acumulación de ABA en las hojas podría ser responsable del cierre estomático en plantas encharcadas (Castonguay et al. 1993, Jackson y Hall 1987, Neuman y Smith 1991, Zhang y Zhang 1994) aunque es

poco probable que las raíces sean la principal fuente de ABA en condiciones de encharcamiento (Jackson et al. 1988, Zhang y Davies 1986).

Existen diferencias en la tolerancia a asfixia entre patrones de cítricos (Syvertsen y Zablutowicz 1981, Syvertsen et al. 1983, Vu y Yelenoski 1991, Ruiz-Sánchez et al. 1996, García-Sánchez et al. 2007, Arbona y Gómez-Cadenas 2008). Citrumelo Swingle y *C. volkameriana* se consideran muy resistentes (Forner et al. 1983), mandarino Cleopatra se considera sensible (Forner et al. 1983, Platt y Bitters 1971), al igual que citrange Troyer (Platt y Bitters 1971, Yelenoski 1973, Forner 1985). Sin embargo citrange Carrizo presenta mayor tolerancia a encharcamiento que citrange Troyer (Forner y Alcaide 1994)

5. CONDUCTANCIA HIDRÁULICA

La conductancia hidráulica (K) se define como el flujo de agua (Kg s^{-1}) por unidad de gradiente de presión (MPa) responsable del flujo de agua a través del sistema considerado.

De acuerdo con el modelo compuesto del flujo de agua propuesto por Steudle (1993) el agua se transporta a los órganos de la planta por tres rutas: apoplasto, simplasto y transcelular. Las dos últimas rutas no pueden ser diferenciadas experimentalmente, y por tanto son denominadas conjuntamente como ruta célula a célula. Por otra parte, en raíces, existe un flujo de agua radial y otro axial. El flujo radial va desde la superficie de la raíz hacia los vasos del xilema, a través de tejido no vascular y el flujo axial se da predominantemente a través de los vasos del xilema.

La conductancia hidráulica está considerada como uno de los principales factores que controlan el movimiento del agua a través del sistema suelo-planta (Kriedmann y Barrs 1981), por tanto tendrá una influencia importante en la transpiración de la planta y en los procesos fisiológicos relacionados con ésta. Así, las limitaciones de aporte de agua en cítricos, impuestas por el patrón (Syvertsen y Graham 1985), podrían tener una marcada influencia en las relaciones hidricas

(Castle y Krezdorn 1977, Crocker et al. 1974) y en la transpiración (Camacho-B et al. 1974, Sinclair y Allen 1982, Graham y Syvertsen 1984). Según Passioura (1988), diferencias en la conductancia hidráulica de la raíz causan diferencias en el transporte de agua a la parte aérea de la planta que pueden influir en el estado hídrico de la hoja y por tanto en el crecimiento de la planta y en las respuestas fisiológicas. En consecuencia, la capacidad hidráulica del sistema vascular podría jugar un papel importante en regular la conductancia estomática y el intercambio gaseoso (Sperry et al. 1993, Hubbard et al. 2001, Lo Gullo et al. 2007). Además, se ha propuesto que la conductancia hidráulica de patrones de manzano (Cohen y Naor 2002, Cohen et al. 2007) y de melocotonero (Solari y DeJong 2006, Solari et al. 2006a, 2006c) puede estar implicada en los mecanismos de control del tamaño de la planta.

5.1. Conductancia hidráulica en cítricos

A pesar de que en otras especies leñosas existen estudios recientes sobre conductancia hidráulica como en melocotonero (*Prunus persica* L. Batsch) (Solari et al. 2006a, Solari et al. 2006c, Solari y DeJong 2006), olivo (*Olea europaea* L.) (Nardini et al. 2006), vid (*Vitis vinifera* L.) (Alsina et al. 2011), manzano (*Malus domestica* L. Borkh.) (Cohen y Naor 2002, Cohen et al. 2007), la literatura en cítricos a tal respecto es muy escasa (Syvertsen 1981, Syvertsen et al. 1983, Syvertsen y Graham 1985, Syvertsen y Yelenosky 1988, Ramos y Kaufmann 1979, Zekri 1991, Huang y Eissenstat 2000, Zekri y Parsons 1989).

Syvertsen (1981) y Syvertsen y Graham (1985) observaron que plantas sin injertar de los patrones relativamente vigorosos: limón Rugoso y citrange Carrizo tienen mayor conductividad hidráulica (obtenida a partir de la división de la conductancia hidráulica de la raíz entre la superficie de la raíz en contacto con el suelo) y mayor tasa de transpiración que los patrones mandarino Cleopatra y naranjo amargo, menos vigorosos que los anteriores. También, plantas de la variedad Valencia Late presentan un potencial hídrico en las hojas más alto cuando están injertadas sobre limón Rugoso atribuido a su mayor conductancia

hidráulica que cuando están sobre naranjo amargo (Albrigo 1977). Esto sugiere que diferencias en la capacidad de transporte de agua de la raíz de los patrones puede originar diferencias en la cantidad de agua transportada a la parte aérea, puesto que una mayor conductividad hidráulica del sistema radical se asocia con una mayor conductancia estomática y mayor transpiración (Syvertsen y Graham 1985)

Los trabajos realizados en condiciones de estrés abiótico han mostrado reducciones de la conductividad de hidráulica en plantas sometidas a asfixia radical (Syvertsen et al. 1983), estrés hídrico (Ramos y Kaufmann 2006) y en condiciones de salinidad asfixia (Syvertsen y Yelenosky 1988, Zekri 1991, Zekri y Parsons 1989).

5.2. Influencia de los factores anatómicos en la conductancia hidráulica

Las características de los vasos del xilema parecen determinar la capacidad de transporte de agua y se ha propuesto que influyen en el crecimiento vegetativo (Olmstead et al. 2006, Gonçalves et al. 2007, Tombesi et al. 2010). Los cítricos injertados sobre limón Rugoso o citrange Carrizo presentan elementos vasculares más abundantes y de mayor tamaño que los árboles injertados en naranjo amargo o mandarina Cleopatra (Vasconcellos y Castle 1994). Estos últimos presentan elementos vasculares más pequeños y en menor número. La mayor conductancia hidráulica de la raíz de los patrones limón Rugoso y citrange Carrizo (Syvertsen 1981), indican una posible relación entre la anatomía del xilema y la conductancia hidráulica. Respecto a esta relación, Huang y Eissenstat 2000 no encontraron diferencias en el número ni en el diámetro de los vasos del xilema entre raíces fibrosas de naranjo amargo, *P. trifoliata* y citrumelo Swingle y por tanto, la componente axial de la conductancia hidráulica de estos tres patrones también fue similar. Sin embargo, asociaron la mayor conductividad hidráulica de *P. trifoliata* respecto a la de los otros dos patrones, a la menor suberización de la

exodermis y al menor espesor del córtex que disminuyen la resistencia radial al flujo del agua.

También, observaciones en cítricos en condiciones de salinidad sugieren que la absorción de agua y la transpiración podrían depender de la morfología de la planta junto con las características anatómicas de los tejidos del xilema (Moya et al. 1999, 2003). Slatyer (1967) sugirió que la mayor resistencia al flujo hídrico en los cítricos, ejercida por el sistema radicular, es debida a la necesidad que tiene el agua de pasar a través de las membranas celulares de la endodermis, donde la banda de Caspary hace a las paredes celulares impermeables al agua.

También en otras especies se han asociado diferencias en la conductancia hidráulica de la raíz con diferencias en la anatomía de las raíces. Tombesi et al. (2010) han demostrado que diferencias en características anatómicas del xilema entre patrones de melocotonero influyen en su conductancia hidráulica.

5.3. Acuaporinas y su relación con la conductancia hidráulica

La conductancia hidráulica de la planta puede responder directamente a la densidad de flujo evaporativo (E). Esto requiere un mecanismo que regule los cambios de la conductancia hidráulica a nivel celular. En este contexto, las acuaporinas, proteínas trans-membrana, juegan un papel crítico en la regulación del transporte de agua, concretamente en la ruta transcelular del agua (Javot y Maurel 2002), puesto que facilitan el transporte de agua a través de las membranas biológicas (Agré et al. 1997, Maurel 1997) y permiten mantener el contenido de agua en las células y tejidos regulando el flujo de agua en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (Maurel et al. 2008). Se ha demostrado que la actividad de las acuaporinas varía con el momento del día, en respuesta a las variaciones de temperatura o de presión inducida por el flujo de evaporación (Henzler et al. 1999, Tsuda y Tyree 2000), con el desarrollo de raíces (Barrowclough et al. 2000, North y Nobel 2000, Martre et al. 2001, Hukin et al. 2002) y en respuesta a estreses abióticos como estrés hídrico (Martre et al. 2001, Alexandersson et al. 2005), salinidad (Carvajal et al. 1999, Martínez-Ballesta et al.

2000) o déficit nutricional (Carvajal et al. 1996, Clarkson et al. 2000).

Las acuaporinas son proteínas de 26-30 kDa que pertenecen a la superfamilia MIPs (mayor intrinsic proteins). Se encuentran en la membrana plasmática, tonoplasto y otras membranas intercelulares y se expresan abundantemente en las raíces (Javot y Maurel 2002, Tyerman et al. 2002, North et al. 2004, Forrest y Bhave, 2007). En plantas, las acuaporinas, según su localización, se clasifican principalmente en proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIPs) y en proteínas intrínsecas de la membrana plasmática (PIPs) (Maurel 1997), aunque existen otras tres subfamilias, pertenecientes a la superfamilia MIPs, menos estudiadas: Nodulin 26-like membrane intrinsic proteins (NIPs), basic membrane intrinsic proteins (SIPs) (Johanson et al. 2001, Zardoya 2005) o la subfamilia XIPs no caracterizada (Danielson y Johanson 2008, Gupta y Sankararamakrishnan 2009).

La subfamilia PIPs se divide, basándose en homología de secuencias, en dos grupos evolutivos (PIP1 y PIP2) (Kammerloher et al. 1994) presentando, cada grupo varias isoformas (e.g., PIP1;1) (Kammerloher et al 1994, Daniels et al. 1994, Weig et al. 1997). En lo referente al transporte del agua a través de la planta existen evidencias de que, entre las acuaporinas, la subfamilia PIPs juega un papel más importante que el resto de subfamilias en el control de este transporte debido a que la membrana plasmática es generalmente mucho menos permeable al agua que el resto de membranas (Javot y Maurel 2002). Además, las acuaporinas muestran especificidad de expresión en tejidos y órganos (Tyerman et al. 2002), pero su papel en raíces y tallos es más importante en la regulación de las relaciones hídricas, que en otras zonas de la planta (Smart et al. 2001, Luu y Maurel 2005).

Estudios realizados en sistemas radiculares completos o en partes aisladas del sistema radical indican que entre el 60% y el 80% del valor de la conductancia hidráulica de las raíces se debe a la actividad de las acuaporinas (Maggio y Joly 1995, Wan y Zwiazek 1999, Barrowclough et al. 2000, Martre et al. 2001). La represión de la expresión de acuaporinas se asocia con descensos en la conductancia hidráulica de los órganos de la planta (Henzler et al. 1999, Clarkson

et al. 2000, North et al. 2004). Además, las acuaporinas pueden ser bloqueadas por iones de mercurio, resultando en un descenso de la permeabilidad al agua de las membranas y por tanto de la conductancia hidráulica (Maggio y Joly 1995 Martínez-Ballesta et al. 2003).

5.4. Conductancia hidráulica y estreses abióticos

5.4.1. Conductancia hidráulica y estrés hídrico

Según diversos autores, en cítricos, la tolerancia a sequía proporcionada por el sistema radical puede estar relacionada con su arquitectura o con su conductancia hidráulica (Kriedmann y Barrs 1981, Syvertsen y Graham 1985, Syvertsen y Lloyd 1994). Estas características son importantes para que la planta extraiga más agua del suelo, manteniendo alto el potencial hídrico de la copa, mayor turgencia celular y consecuentemente mayor eficiencia fotosintética.

Poseer una alta conductancia hidráulica en las raíces favorece la absorción de agua, como también puede aumentar el flujo de minerales en los cítricos, incrementando positivamente el vigor de las plantas (Spiegel-Roy y Goldschmidt 1996). Sin embargo, la mayor conductancia hidráulica puede no ser tan ventajosa, pues en ciertas condiciones, una mayor extracción de agua puede someter más rápido a los cítricos a un déficit hídrico (Syvertsen y Graham 1985).

Durante el estrés hídrico severo, la anatomía de la raíz puede cambiar induciendo barreras en el apoplasto a través de la lignificación y suberización de las paredes celulares y consecuentemente disminuir la conductancia hidráulica. Esta es una estrategia útil para la supervivencia en condiciones extremas, evitando la pérdida de agua y de iones hacia el suelo y permitiendo una recuperación más rápida de la planta (North y Nobel 1995, Zimmermann et al. 2000). Ramos y Kaufmann (1979) observaron que el estrés hídrico redujo en un 50% la conductividad hidráulica de las raíces de limón Rugoso. Esa mayor resistencia fue atribuida a una mayor suberización de las paredes de las células del córtex y/o al descenso de la permeabilidad de las membranas.

En este contexto, se ha demostrado que en muchas especies vegetales, la conductancia hidráulica de las raíces disminuye considerablemente en condiciones de déficit hídrico (Sumner y Boswell 1981, Cruz et al. 1992, North y Nobel 1996, Lo Gullo et al. 1998 Martre et al. 2001, North et al. 2004). Esta reducción puede estar asociada con modificaciones anatómicas, tales como una mayor suberización de la exodermis o endodermis (Enstone y Peterson 1998, North y Nobel 2000) o con una reducción en la actividad de las acuaporinas (Martre et al. 2001, Siefritz et al. 2002, North et al. 2004). La reducción de la conductancia hidráulica debida a la menor actividad de las acuaporinas en respuesta a estrés hídrico puede ser revertida cuando se recupera el potencial hídrico del suelo (North y Nobel 2000, Martre et al. 2001). Sin embargo, los estudios que relacionan la expresión de acuaporinas con el estrés hídrico presentan resultados diversos. Algunos estudios indican que la expresión de PIPs se reduce en raíces durante estrés hídrico (Smart et al. 2001, Suga et al. 2002), otros que no cambia (Morillon y Lassalles 2002, Galmés et al. 2007) y otros que se incrementa (Kirch et al. 2000, Galmés et al. 2007).

5.4.2 Conductancia hidráulica y salinidad

Se ha demostrado que plantas sometidas a elevados niveles de NaCl reducen la conductancia hidráulica de las raíces de maíz (*Zea mays* L.) (Azaizeh y Steudle 1991), *Capsicum annuum* L. (cv. Albar) (Carvajal et al. 1999), melón (*Cucumis melo* L.) (Martínez-Ballesta et al. 2000) y soja (*Glycine max* (L.) Merr. var Harosoy) (Joly 1989). Sin embargo, en cebada (*Hordeum vulgare* L.) que es tolerante a la salinidad no se detectaron reducciones en la conductancia hidráulica en condiciones de salinidad (Munns y Passioura 1984).

En cítricos, la reducción de la capacidad de absorción de agua en condiciones de salinidad ha sido relacionada con un descenso de la conductividad hidráulica de la raíz en naranjo amargo, mandarino Cleopatra, citrumelo Swingle, citrange Carrizo, limón rugoso, limón Milam y *P. trifoliata* (Zekri y Parsons 1989). Los resultados de Syvertsen y Yelenosky (1988) en plantas de un año de naranjo dulce

“Pineapple”, mandarina Cleopatra y *P. trifoliata* mostraron que el estrés salino redujo tanto la conductividad hidráulica de las raíces como la transpiración. También Zekri (1991) observó que la conductividad hidráulica de las raíces y la transpiración se redujeron, en condiciones de salinidad, de manera similar en plantas de naranjo amargo y en mandarina Cleopatra y que además existió una relación lineal positiva entre la conductividad hidráulica y la conductancia estomática.

Algunos autores han atribuido la reducción de la conductancia hidráulica en condiciones de salinidad a la reducción de la actividad o niveles de expresión de acuaporinas en estas condiciones (Carvajal et al. 1999, 2000, Martínez-Ballesta et al. 2000). Yamada et al. (1995) han descrito alteraciones en los niveles de expresión de acuaporinas en *Mesembryanthemum crystallinum* L. en condiciones de salinidad. En *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. la reducción de la conductancia hidráulica en condiciones de salinidad ha sido atribuida a una represión de la expresión de acuaporinas (Martínez-Ballesta 2003). También Boursiac et al (2005) observaron una represión en la expresión de genes de PIP en *Arabidopsis* proponiendo que esta represión es la causa de la reducción de la conductancia hidráulica. Sin embargo, la represión de acuaporinas en condiciones de salinidad no ha sido demostrada en rábano (*Raphanus sativus* L. cv Tokinashi-daikon) (Suga et al. 2002) ni en *Festuca rubra* ssp. litoralis) (Diedhiou et al. 2009).

5.4.3. Conductancia hidráulica y encharcamiento

La reducción del flujo de agua en condiciones de encharcamiento parece ser debida a la reducción de la conductancia hidráulica de la raíz (Birner y Steudle 1993, Ehlert et al. 2009). Esta reducción ha sido asociado con el cierre estomático en condiciones de encharcamiento en peral (Andersen 1984), arándano (Davies y Flore 1986), ricino (Else et al. 2001), tomate (Else et al. 1995) y cítricos (Syvertsen et al. 1983).

Por otra parte, según diversos autores, la reducción de la conductancia hidráulica de la raíz en plantas encharcadas podría ser el resultado del descenso

de la actividad de las acuaporinas, que está regulada por el pH citosólico, el cual se incrementa, durante el estrés por anoxia (Tournaire-Roux et al. 2003). En relación con el pH, también ha sido observado que el pH del fluido del xilema de algunas especies de plantas se ve alterado cuando se exponen a estreses ambientales (Wilkinson 1999). Algunos estudios han detectado incrementos del pH de la savia del xilema en tomate en suelos encharcados (Else et al. 2006; Jackson et al. 2003). Coincidiendo con esto, las plantas de tomate encharcadas mostraron una reducción de la conductancia estomática que podría no estar completamente atribuida a un incremento del ABA foliar (Else et al. 1996).

En cítricos, Syvertsen et al. (1983), demostraron que plantas de limón Rugoso sometidas a encharcamiento redujeron la conductancia hidráulica, lo cual se asoció con una reducción tanto de la conductancia estomática como del crecimiento de la parte aérea.

OBJETIVOS

Objetivo 1: Determinar si las características hidráulicas de la planta afectan a la transpiración en los cítricos.

Objetivo 2: Estudiar como los siguientes factores: anatomía de la raíz, expresión de las acuaporinas y pH, influyen en la conductancia hidráulica de la raíz.

Objetivo 3: Determinar la influencia de la conductancia hidráulica en la respuesta de los cítricos a estreses abióticos, concretamente:

- En condiciones de estrés hídrico: Estudiar si la conductancia hidráulica está implicada en la respuesta de la planta y en la tolerancia de distintos patrones frente a este estrés.
- En condiciones de salinidad: Evaluar si la conductancia hidráulica está relacionada con la capacidad de exclusión de iones cloruro de las hojas así como con la tolerancia a estrés salino por distintos patrones de cítricos.
- En condiciones de asfixia: Determinar si la conductancia hidráulica determina parte de la respuesta de la planta a dicho estrés.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

El material vegetal de los diferentes estudios de la presente memoria fueron plantas de *Poncirus trifoliata* (PT), mandarino Cleopatra (MC) y citrange Carrizo (CC) y los híbridos, mandarino Cleopatra x *P. trifoliata*, Forner-Alcaide 5 (FA-5), Forner-Alcaide 13 (FA-13) y 030115, obtenidos en el programa de mejora de patrones del IVIA.

Los ensayos con plantas sin injertar, se realizaron cuando éstas tenían entre nueve y diez meses.

Las semillas de PT, MC y CC se obtuvieron de plantas madre de la colección del banco de germoplasma del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y las de los híbridos FA-5 y FA-13 a partir de las plantas madre de la colección de patrones del IVIA. Las semillas se sembraron en bandejas de 50x40 cm con una mezcla de turba y arena silíceas (3:2 v:v) en un invernadero antiáfidos para su crecimiento en el que, mediante un sistema cooling, se mantuvo la temperatura entre 24 y 28 °C durante las horas del día y entre 15 y 18 °C en la noche y una humedad relativa del 80 %. El invernadero tenía luz suplementaria para extender el fotoperiodo a 16 h. Cuando las plantas tuvieron tres meses se trasplantaron a macetas de 1 l con arena silíceas y se regaron cada 3 días con la siguiente solución nutritiva: 3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 3 mM KNO_3 , 2 mM MgSO_4 , 2.3 mM H_3PO_4 , 17.9 mM Fe-EDDHA y los micronutrientes descritos por Hoagland y Arnon (1950).

El híbrido 030115, puesto que es monoembrionario no puede ser propagado por semilla, por lo que su propagación se realizó *in vitro*. Para esta propagación se tomaron brotes jóvenes apicales de la planta madre y se sometieron a un proceso de esterilización en cabina de flujo laminar. El material fue prelavado con alcohol, desinfectado con una solución de hipoclorito sódico (0.425% de cloro activo) durante 10-12 minutos, y seguido por tres lavados con agua destilada estéril de 5, 10 y 15 minutos de duración. Después del proceso de esterilización, los brotes se transfirieron a tubos con un medio nutriente DKW (Driver y Kuniyuki 1984). Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas a temperatura de 22-24 °C y a

un fotoperiodo de 16 h luz:8 h oscuridad. En la fase de multiplicación, los brotes fueron transferidos cada dos semanas a un nuevo medio DKW, pero con 0.5 mg/l de benciladenina y 0.01 mg/l de ácido indolbutírico adicionales para promover la elongación de los brotes y se mantuvieron en la cámara de crecimiento hasta que alcanzaron una longitud de 6-8 cm. Los brotes elongados de buena calidad se cortaron por su base y se transfirieron a un sustrato compuesto de turba y perlita y a condiciones de elevada humedad en túneles de aclimatación dentro del invernadero para promover el enraizamiento y favorecer la aclimatación de las plantas. En estas condiciones las plantas desarrollaron un sistema radicular en 19-20 días. Después de esto, se trasplantaron a macetas con una mezcla de turba y arena silíceas (3:2 v:v) y fueron transferidas al invernadero citado anteriormente.

En los ensayos realizados con planta injertada se utilizaron plantas de 15 meses de la variedad Valencia Late injertadas sobre los patrones PT, MC, FA-5, FA-13 y 030115. La variedad se injertó sobre los patrones cuando éstos tenían 6 meses.

Durante el periodo experimental, las plantas permanecieron en el mismo invernadero y se regaron con la solución nutritiva citada anteriormente.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los seis estudios incluidos en la presente tesis se desarrollaron entre marzo de 2008 y marzo de 2011 en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (39.28 N-0.22 O), Valencia, España.

2.1 Influencia de la conductancia hidráulica en la transpiración

El **Estudio 1** tuvo como objetivo determinar la relación existente en cítricos entre conductancia hidráulica y transpiración. Para ello, se utilizaron plantas de nueve meses de *P. trifoliata* (PT) y mandarino Cleopatra (MC) puesto que *P. trifoliata* presenta mayor tasa de transpiración y conductancia hidráulica que MC. De cada genotipo, se seleccionaron quince plantas con distinto grado de desarrollo. Las plantas de MC seleccionadas tenían entre 17 y 77 hojas. Las plantas de PT tenían entre 15 y 80 hojas.

Durante el periodo experimental, las plantas estuvieron en macetas individuales de 1 l con arena silíceas. La dosis de riego, previa al experimento fue 0,5 l de solución nutritiva tres veces por semana. El exceso de solución drenaba fuera de la maceta, impidiendo, de este modo, la acumulación de sales en la arena.

El experimento tuvo una duración de cinco días. De cada planta del experimento se determinó:

- **La transpiración diaria de la planta completa (T_p)**, de forma gravimétrica. La pérdida de peso de cada maceta se determinó tres días soleados consecutivos. Para ello, cada día las plantas se regaron hasta saturar el sustrato de agua. La media de las tres determinaciones fue considerada representativa de cada planta individual.
- **La transpiración instantánea por unidad de área foliar (E)** que se midió los mismos días en que se determinó T_p .
- **La conductancia hidráulica del sistema radical (K_r)**, la conductancia

hidráulica de la parte aérea (Ka) y la conductancia hidráulica de la planta completa (Kp). Estos parámetros se determinaron durante el cuarto y quinto día del experimento.

- **La biomasa de los distintos órganos de la planta.** Posteriormente a la realización de las medida de conductancia hidráulica, las plantas se separaron en raíz, tallo y hojas. Las diferentes fracciones de la planta se secaron a 60 ° C durante 48 horas y se pesaron.

Las plantas se distribuyeron al azar sobre el área experimental y fueron analizadas individualmente. Una fila de plantas, no incluida en el experimento, se puso alrededor del perímetro como fila guarda.

2.2. Influencia de las características hidráulicas del patrón en la transpiración y su relación con la anatomía de la raíz

El **Estudio 2** tuvo como objetivo determinar cómo las características hidráulicas del patrón pueden afectar a la transpiración y si estas características hidráulicas pueden estar relacionadas con la anatomía de la raíz

El material vegetal utilizado fue: (1) plantas sin injertar de nueve meses de edad de los patrones de cítricos: mandarino Cleopatra (MC), *P. trifoliata* (PT) y su híbridos Forner-Alcaide 5 (FA-5) y Forner-Alcaide 13 (FA-13) y (2) plantas de 15 meses de la variedad Valencia Late injertadas en estos cuatro patrones (V/MC, V/PT, V/FA-5 y V/FA-13). Estos patrones se seleccionaron para este trabajo basándonos en estudios previos (Forner et al. 2003, Forner-Giner et al. 2003, 2009) que demuestran diferencias en el comportamiento agronómico de estos patrones.

Durante el periodo experimental, las plantas estuvieron en macetas individuales de 3 l con arena silíceas y se regaron con 1 l de solución nutritiva dos veces por semana. El exceso de solución drenaba fuera de la maceta, impidiendo, de este modo, la acumulación de sales en la arena.

En este estudio se realizaron tres experimentos independientes:

a) Relación entre conductancia hidráulica y transpiración. De cada tipo de planta, se seleccionaron seis plantas uniformes de aproximadamente 50 cm de altura y con 40-50 hojas. En cada una de las seis plantas sin injertar de cada patrón y en cada una de las seis combinaciones injerto-patrón se determinó:

- **La transpiración por unidad de área foliar (E).** La determinación de E se realizó 4 días diferentes.
- **La conductancia hidráulica de la raíz (Kr).** Los valores de Kr determinados se normalizaron dividiendo Kr entre el peso seco total de la raíz para obtener la conductancia hidráulica específica por unidad de biomasa radicular (Kr).
- **La biomasa de las plantas.** Posteriormente a la medida de Kr, las diferentes fracciones de la planta se secaron a 60 °C durante 48 horas y se pesaron.

b) Relación entre la biomasa foliar y la transpiración de la planta completa. Para cada combinación injerto-patrón, se seleccionaron plantas con diferente número de hojas (entre 10 y 50 hojas). Se determinó Tp en al menos doce plantas. Tp se determinó cuatro días diferentes en periodos de ocho horas. Después de la última medida de Tp, las diferentes fracciones de la planta se secaron a 60 °C durante 48 horas y se pesaron.

c) Estudio histológico. En seis plantas de cada uno de los cuatro patrones, se realizó un estudio histológico, mediante tinción con azul de toluidina (CI 52040, Merck, Darmstadt, Germany), en muestras de raíces fibrosas (a 4-6 mm de distancia del ápice de la raíz), en raíces pionner (a 10-20 mm de distancia del ápice de la raíz) y en muestras de madera de la base del tallo y raíz principal (20-25 mm por encima o debajo de la zona de unión entre tallo y raíz). De cada planta se tomaron dos muestras de tejido por planta y órgano. La media de los valores

medidos en tres campos visuales de tres secciones de cada muestra se consideró representativa de cada patrón para cada tipo de muestra.

En los tres experimentos, las plantas se distribuyeron al azar sobre el área experimental y fueron analizadas individualmente. Una fila de plantas, no incluida en el experimento, se puso alrededor del perímetro como fila guarda.

2.3. Influencia de la conductancia hidráulica en la respuesta de los cítricos a estreses abióticos

2.3.1 Estrés hídrico

En condiciones de estrés hídrico se realizaron dos experimentos diferentes. El **Estudio 3** evaluó como la conductancia hidráulica, pH de la savia y niveles ABA se ven afectados en estas condiciones y cómo pueden inducir al cierre estomático. Para ello se utilizó el patrón citrange Carrizo puesto que es el patrón utilizado mayoritariamente en España y además ha sido ampliamente utilizado como planta modelo de cítricos en muchos trabajos de investigación. El **Estudio 4** evaluó concretamente la influencia de las características hidráulicas del patrón en la respuesta de la planta a estrés hídrico, así como la relación de la conductancia hidráulica de éstos con la expresión de acuaporinas en raíces finas. Para ello, se utilizaron tres patrones diferentes (mandarino Cleopatra, *P. trifoliata* y el híbrido [mandarino Cleopatra x *P. trifoliata*] 030115 injertados todos ellos con la variedad Valencia Late.

En el **Estudio 3**, se utilizaron plantas de diez meses de citrange Carrizo (CC). Durante el experimento, las plantas estuvieron individualmente en macetas de 1 l con arena sílicea. Las plantas se regaron cada dos días hasta el inicio del experimento con aproximadamente 0.2 l de solución nutritiva por maceta. El exceso de solución drenaba fuera de la maceta evitando la acumulación de sales.

En este estudio se realizaron dos experimentos independientes:

a) Respuesta fisiológica frente a estrés hídrico. Se seleccionaron plantas de tamaño uniforme que no presentaban ramificaciones. Se aplicaron tres tratamientos diferentes.

- 1) **C:** plantas control con riego normal (cada dos días) con la solución estándar.
- 2) **EH +NF:** plantas sometidas a estrés hídrico suprimiendo el riego después de la aplicación de 1 mM de norfluorazona (NF) (inhibidor de la síntesis de ABA) en la solución nutritiva al principio del experimento.
- 3) **EH -NF:** plantas sometidas a estrés hídrico con la supresión del riego.

El día inicial del experimento, los tres grupos se regaron con 0.2 l de solución nutritiva. En este riego, a la solución nutritiva utilizada para el tratamiento EH +NF se le añadió norfluorazona y a partir de este día, las plantas de los tratamientos 2 y 3 dejaron de regarse.

Este experimento tuvo una duración de 9 días y se determinó:

- **El pH la savia del xilema** cada día del experimento en seis plantas independientes por tratamiento y fecha de muestreo.
- **La conductancia estomática (gs) y la transpiración (E)**, cada tres días en seis plantas por tratamiento y fecha de muestreo.
- **El potencial hídrico (Ψ_w), el potencial osmótico (Ψ_o), el potencial de turgencia (Ψ_p) y contenido relativo de agua (RWC).** Estos parámetros se midieron, cada tres días, en seis plantas independientes por tratamiento y fecha de muestreo.
- **La conductancia hidráulica de la raíz (Kr)**, cada tres días. La Kr, para cada fecha de muestreo, se obtuvo a partir de la media de las medidas realizadas en seis plantas independientes por tratamiento y fecha de muestreo. Los valores de Kr fueron normalizados dividiéndolos entre el peso seco total del sistema radical para obtener Kr.
- **El contenido de ABA en raíces, hojas y savia del xilema**, cada tres días. De

cada parámetro se realizaron tres determinaciones por tratamiento y fecha de muestreo en plantas independientes.

Las plantas se distribuyeron al azar sobre el área experimental y fueron analizadas individualmente. Una fila de plantas, no incluida en el experimento, se puso alrededor del perímetro como fila guarda.

b) Efecto del pH y del ABA en la conductancia estomática. En esta segunda parte del estudio, se determinó el efecto del pH y del ABA en la conductancia estomática de hojas arrancadas. Para esto, hojas completamente expandidas de seis plantas diferentes con 40-50 hojas se introdujeron en vasos con tampones a diferente pH y con o sin la adición de ABA [(±)-abscisic acid. Sigma-Aldrich, Madrid, Spain].

Los cuatro tratamientos fueron:

- 1) tampón de Fosfato Potásico, pH 6.4
- 2) tampón de Fosfato Potásico, pH 6.4 + 0.2 ppm ABA
- 3) tampón de Fosfato Potásico, pH 7.1
- 4) tampón de Fosfato Potásico, pH 7.1 + 0.2 ppm ABA

Las hojas se arrancaron de la zona media del tallo y se introdujeron inmediatamente en vasos de 100 ml con 20 ml de tampón fosfato potásico ($10 \text{ mol m}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$). Los tampones se ajustaron a los valores de pH 6.4 y 7.1 alterando el ratio de las dos sales de modo que los dos tratamientos fueran iso-osmóticos. Los dos tratamientos se aplicaron solos o con la adición de ABA (0.2 ppm) a ambas soluciones tampón. Las hojas se introdujeron en las soluciones tampón por la zona del pecíolo a una profundidad de aproximadamente 2 cm y permanecieron en una cámara de cultivo (Sanyo MCR-350 H, Sanyo Electric Biochemical Co., Japan) con una densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 28 °C y 80 % de HR.

La conductancia estomática (gs) se determinó, en seis hojas por tratamiento,

seis horas después de haber introducido las hojas en las soluciones tampón.

En el **Estudio 4**, para determinar la influencia de las características hidráulicas del patrón en la respuesta de la planta a estrés hídrico, se utilizaron plantas de quince meses de la variedad Valencia Late injertadas en los patrones *P. trifoliata* (PT), mandarino Cleopatra (MC) y 030115.

Durante el experimento las plantas estuvieron en macetas de 3 l con una mezcla de turba y arena silíceas (3:2 v:v). Las plantas presentaban un tamaño homogéneo al inicio del experimento (aproximadamente 45 cm y 40 hojas).

Plantas control de cada patrón se regaron de forma normal [PT(C), MC(C) y 030115(C)] y otro grupo de plantas de cada patrón se regó con riego deficitario [PT(EH), MC(EH) y 030115(EH)]. Las plantas se distribuyeron al azar en el área experimental y estuvieron rodeadas por una fila guarda no incluida en el experimento.

La duración del experimento fue de 70 días y, a su inicio, todas las plantas se regaron con 300 ml de solución nutritiva, suficiente para saturar el sustrato. La dosis de riego de las plantas control fue de 300 ml/semana, suministrados en un único riego. Desde el día 7, las plantas con déficit hídrico se regaron con 50 ml/semana, también en un único riego. Las determinaciones que se realizaron en este estudio se describen a continuación:

- **La transpiración semanal de la planta completa (T_s)**, se midió semanalmente de forma gravimétrica en seis plantas por tipo de planta y tratamiento. La transpiración acumulada de la planta completa a lo largo de todo el experimento (T_{Total}), se calculó mediante la suma de todos los valores de T_s .
- **El potencial hídrico de la hoja (Ψ_w)** se determinó quincenalmente, en seis plantas independientes por genotipo y tratamiento.
- **La tasa neta de asimilación de CO_2 (A_{CO_2}), la transpiración (E), la conductancia estomática (g_s) y concentración subestomática de CO_2 (C_i)** se midieron quincenalmente en seis plantas por patrón y tratamiento.

- **La conductancia hidráulica de la raíz (Kr)** se midió, el día 43 del experimento, en cinco réplicas por tipo de planta y tratamiento.
- **La expresión de acuaporinas en raíces finas**, se determinó el día 43 del experimento. Para ello, seis plantas de cada patrón y tratamiento fueron arrancadas. Las raíces finas de cada planta se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior extracción de RNA.
- **La biomasa de las plantas.** Cuando se completó el experimento (día 70), seis plantas de cada patrón y tratamiento se arrancaron y se separaron en raíz, tallo y hojas. Todas las partes de la planta fueron lavadas y secadas en estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h y pesadas una vez secas. Se determinó el peso seco de la parte aérea (S) (suma del peso seco del tallo y de las hojas) y el ratio S/R donde R es el peso seco de la raíz.
- **El valor SPAD**, relacionado con la concentración de clorofila, se determinó al final del experimento en todas las hojas de las plantas arrancadas con un equipo portátil SPAD (Minolta Co., Osaka, Japón). La media del valor SPAD de todas las hojas de cada planta, se consideró representativo de cada planta individual.

2.3.2. Salinidad

En el **Estudio 5**, se evaluó la influencia de la conductancia hidráulica de la raíz en la respuesta de los cítricos a salinidad, así como su relación con la expresión de acuaporinas y con la acumulación de Cl^- en hojas.

Se utilizaron plantas de diez meses de mandarino Cleopatra (MC), citrange Carrizo (CC) y *P. trifoliata* (PT). Estos genotipos fueron seleccionados en base a otros estudios, ya que PT presenta mayor transpiración y conductividad hidráulica que MC, mientras que el comportamiento es intermedio en CC (Zekri y Parsons 1989). Además, estas plantas difieren en su tolerancia a la salinidad, ya que PT y CC son considerados como patrones sensibles mientras que MC es relativamente un patrón tolerante debido a su posibilidad de excluir iones Cl^- de las hojas

(Walker et al. 1983).

Durante el experimento, las plantas estuvieron en macetas individuales de 3 l con arena silíceas. Las plantas se regaron cada 3 días hasta el inicio del experimento con aproximadamente 0.5 l de solución nutritiva por maceta en cada riego. El exceso de solución drenaba fuera de la maceta evitando la acumulación de sal en la arena.

Al inicio de los experimentos, se seleccionaron plantas de tamaño uniforme y sin ramificaciones. Se realizaron dos experimentos independientes como se explica a continuación:

a) 30 días con la adición de 80 mM de NaCl a la solución nutritiva: Plantas de MC, CC y PT se regaron cada tres días con 300 ml de la solución estándar a la que se le añadió 0 (control) u 80 mM de NaCl, durante 30 días. Al finalizar el experimento se realizaron las siguientes determinaciones y estudios:

- **La transpiración por unidad de área foliar (E)** se midió en seis plantas independientes por genotipo y tratamiento.
- **La conductancia hidráulica de la raíz (Kr)** se midió en seis plantas independientes por genotipo y tratamiento. Los valores de Kr fueron normalizados dividiéndolos entre el peso seco total del sistema radical para obtener la conductancia hidráulica específica de la raíz por unidad de biomasa (*Kr*).
- **El contenido de Cl⁻ en hojas** se determinó en seis plantas independientes por genotipo y tratamiento.
- **La expresión de acuaporinas.** Para ello, tres plantas por cada patrón y tratamiento fueron arrancadas. Las raíces finas de estas plantas se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C para la posterior extracción de RNA.
- Se realizó un **estudio histológico de la epidermis e hipodermis** de las raíces de CC. Se tomaron muestras de raíces tanto de plantas control como de plantas tratadas 30 días con la solución nutritiva 80 mM de NaCl. Se realizaron dos tipos de tinción: (1) tinción con toluidine blue que tiñe la

lignina y (2) tinción con Sudan Red 7B para visualizar los depósitos de suberina. Para cada tinción se tomaron tres muestras de raíces finas a 5-6 mm del ápice de la raíz en seis plantas independientes por tratamiento.

b) 14 días con la adición de 200 mM de NaCl y 0.05 mM de HgCl₂. En este experimento se utilizó HgCl₂ por su capacidad de bloquear el poro de las acuaporinas. Cuatro grupos de plantas de CC se regaron con diferentes tratamientos durante 14 días. La dosis de riego fue de 300 ml cada tres días. Los tratamientos aplicados fueron:

- 1) solución estándar (plantas control)
- 2) solución estándar + 0.05 mM HgCl₂
- 3) solución estándar + 200 mM NaCl
- 4) solución estándar + 200 mM NaCl + 0.05 mM HgCl₂.

Al final del experimento se determinó:

- **La transpiración por unidad de área foliar (E)** en seis plantas independientes por tratamiento.
- **La conductancia hidráulica de la raíz (Kr)** en seis plantas independientes por tratamiento. Los valores de Kr fueron normalizados dividiéndolos entre el peso seco total del sistema radical para obtener *Kr*.
- **El contenido de Cl⁻ en hojas** en seis plantas independientes por tratamiento.
- **La expresión de acuaporinas.** Para ello, se arrancaron tres plantas por cada patrón y tratamiento. Las raíces finas de estas plantas se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C para la posterior extracción de RNA.

En ambos experimentos, las plantas se distribuyeron al azar sobre el área experimental y fueron analizadas individualmente. Una fila de plantas, no incluida en el experimento, se utilizó como fila guarda.

2.3.3. Asfixia

El **Estudio 6** evaluó la relación entre la conductancia hidráulica de la raíz y la respuesta de la planta a asfixia. Este experimento se realizó con plantas de diez meses de edad de citrange Carrizo (CC).

Las plantas estuvieron en macetas individuales de 4 l con arena silíceas. Previo al experimento, cada planta se regó dos veces por semana con un litro de solución nutritiva. El exceso de solución drenaba fuera de la maceta, impidiendo, de este modo, la acumulación de sales en la arena.

Se realizaron tres experimentos independientes:

a) Evaluación de las respuestas fisiológicas al encharcamiento. Se seleccionaron plantas de tamaño homogéneo que no presentaban ramificaciones. Las plantas se dividieron en cuatro grupos para aplicar cuatro tratamientos diferentes. Previamente al encharcamiento, la mitad de las plantas se defoliaron retirando diez hojas adultas de la parte baja del tallo y dejando la parte superior de la planta con hojas. Después de defoliar las plantas, se esperó dos días antes de iniciar el encharcamiento para permitir la recuperación de los posibles daños causados por la eliminación de hojas. Los tratamientos aplicados en este experimento fueron:

- 1) plantas control
- 2) plantas defoliadas sin encharcar
- 3) plantas encharcadas
- 4) plantas defoliadas encharcadas

Las plantas control y las plantas defoliadas sin encharcar se regaron normalmente y con buen drenaje (como se indicó anteriormente). Las plantas encharcadas se mantuvieron continuamente con el sustrato encharcado, para lo cual las macetas se introdujeron en contenedores de plástico con el nivel de la solución nutritiva a 2 cm por encima de la superficie del suelo. Cuando era necesario, se añadía más solución nutritiva para mantener el nivel de agua. La superficie del contenedor se cubrió con una lámina opaca de plástico para impedir

la proliferación de algas. Las plantas se distribuyeron al azar sobre el área experimental y se analizaron individualmente. Una fila de plantas, no incluida en el experimento, se puso alrededor del perímetro experimental. El experimento tuvo una duración de 35 días.

En las plantas sin defoliar, encharcadas y sin encharcar (tratamientos 1 y 3), se determinó:

- Una vez por semana:
 - **La conductancia estomática (gs) y la tasa de transpiración (E)**, en seis plantas independientes por tratamiento.
 - **El potencial hídrico total (Ψ_w), el potencial osmótico (Ψ_o) el contenido relativo de agua (RWC)** en seis plantas independientes por fecha de muestreo y tratamiento.
 - **La conductancia hidráulica de la raíz (Kr)** en seis plantas independientes por tratamiento y fecha de muestreo. Los valores de Kr se normalizaron dividiéndolos entre el área foliar total de la planta obteniéndose la conductancia hidráulica de la raíz específica por unidad de área foliar (KI).
 - **El pH de la savia del xilema** en seis plantas independientes por fecha de muestreo y tratamiento.
 - **El contenido de ABA en hojas adultas.** Para esto, se tomaron muestras de diez hojas de tres plantas independientes para cada fecha de muestreo y tratamiento.

- 15 y 35 días después del inicio del tratamiento:
 - **La concentración de ABA en raíces y en la savia del xilema.** Estas determinaciones se realizaron en tres plantas independientes por fecha, tratamiento y tipo de muestra.
 - **La transpiración de la planta completa (Tp).** La pérdida de peso se determinó en tres períodos de ocho horas. Las determinaciones se

realizaron en seis réplicas por tratamiento y el valor medio de tres días se consideró representativo de cada planta individual.

- **El transporte apoplástico** en seis plantas independientes por tratamiento.
- Al final del experimento:
- **La expresión de acuaporinas.** Para ello, se realizaron tres extracciones de RNA de raíces finas de tres plantas independientes por tratamiento para su posterior hibridación.

En los cuatro tratamientos se determinó:

- Semanalmente, **el contenido de ABA en hojas jóvenes.** Para esto, se utilizaron muestras de diez hojas de tres plantas independientes para cada fecha de muestreo y tratamiento.
- El día 35 del experimento, **la conductancia estomática (gs) en hojas jóvenes** en seis plantas por tratamiento.

b) Efecto del pH de la solución nutritiva en la conductancia estomática y conductancia hidráulica. Se transfirieron plantas de CC a vasos de 0.5 l de manera que el sistema radical quedase inmerso directamente en la solución nutritiva. Se utilizaron soluciones nutritivas con tres pHs diferentes: 6.5, 5.9 y 5.3. El valor del pH de la solución a pH 6.5 fue equivalente al pH medido en la savia del xilema extraída de plantas control. El valor del pH de la solución a pH 5.9 fue equivalente al pH medido en la savia del xilema extraída de plantas encharcadas. Adicionalmente, se añadió una solución a pH 5.3 para comprobar el efecto de la acidificación de la solución nutritiva en la conductancia estomática y en la conductancia hidráulica.

La solución a pH 6.5 (control) y las soluciones a pH 5.9 y 5.3 fueron continuamente aireadas mediante un oxigenador. A la solución a pH 6.5 sin aireación (anoxia), además de no airearla, se le inyectó N₂, para disminuir la

presión parcial de oxígeno. Los diferentes tratamientos que se aplicaron a las plantas fueron los siguientes:

- 1) Solución nutritiva a pH 6.5 y aireada
- 2) Solución nutritiva a pH 5.9 y aireada
- 3) Solución nutritiva a pH 5.3 y aireada
- 4) Solución nutritiva a pH 6.5 sin aireación

Los diferentes pHs de la solución nutritiva se obtuvieron añadiendo 20 mM de ácido propiónico/propionato potásico a la solución nutritiva para obtener soluciones de pH 5.9 y 5.3. A las soluciones nutritivas a pH 6.5 (tanto aireada como sin airear) no se les aplicó ácido propiónico.

Los vasos, con las plantas en su interior, se distribuyeron dentro de una cámara de cultivo (Sanyo MCR-350 H, Sanyo Electric Biochemical Co, Japan) con una densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a 28 °C y 80 % HR.

Se utilizaron seis plantas por tratamiento, en las que se determinó la conductancia hidráulica de la raíz (K_r) y la conductancia estomática (g_s) siete días después del inicio del tratamiento.

c) Efecto del pH en la conductancia estomática. Hojas completamente expandidas se arrancaron de la zona media del tallo de seis plantas intactas e inmediatamente se introdujeron en vasos de 100 ml con 20 ml de tampones ajustados a diferentes pHs. Posteriormente, se midió la conductancia estomática de estas hojas.

Los valores del pH de las soluciones tampón fueron equivalentes a los medidos en la savia del xilema extraído de plantas sin encharcar y de plantas encharcadas (6.5 y 5.9, respectivamente).

Se prepararon dos tampones con sales de fosfato potásico ($10 \text{ mol m}^{-3} \text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) que se ajustaron a los valores de los pHs medidos en la savia del xilema extraído de plantas sin encharcar y de plantas encharcadas (6.5 y 5.9,

respectivamente). Los tampones se ajustaron a los valores de pH alterando la proporción de las dos sales de modo que los dos tratamientos fueran iso-osmóticos.

Las hojas se introdujeron en los tampones por la zona del pecíolo a una profundidad de aproximadamente 2 cm y permanecieron dentro de la misma cámara y en las mismas condiciones ambientales descritas en el experimento anterior. Las medidas de gs se realizaron a las 2, 4, 6, 12 y 24 horas después del inicio del experimento en seis hojas diferentes por tratamiento y momento de medida.

3. METODOLOGÍA

3.1. Conductancia hidráulica

La conductancia hidráulica (K) de las diferentes partes de las plantas se midió con el equipo HPFM (High Pressure Flow Meter) (Dynamax Inc., Houston, TX). El método seguido fue el descrito por Tyree et al. (1995). Para minimizar el posible impacto de la periodicidad diaria en la conductancia hidráulica (Tsuda y Tyree 2000), todas las medidas se realizaron entre las 10:00 y las 12:00 h.

La planta se cortó aproximadamente a 5 cm por encima de la superficie del sustrato y el HPFM se conectó, bien al sistema radical o a la componente aérea por la zona de corte para medir la conductancia hidráulica del sistema radical (K_r) o la conductancia hidráulica de la componente aérea (K_a). Las medidas se realizaron mediante el método de medidas de flujo transitorio. El flujo de agua (F) y la presión aplicada (P) se midió cada 3 s mientras se incrementaba la presión aplicada a una tasa constante de 3-7 kPa s^{-1} . La K se calculó como la pendiente del tramo lineal del gráfico de F vs. P de acuerdo con la ecuación (1):

$$K=dF/dP \quad (1)$$

La conductancia hidráulica de la planta completa (K_p) se calculó a partir de la ecuación (2):

$$1/K_p = 1/K_a + 1/K_r \quad (2)$$

En algunos estudios, los valores de K_r medidos con el HPFM se normalizaron dividiendo K_r entre el peso seco total de la raíz para obtener la conductancia hidráulica de la raíz específica por unidad de biomasa radical (K_r) o bien, entre el área foliar total de la planta para obtener la conductancia hidráulica de la raíz específica por unidad de superficie foliar (K_l).

3.2. Medidas de intercambio gaseoso

La transpiración (E), la tasa neta de asimilación de CO_2 (A_{CO_2}), la conductancia estomática (g_s) y la concentración subestomática de CO_2 (C_i) se midieron con un equipo portátil de fotosíntesis (CIRAS-2) (PP-systems, Hitchin, UK), equipado con una fuente externa de luz para mantener un PAR (radiación fotosintéticamente activa) constante. El PAR en la superficie de la hoja se ajustó a $1000 \mu mol m^{-2} s^{-1}$, el cual excede del valor para el que se satura la tasa neta de asimilación de CO_2 en cítricos. Previamente se realizó una curva de saturación de la fotosíntesis neta en función del PAR. El punto de saturación coincidió con el punto de saturación de A_{CO_2} en cítricos obtenido por otros autores ($900 \mu mol m^{-2} s^{-1}$) (Syvertsen 1984, Iglesias et al. 2002). Para realizar las medidas, la hoja se introdujo en la cámara PLC 6(U) y permaneció a 25 ± 0.5 °C con un déficit de presión de vapor de 1.7 Pa. El flujo de aire a través de la cubeta fue de $0.5 - 1.5 l min^{-1}$.

Para minimizar las variaciones de E , A_{CO_2} , g_s y C_i en la medida de lo posible, estos parámetros se midieron entre las 10:00 y las 12:00 h en días soleados. En cada planta, se midieron en dos hojas completamente expandidas situadas en la zona media del tallo. La media de estas dos medidas se consideró como representativa de cada planta. En las plantas defoliadas del Estudio 6, g_s se determinó en dos hojas jóvenes de cada una de las plantas. La media de estas dos medidas se consideró representativa de cada planta individual.

3.3. Determinación de las relaciones hídricas de la hoja

El potencial hídrico (Ψ_w) se midió entre las 6:30 y las 7:30 h con la cámara de presión Scholander (Soil-moisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA, USA) (Scholander et al. 1965) en dos hojas completamente expandidas de la zona media del tallo. La media de las medidas de dos hojas se consideró como representativa de cada planta individual.

Para determinar el potencial osmótico (Ψ_o), en el mismo momento en que se determinó Ψ_w , se tomaron dos muestras de cada planta (cada muestra compuesta por, al menos, dos hojas). Las muestras se envolvieron en papel de aluminio y se congelaron a -20 °C. Las hojas se descongelaron en el momento de la determinación del Ψ_o , y se extrajo el jugo celular con una jeringuilla del cual se determinó el Ψ_o a 25 ± 1 °C con un osmómetro (Digital Osmometer, Wescor, Logan, UT, USA). La media de las medidas de las dos muestras de cada planta se consideró como representativa de cada planta individual.

El potencial de turgencia (Ψ_p) se calculó como la diferencia entre el Ψ_w y el Ψ_o .

Para la determinación del contenido relativo de agua (RWC), también al alba, se arrancaron otras dos hojas de cada planta y se determinó su peso fresco (PF). Las hojas, por la parte del pecíolo, se introdujeron en un vaso en contacto con agua destilada durante 24 h en oscuridad para que las hojas se hidratasen completamente. Las hojas se secaron con toallas de papel, y fueron repesadas para obtener el peso en turgencia (PT). Después de pesar, se secaron a 80 °C durante 48 h para obtener el peso seco (PS). El contenido relativo de agua de las hojas (RWC) se determinó como $RWC = (PF - PS) \times (PT - PS)^{-1} \times 100$ de acuerdo con Morgan (1984). La media de las medidas de dos hojas de cada planta se consideró como representativa de cada planta individual.

3.4. Transpiración de la planta completa

La transpiración diaria de la planta completa (T_p) se midió de forma gravimétrica. Para ello, las macetas se cubrieron con una lámina de plástico con

un agujero de diámetro similar al del tallo de la planta, a través del que sobresalía la planta. Con este sistema se evitó la evaporación de agua del sustrato y se redujo la posibilidad de que condiciones anaeróbicas afectasen al sistema radical.

En el Estudio 1 la transpiración de cada planta se calculó como la diferencia entre el peso de la maceta regada (después de drenar) y el peso de la maceta antes del riego del siguiente día. En los Estudios 2 y 6, la pérdida de peso de cada maceta se midió en periodos de 8 horas.

En el Estudio 4, para medir la transpiración semanal de cada planta (T_s) las macetas también estuvieron tapadas con una lámina de plástico como se indicó anteriormente. T_s se calculó como la diferencia entre el peso de la maceta regada (y después de drenar) y el peso de la maceta antes de regar de la semana siguiente. La transpiración acumulada de la planta completa a lo largo de todo experimento (T_{Total}), se calculó mediante la suma de todos los valores de T_s .

3.5. Microscopía óptica

En el Estudio 2, las muestras utilizadas fueron raíces finas de 2 mm (a 6 mm y 12-20 mm del ápice de la raíz), y madera de 3x2 mm de la base del tallo y de la raíz principal de los patrones MC, PT, FA-5 y FA-13. En el Estudio 5, se tomaron muestras de raíces finas de CC a 5-6 mm del ápice de la raíz tanto de plantas control como de plantas tratadas 30 días con 80 mM NaCl.

Las muestras fueron fijadas, deshidratadas y embebidas en LR White (London Resin Co., Woking, Surrey, UK) según Tadeo et al. (1997). Se obtuvieron secciones transversales de 1 μ m con un microtomo rotatorio Leica RM2165 (Leica Instruments, Heidelberg, Germany) y fueron tintadas con azul de toluidina (CI 52040, Merck, Darmstadt, Germany) según O'Brien et al. (1964). Los cortes se examinaron y fotografiaron con un microscopio Olympus BX-51 (Olympus Imaging Corp., Tokyo, Japan) provisto de una cámara digital DP-12 y el programa AnalySIS (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany).

3.6 Microscopía de fluorescencia

En el Estudio 5, se tomaron muestras de raíces de CC tanto de plantas control como de plantas tratadas 30 días con 80 mM de NaCl. Las muestras se tiñeron con Sudan Red 7B (Sudan Red 7B. Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) para visualizar los depósitos de suberina. Para ello, se realizaron cortes del material en fresco con una cuchilla. Las secciones se tiñeron a temperatura ambiente durante 2 h con el protocolo descrito por Brundrett et al. (1991). Las secciones se examinaron con una iluminación ultravioleta (330-385 nm de excitación) en microscopía de fluorescencia.

3.7 Extracción de la savia del xilema

Para las posteriores determinaciones de la concentración de ABA en la savia del xilema y del pH de este fluido, la savia del xilema se extrajo de las raíces utilizando la cámara de presión Scholander (Soil-moisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA, USA). Las plantas se cortaron aproximadamente 5 cm por encima de la raíz principal, y todo el sistema radical se introdujo dentro de la cámara cilíndrica dejando la zona del corte sobresalir por el cilindro de la cámara. Un tubo de plástico se conectó a la zona de corte de la planta para recoger el fluido del xilema con una micropipeta. Se aplicó una presión constante de 2 MPa durante 5 minutos (Tudela y Primo-Millo 1992).

3.8 Análisis de ABA

Se tomaron muestras de raíces fibrosas y de hojas. Estas muestras se lavaron, pesaron, congelaron con nitrógeno líquido, liofilizaron y trituraron. Se determinó el peso seco y las muestras se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis. La savia del xilema también se extrajo de raíces como se indicó en el apartado anterior y también se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis.

El proceso para la cuantificación de ABA fue el descrito en Agustí et al. 2007. Las muestras se extrajeron con 80% de etanol y se hizo una purificación adicional con cartuchos de C_{18} Sep-Pak y fase-inversa HPLC. Una fracción del HPLC

conteniendo ABA se metiló y analizó utilizando un cromatógrafo de gases Varian Star 3400 CX acoplado con un espectrómetro de masas Varian Saturn. Las muestras (1 – 2 µl) se inyectaron en modo splitless. La presión de entrada He fue de 85 kPa y la temperatura del inyector, interfase y fuente MS fueron 250, 250 y 200 °C, respectivamente. El ABA se cuantificó basándose en el uso de estándares internos (Gaskin y MacMillan 1991). La base de los picos de ABA estándar y ABA deuterado [2H6] (190 y 194 m/z, respectivamente) se utilizó para la identificación y cuantificación de ABA.

3.9. Medida del pH de la savia del xilema

El pH de la savia del xilema se determinó con un microelectrodo Metrohm modelo 6.02.34.100 (Metrohm AG, Switzerland) conectado a un pH-metro Crison modelo Basic 20 (Crison Instruments SA, Spain).

3.10 Expresión de acuaporinas

Para estudiar los niveles de expresión de acuaporinas, las raíces finas de cada planta se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a –80 °C para la posterior extracción de RNA. Para evitar la influencia del momento del día en la expresión de acuaporinas (Henzler et al. 1999), todas las plantas fueron arrancadas simultáneamente entre las 10:00 am y las 12:00 am.

Las sondas específicas para PIP1 y PIP2 se diseñaron, amplificaron, clonaron y marcaron como se describe a continuación. Después de la hibridación del RNA con las sondas, los niveles de expresión de RNA de PIP1 y PIP2 se cuantificaron utilizando un software estándar.

3.10.1 Clonación de fragmentos específicos para PIP1 y PIP2

Las secuencias disponibles de PIP1 y PIP2 de cítricos en la base de datos del Citrus Functional Genomic Project EST (<http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB>) fueron alineadas para buscar las regiones más conservadas con el fin de diseñar sondas específicas para cada subfamilia. Los detalles sobre los

códigos de identificación de las ESTs (expressed sequence tag), la secuencia de los primers y la longitud de los fragmentos amplificados se muestran en la Tabla 1. La transcripción inversa y la subsiguiente PCR se realizaron utilizando el kit: SuperScript III one-step RT-PCR con Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Renfrewshire, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos amplificados se clonaron en el vector pTZ57R/T (MBI Fermentas) para generar pTZ/PIP-1 y pTZ/PIP-2. Después de la secuenciación, se seleccionaron los plásmidos clonados con polaridad positiva.

Tabla 1. Códigos de identificación de las ESTs, secuencia de los primers y longitud de los fragmentos amplificados para la clonación de *PIP1* y *PIP2*

Subfamilia	Códigos de identificación de las EST	Secuencia de los primers (5'-3')	Longitud de los fragmentos amplificados (bp)
PIP1	aC31502B11EF_c aCL3500Contig1 aCL58Contig7	AGGATTACACGGAGCCACCT TGCTTTGGATTGGACACG	156 bp
PIP2	aCL165Contig1 aCL7831Contig1 aCL102Contig2	TGTGTTTCATGGTTCACCTGG TGAATGGTCCAACCCAGAAG	137 bp

3.10.2. Extracción de RNA

El RNA total se extrajo de las raíces finas de acuerdo con el protocolo descrito por Ancillo et al. (2007). Cinco gramos de material pulverizado con nitrógeno líquido, se resuspendió en 5 ml de fenol saturado con H₂O y 25 µl de 3-mercaptoetanol con un vortex y se incubó durante 5 min a 50 °C. Después de centrifugar, la fase acuosa se extrajo con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v:v). Un volumen de LiCl 6M se añadió a la nueva fase acuosa, y el RNA se dejó precipitar durante una noche a -20 °C. Después de la centrifugación y lavado con etanol 70% (v/v), el RNA se resuspendió en H₂O tratada con dietilpirocarbonato.

3.10.3. Análisis Northern

El RNA total (12 mg por pocillo) se sometió a electroforesis en gel desnaturante de formaldehído-agarosa al 1% (W/v) tras lo cual fue transferido a membranas de nylon (Sambrook et al. 1989). Las membranas (Roche, Basel, Switzerland) se secaron al aire y los ácidos nucleicos se unieron covalentemente a la membrana utilizando UV ($700 \times 100 \text{ J/cm}^2$). Los plásmidos pTZ fueron linearizados con en la enzima de restricción Xba I y usados para sintetizar las ribosondas marcadas con digoxigenina como se describe en Más et al. (1993). Las prehibridaciones e hibridaciones con las ribosondas marcadas con digoxigenina se llevaron a cabo como describe Pallás et al. (1998). La detección por quimioluminiscencia con el reactivo CSPD (Roche, Basel, Switzerland) como sustrato, fue realizada según las recomendaciones del fabricante. Las membranas reveladas con la reacción de quimioluminiscencia fueron expuestas a un film de rayos X durante 15-30 minutos.

3.11. Análisis de cloruros

Al final de los experimentos del estudio de salinidad, se tomaron muestras de hojas (compuestas por diez hojas) de seis plantas diferentes de cada patrón y tratamiento completamente expandidas de la zona media del tallo. Las hojas se lavaron y se pesaron, se secaron en estufa a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h y, una vez secas, se volvieron a pesar. Para el análisis de Cl^- , las hojas se trituraron y la muestra triturada se almacenó a temperatura ambiente. La concentración de cloruro se determinó mediante valoración con electrodo de plata (Gilliam 1971), empleando un clorímetro automático Corning-926 (Corning, Halstead, Essex, UK). Para cada planta, la determinación de cloruros se repitió al menos cinco veces.

3.12. Determinación del transporte apoplástico

Para medir el porcentaje del transporte apoplástico se utilizó el compuesto Light green dye (Light Green SF Yellowish; Aldrich chemical Co. Ltd., Gillingham, Dorset, UK) que se transporta en los tejidos de la planta apoplásticamente pero

no simplásticamente (Epel y Bandurski, 1990). Las plantas fueron inmersas en una solución con este colorante ($253.3 \mu\text{mol l}^{-1}$). Dos horas después de estar inmersas en la solución, las plantas se cortaron por la zona del cuello y las raíces y, todavía inmersas en la solución, se introdujeron en la cámara Scholander donde la presión de la solución que rodeaba las raíces se incrementó a 0.5 MPa. Se recogió la savia del xilema que exudó durante 5 minutos por la zona de corte de la raíz. La concentración de colorante en la savia del xilema se determinó inmediatamente en las muestras utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-40 UV a 630 nm. El porcentaje de transporte apoplástico se calculó a partir de la concentración del colorante en la savia del xilema, considerando que la concentración del colorante de la solución externa era del 100% (Martínez-Ballesta et al. 2003).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los parámetros fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA) y la comparación de medias determinada mediante el método LSD (least significant differences) al 95 % de confianza. También se compararon las rectas de regresión obtenidas en el Estudio 1. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statgraphics Plus ver. 5.1 (Statistical Graphics, Englewood Cliffs, NJ, USA).

RESULTADOS

1. INFLUENCIA DE LA CONDUCTANCIA HIDRÁULICA EN LA TRANSPIRACIÓN

En el **Estudio 1** se analizó la relación entre la conductancia hidráulica de la raíz, la conductancia hidráulica de la componente aérea, biomasa foliar y la transpiración. Para ello se utilizaron plantas sin injertar de los patrones mandarino Cleopatra (MC) y *Poncirus trifoliata* (PT). Los resultados de este estudio se describen a continuación.

Biomasa de las plantas y transpiración

En este experimento existieron diferencias morfológicas entre los dos tipos de planta estudiados (Tabla 2) debidos, en parte, a que MC se caracteriza por tener hojas enteras frente a PT, que presentan hojas trifoliadas y más pequeñas. Ambos genotipos presentaron un desarrollo similar del sistema radical. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en los valores de biomasa foliar siendo 3.65 veces mayor la biomasa foliar de MC que la de PT lo cual dio lugar a un mayor ratio peso de hojas/peso raíz (H/R) en MC que en PT (1.65 y 0.44, respectivamente). A pesar de que MC presentó una mayor biomasa foliar que PT, la transpiración diaria de la planta completa (Tp) fue similar en ambos grupos de plantas.

Tabla 2. Peso seco de hojas (PS Hojas) y de raíces (PS Raíz), ratio peso de hojas/peso de raíz (H/R), transpiración instantánea (E) y transpiración diaria de la planta completa (Tp) en *P. trifoliata* (PT) y mandarino Cleopatra (MC). Para cada parámetro, las medias (n=16) con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

	PS Hojas (g)	PS Raíz (g)	H/R	E mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹	Tp g d ⁻¹
PT	1.55 ± 0.19 b	3.70 ± 0.31 a	0.44 ± 0.05 b	1.65 ± 0.12 a	39.71 ± 1.20 a
MC	5.66 ± 0.68 a	3.68 ± 0.46 a	1.65 ± 0.15 a	0.72 ± 0.24 b	38.07 ± 1.16 a

RESULTADOS

Existió una correlación curvilínea positiva entre la biomasa foliar y la transpiración de la planta completa (Tp) (Fig. 1). Sin embargo, puesto que transpiración instantánea (E) fue 2,29 veces mayor en PT que en MC (Tabla 2), a igualdad de biomasa foliar, las plantas de PT presentaron mayores valores de Tp que las plantas de MC (Fig. 1).

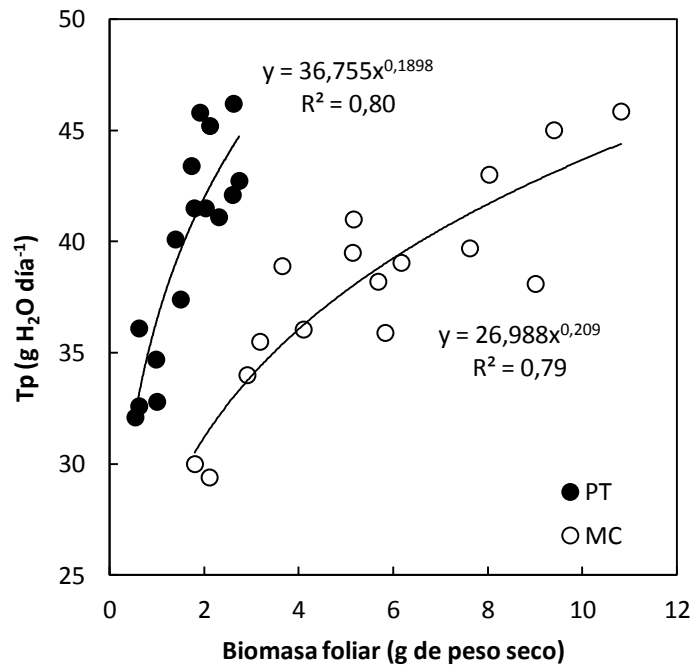


Fig 1. Relación entre la biomasa foliar y la transpiración diaria de la planta completa (Tp) en *P. trifoliata* (PT) y mandarino Cleopatra (MC). Cada punto representa la media de tres medidas de Tp.

Conductancia hidráulica de la raíz, de la componente aérea y de la planta completa

El valor promedio de la conductancia hidráulica de la raíz (Kr) fue significativamente mayor en PT que en MC (Tabla 3). Esto, junto con los resultados mostrados en la Tabla 2, donde se observa un desarrollo similar del

sistema radical de ambos genotipos demuestra la mayor capacidad de transporte de agua de PT a igualdad de biomasa de raíz. Sin embargo, la conductancia hidráulica de la parte aérea (Ka) fue significativamente mayor en MC que en PT.

En PT, Kr fue significativamente mayor que Ka, mientras que en MC no hubo diferencias significativas entre Kr y Ka. En ambos genotipos, la Ka estuvo relacionada linealmente con Kr, sin embargo esta relación fue distinta en ambos patrones. Para un determinado valor de Kr, Ka es mayor en MC que en PT (Fig. 2).

A pesar de las diferencias en Kr y Ka entre PT y MC, la conductancia hidráulica de la planta completa (Kp), calculada mediante la ecuación (1) fue similar en ambos genotipos (Tabla 3).

Tabla 3. Conductancia hidráulica del sistema radicular completo (Kr), conductancia hidráulica de la parte aérea de la planta (Ka) y conductancia hidráulica de la planta completa (Kp) de *P. trifoliata* (PT) y mandarina Cleopatra (MC). Las medias (n=16) con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

	Kr $10^{-7} \times \text{Kg MPa}^{-1} \text{s}^{-1}$	Ka $10^{-7} \times \text{Kg MPa}^{-1} \text{s}^{-1}$	Kp $10^{-7} \times \text{Kg MPa}^{-1} \text{s}^{-1}$
PT	104.03 ± 9.18 a	39.50 ± 3.10 c	28.38 ± 2.23 d
MC	52.87 ± 5.01 b	53.69 ± 4.31 b	26.58 ± 2.31 d

Los valores de conductancia hidráulica del sistema radicular completo (Kr) en PT estuvieron en un rango de $45,50 \cdot 10^{-7}$ – $159,00 \cdot 10^{-7} \text{ Kg MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para raíces con un peso seco comprendido entre 1.69 y 5.67 g. En MC los valores de Kr estuvieron en un rango de $20,20 \cdot 10^{-7}$ – $88,70 \cdot 10^{-7} \text{ Kg MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para raíces entre 0.76 y 7.25 g de peso seco. Kr se incrementó linealmente tanto en PT como en MC con el incremento de biomasa de raíz (Fig. 3) con valores de r^2 de 0,90 para PT y 0,69 para MC. Para una determinada biomasa de raíz, los valores de Kr fueron mayores en PT que en MC.

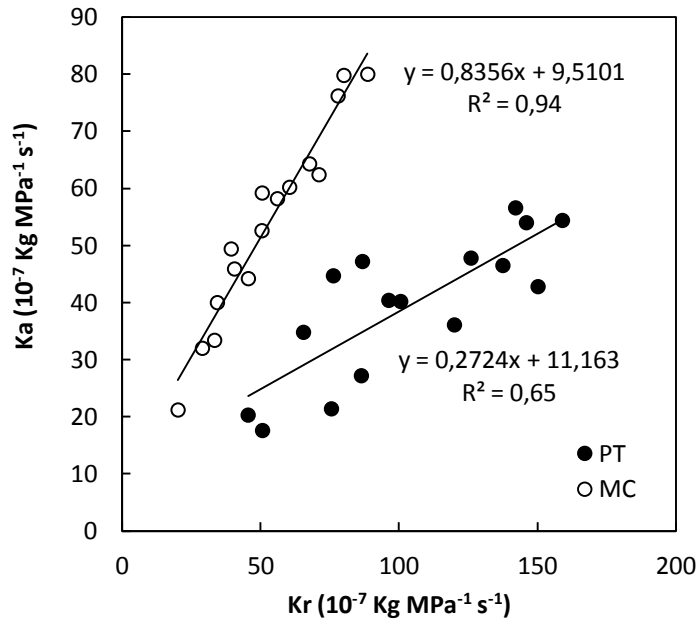


Fig. 2. Relación entre la conductancia hidráulica de la raíz (Kr) y la conductancia hidráulica de la parte aérea (Ka) en *P. trifoliata* (PT) y mandarino Cleopatra (MC).

Las plantas de PT del experimento presentaron un peso seco de hojas comprendido entre 0.54 y 2.74 g de peso seco. Los valores de la conductancia hidráulica de la componente aérea (Ka) de estas plantas estuvieron entre 21.30 10^{-7} y 56.60 10^{-7} Kg MPa⁻¹ s⁻¹. En MC, las plantas con una biomasa foliar de entre 4.99 y 22.63 g de peso seco, los valores de la Ka se encontraron en un rango de 21.21 10^{-7} - 80.00 10^{-7} Kg MPa⁻¹ s⁻¹. La Ka se incrementó de manera curvilínea con el incremento de la biomasa foliar con valores de r^2 de 0,53 para PT y 0,65 para MC. A igualdad de biomasa foliar, la Ka fue mayor en PT (Fig. 4).

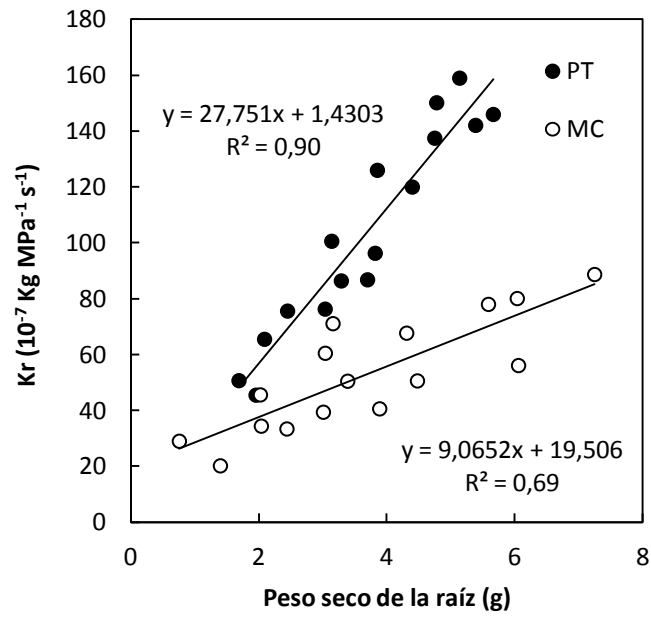


Fig 3. Relación entre la conductancia hidráulica del sistema radicular completo (K_r) y su biomasa en *P. trifoliata* (PT) y mandarino Cleopatra (MC).

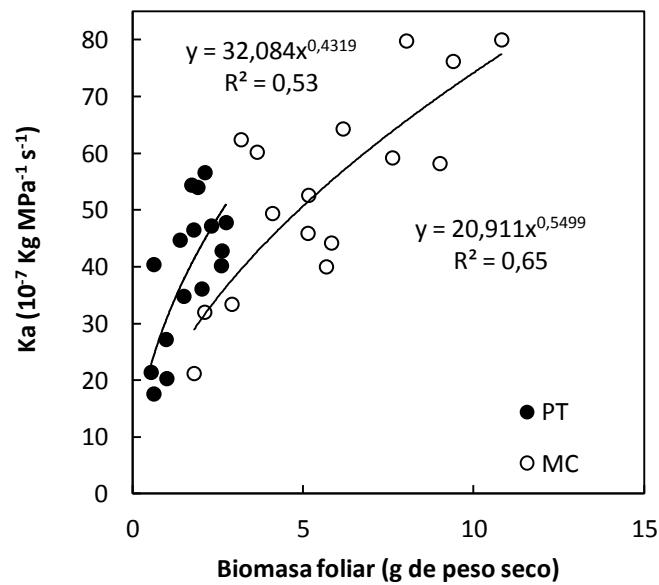
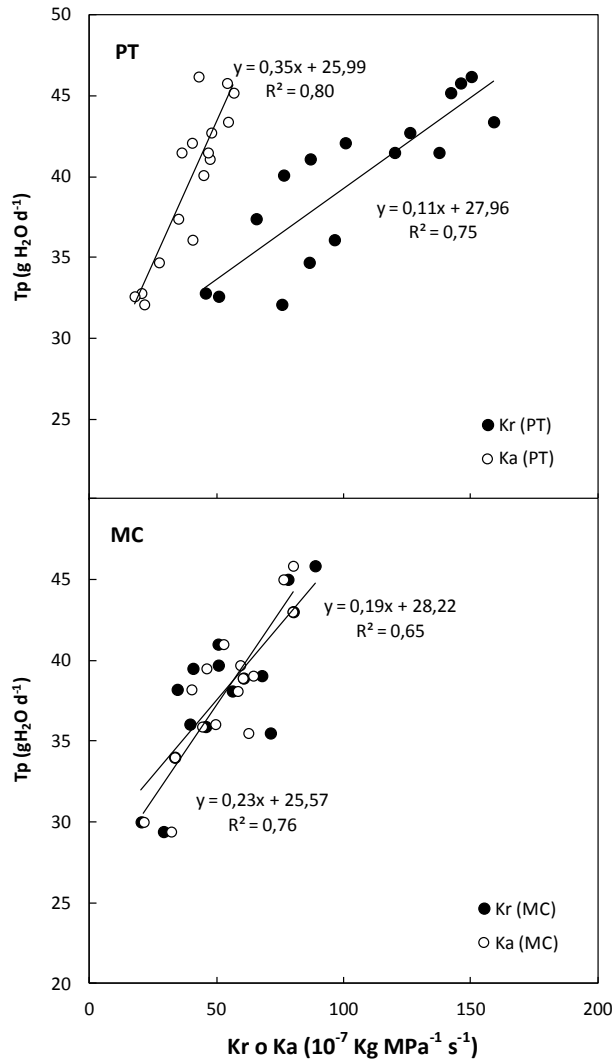


Fig 4. Relación entre la conductancia hidráulica de la componente aérea (K_a) y la biomasa foliar, expresada en g de peso seco, en *P. trifoliata* (PT) y mandarino Cleopatra (MC).

Relación de la transpiración de la planta completa con la conductancia hidráulica de la raíz, de la componente aérea y de la planta completa

La transpiración de la planta completa (T_p) se incrementó linealmente con el aumento de K_r y K_a en ambos genotipos (Fig. 5). En MC, K_r y K_a afectaron de igual manera a T_p (no existieron diferencias ni en la pendiente ni en la ordenada de las rectas de regresión), mientras que en PT, el incremento de T_p fue mayor con el incremento de K_a , que con el de K_r , lo cual puede deberse a una menor limitación de T_p por K_r .

Fig. 5. Relación de la conductancia hidráulica de la raíz (K_r) y de la parte aérea (K_a) con la transpiración diaria de la planta completa (T_p) en *P. trifoliata* (PT) y mandarina Cleopatra (MC). Cada punto representa la media de tres medidas de T_p .



Por otra parte, la conductancia hidráulica de la planta completa (K_p) estuvo linealmente relacionada con T_p . Esta relación es idéntica en ambos genotipos (las pendientes y ordenadas en el origen no difieren significativamente) a pesar de las diferencias morfológicas, fisiológicas e hidráulicas que presentan éstos.

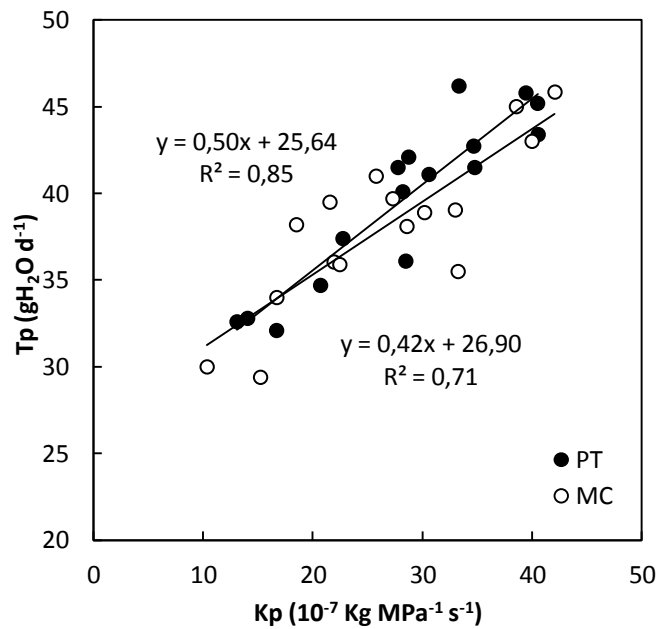


Fig. 6. Relación de la conductancia hidráulica de la planta completa (K_p) con la transpiración diaria de la planta completa (T_p) en *P. trifoliata* (PT) y mandarina Cleopatra (MC). Cada punto representa la media de tres medidas de T_p .

2. INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS HIDRÁULICAS DEL PATRÓN EN LA TRANSPIRACIÓN Y SU RELACIÓN CON LA ANATOMÍA DE LA RAÍZ

En el **Estudio 2** se evaluó la influencia de las características hidráulicas del patrón en la transpiración así como la posible influencia de la anatomía del sistema radicular en la conductancia hidráulica de la raíz. Este estudio se realizó con plantas sin injertar de los patrones mandarino Cleopatra (MC), *P. trifoliata* (PT), Forner-Alcaide 13 (FA-13) y Forner-Alcaide 5 (FA-5) y con plantas de la variedad Valencia Late injertadas sobre estos patrones (V/MC, V/PT, V/FA-13 y V/FA-5). Este trabajo estuvo compuesto por tres experimentos independientes: (a) Relación entre conductancia hidráulica y transpiración, (b) Relación entre la biomasa foliar y la transpiración de la planta completa y (c) Estudio histológico. Los resultados se describen a continuación.

Biomasa y conductancia hidráulica de la raíz de los diferentes genotipos

Los resultados del primer experimento de este estudio se muestran en la Tabla 4. Existieron diferencias morfológicas entre los tipos de plantas estudiados. Las plantas sin injertar de MC tuvieron los mayores valores de biomasa foliar, mientras que las de FA-5 y FA-13 presentaron los menores valores de peso seco de hojas y de raíces. Sin embargo, en plantas injertadas en los diferentes patrones, el peso seco de hojas y el de raíces fue similar. El peso seco de raíces fue mayor en plantas injertadas que en plantas sin injertar debido a que el sistema radical de las plantas injertadas era seis meses de edad mayor que el de las plantas sin injertar.

En este experimento, los valores de K_r medidos en el HPFM se dividieron entre el peso seco de la raíz para obtener la conductancia hidráulica de la raíz específica por unidad de biomasa del sistema radical (K_r). K_r no difirió, para cada patrón, entre plantas injertadas y plantas sin injertar (Tabla 4). Sin embargo hubo diferencias significativas para el valor de K_r entre los cuatro patrones, siendo

mayor en FA-13 y V/FA-13, seguido por PT y V/PT. En tercer lugar, para este parámetro, estuvieron las plantas de FA-5 y V/FA-5, mientras que MC y V/MC presentaron los menores valores de *Kr*.

Tabla 4. Peso seco de hojas (PS Hojas) y raíces (PS Raíz), conductancia hidráulica de la raíz por unidad de peso seco (*Kr*) y transpiración instantánea (E) en plantas de mandarino Cleopatra (MC), *P. trifoliata* (PT), Forner-Alcaide 5 (FA-5) y Forner-Alcaide 13 (FA-13) y en plantas de naranjo Valencia Late injertado sobre estos cuatro patrones (V/MC, V/PT, V/FA-5 V/FA-13). Las medias (n=6) dentro de cada columna con diferente letra presentan diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

	PS Hojas (g)	PS Raíz (g)	<i>Kr</i> (10 ⁻⁷ Kg MPa ⁻¹ s ⁻¹ g ⁻¹)	E mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹
MC	12.01 ± 0.92 a	7.19 ± 0.61 ab	14.06 ± 1.39 d	0.84 ± 0.07 c
PT	3.74 ± 0.35 c	9.12 ± 0.88 a	42.20 ± 5.29 b	2.72 ± 0.24 a
FA-5	2.23 ± 0.19 d	5.72 ± 0.67 b	23.11 ± 3.21 c	1.85 ± 0.21 b
FA-13	2.53 ± 0.21 cd	5.75 ± 0.39 b	114.06 ± 10.93 a	2.84 ± 0.31 a
V/MC	4.25 ± 0.32 bc	8.50 ± 0.71 a	13.30 ± 1.59 d	0.92 ± 0.09 c
V/PT	5.71 ± 0.43 b	8.28 ± 0.68 a	42.40 ± 4.65 b	2.40 ± 0.17 a
V/FA-5	4.64 ± 0.39 bc	8.39 ± 0.56 a	25.12 ± 2.21 c	1.64 ± 0.21 b
V/FA-13	6.82 ± 0.51 b	9.74 ± 0.78 a	111.36 ± 12.15 a	2.58 ± 0.34 a

Relación entre la transpiración instantánea y conductancia hidráulica

En plantas sin injertar, la transpiración instantánea por unidad de área foliar (E) fue significativamente menor en MC y mayor en PT y FA-13 (Tabla 4). También en plantas injertadas, E fue significativamente menor en V/MC que en V/PT y V/FA-13. Existió una correlación curvilínea positiva ($r^2=0.84$) entre la media de E y *Kr* de los cuatro patrones sin injertar e injertados (Fig. 7) sugiriendo que plantas con un sistema radicular más eficiente en el transporte del agua incrementan el valor de E.

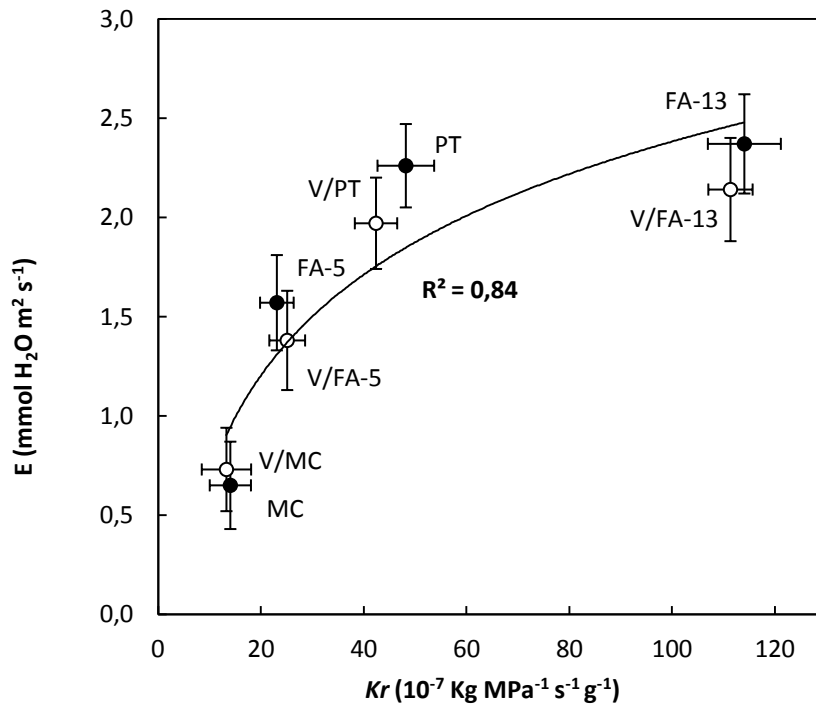


Fig. 7. Relación entre la transpiración instantánea (E) y la conductancia hidráulica específica por unidad de biomasa de raíz (Kr) en plantas de mandarino Cleopatra (MC), *P. trifoliata* (PT), Forner-Alcaide 5 (FA-5), Forner-Alcaide 13 (FA-13) y en plantas de la variedad Valencia Late injertadas sobre estos cuatro patrones (V/MC, V/PT, V/FA-5, y V/FA13). Cada punto es la media de seis plantas independientes.

Influencia de la conductancia hidráulica en la relación de la transpiración de la planta completa con la biomasa foliar

El segundo experimento de este estudio, realizado con plantas con distinto grado de desarrollo, también se encontró la relación curvilínea entre T_p y biomasa foliar descrita en la Fig. 1, pero esta vez en plantas injertadas. La T_p de las plantas de la variedad Valencia Late injertadas sobre los patrones MC, PT, FA-5 y FA-13 estuvo relacionada con su biomasa foliar (Fig. 8), pero es de destacar que para una determinada biomasa foliar, T_p es mayor cuando la planta está injertada en patrones con mayor Kr (Fig 8, Tabla 4), confirmando que Kr influye en T_p .

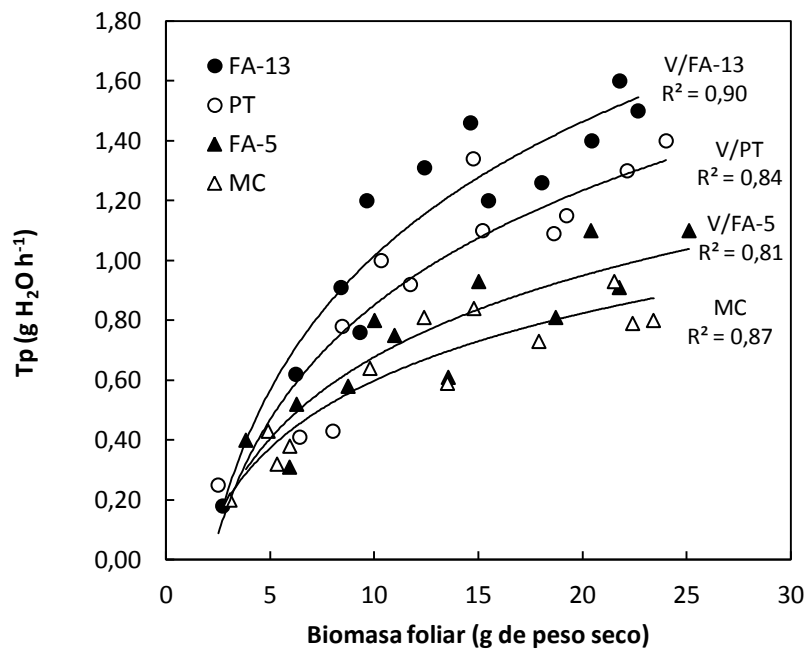


Fig 8. Relación de transpiración de la planta completa (T_p) con la biomasa foliar de plantas de Valencia Late injertadas sobre los patrones mandarino Cleopatra (V/MC), *P. trifoliata* (V/PT), Forner-Alcaide 5 (V/FA-5) y Forner-Alcaide 13 (V/FA13).

Características anatómicas de la raíz y su relación con la conductancia hidráulica

Se realizó un estudio histológico para evaluar las características anatómicas de los patrones PT, MC, FA-5 y FA-13 y determinar su influencia en la conductancia hidráulica. El estudio histológico mostró diferencias importantes en la anatomía de raíces entre los patrones (Figs. 9 y 10). Anatómicamente, PT y FA-13, que presentaron los mayores valores de K_r (Tabla 4), tuvieron mayor diámetro del lumen de los vasos del xilema en raíces pionner, raíz principal y base del tallo que MC y FA-5 (Tabla 5). Las células epidérmicas e hipodérmicas en raíces fibrosas fueron significativamente más pequeñas en PT y FA-13 que en MC y FA-5 (Tabla 6). El espesor de las raíces fibrosas fue mayor en FA-5 que en los otros genotipos y esto implicó un mayor diámetro de la estela y un mayor número de capas de células corticales.

RESULTADOS

Tabla 5. Diámetro del lumen y densidad de los vasos del xilema en secciones transversales de raíces pioner, de la base del tallo y de la raíz principal de mandarina Cleopatra (MC), *P. trifoliata* (PT), Forner-Alcaide 5 (FA-5) y Forner-Alcaide 13 (FA-13). Las secciones de la base del tallo y de la raíz principal se realizaron a 20-25 mm por encima o por debajo de la zona de unión entre tallo y raíz, respectivamente y las secciones de raíces pioner se cortaron a 10-20 mm del ápice de la raíz. Las medias (n= 6) dentro de una columna con letras diferentes presenta diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

	Vasos de raíces Pioneer		Vasos de la raíz principal		Vasos de la base del tallo	
	Diámetro (μm)	Densidad (nº raíz ⁻¹)	Diámetro (μm)	Densidad (nº raíz ⁻¹)	Diámetro (μm)	Densidad (nº raíz ⁻¹)
MC	10.6 ± 1.2 b	18.3 ± 1.9 b	11.8 ± 1.7 b	127.9 ± 11.7 a	14.1 ± 1.6 b	169.3 ± 13.3 a
PT	14.8 ± 1.1 a	33.6 ± 2.6 a	17.2 ± 1.6 a	135.1 ± 2.9 a	18.1 ± 2.1 a	154.9 ± 14.5 a
FA-5	10.2 ± 0.9 b	20.4 ± 1.5 b	14.1 ± 0.8 b	154.9 ± 14.2 a	14.3 ± 2.2 b	144.1 ± 18.2 a
FA-13	16.4 ± 1.4 a	18.1 ± 1.7 b	18.5 ± 0.7 a	124.3 ± 13.4 a	18.0 ± 1.7 a	154.0 ± 16.1 a

Tabla 6. Diámetro de la raíz, espesor de las células de la epidermis e hipodermis, número de capas de células corticales y diámetro de la estela en raíces fibrosas de los patrones mandarina Cleopatra (MC), *P. trifoliata* (PT), Forner-Alcaide 5 (FA-5) y Forner-Alcaide 13 (FA-13). Las secciones se realizaron a 4-6 mm del ápice de la raíz. Medias (n=6) dentro de una misma fila con letras diferentes, presentan diferencias significativas (P<0.05).

	MC	PT	FA-5	FA-13
Diámetro de la raíz (μm)	344.3 ± 29.3 b	385.9 ± 31.2 b	455.1 ± 49.5 a	386.0 ± 28.6 b
Espesor de las células epidérmicas (μm)	9.9 ± 1.2 a	7.6 ± 0.6 b	9.7 ± 1.2 a	7.8 ± 1.1 b
Espesor de las células de la hipodermis (μm)	11.9 ± 1.4 a	7.3 ± 1.2 b	11.0 ± 0.9 a	7.0 ± 1.3 b
Número de capas de células corticales (μm)	7.6 ± 0.6 b	7.1 ± 0.9 b	9.7 ± 1.4 a	7.9 ± 0.6 b
Diámetro de la estela (μm)	95.0 ± 7.6 c	119.0 ± 9.7 b	147.7 ± 10.2 a	112.7 ± 12.6 b

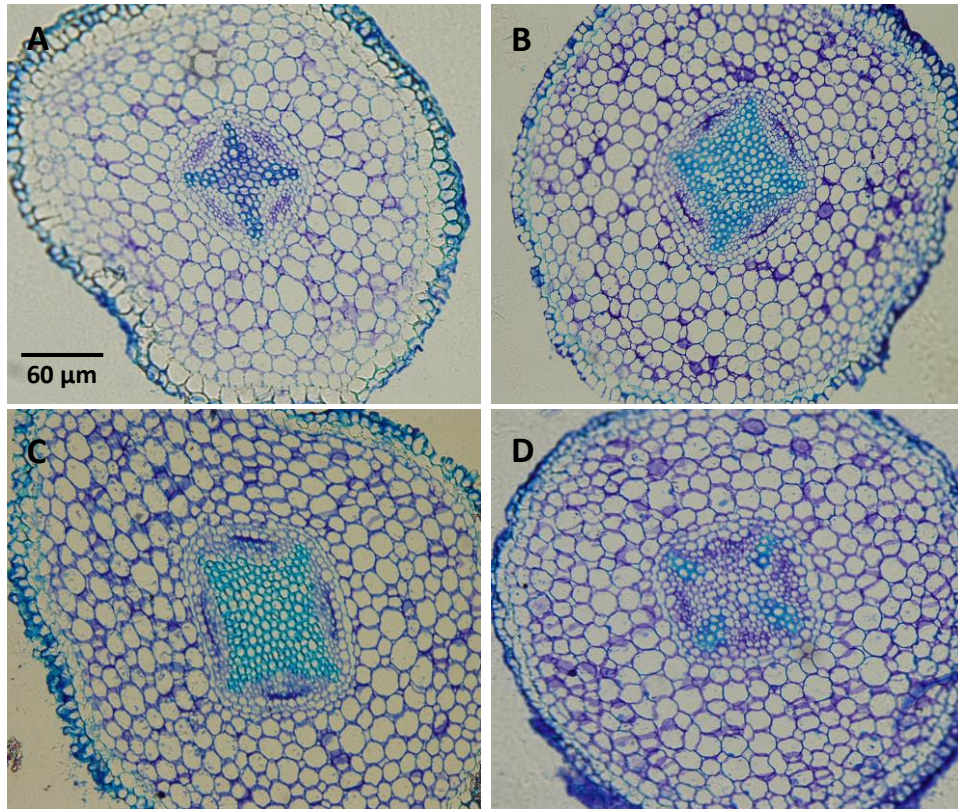


Fig 9. Microscopía óptica de raíces fibrosas de: (A) mandarina Cleopatra, (B) *P. trifoliata*, (C) Forner-Alcaide 5 y (D) Forner-Alcaide 13. Las secciones se cortaron a 4-6 mm del ápice de la raíz.

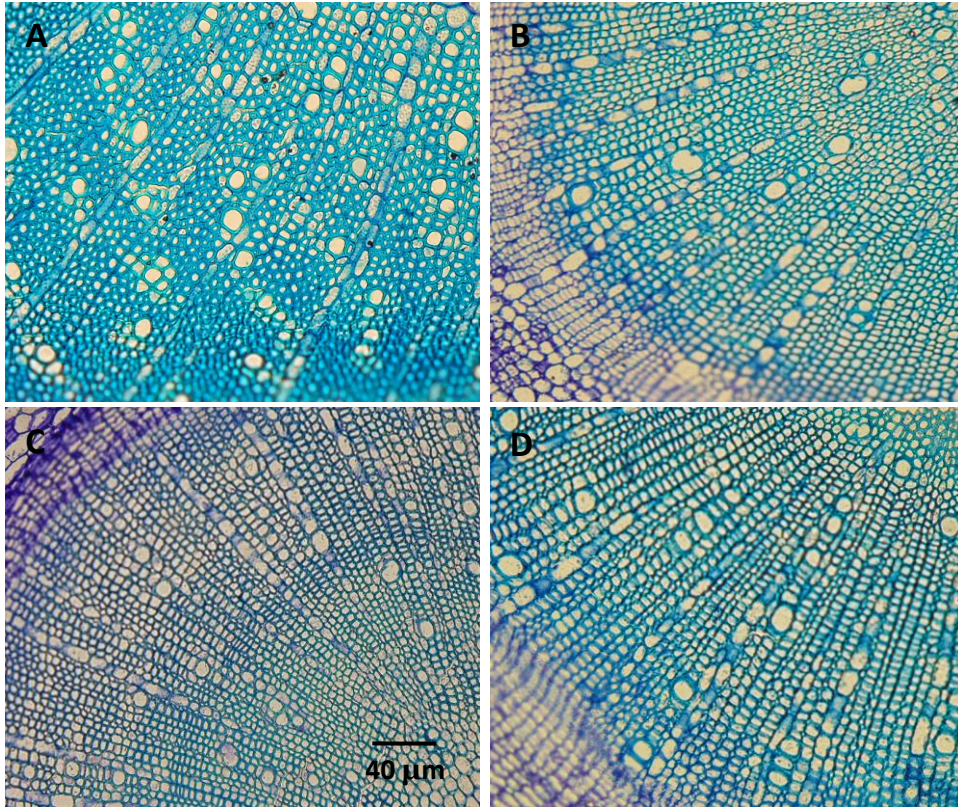


Fig 10. Microscopía óptica del xilema secundario de raíces de los patrones: (A) mandarino Cleopatra, (B) *P. trifoliata*, (C) Forner-Alcaide 5 y (D) Forner-Alcaide 13. Las secciones se cortaron 20-25 mm por debajo de la zona de unión entre tallo y raíz.

3. INFLUENCIA DE LA CONDUCTANCIA HIDRÁULICA EN LA RESPUESTA DE LOS CÍTRICOS A ESTRESSES ABIÓTICOS

En condiciones de estrés abiótico se realizaron cuatro estudios relacionados con la influencia de la conductancia hidráulica en la respuesta de la planta al estrés. Los **Estudios 3 y 4** se realizaron en condiciones de estrés hídrico, el **Estudio 5** en condiciones de salinidad y el **Estudio 6** en condiciones de asfixia.

3.1 Estrés hídrico

3.1.1. Fisiología del estrés hídrico

En este apartado se muestran los resultados del **Estudio 3**, en el que se evaluó la relación del cierre estomático en condiciones de estrés hídrico con el ABA, el pH de la savia del xilema y la conductancia hidráulica de la raíz. Este estudio estuvo compuesto por dos experimentos independientes: **(a) Respuesta fisiológica frente a estrés hídrico**, en el que plantas de citrange Carrizo (CC) tratadas previamente y sin tratar con norfluorazona (NF), que inhibe la síntesis de ABA, se sometieron a estrés hídrico durante 9 días y **(b) Efecto del pH y del ABA en la conductancia estomática** en el que hojas arrancadas de plantas de CC se introdujeron en soluciones tampón de diferente pH con o sin la adición de ABA para determinar el efecto de estos dos factores en la conductancia estomática.

Efecto del estrés hídrico en la conductancia estomática y transpiración

En el primer experimento de este estudio, la conductancia estomática (gs) disminuyó progresivamente a lo largo del tratamiento de estrés hídrico (Fig. 11A), alcanzando los valores mínimos el día 9. Las plantas sin norfluorazona (EH -NF) sufrieron una marcada reducción de la gs desde el día 3, mientras que las plantas tratadas con norfluorazona (EH +NF), en las que se inhibió la síntesis de ABA en raíces, tuvieron mayores valores de gs que las plantas EH -NF desde el día 3 hasta el día 6, aunque mostraron valores similares a las plantas EH -NF el día 9. La

evolución de la tasa de transpiración mostró cambios similares a los cambios descritos para g_s (Fig. 11B).

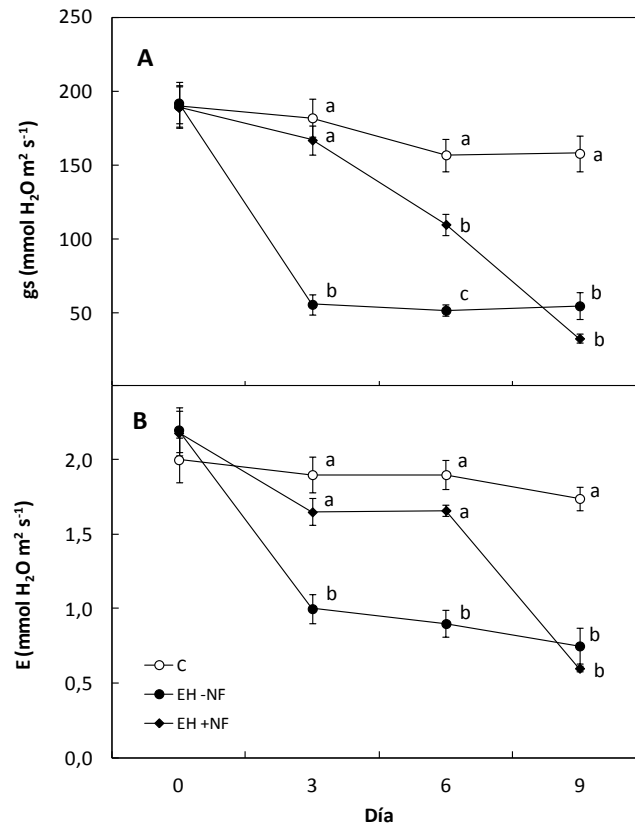


Fig. 11. Conductancia estomática (g_s) y transpiración (E) en citrange Carrizo frente a estrés hídrico en plantas no estresadas (C) y en plantas con estrés hídrico tratadas con norfluorazona (EH +NF) o sin norfluorazona (EH -NF). Los datos son la media de seis plantas independientes. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para cada fecha de muestreo.

Efecto del estrés hídrico en las relaciones hídricas

Los potenciales hídrico (Ψ_w), osmótico (Ψ_o) y de turgencia (Ψ_p) de la hoja disminuyeron progresivamente en las plantas estresadas (Fig. 12). A lo largo del experimento, las reducciones del Ψ_w de la hoja causadas por el estrés hídrico no fueron completamente compensadas con las reducciones en el Ψ_o , y por tanto, el

Ψ_p decreció, de manera similar, en los dos grupos de plantas estresadas. Después de 9 días, el Ψ_p de plantas estresadas, tratadas o no tratadas con NF, disminuyó más del 70% con respecto a los valores de las plantas control. El contenido relativo de agua en las hojas (RWC) de plantas estresadas se redujo progresivamente hasta alcanzar aproximadamente el 50% del de las plantas control (Fig. 13), con una evolución similar al Ψ_p .

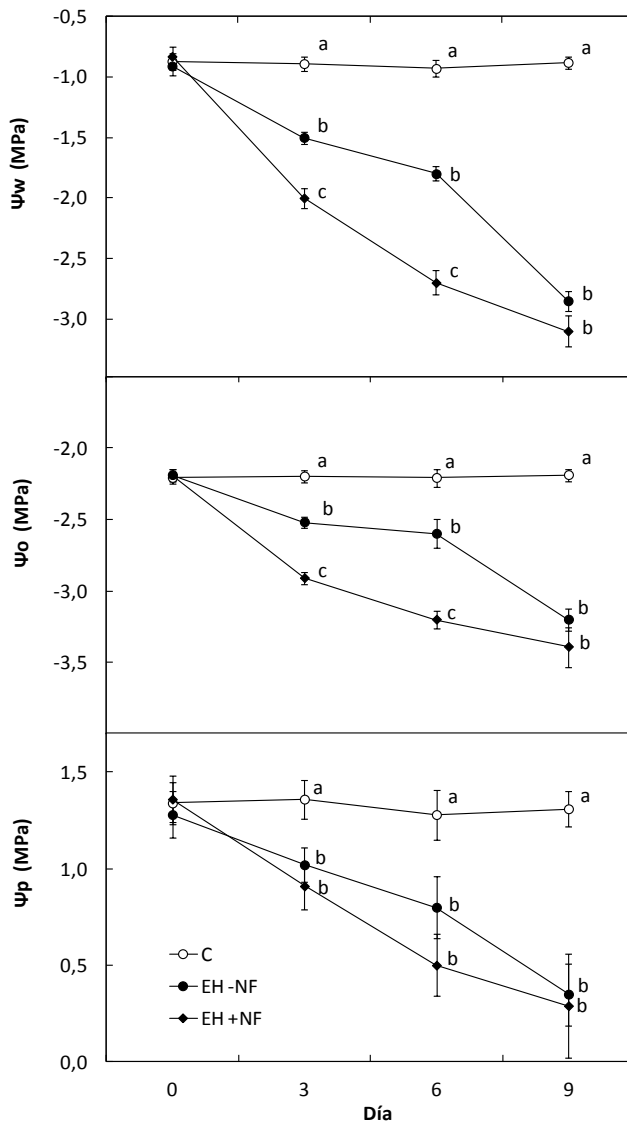


Fig. 12. Potencial hídrico (Ψ_w), osmótico (Ψ_o) y de turgencia (Ψ_p) en citrange Carrizo frente a estrés hídrico en plantas no estresadas (C) y en plantas con estrés hídrico, tratadas con norflurazona (EH +NF) o sin norflurazona (EH -NF). Los datos son la media de seis plantas independientes. Las barras verticales muestran el error estándar y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para cada fecha de muestreo.

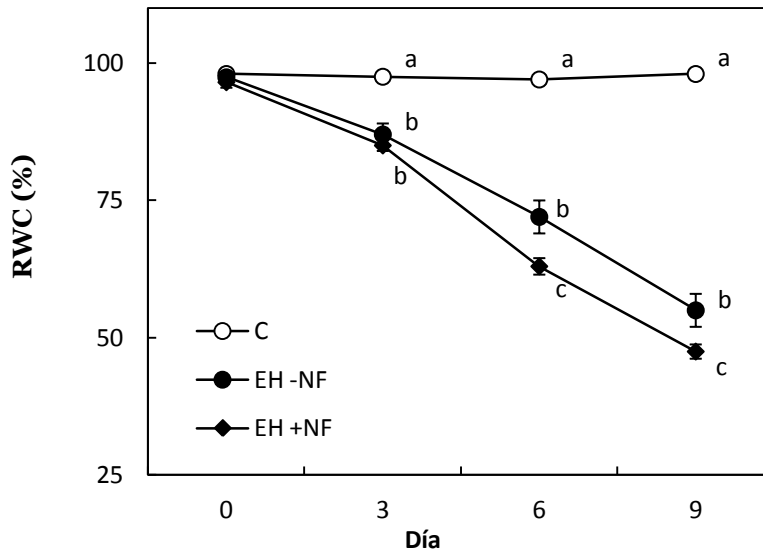


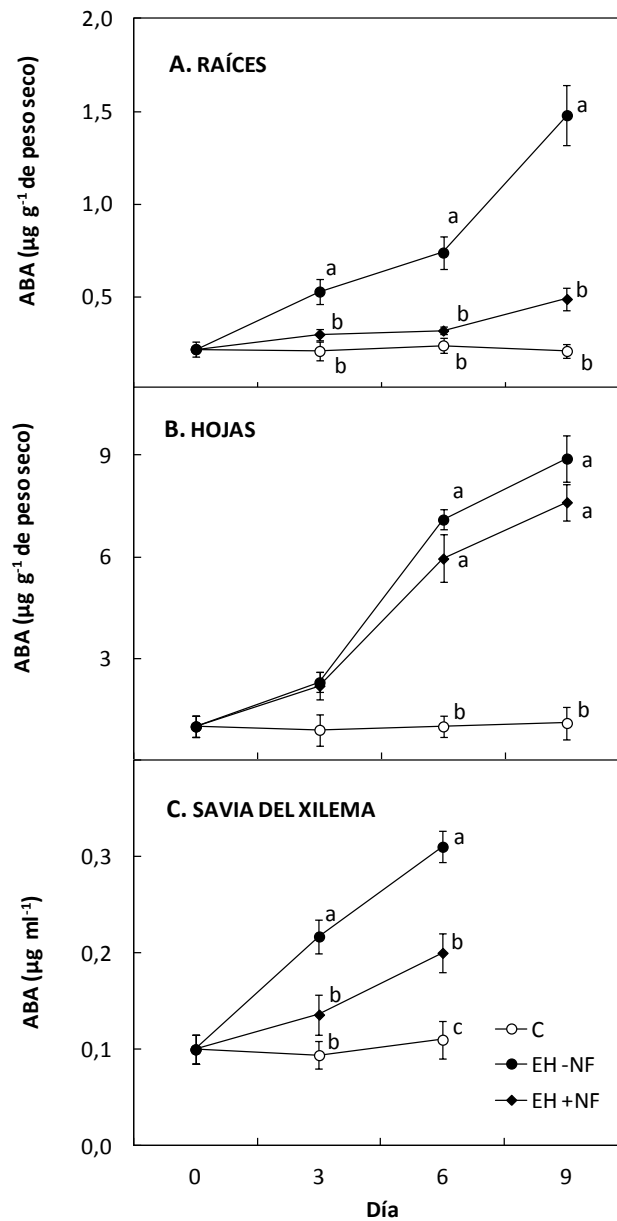
Fig. 13. Contenido relativo de agua (RWC) en citrange Carrizo frente a estrés hídrico en plantas no estresadas (C) y en plantas con estrés hídrico tratadas con norfluorazona (EH +NF) o sin norfluorazona (EH -NF). Los datos son la media de seis plantas independientes. Las barras verticales muestran el error estándar y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para cada fecha de muestreo.

Efecto del estrés hídrico en el contenido de ABA

El contenido de ABA en raíces de plantas estresadas se incrementó progresivamente desde el principio del experimento, alcanzando los mayores valores el día 9 (Fig. 14A). Este incremento fue menor en plantas EH +NF (2.3 veces mayor que en plantas control) que en plantas EH -NF (6.5 veces mayor que en plantas control).

El estrés también incrementó el contenido de ABA en las hojas, que alcanzó, después de 9 días sin riego, un valor siete veces mayor que en plantas control (Fig. 14B). No se detectaron diferencias significativas en la concentración de ABA en las hojas de plantas estresadas entre plantas tratadas o sin tratar con NF.

Fig 14. Concentración de ácido abscísico (ABA) en raíces (A), hojas (B) y savia del xilema (C) en citrange Carrizo frente a estrés hídrico en plantas no estresadas (C), y plantas con estrés hídrico tratadas con norflurazona (EH +NF) o sin norflurazona (EH -NF). Los datos son la media de extracciones independientes de tres plantas diferentes por tratamiento y fecha de muestreo. Las barras verticales muestran el error estándar y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para cada fecha de muestreo.



La concentración de ABA también se incrementó en la savia del xilema en respuesta al estrés hídrico. En las plantas EH -NF, este fluido tuvo mayor concentración de ABA que en las plantas EH +NF (Fig. 14C). Utilizando una presión

de 2 MPa durante 5 minutos, se obtuvo entre 150 y 180 μl de fluido de las plantas control. Después de 3 días de estrés, no hubo efecto en el volumen extraído entre plantas estresadas tratadas con o sin NF. Sin embargo, el día 6 este volumen se redujo en plantas estresadas a menos del 30%, respecto a plantas control. Al final del experimento (día 9), el volumen obtenido fue muy bajo para poder medir la concentración de ABA.

Efecto del estrés hídrico en la conductancia hidráulica

En plantas estresadas con o sin NF, la conductancia hidráulica específica por unidad de biomasa radical (K_r) presentó valores similares a los de las plantas control hasta el día 6 del experimento. Reducciones significativas (mayores del 50%) se registraron únicamente después de nueve días en condiciones de estrés, independientemente de si las plantas habían sido tratadas o no con NF (Fig. 15).

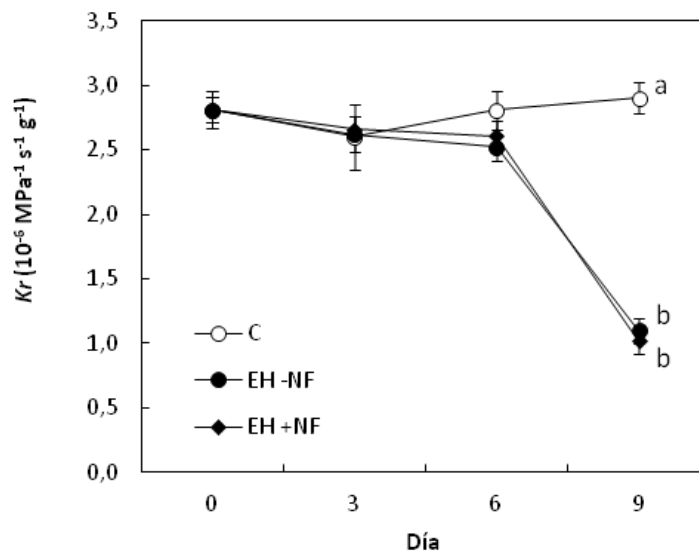


Fig. 15. Conductancia hidráulica específica por unidad de biomasa radical (K_r) en citrange Carrizo frente a estrés hídrico en plantas no estresadas (C) y en plantas con estrés hídrico, tratadas con norfluorazona (EH +NF) o sin norfluorazona (EH -NF). Los datos son la media de seis medidas en plantas independientes por fecha de muestreo y tratamiento. Las barras verticales muestran el error estándar y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para cada fecha de muestreo.

Efecto del estrés hídrico en el pH de la savia del xilema

El fluido extraído de las raíces de las plantas estresadas fue significativamente más alcalino desde el día 2 que en plantas control independientemente del tratamiento de NF (Fig. 16). En plantas control, el pH se mantuvo a 6.4 a lo largo del experimento. En plantas estresadas, tanto tratadas como sin tratar con NF, se alcanzó, el día 6, un valor medio del pH del fluido del xilema de 7.1.

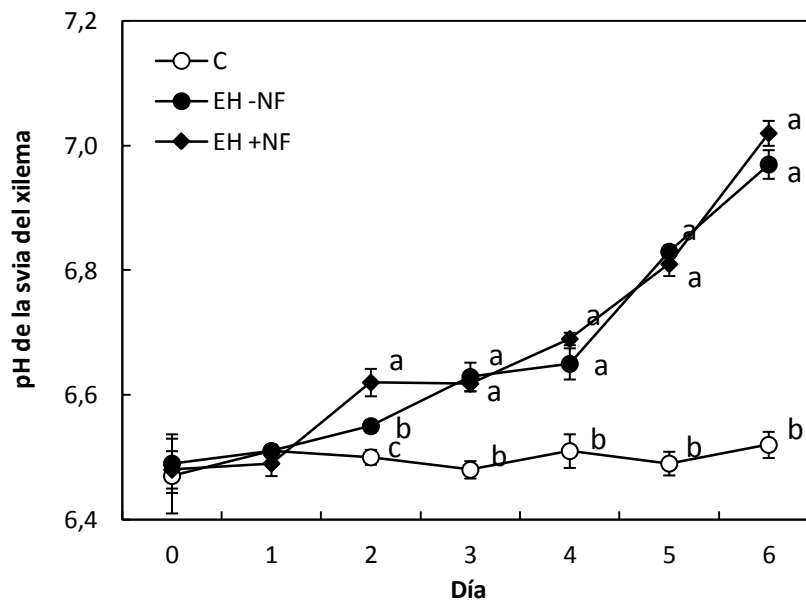


Fig. 16. pH de la savia del xilema de citrange Carrizo durante el tratamiento de estrés en plantas no estresadas (C) y en plantas con estrés hídrico, tratadas con norfluorazona (EH +NF) o sin norfluorazona (EH -NF). Los datos son la media de seis medidas en plantas independientes por fecha de muestreo y tratamiento. Las barras verticales muestran el error estándar y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para cada fecha de muestreo.

Efecto del pH y del ABA en la conductancia estomática

Adicionalmente, en este estudio, se determinó la respuesta de la conductancia estomática (gs) de hojas que habían sido arrancadas e inmediatamente introducidas en soluciones tampón a diferente pH y con 0.2 ppm de ABA o sin

RESULTADOS

ABA. Los valores del pH de los tampones utilizados en este experimento fueron equivalentes a los pHs medidos en la savia del xilema extraída de plantas control y plantas con estrés hídrico (6.4 y 7.1, respectivamente) (Fig. 16).

A las seis horas de estar las hojas inmersas en estos tampones, el tratamiento con tampón ajustado a pH 7.1 redujo significativamente la gs en un 29% respecto a al valor de gs medido a pH 6.4 (Tabla 7). La adición de ABA a las solución tampón a pH 6.4 causó una reducción de la gs del 33 % relativo a los valores de la gs a pH 6.4 sin ABA. A pH 7.1, el ABA redujo la gs en un 52% respecto a la gs a pH 7.1 sin ABA. Los menores valores de gs se observaron a pH 7.1 + ABA.

Tabla 7. Conductancia estomática de hojas arrancadas de citrange Carrizo introducidas durante seis horas en tampones iso-osmóticos ajustados a pH 6.4 y 7.1 combinados o no con ácido abscísico (0.2 ppm ABA). Los datos son las media de seis hojas independientes. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Tratamiento	Conductancia estomática (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)
pH 6.4	76.19 ± 1.48 a
pH 6.4 + ABA	51.06 ± 2.76 b
pH 7.1	53.74 ± 2.16 b
pH 7.1 + ABA	25.68 ± 1.12 c

3.1.2 Influencia de las características hidráulicas del patrón en la respuesta de los cítricos a estrés hídrico

En este apartado se muestran los resultados del **Estudio 4** donde se evaluó la influencia de las características hidráulicas del patrón frente al estrés hídrico, así como la relación de la expresión de acuaporinas con la conductancia hidráulica. Este estudio se realizó con plantas de naranjo Valencia Late injertadas sobre los patrones PT, MC y 030115. Las plantas se dividieron en dos grupos. La dosis de riego de uno de ellos fue la normal para un desarrollo adecuado de la planta (plantas control) [PT(C), MC(C) y PT(C)]. Las plantas del otro grupo [PT(EH), MC(EH) y 030115(EH)] se sometieron a un estrés hídrico moderado durante 70 días.

Efecto del estrés hídrico en la biomasa y relaciones hídricas

El tratamiento de estrés hídrico no alteró significativamente el peso seco de la raíz en ninguno de los patrones estudiados (Tabla 8). Sin embargo, hubo una reducción significativa en el peso seco de la parte aérea en las plantas injertadas sobre los patrones PT y 030115 sometidas a estrés, relativo al de sus respectivos controles. Esta reducción dio lugar a un menor ratio peso seco parte aérea/peso seco raíz (S/R) en PT(EH) y 030115(EH) comparados con PT(C) y 030115(C) respectivamente. En plantas injertadas sobre MC el ratio S/R no se modificó con el estrés hídrico.

RESULTADOS

Tabla 8. Valores de peso seco de la planta (PS planta), de las hojas (PS hojas), del tallo (PS tallo), de la componente aérea (PS aérea) y de las raíces (PS raíz) y ratio parte aérea/raíz (S/R) en plantas control injertadas sobre *P. trifoliata* [PT(C)], mandarino Cleopatra [MC(C)] y 030115 [030115(C)] y en plantas con estrés hídrico durante 70 injertadas sobre *P. trifoliata* [PT(EH)], mandarino Cleopatra [MC(EH)] y 030115 [030115(EH)]. Medias con letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativas ($P < 0.05$) ($n=6$).

	PS planta (g)	PS hojas (g)	PS tallo (g)	PS aérea (g)	PS raíz (g)	S/R
PT(C)	19.90 ±2.29 ab	6.84±1.09 b	5.77±0.50 b	12.61±1.42 b	7.29±0.98 a	1.77±0.13 b
PT(EH)	13.24±0.77 c	3.65±0.24 cd	3.47±0.24 d	7.12±0.37 c	6.12±0.53 a	1.19±0.09 c
MC(C)	13.74±0.79 c	2.81±0.29 cd	3.99±0.22 d	6.80±0.42 c	6.95±0.80 a	1.05±0.13 c
MC(EH)	13.75±1.46 c	2.43±0.28 d	4.14±0.48 cd	6.57±0.67 c	7.18±0.80 a	0.92±0.02 c
030115(C)	25.33±3.33 a	9.70±1.37 a	7.96±1.00 a	17.66±2.31 a	7.67±1.07 a	2.36±0.14 a
030115(EH)	16.58±0.73 bc	4.85±0.33 bc	5.28±0.48 bc	10.13±0.41 bc	6.10±0.48 a	1.71±0.15 b

La figura 17 representa la extracción de agua acumulada a lo largo del experimento. El valor presentado el día 70 representa la transpiración total de la planta completa durante todo el experimento (T_{Total}). La cantidad acumulada de agua transpirada fue mayor en 030115(C) (2369.5 g de agua). El estrés hídrico originó una disminución estadísticamente significativa de la T_{Total} en los tres patrones comparada con la de sus respectivos controles. Además, esta reducción fue mayor en el patrón 030115(EH) [59.4% de reducción comparado con 030115(C)] que en PT(EH) [48.0% de reducción comparado con PT(C)] y en MC(EH) [32.9% de reducción comparado con MC(C)].

Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los valores de T_{Total} entre los patrones PT(EH), MC(EH) y 030115(EH). Además la evolución de la transpiración acumulada de la planta completa fue similar en los tres patrones en condiciones de estrés hídrico, lo cual implica que el contenido hídrico del suelo varió de manera similar en las macetas de estas plantas.

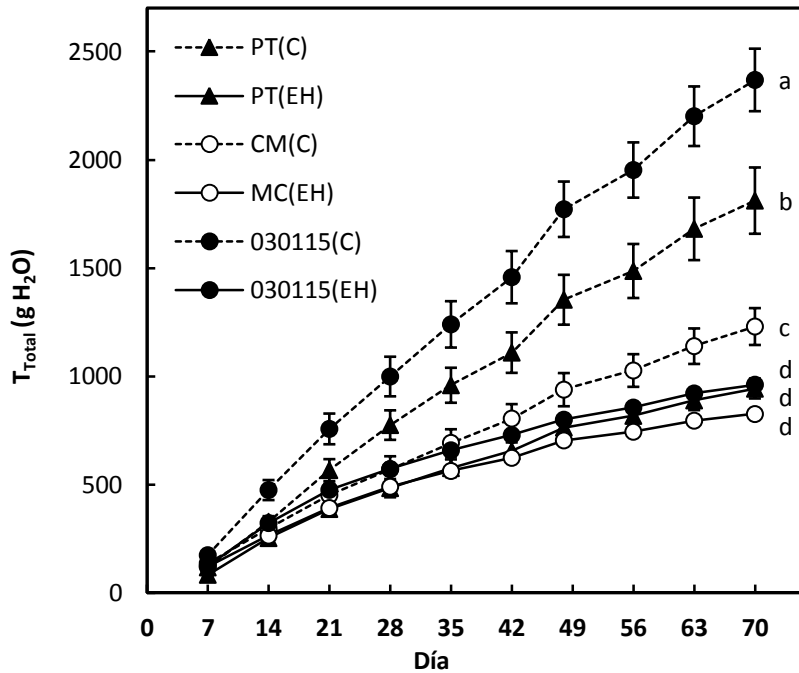


Fig. 17. Transpiración acumulada de la planta completa (T_{Total}) en plantas control injertadas sobre *P. trifoliata* [PT(C)], mandarina Cleopatra [MC(C)] y 030115 [030115(C)] y en plantas con estrés hídrico injertadas sobre *P. trifoliata* [PT(EH)], mandarina Cleopatra [MC(EH)] y 030115 [030115(EH)]. Los valores representan la media de seis réplicas independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en T_{Total} al final del experimento.

Las hojas de las plantas control injertadas sobre los tres patrones estudiados tuvieron un valor similar de potencial hídrico (Ψ_w). Desde el día 42, el Ψ_w de PT(EH) mostró diferencias estadísticamente significativas comparado con el de PT(C) (Fig. 18). Después de este día, este parámetro continuó decreciendo en plantas injertadas sobre este patrón, alcanzando el valor mínimo al final del experimento (-2.48 MPa). MC(EH) únicamente mostró diferencias significativas comparadas con MC(C) el día 70 con un valor de -1.35 MPa en plantas estresadas.

El patrón 030115 no mostró diferencias estadísticamente significativas entre plantas control y plantas estresadas a lo largo de todo el experimento.

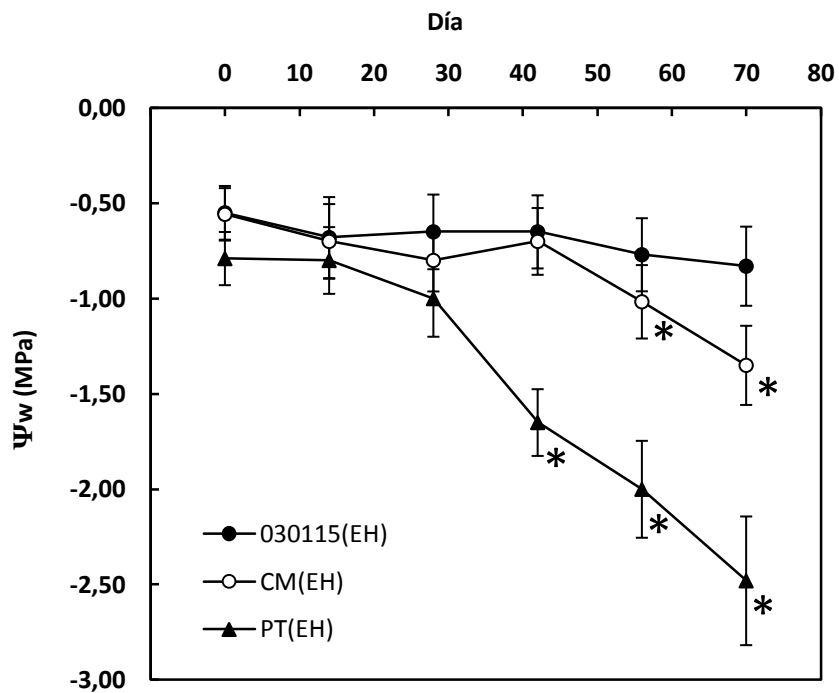


Fig. 18. Efecto del estrés hídrico en el potencial hídrico (Ψ_w) en plantas con estrés hídrico injertadas sobre *P. trifoliata* [PT(EH)], mandarina Cleopatra [MC(EH)] y 030115 [030115(EH)]. Las barras verticales indican el error estándar de seis medidas en plantas independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a sus respectivos controles.

Efecto del estrés hídrico en los parámetros de intercambio gaseoso

La figura 19 muestra la evolución del porcentaje de asimilación neta de CO_2 (A_{CO_2}), transpiración (E) y conductancia estomática (g_s) de los patrones PT, MC y 030115 sometidos a estrés hídrico respecto a los valores de estos parámetros de sus respectivos controles durante todo el experimento. En PT, A_{CO_2} fue significativamente menor en plantas estresadas que en plantas control desde el día 42 hasta el final del experimento. En MC(EH), A_{CO_2} disminuyó únicamente al

final del experimento (día 70). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los valores de A_{CO_2} entre 030115(C) y 030115(EH) a pesar de que existió una reducción, desde el día 42, en E y gs en las plantas 030115(EH) respecto a las plantas 030115(C). En las plantas PT y MC sometidas a estrés hídrico, la evolución de A_{CO_2} fue similar a la evolución de E y gs.

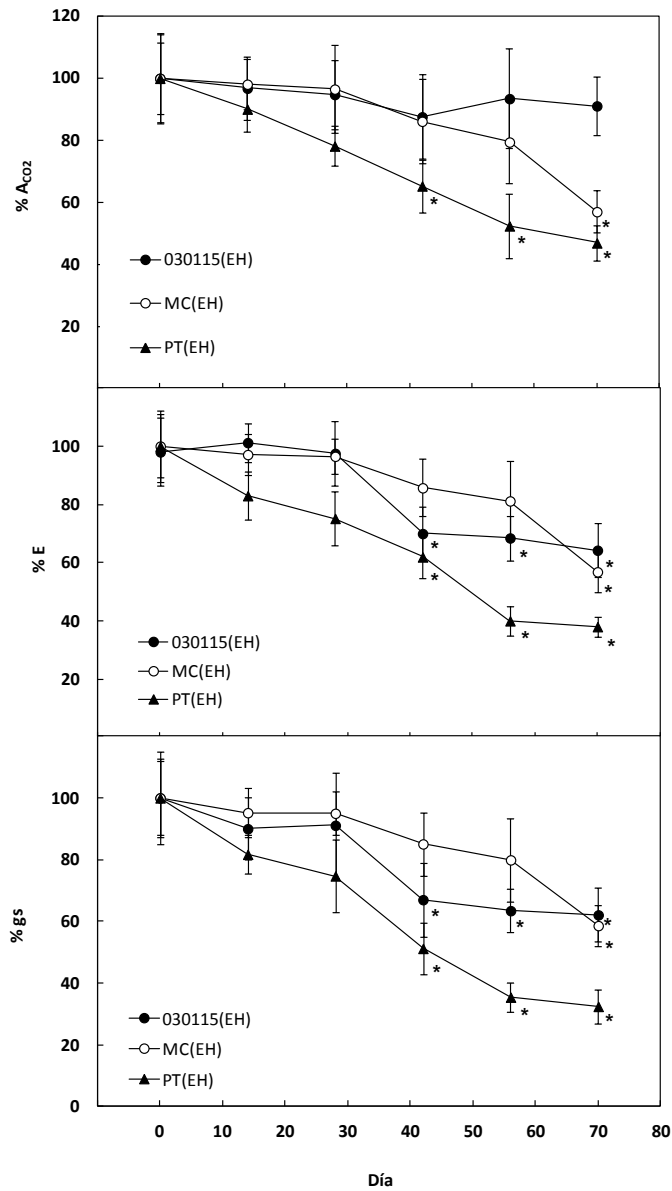


Fig. 19. Evolución del porcentaje de la tasa de asimilación neta de CO_2 (A_{CO_2}), transpiración (E) y conductancia estomática (gs) frente a estrés hídrico en plantas injertadas sobre *P. trifoliata* [PT(EH)], mandarina Cleopatra [MC(EH)] y 030115 [030115(EH)] con respecto a sus controles. Las barras verticales indican el error estándar de seis medidas independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a sus respectivos controles (100%).

RESULTADOS

El ANOVA realizado para comparar los valores de A_{CO_2} , medidos al final del experimento (día 70) (Tabla 9) mostró que los valores de A_{CO_2} fueron significativamente mayores en PT(C) que en MC(C). El valor de A_{CO_2} de 030115(C) fue intermedio al de PT(C) y MC(C). La A_{CO_2} de 030115(EH) no mostró diferencias significativas con la de 030115(C) ni con la de MC(C) y fue significativamente mayor que la de MC(EH) y PT(EH).

Tabla 9. Valores de asimilación neta de CO_2 (A_{CO_2}), transpiración (E), conductancia estomática (gs), concentración subestomática de CO_2 (Ci) y valor SPAD en plantas control injertadas sobre *P. trifoliata* [PT(C)], mandarino Cleopatra [MC(C)] y 030115 [030115(C)] y en plantas con estrés hídrico durante 70 injertadas sobre *P. trifoliata* [PT(EH)], mandarino Cleopatra [MC(EH)] y 030115 [030115(EH)]. Medias con letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativas ($P < 0.05$) ($n=6$).

	A_{CO_2} $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	E $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	gs $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Ci ppm	SPAD
PT(C)	6.02 ± 0.43 a	1.82 ± 0.11 a	98.21 ± 11.61 a	179.04 ± 22.80 a	57.21 ± 1.86 a
PT(EH)	2.53 ± 0.34 c	0.71 ± 0.05 c	38.69 ± 3.54 c	184.78 ± 21.63 a	41.68 ± 1.21 cd
MC(C)	3.21 ± 0.54 b	1.15 ± 0.09 b	48.72 ± 3.09 b	162.38 ± 19.23 a	45.16 ± 2.20 bc
MC(EH)	1.61 ± 0.37 c	0.58 ± 0.08 c	23.88 ± 2.74 c	191.21 ± 21.12 a	38.30 ± 1.43 d
030115(C)	4.41 ± 0.53 ab	1.42 ± 0.15 ab	62.45 ± 9.47 ab	187.62 ± 19.32 a	54.32 ± 2.20 a
030115(EH)	4.06 ± 0.42 b	0.92 ± 0.10 c	41.63 ± 3.59 c	115.83 ± 25.60 b	49.89 ± 2.14 ab

Aunque el tratamiento de estrés hídrico causó una reducción en la gs de PT(EH) y MC(EH) (Tabla 9), la concentración subestomática de CO_2 (Ci) fue similar en plantas estresadas y plantas control de estos dos patrones. Sin embargo, el patrón 030115 presentó significativamente menor Ci en plantas estresadas que en plantas control.

El valor SPAD, relacionado con el contenido en clorofila, fue significativamente menor en PT(EH) y MC(EH) comparado con sus respectivos controles mientras que 030115(C) y 030115(EH) no mostraron diferencias significativas en este valor.

Efecto del estrés hídrico en la expresión de acuaporinas

Con el objetivo de estudiar los niveles de expresión de genes PIP1 y PIP2, el día 43 se extrajo el RNA total de las raíces finas de plantas control y de plantas sometidas a déficit hídrico. Los niveles de expresión de PIP2 fueron similares en las plantas PT(C), 030115(C) mientras que los niveles de PIP2 en MC(C) fueron ligeramente menores (15.6%) que en PT(C) y 030115(C) (Fig. 20). También los niveles de PIP1 fueron similares en plantas PT(C) y 030115(C), mientras que los niveles de PIP1 en MC(C) fueron mucho menores que en PT(C) y 030115(C) [73.7% menores que en PT(C) y 58.3% menores que en 030115(C)].

En respuesta al estrés hídrico, la expresión de mRNA de acuaporinas difirió entre los tres patrones estudiados: en PT, el déficit hídrico no cambió significativamente la expresión de acuaporinas; en MC, la expresión de PIP2 fue ligeramente reprimida [16.1% de reducción comparada con MC(C)]; mientras que en el patrón 030115 existió una drástica reducción tanto en la expresión de mRNA de PIP1 como de PIP2 en condiciones de estrés hídrico (reducción de 66.7 y 72.7% en PIP1 y PIP2 comparados con los niveles de 030115(C), respectivamente).

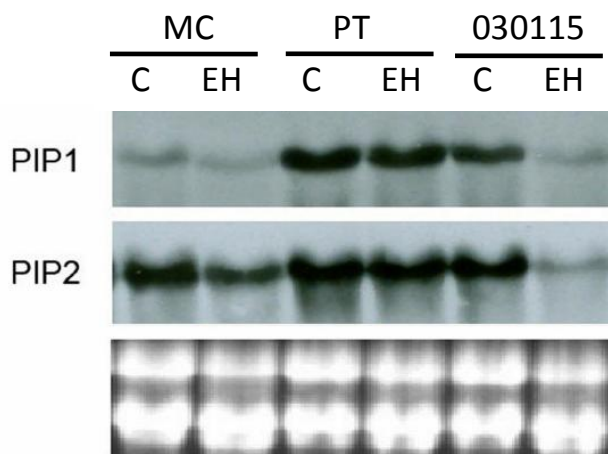


Fig. 20. Análisis Northern de la expresión de PIP1 y PIP2 en plantas control injertadas sobre *P. trifoliata* [PT(C)], mandarina Cleopatra [MC(C)] y 030315 [030115(C)] y en plantas con estrés hídrico injertadas sobre *P. trifoliata* [PT(EH)], mandarina Cleopatra [MC(EH)] y 030115 [030115(EH)] el día 43 del experimento.

Efecto del estrés hídrico en la conductancia hidráulica

La conductancia hidráulica (K_r), medida 43 días después del inicio del experimento se muestra en la Fig. 21. PT(C) y 030115(C) tuvieron un valor similar de K_r ($17.38 \cdot 10^{-6}$ y $15.55 \cdot 10^{-6} \text{ kg MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente). MC(C) presentó un valor de K_r aproximadamente 60% menor que los de PT(C) y 030115(C). En plantas injertadas sobre PT y MC, en condiciones de estrés hídrico, la K_r no se alteró respecto a la de las plantas control. Sin embargo, en condiciones de estrés hídrico, la K_r de 030115 se redujo en un 54.85% respecto a la de plantas control.

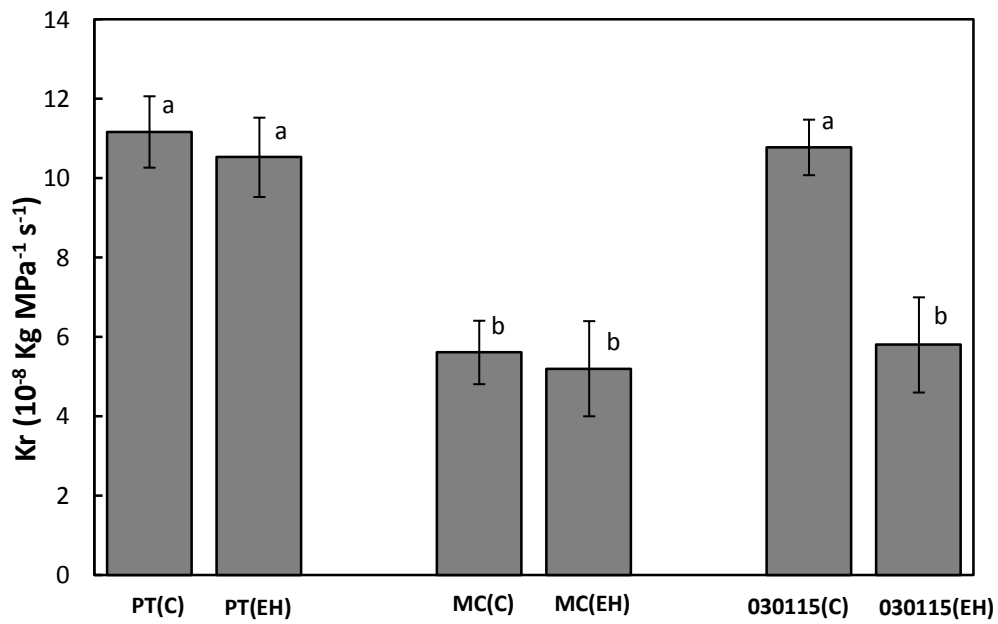


Fig. 21. Conductancia hidráulica de la raíz, el día 43 del experimento, en plantas control injertadas sobre *P. trifoliata* [PT(C)], mandarina Cleopatra [MC(C)] y 030115 [030115(C)] y en plantas con estrés hídrico injertadas sobre *P. trifoliata* [PT(EH)], mandarina Cleopatra [MC(EH)] y 030115 [030115(EH)]. Las barras verticales muestran el error estándar de cinco medidas independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

3.2 Salinidad

En este apartado se presentan los resultados del **Estudio 5** en el que se evaluó la relación entre la conductancia hidráulica, expresión de acuaporinas, transpiración y acumulación de Cl^- en hojas en condiciones de estrés salino. Se realizaron dos experimentos independientes. En el primero, plantas de mandarina Cleopatra (MC), *Poncirus trifoliata* (PT) y citrange Carrizo (CC) permanecieron en condiciones de salinidad durante 30 días con una concentración de 80 mM de NaCl en la solución nutritiva. En el otro, plantas de CC se regaron durante 14 días con la adición de NaCl y HgCl_2 a la solución nutritiva aplicando tres tratamientos diferentes (200 mM NaCl, 0.05 mM de HgCl_2 y 200 mM NaCl + 0.05 mM de HgCl_2) para estudiar el comportamiento de las plantas tras el bloqueo de las acuaporinas.

Efecto de la salinidad en la conductancia hidráulica de la raíz, transpiración, acumulación de Cl^- en hojas, expresión de acuaporinas y acumulación de suberina en la hipodermis

En el experimento en el que plantas de PT, MC y CC se trataron NaCl 80 mM durante 30 días, la transpiración (E) y conductancia hidráulica específica de la raíz (K_r) de plantas control presentaron, el último día del experimento, valores significativamente mayores en PT, intermedios en CC y menores en MC. También, la acumulación de Cl^- en plantas salinizadas fue mayor en PT, intermedia en CC e inferior en MC (Tabla 10).

En los tres genotipos, el tratamiento con NaCl 80 mM redujo la K_r respecto a sus controles respectivos (88.71% de reducción en MC, 61.86% en CC y 49.60% en PT) y la tasa de transpiración (62,07% de reducción en MC, 48,77% en CC y 32,12% en PT).

RESULTADOS

Tabla 10. Conductancia hidráulica de la raíz por unidad de peso de raíz (K_r), tasa de transpiración (E) y concentración de Cl^- en hojas de mandarina Cleopatra (MC) citrange Carrizo (CC) y *Poncirus trifoliata* (PT) tratados con 0 (control) u 80 mM NaCl durante 30 días. Medias (n=6) dentro de cada columna con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

Tratamiento		K_r ($\times 10^{-6} \text{ Kg MPa s}^{-1} \text{ g}^{-1}$)	E ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Cl^- en hojas ($\text{mg g de peso seco}^{-1}$)
MC	Control	1.86 ± 0.23 c	1.16 ± 0.12 c	3.05 ± 0.25 e
MC	80 mM NaCl	0.21 ± 0.02 d	0.44 ± 0.03 e	20.04 ± 2.12 c
CC	Control	9.72 ± 0.83 b	1.62 ± 0.16 b	10.55 ± 1.89 d
CC	80 mM NaCl	3.78 ± 0.42 c	0.83 ± 0.07 d	40.33 ± 5.71 b
PT	Control	21.67 ± 2.31 a	1.93 ± 0.23 a	8.40 ± 0.71 d
PT	80 mM NaCl	10.92 ± 2.3 b	1.31 ± 0.12 bc	52.73 ± 6.42 a

En la Fig. 22 se muestra la expresión de acuaporinas en plantas control y plantas tratadas con 80 mM de NaCl durante 30 días de MC, CC y PT. En plantas no salinizadas, la expresión de PIPs fue menor en MC, intermedia en CC y superior en PT. El tratamiento con 80 mM de NaCl no tuvo efecto en la expresión de acuaporinas.

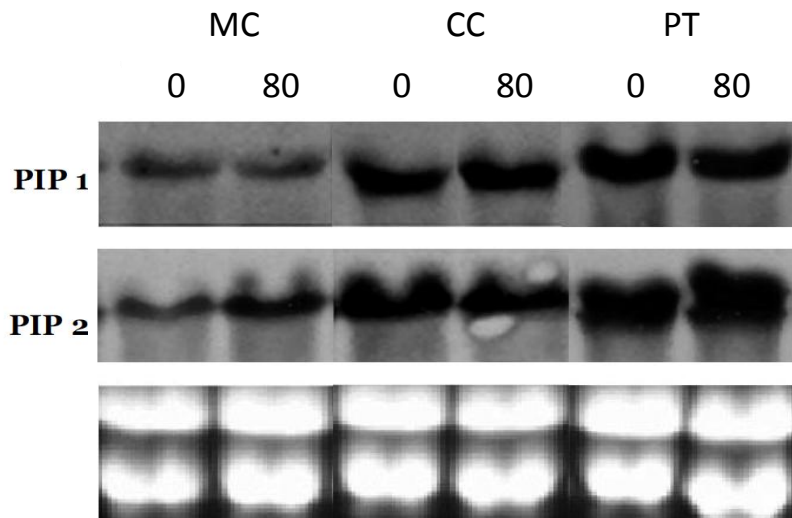


Fig. 22. Expresión de acuaporinas en plantas de mandarina Cleopatra (MC), citrange Carrizo (CC) y *Poncirus trifoliata* (PT) tratadas con 0 y 80 mM de NaCl durante 30 días.

El estudio histológico realizado en plantas control de CC y plantas sometidas a 80 mM durante 30 días, mostró que las raíces de CC expuestas a una concentración externa de 80 mM NaCl presentaron una mayor suberización de la hipodermis que las plantas control (Fig. 24).

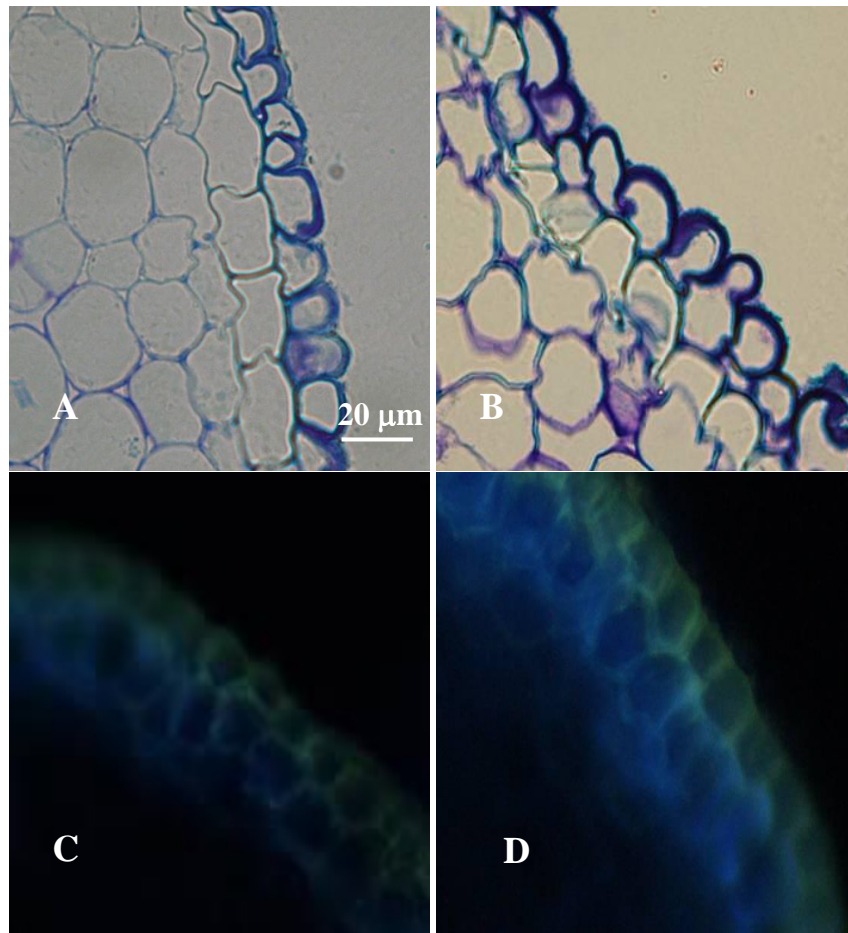


Fig. 23. Epidermis e hipodermis de raíces de plantas de citrange Carrizo control (A y C) y salinizadas durante 30 días (B y D). Microscopía óptica con azul de toluidina (A y B) y microscopía de fluorescencia con Sudan Red (B y D)

Efecto de la salinidad y del mercurio en la conductancia hidráulica de la raíz, transpiración, acumulación de Cl⁻ en hojas y expresión de acuaporinas

En el experimento realizado en plantas de CC durante 14 días, el bloqueo de las acuaporinas con HgCl₂ redujo la Kr en un 56.31%. El tratamiento salino con 200 mM de NaCl la redujo en un 45.63% mientras que la mayor reducción de Kr se observó con el tratamiento combinado de 200 mM NaCl + 0.05 mM HgCl₂ (66.02 % de reducción) (Tabla 11).

Tabla 11. Conductancia hidráulica de la raíz por unidad de peso de raíz (Kr), tasa de transpiración (E) y concentración de Cl⁻ en hojas de citrange Carrizo de plantas control y de plantas tratadas con: (1) 0.05 mM HgCl₂, (2) 200 mM NaCl o (3) 200 mM NaCl + 0.05 mM HgCl₂ durante 14 días. Medias (n=6) dentro de cada columna con diferente letra presentan diferencias estadísticas significativas (P<0.05)

Tratamiento	Kr (10 ⁻⁶ Kg MPa s ⁻¹ g ⁻¹)	E (mmol m ⁻² s ⁻¹)	Cl ⁻ en hojas (mg g de peso seco ⁻¹)
Control	10.34 ± 1.69 a	1.67 ± 0.22 a	8.05 ± 0.72 c
0.05 mM mM HgCl ₂	4.48 ± 1.02 bc	0.86 ± 0.07 bc	4.17 ± 0.51 d
200 mM NaCl	5.62 ± 0.43 b	1.13 ± 0.12 b	41.40 ± 5.48 a
200 mM NaCl + 0.05 mM HgCl ₂	3.47 ± 0.52 c	0.68 ± 0.05 c	23.52 ± 3.14 b

Los tratamientos con HgCl₂, con 200 mM NaCl y con HgCl₂ + 200 mM NaCl redujeron E respecto a las plantas control (Tabla 11). La mayor reducción se observó con el tratamiento combinado de NaCl + HgCl₂. La acumulación de Cl⁻, respecto a las plantas control, disminuyó con el tratamiento de HgCl₂. Cuando se combinó el HgCl₂ con el tratamiento salino, la concentración de Cl⁻ en hojas fue la mitad que la de las plantas tratadas únicamente con sal.

En este experimento, ni el tratamiento de dos semanas con HgCl₂ ni el tratamiento combinado de HgCl₂ + 200 mM NaCl alteraron los niveles de expresión de acuaporinas (Fig 24).

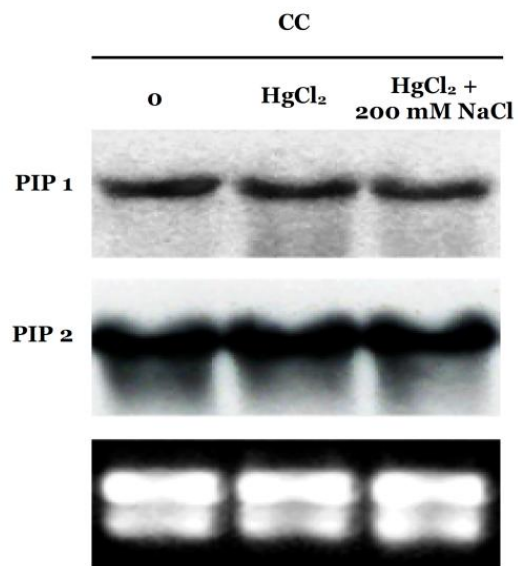


Fig. 24. Expresión de acuaporinas en plantas de citrange Carrizo (CC) control (0 mM HgCl₂ y 0 mM NaCl) y tratadas con 0.05 mM HgCl₂ o 200 mM NaCl + 0.05 mM HgCl₂ durante 14 días.

3.4. Asfixia

En este apartado se presentan los resultados del **Estudio 6** en el que se evaluó la influencia de la conductancia hidráulica en la respuesta de los cítricos a la asfixia radical. Se realizaron tres experimentos independientes: **(a) Evaluación de la respuesta fisiológica al encharcamiento**, en el que plantas de citrange Carrizo (CC) permanecieron en condiciones de encharcamiento durante 35 días, **(b) Efecto del pH de la solución nutritiva en la conductancia estomática y conductancia hidráulica** en el que plantas de CC se transfirieron durante una semana a vasos (sin sustrato) con soluciones nutritivas a diferente pH, aireadas y sin airear y **(c) Efecto del pH en la conductancia estomática** en el que se introdujeron hojas en tampones a diferentes valores de pH y posteriormente se determinó la conductancia estomática.

Efecto de la asfixia en la conductancia estomática y transpiración

Se detectaron diferencias significativas en la conductancia estomática (gs) entre plantas control y encharcadas desde la primera semana del experimento (Fig 25A). Al final del experimento, el valor medio de la gs de las plantas control fue $172.6 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mientras que el valor medio alcanzado en este momento en plantas encharcadas fue un 80% menor que en las plantas control.

La evolución de tasa de transpiración (E) estuvo relacionada con los cambios en la gs. Las hojas de las plantas control mostraron, el día 35, un valor medio de E de $2.75 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mientras que para las plantas encharcadas, este día, el valor de E fue de $0.96 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 25B).

Efecto de la asfixia en las relaciones hídricas

Las hojas de las plantas encharcadas presentaron valores similares del potencial hídrico total (Ψ_w) a los de las plantas control a lo largo de todo el experimento (Fig. 26A). El encharcamiento tampoco tuvo efecto en el potencial osmótico de la hoja (Ψ_o), cuyos valores permanecieron a niveles similares en plantas control y en plantas encharcadas a lo largo del periodo experimental (Fig.

26B). En consecuencia, la turgencia de la hoja no se vio afectada por el encharcamiento manteniéndose el contenido hídrico relativo (RWC) con valores similares a los de plantas control (Fig. 27).

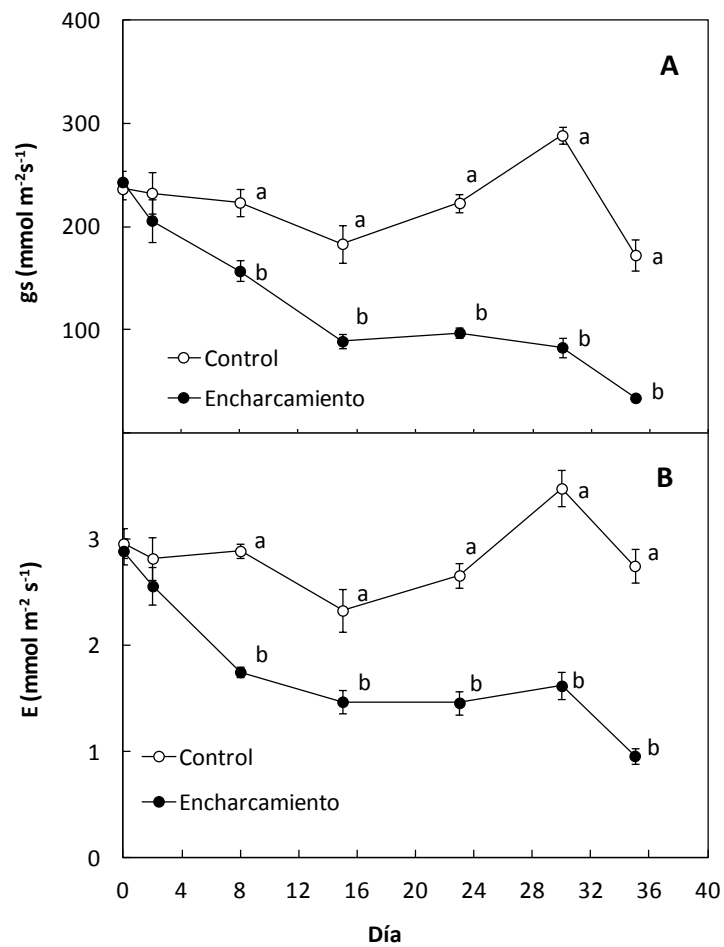


Fig. 25. Conductancia estomática (g_s) y transpiración (E) en citrange Carrizo durante el tratamiento de asfixia. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para cada fecha de muestreo ($P < 0.05$). Cada valor es la media de seis plantas diferentes.

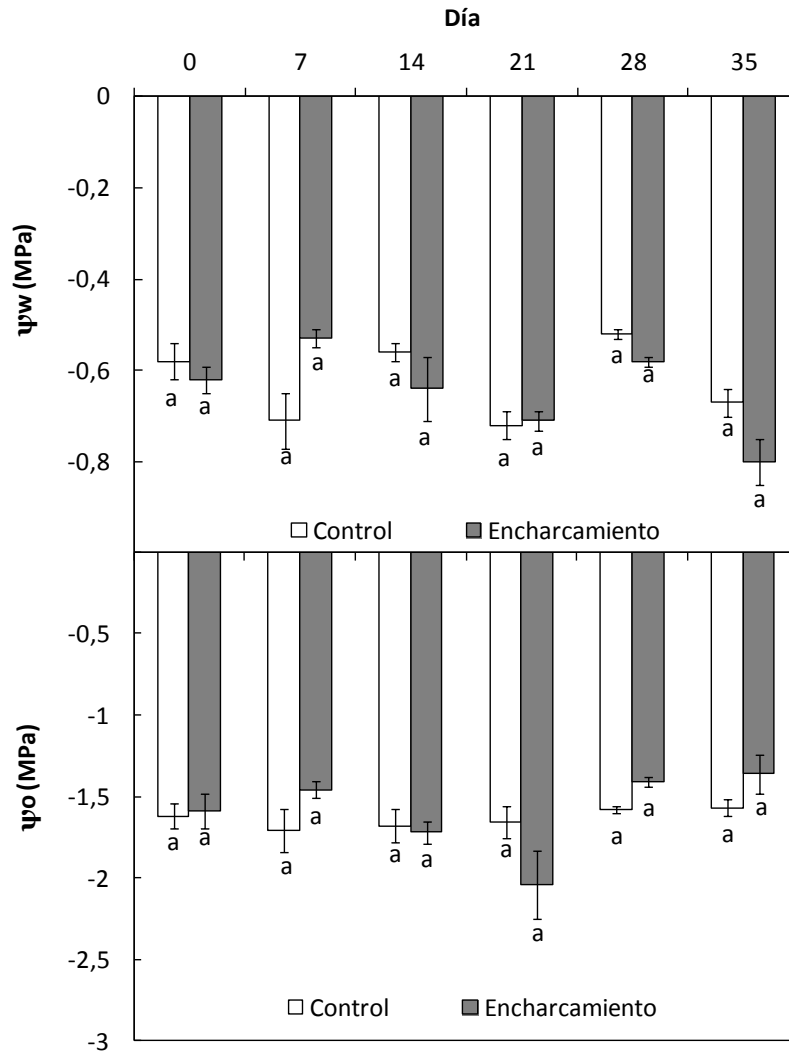


Fig. 26. Potencial hídrico (Ψ_w) y osmótico (Ψ_o) en citrange Carrizo durante el tratamiento de encharcamiento. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) para cada momento de muestreo. Cada valor se determinó a partir de seis plantas independientes.

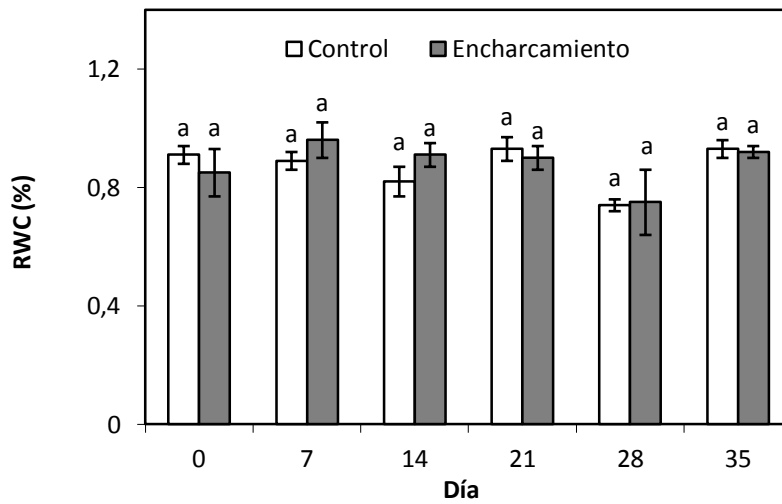


Fig. 27. Contenido relativo de agua (RWC) de citrange Carrizo durante el tratamiento de encharcamiento. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para cada fecha de muestreo. Cada valor se determinó a partir de seis plantas independientes.

Efecto de la asfixia en el contenido de ABA en raíces y en la savia del xilema

El encharcamiento redujo significativamente el contenido de ABA en las raíces más del 90% después de 15 días y fue casi indetectable después de 35 días (Fig. 28B). Además, redujo fuertemente la concentración de ABA en la savia extraída de la raíz, esta hormona estuvo prácticamente ausente al final del experimento (Fig. 28A).

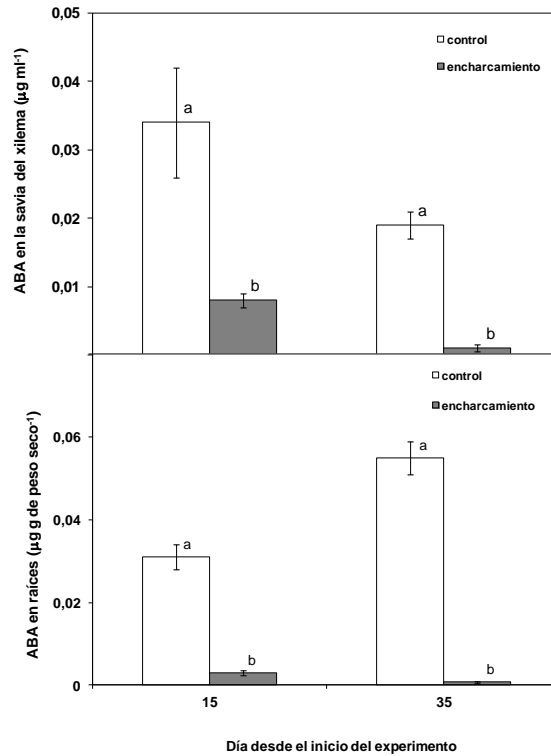


Fig. 28. Concentración de ABA en la savia del xilema (A) y en las raíces (B) de citrange Carrizo 15 y 35 días después del inicio del encharcamiento. Los valores representan el valor medio de tres plantas diferentes; las barras muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para la misma fecha de muestreo.

Efecto de la asfixia en el contenido de ABA en hojas

Desde el inicio del experimento hasta el día 21 no hubo diferencias en el contenido de ABA en hojas entre plantas encharcadas y sin encharcar. A partir de este día, el contenido de ABA en las hojas se incrementó progresivamente en plantas encharcadas. El incremento de ABA fue mayor en hojas adultas que en hojas jóvenes, con valores, el día 35, 2.7 y 2.2 veces mayor, respectivamente, que en las mismas hojas de plantas control. En cambio, permaneció a niveles bajos en plantas no encharcadas, sin diferencias significativas entre hojas adultas y hojas

jóvenes, cuyos valores oscilaron entre 0.2 y 0.4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco de hojas (Fig. 29)

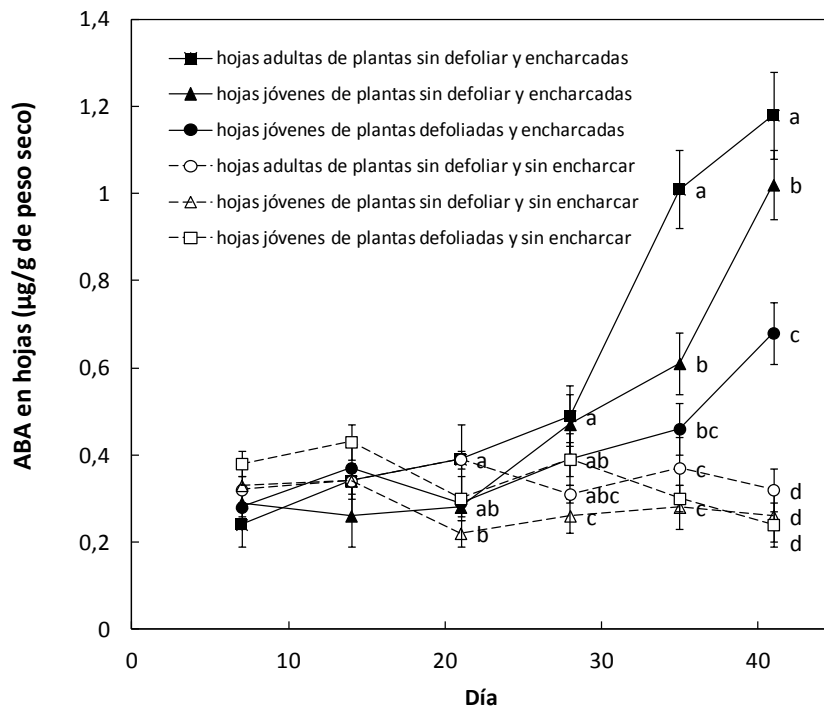


Fig. 29. Concentración de ABA en hojas jóvenes y adultas de plantas defoliadas y plantas intactas de citrange Carrizo durante el tratamiento de encharcamiento. Las barras muestran el error estándar y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para la misma fecha de muestreo. Cada valor se determinó a partir de tres plantas diferentes.

Efecto de la defoliación parcial

En las plantas defoliadas, en las que se eliminaron las hojas adultas antes del encharcamiento, éste causó un menor incremento de ABA en hojas jóvenes comparado con hojas jóvenes de plantas encharcadas sin defoliar (Fig. 29). De este modo, al final del experimento, el contenido de ABA en hojas jóvenes de plantas encharcadas sin defoliar fue de 1.01 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, mientras que en plantas encharcadas y defoliadas el valor máximo fue de 0.68 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco.

La conductancia estomática de las hojas jóvenes de las plantas inundadas se

redujo más del 50% respecto a la de las plantas control (Fig. 30). La defoliación parcial no tuvo ningún efecto en la gs de plantas no encharcadas. Sin embargo, las plantas encharcadas y defoliadas presentaron mayor gs que las plantas encharcadas sin defoliar y similar a la de las plantas control.

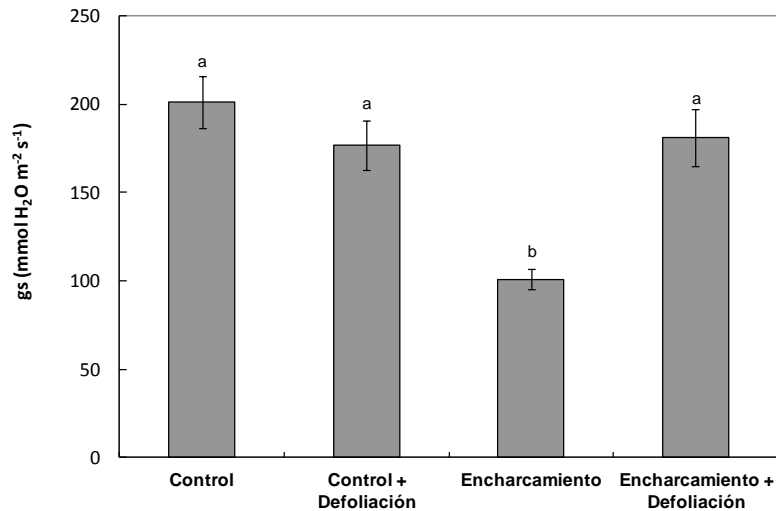


Fig. 30. Efecto del encharcamiento y de la defoliación en la conductancia estomática de hojas jóvenes de citrange Carrizo. Los datos son valores medios, las barras verticales muestran el error estándar y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Las determinaciones se hicieron 35 días después del inicio del tratamiento. Cada valor se determinó a partir de seis plantas independientes.

Efecto de la asfixia en la conductancia hidráulica de la raíz

La conductancia hidráulica de la raíz específica por unidad de área foliar (K_l) se redujo progresivamente en condiciones de asfixia (Fig. 31). La reducción de K_l fue estadísticamente significativa con respecto a las plantas control desde el día 7 del experimento. Tras 35 días de encharcamiento, los valores de K_l se redujeron en un 89% respecto a los de las plantas control.

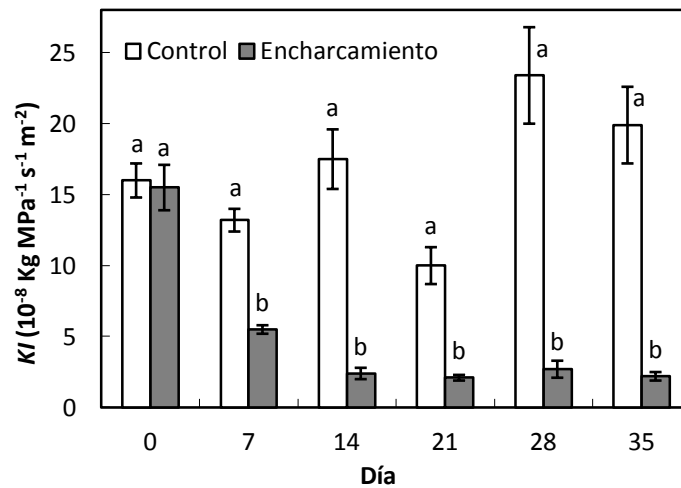


Fig. 31. Conductancia hidráulica de la raíz por unidad de área foliar (Kl) durante el tratamiento de encharcamiento en citrange Carrizo. Las barras verticales muestran el error estándar y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para cada fecha de muestreo. Cada valor se determinó a partir de seis plantas independientes.

Efecto de la asfixia en la transpiración de la planta completa y en el transporte apoplástico

La transpiración de la planta completa (T_p) se midió gravimétricamente en plantas control y en plantas encharcadas (Tabla 12). Al final del experimento (día 35), el encharcamiento redujo significativamente T_p en un 55.8% respecto a las plantas control.

El día 35, el 20.4% del agua se transportó por la raíz de las plantas control por el apoplasto, mientras que este porcentaje se redujo al 11.5% en plantas encharcadas.

Aplicando estos porcentajes a los valores de T_p , se estimaron los valores para los flujos apoplástico y simplástico del agua transportada a través de la raíz en plantas control y en plantas encharcadas. Así, después del día 35 de encharcamiento los flujos estimados de las rutas apoplásticas y simplásticas se redujeron en un 75% y 50% respectivamente, relativo a estos parámetros de las plantas control.

RESULTADOS

Tabla 12. Transpiración de la planta completa (Tp), porcentaje de transporte apoplástico (RATP) y estimación del flujo transportado por vía apoplasto (AF) y simplasto (SF) en plantas de citrange Carrizo control y encharcadas el día 16 y 35. Los datos son la media de seis réplicas. ns (no significativo); * (significativo a $P < 0.05$); ** (significativo a $P < 0.01$).

		Tp	RATP	AF	SF
		(g H ₂ O/h)	(%)	(g H ₂ O/h)	(g H ₂ O/h)
16 d	Control	1.48	21.92	0.32	1.17
	Asfixia	0.82	13.18	0.10	0.71
35 d	Control	1.65	20.41	0.33	1.32
	Asfixia	0.73	11.51	0.08	0.65
		ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA
Periodo		ns	ns	Ns	ns
Tratamiento		**	*	**	*
Periodo x Tratamiento		ns	ns	ns	ns

Efecto de la asfixia en la expresión de acuaporinas

Se evaluó la expresión acuaporinas en raíces finas de plantas control y de plantas encharcadas durante 35 días. Se observó transcripción tanto de PIP1 como de PIP2 en plantas control. Sin embargo, los niveles de transcripción de PIP1 y PIP 2 fueron indetectables en las raíces de plantas encharcadas (Fig. 32).

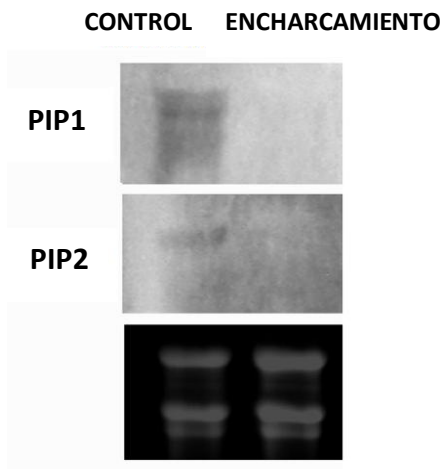


Fig. 32. Análisis Northern para la expresión de PIP1 y PIP2 en plantas de citrange Carrizo control y en plantas encharcadas durante 35 días. Se presenta el gel teñido con bromuro de etidio que demuestra aproximadamente igual carga de muestra intacta. Se realizaron tres determinaciones independientes por tratamiento de diferentes plantas.

Efecto de la asfixia en el pH de la savia del xilema

El fluido extraído de las raíces de plantas inundadas fue significativamente más ácido que el de las plantas control a partir del séptimo día desde el inicio del experimento y progresivamente continuó acidificándose hasta alcanzar, el día 28, un valor de 5.93. Este día, el pH de la savia del xilema presentó un valor de 6.54 en plantas control (Fig. 33).

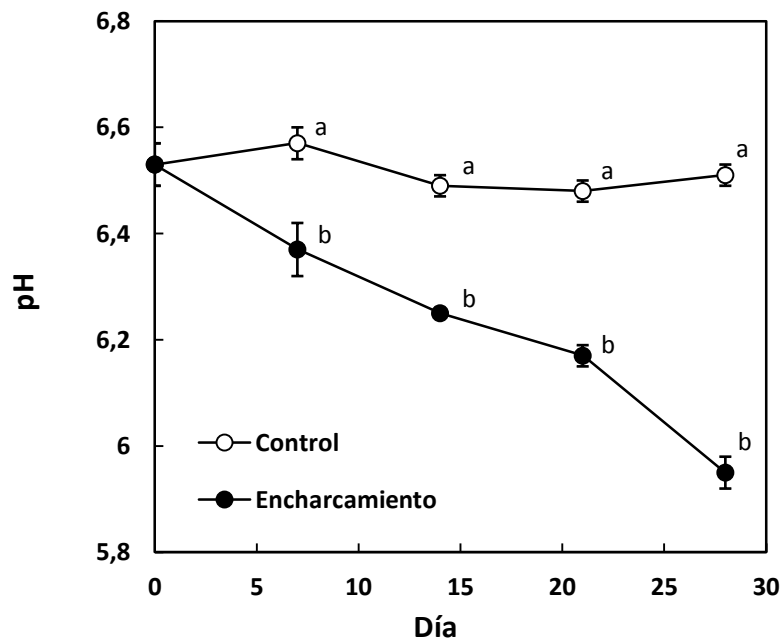


Fig. 33. pH de la savia del xilema extraído de citrange Carrizo durante el tratamiento de encharcamiento. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para cada fecha de muestreo. Se realizaron seis medidas por tratamiento y fecha de muestreo en plantas independientes.

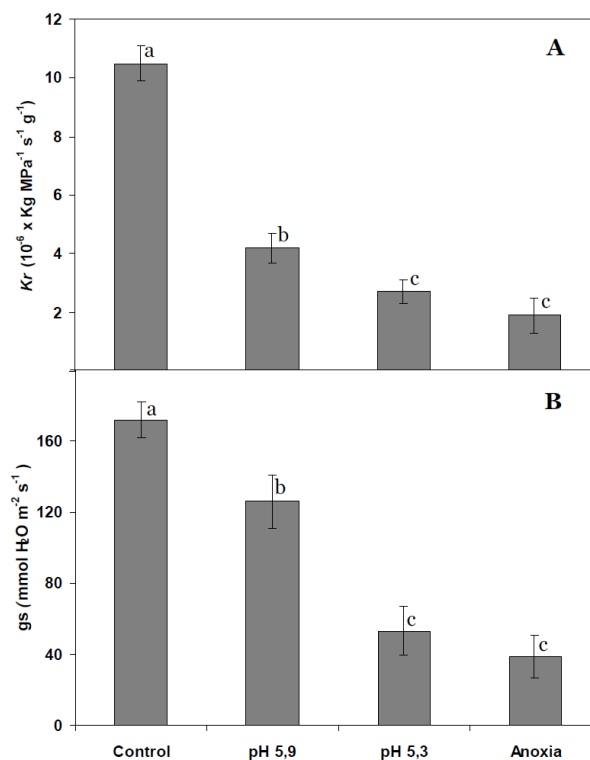
Efecto del pH en la conductancia hidráulica y en la conductancia estomática

Puesto que en plantas encharcadas se observó una acidificación del pH de la savia del xilema, para estudiar el efecto del pH en la conductancia estomática (gs) y en la conductancia hidráulica específica de la raíz (Kr) se realizaron dos experimentos adicionales. En el primero, se transfirieron plantas de CC a vasos sin

sustrato con soluciones nutritivas a diferentes pHs y con o sin aireación: (1) solución nutritiva a pH 6.5 y aireada (control), (2) solución nutritiva a pH 6.5 sin airear, (3) solución nutritiva a pH 5.9 y aireada y (4) solución nutritiva a pH 5.3 y aireada.

A los 7 días de estar las plantas en estas condiciones, los tratamientos ácidos a pH 5.9 (pH equivalente al pH medido en la savia del xilema después de 35 días de encharcamiento) y pH 5.3 redujeron significativamente K_r en un 56.2 y 76.2%, respectivamente, a pesar de que la solución nutritiva se mantuvo aireada, cuando estos valores se compararon con la K_r de las plantas inmersas en la solución nutritiva a pH 6.5 y aireada (control) (Fig. 34A). El tratamiento de anoxia, en el que la solución nutritiva se mantuvo a pH 6.5 pero sin airear, también indujo una disminución de la K_r en un 83.9 % con respecto a los controles que pudo ser debido al descenso del pH de la savia del xilema por el tratamiento de anoxia.

Fig. 34. Cambios en g_s (A) y K_r (B) en plantas de citrange Carrizo en cultivo hidropónico en respuesta a varios tratamientos de la raíz: (1) Solución nutritiva aireada a pH 6.5 [control]; (2) solución nutritiva aireada y acidificada a pH 5.9 con ácido propiónico [pH 5.9]; (3) solución nutritiva aireada y acidificada a pH 5.3 con ácido propiónico [pH 5.3] y (4) solución nutritiva no aireada a pH 6.5 [anoxia]. Las medidas se realizaron 7 días después del inicio de los tratamientos en seis plantas independientes por tratamiento.



La acidificación de la solución nutritiva alrededor de las raíces en plantas causó el cierre de los estomas. A pH 5.3, el cierre estomático fue mayor que a pH 5.9 y similar al cierre estomático inducido por el tratamiento de anoxia (solución nutritiva no aireada a pH 6.5) (Fig. 34B). Las soluciones a pHs 5.9 y 5.3 redujeron gs en un 26.8 y 69.1%, respectivamente, respecto al valor de las plantas control.

En un segundo experimento, hojas arrancadas de plantas de CC se introdujeron en vasos con soluciones tampón ajustadas a los pHs medidos en la savia de plantas control y de plantas encharcadas (6.5 y 5.9, respectivamente). Se midió la conductancia estomática 24 horas después de mantener estas hojas en soluciones tampón. Después de 24 horas en las distintas soluciones, no existió diferencias en la gs de las hojas inmersas a diferente pH con una media de $105.4 \pm 8.2 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a pH 5.9 y $118.3 \pm 10.1 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a pH 6.5.

DISCUSIÓN

1. CARACTERÍSTICAS HIDRÁULICAS DE LOS PATRONES DE CÍTRICOS Y SU RELACIÓN CON LA TRANSPIRACIÓN

El **Estudio 1** de la presente tesis tuvo como objetivo determinar la influencia de la conductancia hidráulica en la transpiración. Los dos genotipos estudiados, *P. trifoliata* (PT) y mandarina Cleopatra (MC), presentaron diferencias morfológicas. MC, que se caracteriza por tener hojas enteras frente a PT que tiene hojas trifoliadas y más pequeñas, presentó los mayores valores de biomasa foliar y ratio peso seco de hojas/peso seco de raíz (H/R). Tanto la tasa de transpiración (E) como la conductancia hidráulica de la raíz (Kr) fue mayor en PT que en MC (Tablas 2 y 3). En otros trabajos también, PT presentó mayor transpiración (Syvertsen y Graham 1985) y conductancia hidráulica de la raíz que MC (Syvertsen y Graham 1985, Zekri y Parsons 1989), coincidiendo con los datos obtenidos en este estudio. Sin embargo, no existe ningún trabajo realizado en cítricos en el que se tenga en cuenta la conductancia hidráulica de la componente aérea (Ka), a pesar de que este parámetro también afecta a la capacidad de transporte de agua de la planta (Solari et al 2006a, Tombesi et al 2010) y por tanto influirá en estado hídrico de la planta, en el crecimiento vegetativo y en el intercambio gaseoso (Solari et al. 2006a, 2006b). En el presente experimento se encontró una relación lineal entre Kr y Ka en ambos genotipos. Aunque es de destacar que esta relación no es igual en los dos tipos de planta. A igualdad de Kr, MC presentó mayores valores de Ka que PT (Fig. 2).

La Kr, tanto en PT como en MC se incrementó linealmente con el incremento de biomasa de la raíz (Fig. 3). También Tyree et al. (1998) observaron valores más elevados de Kr a medida que la biomasa del sistema radicular era mayor en *Miconia argentea* (Sw.) DC., *Apeiba membranacea* Spruce ex Benth, *Pouteria reticulata* (Engl.) Eyma., *Gustavia superba* O. Berg. y *Trichilia tuberculata* (Triana & Planch.) C. DC. observando que las plantas más vigorosas presentaban mayores valores de Kr por unidad de biomasa radical. Las plantas deben invertir una gran cantidad de carbono para el desarrollo de las raíces que favorecerá la captación

de agua y nutrientes. Por tanto un mayor valor de K_r para una determinada biomasa de raíz implica una mayor eficiencia de las raíces en el uso del carbono (Tyree et al 1998). El sistema radical de PT es más eficiente en cuanto este uso, pues a igualdad de biomasa radical presenta mayor valor de K_r lo que supone una mayor capacidad de transporte de agua que MC. Esto podría ser responsable de las mayores tasas de transpiración y de asimilación neta de CO_2 que presenta PT comparado con CM, incluso cuando están injertados (Syvertsen y Yelenosky 1988, Zekri y Parsons 1989, Forner-Giner et al. 2009).

La K_a estuvo relacionada con la biomasa foliar (Fig. 4). Sin embargo, a pesar del mayor valor medio de la K_a de MC (Tabla 3), para una determinada biomasa foliar, la K_a fue mayor en PT. También Tyree et al. (1998) observaron incrementos de K_a con incrementos de biomasa de la componente aérea en las especies citadas anteriormente. Las especies que presentaban una mayor K_a por unidad de biomasa foliar presentaban también mayor tasa de crecimiento y de asimilación de CO_2 . Además hay evidencias de que la K_a limita la conductancia estomática en árboles de *Acer saccharum* Marsh (Yang y Tyree 1993). De esta manera, los mayores valores de K_a para una determinada biomasa foliar en PT podrían estar relacionados con la mayor tasa de transpiración (E) que presentan estas plantas.

La relación de K_r y K_a con la biomasa de la planta y la relación existente entre ambas conductancias (Fig. 2) hace pensar que la conductancia hidráulica pueda influir en el vigor de la planta como han demostrado varios autores (Nardini et al. 2006, Gonçalves et al. 2007, Tombesi et al. 2009), afectando incluso al ratio H/R que es un parámetro específico de cada especie (Maurel et al. 2010). Respecto a esto, se ha demostrado que el crecimiento de la parte aérea en olivo está determinado por la conductancia hidráulica de la raíz (Nardini et al. 2006) y también que ésta es la responsable del vigor en variedades de melocotonero injertadas (Tombesi et al. 2010). Sin embargo, variedades no vigorosas de melocotonero injertadas en patrones vigorosos presentan menor K_a y menor desarrollo que las variedades vigorosas injertadas en los mismos patrones, indicando que la K_a de estas plantas está probablemente determinadas por

factores genéticos (Tombesi et al. 2010). En nuestro estudio, el mayor ratio H/R en MC podría estar relacionado, además de con la diferencia en el tipo de hoja, con la relación K_a/K_r la cual es mayor en MC. Este mayor ratio en MC podría atribuirse a las características anatómicas del xilema de la raíz principal y de la base del tallo. En plantas de MC los valores de estos dos parámetros en la base del tallo fueron 32,4 y 19,5% mayores que en la raíz principal, mientras que en PT fueron únicamente 5,2 y 14,6% mayores, respectivamente (Tabla 5).

Por otra parte, la relación encontrada entre la transpiración de la planta completa (T_p) y K_r presentada en la Fig. 5 también ha sido descrita en cítricos por Syvertsen y Graham (1985) que encontraron una correlación significativa ($r^2=0.63$) entre estos dos parámetros, observando que los patrones con baja K_r presentaban menores valores de T_p que los patrones con altos valores de K_r . Sin embargo, en este estudio, aparentemente se observa que K_a también influye en la transpiración. Estudios previos en patrones de cítricos proponen que las diferencias en el tamaño de las raíces o en el volumen de copa de la variedad injertada afectan a la relación planta-suelo-agua (Castle y Krezdorn 1977, Cohen y Nahor 2002, Cohen et al. 2007, Clearwater et al. 2007, Romero et al. 2006).

Además de la correlación existente entre K_r y T_p observada en este experimento, otras especies han mostrado una fuerte correlación entre la conductancia hidráulica de la planta completa (K_p) y la transpiración, como son la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Meinzer y Grantz 1990) y Eucalyptus (Franks et al. 2007). Aparte, Tsuda y Tyree (2000) observaron en girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Russian mammoth) que la K_p , normalizada dividiéndola entre la superficie foliar osciló a lo largo del día con máximos alcanzados entre las 10:00 y las 15:00 siendo paralela a la evolución de la transpiración por unidad de superficie foliar (E), indicando que K_p varía en función de E . En nuestro experimento la relación de K_p con T_p fue idéntica en ambos genotipos, sugiriendo que la transpiración de la planta depende directamente de la K_p , interviniendo en esta regulación tanto K_r como K_a de acuerdo con Brisson et al. (1993) y Tsuda y

Tyree (2000). Estos últimos autores proponen que K_p es variable y que depende de cambios independientes de K_r y K_a .

También en el **Estudio 2**, realizado en plantas de PT, MC, Forner-Alcaide 5 (FA-5) y Forner-Alcaide 13 (FA-13) injertadas y sin injertar, PT presentó valores de E y de conductancia hidráulica de la raíz por unidad de biomasa de raíz (K_r) mayores que MC (Tabla 4). Con respecto al comportamiento de sus híbridos (FA-5 y FA-13) en estos parámetros, FA-13 presentó características similares a las de PT, mientras que FA-5 presentó características intermedias entre PT y MC. El momento del día y la estación pueden afectar E , especialmente durante las horas más cálidas del día en verano, con máximos valores de E en el intervalo 10.00-12.00 h (Lo Gullo et al. 2007). A pesar de los cambios diarios en las condiciones ambientales, que inducen variaciones en E , existió una elevada correlación ($r^2=0.89$) entre K_r y la media de los valores de E en hojas de cada tipo de planta medidos en condiciones óptimas (Fig. 7). Esto sugiere que el flujo de transpiración máxima es parcialmente dependiente de K_r .

Por otra parte, T_p en patrones sin injertar estuvo fuertemente relacionada con la biomasa foliar (Fig. 1). El efecto de la biomasa en T_p se confirmó en el Estudio 2 en plantas de naranjo Valencia Late injertado en MC, PT, FA-13 y FA-5. Esto parece indicar que la biomasa foliar es probablemente un importante factor determinante de la transpiración que a su vez parece estar relacionado con el hecho de que incrementos en la biomasa foliar supongan incrementos de la K_a . Estos resultados apoyan la dependencia de T_p de la biomasa foliar que está de acuerdo con estudios previos que proponen que el tamaño de la copa influye en la tasa de agua absorbida por los árboles injertados en diferentes patrones (Castle y Krezdorn 1977). Sin embargo, el hecho de que para una determinada biomasa foliar de plantas injertadas, T_p sea mayor cuando la planta está injertada en patrones con mayor K_r (Fig. 8, Tabla 4) confirma que K_r también influye en T_p .

2. FACTORES QUE AFECTAN A LA CONDUCTANCIA HIDRÁULICA EN CÍTRICOS

2.1 Anatomía de la raíz

Las características de los vasos del xilema, aparentemente, determinan la capacidad de transporte de agua de la planta e influyen en el crecimiento vegetativo (Olmstead et al. 2006, Gonçalves et al. 2007, Tombesi et al. 2010). Según muestran los resultados del **Estudio 2**, el diámetro medio del lumen de los vasos del xilema (en secciones transversales de la base del tallo, base de la raíz y raíces pioner) puede estar relacionado con la conductancia hidráulica específica de la raíz (K_r) (Tablas 4 y 5). FA-13 y PT, que tuvieron los mayores valores de K_r , presentaron mayores diámetros de los vasos del xilema que los patrones FA-5 y MC. Los estudios de Syvertsen y Graham (1985) y Vasconcellos y Castle (1994) apuntan a la relación de la densidad y diámetro de los elementos vasculares con la conductancia hidráulica de la raíz en algunos patrones de cítricos. Por otra parte, comunicaciones más recientes han demostrado que en cerezo la combinación de un menor número de vasos con vasos más pequeños en la zona de unión del injerto contribuyen a incrementar la resistencia hidráulica en esta zona induciendo una reducción en el crecimiento de la variedad injertada (Olmstead et al. 2006), y también, que las raíces con mayor diámetro de los vasos del xilema presentaron mayor conductancia hidráulica (Gonçalves et al. 2007, Tombesi et al. 2010).

Adicionalmente, tanto las raíces fibrosas como sus estelas tuvieron significativamente mayor diámetro en FA-5 que en los otros patrones (Tabla 6). Esto supone una superficie externa más amplia de la epidermis y del cilindro vascular en FA-5, lo cual influye en el flujo de agua liberado al xilema y a su vez supone una menor superficie externa de raíces por unidad de peso seco en contacto con el suelo. Se ha visto que los patrones de melocotonero con bajas conductancias hidráulicas tienen menor superficie de raíces finas de contacto con el suelo por unidad de peso seco de raíz que patrones más vigorosos (Solari et al.

2006c). Esto podría tener un efecto directo en la componente radial de la conductancia hidráulica que según Frensch y Steudle (1989) es la componente hidráulica más limitante del transporte de agua por el sistema radical.

También es posible que la epidermis e hipodermis determinen, de manera principal la ruta y grado de absorción del agua e iones por la raíz (Storey y Walker 1987, Walker et al. 1984), afectando a la conductancia hidráulica. Las imágenes de microscopía del presente estudio indicaron que las células epidérmicas e hipodérmicas de las raíces finas de MC y FA-5 fueron mayores que las de PT y FA-13 (Tabla 6). Por tanto, también es posible que un mayor tamaño de las células hipodérmicas de las raíces fibrosas de MC y FA-5 den lugar a una menor conductancia hidráulica de su raíz.

2.2 Efecto de la expresión de acuaporinas

En el **Estudio 4** se evaluó la expresión genética de acuaporinas y la conductancia hidráulica en condiciones de déficit hídrico y de riego normal de diferentes patrones de cítricos. La expresión de acuaporinas fue similar en plantas control de PT y 030115 mientras que las plantas control de MC presentaron una menor expresión de acuaporinas (Fig. 20). Esto podría estar asociado con los menores valores de Kr presentados por las plantas control de MC, aproximadamente 60% inferior a las plantas control de PT y 030115 (Fig. 21).

Estudios realizados en sistemas radicales completos o en partes concretas del sistema radical indican que entre el 60% y el 80% del valor de la conductancia hidráulica de las raíces se debe a la actividad de las acuaporinas (Maggio y Joly 1995, Wan y Zwiazek 1999, Barrowclough et al. 2000, Matre et al. 2001). La represión de la expresión de acuaporinas se asocia con descensos en la conductancia hidráulica de los órganos de la planta (Henzler et al. 1999, Clarkson et al. 2000, North et al. 2004). El patrón 030115 experimentó una reducción de la expresión de PIP en condiciones de estrés hídrico que podría ser la causa de la reducción del 54.85% de su Kr respecto a la de las plantas control. Esto, junto con el hecho de que ni la expresión de acuaporinas ni la Kr se alterasen en MC y PT en

condiciones de estrés hídrico respecto a sus plantas control, confirma la relación entre K_r y expresión de acuaporinas.

Se ha observado que la actividad de transporte de las acuaporinas de la subfamilia PIP2 es más efectiva que la de PIP1, al menos en oocitos de *Xenopus* (Li et al. 2008, Secchi et al. 2007, Moshelion et al. 2002, Chaumont et al. 2000, Fetter et al. 2004, Sakr et al. 2003, Katsuhara et al. 2002, Mahdieh et al. 2008, Johansson et al. 1998, Almeida-Rodriguez et al. 2010). Sin embargo, las acuaporinas PIP1 se han mostrado cruciales en el transporte de agua en raíces de tabaco. Plantas de tabaco con genes antisentido de PIP1 mostraron una marcada reducción de la conductancia hidráulica (Siefritz et al. 2002). De acuerdo con los resultados de este estudio, la menor conductancia hidráulica de MC(C), MC(EH) y 030115(EH) podría ser debida a la menor expresión de PIP1, PIP2 o de ambas simultáneamente.

También el **Estudio 5** realizado con plantas de PT, Citrange Carrizo (CC), y MC confirma la relación de las acuaporinas con la conductancia hidráulica en cítricos. En este estudio se determinó la conductancia hidráulica de la raíz por unidad de biomasa (K_r) de plantas control y plantas sometidas a estrés salino. En plantas control, K_r fue mayor en PT, intermedia en CC e inferior en MC (Tabla 10). Este valor estuvo relacionado con la expresión de acuaporinas en las raíces finas de estas plantas, puesto que su mayor expresión se observó en PT, la menor en MC y fue intermedia en CC (Fig. 22).

Muchos estudios han demostrado que las raíces expuestas a $HgCl_2$ experimentan una reducción de la conductancia hidráulica como consecuencia del bloqueo de las acuaporinas con Hg^{2+} (Javot y Maurel, 2002) el cual es conocido por inhibir específicamente la actividad de algunas acuaporinas (Kammerloher et al. 1994) uniéndose a los residuos de cisteína en el poro acuoso, y así reduciendo el transporte de agua (Daniels et al. 1996). En el **Estudio 5** se determinó el efecto del $HgCl_2$ sobre la K_r y expresión de acuaporinas en CC. La aplicación de $HgCl_2$ en la solución nutritiva durante 14 días redujo K_r en un 56,31% respecto a la K_r de las plantas control (Tabla 11) a pesar de que la expresión de acuaporinas no se alteró

con el tratamiento de HgCl_2 (Fig. 24). Así, asumiendo que el Hg^{2+} podría actuar bloqueando las acuaporinas, su expresión podría no verse afectada, como muestra la Fig. 24, o incluso incrementada con el tratamiento de HgCl_2 . Respecto a esto, estudios realizados en *Pisum sativum*, indicaron que la reducción de la conductancia hidráulica de la raíz por el tratamiento de HgCl_2 fue acompañado por un incremento de la expresión de *PsPIP2-1* en raíces (Beaudette et al. 2007).

Por otra parte, la adaptación de la conductancia hidráulica de la raíz a la alteración de condiciones ambientales podría ser el resultado de cambios en la actividad de las acuaporinas (Tournaire-Roux et al. 2003). En relación con esto, en el **Estudio 6**, en plantas de CC en condiciones de encharcamiento existió una marcada represión de la expresión de acuaporinas (Fig. 32) que pudo ser responsable del descenso del 89% de la conductancia hidráulica respecto a plantas no encharcadas (Fig. 31).

2.3 pH

Los resultados del **Estudio 6** presentados en la Fig. 33 indican que el estrés por encharcamiento disminuye el pH de la savia extraída de las raíces de CC respecto al pH de plantas sin encharcar. Además se observó una disminución gradual de la conductancia hidráulica de las plantas encharcadas a lo largo del experimento que aparentemente estuvo relacionada con la represión de la expresión de acuaporinas (Figs. 31 y 32).

Adicionalmente, en el Estudio 6 se realizó un experimento con plantas de CC transferidas a vasos que contenían soluciones nutritivas a diferentes pHs (6.5, 5.9 y 5.3). En este experimento se observó una reducción tanto de la conductancia hidráulica específica por unidad de biomasa (K_r) como de la conductancia estomática (g_s) a los valores de pH de 5.9 y 5.3 respecto a los valores de K_r y g_s de las plantas inmersas en la solución nutritiva de pH 6.5 (Fig. 34). En algunos estudios se ha observado que la acidosis inducida por el estrés de anoxia inhibe la actividad de las acuaporinas (Ehlert et al. 2009, Tournaire-Roux et al. 2003), de este modo decrece la conductancia hidráulica causando el cierre estomático. Se

ha sugerido que, en condiciones de anaerobiosis, las bombas de protones de las células de la raíz podrían estar inhibidas, causando una acidificación del simplasto (Ratcliffe 1997). Este efecto podría explicar la reducción del pH de la savia del xilema, ya que cerca del 89% del agua transportada en las raíces viene del transporte célula a célula (Tabla 12). La adición de un ácido débil a la solución nutritiva causan la acidificación del citosol de las células del cortex de la raíz (Ehlert et al. 2009), por tanto, el hecho de que las soluciones nutritivas ácidas aplicadas causen una reducción tanto de la g_s como de la K_r , apoya la posibilidad de que la acidificación del pH intracelular en las células de la raíz, inducido por el encharcamiento, origine un descenso de la conductancia de la planta.

3. INFLUENCIA DE LA CONDUCTANCIA HIDRÁULICA EN LA RESPUESTA DE LOS CÍTRICOS A ESTRESSES ABIÓTICOS

3.1 Estrés hídrico

En el **Estudio 3** de la presente tesis se evaluó la respuesta de CC a condiciones de estrés hídrico. Éste, provocó una reducción de la conductancia estomática (Fig. 11A). Sin embargo, en condiciones de estrés hídrico moderado (3-6 días sin irrigación), este efecto fue menor en plantas tratadas previamente con Norfluorazona (NF), que inhibe la síntesis de ABA. Además, en plantas tratadas con NF, la alta tasa de transpiración en condiciones de estrés hídrico estuvo relacionada con un mayor descenso del potencial hídrico de la hoja los días 3 y 6 (Fig. 12). Debido al ajuste osmótico, no se observaron diferencias importantes, entre plantas tratadas o sin tratar con NF, en la turgencia de la hoja ni en el contenido hídrico relativo (RWC) (Figs. 12 y 13).

En algunos estudios, la conductancia hidráulica se altera como consecuencia del estrés hídrico (Cruz et al. 1992, North y Nobel 1996, Lo Gullo et al. 1998) o de cambios en las condiciones ambientales (Matzner y Comstock 2001) y podría estar ajustada a través de la expresión de acuaporinas para mantener el potencial

hídrico de la hoja (Comstock 2002). Sin embargo, en nuestro experimento, la conductancia hidráulica en plantas con estrés hídrico se redujo aproximadamente un 30% únicamente después de nueve días sin riego, pero no en condiciones de estrés hídrico moderado (entre 3-6 días desde la supresión del riego) (Fig. 15). Por tanto, la posibilidad de que el comportamiento de los estomas en condiciones de estrés hídrico esté influenciado por cambios en la conductancia hidráulica no es muy consistente con nuestros resultados.

El estrés hídrico incrementó el contenido de ABA en las raíces contribuyendo al incremento de la concentración de esta hormona en la savia del xilema y también, probablemente, al incremento de la concentración de ABA en las hojas (Fig. 14). Las plantas tratadas con NF y sometidas a estrés hídrico (EH +NF) presentaron menor concentración de ABA en raíces y en la savia del xilema que las plantas sometidas a estrés hídrico sin norfluorazona (EH –NF), aunque no se observó este efecto en las hojas, probablemente debido a que la reducción de los niveles de ABA en el xilema fueron compensados por un mayor flujo en el xilema (puesto que la transpiración de las plantas EH +NF fue mayor que la de las plantas EH –NF) o por la posible síntesis de ABA en hojas estresadas (Zhang y Davies 1987, 1989b, 1990, Zhang et al. 1987, Nambara y Marion-Poll 2005). Según diversos autores, el ABA se sintetiza en grandes cantidades en raíces de plantas sometidas a estrés hídrico, transportándose a las hojas a través del xilema y originando el cierre estomático con independencia de cualquier cambio en el contenido hídrico de la hoja. En este sentido, la producción de ABA en raíces parece proporcionar una señal indicadora de baja disponibilidad de agua en el suelo que posteriormente es captada por la parte aérea (Zhang y Davies 1989a). La respuesta de la hoja, mediante la reducción de la conductancia estomática, implicaría una regulación adicional para evitar la pérdida de agua (Zhang y Davies 1990, Israelsson et al. 2006).

Sin embargo, en nuestros resultados, existe una discrepancia entre la concentración de ABA foliar y la conductancia estomática los días 3 y 6 del experimento (Figs. 11 y 14B). Aunque existió una concentración similar de ABA en

hojas de plantas estresadas, a lo largo del experimento, con independencia del tratamiento con NF, los días 3 y 6, la conductancia estomática fue mayor en plantas EH +NF que en plantas EH -NF. Los resultados parecen indicar que la concentración de ABA en e la savia del xilema, está mejor correlacionada con el cierre estomático, como también muestran Jia y Zhang (1999). El ABA que se encuentra en las hojas es el resultado del diferentes procesos de absorción, compartimentación, acumulación, conjugación y metabolización por el mesófilo y los tejidos epidérmicos. Por tanto, la composición de la corriente del xilema podría modificarse antes de alcanzar las células guarda (Slovic y Hatung 1992a, 1992b). Además, es probable que únicamente la fracción de ABA transportado por el xilema y que se mueve a través del apoplasto de la hoja, el cual permanece disponible para los receptores de las células de guarda, sea transducido en una señal de cierre estomático (Hartung et al. 1998). Sin embargo, no hubo correspondencia entre la conductancia estomática y la concentración de ABA en el xilema en girasol (Schurr et al 1992). Por tanto, en condiciones de estrés hídrico moderado, el aporte de ABA a las hojas podría no ser el único factor responsable de limitar la conductancia estomática inducida por baja disponibilidad de agua en el suelo.

En plantas sometidas a estrés hídrico existió un descenso de la turgencia y del contenido de agua de las hojas nueve días después del inicio del experimento. Las hojas pueden incrementar la concentración de ABA cuando la turgencia o el contenido hídrico disminuye (Zhang y Davies 1989b, Neales y McLeod 1991). Esto está de acuerdo con nuestros resultados donde se observaron bajos niveles del potencial hídrico (Ψ_w) y un menor potencial osmótico (Ψ_o) que no fue suficiente para compensar el potencial de turgencia y, por tanto, las hojas se deshidrataron parcialmente (Figs. 12 y 13). Esto podría haber estimulado la producción de ABA en las hojas, independientemente del tratamiento de NF, que podría ser responsable del cierre estomático.

Además de los cambios observados en la concentración de ABA en plantas estresadas, el pH de la savia del xilema de estas plantas fue más alcalino, desde el

día 2, que las plantas control independientemente del tratamiento de NF. El incremento del pH de la savia del xilema que viene de las raíces, inducido por el estrés hídrico, podría actuar como una señal a través de la cual la información se transmite a la parte aérea de la planta. La alcalinización de la savia del xilema ha sido descrita en numerosas especies en condiciones de estrés hídrico (Hartung y Radin 1989, Gollan et al. 1992, Wilkinson y Davies 1997, 2002, Wilkinson et al. 1998, Bacon et al. 1998, Bahrún et al. 2002). De hecho, se ha sugerido que las alteraciones en el pH de la savia en respuesta al estrés hídrico puedan ser una de las primeras señales en las hojas que conducen al cierre estomático, incluso con bajas reducciones del potencial hídrico del suelo (Bahrún et al. 2002, Sobeih et al. 2004). Además, se ha demostrado, en algunos casos, que el aporte a las hojas o raíces de tampones ajustados a pH similar al del xilema de plantas estresadas puede conducir al cierre estomático (Dodd et al. 2003, Kamaluddin y Zwiazek 2004, Wilkinson et al. 2007, Wilkinson y Davies 2008, Sharp y Davies 2009). En este contexto, el incremento del pH del xilema parece actuar como una señal de estrés hídrico (Netting 2000) vía un mecanismo dependiente del ABA (Bacon et al. 1998, Wilkinson y Davis 1997, 2008, Wilkinson et al. 1998). La fuente de OH⁻ causante del incremento del pH ha sido descrita como una combinación de respuestas fisiológicas, cambios a nivel de membrana (actividad ATPasa), e incluso en alteraciones en la carga del xilema debido a la modificación en la absorción de iones (Netting 2000, Sharp y Davies 2009). Wilkinson (1999) propuso que esta alcalinización de la savia del xilema causa el cierre estomático por diferentes mecanismos: (1) incrementando la concentración de ABA en las hojas a través de una mayor biosíntesis de ABA o de menores procesos de degradación o conjugación (Jia y Zhang 1997, Nambara y Marion-Poll 2005); (2) incrementando la sensibilidad de las células guarda al ABA (Gollan et al. 1992, Schurr et al. 1992, Jia y Davies 2007); (3) modificando la distribución de ABA en los distintos compartimentos para incrementar la concentración cerca de las células guarda (Kaiser y Hartung 1981, Zhang y Outlaw 2001a, 2001b), alterando los flujos de iones a nivel de membrana, y finalmente afectando a la apertura estomática

(Hedrich et al. 2001, Felle y Hanstein 2002).

Incrementos similares en el pH de la savia mostrados en las raíces de cítricos durante estrés hídrico (Fig. 16) han sido descritos en otras especies (Wilkinson 2004). Además, en el Experimento 3b), la introducción de hojas arrancadas de CC en tampones ajustados a pH 7.1 redujeron la gs más del 30% comparado con las que se introdujeron en tampones ajustados a pH 6.4 (Tabla 7). Los pHs de los tampones empleados en este experimento fueron equivalentes a los determinados en la savia extraída de plantas control (pH 6.4) y plantas sometidas a estrés hídrico (pH 7.1). La adición de ABA en rangos fisiológicos (0.2 ppm) a ambas soluciones resultó en un descenso de gs. Aunque fue estadísticamente significativo en ambos casos, este efecto fue más de 1.5 veces mayor a pH 7.1 que a pH 6.4. Resultados comparables se obtuvieron en plantas de tomate y *Forsythia* tratadas con tampones alcalinos en forma de sprays foliares (Wilkinson y Davies 2008). También se ha descrito que soluciones alcalinas disminuyeron la gs cuando se aplicaron a plantas de *Betula papyrifera* (Kamaluddin y Zwiazek 2004), a hojas arrancadas de pimiento (Dodd et al. 2003) y a la parte aérea de plantas de maíz (Wilkinson et al. 2007).

De nuestros resultados, dos hechos parecen evidentes: primero, en cítricos el incremento del pH de la savia del xilema en respuesta al estrés hídrico; y segundo, tampones artificiales a pH 7.1, aplicados a través del pecíolo de hojas arrancadas, son capaces de reducir gs, incluso en ausencia de ABA exógeno. Esto parece indicar que la alcalinización de la savia del xilema por sí sola constituye una señal de la raíz que controla el cierre estomático en plantas en respuesta al déficit hídrico. Los datos presentados también sugieren una interacción entre el pH y contenido de ABA en la savia del xilema, ya que el efecto del ABA añadido a la solución tampón en el cierre estomático fue mucho más fuerte a mayor valor de pH. Además, el comportamiento de las plantas tratadas con NF apoya esta interacción. Plantas con estrés hídrico, tratadas o sin tratar con NF, tuvieron similares incrementos en el pH de la savia de las raíces (Fig. 16). Sin embargo, los valores de gs, fueron bastante diferentes entre ambos grupos de plantas,

indicando el efecto adicional de la concentración de ABA en la savia del xilema (Fig. 14C).

Nuestros resultados coinciden con la posibilidad de que los cambios de pH generados en raíces de plantas sometidas a estrés hídrico son transmitidos por la savia del xilema al apoplasto de la hoja (Jia y Davies 2007), actuando como una señal que dispara los mecanismos que permiten a la parte aérea de la planta reducir la pérdida de agua a través del cierre estomático. En particular, el pH del apoplasto puede, de esta manera, determinar la cantidad de ABA que finalmente alcanza las células guarda (Slovic y Hartung 1992a, 1992b, Wilkinson y Davies 2002, Wilkinson 2004). Este efecto podría explicar las interacciones observadas entre el pH y el ABA.

En resumen, el ABA ha sido considerado un factor esencial en la regulación del cierre estomático en condiciones de estrés hídrico. El papel tanto en raíces y hojas como fuente potencial del incremento de ABA en la savia del xilema en respuesta a estrés hídrico ha sido descrito (Neales y McLeod 1991). Estos autores describen que después de un tratamiento de PEG, el incremento inicial de ABA en la savia puede ser debido a su síntesis en las raíces, mientras que después, el ABA derivado de las hojas podría constituir una mayor contribución a la concentración encontrada en la savia del xilema. De acuerdo con esto, a pesar de no incrementarse el ABA en las raíces en plantas EH +NF sí que existió un incremento significativo de ABA en las hojas.

Por tanto, los resultados de este estudio sugieren un papel complementario del incremento del pH de la savia del xilema y cambios en la concentración de ABA en la señalización del proceso que regula el cierre estomático en plantas de cítricos en condiciones de estrés hídrico. Nuestros resultados también apoyan la propuesta de Zhang y Davies (1989b) que indican que el incremento de la concentración de ABA en el xilema sigue una respuesta secuencial. El inicial incremento se genera en las raíces y el siguiente, al menos parcialmente, se promueve por las hojas estresadas. Ambas respuestas, parecen ser requeridas para incrementar el nivel de protección de la planta frente a estrés hídrico.

3.1.1 Influencia de las características hidráulicas del patrón en la respuesta al estrés hídrico

En el **Estudio 4** de la presente tesis se evaluó la relación de la conductancia hidráulica con la respuesta a condiciones de déficit hídrico en tres patrones de cítricos que presentan distintas respuestas fisiológicas a este estrés abiótico. De los tres patrones estudiados, el único que no redujo el potencial hídrico (Ψ_w) y la tasa neta de asimilación de CO_2 (A_{CO_2}) en condiciones de déficit hídrico, y por tanto puede ser calificado como tolerante a estrés hídrico, fue 030115 coincidiendo además con ser el único patrón en el que la expresión de acuaporinas y la conductancia hidráulica de la raíz (K_r) disminuyeron drásticamente en condiciones de déficit hídrico. Como se ha visto anteriormente, en el apartado 2.2 de la discusión, la reducción de la conductancia hidráulica de este patrón pudo ser debida a la represión de la expresión de acuaporinas. Este descenso de K_r , que disminuye la capacidad de transporte de agua a través de la planta podría ser responsable del cierre estomático y de la disminución de E en estas plantas en condiciones de estrés hídrico, de acuerdo con la relación encontrada entre K_r y E en la Fig. 7.

Por tanto, la mayor tolerancia al estrés hídrico encontrada en 030115 pudo estar relacionada con la represión de la expresión de PIP1 y PIP2 en las raíces finas de este patrón en condiciones de estrés hídrico que conlleva una disminución de la permeabilidad de las membranas al agua implicando un cambio en el comportamiento de este patrón con respecto a su habilidad para suministrar agua. El descenso de la permeabilidad de las membranas al agua permite conservar el contenido de agua en las células y así mantener un estado hídrico adecuado en la planta (Yamada et al. 1995, Johansson et al. 1998, Smart et al. 2001, Suga et al. 2002, Aharon et al. 2003).

El comportamiento de PT en condiciones de estrés hídrico [PT(EH)] podría parecer similar al de 030115 en estas condiciones [030115(EH)], ya que E y g_s disminuyeron el mismo día. Sin embargo, este cierre estomático en PT(EH) podría estar relacionado tanto con el descenso del potencial hídrico (Figs. 18 y 19)

(Romero et al. 2006), con incrementos de la concentración de ABA (Gómez-Cadenas et al. 1996) que podría actuar como regulador del intercambio gaseoso en respuesta al estrés hídrico principalmente a través de su implicación en el cierre estomático evitando la deshidratación de las hojas (Davies y Zhang 1991) o con cambios en el pH de la savia como ocurría en CC en el Estudio 3. Dado que E y gs decrecen aproximadamente el mismo día en PT(EH) y 030115(EH) con un estado similar del contenido hídrico del suelo, este experimento sugiere que el cierre estomático y la reducción de E es más efectivo para mantener un estado hídrico adecuado de la planta si esta respuesta es resultado del descenso de la conductancia hidráulica y no el resultado de otros factores.

El patrón MC ha sido calificado como un patrón moderadamente tolerante al déficit hídrico (Romero et al. 2006, Gimeno et al. 2009). En el presente estudio MC mostró una mejor respuesta a un déficit hídrico moderado que PT. Los niveles de expresión de acuaporinas y la menor Kr en MC que en PT también explican la mayor tolerancia de MC que PT a estrés hídrico puesto que MC en condiciones de aporte de agua normal ya tiene, por sí mismo, menor expresión de acuaporinas y menor Kr que PT(C). Adicionalmente, las evidencias de que MC presenta unas características hidráulicas que le permiten tolerar el déficit hídrico se ve reforzado por el hecho de que MC fue el único patrón de los tres estudiados que no modificó el peso seco de la planta ni el ratio S/R en respuesta al déficit hídrico (Tabla 8) siendo la disminución de este ratio una respuesta común en las plantas frente a dicho estrés.

La reducción observada en el peso seco de la planta en 030115(EH) comparado con el de su control (Tabla 8) puede estar relacionada con la reducción de su Kr de acuerdo con otros estudios que proponen que relativamente bajos valores de Kr están asociados con un menor desarrollo de la componente aérea (Solari et al. 2006a, 2006c, Lovisolo et al. 2007, Tombesi et al. 2010). Sin embargo, la reducción del peso seco de la planta y del ratio S/R en PT podría estar más relacionado con el proceso de estrés experimentado por la planta dado que la reducción de la capacidad fotosintética en cítricos, como resultado de un estrés hídrico, podría ser

responsable de una reducción del crecimiento vegetativo (Romero et al. 2006). Además, como resultado del estrés hídrico algunas hojas de PT(EH) cayeron durante el experimento y no fueron incluidas en las medidas de biomasa; por tanto, parte de la reducción del peso seco de la planta y del ratio S/R en PT(EH) podría ser debido a defoliación. Por el contrario, en MC(EH) y 030015(EH) no se observó defoliación. Esto confirma que la reducción del ratio S/R en 030115(EH) responde a la limitación del aporte de agua como consecuencia de la reducción de Kr. Además, la mayor reducción en el crecimiento total de la planta en condiciones de estrés hídrico ocurrió en 030115(EH). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Aharon et al. (2003), donde la sobreexpresión de PIP1;2 de Arabidopsis en plantas de tabaco resultó en un incremento del vigor de la planta y en un marchitamiento más precoz, en condiciones de estrés hídrico, atribuidos a la pérdida de agua debida al incremento de la permeabilidad de las membranas de sus células.

El patrón 030115 no experimentó una reducción de los valores de A_{CO_2} . A pesar de esto, los valores de E y gs disminuyeron desde el día 42 del experimento. La reducción de gs se tradujo en una disminución estadísticamente significativa de Ci (Tabla 9). La reducción de gs, Ci y E, podría haber originado una reducción en A_{CO_2} puesto que el transporte de agua en las hojas está funcionalmente relacionado con la capacidad fotosintética (Aasamaa y Söber 2001; Brodribb y Holbrook 2003a, Franks 2006). Las hojas con alta capacidad fotosintética necesitan un gran aporte de agua (Voicu y Zwiazek 2009), sin embargo, los cítricos (plantas C3) se caracterizan por tener bajas tasas máximas de asimilación de CO_2 ($<12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) comparadas con otras plantas C3 ($20\text{-}30 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Jifon y Syvertsen 2003). Por tanto es posible que la reducción del CO_2 disponible, debido al cierre estomático en el patrón 030115 no ocasionase una disminución en A_{CO_2} . Además, 030115, a diferencia de PT y MC, no mostró diferencias en el valor SPAD entre hojas de plantas control y plantas estresadas indicando que el déficit hídrico tuvo un menor efecto negativo en las hojas de 030115 que en las de PT y MC.

La reducción de la A_{CO_2} en PT(EH) y MC(EH) fue paralela a la reducción de E y

gs. Esto podría indicar que fueron factores estomáticos los responsables de la reducción de la A_{CO_2} . Sin embargo, PT y MC, al contrario que 030115, no mostraron diferencias significativas en los valores de C_i el día 70 entre plantas control y plantas sometidas a estrés (Tabla 9). El hecho de que PT(EH) y MC(EH) tengan la misma disponibilidad de CO_2 que sus controles sugiere que son factores no estomáticos los responsables de la reducción de A_{CO_2} en los patrones PT y en MC sometidos a estrés. También García-Sánchez et al. (2007) atribuyeron la reducción de A_{CO_2} en MC, sometido a déficit hídrico, a factores no estomáticos. Tanto PT como MC disminuyeron sus valores de A_{CO_2} en condiciones de déficit hídrico sin alterar su expresión de acuaporinas, al contrario que el patrón 030115, lo cual apoya el hecho de que la regulación del contenido de agua en la planta mediante el control de la expresión de acuaporinas garantiza a la planta un estado hídrico adecuado para mantener sus niveles de A_{CO_2} . De acuerdo con Aharon et al. (2003), las plantas pueden tolerar mejor el estrés hídrico si la cantidad total de agua transportada simplásticamente vía acuaporinas se ve reducida.

En *A. thaliana* Ecotype Columbia (Col-0) (Alexandersson et al. 2005), *Agave deserti* Engelm. (North et al. 2004), *Opuntia acanthocarpa* var. Ganderi C.B. Wolf (Cactaceae) (Martre et al. 2001), *Nicotiana glauca* (Graham) (Smart et al. 2001) y en rábano (*Raphanus sativus* L. cv Tokinashi-daikon) (Suga et al. 2002) se ha observado una reducción en la actividad de las acuaporinas en raíces en condiciones de déficit hídrico. Sin embargo, en arroz (*Oriza sativa* L.) (Lu y Neumann 1999) la actividad de los canales de agua aumentó en raíces en condiciones de déficit hídrico.

En *A. thaliana* las PIPs reprimidas con estrés hídrico tienen altos niveles de expresión en raíces en condiciones de riego normal, mientras que las que incrementaron o mantuvieron su expresión la tienen muy baja (Alexandersson et al. 2005). Además, la reapertura de los canales de agua es aparentemente crucial en *A. thaliana* para la recuperación de la absorción de agua después de reponerse el riego (Martre et al. 2002; Alexandersson et al. 2005).

Los estudios en *O. acanthocarpa*, *A. deserti* y *O. sativa*, relacionados con

acuaporinas han sido realizados mediante la inhibición del transporte de agua a través de éstas mediante el uso de mercurio. En *A. deserti* y *O. acanthocarpa*, la adición de HgCl_2 confirmó un descenso de la actividad de las acuaporinas en condiciones de estrés hídrico con respecto a la actividad de éstas en condiciones de humedad. Los estudios realizados para estudiar la respuesta de los canales de agua mediante su bloqueo con mercurio, plantean la duda de si la reducción de la actividad de las acuaporinas por el estrés hídrico se debe realmente a la represión de la expresión de las acuaporinas, a un cierre o estrechamiento del poro existente en los canales de agua o a que éstas se han insensibilizado frente al HgCl_2 (North et al. 2004); además, la permeabilidad de las PIPs puede estar regulada post-transcripcionalmente mediante fosforilación de aminoácidos específicos (Johansson et al. 1996; Johansson et al. 1998) y por el pH citosólico (Tournair-Roux et al. 2003). En este trabajo, al igual que en los de Alexandersson et al. (2005), Smart et al. (2001) y Suga et al. (2002), nuestros resultados muestran una marcada represión en la expresión de acuaporinas en condiciones de estrés hídrico. Sin embargo, esta represión está determinada por el genotipo puesto que sólo la presentó uno de los tres patrones estudiados.

Por tanto la baja expresión de acuaporinas de MC y la represión de su expresión a nivel transcripcional en raíces de 030115 suponen menores valores de la conductancia hidráulica. Esto permite mantener un contenido adecuado de agua en las células y niveles adecuados de potencial hídrico y fotosíntesis en condiciones de estrés hídrico. Así, bajos niveles de acuaporinas y su represión, acompañada de una pérdida de vigor de la planta, podría ser un mecanismo de tolerancia al estrés hídrico en cítricos.

3.2. Salinidad

En el **Estudio 5** se evaluó la relación entre la conductancia hidráulica de la raíz, expresión de acuaporinas, transpiración y acumulación de Cl^- en hojas en condiciones de estrés salino. El análisis de expresión acuaporinas en raíces de plantas no salinizadas, mostró que en plantas de MC la expresión de acuaporinas fue menor que en CC y PT (Fig. 25), resultando en una menor conductancia hidráulica de la raíz por unidad de biomasa radical (Kr) (Tabla 10). En este experimento los valores de Kr aparentemente están relacionados con los valores de E (Tabla 10), de acuerdo con la relación observada en la Fig. 7 entre Kr y E . Así, PT mostró los mayores valores de Kr y E mientras que MC mostró los menores. Además, las plantas de CC que presentaron un valor de Kr intermedio a MC y PT, también mostraron un valor intermedio de E .

Además, los resultados obtenidos en este experimento evidenciaron que un tratamiento salino prolongado en cítricos con relativamente alta concentración externa de NaCl (80 mM) no tuvo efecto en la expresión de acuaporinas (Fig. 22) al contrario que otros estudios en los que sí se observó una alteración en los niveles de expresión éstas en condiciones de salinidad (Carvajal et al. 1999, 2000, Martínez-Ballesta et al. 2000, Yamada et al. 1995). A pesar de no alterarse la expresión de acuaporinas, el tratamiento salino redujo Kr y E en todos los genotipos, que mantuvieron el mismo orden descrito anteriormente con respecto a estos parámetros.

En plantas de CC, el tratamiento con iones Hg^{2+} en ausencia de sal redujo Kr y E en la misma magnitud en que lo hizo el tratamiento con 200 mM NaCl (Tabla 11). Sin embargo, con la aplicación del tratamiento conjunto con NaCl y HgCl_2 , estos parámetros se redujeron significativamente respecto al tratamiento con NaCl pero no respecto al tratamiento con HgCl_2 . Por otra parte, el descenso de Kr inducido por el NaCl, que aparentemente no está relacionado con la expresión de acuaporinas, podría ser resultado de la inhibición de la actividad de las PIPs por el tratamiento salino. Los datos de la Tabla 11 no permiten descartar esta posibilidad, puesto que tanto Kr como E se redujeron. Por el contrario, Martínez-

Ballesta et al. (2003) confirmaron que la reducción de la conductancia hidráulica de la raíz en plantas de *Arabidopsis* tratadas con NaCl podría estar fuertemente relacionada con la represión de la expresión de acuaporinas.

Alternativamente, la reducción de K_r por la salinidad podría estar causada por cambios anatómicos en raíces estresadas por salinidad. La Figura 23 muestra el incremento de la suberización de las paredes de las células hipodérmicas en plantas de CC sometidas a estrés salino. De acuerdo con esto, Walker et al. (1984), observaron un incremento en la suberización de la hipodermis en los ápices de las raíces de cítricos tratados con sal. El desarrollo de paredes suberificadas en las células hipodérmicas podría bloquear los plasmodesmos, restringir el movimiento simplástico de agua e iones y, por tanto, disminuir la conductancia hidráulica de la raíz (Walker et al. 1984, Story y Walker 1987). Estos autores sugieren que el estado de las paredes celulares de la hipodermis podría ser de primordial importancia en determinar las rutas y probablemente la cantidad de agua e iones absorbidos en raíces de cítricos sometidos a salinidad.

De acuerdo con los datos de la Tabla 10, los valores de E aparentemente están relacionados con la concentración de Cl^- en las hojas de plantas salinizadas. Además, los tratamientos de Hg^{2+} redujeron significativamente la concentración de Cl^- en plantas estresadas por sal, probablemente a través de la reducción del agua transportada causada por la inhibición de las acuaporinas (Tabla 11). Esta propuesta está apoyada por la relación existente entre la acumulación de cloruro en las hojas y la tasa de transpiración, tal y como sugirieron Moya et al. (2003).

De esta manera, las diferencias entre los genotipos de cítricos en la expresión de acuaporinas aparentemente afecta a la exclusión de Cl^- de las hojas, determinando así su tolerancia a la salinidad. Probablemente, este efecto es debido a la influencia de las acuaporinas en la conductancia hidráulica de la raíz que controlan el movimiento del agua. Sin embargo, un largo tratamiento de sal no afectó a la expresión de PIP en raíces de cítricos aunque la salinidad redujo la transpiración y la conductancia hidráulica por otros mecanismos.

3.3. Asfixia

En el **Estudio 6**, en plantas de CC sometidas a encharcamiento, se observó un rápido descenso en la tasa de transpiración ligado al cierre estomático (Fig. 25). La relación del ABA con el cierre estomático en condiciones de encharcamiento ha sido descrita en algunas especies (Ahmed et al. 2006, Jackson y Hall 1987, Neuman y Smith 1991, Zhang y Zhang 1994). Sin embargo, el rápido cierre estomático en las plantas de CC encharcadas no parece estar inducido por el ABA, ya que se observaron reducciones significativas de la conductancia estomática desde la primera semana del experimento, mientras que el incremento de ABA en hojas se detectó 21 días después del inicio del tratamiento (Fig. 29). De este modo, el ABA de las hojas podría actuar únicamente en la reducción de la conductancia estomática durante la última parte del experimento. Además, es muy poco probable que el cierre de los estomas en las hojas de plantas de CC encharcadas resulte de la translocación de ABA de las raíces a la parte aérea, ya que los niveles de ABA en raíces de CC encharcados fueron menores que en raíces de plantas control (Fig. 28B) de acuerdo con otros estudios clásicos (Jackson et al. 1988) y con otros más recientes realizados en especies de cítricos (Arbona y Gómez-Cadenas 2008). Esto, además, está reforzado por el hecho de que el encharcamiento, a su vez, redujo la concentración de ABA en la savia del xilema con respecto al de las plantas control (Fig. 28A).

Los resultados del experimento muestran que, aparentemente, parte del ABA se produce en las hojas viejas de las plantas de CC y se transporta a las hojas jóvenes. Los resultados del tratamiento de defoliación realizado refuerzan esta hipótesis ya que las hojas jóvenes de plantas encharcadas y defoliadas, que mostraron menores cantidades de ABA que las hojas jóvenes de plantas encharcadas sin defoliar (Fig. 29) también incrementaron la conductancia estomática (Fig. 30). Estos resultados están de acuerdo con otros presentados por Zhang y Zhang (1994) que indican que, en plantas encharcadas de guisante, las hojas jóvenes podrían estar protegidas del marchitamiento mediante el ABA producido en las hojas adultas. Resultados previos han mostrado también que el

encharcamiento por sí mismo no causa la producción de ABA en las raíces (Jackson et al. 1987, Zhang y Zhang 1994).

Puesto que es improbable que la marcada reducción de la conductancia estomática en plantas de CC en condiciones de encharcamiento esté relacionado con el ABA, existe la posibilidad de que la reducción de g_s esté relacionada con un descenso de la conductancia hidráulica de la raíz, que puede estar afectada por la anoxia (Birner y Steudle 1993) y representa, para la planta, la mayor barrera de resistencia al flujo del agua, después de los estomas (Steudle y Peterson 1998). Algunos estudios apoyan la hipótesis de que el cierre de estomas en las hojas de plantas encharcadas está causado por la reducción asociada de la conductancia hidráulica (Andersen et al. 1984, Davies y Flore 1986, Else et al. 1995, 2001). Al final del experimento (día 35) la conductancia hidráulica de plantas de CC se redujo aproximadamente en un 89% (Fig. 31), mientras que la conductancia estomática se redujo en un 80% (Fig 25A). También Syvertsen et al. (1983) observaron un descenso en la conductancia hidráulica de la raíz en plantas encharcadas de cítricos junto con un descenso de la conductancia estomática.

La reducción en la conductancia hidráulica en condiciones de anaerobiosis podría inducir estrés hídrico en algunas plantas, causando una pérdida de turgencia de las hojas y disminuyendo la conductancia estomática (Andersen et al. 1984, Else et al. 2001). Por el contrario, muchos estudios han mostrado que, en muchas especies, el encharcamiento no causa un déficit hídrico en la hoja, y por lo tanto, el cierre estomático inducido por el encharcamiento, no puede verse asociado con una reducción de la turgencia de la hoja o del potencial hídrico de éstas (Arbona et al. 2008, Blanke y Cooke 2004, Bradford y Hsiao 1982, Else et al. 1996, García-Sánchez et al. 2007, Jackson et al. 1978, Jackson y Hall 1987, Pereira y Kozlowski 1977). Por otra parte Else et al. (2009), presentaron evidencias de que un descenso del potencial hídrico de la hoja no es necesariamente responsable del cierre de los estomas en las plantas de tomate. Por otra parte, la respuesta de la conductancia hidráulica de la raíz a condiciones ambientales podría contribuir a estabilizar el potencial hídrico, reduciendo la tensión y la vulnerabilidad a

cavitación del xilema (Comstock 2002).

Nuestros resultados muestran que, a lo largo de todo el experimento, el potencial hídrico de las hojas de plantas de CC fueron similares en plantas encharcadas y en plantas control (Fig. 26A). También, el RWC mantuvo niveles similares en plantas encharcadas y control a lo largo del periodo de encharcamiento (Fig. 27) y, por tanto, el cierre estomático no puede estar asociado con un déficit hídrico resultado de la reducción de la conductancia hidráulica de la raíz. Con nuestras observaciones, el marchitamiento de las hojas ocurrió más tarde (generalmente después de 60 días de encharcamiento) cuando las condiciones de encharcamiento condujeron a la pudrición de las raíces por un incremento de la susceptibilidad del huésped a los hongos del suelo. Nuestros resultados, que demuestran que los componentes del potencial hídrico de la hoja no cambiaron durante el periodo de encharcamiento, confirman el papel adaptativo del cierre estomático en contrarrestar la deshidratación de la hoja que podría estar potencialmente causada por una reducción de la conductancia hidráulica de la raíz en raíces encharcadas (Else et al. 2009).

La adaptación de la conductancia hidráulica de la raíz a la alteración de condiciones ambientales podría resultar de cambios en la actividad de las acuaporinas (Tournaire-Roux et al. 2003). Apoyando esto, nuestros resultados mostraron que la expresión de genes PIP1 y PIP2 se redujo drásticamente por la anoxia (Fig. 32) en paralelo a la reducción del 89% de la conductancia hidráulica (Fig. 31). El modelo propuesto para el transporte de agua en la raíz (Steudle y Peterson 1998), se basa en la contribución variable de las rutas transmembrana y apoplástica al flujo completo de agua, con las acuaporinas envueltas únicamente en la regulación de la primera ruta. En nuestro experimento, la transpiración de la planta completa se redujo en un 55.8% después de 35 d de encharcamiento (Tabla 12), mientras que las acuaporinas estudiadas prácticamente desaparecieron. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la proporción de agua transportada controlada por acuaporinas está limitada (Neuman y Smith 1991). Martínez-Ballesta et al. (2003) observaron que la aplicación de mercurio, que inhibe

específicamente la actividad de las acuaporinas (Maggio y Joly 1995), en plantas de *Arabidopsis* redujo la conductancia hidráulica de la raíz e incrementó el porcentaje de transporte apoplástico. Sin embargo, en plantas de CC encharcadas el porcentaje de transporte apoplástico se vio también reducido en un 43.6%, que resultó en una reducción del 75.8% del agua total aportada por el apoplasto de la raíz al flujo transpiracional, relativo a plantas control (Tabla 12). Este efecto podría ser explicado por el descenso de la conductancia hidráulica y/o por el cierre estomático.

Por otra parte, los resultados presentados en la Fig. 33 indican que el estrés por encharcamiento disminuye el pH del fluido extraído de las raíces de cítricos. Por el contrario, otros estudios (Else et al. 2006, Jackson et al. 2003), mostraron un incremento en el pH de la savia del xilema de plantas de tomate encharcadas con respecto a plantas sin encharcar. En el experimento realizado con hojas arrancadas introducidas en tampones a pH 5.9 y 6.5, el tampón ajustado a un pH equivalente al medido en la savia del xilema extraído de plantas encharcadas (pH 5.9), no redujo la g_s cuando se comparó con un tampón ajustado a pH 6.5, que es el valor de pH de la savia del xilema de las plantas control. Sin embargo, las plantas de CC con el sistema radicular sumergido en soluciones ácidas a pHs 5.9 y 5.3 sin sustrato presentaron menor K_r y g_s que las plantas a pH 6.5 (Fig. 34).

De nuestros datos, dos hechos parecen ser evidentes: primero, que el pH del fluido del xilema en citrange Carrizo decrece en respuesta al encharcamiento y segundo, que las soluciones con pH relativamente bajo, aplicadas a través de la raíz pueden reducir g_s . Por tanto, la acidosis inducida por el estrés de anoxia inhibe la actividad de las acuaporinas (Ehlert et al. 2009, Tournaire-Roux et al. 2003), de este modo decrece la conductancia hidráulica que resulta en el cierre estomático. En este caso, las plantas de CC podrían regular muy eficientemente el cierre de los estomas en respuesta a pequeños déficits hídricos generados por el descenso de la conductancia hidráulica, así ajustando las pérdidas por evaporación con la capacidad de absorción de agua por las raíces. El hecho de que los tampones ácidos aplicados a plantas completas a través de las raíces causen

DISCUSIÓN

una reducción tanto en g_s como en K_r , apoya esta posibilidad. Por otro lado, ni el incremento de la concentración de ABA en las hojas ni el incremento del transporte de ABA de las raíces a la parte aérea son la causa del inicial cierre de los estomas en plantas encharcadas, aunque el ABA generado por las hojas puede tener un papel en la regulación del cierre estomático en estados avanzados del estrés por encharcamiento.

CONCLUSIONES

No existen diferencias en la conductancia hidráulica de la raíz, específica por unidad de biomasa radical, de un mismo patrón entre plantas injertadas y sin injertar. Mayores valores de este parámetro se relacionan con mayores tasas de transpiración por unidad de superficie foliar.

La transpiración total de la planta se relaciona linealmente con la conductancia hidráulica de la planta completa que depende tanto de la conductancia hidráulica de la raíz como de la conductancia hidráulica de la componente aérea.

La conductancia hidráulica de la raíz se incrementa a medida que aumenta la biomasa del sistema radical y se relaciona positiva y linealmente con la transpiración de la planta.

Existe una relación positiva entre la biomasa foliar y la transpiración total de la planta así como entre la biomasa foliar y la conductancia hidráulica de la componente aérea. Esta última también modula la transpiración de la planta.

El diámetro medio del lumen de los vasos del xilema está relacionado con la conductancia hidráulica de la raíz específica por unidad de biomasa radical (K_r) en los patrones *P. trifoliata*, mandarino Cleopatra, Forner Alcaide 5 y Forner Alcaide 13. Los diámetros mayores se asocian con los mayores valores de K_r .

Los niveles de expresión de acuaporinas se relacionan con diferencias, entre patrones, en la conductancia hidráulica de la raíz. Raíces con un desarrollo similar de los patrones *P. trifoliata* y 030115, con niveles de expresión de acuaporinas similares, no presentan diferencias en su conductancia hidráulica. Citrange Carrizo, con niveles inferiores a *P. trifoliata*, presenta menor K_r que éste. Mandarino Cleopatra presenta menores niveles de expresión de acuaporinas y menor capacidad de transporte de agua que *P. trifoliata*, 030115 y citrange Carrizo.

CONCLUSIONES

En un determinado patrón, la represión de la expresión de acuaporinas supone una reducción en la conductancia hidráulica. Tanto la reducción de la conductancia hidráulica del patrón 030115 en condiciones de estrés hídrico como la de citrange Carrizo en condiciones de asfixia se asociaron con una menor expresión de acuaporinas en estas condiciones.

La acidificación de la savia del xilema se asocia con una reducción de la conductancia hidráulica de la raíz.

Las características hidráulicas del patrón determinan la respuesta de la planta frente a estrés hídrico. La baja expresión de acuaporinas de mandarina Cleopatra y la represión de su expresión en raíces de 030115 suponen menores valores de la conductancia hidráulica. Esto permite mantener un contenido adecuado de agua en las células y niveles adecuados de potencial hídrico y fotosíntesis en condiciones de estrés hídrico. De esta manera, niveles bajos de expresión de acuaporinas o su represión, acompañada de una pérdida de vigor de la planta supone un mecanismo de tolerancia al estrés hídrico en cítricos.

En condiciones de estrés hídrico, la señalización del proceso que regula el cierre estomático en plantas de citrange Carrizo no está relacionada con cambios en la conductancia hidráulica. Sin embargo, el incremento del pH de la savia del xilema y la concentración de ABA en este fluido actúan de manera complementaria en esta señalización. El incremento de la concentración de ABA en el xilema sigue una respuesta secuencial. El incremento inicial es promovido por la raíz y el siguiente, al menos parcialmente, es generado por las hojas estresadas.

En condiciones de salinidad, la diferencia en la expresión de acuaporinas entre genotipos de cítricos afecta a la exclusión de cloruro de las hojas, determinando así su tolerancia a la salinidad. Este efecto es debido a la influencia de las acuaporinas en la conductancia hidráulica de la raíz. Sin embargo, un tratamiento

salino no afecta a su expresión a pesar de que reduce la transpiración y la conductancia hidráulica. En citrange Carrizo esta reducción se atribuye a la mayor suberización de la hipodermis en estas condiciones.

La acidosis inducida por el estrés de anoxia inhibe la actividad de las acuaporinas de este modo decrece la conductancia hidráulica provocando el cierre estomático. Por otro lado, ni el incremento de la concentración de ABA en las hojas ni el incremento del transporte de ABA de las raíces a la parte aérea son la causa del inicial cierre de los estomas en plantas encharcadas, aunque el ABA generado por las hojas puede tener un papel en la regulación del cierre estomático en estados avanzados del estrés por encharcamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Aasamaa K, Söber A (2001) Hydraulic conductance and stomatal sensitivity to changes of leaf water status in six deciduous tree species. *Biol Plant* 44:65–73
- Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ (1993) Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am J Physiol* 261:F461
- Agustí M (2000). Patrones. Capítulo 16. En: *Citricultura*. Ed. Mundi Prensa. Madrid. España. pp 325-343
- Agustí J, Zapater M, Iglesias DJ, Cercos M, Tadeo FR, Talón M (2007) Differential expression of putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases and abscisic acid accumulation in water stressed vegetative and reproductive tissues of citrus. *Plant Sci* 172:85-94
- Aharon R, Shahak Y, Wininger S, Bendov R, Kapulnik Y, Galili G (2003) Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* 15:439–447
- Ahmed S, Nawata E, Sakuratani T (2006) Changes of endogenous ABA and ACC, and their correlations to photosynthesis and water relations in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczak cv. KPS1) during waterlogging. *Environ Exp Bot* 57:278-284
- Albrigo LG (1977) Rootstocks affect Valencia orange fruit quality and water balance. *Proc Int Soc Citriculture* 1:62-65 Orlando, Florida
- Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol* 59:469–484
- Almeida-Rodríguez AM, Cooke JEK, Yeh F, Zwiazek JJ (2010) Functional characterization of drought-responsive aquaporins in *Populus balsamifera* and *Populus simonii* x *balsamifera* clones with different drought resistance strategies. *Physiol Plant* 140:321–333
- Alsina MM, Smart DR, Bauerle T, de Herralde F, Biel C, Stockert C, Negron C, Save R (2011) Seasonal changes of whole root system conductance by a drought-tolerant grape root system. *J Exp Bot* 62, 99–109
- Ancillo G, Gadea J, Forment J, Guerri J, Navarro L (2007) Class prediction of closely related plant varieties using gene expression profiling. *J Exp Bot* 58:1927–1933
- Andersen PC, Lombard PB, Westwood MN (1984) Effect of root anaerobiosis on the water relations of several *Pyrus* species. *Physiol Plant* 62:245-252
- Arbona V, Gómez-Cadenas A (2008) Hormonal modulation of citrus responses to flooding. *J Plant Growth Regul* 27:241-250

BIBLIOGRAFÍA

- Arbona V, Hossain Z, López-Climent MF, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A (2008) Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiol Plant* 132:452-466
- Arbona V, Iglesias DJ, Jacas J, Primo-Millo E, Talón M, Gómez-Cadenas A (2005) Hydrogel substrate amendment alleviates drought effects on young citrus plants. *Plant Soil* 270:73–82
- Azaizeh H, Steudle E (1991) Effects of salinity on water transport of excised maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Physiol* 97: 1136-1145
- Bacon MA, Wilkinson S, Davies WJ (1998) pH-regulated leaf cell expansion in droughted plants is abscisic acid dependent. *Plant Physiol* 118:1507-1515
- Bahrún A, Jensen CR, Asch F, Mogensen VO (2002) Drought-induced changes in xylem pH, ionic composition and ABA concentration act as early signals in field-grown maize (*Zea mays* L.). *J Exp Bot* 53:251-263
- Bailey-Serres J, Voeselek LACJ (2008) Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annu Rev Plant Biol* 59:313-339
- Bañuls J, Primo-Millo E (1992) Effects of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of citrus plants. *Physiol Plant* 86:115–123.
- Bañuls J, Primo-Millo E (1995) Effects of salinity on some citrus scion-rootstock combinations. *Ann Bot London* 76:97–102.
- Bañuls J, Serna MD, Legaz F, Talón M, Primo-Millo E (1997) Growth and gas exchange parameters of citrus plants stressed with different salts. *J Plant Physiol* 150:194–199
- Bar-Joseph M, Marcus MR, Lee RF (1989) The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Ann Rev Phyto* 27:291-316
- Barrowclough DE, Peterson CA, Steudle E (2000) Radial hydraulic conductivity along developing onion roots. *J Exp Bot* 51:547–557
- Barry GH, Castle WS, Davis FS (2004) Rootstocks and plant water relations affect sugar accumulation of citrus fruit via osmotic adjustment. *J Am Soc Hort Sci* 129:881–889.
- Beaudette PC, Chlup M, Yee J, Emery RJN (2007) Relationships of root conductivity and aquaporin gene expression in *Pisum sativum*: diurnal patterns and the response to HgCl₂ and ABA. *J Exp Bot* 58:1291–1300
- Behboudian MH, Törökfalvy E, Walker RR (1986) Effects of salinity on ionic content, water relations and gas exchange parameters in some citrus scion-rootstocks combinations. *Scientia Hort* 28:106-116

- Birner TP, Steudle E (1993) Effects of anaerobic conditions on water and solute relations and on active transport in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta* 190: 474-483
- Blanke MM, Cooke DT (2004) Effects of flooding and drought on stomatal activity, transpiration, photosynthesis, water potential and water channel activity in strawberry stolons and leaves. *Plant Growth Regul* 42:153-160
- Bou F (1979) Estudio sobre el naranjo, limonero, cidro y otros árboles de la familia de las Aurantiáceas que se cultivan en la provincia de Castellón. F. Segarra (eds.) Castellón, España
- Boursiac Y, Chen S, Luu D-T, Sorieul M, Van den Dries M, Maurel C (2005) Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol* 139:790–805
- Bradford KJ, Hsiao TC (1982) Stomatal behaviour and water relations of waterlogged tomato plants. *Plant Physiol* 70:1508-1513
- Brakke MP, Allen LH (1995) Gas exchange of Citrus seedlings at different temperatures, vapor-pressure deficits, and soil water contents. *J Am Soc Hortic Sci* 120:497–504.
- Brisson N, Olioso A, Clastre P (1993) Daily transpiration of field soybeans as related to hydraulic conductance, root distribution, soil potential and midday leaf potential. *Plant Soil* 154:227-237
- Brodribb TJ, Holbrook NM (2003a) Changes in leaf hydraulic conductance during leaf shedding in seasonally dry tropical forest. *New Phytol* 158:295–303
- Brodribb TJ, Holbrook NM (2003b) Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. *Plant Physiol* 132:2166–2173
- Camacho-B SE, Kauffman MR, Hall AE (1974) Leaf water potential response to transpiration by citrus. *Physiol Plant* 31:101–105
- Carvajal M, Cerdá A, Martínez V (2000) Does calcium ameliorate the negative effect of NaCl on melon root water transport by regulating aquaporin activity? *New Phytol* 145:439–447
- Carvajal M, Cooke DT, Clarkson DT (1996) Responses of wheat plants to nutrient deprivation may involve the regulation of water-channel function. *Planta* 199:372–381
- Carvajal M, Martínez V, Alcaraz CF (1999) Physiological function of water channels as affected by salinity in roots of paprika pepper. *Physiol Plant* 105:95–101
- Castel JR, Buj A (1990) Response of *Salustiana* oranges to high frequency deficit irrigation. *Irrig Sci* 11:121–127

BIBLIOGRAFÍA

- Castle WS (1987) Citrus rootstocks. En: Rootstocks for Fruits Crops. Rom RC, Carlson RF (eds.) John Wiley and Sons, New York. pp 361-369
- Castle WS, Krezdorn AH (1975) Effect of citrus rootstocks on root distribution and leaf mineral content of "Orlando" Tangelo trees. *J Am Soc Hortic Sci* 100:1-4
- Castle WS, Krezdorn AH (1977) Soil water use and apparent root efficiencies of citrus trees on four rootstocks. *J Am Soc Hortic Sci* 102:403-406
- Castonguay Y, Nadeau P, Simard RR (1993), Effects of flooding on carbohydrate and ABA levels in roots and shoots of alfalfa. *Plant Cell Environ* 16:695-702
- Chaumont F, Barrieu F, Jung R, Chrispeels MJ (2000) Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol* 122:1025-1034
- Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, Müller A (2005) Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 137:209-219
- Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y, Grill E (2006) Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biol* 8:314-325
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E (2007) A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J* 52:167-174
- Clarkson DT, Carvajal M, Henzler T, Waterhouse RN, Smyth AJ, Cooke DT, Steudle E (2000) Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *J Exp Bot* 51:61-70
- Clearwater MJ, Blattmann ZL, Lowe RG (2007) Control of scion vigour by kiwifruit rootstocks is correlated with spring root pressure phenology. *J Exp Bot* 58:1741-1751
- Cochard H, Coll L, Le Roux X, Ameglio T (2002) Unraveling the effects of plant hydraulics on stomatal closure during water stress in walnut. *Plant Physiol* 128:282-290
- Cohen S, Naor A (2002) The effect of three rootstocks on water use, canopy conductance and hydraulic parameters of apple trees and predicting canopy from hydraulic conductance. *Plant Cell Environ* 25:17-28
- Cohen S, Naor A, Bennink J, Avraham G, Tyree M (2007) Hydraulic resistance components of mature apple trees on rootstocks of different vigours. *J Exp Bot* 58:4213-4224
- Cole J (1985) Chloride toxicity in Citrus. *Irrig Sci* 6: 63-71
- Colmer TD, Voesenek LACJ (2009) Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Funct Plant Biol* 36:665-681

- Comstock JP (2002) Hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and transpiration. *J Exp Bot* 53:195-200
- Comstock JP, Mencuccini MM (1998) Control of stomatal conductance by leaf water potential in *Hymenoclea salsola* (T&G), a desert subshrub. *Plant Cell Environ* 21:1029-1038
- Cooper WC (1961) Toxicity and accumulation of salts in citrus trees on various rootstocks in Texas. *Fla St Hort Soc* 74:95-104
- Cooper WC, Peynado A, Shull AV (1954) Screening citrus rootstocks seedlings for tolerance to calcareous soils. *J Rio Grande Valley Hort Soc* 4:100-105
- Cooper WC, Shull AV (1953) Salt tolerance and accumulation of sodium and chloride ions in grapefruit on various rootstocks grown in naturally saline soil. *Proc Rio Grande Valley Horticult Inst* 7:107-117
- Cowan IR (1977) Stomatal behavior and environment. *Adv Bot Res* 4:117-228
- Crocker TE, Bell WD, Bartholic JF (1974) Scholander pressure bomb technique to assess the relative leaf water stress of "Orlando" tangelo scion as influenced by various citrus rootstocks. *HortScience* 9:453-455
- Cruz RT, Jordan WR, Drew MC (1992) Structural changes and associated reduction of hydraulic conductance in roots of *Shorghum bicolor* L. following exposure to water deficit. *Plant Physiol* 99:203-212
- Daniels MJ, Chaumont F, Mirkov TE, Chrispeels MJ (1996) Characterization of a new vacuolar membrane water channel sensitive to mercury at a unique site. *Plant Cell* 8:587-599
- Daniels MJ, Mirkov TE, Chrispeels MJ (1994) The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. *Plant Physiol* 106:1325-1333
- Danielson JÅH, Johanson U (2008) Unexpected complexity of the Aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol* 8:45
- Dat JF, Capelli N, Folzer H, Bourgeade P, Badot PM (2004) Sensing and signaling during plant flooding. *Plant Physiol Biochem* 42:273-282
- Davies FS, Albrigo LG (1994) *Citrus*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK
- Davies FS, Flore JA (1986) Flooding, gas exchange and hydraulic conductivity of highbush blueberry. *Physiol Plant* 67:545-551
- Davies WJ, Zhang J (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu Rev Plant Physiol* 42:55-76

BIBLIOGRAFÍA

- Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 4:215-222
- Diédhiou CJ, Popova OV, Golldack D (2009) Transcript profiling of the salt tolerant *Festuca rubra* ssp. *litoralis* reveals a regulatory network controlling salt acclimatization. *J Plant Physiol* 166, 697-711
- Dodd IC, Tan LP, He J (2003) Do increases in xylem sap pH and/or ABA concentration mediate stomatal closure following nitrate deprivation. *J Exp Bot* 54:1281-1288
- Driver S, Kuniyuki S (1984) *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience* 19:507-509
- Ehlert C, Maurel C, Tardieu F, Simonneau T (2009) Aquaporin-mediated reduction in maize root hydraulic conductivity impacts cell turgor and leaf elongation even without changing transpiration. *Plant Physiol* 150:1093-1104
- Else MA, Coupland D, Dutton L, Jackson MB (2001) Decreased root hydraulic conductivity reduces leaf water potential, initiates stomatal closure and slows leaf expansion in flooded plants of castor oil (*Ricinus communis*) despite diminished delivery of ABA from the roots to shoots in xylem sap. *Physiol Plant* 111:46-54
- Else MA, Davies WJ, Malone M, Jackson MB (1995) A negative hydraulic message from oxygen-deficient roots of tomato plants? Influence of soil flooding on leaf water potential, leaf expansion, and synchrony between stomatal conductance and root hydraulic conductivity. *Plant Physiol* 109:1017-1024
- Else MA, Janowiak F, Atkinson CJ, Jackson MB (2009) Root signals and stomatal closure in relation to photosynthesis, chlorophyll a fluorescence and adventitious rooting of flooded tomato plants. *Ann Bot* 103:313-323
- Else MA, Taylor JM, Atkinson CJ (2006) Anti-transpirant activity in xylem sap from flooded tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants is not due to pH-mediated redistributions of sourced ABA. *J Exp Bot* 57:3349-3357
- Else MA, Tiekstra AE, Croker SJ, Davies WJ, Jackson MB (1996) Stomatal closure in flooded tomato plants involves abscisic acid and a chemically unidentified anti-transpirant in xylem sap. *Plant Physiol* 112:239-247
- Enstone DE, Peterson CA (1998) Effects of exposure to humid air on epidermal viability and suberin deposition in maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Cell Environ* 21:837-844
- Epel BL, Bandurski RS (1990) Apoplastic domains and sub-domains in the shoots of etiolated corn seedlings. *Physiol Plant* 79:599-603
- FAO (2011) Producciones mundiales de cítricos 2010. <http://faostat.fao.org>.
- Fawcett HS, Klotz LJ (1948) Bark shelling of trifoliate orange. *Calif Citrogr* vol. 33 pp 230

- Feichtenberger E, Muntaner AIC de, Rossetti V, Leite YR, Pompeu Jr J, Teófilo Sobrinho J (1978) Estudo comparativo da resistência a *Phytophthora* spp. De quinze seleções de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. com copa de laranja Hamlin de clone nucelar. En: Congresso brasileiro de fruticultura, 4., Salvador, 1977. Anais. Cruz das Almas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1978. p.131-136
- Feichtenberger E, Rossetti V, Pompeu Jr J, Teófilo Sobrinho J, Figueiredo JO de (1992) Evaluation of tolerance to *Phytophthora* species in scion rootstock combinations of citrus in Brazil - A review . International Citrus Congress (7th 1992 Acireale, Italy), Acireale, Italy, International Society of Citriculture. 2:854-858
- Felle HH, Hanstein S (2002) The apoplastic pH of the substomatal cavity of *Vicia faba* leaves and its regulation responding to different stress factors. J Exp Bot 53:73-82
- Fetter K, Van Wilder V, Moshelion M, Chaumont F (2004) Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. Plant Cell 16:215–228
- Fiscus EL, Klute A, Kauffman MR (1983) An interpretation of some whole plant water transport phenomena. Plant Physiol 71:810–817
- Flowers TJ, Colmer TD (2008) Salinity tolerance in halophytes. New Phytol 179:945-963
- Forner JB (1979) Patrones de agrios. Levante agrícola 209:27-37
- Forner JB (1981) Combinaciones patrón injerto en cítricos. Jornadas cítricas andaluzas. Junta de Andalucía. Consellería de Agricultura y Pesca. Málaga.
- Forner JB (1984) Patrones de agrios tolerantes a tristeza. Levante Agrícola. 251-252: 78-90
- Forner JB (1985) Características de los patrones de agrios tolerantes a tristeza. STTA Consellería de Agricultura y Pesca. Generalitat Valenciana 20 pp
- Forner JB, Alcaide A (1994) Últimas investigaciones en patrones tolerantes. El Agricultor Cualificado 0:21-24
- Forner JB, Alcaide A (1997) Últimas investigaciones en patrones tolerantes (1) Comunidad Agraria Valenciana 10:11-14
- Forner JB, García C, Ferquera J (1983) Comportamiento de patrones y variedades de agrios ante situaciones extremas de asfixia radical. I Congreso Mundial de la Asociación de viveristas de Agrios, Valencia (España) 4-10 diciembre 55-65
- Forner JB, Forner-Giner MA, Alcaide A (2003) Forner-Alcaide 5 and Forner-Alcaide 13: two new citrus rootstocks released in Spain. HortScience 38:629–630
- Forner JB, Forner-Giner MA, Alcaide A, Verdejo Lucas S, Sorribas FJ (1996) New hybrids as citrus rootstocks in Spain. Proc Int Soc Citriculture 167-170

BIBLIOGRAFÍA

- Forner-Giner MA, Alcaide A, Primo-Millo E, Forner JB (2003) Performance of “Navelina” orange on 14 rootstocks in Northern Valencia (Spain). *Sci Hortic (Amsterdam)* 98:223–232
- Forner-Giner MA, Legaz F, Primo-Millo E, Forner J (2011) Nutritional responses of citrus rootstocks to salinity: performance of the new hybrids Forner-Alcaide 5 and Forner-Alcaide 13. *J Plant Nut* 34:1437-1452
- Forner-Giner MA, Primo-Millo E, Forner JB (2009) Performance of Forner-Alcaide 5 and Forner-Alcaide 13, hybrids of Cleopatra mandarin × *Poncirus trifoliata*, as salinity-tolerant citrus rootstocks. *J Am Pomol Soc* 63:72–80
- Forrest KL, Bhawe M (2007) Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Funct Integr Genomics* 7:263-289
- Franks PJ (2006) Higher rates of leaf gas exchange are associated with higher leaf hydrodynamic pressure gradients. *Plant Cell Environ* 29:584–593
- Franks PJ, Drake PL, Froend RH (2007) Anisohydric but isohydrodynamic: seasonally constant plant water potential gradient explained by a stomatal control mechanism incorporating plant hydraulic conductance. *Plant Cell Environ* 30:19-30
- Frensch J, Steudle E (1989) Axial and radial hydraulic resistance to roots of maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol* 91:719–726
- Galmés J, Pou A, Alsina MM, Tomás M, Medrano H, Flexas J (2007) Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status. *Planta* 226: 671–681
- García-Sánchez F, Syvertsen JP (2006) Salinity tolerance of Cleopatra mandarin and Carrizo citrange citrus rootstock seedling is affected by CO₂ enrichment during growth. *J Am Soc Hortic Sci* 131:24–31.
- García-Sánchez F, Syvertsen JP, Gimeno V, Botia P, Pérez-Pérez JG (2007) Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. *Physiol Plant* 130:532-542
- Gaskin P, MacMillan J (1991) Discussion of spectra of TMSI ester TMSI ethers. En: Gaskin P, MacMillan J (eds.). *GC-MS of the Gibberellins and Related Compounds: Methodology and a Library of Spectra*. Cantocks Enterprises Ltd, University of Bristol, Bristol.
- Ghassemi F, Jakeman AJ, Nix HA (1995) *Salinisation of Land and Water Resources*. CAB International, Wallingford, England.
- Gilliam JW (1971) Rapid measurement of chloride in plant materials. *Proc Soil Sci Soc Am* 35:512–513

- Gimeno J, Gadea J, Forment J, Pérez-Valle J, Santiago J, Martínez-Godoy MA, Yenush L, Bellés JM, Brumós J, Colmenero-Flores JM, Talón M, Serrano R (2009) Shared and novel molecular responses of mandarin to drought. *Plant Mol Biol* 70:403–409
- Giner B (1983) Tratado completo del naranjo. P Aguilar (ed.) Valencia, España
- Ginestar C, Castel JR (1996) Response of young clementine citrus trees to water stress during different phenological periods. *J Hortic Sci* 71:551–559
- Gollan T, Passioura JB, Munns R (1986) Soil water status affects the stomatal conductance of fully turgid wheat and sunflower leaves. *Aust J Plant Physiol* 13:459–464
- Gollan T, Schurr U, Schulze ED (1992) Stomatal response to drying soil in relation to changes in xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids in, and pH of the xylem sap. *Plant Cell Environ* 15:551–559
- Gómez-Cadenas A, Tadeo FR, Talón M, Primo-Millo E (1996) Leaf abscission induced by ethylene in water stressed intact seedling of Cleopatra Mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol* 112:404–408
- Gonçalves B, Correia CM, Silva AP, Bacelar EA, Santos A, Ferreira H, Moutinho-Pereira JM (2007) Variation in xylem structure and function in roots and stems of scion-rootstock combinations of sweet cherry tree (*Prunus avium* L.). *Trees* 21: 121–130
- González-Altozano P, Castel JR (1999) Regulated deficit irrigation in 'Clementina de Nules' citrus trees. I. Yield and fruit quality effects. *J Hortic Sci Biotechnol* 74:706–713
- González-Mas MC, Llosa MJ, Quijano A y Forner-Giner MA (2009) Rootstock effects on leaf photosynthesis in 'Navelina' trees grown in calcareous soil. *HortScience* 44:280-283
- Gowing DJ, Davies WJ, Jones HG (1990) A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple, *Malus domestica* Borkh. *J Exp Bot* 41:1535–1540
- Graham JH, Syvertsen JP (1984) Influence of VAM on the hydraulic conductivity of roots of two citrus rootstocks. *New Phytol* 97:277–284
- Grant TJ, Moreira S, Salibe AA (1961) Citrus variety reaction to tristeza virus in Brazil when used in various rootstock and scion combinations. *Plant Dis Rep* 45:416-421
- Gupta AB, Sankararamkrishnan R (2009) Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: Characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biol* 9:134
- Hartung W, Radin JW (1989) Abscisic acid in the mesophyll apoplast and in the root xylem sap of water-stressed plants: the significance of pH gradients. *Curr Top Plant Biochem Physiol* 8:110–124

BIBLIOGRAFÍA

- Hartung W, Wilkinson S, Davies WJ (1998) Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. *J Exp Bot* 49:361–367
content in leaves. *Physiol Plant* 116:563–572
- Hedrich R, Neimanis S, Savchenko G, Felle H, Kaiser WM, Heber U (2001) Changes in apoplastic pH and membrane potential in leaves in relation to stomatal responses to CO₂, malate, abscisic acid or interruption of water supply. *Planta* 213:594–601
- Henzler T, Waterhouse RN, Smyth AJ, Carvajal M, Cooke DT, Schäffner AR, Steudle E, Clarkson DT (1999) Diurnal variations in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the roots of *Lotus japonicus*. *Planta* 210:50–60
- Hilgeman RH, Ehrler WL, Everling CE, Sharp FO (1969) Apparent transpiration and internal water stress in Valencia oranges as affected by soil water, season and climate. *Proc First Int Citrus Symp* 3:1713–1724
- Hilgeman RH, Sharp FO (1970) Response of Valencia orange trees to four soil water schedules during 20 years. *J Am Soc Hortic Sci* 95:739–745.
- Hoad GV (1973) Effect of moisture stress on abscisic acid levels in *Ricinus communis* L. with particular reference to phloem exudate. *Planta* 113:367–372
- Hoad GV (1975) Effect of osmotic stress on abscisic acid levels in xylem sap of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Planta* 124:25–29
- Hoad GV (1978) Effect of water stress on abscisic acid levels in white lupin (*Lupinus albus* L.) fruits, leaves and phloem exudate. *Planta* 142:287–290
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water culture method for growing plants without soil. *Calif Agric Exp Sta Circular* 347:1–32
- Huang B, Eissenstat DM (2000) Linking root hydraulic conductivity to anatomy in citrus rootstocks that vary in specific root length. *J Am Soc Hortic Sci* 125:260–265
- Hubbard RM, Ryan MG, Stiller V, Sperry JS (2001) Stomatal conductance and photosynthesis vary linearly with plant hydraulic conductance in ponderosa pine. *Plant Cell Environ* 24:113–121
- Hukin D, Doering-Saad C, Thomas CR, Pritchard J (2002) Sensitivity of cell hydraulic conductivity to mercury is coincident with symplasmic isolation and expression of plasmalemma aquaporin genes in growing maize roots. *Planta* 215:1047–1056
- Iglesias DJ, Lliso I, Tadeo FR, Talón M (2002) Regulation of photosynthesis through source:sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves. *Physiol Plant* 116:563–572

- Irialte-Martel JH, Donadio LC, de Figueiredo JO (1999) Effect of eleven rootstocks on fruit quality and plant development of Tahiti lime. *Revista Brasileira de Fruticultura* 21: 235-238
- Israelsson M, Siegel RS, Young J, Hashimoto M, Iba K, Schoroeder JI (2006) Guard cell ABA and CO₂ signalling network updates and Ca²⁺ sensor priming hypothesis. *Curr Opin Plant Biol* 9:654–663
- Jackson MB, Gales K, Campbell DJ (1978) Effect of waterlogged soil conditions on the production of ethylene and on water relationships in tomato plants. *J Exp Bot* 29:183-193
- Jackson MB, Hall KC (1987) Early stomatal closure in waterlogged pea plants is mediated by abscisic acid in the absence of foliar water deficits. *Plant Cell Environ* 10:121-130
- Jackson MB, Saker LR, Crisp MA, Else MA, Janowiak F (2003) Ionic and pH signaling from roots to shoots of flooded tomato plants in relation to stomatal closure. *Plant Soil* 253:103-113
- Jackson MB, Young S, Hall KC (1988) Are roots a source of abscisic acid for the shoots of flooded pea plants? *J Exp Bot* 39:1631-1637
- Javot H, Maurel C (2002) The role of aquaporins in root water uptake. *Ann Bot* 90:301–313
- Jia WS, Davies WJ (2007) Modification of leaf apoplastic pH in relation to stomatal sensitivity to root-sourced ABA signals. *Plant Physiol* 143:68-77
- Jia WS, Zhang J (1997) Comparison of exportation and metabolism of xylem-delivered ABA in maize leaves at different water status and xylem sap pH. *Plant Growth Regul* 21:43–49
- Jia WS, Zhang J (1999) Stomatal closure is induced rather by prevailing xylem abscisic acid than by accumulated amount of xylem-derived abscisic acid. *Physiol Plant* 106:268–275
- Jifon JL, Syvertsen JP (2003) Moderate shade can increase net gas exchange and reduce photoinhibition in citrus leaves. *Tree Physiol* 23:119–127
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Fraysse L, Weig AR, Kjellbom P (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol* 126:1358–1369
- Johansson I, Larsson C, Ek B, Kjellbom P (1996) The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca²⁺ and apoplastic water potential. *Plant Cell* 8:1181–1191

BIBLIOGRAFÍA

- Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, Kjellbom P (1998) Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* 10:451–459
- Joly RJ (1989) Effects of sodium chloride on the hydraulic conductivity of soybean root systems. *Plant Physiol* 91:1262–1265
- Jover J, Martínez-Alcántara B, Rodríguez-Gamir J, Legaz F, Primo-Millo E, Forner J, Forner-Giner MA (2012) Influence of rootstocks on photosynthesis in Navel orange leaves: effects on growth, yield, and carbohydrate distribution. *Crop Sci* 52:836–848
- Kaiser WM, Hartung W (1981) Uptake and release of abscisic acid by photoautotrophic mesophyll cells, depending on pH gradients. *Plant Physiol* 68:202–206
- Kamaluddin M, Zwiazek JJ (2004) Effects of root medium pH on water transport in paper birch (*Betula papyrifera* Marsh) seedlings in relation to root temperature and abscisic acid treatments. *Tree Physiol* 24:1173–1180
- Kammerloher W, Fischer U, Piechottka GP, Schäffner AR (1994) Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J* 6:187–199
- Katsuhara M, Akiyama Y, Koshio K, Shibasaka M, Kasako K (2002) Functional analysis of water channels in barley roots. *Plant Cell Physiol* 43:885–893
- Kirch HH, Vera-Estrella R, Gollmack D, Quigley F, Michalowski CB, Barkla BJ, Bohnert HJ (2000) Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol* 123:111–124
- Klotz LJ, Bitters WP, DeWolfe TA, Garber MJ (1968) Some factors in resistance of citrus to *Phytophthora* spp. *Plant Dis Rep* 52:952–955
- Kozłowski TT (1997) Responses of Woody Plants to Flooding and Salinity. *Tree Physiology Monograph* No. 1, pp. 1–29
- Kriedmann PE, Barrs HD (1981) Citrus orchards, p. 325–417. En: Kozłowski TT (ed.) *Water Deficits and Plant Growth*. VI. Academic Press, New York
- Lei YB, Yin CY, Li CY (2006) Differences in some morphological, physiological, and biochemical, responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiol Plant* 127:182–191
- Levy Y (1980) Effect of evaporative demand on water relations of *Citrus limon*. *Ann Bot* 46:695–700
- Levy Y, H Bielorai H, Shalhevet J (1978) Long term effects of different irrigation regimes on grapefruit tree development and yield. *J Am Soc Hortic Sci* 103:680–683.

- Levy Y, Shalhevet J, Bielorai H (1979) Effect of irrigation regime and water salinity on grapefruit quality. *J Am Soc Hortic Sci* 104:356–359.
- Levy Y, Syvertsen JP (1981) Water relations of citrus in climates with different evaporative demands. *Proc Int Soc Citriculture. Tokio (Japón)* 2:501-503
- Levy Y, Syvertsen JP (2004) Irrigation water quality and salinity effects in citrus trees. *Hort Rev* 30:37–82.
- Li GW, Peng YH, Yu X, Zhang MH, Cai WM, Sun WN, Su WA (2008) Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice. *J Plant Physiol* 165:1879–1888
- Llosá MJ, Bermejo A, Cano A, Quiñones A, Forner-Giner MA (2009) The citrus rootstocks Cleopatra mandarin, *Poncirus trifoliata*, Forner-Alcaide 5 and Forner-Alcaide 13 vary in susceptibility to iron deficiency chlorosis. *J Am Pomol Soc* 63: 160-167
- Lo Gullo MA, Nardini A, Salleo S, Tyree MT (1998) Changes in root hydraulic conductance (Kr) of *Olea oleaster* seedlings following drought stress and irrigation. *New Phytol* 140:25–31
- Lo Gullo MA, Salleo S, Rosso R, Trifilò P (2003) Drought resistance of 2-year-old saplings of Mediterranean forest trees in the field: relations between water relations, hydraulics and productivity. *Plant Soil* 250:259–272
- Lo Gullo MA, Trifilò P, Raimondo F (2007) Hydraulic characteristics and water relations in pigment-less mutant shoots of an orange tree. *Tree Physiol* 27:209–217
- López-Climent MF, Arbona V, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A (2008) Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus *Environ Exp Bot* 62: 176-184 (2008)
- Lovisolò C, Secchi F, Nardini A, Salleo S, Buffa R, Schubert A (2007) Expression of PIP1 and PIP2 aquaporins is enhanced in olive dwarf genotypes and is related to root and leaf hydraulic conductance. *Physiol Plant* 130:543–551
- Lu Z, Neumann PM (1999) Water stress inhibits hydraulic conductance and leaf growth in rice seedlings but not the transport of water via mercury-sensitive water channels in the root. *Plant Physiol* 120:143–151
- Luu DT, Maurel C (2005) Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell Environ* 28:85–96
- Maas EV (1993) Salinity and citriculture. *Tree Physiol* 12:195-216
- Maas EV, Hoffman GJ (1977) Crop salt tolerance current assessment. *ASCE J Irrig Drain* 103:115–134

BIBLIOGRAFÍA

- Maggio A, Joly RJ (1995) Effects of mercuric chloride on the hydraulic conductivity of tomato root systems: evidence of a channel-mediated water pathway. *Plant Physiol* 109:331–335
- MAGRAMA (2012) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de Estadística 2010.
- Mahdieh M, Mostajeran A, Horie T, Katsuhara M (2008) Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell Physiol* 49:801–813
- Martínez-Ballesta MC, Aparicio F, Pallás V, Martínez V, Carvajal M (2003) Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol* 160:689–697
- Martínez-Ballesta MC, Martínez V, Carvajal M (2000) Regulation of water channel activity in whole roots and in protoplasts from roots of melon plants grown under saline conditions. *Aust J Plant Physiol* 27:685–691
- Martre P, Morillon R, Barrieu F, North GB, Nobel PS, Chrispeels MJ (2002) Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol* 130:2101–2110
- Martre P, North GB, Nobel PS (2001) Hydraulic conductance and mercury-sensitive water transport for roots of *Opuntia acanthocarpa* in relation to soil drying and rewetting. *Plant Physiol* 126:352–362
- Más P, Sánchez-Navarro JA, Sánchez-Pina MA, Pallás V (1993) Chemiluminescent and colorigenic detection of Cherry leaf roll virus with digoxigeninlabelled RNA probes. *J Virol Methods* 45:93–102
- Matzner S, Comstock JP (2001) Temperature dependence of shoot hydraulic resistance: implications for stomatal behaviour. *Plant Cell Environ* 24:1299–1308
- Maurel C (1997) Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu Rev Plant Physiol* 48:399–429
- Maurel C, Verdoucq L, Luu D-T, Santoni V (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* 59:595–624
- McNeil SD, Nuccio ML, Hanson AD (1999) Betaines and related osmoprotectants: targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol* 120:945–949
- Medina CL, Machado FC (1998) Gas exchange and water relations of Valencia orange tree grafted on rangpur lime and *Poncirus trifoliata* submitted to a water deficit. *Bragantia, Campinas* 57:15–22

- Medina CL, Machado EC, Gomes MMA (1999) Condutância estomática, transpiração e fotossíntese de laranja Valência sob deficiência hídrica. *Rev Bras Fisiol Veg* 11:29–34.
- Meinzer FC, Grantz DA (1990) Stomatal and hydraulic conductance in growing sugarcane: stomatal adjustment to water transport capacity. *Plant Cell Environ* 13:383–388.
- Morgan JM (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 35:299–319
- Morillon R, Lassalles JP (2002) Water deficit during root development: effects on the growth of roots and osmotic water permeability of isolated root protoplasts. *Planta* 214:392–399
- Moshelion M, Becker D, Biela A, Uehlein N, Hedrich R, Otto B, Levi H, Moran N, Kaldenhoff R (2002) Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: Diurnal and circadian regulation. *Plant Cell* 14:727–739
- Moya JL, Gómez-Cadenas A, Primo-Millo E, Talón M (2003) Chloride absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water use. *J Exp Bot* 54:825–833
- Moya JL, Primo-Millo E, Talón M (1999) Morphological factors determining salt tolerance in citrus seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. *Plant Cell Environ* 22:1425–1433
- Munns R, Passioura JB (1984) Hydraulic resistances of plants. III. Effects of NaCl in barley and lupin. *Aust J Plant Physiol* 11: 351–359
- Murkute AA, Sharma S, Singh SK (2005) Citrus in terms of soil and water salinity: a review. *J Sci Ind Res* 64, 393–402.
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Ann Rev Plant Biol* 56:165–185
- Nardini A, Gascó A, Raimondo F, Gortan E, Lo Gullo MA, Caruso T, Salleo S (2006) Is rootstock-induced dwarfing in olive an effect of reduced plant hydraulic efficiency? *Tree Physiol* 26:1137–1144
- Neales TF, Masia A, Zhang J, Davies WJ (1989) The effects of partly drying part of the root system of *Helianthus annuus* on the abscisic acid content of roots, xylem sap and leaves. *J Exp Bot* 40:1113–1120
- Neales TF, McLeod AL (1991) Do leaves contribute to the abscisic acid present in the xylem sap of “droughted” sunflower plants? *Plant Cell Environ* 14:979–986
- Netting AG (2000) pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions: cellular responses to stress and their implication for plant water relations. *J Exp Bot* 51:147–158

BIBLIOGRAFÍA

- Neuman DS, Smith BA (1991) The influence of leaf water status and ABA on leaf growth and stomata of *Phaseolus* seedlings with hypoxic roots J Exp Bot 42:1499-1506
- Newcomb DA (1978) Selection of rootstocks for salinity and disease resistance. Proc Int Soc Citriculture Australia 1:117-120
- Nolte KD, Hanson AD, Gage DA (1997) Proline accumulation and methylation to proline betaine in citrus: implications for genetic engineering of stress resistance. J Am Soc Hortic Sci 122:8-13
- North GB, Martre P, Nobel PS (2004) Aquaporins account for variations in hydraulic conductance for metabolically active root regions of *Agave deserti* in wet, dry, and rewetted soil. Plant Cell Environ 27:219–228
- North GB, Nobel PS (1995) Hydraulic conductivity of concentric root tissues of *Agave desertii* Engelm. Under water and drying conditions. New Phytol 130:47-57
- North GB, Nobel PS (1996) Radial hydraulic conductivity of individual root tissues of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller as soil moisture varies. Ann Bot 77:133–142
- North GB, Nobel PS (2000) Heterogeneity in water availability alters cellular development and hydraulic conductivity along roots of a desert succulent. Ann Bot 85:247–255
- O'Bannon JH, Ford HW (1978) Resistance in citrus rootstocks to *Radopholus similis* and *Tylenchulus semipenetrans* (Nematoda). Proc Int Soc Citriculture 2:544-549
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine blue O. Protoplasma 59:368–373
- Olmstead MA, Lang NS, Ewers FW, Owens SA (2006) Xylem vessel anatomy of sweet cherries grafted onto dwarfing and nondwarfing rootstocks. J Am Soc Hortic Sci 131:577–585
- Ongun AR y Wallace A (1958) Tree physiology studies at U.C.L.A. Special report no. 1 Univ of Calif at Los Angeles 87-101
- Ortuño MF, Alarcón JJ, Nicolas E, Torrecillas A (2007) Water status indicators of lemon trees in response to flooding and recovery. Biol Plantarum 51:292-296
- Pallás V, Más P, Sánchez Navarro JA (1998) Detection of plant RNA viruses by nonisotopic dot-blot hybridization. Meth Mol Biol (Clifton, NJ) 81:461–468
- Passioura JB (1988) Water transport in and to roots. Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 39:245-56
- Pereira JS, Kozlowski TT (1977) Variations among woody angiosperms in response to flooding. Physiol Plant 45:184-192

- Pérez-Pérez JG, Syvertsen JP, Botia P, García-Sánchez F (2007) Leaf water relations and net gas exchange responses of salinized Carrizo citrange seedlings during drought stress and recovery. *Ann Bot* 100:335–345
- Peynado A, Young R (1969) Relation of salt tolerance to cold hardiness of “Redblush” grapefruit and Valencia orange trees on various rootstocks. En: *Int. Citrus Symposium*, 1., 1968, Riverside: University of California vol.3 pp. 1793-1802
- Phung HT, Knipling EB (1976) Photosynthesis and transpiration of citrus seedlings under flooded conditions. *HortScience* 11:131-133
- Platt RG, Bitters WP (1971) Characteristics of rootstocks used for citrus in California. *Citrus notes*. Cooperative Extension. University of California. Tulare County 10 pp
- Pompeu Jr J (2005) Capítulo 4. Porta-enxertos. En: de Mattos Jr D, Dagoberto J, Pio RM, Pompeu Jr J. *Citros*. Centro APTA Citros Syvio Moreira – IAC. São Paulo. Brasil.
- Ponnamperuma FN (1984) Effects of flooding on soils. En: T.T. Kozlowski (Ed.), *Flooding and Plant Growth*. Academic Press, Orlando, FL, pp. 9-45
- Ramos C, Kaufmann MR (1979) Hydraulic resistance of rough lemon roots. *Physiol Plant* 45:311-314
- Ratcliffe RG (1997) In vivo NMR studies of the metabolic response of plant tissue to anoxia. *Ann Bot* 79:39-48
- Ream CL, Furr JR (1976) Salt tolerance of some citrus species, relatives and hybrids tested as rootstocks. *J Am Soc Hortic Sci* 101:265–267
- Rodríguez-Gamir J, Primo-Millo E, Forner JB, Forner-Giner MA (2010) Citrus rootstock responses to water stress. *Sci Hortic* 126:95-102
- Romero P, Navarro JM, Pérez-Pérez J, García-Sánchez F, Gómez-Gómez A, Porras I, Martínez V, Botía P (2006) Deficit irrigation and rootstock: their effects on water relations, vegetative development, yield, fruit quality and mineral nutrition of *Clemenules mandarin*. *Tree Physiol* 26:1537–1548
- Ruiz-Sánchez MC, Domingo R, Morales D, Torrecillas A (1996) Water relations of Fino Lemon plants on two rootstocks under flooded conditions. *Plant Sci* 120:119-125
- Sairam RK, Kumutha D, Ezhilmathi K, Deshmukh PS, Srivastava GC (2008) Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. *Biol Plantarum* 52:401-412
- Sakr S, Alves G, Morillon R, Maurel K, Decourteix M, Guillot A, Fleurat-Lessard P, Julien JL, Chrispeels MJ (2003) Plasma membrane aquaporins are involved in winter embolism recovery in walnut tree. *Plant Physiol* 133:630–641

BIBLIOGRAFÍA

- Salibe AA, Moreira S (1965) Reaction of types of citrus as scion and as rootstocks to xyloporosis virus. Proc 3rd Conf int Org. Citrus Virologists, pp 238-241
- Saliendra NZ, Sperry JS, Comstock JP (1995) Influence of leaf water status on stomatal response to humidity, hydraulic conductance and soil drought in *Betula occidentalis*. Planta 196:357–366
- Sambrook J, Fritsch EJ, Maniatis T (1989) En: Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Díaz M, Pardo M, Antolín M, Peña J, Aguirreolea J (1990) Effect of water stress on photosynthetic activity in the *Medicago-Rhizobium-Glomus* symbiosis. Plant Sci 71:215–221
- Scholander P, Hammel H, Bradstreet EY, Hemmingsen E (1965) Sap pressure in vascular plants. Science 37:247–274
- Schurr U, Gollan T, Schulze ED (1992) Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus* L. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. Plant Cell Environ 15:561–567
- Secchi F, Lovisolo C, Uehlein N, Kaldenhoff R, Schubert S (2007) Isolation and functional characterization of three aquaporins from olive (*Olea europaea* L.). Planta 225:381–392
- Sharp RG, Davies WJ (2009) Variability among species in the apoplastic pH signalling response to drying soils. J Exp Bot 60:4361–4370
- Siefritz F, Tyree MT, Lovisolo C, Schubert A, Kaldenhoff R (2002) PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. Plant Cell 14:869–876
- Sinclair TR, Allen Jr LH (1982) Carbon dioxide and water vapour exchange of leaves on field-grown citrus trees. J Exp Bot 33:1166–1175
- Slatyer RO (1967) Plant-water relationships. London, Academic Press, 366 p.
- Slovic S, Hartung W (1992a) Compartmental distribution and redistribution of abscisic acid in intact leaves. II. Model analysis. Planta 187:26–36
- Slovic S, Hartung W (1992b) Compartmental distribution and redistribution of abscisic acid in intact leaves. III. Analysis of the stress signal chain. Planta 187:37–47
- Smart LB, Moskal W, Cameron KD, Bennett AB (2001) MIP Genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca*. Plant Cell Physiol 42:686–693
- Sobeih WY, Dodd IC, Bacon MA, Grierson D, Davies WJ (2004) Long-distance signals regulating stomatal conductance and leaf growth in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants subjected to partial root-zone drying. J Exp Bot 55:2353-2363

- Solari LI, DeJong TM (2006) The effect of root pressurization on water relations, shoot growth, and leaf gas exchange of peach (*Prunus persica*) trees on rootstocks with differing growth potential and hydraulic conductance. *J Exp Bot* 57:1981–1989
- Solari LI, Johnson S, DeJong TM (2006a) Hydraulic conductance characteristics of peach (*Prunus persica*) trees on different rootstocks are related to biomass production and distribution. *Tree Physiol* 26:1343–1350
- Solari LI, Johnson S, DeJong TM (2006b) Relationship of water status to vegetative growth and leaf gas exchange of peach (*Prunus persica*) trees on different rootstocks. *Tree Physiol* 26:1333–1341
- Solari LI, Pernice F, DeJong TM (2006c) The relationship of hydraulic conductance to root system characteristics of peach (*Prunus persica*) rootstocks. *Physiol Plant* 128:324–333
- Sperry JS, Alder NN, Eastlack SE (1993) The effect of reduced hydraulic conductance on stomatal conductance and xylem cavitation. *J Exp Bot* 44:1075–1082
- Sperry JS, Hacke UG, Oren R, Comstock JP (2002) Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. *Plant Cell Environ* 25:251–263
- Spiegel-Roy P, Goldschmidt EE (1996) *Biology of citrus*. Cambridge: Cambridge University Press. 230 pp
- Stannard MC (1973) Citrus rootstocks in Australia. *Proc Int Soc Citriculture* 2:191-193
- Stedle E (1993) Pressure probe techniques: basic principles and application to studies of water and solute relations at the cell, tissue, and organ level. En: Smith JAC, Griffith H (eds.) *Water deficits: plant responses from cell to community*. Oxford: Bios Scientific Publishers, 5–36.
- Stedle E, Peterson CA (1998) How does water get through roots?. *J Exp Bot* 49:775-788
- Storey R, Walker RR (1987) Some effects of root anatomy on K, Na and Cl loading of citrus roots and leaves. *J Exp Bot* 38:1769–1780
- Storey R, Walker RR (1999) Citrus and salinity. *Sci Hortic* 78:39-81
- Suga S, Komatsu S, Maeshima M (2002) Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant Cell Physiol* 43:1229–1237
- Sumner ME, Boswell FC (1981) Alleviating nutrient stress. En: Arkin GF, Taylor HM (eds), *Modifying the root environment to reduce crop stress*. Amer Soc Agr Eng Monograph No. 4, St. Joseph, Mich, pp 99–137
- Sykes SR (1985) Effects of seedlings age and size on chloride accumulation by juvenile citrus seedlings treated with sodium chloride under glasshouse conditions. *Aust J Exp Bot* 25:943-953

BIBLIOGRAFÍA

- Syvetsen JP (1981) Hydraulic conductivity of four commercial citrus rootstocks. *J Am Soc Hortic Sci* 106:378–381
- Syvetsen JP (1984) Light acclimation in citrus leaves. II. CO₂ assimilation and light, water, and nitrogen use efficiency. *J Am Soc Hortic Sci* 109:812–817
- Syvetsen JP, Graham JH (1985) Hydraulic conductivity of roots, mineral nutrition, and leaf gas exchange of Citrus rootstocks. *J Am Soc Hortic Sci* 110:865–869
- Syvetsen JP, Levy Y (2005) Salinity interactions with other abiotic and biotic stresses in citrus. *HortTechnology* 15:100–103
- Syvetsen JP, Lloyd JJ (1994) Citrus. En: Schaffer BA, Andersen PC (eds) *Handbook of environmental physiology of fruit crops. Vol. II. Subtropical and tropical crops*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 65–99.
- Syvetsen JP, Lloyd J, Kriedmann PE (1988) Salinity and drought stress effects on foliar ion concentration, water relations, and photosynthetic characteristics of orchard citrus. *Aust J Agr Res* 39:619–627
- Syvetsen JP, Smith ML (1983) Environmental stress and seasonal changes in proline concentration of citrus tree tissues and juice. *J Am Soc Hortic Sci* 108:861–866
- Syvetsen JP, Yelenosky G (1988) Salinity can enhance freeze tolerance of citrus rootstock seedlings by modifying growth, water relations, and mineral nutrition. *J Am Soc Hortic Sci* 113: 889–893.
- Syvetsen JP, Zablotowicz RM (1981) Effects of rootstock, root temperature and flooding on citrus water relations and growth. *HortScience* 16:419
- Syvetsen JP, Zablotowicz RM, Smith ML (1983) Soil temperature and flooding effects on two species of citrus. I. Plant growth and hydraulic conductivity. *Plant Soil* 72:3–12
- Tadeo FR, Ben-Cheikh W, Gómez-Cadenas A, Talón M, Primo-Millo E (1997) Gibberellin-ethylene interaction controls radial expansion in citrus roots. *Planta* 202:370–378
- Timmer LW (1988) Phytophthora-induced diseases. En: Whiteside JO, Garnsey SM, Timmer LW (eds.) *Compendium of Citrus diseases*. APS Press, Am Phytopathol Soc St Paul, Min, pp. 22-25
- Tombesi S, Johnson RS, Day KR, DeJong TM (2010) Relationships between xylem vessel characteristics, calculated axial hydraulic conductance and size controlling capacity of peach rootstocks. *Ann Bot* 105:327–331
- Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu DT, Bligny R, Maurel C (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425:393–397

- Trejo CL, Davies WJ (1991) Drought-induced closure of *Phaseolus vulgaris* L. stomata precedes leaf water deficit and any increase in xylem ABA concentration. *J Exp Bot* 42:1507–1515
- Tsuda M, Tyree MT (2000) Plant hydraulic conductance measured by the high pressure flow meter in crop plants. *J Exp Bot* 51:823–828
- Tudela D, Primo-Millo E (1992) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress. *Plant Physiol* 100:131–137
- Turner NC (1979) Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants. En: Mussell, H, Staples RC (eds.) *Stress Physiology in crop plants*. Wiley, New York, pp. 343-372
- Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ* 25:173–194
- Tyree MT, Patiño S, Bennink J, Alexander J (1995) Dynamic measurements of root hydraulic conductance using a high-pressure flowmeter in the laboratory and field. *J Exp Bot* 46:83-94
- Tyree MT, Vélez V, Dalling JW (1998) Growth dynamics of root and shoot hydraulic conductance in seedlings of five neotropical tree species: scaling to show possible adaptation to differing light regimes. *Oecologia* 114:293-298
- Vasconcellos LABC, Castle WS (1994) Trunk xylem anatomy of mature healthy and blighted grapefruit trees on several rootstocks. *J Am Soc Hortic Sci* 119:185–194
- Verdejo-Lucas S, Sorribas FJ, Forner JB, Alcaide A (1997) Screening of hybrid citrus rootstocks for resistance to *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. *HortScience* 32:1116-1119
- Verdejo-Lucas S, Sorribas FJ, Forner JB, Alcaide A (2000) Resistance of hybrid citrus rootstocks to a Mediterranean biotype of *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. *HortScience* 35:269-273
- Voicu MC, Zwiazek JJ (2009) Inhibitor studies of leaf lamina hydraulic conductance in trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) leaves. *Tree Physiol* 30:193–204
- Vu JCV, Yelenoski (1991), Photosynthetic responses of citrus trees to soil flooding. *Physiol Plant* 81:7-14
- Walker RR, Törökfalvy E, Downton WJS (1982) Photosynthetic responses of the citrus varieties Rangpur lime and Etrog citron to salt treatment. *Aust J Plant Physiol* 9:783–790

BIBLIOGRAFÍA

- Walker RR, Törökfalvy E, Grieve AM, Prior LD (1983) Water relations and ion concentrations of leaves on salt stressed citrus plants. *Austr J Plant Physiol* 10:265–277
- Walker RR, Sedgley M, Blesing MA, Douglas TJ (1984) Anatomy, ultrastructure and assimilate concentrations of roots of citrus genotypes differing in ability for salt exclusion. *J Exp Bot* 35:1481–1494
- Wan X, Zwiazek JJ (1999) Mercuric chloride effects on root water transport in aspen seedlings. *Plant Physiol* 121:939–946
- Weig A, Deswarte C, Chrispeels MJ (1997) The major intrinsic protein family of Arabidopsis has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiol* 114:1347–1357
- Wilkinson S (1999) pH as a stress signal. *Plant Growth Regul* 29:87-99
- Wilkinson S (2004) Water use efficiency and chemical signalling. En: Bacon MA (ed) *Water use efficiency in plant biology*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp 75–112
- Wilkinson S, Bacon MA, Davies WJ (2007) Nitrate signalling to stomata and growing leaves: interactions with soil drying, ABA, and xylem sap pH in maize. *J Exp Bot* 58:1705–1716
- Wilkinson S, Corlett JE, Oger L, Davies WJ (1998) Effects of xylem pH on transpiration from wild-type and flacca tomato leaves: a vital role for abscisic acid in preventing excessive water loss even from well-watered plants. *Plant Physiol* 117:703–709
- Wilkinson S, Davies WJ (1997) Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cells that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiol* 113:559–573
- Wilkinson S, Davies WJ (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* 25:195–210
- Wilkinson S, Davies WJ (2008) Manipulation of the apoplastic pH of intact plants mimics stomatal and growth responses to water availability and microclimatic variation. *J Exp Bot* 59:619–631
- Wolf O, Jeske WD, Hartung W (1990) Long distance transport of abscisic acid in NaCl-treated plants of *Lupinus albus*. *J Exp Bot* 41:593–600
- Wutscher HK (1981) Swingle in Texas and Florida. *Citrograph* 66:197
- Yamada S, Katsuhara M, Kelly WB, Michalowski CB, Bohnert HJ (1995) A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in common ice plant. *Plant Cell* 7:1129–1142
- Yang Y, Tyree MT (1993) Hydraulic resistance in the shoots of *Acer saccharum* and its influence on leaf water potential and transpiration. *Tree Physiol* 12:231-242

- Yelenosky (1973) Tolerance of trifoliolate orange selections and hybrid to freezes and flooding. Fla State Hor Soc 86:99-104
- Yelenosky G (1991) Minireview: Responses and adaptations of citrus trees to environmental stresses. Israel J Bot 40:239-250.
- Yin CY, Peng YH, Zang RG, Zhu YP, Li CY (2005) Adaptive responses of *Populus kangdingensis* to drought stress. Physiol Plant 123:445-451
- Zardoya R (2005) Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. Biol Cell 97:397-414
- Zeevaart JA, Boyer JS (1984) Accumulation and transport of abscisic acid and its metabolites in *Ricinus* and *Xanthium*. Plant Physiol 74:934-939
- Zekri M (1991) Effects of NaCl on growth and physiology of sour orange and Cleopatra mandarin seedlings. Scientia Hort 47:305-315
- Zekri M, Parsons LR (1989) Growth and root hydraulic conductivity of several citrus rootstocks under salt and polyethylene glycol stresses. Physiol Plant 77:99-106
- Zhang J, Davies WJ (1986) Chemical and hydraulic influences on the stomata of flooded plants. J Exp Bot 37:1479-1491
- Zhang J, Davies WJ (1987) Increased synthesis of ABA in partially dehydrated root tips and ABA transport from roots to leaves. J Exp Bot 38:2015-2023
- Zhang J, Davies WJ (1989a) Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. Plant Cell Environ 12:73-81
- Zhang J, Davies WJ (1989b) Sequential response of whole plant water relations to prolonged soil drying and the involvement of xylem sap ABA in the regulation of stomatal behaviour of sunflower plants. New Phytol 113:167-174
- Zhang J, Davies WJ (1990) Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. Plant Cell Environ 13:277-285
- Zhang SQ, Outlaw Jr WH (2001a) The guard-cell apoplast as a site of abscisic acid redistribution in *Vicia faba* L. Plant Cell Environ 24:347-356
- Zhang SQ, Outlaw Jr WH (2001b) Abscisic acid introduced into the transpiration stream accumulates in the guard cell apoplast and causes stomatal closure. Plant Cell Environ 24:1045-1054
- Zhang J, Schurr U, Davies WJ (1987) Control of stomatal behavior by abscisic acid which apparently originates in the roots. J Exp Bot 38:1174-1181

BIBLIOGRAFÍA

Zhang J, Zhang X (1994) Can early wilting of old leaves account for much of the ABA accumulation in flooded leaves?. J Exp Bot 45:1335-1342

Zimmermann HM, Klaus Hartmann K, Schreiber L, Steudle E (2000) Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.) Planta 210:302-311