

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Máster en Producción Vegetal y Ecosistemas Agroforestales



Efecto del estrés abiótico sobre la fisiología y regulación hormonal en citrange Carrizo

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Presentado por:

D^a. Marta Pitarch Bielsa

Director experimental:

Prof. Dr. Vicent Arbona Mengual

Tutor académico:

Prof. Dr. Carlos Mesejo Conejos

Valencia, Septiembre de 2013

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Abreviaturas y símbolos utilizados	4
Resumen	5
Abstract	6
Resum	7
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	8
1.1. Cítricos: importancia económica y clasificación botánica	8
1.2. Estrés en plantas	8
1.2.1. Estrés por inundación del sustrato	9
1.2.2. Déficit hídrico	10
1.2.3. Estrés oxidativo	10
1.3. Hormonas y estrés abiótico	11
1.3.1. ABA	12
1.3.2. JA	12
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1. Material vegetal y tratamientos	14
3.1.1. Estrés por inundación del sustrato	14
3.1.2. Déficit hídrico	15
3.2. Parámetros fisiológicos	15
3.2.1. Parámetros de intercambio gaseoso	15
3.2.2. Potencial hídrico	16
3.2.3. Parámetros de fluorescencia de clorofilas	16
3.3. Parámetros bioquímicos	16
3.3.1. Determinación de la concentración de MDA	16
3.3.2. Determinación de la concentración de prolina	17
3.3.3. Determinación de la actividad enzimática antioxidante APX	17
3.4. Análisis hormonal	18
3.4.1. Determinación de ABA y JA	18
3.5. Tratamiento estadístico	18

4. RESULTADOS	19
4.1. Estrés por inundación del sustrato	19
4.1.1. Parámetros de intercambio gaseoso	19
4.1.2. Parámetros bioquímicos	24
4.1.3. Contenido hormonal	27
4.2. Déficit hídrico	31
4.2.1. Parámetros de intercambio gaseoso	31
4.2.2. Parámetros bioquímicos	36
4.2.3. Contenido hormonal	40
5. DISCUSIÓN	43
6. CONCLUSIONES	48
7. BIBLIOGRAFÍA	49

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS

An	Tasa fotosintética neta
ABA	Ácido abscísico
Abs	Absorbancia
ACC	Ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico
AOX	Enzima ascorbato oxidasa
APX	Enzima ascorbato peroxidasa
ATP	Adenosin Trifosfato
C _a	Concentración ambiental de CO ₂
C _i	Concentración subestomática de CO ₂
E	Tasa de transpiración
EUA	Eficiencia en el uso del agua
Fm'	Fluorescencia máxima de la clorofila en hojas adaptadas a la luz
Fs	Fluorescencia mínima de la clorofila en hojas adaptadas a la luz
g _s	Conductancia estomática
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>high performance liquid chromatography</i>)
JA	Ácido jasmónico
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
MDA	Malondialdehído
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
rpm	Revoluciones por minuto
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA	Ácido salicílico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Φ _{PSII}	Eficiencia cuántica del PSII

RESUMEN

La sequía y el encharcamiento del sustrato son dos factores ambientales que afectan negativamente al cultivo de los cítricos. Este efecto negativo se puede manifestar de forma similar, aunque existan diferencias a nivel bioquímico y hormonal. Para estudiar estas diferencias en distintos órganos, en este trabajo se ha estudiado y comparado la respuesta fisiológica, bioquímica y hormonal de plantas de citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* L.) a estas condiciones ambientales. En ambos casos la respuesta fisiológica de la parte aérea es similar, afectando de forma negativa a la actividad fotosintética así como a la eficiencia carboxilativa. El patrón de acumulación de prolina foliar y radicular difiere en función de la condición ambiental incidente, actuando como mecanismo de ajuste del balance osmótico foliar y pudiendo relacionarse con el órgano sensor del estrés. El contenido de MDA foliar incrementa en ambas situaciones, activándose a su vez la maquinaria antioxidante en hojas correspondiente al enzima APX, reduciendo la incidencia del daño. Respecto a la regulación hormonal, el JA y el ABA presentan un comportamiento paralelo incrementando su concentración en la parte aérea en respuesta a las dos condiciones de estrés. En raíces, por el contrario, se comportaron de forma opuesta presentando una respuesta específica para cada situación ambiental. En estas condiciones el JA podría actuar como mediador entre la percepción del estrés y la inducción del ABA, que actuaría como modulador de la respuesta fisiológica.

ABSTRACT

Drought and waterlogging are two environmental factors that negatively affect citrus. Although both environmental conditions induce similar physiological disturbances, there might be important differences at the biochemical and hormonal levels. To study these differences, in this work we have studied and compared physiological, biochemical and hormonal response of leaves and roots of Carrizo citrange plants (*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* L.) to these environmental conditions. The physiological response of the aerial part is similar under both adverse environmental conditions, negatively affecting the photosynthetic activity and carboxylative efficiency. The pattern of proline accumulation in leaves and roots differs depending on the environmental condition considered and was associated to leaf osmotic balance adjustment. In addition, it could be an indicator of the stress sensing organ. Leaf MDA content increased in both situations and, at the same time, the antioxidant machinery, corresponding to the APX enzyme, was activated reducing the incidence of damage. Regarding hormonal regulation, JA and ABA showed parallel behaviour increasing their concentration in leaves in response to both stress conditions. On the contrary, in roots the response appeared to be specific for each environmental condition. In these conditions JA could act as a mediator between the perception of stress and induction of ABA, which would act as a modulator of the physiological response.

RESUM

La sequera i l'embassament del substrat són dos factors ambientals que afecten negativament al cultiu dels cítrics. Aquest efecte negatiu es pot manifestar de forma similar, encara que existeixen diferències a nivell bioquímic i hormonal. Per estudiar aquestes diferències en distints òrgans, en aquest treball s'ha estudiat i comparat la resposta fisiològica, bioquímica i hormonal de plantes de citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* L.) a aquestes condicions ambientals. En ambdós casos la resposta fisiològica de la part aèria es similar, afectant de forma negativa a l'activitat fotosintètica i també a l'eficiència carboxilativa. El patró d'acumulació de prolina foliar i radicular difereix en funció de la condició ambiental incident, actuant com a mecanisme d'ajust del balanç osmòtic foliar i podent relacionar-se amb l'òrgan sensor de l'estrès. El contingut de MDA foliar incrementa en ambdues situacions, activant al seu torn la maquinària antioxidant en fulles corresponent a l'enzim APX, reduint la incidència del dany. Respecte a la regulació hormonal, el JA i l'ABA presenten un comportament paral·lel incrementant la seua concentració en la part aèria en resposta a les dues condicions d'estrès. En arrels, per contra, es van comportar de forma oposada, presentant una resposta específica per a cada situació ambiental. En aquestes condicions el JA podria actuar com a mediador entre la percepció de l'estrès i la inducció del ABA, que actuaria com a modulador de la resposta fisiològica.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Cítricos: importancia económica y clasificación botánica

En España, el primer exportador mundial de frutos cítricos para consumo en fresco, la citricultura representa una de las primeras partidas de ingresos en el capítulo general de las exportaciones nacionales (2,043 millones de euros en 2012). Durante los últimos años, la producción de cítricos se ha acercado a los 6.3 millones de toneladas. Se estima que la superficie actual dedicada al cultivo de los cítricos supera las 300,000 Ha, de las cuales 182,951 Ha se encuentran en la Comunidad Valenciana y, en concreto, la provincia de Castellón se sitúa como primera productora de Clementinas (MAGRAMA, 2012).

Desde el punto de vista botánico, los cítricos pertenecen a la familia *Rutaceae*, subfamilia *Aurantoideae*, dentro de la división *Embriophyta Siphonogama*, subdivisión *Angiospermae*, clase *Dicotyledonae*, subclase *Rosidae*, superorden *Rutanae*, orden *Rutales* (Swingle, 1967).

Los cítricos de importancia comercial se encuentran dentro de la subtribu *Citrinae*, la cual contiene todos los géneros a los que pertenecen los cítricos cultivados: *Fortunella*, *Poncirus* y *Citrus*. Las especies del género *Citrus* son las más importantes desde el punto de vista agronómico. Los cítricos son, en su mayoría, especies de hoja perenne que pueden crecer tanto en condiciones de clima tropical como subtropical (Agustí, 2003).

1.2. Estrés en plantas

Tanto en cultivo como en la naturaleza, las plantas están expuestas constantemente a condiciones de estrés, tanto biótico como abiótico. En el marco de la fisiología vegetal, el término estrés refleja la magnitud de presión ambiental que fuerza al cambio en la fisiología de una planta (Nilsen y Orcutt, 1996). En muchos casos, la tolerancia al estrés se mide con relación a la supervivencia de la planta, el rendimiento del cultivo, el crecimiento (acumulación de biomasa) o los procesos de asimilación primaria (incorporación de CO₂ y minerales) relacionados con el crecimiento (Taiz y Zeiger, 2006).

Entre las principales situaciones ambientales que afectan a los cítricos provocando estrés se encuentran el déficit hídrico, la salinidad, la asfixia radicular, las bajas o altas temperaturas y la disponibilidad de nutrientes. A continuación se hace una descripción de los estreses que han sido objeto de investigación en el presente trabajo.

1.2.1. Estrés por inundación del sustrato

El encharcamiento del sustrato se produce generalmente debido a una mala capacidad de drenaje del suelo combinado con un exceso de lluvias o riego. La inundación impide la aireación del sustrato, disminuyendo el contenido de O₂ y la acumulación de sustancias reducidas que pueden resultar tóxicas para las plantas (Ponnamperuma, 1984).

Además de la alteración en la composición gaseosa, se producen cambios electroquímicos inducidos por los microorganismos. A medida que las condiciones se hacen cada vez más reductoras, aparecen concentraciones de compuestos potencialmente tóxicos para las plantas como Mn²⁺ y Fe²⁺ y se incrementa la producción de H₂S de origen microbiano (Colmer y Voesenek, 2009). El grado de daño por encharcamiento del sustrato depende de una combinación de factores, incluyendo la especie vegetal, la composición del suelo y temperatura atmosférica, el estado de desarrollo y la prolongación del encharcamiento (Phung y Knipling, 1976).

El principal efecto del encharcamiento en las plantas está relacionado con el descenso de la respiración aeróbica de la raíz, que impide la síntesis de ATP, alterando su metabolismo. La asfixia radical provoca una serie de disfunciones fisiológicas que alteran el crecimiento de plantas, como desequilibrios hormonales, alteración de la distribución de carbohidratos o deficiencias en la absorción de nutrientes (Bailey-Serres y Voesenek, 2008). Para sobrevivir al encharcamiento las plantas han desarrollado mecanismos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos (Voesenek *et al.*, 2006).

En el caso de los cítricos, éstos se pueden considerar un cultivo sensible a la inundación del sustrato, ya que no poseen adaptaciones específicas a esta condición ambiental. A pesar de esto, existen diferencias significativas con respecto a la sensibilidad a este factor ambiental entre genotipos (Arbona *et al.*, 2009). Los principales efectos incluyen la regulación en la apertura estomática, cambios en el estado hídrico foliar, disminución en los parámetros de intercambio gaseoso de las hojas, clorosis, necrosis y reducción en el crecimiento (Ruiz-Sánchez *et al.*, 1996). Sin embargo, la respuesta fisiológica precede a la aparición de síntomas morfológicos. En muchas ocasiones los árboles no mueren pero permanecen prácticamente improductivos hasta que el suelo ha drenado. Además, la inundación, aparte de debilitar al árbol, conlleva una proliferación de patógenos, como *Phytophthora* spp. que pueden causar la muerte de los árboles (Davies y Albrigo, 1994).

1.2.2. Déficit hídrico

El déficit 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 y el rendimiento así como el tamaño del fruto y, algunas veces, la calidad, causando importantes pérdidas económicas en las explotaciones (Rodríguez-Gamir *et al.*, 2010). La deficiencia hídrica produce el marchitamiento de las hojas, reduce la asimilación de CO₂, la conductancia estomática, el potencial hídrico y la transpiración (Arbona *et al.*, 2005).

El principal mecanismo por el cual las plantas limitan la pérdida de agua por transpiración en condiciones de déficit hídrico es el cierre estomático, disminuyendo consecuentemente la asimilación neta de CO₂ (García-Sánchez *et al.*, 2007). En los cítricos la reducción de la conductancia estomática y asimilación de CO₂ se atribuye, según Brakke y Allen (1995), a una elevada diferencia de la presión de vapor entre la hoja y el aire, por lo que cuando el agua del suelo no está disponible, los cítricos son más sensibles a las temperaturas elevadas y los altos déficits de presión de vapor, resultando en la citada reducción de ambos parámetros fisiológicos.

Una disminución de la concentración subestomática de CO₂ da lugar a una sobre-reducción de los componentes de la cadena de transporte electrónico, generándose ROS. Estos compuestos son tóxicos para la planta y deben ser eliminados, aunque también pueden actuar como mensajeros secundarios en la transducción de la señal en respuesta a las condiciones de déficit hídrico (Arbona *et al.*, 2008).

Otro proceso mediante el cual las plantas hacen frente al déficit hídrico es la síntesis de osmolitos compatibles que permiten el ajuste osmótico y facilitan la absorción de agua por parte de la planta. La acumulación de estos osmolitos también tiene como consecuencia la osmoprotección, dada por la capacidad estabilizadora de algunos de estos solutos sobre macromoléculas como proteínas (Moreno, 2009). En los cítricos se ha observado que bajo condiciones de déficit hídrico se acumula prolina con el objetivo de regular el potencial osmótico y compensar el déficit hídrico (Molinari *et al.*, 2004).

1.2.3. Estrés oxidativo

Diferentes condiciones de estrés abiótico como sequía, salinidad, desequilibrios nutricionales o inundación del sustrato producen alteraciones en el funcionamiento de las cadenas de transporte electrónico originándose especies oxidantes y/o reductoras, denominadas ROS. Estos compuestos, derivados de la actividad metabólica relacionada con el oxígeno, poseen una vida media relativamente corta ya que reaccionan

fácilmente con las moléculas de su alrededor. Dependiendo de sus características químicas, algunas ROS pueden atravesar las membranas o estar restringidas a determinados orgánulos. Las principales ROS pueden ser clasificadas como radicales libres: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (HO^{\bullet}) y radical hidroperoxilo (HO_2^{\bullet}) y como formas no radicales: peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singlete (1O_2). La interacción entre estas ROS y diferentes moléculas como los lípidos puede iniciar reacciones en cadena (Arbona y Gómez-Cadenas, 2012).

De forma general, los efectos que provocan las ROS son: la inhibición de enzimas susceptibles que pueden reaccionar con ellas y la reacción con proteínas; la reacción con pigmentos como clorofilas produciendo su degradación; la peroxidación de lípidos, alterando de forma drástica la estructura y funcionalidad celular y la fragmentación del DNA, producida por la reacción de los radicales HO^{\bullet} con las bases nitrogenadas (Mano, 2002).

Para hacer frente al estrés oxidativo las plantas poseen diferentes mecanismos antioxidantes. En cítricos, la diferente tolerancia a dicho estrés ha sido asociada con la capacidad de eliminar las ROS. El ascorbato y el glutatión reducido son los principales componentes antioxidantes del ciclo Halliwell-Asada, que ocurre en mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas de las células vegetales. El ascorbato puede reaccionar con diferentes ROS como 1O_2 , HO^{\bullet} y $O_2^{\bullet-}$, y actúa como sustrato del enzima APX (Arbona *et al.*, 2008). Este enzima, estudiado en el presente trabajo, es la encargada de la reducción del H_2O_2 a agua empleando el ascorbato como cofactor (Arbona y Gómez-Cadenas, 2012).

Además, existen diversos marcadores que indican el grado de daño oxidativo que están sufriendo las plantas, entre los cuales se encuentra el MDA que es un producto de la peroxidación lipídica en las membranas biológicas. El aumento en el contenido de esta molécula es indicativo de un incremento en el daño oxidativo (Arbona *et al.*, 2008).

1.3. Hormonas y estrés abiótico

Las plantas, debido a su naturaleza sésil, han desarrollado distintos mecanismos de respuesta a nivel fisiológico, bioquímico y molecular frente a los cambios externos. Estas respuestas incluyen cambios en la expresión génica, la regulación proteica y cambios en los niveles de metabolitos e iones. La regulación génica a nivel de transcripción es uno de los puntos de control más importantes en los procesos de respuesta a condiciones adversas y, los factores de transcripción y los reguladores juegan papeles claves en este proceso. Las hormonas vegetales comprenden un conjunto de compuestos reguladores de crecimiento cuya acción es fundamental en la respuesta frente al estrés ambiental (Eyidogan *et al.*, 2012).

Entre los compuestos de actividad hormonal implicados en la respuesta de las plantas frente al estrés están el ABA, JA, SA y etileno (Eyidogan *et al.*, 2012; Gómez-Cadenas *et al.*, 1996). De forma breve se describen a continuación las dos fitohormonas estudiadas en el presente trabajo:

1.3.1. ABA

Químicamente es un sesquiterpeno sintetizado principalmente a partir del ácido mevalónico en cloroplastos y otros plastos. Se puede encontrar libre, forma en la cual está activo, o conjugado con otras moléculas orgánicas, inactivándose (Wilkinson y Davies, 2002).

El ABA es una de las hormonas importantes en la regulación de las respuestas frente a condiciones de estrés, acumulándose en las células sometidas a estrés osmótico y promoviendo, entre otros procesos, el cierre de estomas. Esta hormona, en condiciones de estrés ambiental, es la encargada del control de la regulación de la expresión de genes de respuesta al estrés, responsables de la acumulación de compuestos osmocompatibles y la síntesis de proteínas LEA (late embryogenesis abundant), entre las que se encuentran las dehidrinas (Eyidogan *et al.*, 2012).

La acumulación de ABA bajo condiciones de déficit hídrico en cítricos y posterior rehidratación se ha asociado, por una parte, al incremento en contenido de ACC en raíces y a su posterior oxidación a etileno en hojas. Durante el periodo de déficit hídrico severo, se produce una acumulación masiva de ACC en raíces que no se observa cuando se inhibe la síntesis de ABA. La rehidratación permite la translocación de este ACC a la parte aérea, donde su oxidación a etileno dispara la abscisión foliar (Gómez-Cadenas *et al.*, 1996).

En el estudio llevado a cabo por Arbona y Gómez-Cadenas (2008), bajo condiciones de encharcamiento del sustrato, se detectaron incrementos del contenido de ABA en hojas de cítricos de forma más acusada y temprana en genotipos sensibles, tales como mandarino Cleopatra y algo menos en genotipos tolerantes como citrange Carrizo. En raíces, no obstante, se observó el efecto contrario, una reducción drástica de los niveles de esta hormona muy por debajo de los valores control.

1.3.2. JA

El JA y sus metabolitos, conocidos globalmente como jasmonatos, son moléculas derivadas de los ácidos grasos a través de la ruta octadecanóica. Tras su síntesis el JA puede conjugarse con aminoácidos, preferentemente con isoleucina, formando

Jasmonato-isoleucina o formar otros conjugados, como Metil jasmonato (Wasternack, 2007).

Su actividad engloba un gran número de procesos en las plantas, presentando un papel importante en la señalización de la respuesta frente a estrés ambiental, como el producido por ozono, patógenos o por heridas (de Ollas *et al.*, 2013), así como en el crecimiento y el desarrollo vegetal. Una de sus funciones mejor descrita es la interacción coordinada con el ácido salicílico en la respuesta de defensa de las plantas frente a agentes bióticos (Eyidogan *et al.*, 2012). En los cítricos, los jasmonatos podrían tener algún tipo de implicación en el cuajado del fruto, así como en su abscisión prematura conjuntamente con ABA (Pozo, 2001).

En raíces de cítricos sometidos a condiciones de sequía se ha observado un incremento en los niveles de JA previo al incremento de ABA, exhibiendo el mismo perfil que se produce en hojas de cítricos bajo encharcamiento del sustrato. Por tanto, el JA actuaría como mediador entre la percepción del estrés y la inducción de las respuestas fisiológicas, apareciendo de forma temprana (Arbona y Gómez-Cadenas, 2008). Este comportamiento similar bajo ambas condiciones estresantes sugieren la idea de una conexión entre ambas hormonas (de Ollas *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El principal objetivo de este trabajo es la caracterización y comparación de la respuesta a nivel fisiológico, bioquímico y hormonal del patrón citrange Carrizo sometido a dos condiciones de estrés hídrico: deficiencia hídrica y por inundación del sustrato, basándonos en la hipótesis de trabajo de que la posible existencia de respuestas hormonales diferentes a nivel de tejidos y en unas condiciones ambientales particulares podría ser la causa de una respuesta fisiológica similar. A continuación se describen los objetivos específicos:

I. Estudio de la fisiología de los cítricos en condiciones de estrés por inundación

En este experimento se estudiará la respuesta fisiológica de la parte aérea mediante el análisis de parámetros de intercambio gaseoso, de potencial hídrico y fluorescencia de clorofilas, así como la acumulación de prolina foliar y radicular y también la regulación hormonal mediada por ABA y JA. Se estudiará también el daño oxidativo provocado por la inundación del sustrato mediante la determinación de MDA junto con la respuesta antioxidante vegetal a través del análisis de la actividad enzimática APX.

II. Estudio de la fisiología de los cítricos en condiciones de déficit hídrico

Con el fin de comparar la respuesta causada por el déficit hídrico y por el encharcamiento del sustrato, se llevará a cabo en paralelo un estudio de déficit hídrico

severo en el que, como en el caso anterior, se analizarán las respuestas tanto fisiológicas, como bioquímicas y hormonales.

III. Estudio comparado de la respuesta frente a ambos tipos de estrés

El objetivo de este estudio será discutir los posibles puntos en común y los mecanismos diferenciales entre ambos sistemas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal y tratamientos

En los experimentos que se describen a continuación, se emplearon plantas de citrange Carrizo de un año de edad (*Citrus sinensis* L. Osb. X *Poncirus trifoliata* L. Raff.) como material vegetal. Las plántulas se cultivaron en macetas de 2.5 L empleando, en el caso de los experimentos de inundación, una mezcla de turba, perlita y vermiculita (80:10:10) como sustrato, y en el caso de los experimentos de sequía severa únicamente perlita. Antes del comienzo de los experimentos, las plantas se aclimataron en invernadero sujetas al fotoperiodo natural y temperatura diurna de $20.0 \pm 3.0^{\circ}\text{C}$ y $17.0 \pm 3.0^{\circ}\text{C}$ por las noches. Las plantas se regaron tres veces a la semana con 0.5 L de solución nutritiva Hoagland (Arbona *et al*, 2009). Los experimentos se realizaron durante el mes de julio.

Se llevaron a cabo dos diseños experimentales.

3.1.1. Estrés por inundación del sustrato

Para este grupo de experimentos, se escogieron treinta y seis plantas de un tamaño y apariencia similar, de las cuales la mitad se estableció como grupo control, siendo regadas tal y como se ha descrito anteriormente, y el resto se sometió a inundación continua, de éstas, la mitad se dejaron drenar con el objetivo de recuperarlas del estrés. El tratamiento de inundación se aplicó introduciendo las macetas en una bolsa de plástico oscuro y, a su vez, en otra maceta de mayor capacidad. A continuación, se llenó la bolsa conteniendo la maceta con la planta con agua del grifo hasta que el agua alcanzase unos 2 cm por encima de la superficie del sustrato. El experimento duró 30 días. Las plantas para recuperar se drenaron después de 10 días de inundación y dejaron recuperar durante 20 días. Este periodo de recuperación se estableció a partir de resultados obtenidos en ensayos anteriores.

De cada uno de los grupos se seleccionaron un número de plantas que se muestrearon al final para realizar distintas medidas fisiológicas. Todas las medidas fisiológicas

descritas a continuación se llevaron a cabo entre las 09:00-11:00 h los días 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 22, 25 y 30 tras la inundación.

El resto de plantas se cosecharon durante el desarrollo del experimento para el análisis de los distintos parámetros bioquímicos. Se realizaron cinco muestreos, en los que se recogieron hojas completamente desarrolladas en posición intermedia y raíces jóvenes, a días 4, 7, 9, 21 y 30. Para ello se escogieron seis plantas por tratamiento y día y se cogió las hojas de la parte intermedia, descartando las más jóvenes y las más maduras así como las raíces laterales. El material se almacenó en hielo hasta llegar al laboratorio, donde se procedió a su procesado.

Para procesar las muestras, tanto raíces como hojas, se lavaron con agua para eliminar cualquier residuo y se congelaron en nitrógeno líquido. A continuación, se trituraron con un molinillo eléctrico reduciéndolos a polvo fino y se guardó a -80°C en tubos de 50 mL para su posterior análisis.

3.1.2. Déficit hídrico

Para el experimento de sequía se escogieron veintiséis plantas, las cuales se dividieron en un grupo control y un grupo con déficit hídrico. Para realizar el tratamiento se trasplantaron todas las plantas de perlita a perlita seca, regando a continuación el grupo control y dejando el grupo de estrés sin riego. El tratamiento de estrés se mantuvo durante 24 h, tras las cuales se realizó un riego para su recuperación. Este periodo de recuperación se estableció en 10 días a partir de resultados de estudios previos.

Los muestreos se realizaron a las 12 y a las 24 h después del trasplante, momento en el cual se volvieron a rehidratar. También se realizó un muestreo a los trece días de iniciar la experiencia, que posteriormente se procesó. A su vez, de cada grupo se escogieron cuatro plantas, de las que se tomaron diferentes medidas fisiológicas a las 12 y 24 h, 3, 6, 8, 10 y 13 días, paralelamente al experimento de inundación.

3.2. Parámetros fisiológicos

3.2.1. Parámetros de intercambio gaseoso

A lo largo del periodo experimental se midió de forma regular los diferentes parámetros de intercambio gaseoso.

Para realizar las medidas se empleó un analizador de gases con detector de infrarrojos (IRGA) portátil Lcpro+ (ADC bioscientific Ltd., Hoddesdon, RU). Se empleó una

radiación artificial de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el flujo molar de aire se fijó en $150 \mu\text{mol s}^{-1}$. Todas las medidas se realizaron a concentración de CO_2 y vapor de agua atmosférico.

Tras la estabilización del instrumento, se seleccionaron de cada planta dos hojas de tamaño medio (de posición intermedia en el tallo), sobre las cuales se realizaron cuatro medidas. En total, cada día, se realizaron 48 medidas para el tratamiento de inundación y para el de sequía 32, así como de los correspondientes controles.

Se obtuvieron datos de A, C_i/C_a , g_s y E. La EUA se calculó como A/E.

3.2.2. Potencial hídrico foliar

La medida del potencial hídrico foliar se realizó con una cámara de presión tipo Scholander (Scholander *et al.*, 1965). Las medidas se realizaron entre las 10:00 h y las 11:00 h. Para ello se cortaron dos hojas de la parte intermedia de cada planta y se colocaron dentro de una cámara sellada, introduciendo a continuación agua a presión. A medida que la presión aumenta, llega el punto en el cual la savia sale del xilema y se visualiza en el extremo cortado del pedúnculo. Esta presión alcanzada es igual, pero con signo negativo, al potencial hídrico aproximado de la planta.

3.2.3. Parámetros de fluorescencia de clorofilas

Para evaluar el funcionamiento del sistema fotosintético en condiciones de estrés se midió la eficiencia cuántica del PSII bajo condiciones de luz actínica [$\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s) / F_m'$] sobre hojas adaptadas a las condiciones de iluminación del invernadero para ambos experimentos. Se empleó un fluorímetro portátil OS 1-FL FluorPen FP-MAX 100 (Photon Systems Instruments, República Checa). F_m' es la máxima fluorescencia de clorofilas en hojas bajo iluminación actínica y F_s es la fluorescencia basal, por lo que Φ_{PSII} mide el transporte no cíclico de electrones entre el PSII y el PSI (Arbona *et al.*, 2008).

3.3. Parámetros bioquímicos

3.3.1. Determinación de la concentración de MDA

Para la determinación del daño oxidativo provocado por el estrés oxidativo de los tratamientos de inundación y sequía se siguió el método descrito por Arbona *et al.* (2008) pero mediante extracción del MDA por ultrasonidos. Para ello se extrajeron 0.2 g de tejido en 2 mL de etanol al 80% (Panreac S.A., Barcelona, España) que posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min a 4°C . Después, se hizo

reaccionar una alícuota del sobrenadante con TCA (Panreac) al 20% (p/v) y otra con una mezcla de TCA al 20% (p/v) y TBA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) al 0.5% (p/v). Ambas mezclas se dejaron reaccionar a 90°C en baño termostataado durante 1 h tras la que se dejaron enfriar en hielo durante 15 min. A continuación, se centrifugaron de nuevo a 2000 rpm durante 10 min a 4°C. Finalmente, se leyó la absorbancia a 440, 532 y 600 nm de la reacción del extracto con la mezcla de TBA y TCA; y a 532 y 600 nm de la reacción del extracto con TCA. La concentración de MDA se calculó:

$$1) [(Abs_{532+TBA})-(Abs_{600+TBA})-(Abs_{532-TBA}-Abs_{600-TBA})] = X$$

$$2) [(Abs_{440+TBA}-Abs_{600+TBA})\cdot 0.0571] = Y$$

$$3) \text{ equivalentes de MDA (nmol ml}^{-1}\text{)} = (X-Y/157000)\cdot 10^6$$

3.3.2. Determinación de la concentración de prolina

Para la determinación de la concentración de prolina se siguió el protocolo descrito por Arbona *et al.* (2003) con algunas modificaciones. Brevemente se homogeneizaron 0.05 g de tejido en 5 mL de ácido sulfosalicílico al 5% (Panreac) utilizando un baño de ultrasonidos. El homogeneizado se centrifugó a 4000 rpm durante 45 min a 4°C y se recuperó 1 mL de sobrenadante, que se combinó con una mezcla de ácido acético glacial (Panreac) y reactivo de níhidrina en proporción 1:1 (v/v). A continuación, la mezcla se incubó a 100°C en baño termostataado durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar en baño de hielo y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min a 4°C. La fase orgánica se particionó con 2 mL de tolueno (grado ACS; Paneac) y se midió la absorbancia a 520 nm. El valor obtenido se interpoló en una curva estándar realizada con prolina comercial (Sigma-Aldrich; Madrid, España).

3.3.3. Determinación de la actividad enzimática antioxidante APX

Para determinar la actividad del enzima APX se empleó 0.5 g de tejido y se homogeneizaron a 4°C, con ayuda de mortero y maza, en 2.5 mL de solución de extracción formada por tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.1, ascorbato sódico 1 mM y EDTA-Na 0.1 mM. La mezcla resultante se filtró a través de una doble capa de tela de muselina, ayudando con 2.5 mL más de tampón de extracción y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min a 10°C. El sobrenadante resultante se diluyó en proporción 1:5 con el tampón fosfato sódico empleado anteriormente.

El análisis de la actividad del enzima se evaluó según el método espectrofotométrico descrito por Asada (1984), en el cual se mide la disminución de la absorbancia a 290 nm debido al consumo de ascorbato en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Para el cálculo de actividad APX específica se midió la concentración de proteína siguiendo el método de Bradford (1976) y se sustrajo la actividad AOX, que oxida

ascorbato con independencia del H₂O₂ y la oxidación inespecífica del ascorbato producida por el H₂O₂. Tal y como se describe en la bibliografía, la actividad APX se expresó en unidades catalíticas, cada unidad es aquella cantidad de enzima que produce la oxidación de 1 mmol de ascorbato por min, por mg de proteína.

3.4. Análisis hormonal

3.4.1. Determinación de ABA y JA

Para la determinación de las fitohormonas estudiadas se siguió el protocolo descrito en Durgbanshi *et al.* (2005) y Arbona *et al.* (2008). Se pesaron 0.2 g de material vegetal (raíces u hojas) y se añadieron como patrones internos 100 ng de [²H₆]-ABA, 100 ng de [²H₄]-SA y 100 ng de ácido dihidrojasónico. A continuación se añadió 5 mL de agua desionizada y se homogeneizó la mezcla mediante un dispersador (Ultra-Turrax, Ika-Werke, Staufen, Alemania). Tras centrifugar las muestras a 4700 rpm a 4°C se recogió el sobrenadante y se ajustó el pH a 3.0 con una solución de ácido acético al 30% (v/v). Se hicieron dos particiones con 3 mL de éter etílico (Panreac). Se recuperó la fase orgánica y se secó a temperatura ambiente en una centrifuga de evaporación al vacío (Jouan, Saint-Herblain, Francia). El residuo seco resultante se resuspendió en una solución de agua:metanol (9:1) y se pasó por filtros de celulosa regenerada de 0.2 µm de tamaño de poro. A continuación, el extracto se inyectó en un equipo de HPLC (Alliance 2695, Waters Corp., Milford, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas. La separación se llevó a cabo en fase reversa en una columna de C18 (Kromasil 100 C18 5 µm 100 x 2.1 mm, Scharlau) empleando como solventes ácido acético al 0.05% en agua ultrapura y metanol. La detección de los compuestos se realizó en modo electrospray negativo y la cuantificación se realizó en base a una curva de calibrado inyectada previamente.

3.5. Tratamiento estadístico

Para la realización de los ensayos se utilizó un diseño completamente al azar. Los resultados fueron analizados utilizando el programa informático InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012). Para el análisis de los datos se realizó una comparación de medias (método de Tukey, p≤0.05) de los datos.

4. RESULTADOS

4.1. Estrés por inundación del sustrato

4.1.1. Parámetros de intercambio gaseoso

Tasa fotosintética neta (An)

En la Figura 4.1 se muestra el comportamiento de An de plantas de cítricos control, sometidas a estrés por inundación y tras el drenaje del exceso de agua. Durante los primeros 7 días de inundación del sustrato, los valores de An en plantas estresadas no presentaron diferencias significativas respecto de plantas control. A partir de entonces, A inició un descenso progresivo (alcanzando una reducción de un 42.7% respecto a las plantas control tan solo 9 días después del inicio de los experimentos). Al final del periodo experimental, los valores de An en plantas inundadas alcanzaron niveles tan bajos como $0.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, representando una reducción del 91.3%. El drenaje del exceso de agua tras 9 días de inundación continuada provocó un rápido incremento de A hasta valores control que se situaron entre 5 y $8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

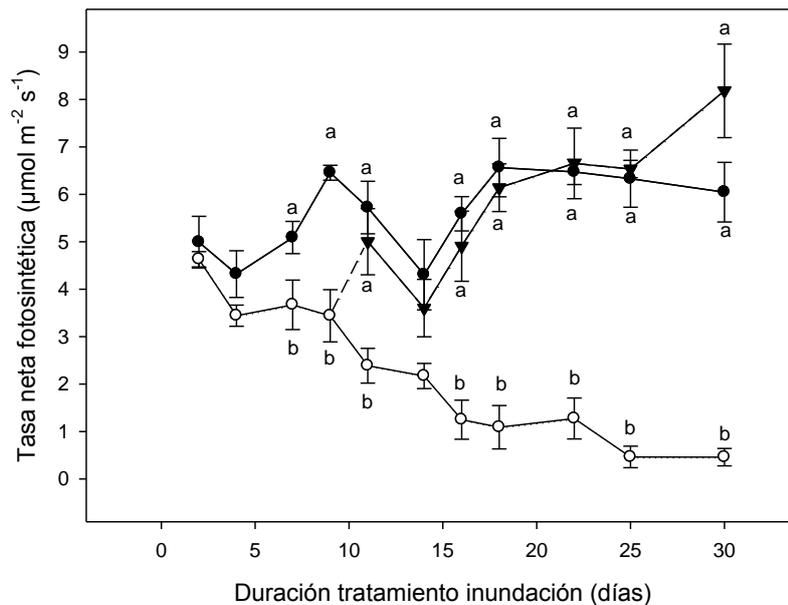


Figura 4.1. Tasa Fotosintética Neta (An). En cada gráfica (●) indica plantas control, (○) indica plantas sometidas a estrés por inundación y (▼) indica plantas drenadas tras ser sometidas a estrés por inundación. Cada punto representa la media de al menos 34 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Tasa de transpiración (E)

En la Figura 4.2 se representa E a lo largo del periodo experimental. Este parámetro siguió una pauta similar a la de An, de modo que el tratamiento de inundación provocó una reducción en E mientras que las plantas control presentaron valores superiores a las plantas estresadas durante todo el periodo. De igual manera, el exceso de agua se drenó después de 9 días de inundación continuada, lo cual permitió la rápida recuperación de este parámetro hasta valores control.

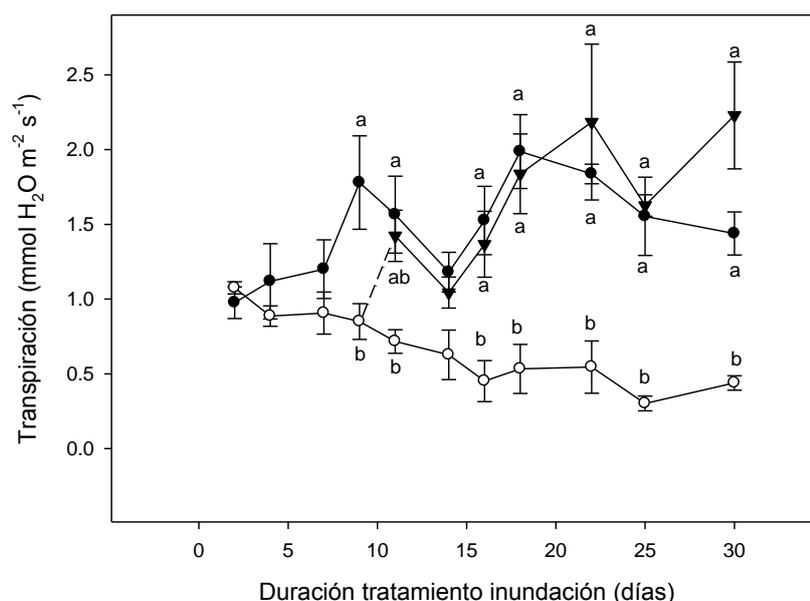


Figura 4.2. Tasa de Transpiración (E). En cada gráfica (●) indica plantas control, (○) indica plantas sometidas a estrés por inundación y (▼) indica plantas drenadas tras ser sometidas a estrés por inundación. Cada punto representa la media de al menos 34 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Conductancia estomática (g_s)

Continuando con los parámetros de intercambio gaseoso, en la Figura 4.3 se presentan los resultados correspondientes a g_s . De forma similar a An y E, los valores de g_s en las plantas inundadas fueron inferiores a los de las plantas control durante todo el periodo experimental. Además, la reducción observada fue progresiva, de tal forma que a partir del día 14 el descenso fue de un 50% respecto a las plantas control. El drenaje del exceso de agua tras 9 días de inundación continuada, previno la reducción en este parámetro asociada al estrés. Así, durante el resto del periodo experimental, ambos grupos de plantas control y drenadas presentaron valores similares de g_s .

Relación entre la concentración de CO₂ subestomática y ambiental (C_i/C_a)

A modo de medida de la eficiencia carboxilativa, se presentan los resultados obtenidos de C_i/C_a en la Figura 4.4. Durante los primeros días de tratamiento, no se observaron diferencias significativas entre plantas control y el resto de tratamientos. No fue hasta pasados 15 días que las diferencias entre plantas inundadas de forma continua y el resto de grupos fueron significativas. Hacia el final del periodo experimental, los valores obtenidos en plantas control fueron de 0,49 ± 0,03 y en plantas sometidas a inundación se alcanzaron valores casi dos veces superiores, alrededor de 0.91 ± 0.06.

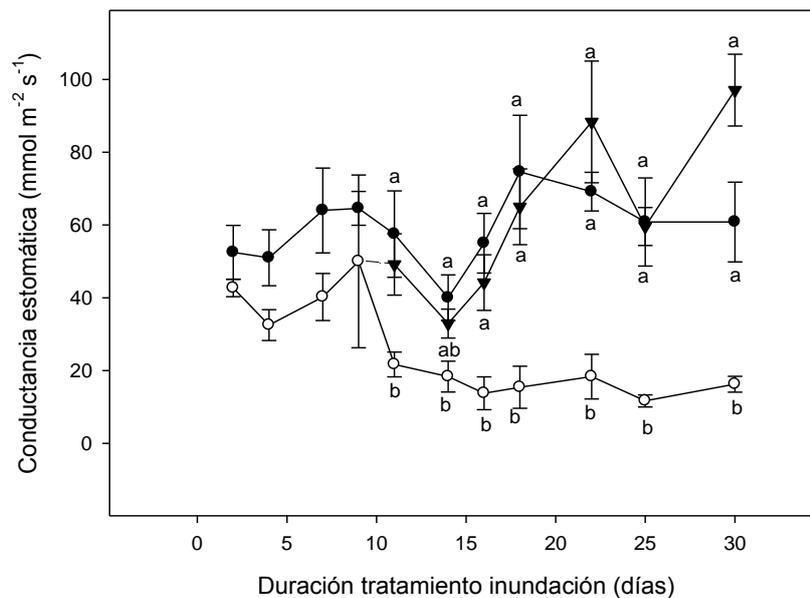


Figura 4.3. Conductancia estomática (g_s). En cada gráfica (●) indica plantas control, (○) indica plantas sometidas a estrés por inundación y (▼) indica plantas drenadas tras ser sometidas a estrés por inundación. Cada punto representa la media de al menos 34 determinaciones independientes ±ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey (p≤0.05).

Eficiencia en el uso del agua (EUA)

En la Figura 4.5 se muestran los resultados obtenidos para la EUA. Durante los primeros días, la inundación del sustrato no presentó diferencias significativas respecto de las plantas control. A partir del día 16 la EUA descendió de manera significativa en hojas de plantas inundadas, disminuyendo de forma progresiva hasta alcanzar valores de un 74.9% respecto de los observados en las plantas control al final del periodo experimental. El drenaje del exceso de agua previno el descenso acusado de este parámetro inducido por la inundación, situándose a niveles similares a las plantas control.

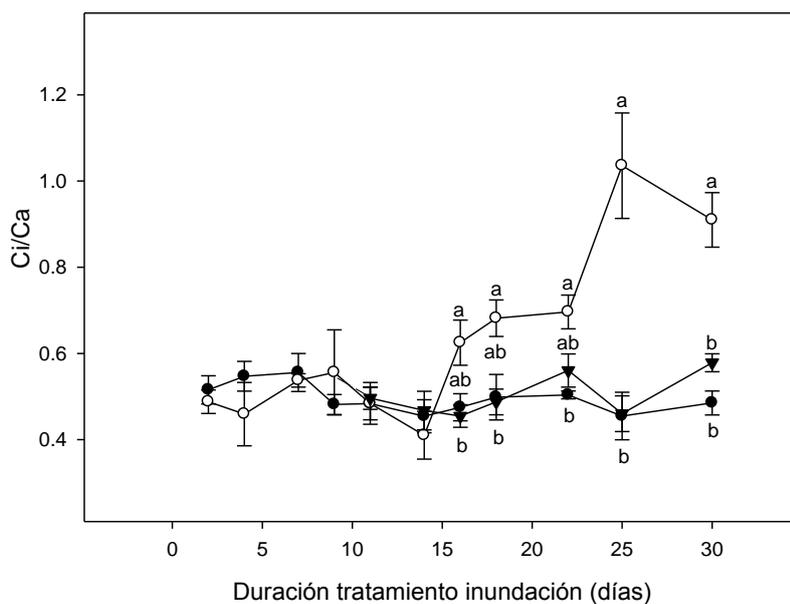


Figura 4.4. Relación entre la Concentración de CO₂ subestomática y la Concentración de CO₂ ambiental (C_i/C_a). En cada gráfica (●) indica plantas control, (○) indica plantas sometidas a estrés por inundación y (▼) indica plantas drenadas tras ser sometidas a estrés por inundación. Cada punto representa la media de al menos 34 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p < 0.05$).

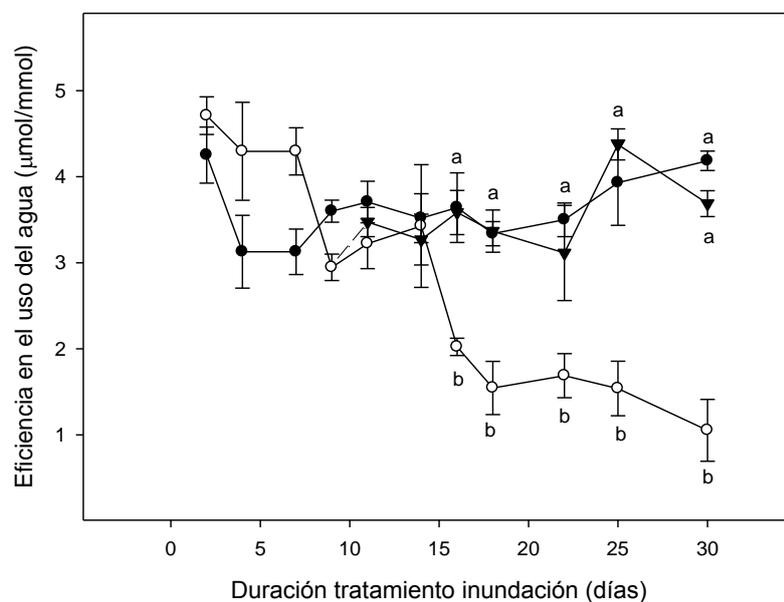


Figura 4.5. Eficiencia en el uso del agua (EUA). En cada gráfica (●) indica plantas control, (○) indica plantas sometidas a estrés por inundación y (▼) indica plantas drenadas tras ser sometidas a estrés por inundación. Cada punto representa la media de al menos 34 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p < 0.05$).

Potencial hídrico foliar

En la Figura 4.6 se presentan los resultados obtenidos para el potencial hídrico en hojas de cítricos. Durante buena parte del periodo experimental no se observaron diferencias significativas entre plantas control e inundadas. Pasados 20 días, se produjo un descenso en el potencial hídrico de plantas inundadas respecto de las plantas control, alcanzando al final del periodo un valor de -2.43 ± 0.05 MPa frente a -1.47 ± 0.03 MPa en las plantas control. En este caso, las plantas sometidas a inundación en las que se drenó el exceso de agua tras 9 días de tratamiento presentaron un comportamiento similar a las plantas control no inundadas. Por tanto, el drenaje del agua de inundación previno este descenso del potencial hídrico foliar.

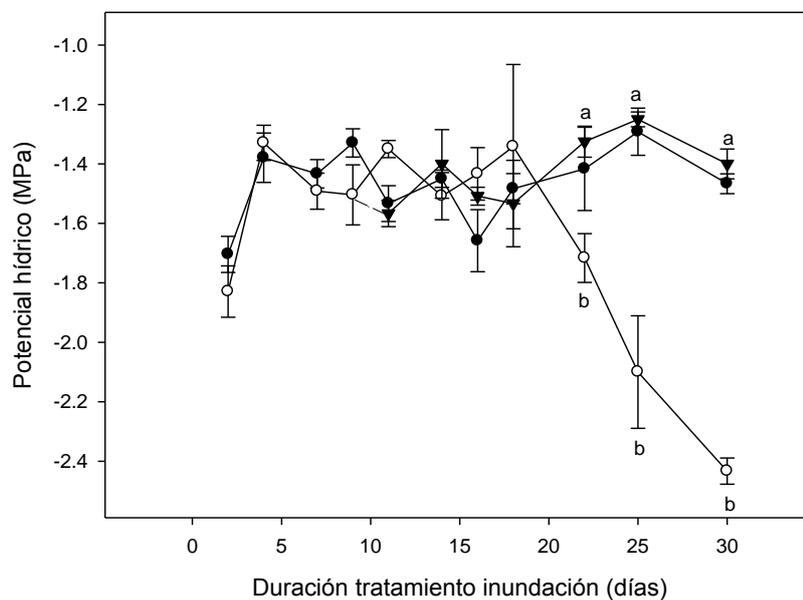


Figura 4.6. Potencial hídrico. En cada gráfica (●) indica plantas control, (○) indica plantas sometidas a estrés por inundación y (▼) indica plantas drenadas tras ser sometidas a estrés por inundación. Cada punto representa la media de al menos 6 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Eficiencia cuántica del fotosistema II (Φ_{PSII})

Con el objetivo de evaluar el transporte electrónico entre fotosistemas y el efecto del estrés sobre este proceso fotoquímico, se midió Φ_{PSII} en hojas adaptadas a luz actínica (Figura 4.7). La inundación del sustrato no provocó alteraciones significativas de este parámetro respecto de los valores control. Posteriormente, a partir del día 14, este parámetro inició un descenso progresivo en hojas de plantas inundadas de forma continua, situándose en valores un 20% inferiores a los de las plantas control. El drenaje del exceso de agua previno este descenso y este grupo de plantas presentó valores similares a los controles durante el resto del periodo experimental.

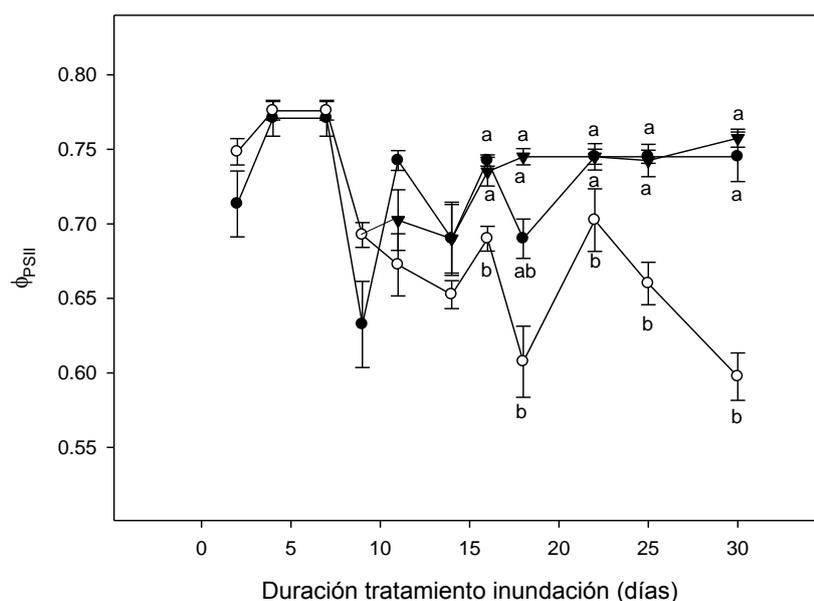


Figura 4.7. Eficiencia cuántica del PSII (Φ_{PSII}). En cada gráfica (●) indica plantas control, (○) indica plantas sometidas a estrés por inundación y (▼) indica plantas drenadas tras ser sometidas a estrés por inundación. Cada punto representa la media de al menos 17 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

4.1.2. Parámetros bioquímicos

Concentración MDA

El grado de daño oxidativo generado por el tratamiento de estrés se evaluó mediante la determinación de la concentración de MDA tanto en el tejido foliar como radicular (Figura 4.8). No se observaron diferencias significativas en la concentración de MDA foliar entre plantas control y sometidas a inundación hasta pasados 9 días de estrés, la fecha previa al drenaje. Estas diferencias se mantuvieron en plantas inundadas de forma continuada hasta los 30 días, que finalizó el experimento. El drenaje del exceso de agua tras 9 días de inundación, tuvo como resultado el descenso de la concentración foliar de MDA hasta valores control.

En las raíces, el contenido en MDA en plantas sometidas a estrés fue incrementando de manera significativa hasta el día 9, siendo en este momento, 1.5 veces superior al de las plantas control. Tras 30 días de inundación del sustrato la concentración de MDA radicular descendió hasta llegar aproximadamente a la mitad de los valores control. El grupo de plantas drenadas presentó, tras 21 días después del drenaje, valores de concentración de MDA radicular significativamente superiores a los de las plantas control.

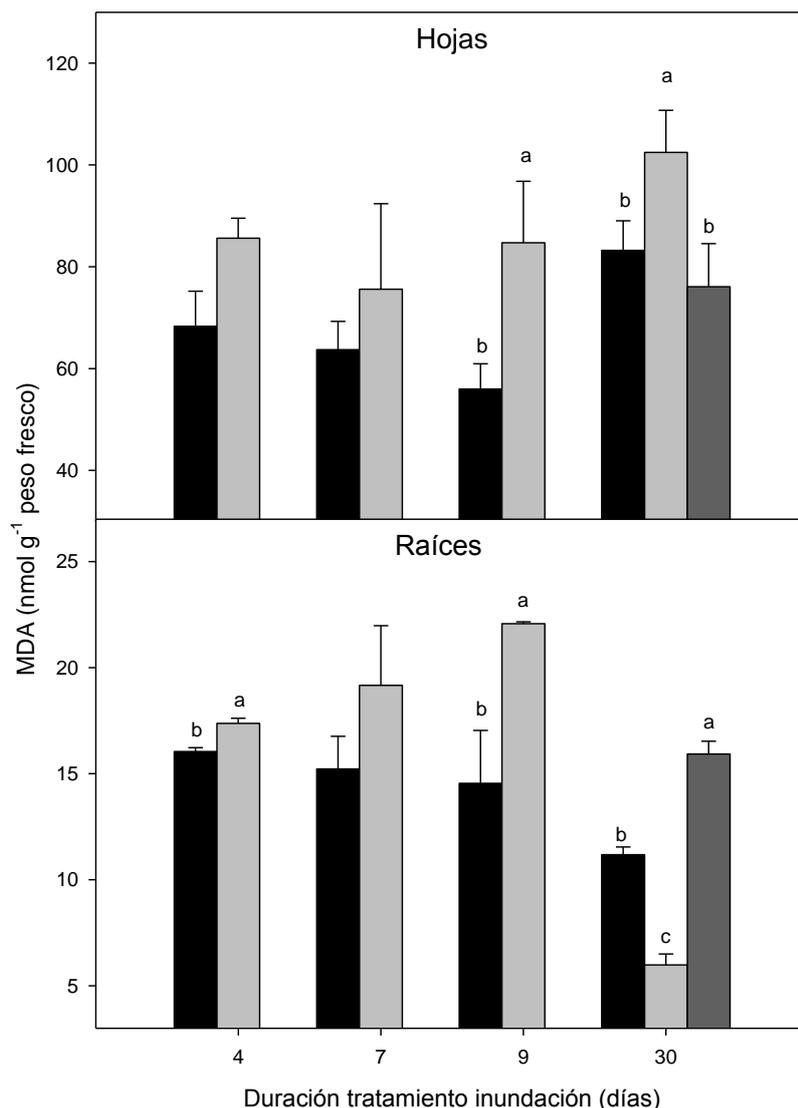


Figura 4.8. Concentración de MDA en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés por inundación. En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a estrés por inundación y (▒) indica plantas drenadas tras ser sometidas a estrés por inundación. Cada barra representa la media de al menos 3 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Concentración de prolina

En la Figura 4.9 se muestra la evolución en el contenido de prolina a nivel de hojas y raíces. En hojas no se observaron diferencias significativas durante los primeros días. No fue hasta el final del periodo experimental que la inundación del sustrato provocó un incremento significativo en el contenido de prolina foliar respecto de plantas control ($15.5 \pm 1.2 \mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco en plantas control frente a $55.8 \pm 5.3 \mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco en plantas sometidas a inundación). En este sentido, el drenaje del sustrato previno la acumulación de este metabolito.

El contenido en prolina en las raíces se vio incrementado con la inundación del sustrato de forma temprana y significativa. De hecho, las diferencias fueron patentes a partir de los 7 días, alcanzando los máximos valores tan solo 9 días después del inicio del tratamiento. El contenido en prolina radicular presentó valores inferiores a los control en estadios avanzados del estrés. El drenaje del exceso de agua, permitió la recuperación de este parámetro aunque sin alcanzar valores control al final del periodo experimental. Por lo general, los niveles máximos de prolina en condiciones de estrés fueron superiores en hojas que en raíces, aunque los valores basales siempre rondaron los 12-20 $\mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco.

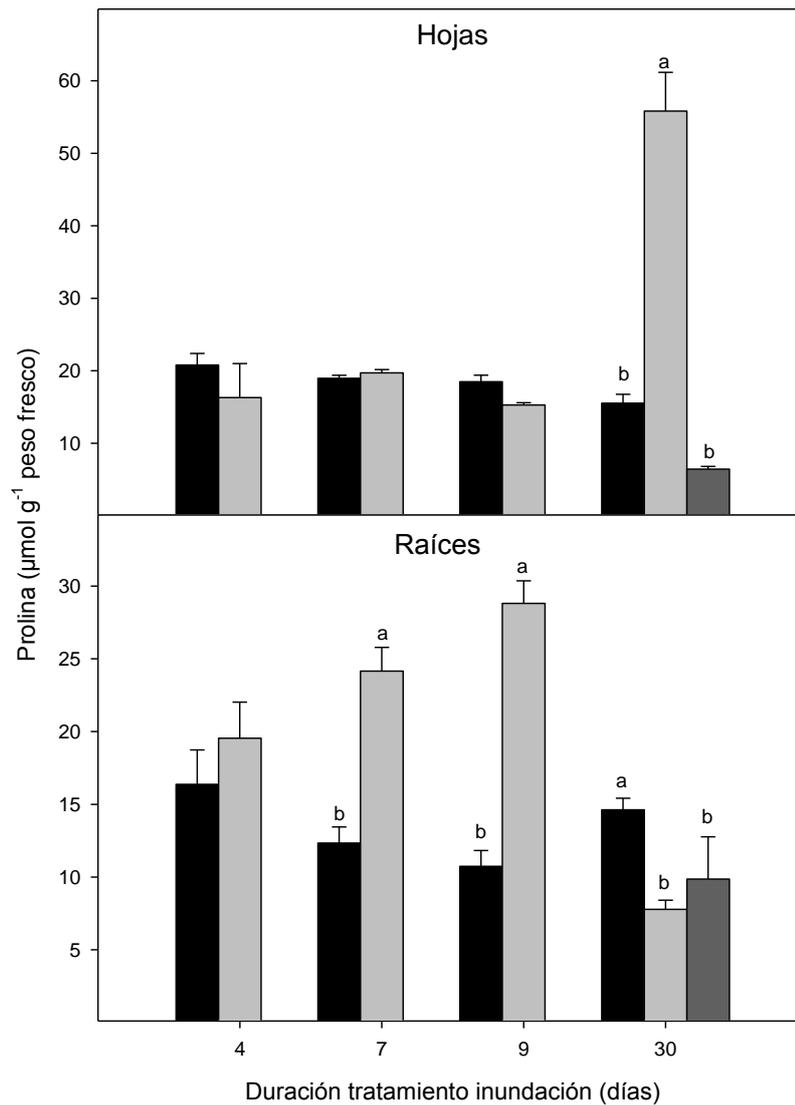


Figura 4.9. Concentración de prolina en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés por inundación. En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a estrés por inundación y (▒) indica plantas drenadas tras ser sometidas a estrés por inundación. Cada barra representa la media de al menos 3 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Actividad antioxidante APX

En la Figura 4.10 se representan los valores de la actividad del enzima APX en hojas y raíces de cítricos en condiciones control y sometidos a inundación. En las hojas, el tratamiento de inundación provocó, al principio y de forma transitoria un descenso de la actividad APX respecto a las plantas control, recuperándose en días posteriores. Al final del periodo experimental, no obstante, esta actividad enzimática se vio incrementada en respuesta a la inundación. En las plantas drenadas, la actividad se mantuvo en niveles control el resto del experimento.

En las raíces se produjo un descenso transitorio en la actividad enzimática APX similar al observado en hojas, aunque algo posterior, a los 7 días de tratamiento de inundación. En fechas posteriores la actividad se recuperó hasta valores control (después de 9 días de tratamiento). Al final del periodo experimental, los valores de actividad APX medidos en raíces de plantas inundadas fueron extremadamente bajos, llegando prácticamente a la depresión de la actividad. El drenaje del exceso de agua previno este descenso acusado y el mantenimiento de la actividad enzimática en valores control.

4.1.3. Contenido hormonal

Concentración de ABA

La evolución del contenido de ABA foliar y radicular se muestra en la Figura 4.11. Como respuesta al encharcamiento del sustrato, el contenido foliar de ABA se vio incrementado de forma ligera pero significativa desde los primeros días de tratamiento. Solo tras 30 días de inundación continua, los niveles medidos en hojas de citrange Carrizo fueron de 400 ng g^{-1} peso fresco, alrededor de 16 veces los valores en hojas de plantas control. El drenaje del exceso de agua tras 9 días de inundación tuvo como resultado el descenso de la concentración foliar de ABA hasta niveles control.

En raíces la inundación del sustrato provocó un descenso de la concentración de ABA tras solo 4 días de tratamiento, aunque este descenso no fue estadísticamente significativo. Los niveles de esta hormona fueron descendiendo aún más en los días posteriores, observándose a partir del día 7 valores significativamente inferiores respecto de los controles. Las raíces de plantas inundadas durante 30 días seguidos mantuvieron niveles bajos de ABA. El drenaje del exceso de agua tuvo como resultado la recuperación de los niveles de ABA aunque éstos fueron significativamente inferiores a los controles.

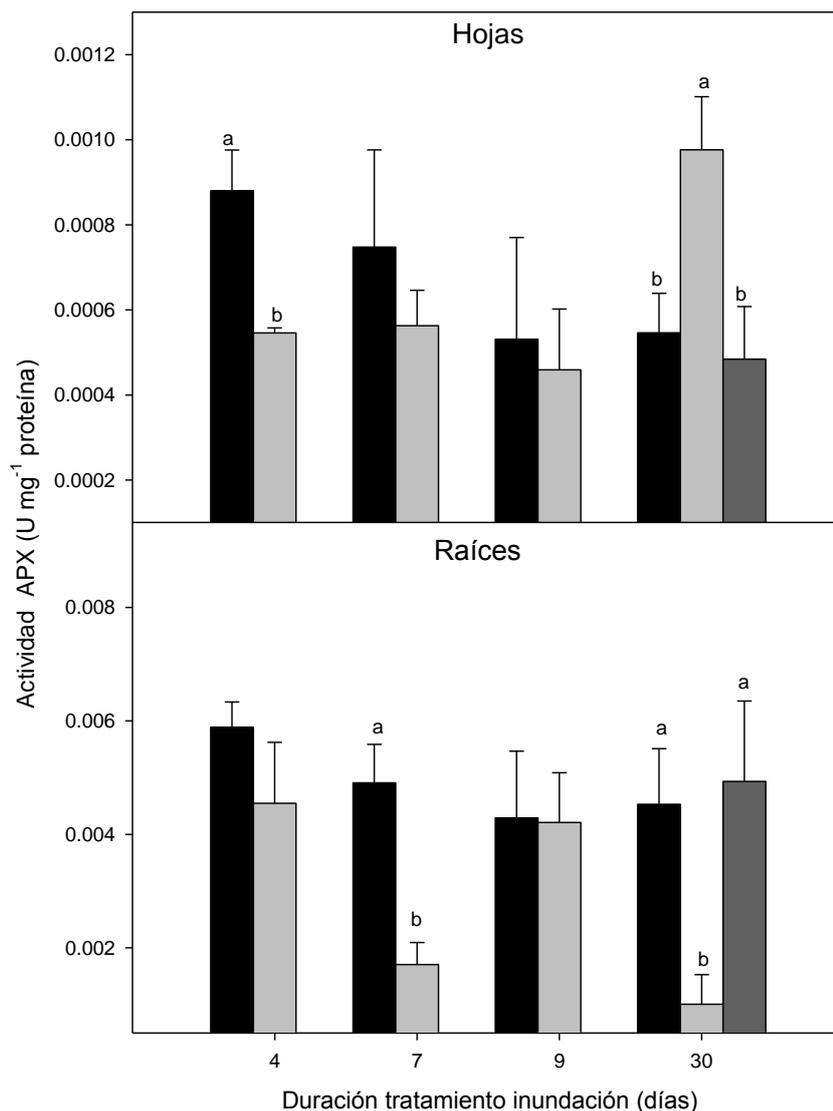


Figura 4.10. Actividad APX en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés por inundación. En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a estrés por inundación y (▒) plantas drenadas tras ser sometidas a estrés por inundación. Cada punto representa la media de al menos 3 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Concentración de JA

En la Figura 4.12 se representan los resultados obtenidos del análisis de JA en hojas y raíces. Durante la mayor parte del período de estudio no se observaron variaciones significativas en la concentración foliar de JA en respuesta al tratamiento de inundación. Al final del experimento se produjo un incremento significativo en el contenido en JA en hojas de plantas sometidas a inundación (9.6 ng g^{-1} peso fresco en plantas estresadas frente 0.2 ng g^{-1} peso fresco en plantas control). El drenaje del exceso de agua previno en parte esta masiva acumulación de JA y, como consecuencia,

la concentración de esta hormona en hojas de plantas drenadas no mostró diferencias significativas respecto del grupo control.

De forma paralela al ABA, el contenido radicular de JA se vio reducido por debajo de los niveles control de forma significativa y constante en respuesta al tratamiento de inundación. El grupo de plantas drenadas presentó niveles de JA significativamente superiores a los de plantas inundadas de forma continua e incluso de plantas control (42.7 ng g⁻¹ peso fresco en plantas drenadas frente 16.8 ng g⁻¹ peso fresco en plantas control y 2.9 ng g⁻¹ peso fresco en plantas inundadas).

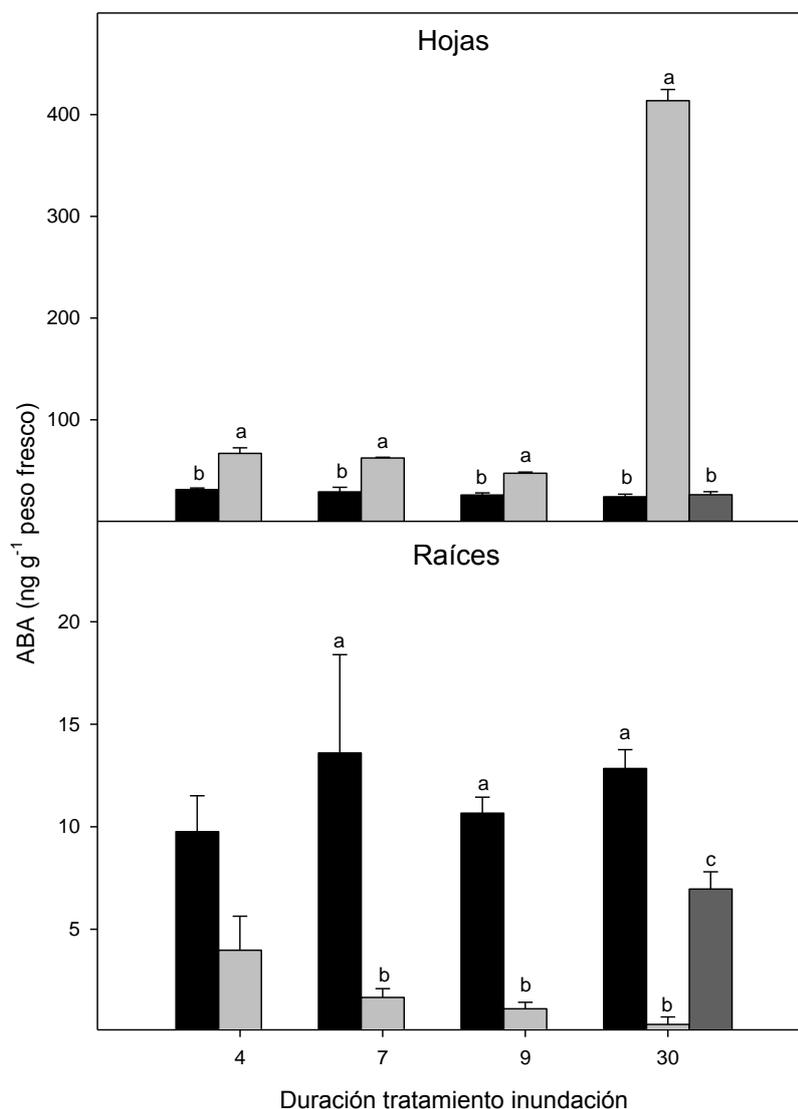


Figura 4.11. Contenido de ABA en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés por inundación. En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a estrés por inundación y (▒) plantas drenadas tras ser sometidas a estrés por inundación. Cada punto representa la media de al menos 3 determinaciones independientes ±ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey (p≤0.05).

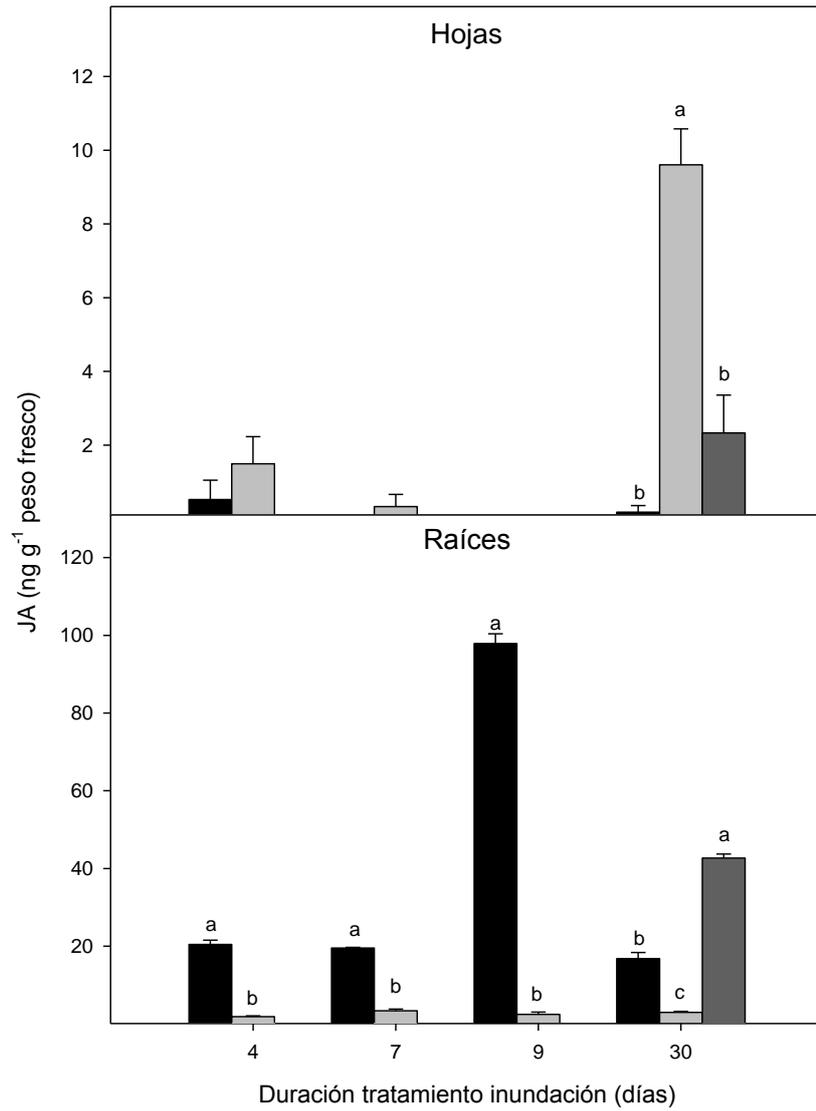


Figura 4.12. Contenido de JA en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés por inundación. En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a estrés por inundación y (▒) plantas drenadas tras ser sometidas a estrés por inundación. Cada punto representa la media de al menos 3 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

4.2. Déficit hídrico

4.2.1. Parámetros de intercambio gaseoso

Tasa fotosintética neta (An)

En la Figura 4.13 se muestran los resultados correspondientes a A_n de plantas de cítricos control y plantas sometidas a déficit hídrico y posteriormente rehidratadas. El déficit hídrico provocó una disminución significativa de A_n tras solo 12 h de estrés (representando una reducción de un 78% respecto de valores control). En plantas estresadas A_n presentó valores alrededor de $0.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 12 y 24 h de privación del riego. La rehidratación de las plantas provocó la recuperación de este parámetro hasta valores control tras 10 días de rehidratación.

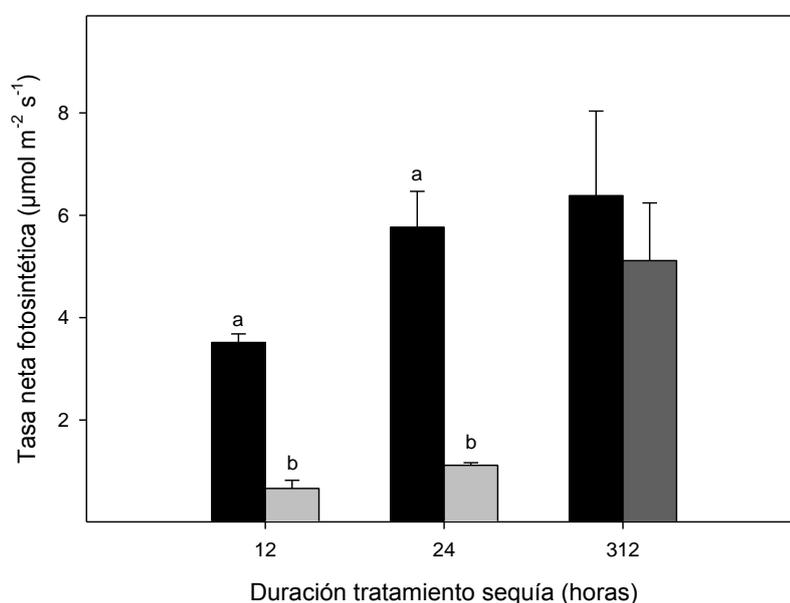


Figura 4.13. Tasa Fotosintética Neta (A_n). En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a déficit hídrico y (▒) plantas rehidratadas. Cada punto representa la media de al menos 16 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Tasa de transpiración (E)

Los resultados de E se presentan en la Figura 4.14. Las condiciones de sequía causaron un descenso significativo en dicho parámetro en relación a las plantas control tras 12 y 24 h. Después de la rehidratación del sustrato se alcanzaron valores similares a los obtenidos para las plantas control.

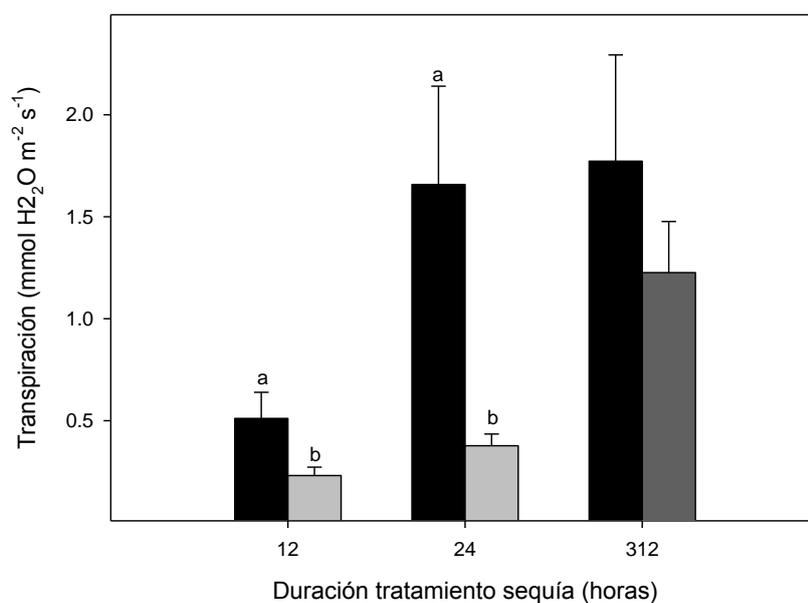


Figura 4.14. Tasa de Transpiración (E). En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a déficit hídrico y (■) plantas rehidratadas. Cada punto representa la media de al menos 16 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Conductancia estomática (g_s)

Como se muestra en la Figura 4.15, las condiciones de sequía provocaron un descenso significativo de g_s tras 12 h de déficit hídrico, que se mantuvo a las 24 h. La rehidratación del sustrato a partir de este momento provocó un incremento de este parámetro, recuperándose hasta alcanzar valores similares a las plantas control.

Relación entre la concentración de CO₂ subestomática y ambiental (C_i/C_a)

En cuanto a la eficiencia carboxilativa, medida como la relación C_i/C_a (Figura 4.16), incrementó de forma significativa tanto a las 12 como a las 24 h respecto a las plantas control, recuperándose tras la rehidratación del sustrato hasta valores control.

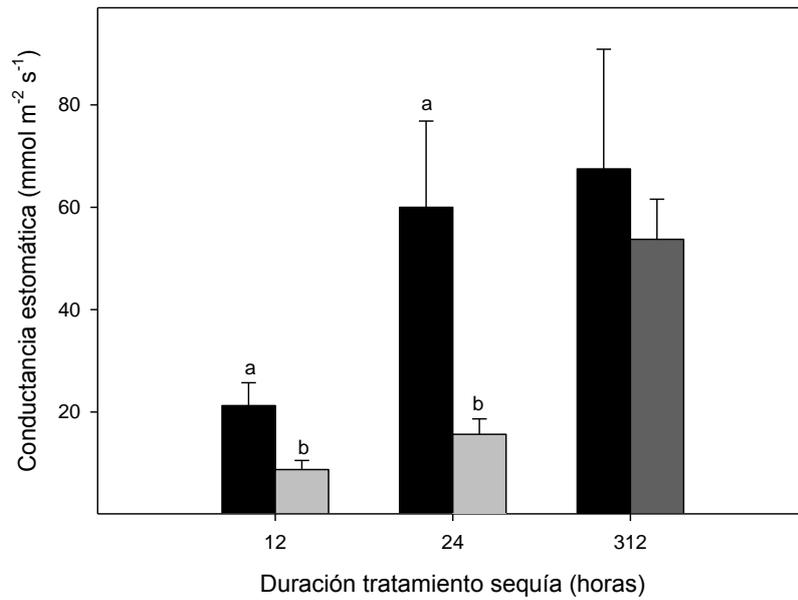


Figura 4.15. Conductancia estomática (g_s). En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a déficit hídrico y (■) plantas rehidratadas. Cada punto representa la media de al menos 16 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

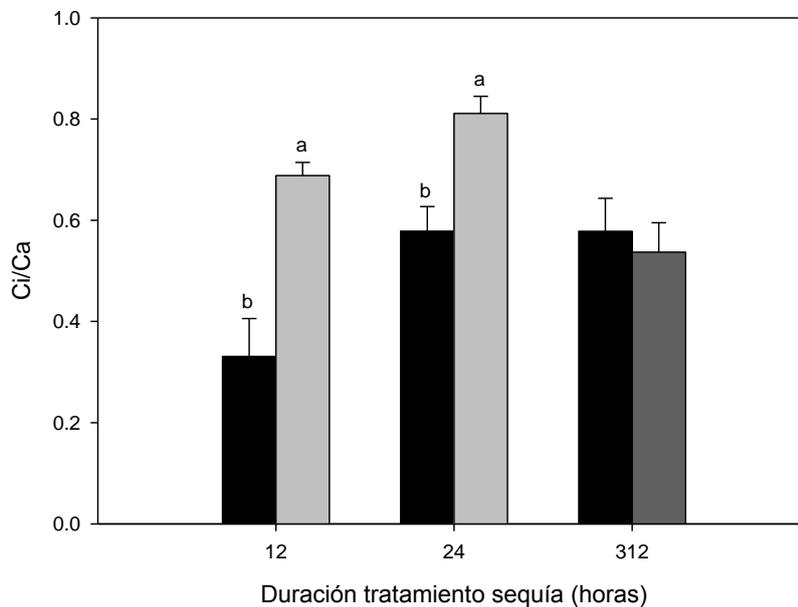


Figura 4.16. Relación entre la Concentración de CO_2 subestomática y la Concentración de CO_2 ambiental (C_i/C_a). En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a déficit hídrico y (■) plantas rehidratadas. Cada punto representa la media de al menos 16 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Eficiencia en el uso del agua (EUA)

Siguiendo con los parámetros fisiológicos, en la Figura 4.17 se representa la EUA. A las 12 h de déficit hídrico este parámetro descendió de forma significativa en relación a las plantas control, siguiendo este descenso hasta las 24 h. A partir de este momento, la rehidratación del sustrato permitió la rápida recuperación de la EUA hasta valores control.

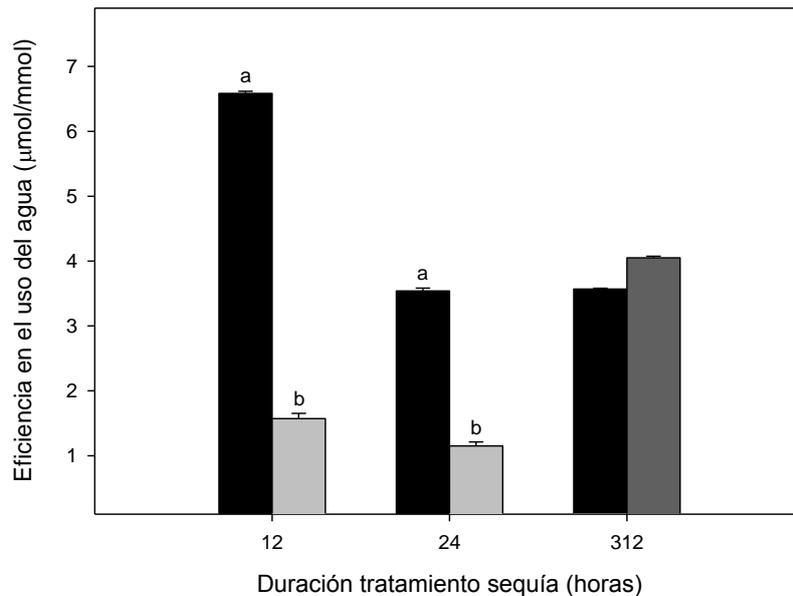


Figura 4.17. Eficiencia en el uso del agua (EUA). En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a déficit hídrico y (■) plantas rehidratadas. Cada punto representa la media de al menos 16 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Potencial hídrico foliar

En la Figura 4.18 se representan los resultados correspondientes a la medida del potencial hídrico foliar. La sequía provocó un descenso significativo de este parámetro tan solo después de 12 h de tratamiento y este efecto se mantuvo después de 24 h. A partir del momento de rehidratación del sustrato, el potencial hídrico se recuperó rápidamente igualándose al de plantas control.

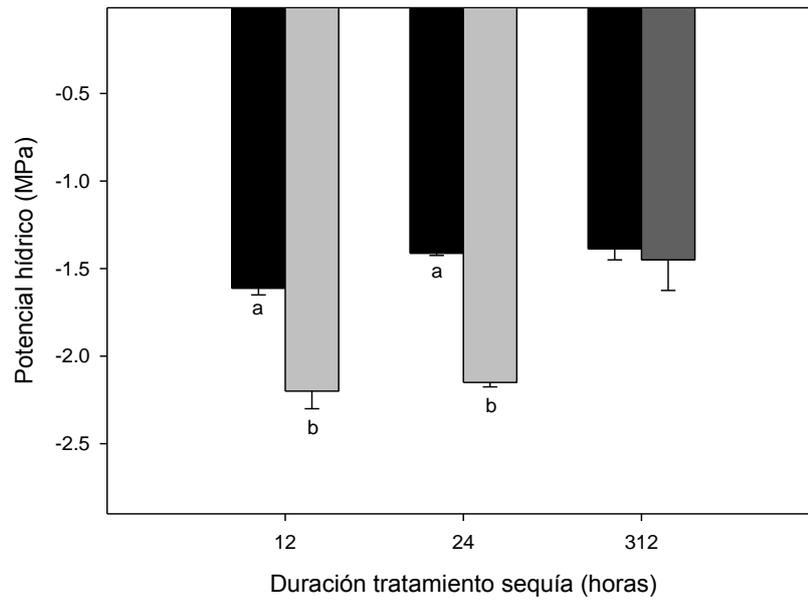


Figura 4.18. Potencial hídrico. En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a déficit hídrico y (■) plantas rehidratadas. Cada punto representa la media de al menos 4 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Eficiencia cuántica del fotosistema II (Φ_{PSII})

Los resultados de Φ_{PSII} se muestran en la Figura 4.19. El tratamiento de sequía provocó un descenso significativo de este parámetro de menor magnitud tras 12 h de estrés y posteriormente este efecto se acentuó, llegando a valores un 20% inferiores a los control. Desde el momento de rehidratación, el parámetro se recuperó rápidamente hasta el final del experimento.

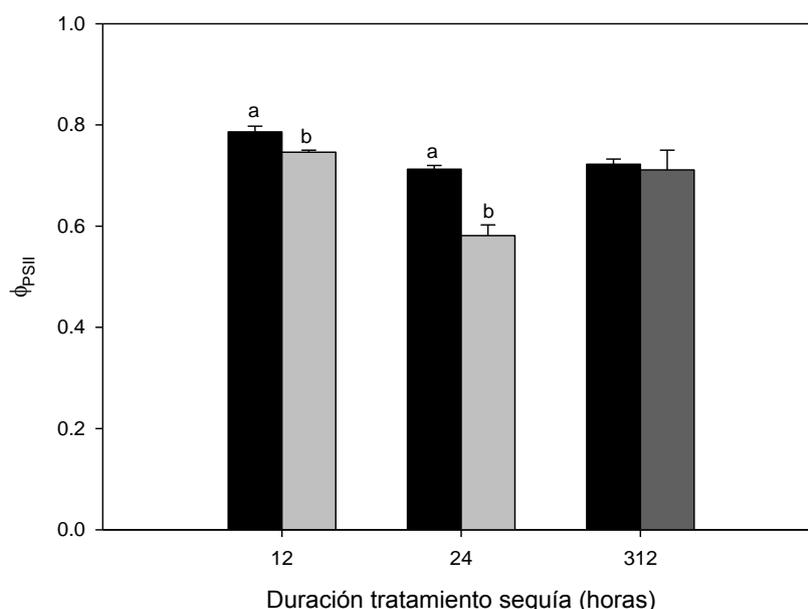


Figura 4.19. Eficiencia cuántica del PSII (Φ_{PSII}). En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a déficit hídrico y (▒) plantas rehidratadas. Cada punto representa la media de al menos 8 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

4.2.2. Parámetros bioquímicos

Concentración de MDA

Los resultados de la concentración de MDA como medida del grado oxidativo se presentan en la Figura 4.20. En el tejido foliar, tanto a las 12 como a las 24 h, las condiciones de sequía produjeron un incremento significativo en la concentración de MDA hasta valores de 80 y 95 nmol g^{-1} peso fresco, un incremento de 1.25 veces respecto de valores control. La rehidratación provocó un descenso del daño oxidativo hasta valores control.

En las raíces, en cambio, el déficit hídrico no provocó cambios significativos en la concentración de MDA entre plantas control y estresadas, presentando valores entre 30 y 33 nmol g^{-1} peso fresco. Sorprendentemente, la rehidratación provocó un descenso del daño oxidativo por debajo de valores control, alcanzando valores un 50% inferiores.

Concentración de prolina

En la Figura 4.21 se presenta el contenido de prolina foliar y radicular de plantas sometidas a déficit hídrico y plantas control. A las 12 h de sequía se produjo en la parte aérea un incremento significativo en la concentración de prolina, que continuó aumentando hasta las 24 h de estrés. Al final del periodo experimental, tras diez días

de rehidratación, el contenido en prolina disminuyó en relación a los valores obtenidos para las condiciones de estrés pero continuó siendo significativamente superior a los valores analizados en las plantas control.

En las raíces, las condiciones de sequía produjeron un incremento significativo en la concentración de prolina tanto a las 12 h como a las 24 h aunque de magnitud inferior a los observados en hojas, alcanzando en este momento los máximos valores ($30.1 \pm 3.1 \mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco). Al final del experimento, la concentración de prolina siguió siendo significativamente mayor en las plantas rehidratadas que en las plantas control, con valores similares a los de plantas estresadas.

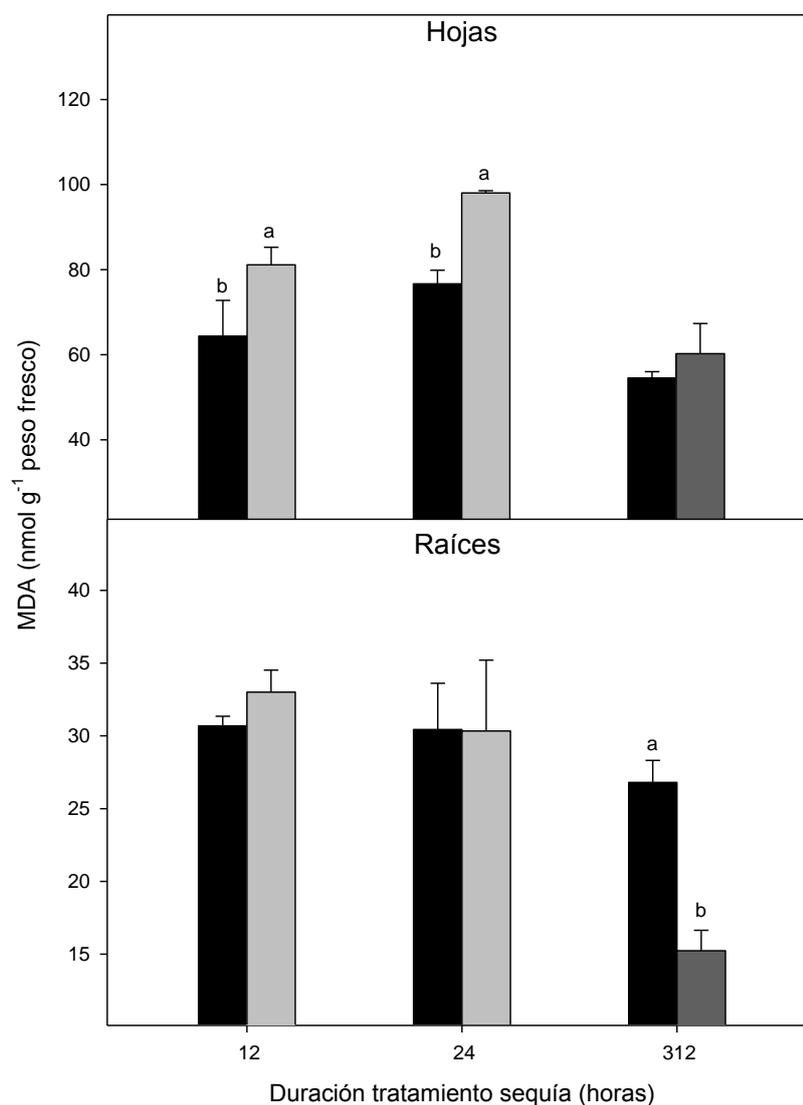


Figura 4.20. Concentración de MDA en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico. En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a déficit hídrico y (■) indica plantas rehidratadas. Cada barra representa la media de al menos 3 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

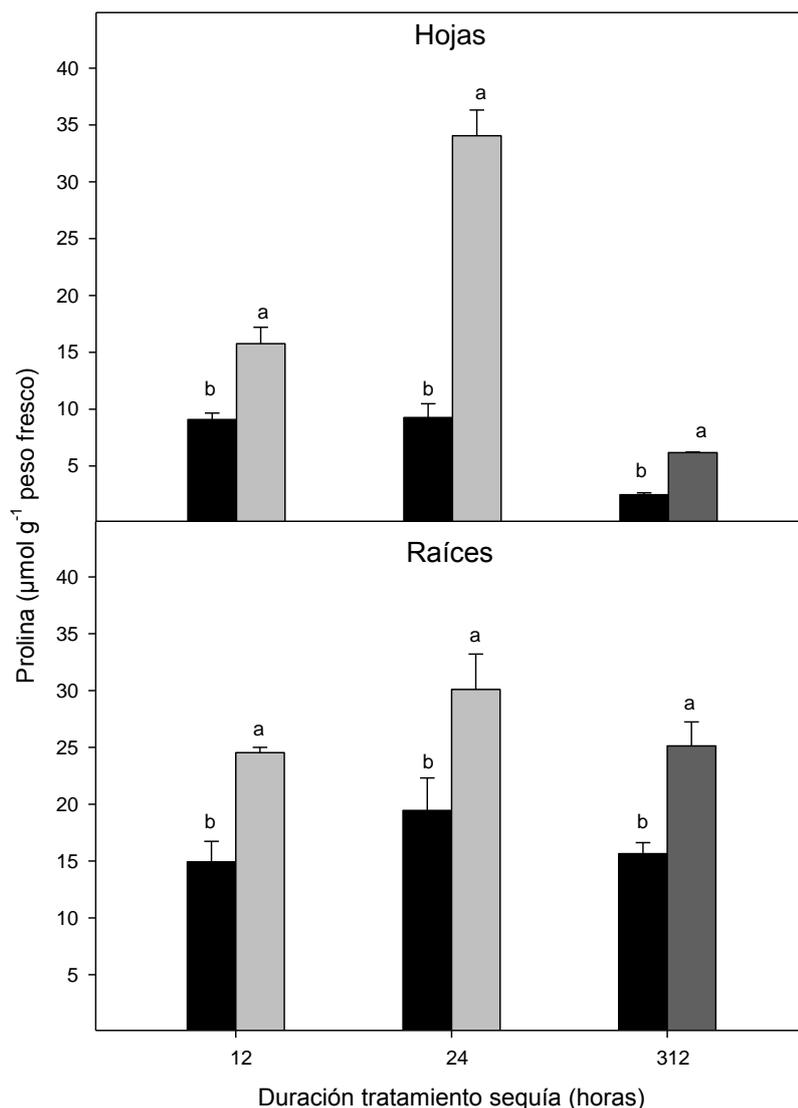


Figura 4.21. Concentración de prolina en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico. En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a déficit hídrico y (■) indica plantas rehidratadas. Cada barra representa la media de al menos 3 determinaciones independientes ±ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Actividad antioxidante APX

En la Figura 4.22 se representa la actividad enzimática correspondiente al enzima APX. En las hojas se observó un incremento significativo de la actividad APX bajo condiciones de déficit hídrico. Tras la recuperación de las plantas mediante hidratación del sustrato los valores disminuyeron alcanzando valores similares a los de plantas control.

En las raíces no se produjo un incremento significativo de las plantas estresadas en comparación con las plantas control.

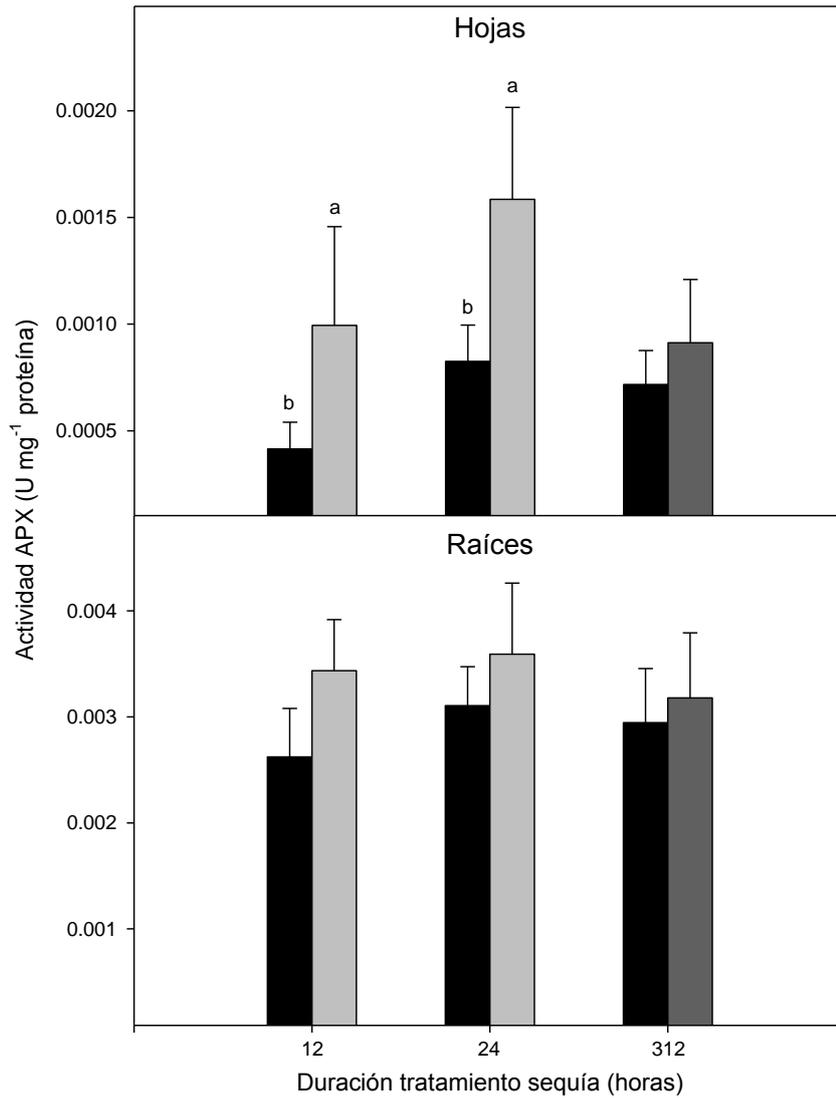


Figura 4.22. Actividad APX en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico. En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a déficit hídrico y (■) indica plantas rehidratadas. Cada punto representa la media de al menos 3 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

4.2.3. Contenido hormonal

Concentración de ABA

En la Figura 4.23 se presenta el contenido de ABA foliar y radicular. En la parte foliar, tanto a las 12 como a las 24 h se produjo un incremento significativo en la concentración endógena de ABA de la misma magnitud (alrededor de 600 ng g^{-1} peso fresco frente a valores inferiores a 100 ng g^{-1} peso fresco en plantas control). Al final del periodo experimental y tras la rehidratación del sustrato, el contenido foliar de ABA disminuyó hasta niveles control.

El contenido radicular de ABA, de forma paralela a las hojas, presentó incrementos significativos a las 12 y 24 h después del estrés e igualmente, la rehidratación provocó una recuperación de estos valores que descendieron hasta niveles control.

Concentración de JA

En la Figura 4.24 se muestra el contenido foliar y radicular de JA. En el tejido foliar se produjo un incremento significativo como consecuencia del tratamiento de sequía a las 12 h, presentando valores de 62.2 ng g^{-1} peso fresco frente a 1.8 ng g^{-1} peso fresco en plantas control, variaciones de 34.5 veces. No obstante, tras 24 h de sequía, descendió la concentración de JA hasta valores de 22.9 ng g^{-1} peso fresco así como la diferencia con las plantas control. Al final del periodo experimental y tras el proceso de rehidratación no se detectó niveles significativos de JA en plantas control o rehidratadas.

En raíces se produjo un descenso significativo del contenido en JA tras 24 h de déficit hídrico. Las plantas rehidratadas, tras 10 días de recuperación, no mostraron diferencias significativas respecto de las plantas control en los niveles endógenos de esta hormona.

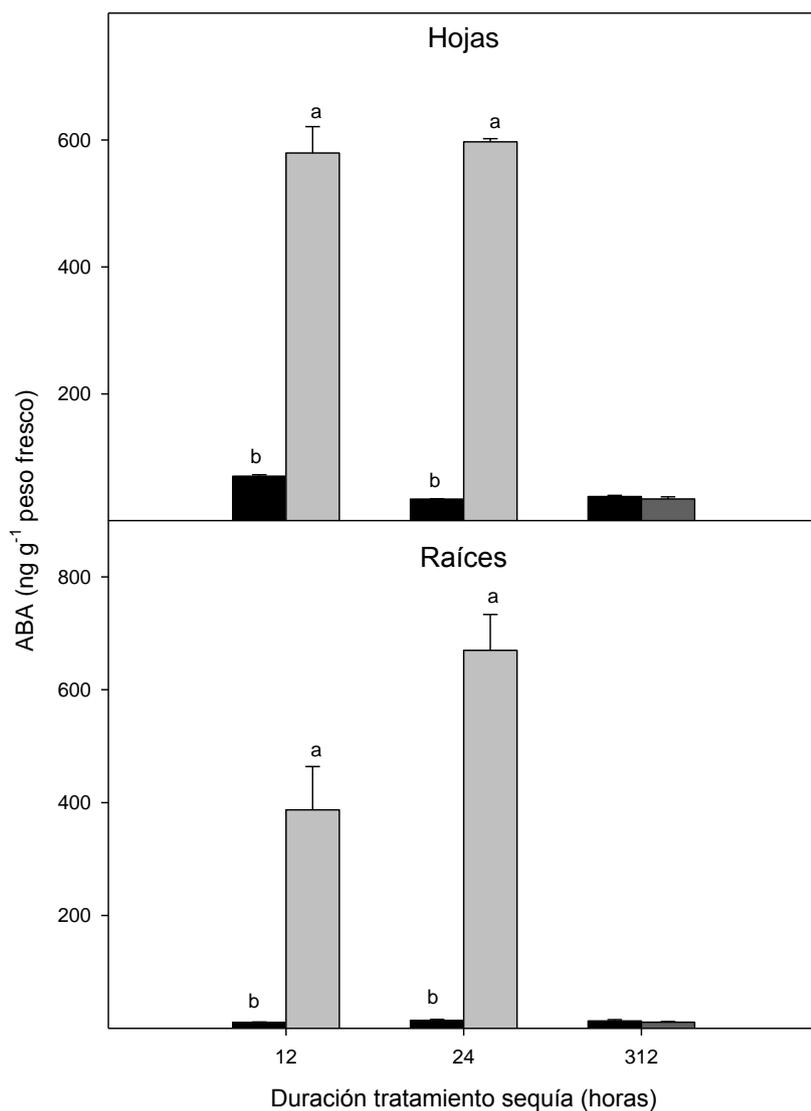


Figura 4.23. Contenido de ABA en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico. En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a déficit hídrico y (■) plantas rehidratadas. Cada punto representa la media de al menos 3 determinaciones independientes \pm ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

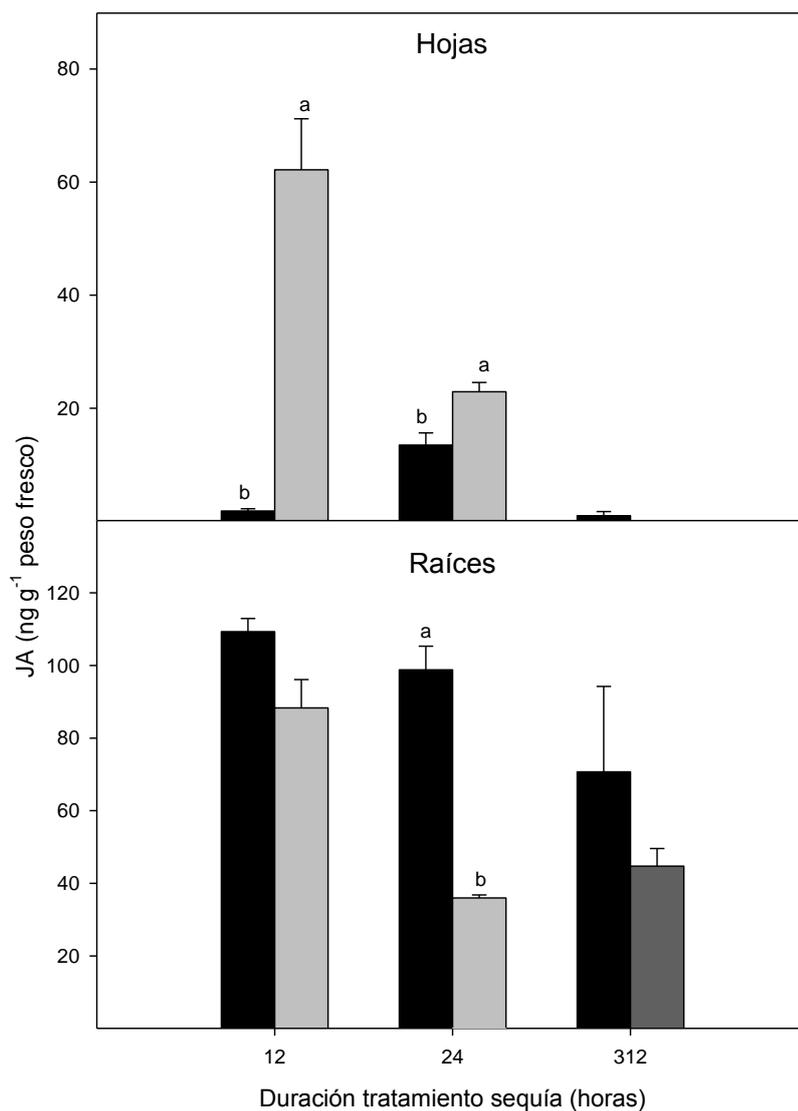


Figura 4.24. Contenido de JA en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés hídrico. En cada gráfica (■) indica plantas control, (□) indica plantas sometidas a déficit hídrico y (■) plantas rehidratadas. Cada punto representa la media de al menos 3 determinaciones independientes ±ES. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

5. DISCUSIÓN

En cítricos la respuesta de la planta a distintos estreses abióticos depende de las características del patrón, al igual que la capacidad de regular las relaciones hídricas en el continuo sustrato-planta-atmósfera. En este sentido, la elección del patrón puede condicionar una mayor o menor tolerancia a distintas condiciones adversas (Agustí, 2003). En el presente trabajo se ha estudiado la respuesta diferencial frente a dos condiciones de estrés: el encharcamiento del sustrato y el déficit hídrico. Aunque ambas condiciones desfavorables producen efectos similares a nivel fisiológico, existen mecanismos que difieren en función de la distinta naturaleza del estrés.

Los resultados presentados en este trabajo indican que ambos tipos de estrés tienen un mismo efecto fisiológico en la parte aérea, reduciendo los parámetros de intercambio gaseoso y además la capacidad carboxilativa y el potencial hídrico. Tanto en condiciones de inundación como de déficit hídrico se observa una disminución de A_n , a pesar de aumentar C_i/C_a . Esto sugiere que la difusión y la disponibilidad de CO_2 no es la principal causa de la inhibición fotosintética observada, sino factores no estomáticos, coincidiendo con estudios similares (García-Sánchez *et al.*, 2007; Arbona *et al.*, 2009). Cabe mencionar que, tras aliviar las plantas del estrés, estos parámetros fisiológicos volvieron a sus valores control, lo cual indicó que en ningún caso se sobrepasó el umbral de supervivencia.

El Φ_{PSII} mide la proporción de energía absorbida por el PSII que se emplea en el transporte electrónico fotosintético y suele ser directamente proporcional al transporte electrónico entre fotosistemas que permite la fijación de CO_2 , conociendo así de forma inmediata la medida en que distintos factores ambientales afectan al aparato fotosintético. De forma indirecta, los parámetros de fluorescencia de clorofilas proporcionan información sobre la capacidad de las plantas para tolerar estreses ambientales en la medida que los factores ambientales adversos afectan negativamente la capacidad fotosintética (Maxwell y Johnson, 2000). En respuesta al estrés, Φ_{PSII} descendió de forma paralela a A_n y al incremento de C_i/C_a , lo que refuerza la idea del efecto negativo que tanto la inundación del sustrato como la sequía ejercen sobre el transporte electrónico entre fotosistemas y la eficiencia carboxilativa, indicando la importancia del daño sobre los fotosistemas en estas condiciones por encima de otros factores como la limitación en la difusión de CO_2 a través de los estomas.

En respuesta a las dos condiciones desfavorables impuestas, las plantas de Carrizo incrementaron la concentración endógena de prolina que actúa a modo de osmolito compatible (Arbona *et al.*, 2003; Arbona *et al.*, 2008). El papel beneficioso de los osmolitos compatibles en la tolerancia al estrés abiótico ha sido sugerido en distintos trabajos. En este sentido, las funciones atribuidas a la prolina durante el estrés son varias: ajuste osmótico, osmoprotección, detoxificación de ROS, regulación de la acidez

citoplasmática y reserva de carbono y nitrógeno tras la recuperación del estrés (Vendruscolo *et al.*, 2007). La acumulación de prolina varía en condiciones de estrés por inundación o por sequía. En condiciones de estrés por inundación se acumula antes y en mayor intensidad en raíces que en hojas, y en estrés por sequía al revés. Este hecho podría indicar que, bajo condiciones de inundación, las raíces son el primer órgano en detectar el estrés o simplemente que la concentración de prolina en hojas está determinando la sensibilidad del genotipo vegetal al estrés. De esta forma, en genotipos tolerantes la mayor acumulación de prolina en raíces podría amortiguar los efectos dañinos del estrés aliviando así la presión ejercida sobre las hojas, que presentarían una menor acumulación de este metabolito. En condiciones de inundación similares, Arbona *et al.* (2008) observaron que el contenido foliar de prolina en plantas estresadas por inundación del sustrato frente plantas control era menor en aquellos genotipos de cítricos tolerantes, como Carrizo, que en aquellos genotipos sensibles, como mandarina Cleopatra, pudiéndose relacionar esto con una menor capacidad amortiguadora de la raíz, tal y como observaron Argamasilla *et al.* (2013).

Además, en el desarrollo del presente trabajo se observó un descenso del potencial hídrico foliar coincidente con una acumulación de prolina en hojas en ambas condiciones estresantes. Estos resultados indicarían la existencia de un mecanismo capaz de restablecer el balance osmótico, reduciendo dicho potencial para asegurar el flujo de agua a la parte aérea. En estudios previos se demostró, empleando plantas transgénicas de cítricos que sobreacumulaban prolina, que este osmolito es importante en el mantenimiento del balance hídrico foliar (Molinari *et al.*, 2004).

En todo estrés de tipo abiótico, la incidencia de éste provoca un incremento en la producción de ROS y, por tanto, en la incidencia del daño oxidativo. Este daño es más acusado cuanto mayor es la presión ejercida por el estrés, correlacionándose de forma positiva con la sensibilidad a determinada condición adversa (Arbona *et al.*, 2003; 2008). En los experimentos descritos en este trabajo, el daño oxidativo, medido en forma de acumulación de MDA, incrementó de forma significativa aunque ligera en raíces y hojas de Carrizo en respuesta al estrés por inundación. Este incremento, no obstante, no ocurrió de forma paralela ya que en raíces se produjo de forma más temprana que en hojas. En cambio, en respuesta a déficit hídrico, el MDA solo aumentó en hojas, lo que podría apoyar, en consonancia con los resultados de prolina, que esta parte de la planta es la que siente el déficit hídrico. En el estudio llevado a cabo por Pérez-Clemente *et al.* (2012) también se vio incrementado el contenido en MDA como respuesta al déficit hídrico producido por el choque osmótico con polietilenglicol sobre brotes de cítricos aislados y cultivados *in vitro*, siendo este dato indicativo de que los tejidos foliares generarían mayor cantidad de ROS que las raíces debido al sistema fotosintético. Sin embargo, en otro estudio similar, los mismos brotes de cítricos fueron sometidos a estrés salino pero no se observó incremento

alguno del contenido en MDA foliar, igual que en plántulas intactas cultivadas *in vitro* (Montoliu *et al.*, 2009) o en invernadero (Arbona *et al.*, 2003). Estos datos apuntan a las raíces como un órgano clave como filtro de iones Cl⁻ y origen de la señalización hormonal en la respuesta a estrés salino en cítricos. Los datos presentados son compatibles con la posibilidad que la señalización en respuesta a déficit hídrico implicaría a la parte aérea además del sistema radicular.

La actividad antioxidante APX se vio incrementada significativamente en hojas de Carrizo sometido a estrés por inundación y a déficit hídrico, indicando que la maquinaria responsable de la eliminación del H₂O₂ no sufrió daño alguno como consecuencia del estrés. En ambos casos, coincide con el incremento foliar de MDA, relacionando ambos parámetros: la defensa y el resultado del daño. Este incremento de MDA podría ser debido a que parte de las ROS escaparían del sistema de detoxificación, como consecuencia de la presión continua que ejercen ambas condiciones estresantes, provocando un incremento de la peroxidación lipídica. Tal y como se demostró en el experimento llevado a cabo por Arbona *et al.* (2003) en condiciones de salinidad, citrange Carrizo posee un sistema eficiente de detoxificación de ROS, contribuyendo a la mayor tolerancia de este patrón frente al estrés salino. En raíces, en cambio, la actividad APX se redujo por debajo de valores control en respuesta a la inundación para recuperarse posteriormente tras el drenaje. Esto indicaría, junto con los datos de acumulación de MDA, por un lado que el estrés oxidativo en condiciones de inundación del sustrato no parece ser una respuesta relevante en raíces y, por otro, que el descenso de la actividad APX es una respuesta directa al encharcamiento. Este incremento en el daño oxidativo en raíces tras el drenaje del sustrato es compatible con los resultados obtenidos por Blokhina *et al.* (1999) que sugerían un aumento en los productos de la peroxidación lipídica como consecuencia de la reoxigenación de las raíces.

Las hormonas vegetales juegan un papel crucial en la adaptación de las plantas a condiciones de estrés abiótico y, entre todas, el ABA es probablemente la hormona más estudiada en respuesta al estrés abiótico (Eyidogan *et al.*, 2012). En este sentido, el JA que tradicionalmente ha sido vinculado a las respuestas a patógenos y herida, recientemente ha adquirido relevancia en la regulación de la respuesta frente a estrés abiótico (Arbona y Gómez-Cadenas, 2008; de Ollas *et al.*, 2013). En el presente estudio, el comportamiento de dos hormonas vinculadas a la regulación de las respuestas al estrés abiótico, ABA y JA, corrió paralela en ambos tipos de estrés.

En el caso de estrés por inundación, el ABA se vio incrementado en hojas de forma temprana, pero en poca magnitud y solo tras un período prolongado de estrés presentó niveles superiores a los control. En cambio, en raíces los niveles de esta hormona se vieron disminuidos inmediatamente tras la inundación, incluso por debajo de valores control. Tanto en parte aérea, como en raíces, el drenaje del exceso de agua

permitió la recuperación hasta niveles control indicando que esta respuesta está asociada directamente al tratamiento de estrés. Comparando el comportamiento del ABA en hojas con los parámetros de intercambio gaseoso no se puede establecer una relación clara entre el cierre estomático y la concentración foliar de ABA ya que el fuerte incremento de la hormona fue posterior al cierre estomático, tal como fue señalado por Rodríguez-Gamir *et al.* (2010). Además, y de acuerdo con el estudio realizado por Arbona y Gómez-Cadenas (2008), es poco probable que el cierre de los estomas en las hojas de plantas de Carrizo encharcadas resulte de la translocación de ABA de las raíces a la parte aérea, ya que la reducción de los niveles de ABA en raíces de plantas estresadas ocurrió de forma muy temprana respecto al incremento observado en hojas.

Como se ha dicho antes, el JA presentó comportamiento paralelo al ABA y también se vio acumulado de forma masiva tras un período prolongado de deficiencia hídrica, de forma concomitante al ABA. Este hecho es compatible con los datos publicados recientemente por de Ollas *et al.* (2013) en los que se describe la relación entre el JA y el ABA a nivel biosintético. En este modelo, el JA actuaría como disparador de la cascada de señalización modulada por el ABA. Este hecho viene apoyado, además, por el comportamiento paralelo del ABA y el JA en raíces de Carrizo inundadas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Arbona y Gómez-Cadenas (2008).

En el caso del estrés por sequía, el ABA se vio incrementado de forma rápida y masiva tan solo 12 h después del tratamiento. Los niveles alcanzados fueron superiores que en raíces en la misma fecha, aunque posteriormente se igualaron. De nuevo, al menos en parte aérea, el incremento de JA y ABA fue concomitante y temprano. Dicho incremento no se observó en raíces, aunque sí en el trabajo de de Ollas *et al.* (2013) en el que se emplearon condiciones similares. El hecho de que no se observara este comportamiento paralelo en los datos presentados podría deberse a que el incremento transitorio de JA ocurrió de forma más temprana en raíces que en hojas. La acumulación de JA es, tal y como describen en trabajos anteriores (Arbona y Gómez-Cadenas, 2008; Arbona *et al.*, 2010; de Ollas *et al.*, 2013), transitoria y siempre precede a la del ABA en condiciones de estrés abiótico. Mediante la aplicación alternativa de inhibidores de la síntesis de JA y de ABA, de Ollas *et al.* (2013) demostraron que se requería una previa acumulación de JA para el inicio de la síntesis de ABA en raíces de cítricos sometidos a estrés por sequía severa. En ambos casos, el alivio del estrés provocó la recuperación de los niveles control, lo cual indica que la respuesta hormonal observada es específica del estrés aplicado.

En resumen, se puede establecer que ambos tipos de estrés producen un efecto similar en el comportamiento fisiológico de la parte aérea, disminuyendo la asimilación neta de CO₂ de forma paralela al cierre estomático y la transpiración. Del mismo modo, C_i/C_a se vio incrementada, acompañada de una disminución de Φ_{PSII} .

Bajo las condiciones impuestas en ambos experimentos, las plantas experimentaron un incremento en la concentración de prolina, tanto en raíces como en hojas, siendo mayor el incremento en raíces en estrés por inundación y en hojas en el caso de déficit hídrico. Asimismo, el incremento en prolina foliar se correlacionó con el descenso del potencial hídrico de hojas como mecanismo para restablecer el balance osmótico.

En ambos sistemas se observó un incremento en los tejidos aéreos de MDA, un marcador indirecto del daño oxidativo. Además, en los dos casos, como respuesta al estrés oxidativo, las plantas de Carrizo fueron capaces de activar, al menos, parte de su maquinaria antioxidante, observada como el incremento en la actividad APX en hojas y, en menor medida en el caso de inundación del sustrato, en raíces.

En cuanto a la regulación hormonal en los dos sistemas se observó una respuesta paralela y del mismo sentido de la concentración foliar de JA y ABA, reforzando la idea de una relación directa entre ambas hormonas y su papel como mediadoras entre la percepción del estrés y la respuesta fisiológica. Además, todos los parámetros estudiados en hojas y raíces, sugieren, por su temporalidad e intensidad, algún tipo de interacción entre la parte radicular y aérea de la planta.

6. CONCLUSIONES

- La inundación del sustrato y el déficit hídrico severo provocan respuestas fisiológicas similares en la parte aérea: por un lado, la reducción de la actividad fotosintética provocada por factores no estomáticos, como revela el incremento en C_i/C_a y el descenso de los parámetros de fluorescencia de clorofilas; y además la reducción del potencial hídrico. Éste último, asociado a la variación en la concentración endógena del osmolito compatible prolina con el objetivo de restablecer el balance hídrico.
- Las variaciones de carácter bioquímico tales como la acumulación de daño oxidativo, la actividad antioxidante o los cambios endógenos de la concentración de ABA y JA podrían ser específicas de la condición ambiental y del tejido analizado.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agustí, M. (2003) Citricultura. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Arbona, V., Argamasilla, R., Gómez-Cadenas, A. (2010) Common and divergent physiological, hormonal and metabolic responses of *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* to water and salt stress. *Plant Physiol.* 167:1342-1350.
- Arbona, V., Flors, V., Jacas, J., García-Agustín, P., Gómez-Cadenas, A. (2003) Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant Cell Physiol.* 44:388-394.
- Arbona, V., Gómez-Cadenas, A. (2012) Antioxidant system in citrus under nutrient stress conditions: latest developments. En: *Advances in Citrus Nutrition*, ed. A.K. Srivastava, pp. 13-24.
- Arbona, V., Gómez-Cadenas, A. (2008) Hormonal modulation of citrus responses to flooding. *J. Plant Growth Regul.* 27: 241-250.
- Arbona, V., Hossain, Z., López-Climent, M.F., Pérez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A. (2008) Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiol. Plant.* 132:452-466.
- Arbona, V., Iglesias, D.J., 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.
- Arbona, V., López-Climent, M.F., Pérez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A. (2009) Maintenance of a high photosynthetic performance is linked to flooding tolerance in citrus. *Environ. Exp. Bot.* 66:135-142.
- Argamasilla, R., Gómez-Cadenas, A., Arbona, V. (2013) Metabolic and regulatory responses in citrus rootstocks in response to adverse environmental conditions. *J. Plant Growth Regul.* DOI 10.1007/s00344-013-9359-z.
- Asada, K. (1984) Assay of ascorbate-specific peroxidase. *Methods Enzymol.* 105:427-429.
- Bailey-Serres, J., Voisenek, L.A. (2008) Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 313-339.
- Blokhina, O. B., Fagerstedt, K. V., Chirkova, T. V. (1999) Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxic reaeration. *Physiol. Plant.* 105(4):625-632.

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brakke, M.P., Allen, L.H. (1995) Gas exchange of Citrus seedlings at different temperatures, vapor-pressure deficits, and soil water contents. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120: 497-504.
- Colmer, T.D., Voeselek, L.A. (2009) Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Funct. Plant Biol.* 36(8):665-681.
- Davies, F.S., Albrigo, L.G. (1994) Citrus. C. A. B. International, Great Britain.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M., Robledo, C.W. (2012) InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- de Ollas, C., Hernando, B., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A. (2013) Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiol. Plant.* 147:296-306.
- Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J.V., Gómez-Cadenas, A. (2005) Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53:8437-8442.
- Eyidogan, F., Oz, M.T., Yucel, M., Oktem, H.A. (2012) Signal transduction of phytohormones under abiotic stresses. En: *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants*, eds. N.A. Khan, R. Nazar, N. Iqbal, N.A. Anjum, Springer, Berlin, pp. 1-48.
- García-Sánchez, F., Syvertsen, J.P., Gimeno, V., Botía, P., Pérez-Pérez, J.G. (2007) Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. *Physiol. Plant.* 130:532-542.
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Talón, M., Primo-Millo, E. (1996) Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiol.* 112:401-408.
- MAGRAMA (2012) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de Estadística 2012.
- Mano, J. (2002) Early events in environmental stresses in plants-induction mechanisms of oxidative stress. En: *Oxidative stress in plants*, eds. D. Inzé, M. Van Montagu, CRC Press, London, UK., pp. 217-246.

- Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51:659-668.
- Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Filho, J.C.B., Kobayashi, A.K., Pileggi, M., Júnior, R.P.L., Pereira, L.F.P., Vieira, L.G.E. (2004) Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Sci.* 167:1375-1381.
- Montoliu, A., López-Climent, M. F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R. M., Gómez-Cadenas, A. (2009) A novel *in vitro* tissue culture approach to study salt stress responses in citrus. *J. Plant Growth Regul.* 59:179-187.
- Moreno, P. (2009) Plant responses to water deficit stress. A review. *Agron. Colomb.* 27:179-191.
- Nilsen, E.T., Orcutt, D.M. (1996) Physiology of plants under stress. En: Abiotic factors, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Pérez-Clemente, R.M., Montoliu, A., de Ollas, C., López, M.F., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A. (2012) *In vitro* culture reveals differences in the organ responsible for citrus responses to osmotic or salt stress. *Acta Hort.* 961:335-341.
- Phung, H.T., Knipling, E.B. (1976) Photosynthesis and transpiration of citrus seedlings under flooded conditions. *HortScience.* 11:131-133.
- Ponnamperuma, F.N. (1984) Effects of flooding on soils. En: Flooding and Plant Growth. Academic Press, Orlando, FL.
- Pozo, L.V. (2001) Endogenous hormonal status in citrus flowers and fruitlets: relationship with postbloom fruit drop. *Scientia Hort.* 91:251-260.
- Rodríguez-Gamir, J., Primo-Millo, E., Forner, J.B., Forner-Giner, M.A. (2010) Citrus rootstock responses to water stress. *Scientia Hort.* 126:95-102.
- Ruiz-Sánchez, M.C., Domingo, R., Morales, D., Torrecillas, A. (1996) Water relations of Fino lemon plants on two rootstocks under flooded conditions. *Plant Sci.* 120:119-125.
- Scholander, P., Hammel, H., Bradstreet, E. Y., Hemmingsen, E. (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science*, 37:247-274.
- Swingle, W.T. (1967) The botany of citrus and its wild relatives. En: The Citrus Industry, vol. I. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, California, USA.

- Taiz, L., Zeiger, E. (2006) *Plant physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City, California, USA.
- Vendruscolo, E.C.G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C.A., Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Vieira, L.G.E. (2007) Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Plant Physiol.* 164:1367-1376.
- Voesenek, L.A., Colmer, T.D., Pierik, R., Millenaar, F.F., Peters, A.J. (2006) How plants cope with complete submergence. *New Phytol.* 170:213-226.
- Wasternack, C. (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* 100:681-697.
- Wilkinson, S., Davies, W.J. (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ.* 25:195-210.