

Vicent Arbona<sup>§</sup> ● María F. López-Climent ● Rosa M. Pérez-Clemente  
Alba Querol ● Aurelio Gómez-Cadenas\*

# LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA COMO INDICADOR DE LA TOLERANCIA DE LOS CÍTRICOS AL ESTRÉS PROVOCADO POR LA INUNDACIÓN DEL SUSTRATO

Ecofisiología i Biotecnologia.  
Departament de Ciències Agràries i  
del Medi Natural, Universitat Jaume I.  
Campus Riu Sec.  
12071 Castelló de la Plana. España

<sup>§</sup> afiliación actual: Department of  
Stress and Developmental Biology.  
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie.  
D-06128 Halle/Saale. Alemania.

\*e-mail: aurelio.gomez@camn.uji.es

## Introducción

La climatología mediterránea se caracteriza por tener veranos calurosos y secos seguidos de periodos de lluvias torrenciales que provocan inundaciones en poblaciones y zonas de cultivo. Este fenómeno, conocido como 'gota fría' está provocado por un incremento de la evaporación durante el período estival que conduce a la acumulación de grandes masas de vapor de agua en las zonas costeras. A medida que las temperaturas disminuyen, este aire húmedo y cálido asciende hacia el interior continental donde se condensa y precipita en forma de abundantes lluvias.

El principal efecto de la inundación es la reducción del contenido en O<sub>2</sub> del suelo como consecuencia de diferentes reacciones químicas.

## Resumen

En la cuenca mediterránea, el encharcamiento del suelo es un fenómeno estacional asociado a la incidencia de lluvias torrenciales. El principal efecto de la inundación del sustrato es la reducción en la disponibilidad de O<sub>2</sub> en el entorno radicular, lo cual se traduce en una reducción de la capacidad de absorción de agua de las plantas y en un descenso del intercambio gaseoso. Los cítricos se consideran, en general, sensibles a la asfixia radicular aunque se han descrito notables diferencias entre genotipos. En este sentido, se considera al mandarino Cleopatra altamente sensible mientras que otros patrones como citrumelo Swingle o citrange Carrizo están clasificados como más tolerantes. En el presente trabajo, se evaluó la relación de distintos parámetros fotosintéticos, tales como el intercambio gaseoso y la fluorescencia de clorofilas, con la tolerancia al encharcamiento en los tres genotipos mencionados. Se observó una gradación en la tolerancia al encharcamiento continuado, siendo mandarino Cleopatra muy sensible, citrumelo moderadamente tolerante y citrange Carrizo muy tolerante. Esta gradación se correlacionó con la capacidad de mantener una elevada actividad fotosintética estable durante más tiempo. Estos resultados sugieren que la actividad fotosintética podría ser utilizada como indicador de la tolerancia al encharcamiento radicular en cítricos.

## Abstract

Soil waterlogging is a seasonal phenomenon associated to the incidence of heavy rains in the mediterranean basin. The main effect of substrate flooding is the reduction in the availability of O<sub>2</sub> in the root environment which is directly related to a decrease in the plant ability for water absorption and the reduction in gas exchange parameters. In general, citrus are considered sensitive to root waterlogging although significant differences have been described to this respect among genotypes. In this sense, Cleopatra mandarin is considered highly sensitive whereas other genotypes such as Swingle citrumelo or Carrizo citrange are classified as more tolerant. In the present work, the relationship of different photosynthetic parameters such as gas exchange and chlorophyll fluorescence with tolerance to continuous flooding was assessed in the three above-mentioned citrus genotypes. Cleopatra mandarin revealed as very sensitive, citrumelo as moderately tolerant and Carrizo citrange as very tolerant. This gradation was correlated with the ability to keep elevated photosynthetic activity and maintaining it stable for longer time. These results suggest that photosynthetic activity could be used as indicator of tolerance to root waterlogging in citrus.

cas y bioquímicas (Domingo y cols. 2002). Dependiendo del tipo de suelo, la desaparición completa del O<sub>2</sub> puede ocurrir incluso en horas, provocando el descenso del potencial de óxido-reducción hasta valores cercanos a los -250 mV (Syvertsen y cols. 1983). En estas condiciones de anaerobiosis, la fisiología de los cítricos se ve gravemente afectada pudiendo incluso ocasionar la muerte de los árboles (Ford 1968).

Uno de los efectos más importantes del encharcamiento en los cítricos es la reducción de la tasa fotosintética neta, especialmente cuando el período de inundación se prolonga en el tiempo (Vu y Yelenosky 1991). Además, la reducción de la conductividad hidráulica radicular lleva a una disminución de la absorción de agua y del crecimiento y a un aumento de la marchitez y de los daños foliares (Ford 1968, Syvertsen y cols. 1983). En especies vegetales propias de ecosistemas húmedos, tales como *Phragmites australis*, *Carex cinerascens* y *Hemarthria altissima*, se ha asociado la tolerancia al encharcamiento con la habilidad de mantener una actividad fotosintética estable (Li y cols. 2007). Por lo general, los cítricos se consideran sensibles al encharcamiento radicular aunque se han descrito notables diferencias a este respecto entre genotipos. Por ejemplo, el mandarino Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) se ha clasificado como altamente sensible mientras que otros genotipos tales como citrange Carrizo (*Poncirus trifoliata* L. Raf. x *Citrus sinensis* L. Osb.) y citrumelo Swingle (*Poncirus trifoliata* L. Raf. x *Citrus paradisi* L. Macf.) se consideran tolerantes (Ford 1968). No obstante, no se conocen aún los mecanismos fisiológicos que explicarían esta distinta tolerancia.

Además de los parámetros de intercambio gaseoso, la fluorescencia de clorofilas puede emplearse como método de diagnóstico del funcionamiento del fotosistema II (PSII). De hecho, este método ha sido ampliamente utilizado en estudios de estrés salino (López-Climent y cols. 2007), elevados niveles de O<sub>3</sub> (Calatayud y cols. 2006) e inundación (Sudhir y Murthy 2004). De esta forma, no sólo se consigue un método rápido y no invasivo de evaluación sino también una forma rápida de investigar procesos básicos en fotosíntesis (Sudhir y Murthy 2004).

El objetivo que se planteó en este trabajo fue comprobar la relación existente entre la actividad fotosintética de cada patrón de cítricos y su tolerancia relativa al estrés por encharcamiento. Para ello, se seleccionaron tres genotipos de cítricos caracterizados por su diferente tolerancia al estrés provocado por el encharcamiento del sustrato: citrange Carrizo, mandarino Cleopatra y citrumelo Swingle y se midieron distintos parámetros de intercambio gaseoso así como de fluorescencia de clorofilas para estudiar su correlación con la tolerancia relativa al estrés por inundación.

## Materiales y métodos

### *Material vegetal, tratamientos de estrés y diseño experimental*

Plántulas de un año de edad de los genotipos citrange Carrizo (CC), citrumelo Swingle (Cit) y mandarino Cleopatra (MC) procedentes de un vivero autorizado (Beniplant S.L.) se trasplantaron a macetas de plástico (2.5 L) un mes antes del comienzo de los experimentos utilizando una mezcla de perlita, vermiculita y turba en proporción 10:10:80 como sustrato.

Las plantas se regaron tres veces por semana con 0.5 L de una solución de Hoagland modificada para cítricos. Las plantas se cultivaron en invernadero manteniendo la temperatura diurna en 25±3.0°C y la nocturna en 18±2.0°C. Para la imposición del tratamiento de estrés se emplearon 36 plántulas de cada genotipo, de tamaño y aspecto uniforme, 18 se reservaron como controles y no se inundaron y las otras 18 se sometieron a tratamiento de inundación continua. Para ello, las macetas de 2.5 L se cubrieron con bolsas de plástico y el conjunto se introdujo en macetas de un mayor volumen. El interior de la bolsa de plástico se llenó con agua del grifo hasta alcanzar un nivel 2 cm por encima de la superficie del sustrato. Durante los 33 días que duró el tratamiento de inundación, se mantuvo el mismo nivel de agua. La evolución del daño foliar se representó como el porcentaje de hojas que presentaban necrosis en, al menos, el 25% de su superficie.

### *Parámetros de intercambio gaseoso*

La fotosíntesis neta (A) y la relación entre la concentración de CO<sub>2</sub> subestomática y ambiental (Ci/Ca) se midieron con un equipo portátil de fotosíntesis LCpro+ (ADC bioscientific Ltd., Hoddesdon, Reino Unido) bajo condiciones de humedad y CO<sub>2</sub> ambientales. El PAR necesario (1000 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) fue proporcionado por una matriz de diodos acoplada al equipo. Las medidas se tomaron después de la estabilización del instrumento y para ello de cada planta se seleccionaron tres hojas maduras en posición intermedia sobre las que se realizaron cuatro medidas consecutivas.

### Fluorescencia de clorofilas

Las medidas de fluorescencia de clorofilas se tomaron con un equipo portátil OS 1-FL (Opti Sciences, Tyngsboro, Massachusetts, EEUU). Se seleccionaron seis plantas al azar de cada tratamiento y después de 30 min de adaptación a la oscuridad se midió la fluorescencia máxima en el PSII (Fv/Fm). Posteriormente, las plantas se re-adaptaron a iluminación actínica ( $200-300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y se midió la eficiencia cuántica fotosintética ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ). Con estos datos, se calculó el grado de disipación no fotoquímica (non-photochemical quenching, NPQ) que es un indicador de la fracción de energía que se emplea en procesos de tipo no fotoquímico o de transferencia de electrones entre fotosistemas.

### Análisis estadístico

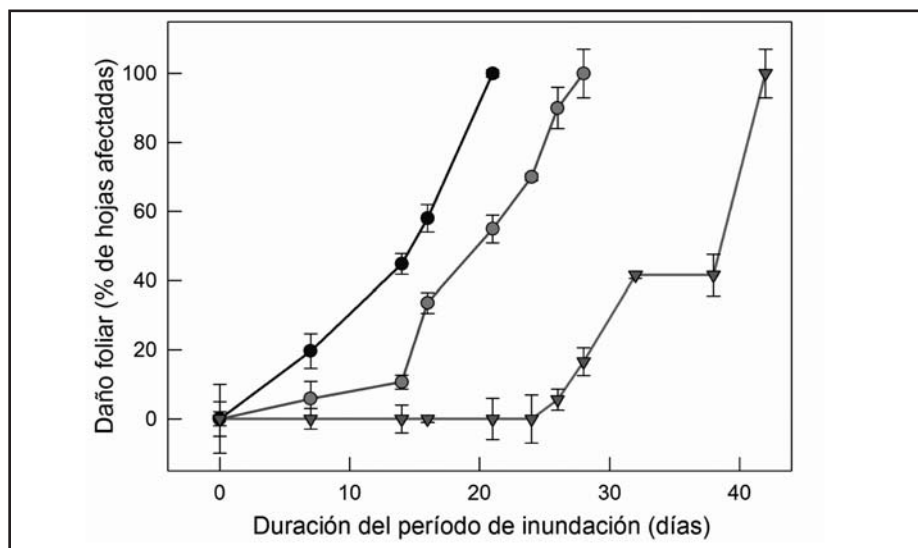
Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete informático StatGraphics Plus (V. 2.1.) para el entorno Windows. Las medias en los distintos tratamientos se compararon mediante análisis de la varianza (ANOVA) aplicando un contraste de hipótesis de tipo LSD a un  $p \leq 0.05$ . Se realizaron análisis de correlación y regresión entre los parámetros A vs Ci/Ca, A vs Fv/Fm y A vs  $\Phi_{\text{PSII}}$ .

### Resultados

#### Evolución del daño foliar inducido por la inundación

En la Figura 1 se muestra la evolución del daño foliar en los tres genotipos de cítricos sometidos a inundación continua. De los genotipos estudiados, fue en MC donde se observó de forma más temprana el daño foliar y, tan sólo 7 días después de la imposición del tratamiento de estrés, un 19.7% de las

Figura 1. Porcentaje de hojas afectadas después de la imposición del estrés por inundación. En la figura, (●) representa mandarina Cleopatra, (●) citrumelo Swingle y (▼) citrange Carrizo.



hojas estaban afectadas. Posteriormente, el porcentaje de daño incrementó de forma rápida y, después de 21 días de inundación continua, el estrés afectaba a todas las plantas. La aparición de síntomas asociados al estrés por inundación se retrasó de forma notable en plantas de Cit, viéndose afectadas sólo un 10.4% de las hojas después de 14 días de inundación continua. No obstante, la evolución del daño se aceleró y, después de 28 días de estrés, el 100% de las plantas de Cit se vieron afectadas. Por el contrario, las plantas de CC no presentaron ningún daño foliar hasta 25 días después de la imposición del tratamiento, diferenciándose claramente del resto de genotipos aunque una vez comenzaron a manifestarse los síntomas de daño foliar, su progresión fue muy rápida y tras 42 días de tratamiento todas las plantas estaban afectadas.

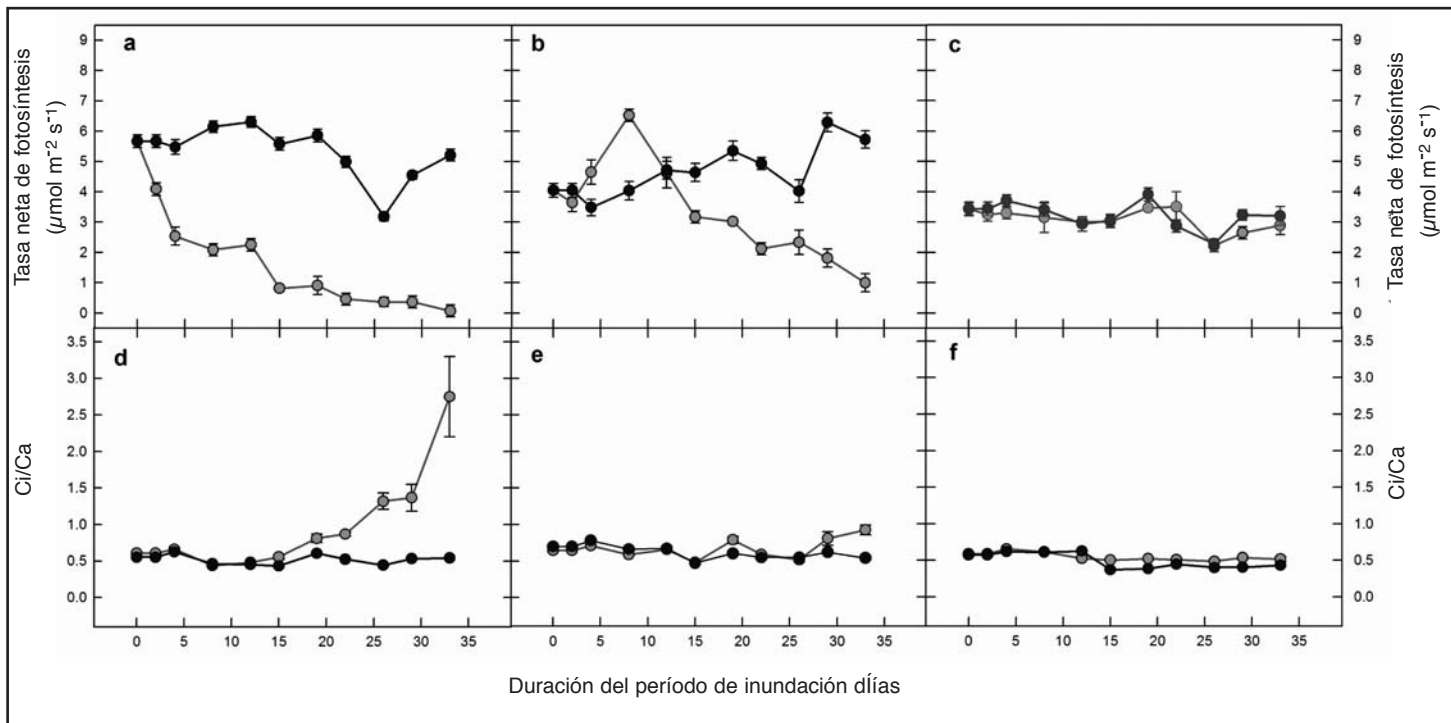
#### Parámetros de intercambio gaseoso

El tratamiento de inundación disminuyó A en las plantas de Cit y de forma más acusada en las de MC; sin embargo no tuvo ningún efecto sobre la tasa fotosintética en CC durante todo el período experi-

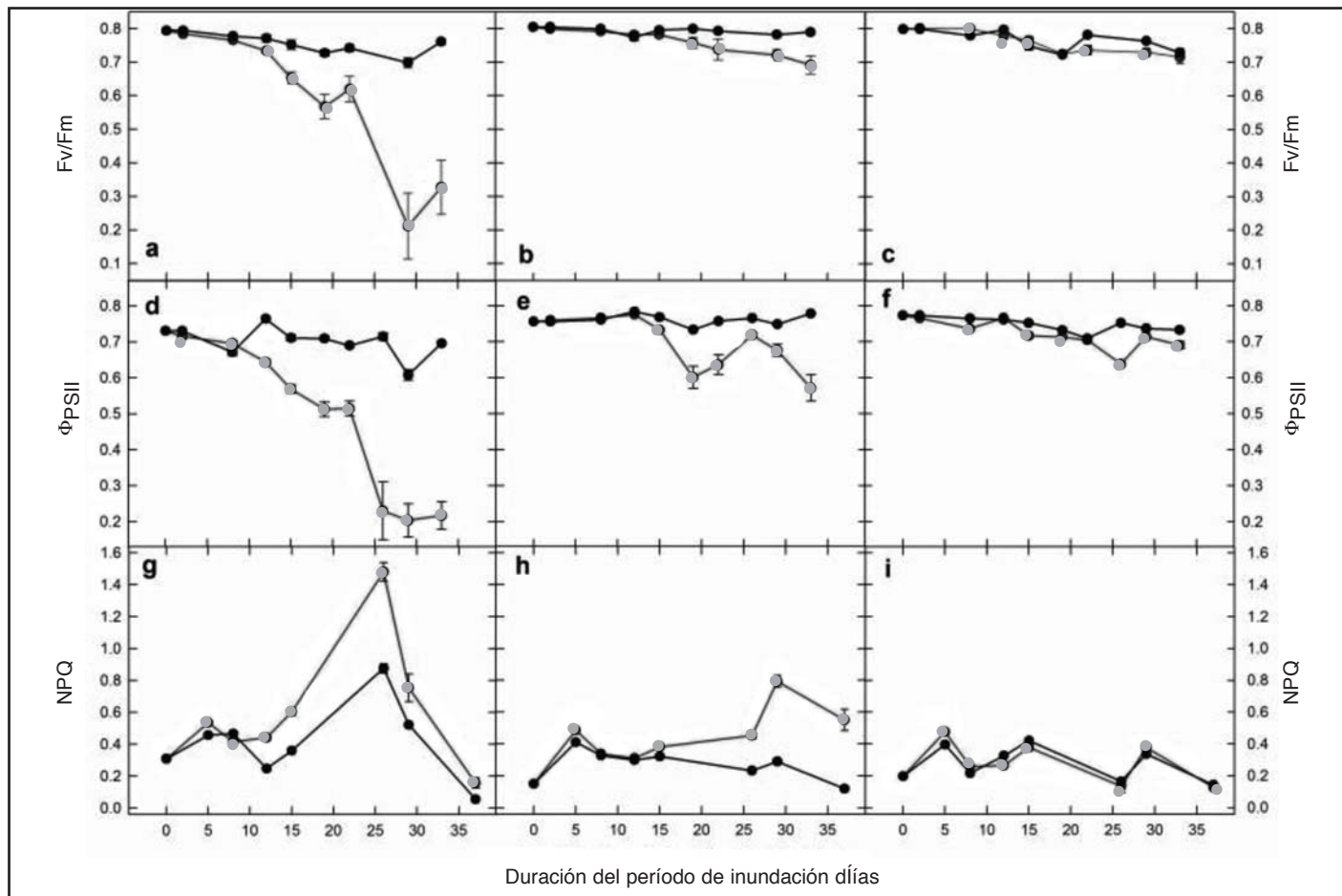
mental. En respuesta al encharcamiento de sustrato, A en MC descendió de forma paulatina hasta llegar a valores cercanos a 0 al final del período experimental (Figura 2a). En Cit, este descenso fue precedido de un incremento transitorio por encima de los valores obtenidos en plantas control (Figura 2b). No obstante, a partir del día 12, A descendió hasta alcanzar valores un 82.7% inferiores a los control al finalizar el experimento.

En general, Ci/Ca en MC y Cit siguió una tendencia opuesta a A. En plántulas inundadas de MC, Ci/Ca aumentó de forma progresiva de tal forma que después de 33 días de tratamiento los valores fueron 4.4 veces superiores a los observados en plantas control (Figura 2d). En Cit, por el contrario, Ci/Ca presentó valores cercanos a los control durante gran parte del período experimental y, únicamente aumentó tras 33 días de inundación continua (Figura 2e). De igual forma que A, los valores de Ci/Ca en plantas inundadas de CC no presentaron ninguna variación significativa respecto de los valores control durante todo el período experimental (Figura 2f).

**Figura 2.** Evolución de los parámetros de intercambio gaseoso: tasa fotosintética neta (A) y relación entre la concentración subestomática y ambiental de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>) en los genotipos mandarina Cleopatra (a y d), citrumelo Swingle (b e) y citrange Carrizo (c y f). En cada gráfico (●) representa plantas control y (●) plantas inundadas de forma continua.



**Figura 3.** Evolución de los parámetros de fluorescencia de clorofilas: eficiencia máxima del PSII (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), eficiencia cuántica fotosintética (Φ<sub>PSII</sub>) y disipación no fotoquímica (non-photochemical quenching, NPQ) en los genotipos mandarina Cleopatra (a, d y g), citrumelo Swingle (b, e y h) y citrange Carrizo (c, f y i). En cada gráfico (●) representa plantas control y (●) plantas inundadas de forma continua.



### Fluorescencia de clorofilas

Durante todo el período experimental, los valores de Fv/Fm en plantas control se mantuvieron alrededor de 0.8 con ligeras diferencias entre genotipos (Figura 3a). La imposición del estrés provocó una reducción de este parámetro en todos los genotipos estudiados, aunque en diferentes grados. En plantas inundadas de MC, el descenso en los valores de Fv/Fm fue drástico llegando hasta valores un 58.9% inferiores a los control tras 33 días de estrés (Figura 3a). En Cit, el descenso en Fv/Fm fue menos acusado que en MC y tuvo lugar más tarde (Figura 3b). Al final del período de estudio, los valores medidos en plantas inundadas de Cit fueron un 10.3% inferiores a los de plantas control. Los valores de Fv/Fm en plantas inundadas de CC (Figura 3c) se mantuvieron en valores similares a los de plantas control durante más tiempo. Las plantas estresadas únicamente presentaron un descenso transitorio en este parámetro a 22 y 30 días y posteriormente se recuperaron hasta valores control. La evolución de los valores de  $\Phi_{PSII}$  en plantas de cítricos inundadas fue prácticamente idéntica a la descrita para Fv/Fm (Figura 3 d-e-f). En Cit y en MC, NPQ se vio inducido como mecanismo protector en respuesta al tratamiento de inundación (Figura 3h y 3g), aunque en este último alcanzó valores superiores (alrededor de 1.5 veces mayores que los valores control después de 25 días de inundación). Por el contrario, las plántulas de CC sometidas a condiciones de estrés no experimentaron ninguna variación en este parámetro respecto a valores control durante todo el período experimental (Figura 3i).

### Análisis de correlación

En la Tabla 1 se presentan los análisis de correlación entre A y los distintos parámetros descriptores de la actividad fotosintética: Ci/Ca, Fv/Fm y FPSII. El análisis de correlación entre A y Ci/Ca dio como resultado valores negativos de R altamente significativos ( $p \leq 0.01$ ). Por el contrario, el estudio de la correlación existente entre los parámetros A y Fv/Fm rindió resultados significativos sólo en el caso de Cit y MC, lo cual está en consonancia con la ausencia de variaciones significativas en ambos parámetros en CC. Por otro lado, cuando observamos los resultados derivados del análisis de correlación entre A y  $\Phi_{PSII}$ , sólo en el caso de MC se obtuvo una correlación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

### Discusión

En este trabajo se presentan datos que permiten establecer una relación entre la actividad fotosintética, medida tanto en términos de tasa de intercambio gaseoso como mediante parámetros de fluorescencia de clorofilas, y la capacidad de plantas de cítricos para tolerar el encharcamiento radicular. Como ya se ha comentado anteriormente, los cítricos están clasificados como especies sensibles al encharcamiento radicular (Ford 1968, Syvertsen y cols. 1983) y como tales no presentan ningún tipo de adaptación fisiológica ni morfológica (p.ej. formación de aerénquima, desarrollo de lenticelas, etc.) que les permita sobrevivir bajo condiciones de inundación. Diferentes autores, han descrito la elevada sensibilidad de MC al encharcamiento mientras que se considera que, por lo general, Cit y CC son más tolerantes (Ford 1968, Yelenosky y cols. 1995).

**Tabla 1.** Análisis de correlación (test de Pearson) entre la tasa neta fotosintética (A) y diferentes parámetros: relación entre la concentración de CO<sub>2</sub> subestomática y ambiental (Ci/Ca), la fluorescencia máxima en hojas adaptadas a oscuridad (Fv/Fm) y la eficiencia cuántica fotosintética ( $\Phi_{PSII}$ ) en hojas adaptadas a iluminación actínica.

	R	P-valor
<b>A vs Ci/Ca</b>		
MC	-0.60	0.00 (n=96)
Cit	-0.56	0.00 (n=96)
CC	-0.47	0.01 (n=96)
<b>A vs Fv/Fm</b>		
MC	0.56	0.00 (n=48)
Cit	0.61	0.00 (n=48)
CC	0.24	0.20 (n=48)
<b>A vs <math>\Phi_{PSII}</math></b>		
MC	0.42	0.02 (n=48)
Cit	0.22	0.24 (n=48)
CC	0.08	0.67 (n=48)

En este trabajo se utilizó como indicador de sensibilidad la aparición de daño foliar. El estudio de estos datos indicó que MC fue el genotipo más afectado por la imposición del estrés, seguido de Cit, siendo CC el menos afectado. Estos datos concuerdan con el grado de tolerancia descrito en anteriores trabajos (Arbona y cols. 2008, Ford 1968, Syvertsen y cols. 1983). Los análisis de correlación entre A-Ci/Ca, A-Fv/Fm y A-FPSII indicaron que las limitaciones en la actividad fotosintética observadas en cítricos sometidos a estrés por inundación podrían deberse a una reducción en la eficiencia carboxilativa y no a un descenso en la difusión del CO<sub>2</sub> a través de los estomas. Esta hipótesis adquiere mayor sentido cuando se observan los resultados obtenidos para el parámetro NPQ (Figura 3 f-g-h) que muestran un incremento del porcentaje de energía que se utiliza en procesos que no implican un transporte electrónico entre fotosistemas. Los resultados obtenidos en este estudio son compatibles con los publicados por Ruiz-Sánchez y

cols. (1996) que asociaron la reducción en los parámetros de intercambio gaseoso inducida por el encharcamiento con un descenso en la permeabilidad radicular al agua. En otros sistemas vegetales, los genotipos tolerantes al encharcamiento presentan niveles similares a los controles en los parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas (Kogawara y cols. 2006, Li y cols. 2007), lo cual refuerza los argumentos expuestos en este trabajo.

Tomados en conjunto, los datos indican que los genotipos de cítricos sensibles a la inundación sufren una reducción drástica en la asimilación de CO<sub>2</sub> cuando están sometidos a encharcamiento durante un periodo de tiempo prolongado, mientras que los genotipos tolerantes mantienen niveles elevados de fotosíntesis durante más tiempo. Este efecto no se reduce sólo a los parámetros de intercambio gaseoso sino que además hay otras deficiencias en la maquinaria fotosintética inducidas por el encharcamiento radicular. Estas deficiencias se resumen en un descenso generalizado de la eficiencia del PSII (medidas por el parámetro Fv/Fm) junto con una reducción del transporte electrónico entre fotosistemas, como indica  $\Phi_{PSII}$ . La reducción en la capacidad de transporte electrónico se asocia a un incremento en la relación Ci/Ca, lo cual permite concluir que el encharcamiento radicular tuvo un efecto sobre la capacidad de fijación de dióxido de carbono. No

obstante, de forma paralela tanto en Cit como en MC se indujo la disipación de energía a través del incremento en NPQ, que mide la fracción de energía que se desvía hacia procesos que no implican un transporte electrónico entre sistemas y en algunos casos implica la disipación en forma de calor a nivel de los complejos antena (López-Climent y cols. 2007). La inducción de estos sistemas supone una ventaja considerable al reducir la incidencia de electrones en el entorno celular que podrían conducir a la producción de especies activadas de oxígeno y a un incremento en el estrés oxidativo (Arbona y cols. 2008).

En definitiva, los datos aportados junto con evidencias previas apuntan a la importancia del mantenimiento de una actividad fotosintética óptima como parte fundamental del mecanismo de tolerancia.

### Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia y la Fundació Bancaixa/ Universitat Jaume I a través de la concesión de los proyectos AGL2007-65437-C04-03/AGR y P1-1A2007-04.

### Bibliografía

ARBONA V, HOSSAIN Z, LÓPEZ-CLIMENT MF, PÉREZ-CLEMENTE RM y GÓMEZ-CADENAS A. 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiol Plant*. 130, 452-466.

CALATAYUD A, IGLESIAS DJ, TALÓN M y BARRENO E. 2006. Effects of long-term ozone exposure on citrus: chlorophyll a fluorescence and gas exchange. *Photosynthetica* 44, 548-554.

DOMINGO R, PÉREZ-PASTOR A y RUÍZ-SANCHEZ C. 2002. Physiological responses of apricot plants grafted on two different rootstocks to flooding conditions. *J Plant Physiol*. 159, 725-732.

FORD HW. 1968. Water management of wetland citrus in Florida. *Proc 1st Int Citrus Symp*. 3, 1759-1770.

KOGAWARA S, YAMANOSHITA T, NORISADA M, MASUMORI M y KOJIMA K. 2006. Photosynthesis and photoassimilate transport during root hypoxia in *Melaleuca cajuputi*, a flood-tolerant species, and in *Eucalyptus camaldulensis*, a moderately flood-tolerant species. *Tree Physiol*. 26, 1413-1423.

LI M, YANG D y LI W. 2007. Leaf gas exchange characteristics and chlorophyll fluorescence of three wetland plants in response to long-term soil flooding. *Photosynthetica* 45, 222-228.

LÓPEZ-CLIMENT MF, ARBONA V, PÉREZ-CLEMENTE RM, GÓMEZ-CADENAS A. 2007. Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus. *Environ Exp Bot*. 62, 176-184.

RUIZ-SANCHEZ MC, DOMINGO R, MORALES D y TORRECILLAS A. 1996. Water relations of Fino lemon plants on two rootstocks under flooded conditions. *Plant Sci*. 120, 119-125.

SUDHIR P y MURTHY SDS. 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*. 42, 481-486.

SYVERTSEN JP, ZABLOTOWICZ RM y SMITH ML. 1983. Soil-temperature and flooding effects on 2 species of citrus. 1. Plant-growth and hydraulic conductivity. *Plant Soil* 72, 3-12.

VU JCV y YELENOSKY G. 1991. Photosynthetic responses of citrus trees to soil flooding. *Physiol. Plant*. 81, 7-14.

YELENOSKY G, VU JCV y WUTSCHER HK. 1995. Influence of paclobutrazol in the soil on growth, nutrient elements in the leaves, and flood freeze tolerance of citrus rootstock seedlings. *J Plant Growth Regul*. 14, 129-134.