

Rosa M. Pérez-Clemente ● Almudena Montoliu ● María F. López-Climent  
Vicent Arbona ● Carlos de Ollas ● Vicente Vives ● Aurelio Gómez-Cadenas

# UTILIZACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LOS CÍTRICOS AL ESTRÉS SALINO.

Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural.  
Universitat Jaume I.  
Campus Riu Sec 12071 Castellón.  
Email: aurelio.gomez@uji.es

## INTRODUCCIÓN

La salinización del sustrato afecta al crecimiento de las plantas de dos formas: por una parte, la presencia de sal reduce la absorción de agua por parte de la planta, lo que conlleva una reducción en la tasa de crecimiento y es lo que se conoce como efecto osmótico del estrés salino. Por otra parte tiene lugar, de forma más lenta, la acumulación de iones en las hojas, donde pueden llegar a alcanzar concentraciones tóxicas (Gómez-Cadenas y col. 1998).

En cítricos, a diferencia de lo que ocurre en otras especies, el ión tóxico es el  $\text{Cl}^-$  (Moya y col. 2002, 2003; López-Climent y col. 2008) y las diferencias en la tolerancia a la salinidad observadas entre los diferentes portainjertos de cítricos se deben, fundamentalmente, a su capacidad para excluir estos iones cloruro (Moya y col. 2003), aunque el mantenimiento del buen funcionamiento del sistema fotosintético es importante (López-Climent y col. 2008).

Algunos genotipos, como mandarino Cleopatra (MC) se consideran

## Resumen

Este trabajo describe la puesta a punto de un sistema *in vitro* para el estudio de la toxicidad del NaCl en tres genotipos de cítricos, evitando el filtro de iones que constituye la raíz. Los cultivos se establecieron a partir de plantas de mandarino Cleopatra, citrange Carrizo y citrumelo CPB4475 cultivadas en invernadero. Se ensayaron diferentes concentraciones de NaCl y se seleccionó 60 mM como tratamiento salino para los diferentes experimentos. Los brotes de todos los genotipos estudiados acumularon concentraciones similares de iones cloruro cuando se cultivaron desprovistos del sistema radicular y mostraron los mismos daños foliares. No se observó incremento en la concentración de malondialdehído (como indicador del daño oxidativo) en ninguno de los genotipos y todos ellos mostraron patrones similares de señalización hormonal, con independencia de su tolerancia o sensibilidad cuando se cultivan en campo. El sistema *in vitro* descrito se postula como una herramienta útil para el estudio de los procesos bioquímicos implicados en la respuesta de los cítricos al estrés salino.

## Abstract

In this work, an *in vitro* experimental system has been developed to study the toxic effect of NaCl on three citrus genotypes, avoiding the ion filter that represents the root system. Cultures were established from greenhouse growing plants of Cleopatra mandarin, Carrizo citrange and citrumelo CPB4475. Several salt concentrations were tested and 60 mM NaCl was selected as saline treatment. Shoots from all studied genotypes accumulated similar levels of chloride when cultured without roots and exhibited similar leaf damage. No increases in malondialdehyde levels (as a measure of oxidative stress) were observed in any genotype and similar patterns of hormonal signalling were exhibited in the three genotypes, despite their different tolerance under field conditions. The *in vitro* culture system has been proved as a useful tool to study biochemical processes involved in the response of citrus to salt stress.

tolerantes a la salinidad, mientras que otros como citrange Carrizo (CC) o citrumelo CPB4475 (Cit) son sensibles a este estrés. La salinidad causa daños en las hojas, disminución en la tasa fotosintética neta, en la transpiración y en la conductancia estomática y hace que se active la

maquinaria antioxidante (Arbona y col. 2003). Además, provoca cambios en los niveles endógenos de diferentes fitohormonas. Es sabido que el ácido abscísico (ABA) y el etileno están implicados en la respuesta de los cítricos al estrés por salinidad (Gómez-Cadenas y col. 1998).

El sistema radicular juega un papel clave en el control de la absorción de agua e iones del sustrato. La mayor tolerancia a la salinidad de MC se asocia con una mayor eficiencia de este genotipo para restringir la acumulación de  $\text{Cl}^-$  en las raíces (Moya y col., 2002) siendo el transporte de este ión a la parte aérea mucho menor que en los genotipos sensibles. Así, sometidas a la misma presión de estrés, las plantas de MC siempre acumularán menos cloruros en la parte aérea. En este trabajo se estudia si, eliminando el sistema radicular tanto los genotipos sensibles como el tolerante acumulan cantidades similares de  $\text{Cl}^-$  y cuál es la señalización hormonal en cada caso cuando los brotes son sometidos a estrés salino.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Un primer experimento se llevó a cabo con plántulas de tres meses de edad cultivadas en invernadero. Los genotipos utilizados fueron los portainjertos de cítricos citrange Carrizo (CC, *Poncirus trifoliata* L. Raf. x *Citrus sinensis* L. Osb), citrumelo CPB4475 (Cit, *C. paradisi* L. Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) y mandarino Cleopatra (MC, *C. reshni* Hort. ex Tan.). Las plantas se cultivaron en macetas de plástico de 12 cm de diámetro, utilizando como sustrato una mezcla de turba, perlita y vermiculita (80:10:10) y se regaron con 0.5 L/maceta de solución de Hoagland diluida a la mitad. El tratamiento salino se llevó a cabo añadiendo 90 mM NaCl a la solución de riego. El porcentaje de plantas afectadas por el estrés y los contenidos de iones cloruro y malondialdehído (MDA) se determinaron después de 10, 20 y 30 días de tratamiento (ddt).

Los experimentos posteriores se llevaron a cabo *in vitro*, utilizando como fuente de material vegetal plantas cultivadas en invernadero. Se cortaron varetas de unos 15 cm de largo, se eliminaron las hojas y se

desinfectaron superficialmente por inmersión durante 10 min en una solución de hipoclorito sódico al 2% (v/v) y 0.01% (v/v) del agente mojan-te Tween 20. A continuación se lavaron tres veces con agua desionizada estéril (5 min/lavado). Las varetas se seccionaron en fragmentos de 1 cm de longitud. Los segmentos nodales se cultivaron en placas Petri de 10 cm de diámetro que contenían medio basal (MB), compuesto por las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), 100 mg/L i-inositol, 1 mg/L piridoxina-HCl, 0.2 mg/L tiamina-HCl, 1 mg/L ácido nicotínico y 30 g/L de sacarosa. El pH se ajustó a  $5.7 \pm 0.1$  con NaOH 0.1N antes del autoclavado. El medio se gelificó mediante la adición de 9g/L de agar (Pronadisa, España).

Los brotes se aislaron de segmentos nodales y se cultivaron en tubos de vidrio de 150x20 mm que contenían 25 mL de medio de multiplicación (MM) para forzar el desarrollo de las yemas axilares. El medio MM estaba compuesto por MB suplementado con 0.4 mg/L de 6-benzilaminopurina. Cuando los brotes axilares alcanzaron un tamaño de 15 mm se aislaron y se utilizaron como fuente de material vegetal en los diferentes experimentos.

Con el fin de determinar la concentración óptima de NaCl que causara un estrés salino evidente, sin causar la muerte de los brotes, éstos se cultivaron en medio MT, que consistía en MB suplementado con 0.2 mg/L de ácido giberélico y 0.2 mg/L de 6-benzilaminopurina al que se añadieron concentraciones crecientes de NaCl: 30 mM (MT1), 60 mM (MT2) o 90 mM (MT3). Como control se utilizaron brotes cultivados en MT. El contenido de iones cloruro, de MDA así como el porcentaje de brotes que mostraban síntomas de estrés se determinaron después de 10, 20 y 30 días de tratamiento. Ello permitió seleccionar 60 mM NaCl como el tratamiento salino a utilizar

en los siguientes experimentos, que se llevaron a cabo con el genotipo CC.

Los brotes fueron sometidos a estrés salino tal y como se describe arriba y se recogieron muestras de material vegetal después de 2, 5, 10 y 20 días en cultivo. Se determinó el contenido de MDA y ABA.

Los cultivos se mantuvieron en cámaras de cultivo a una temperatura de 24°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz.

El material vegetal fue recolectado, lavado con agua destilada estéril y congelado en  $\text{N}_2$  líquido. A continuación se conservó a -80°C hasta que se llevaron a cabo las determinaciones analíticas.

## Síntomas foliares del daño por estrés salino.

Como consecuencia del estrés salino, se producen clorosis en los extremos distales de las hojas que, al prolongarse la situación de estrés se transforman en necrosis. El número de hojas dañadas se contabilizó periódicamente a lo largo de todo el periodo experimental. Se consideraron como "afectados" aquellos brotes o plantas que tenían dañadas un 50 % de las hojas o más.

## Contenido de cloruros y de malondialdehído

El contenido en cloruros se midió por valoración automática tal como se describe en López-Climent y col. (2008), utilizando un clorímetro (Modelo 626, Sherwood Scientific Ltd., Cambridge, RU). La concentración de MDA se midió siguiendo el método descrito en Arbona y col. (2008).

### Concentración de ácido abscísico

La concentración de ABA se analizó mediante HPLC acoplada en tandem a un espectrómetro de masas, tal como se describe en Durgbanshi y col (2005) y en Arbona y Gómez-Cadenas (2008).

### Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software STATGRAPHICS PLUS v. 5.1 (Statistical Graphics Corporation, Warrenton, VA). Las comparaciones de medias y los ANOVA de una vía se realizaron siguiendo el test LSD con  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

### Efecto del estrés salino en plantas intactas de diferentes genotipos de cítricos

En un primer experimento llevado a cabo con plantas cultivadas en invernadero se observó que, después de 10 ddt en los genotipos CC y Cit algunas plantas ya mostraban síntomas de estrés (Tabla 1). El porcentaje de plantas afectadas de Cit, después de 30 ddt fue del 61.08 %, en CC del 48.42 % y únicamente del 11.64 % en MC. El daño foliar se correlaciona con la concentración de iones  $Cl^-$  en hojas, así los genotipos

Cit y CC acumularon concentraciones mayores de este ión a lo largo de todo el periodo experimental. La concentración de MDA (marcador del daño oxidativo) aumentó en las hojas de plantas de los genotipos sensibles a la salinidad mientras que en plantas de MC sometidas a estrés se mantuvo en valores basales (Tabla 1).

### Efecto del estrés salino en brotes cultivados *in vitro*.

Se sometieron brotes de Cit, CC y MC a diferentes tratamientos salinos *in vitro* (30, 60 y 90 mM NaCl). Todos los genotipos estudiados mostraron niveles basales de  $Cl^-$  similares a lo largo de todo el periodo experimental. La concentración de iones cloruro en los brotes aumentó a medida que progresaba el experimento, alcanzándose los valores mayores cuando el medio de cultivo se suplementó con 90 mM NaCl. En todos los genotipos estudiados se alcanzaron concentraciones similares de este ión a los 30 ddt (Figura 1. pag. 18). Para los siguientes experimentos se utilizó 60 mM como tratamiento salino. Sin provocar la elevada mortalidad observada por la adición de 90 mM de NaCl.

La exposición de los brotes al tratamiento salino causó, en todos los genotipos, los daños foliares propios

de este estrés (Figura 2). Al comienzo del tratamiento se observaron zonas cloróticas en las hojas que progresaron a necrosis del tejido después de 30 ddt.

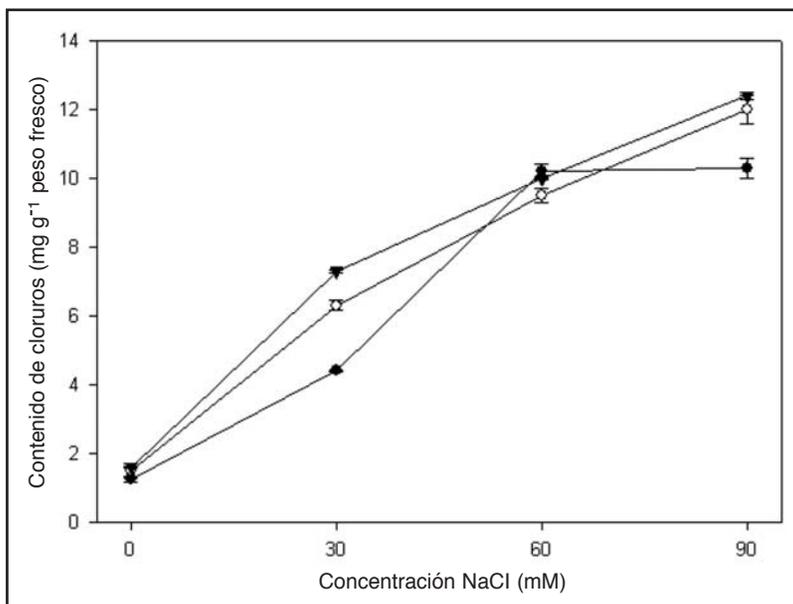
Con el fin de cuantificar la toxicidad debida al tratamiento salino, se consideraron afectados aquellos brotes que mostraban necrosis en al menos el 50 % de sus hojas. En la figura 3 se representa el porcentaje de brotes de Cit, CC y MC afectados por salinidad después de 0, 10, 20 y 30 ddt. El porcentaje de brotes afectados aumentó muy rápidamente en Cit, después de 10 ddt ya el 60% de los brotes estaban afectados mientras que en CC el porcentaje era del 17 % y en MC del 20 %. Al final del tratamiento, todos los brotes y en todos los genotipos estaban afectados (Fig. 3).

Como se muestra en la tabla 2, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la acumulación de  $Cl^-$  en brotes de los tres genotipos estudiados después de 10, 20 y 30 ddt. La concentración de este ión aumentó de forma progresiva en todos los casos oscilando entre 6.80 y 8.89 mg/g en brotes control a los 10 días vs. 20.85-27.00 mg/g en los salinizados. Al final del experimento los valores fueron de 6.55 a 13.20 mg/g en brotes control y de 33.73 a 39.08 mg/g en aquellos sometidos a estrés.

**Tabla 1:** Daño foliar, concentración de  $Cl^-$  y malondialdehido (MDA) en hojas de plantas intactas de tres genotipos de cítricos sometidos a estrés salino.

		Tiempo de tratamiento (días)					
		10		20		30	
		Control	90 mM NaCl	Control	90 mM NaCl	Control	90 mM NaCl
<b>Daño foliar</b>							
(% plantas afectadas)	citrange Carrizo	0.00 ± 0.00	6.15 ± 0.04*	0.00 ± 0.00	12.50 ± 0.80*	0.00 ± 0.00	48.42 ± 1.91*
	citrumelo CPB 4475	0.00 ± 0.00	12.02 ± 1.01*	0.00 ± 0.00	21.12 ± 3.29*	0.00 ± 0.00	61.08 ± 1.54*
	mandarino Cleopatra	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.00 ± 0.42*	0.00 ± 0.00	11.64 ± 0.29*
<b><math>Cl^-</math></b>							
(mg g <sup>-1</sup> peso fresco)	citrange Carrizo	4.14 ± 0.84	6.32 ± 0.39*	3.87 ± 0.65	14.47 ± 2.09*	5.11 ± 0.56	32.19 ± 0.98*
	citrumelo CPB 4475	2.36 ± 0.64	6.96 ± 0.80*	2.14 ± 0.58	18.24 ± 1.57*	2.94 ± 0.20	35.12 ± 2.67*
	mandarino Cleopatra	1.94 ± 0.20	2.53 ± 0.49*	1.47 ± 0.11	4.5 ± 0.95*	1.53 ± 0.01	12.61 ± 0.19*
<b>MDA</b>							
(nmol g <sup>-1</sup> peso fresco)	citrange Carrizo	29.57 ± 2.15	30.00 ± 1.58*	27.41 ± 1.21	42.01 ± 1.29*	27.78 ± 2.52	37.56 ± 2.00*
	citrumelo CPB 4475	25.65 ± 1.92	32.09 ± 2.19*	23.99 ± 2.08	51.19 ± 2.84*	26.39 ± 1.90	48.52 ± 3.25*
	mandarino Cleopatra	25.30 ± 1.81	24.22 ± 0.33	21.33 ± 0.63	23.76 ± 0.88*	22.43 ± 1.32	22.03 ± 0.50

Los datos representan valores medios ± error estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ )



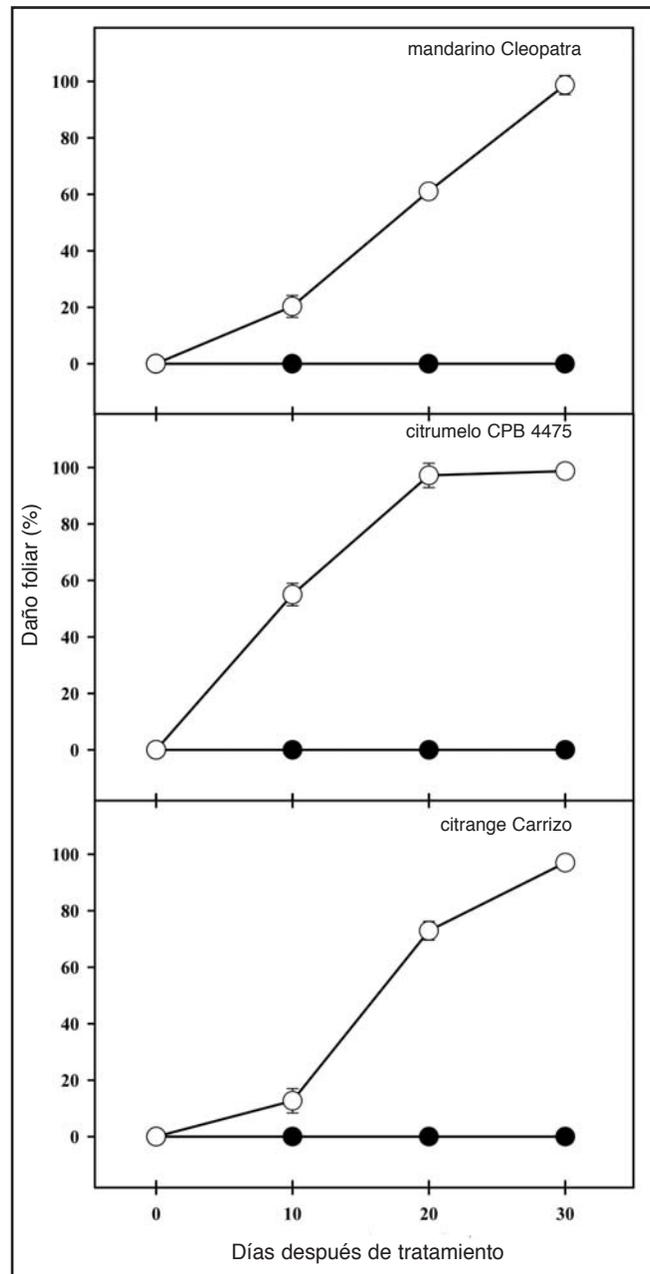
**Figura 1:** Concentración de iones cloruro en tres genotipos de cítricos cultivados *in vitro* y sometidos a diferentes concentraciones de NaCl en el medio después de 30 días en cultivo. (●) mandarino Cleopatra, (○) citrumelo CPB4475 y (▼) citrange carrizo. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  error estándar de 4 determinaciones independientes.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de MDA entre los brotes control y los cultivados en condiciones de estrés salino (Tabla 2).

El tratamiento salino no indujo una acumulación significativa de ABA en ninguno de los genotipos estudiados, independientemente de la duración del tratamiento (Tabla 2).

Con el fin de investigar los efectos a tiempos cortos del estrés salino, se determinaron las concentraciones de iones  $\text{Cl}^-$ , MDA y ABA en brotes de CC cultivados *in vitro* durante 2, 5 y 10 días (Tabla 3). En los brotes control la concentración de cloruros permaneció constante a lo largo del

periodo experimental mientras que en los salinizados aumentó progresivamente con el tiempo. Tampoco se encontraron diferencias en el contenido en MDA entre brotes control y salinizados a estos tiempos cortos. El contenido en ABA en brotes control fue similar al determinado en brotes salinizados, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas después de 5 ddt.



**Figura 3.** Porcentaje de brotes de diferentes genotipos de cítricos afectados por salinidad. Los brotes se cultivaron en medio control (●) o suplementado con 60 mM NaCl (○). Cada punto corresponde a la media  $\pm$  error estándar de 18 determinaciones independientes.

**Tabla 2.** Concentración de cloruros ( $\text{Cl}^-$ ), malondialdehído (MDA) y ácido abscísico (ABA) en brotes de tres genotipos de cítricos después de 10, 20 y 30 días sometidos a estrés salino (60mM).

		Tiempo de tratamiento (días)					
		10		20		30	
		Control	60 mM NaCl	Control	60 mM NaCl	Control	60 mM NaCl
<b><math>\text{Cl}^-</math></b> (mg/ g peso fresco)	citrange Carrizo	7.70 $\pm$ 0.02	27.00 $\pm$ 0.04*	6.06 $\pm$ 0.02	30.25 $\pm$ 0.04*	13.20 $\pm$ 0.02	33.73 $\pm$ 0.05*
	citrumelo CPB 4475	6.80 $\pm$ 0.01	27.00 $\pm$ 0.09*	7.90 $\pm$ 0.01	38.00 $\pm$ 0.03*	9.09 $\pm$ 0.02	48.34 $\pm$ 0.04*
	mandarino Cleopatra	8.89 $\pm$ 0.03	20.85 $\pm$ 0.10*	8.57 $\pm$ 0.08	43.14 $\pm$ 0.21*	6.55 $\pm$ 0.04	39.08 $\pm$ 0.11*
<b>MDA</b>	(nmol/ g peso fresco)						
	citrange Carrizo	37.09 $\pm$ 1.46	24.74 $\pm$ 1.35*	14.90 $\pm$ 0.85	18.42 $\pm$ 1.33*	27.31 $\pm$ 2.92	16.93 $\pm$ 0.70*
	citrumelo CPB 4475	21.99 $\pm$ 1.18	21.55 $\pm$ 1.47	22.04 $\pm$ 0.50	20.65 $\pm$ 0.51	23.75 $\pm$ 0.84	20.45 $\pm$ 1.55
mandarino Cleopatra	-	-	21.34 $\pm$ 0.96	21.02 $\pm$ 0.76	24.83 $\pm$ 0.47	25.21 $\pm$ 0.74	
<b>ABA</b>	(ng/ g peso fresco)						
	citrange Carrizo	37.20 $\pm$ 9.35	29.05 $\pm$ 4.99	53.55 $\pm$ 2.32	23.65 $\pm$ 3.84*	91.37 $\pm$ 8.31	33.13 $\pm$ 3.95*
	citrumelo CPB 4475	78.75 $\pm$ 7.51	52.05 $\pm$ 2.74*	40.70 $\pm$ 1.85	78.42 $\pm$ 14.54*	157.40 $\pm$ 7.38*	82.39 $\pm$ 3.40*
mandarino Cleopatra	104.50 $\pm$ 18.84	90.50 $\pm$ 3.16	26.00 $\pm$ 0.56	22.00 $\pm$ 2.30	24.95 $\pm$ 2.30*	13.30 $\pm$ 2.15*	

Los datos representan valores medios de 4 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

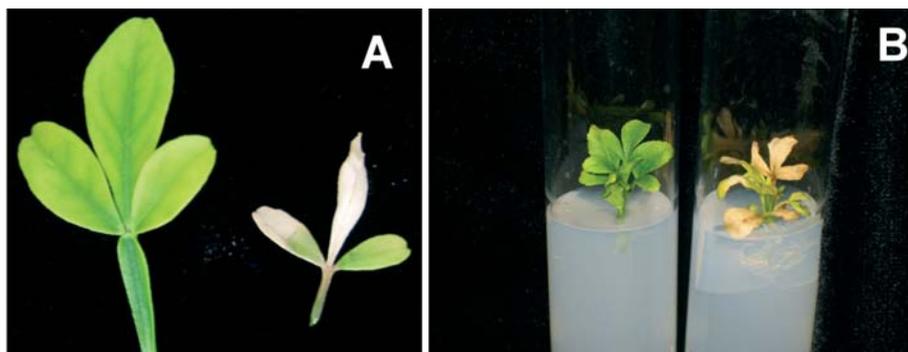
**Tabla 3.** Concentración de cloruros (Cl<sup>-</sup>), malondialdehído (MDA) y ácido abscísico (ABA) en brotes de citrange Carrizo después de 2, 5 y 10 días sometidos a estrés salino (60mM).

	Tiempo de tratamiento (días)					
	2		5		10	
	Control	60 mM NaCl	Control	60 mM NaCl	Control	60 mM NaCl
<b>Cl<sup>-</sup></b> (mg/ g peso fresco)	1.68±0.03	2.73±0.04*	1.72±0.08	5.02±0.09*	1.15±0.04	5.38±0.13*
<b>MDA</b> (nmol/ g peso fresco)	16.48±1.49	20.79±0.99	18.41±2.08	17.31±1.38	27.30±1.35	29.74±1.76
<b>ABA</b> (ng/ g peso fresco)	25.20±2.80	30.07±3.87	33.20±5.91	9.60±1.40*	8.40±1.60	11.33±0.40
<b>SA</b> (ng/ g peso fresco)	34.60±13.00	27.73±6.82	28.93±5.28	37.80±5.24	35.00±3.60	56.73±12.91

Los datos representan valores medios de 4 determinaciones independientes ± error estándar. Los asteriscos denotan diferencias significativas (P < 0.05)

## DISCUSION

En la literatura se describe ampliamente cómo la elevada salinidad en el agua de riego afecta a los cítricos en las plantaciones comerciales. En condiciones de campo, las plantas están expuestas a condiciones climáticas variables así como a otros factores bióticos y abióticos que afectan a su desarrollo y que hacen que el abordaje de estudios básicos sea complejo. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* permite solventar algunas limitaciones: hace posible el crecimiento de plantas clonales en condiciones climáticas y nutricionales controladas, lo que permite llevar a cabo los experimentos en idénticas condiciones a lo largo de todo el año. Sometidas a estrés salino, las plantas intactas de los



**Figura 2.** Efecto del estrés salino en diferentes genotipos de cítricos.

**A)** Amarillamiento y necrosis en hojas de citrange Carrizo procedentes de brotes cultivados *in vitro* y en condiciones de estrés salino durante 10 (izquierda) y 30 días (derecha). **B)** Brote de mandarina Cleopatra después de 30 días de tratamiento salino (derecha) y control (izquierda).

genotipos sensibles Cit y CC siempre acumulan concentraciones mayores de iones Cl<sup>-</sup> en hojas que el genotipo tolerante MC (Tabla1, López-Climent y col. 2008). En estas condiciones de cultivo, la acumulación de cloru-

ros en hojas depende exclusivamente del sistema radicular, responsable de la absorción de estos iones (Moya y col. 2002, 2003; López-Climent y col. 2008).



**Viveros CITROPLANT®**  
En vanguardia

## Plante con las mejores garantías

Viveros Citroplant, S.L., es un Vivero de cítricos, autorizado y regulado por el Ministerio de Agricultura, para la producción de plantones de cítricos sobre pies tolerantes a la tristeza e injertos libres de virus.

Estamos utilizando las más avanzadas tecnologías, con dos sistemas de cultivo, Tierra e Hidropónico para obtener la mayor calidad en nuestros plantones.

### Sistema Hidropónico

#### Ventajas:

- Estrés al trasplante menor
- Crecimiento inicial mucho mayor
- No es necesario el despunte de la planta
- Ideal para doblados y reposiciones
- Porcentaje de faltas cero o nulo

**¡INNOVACIONES!!**

Valencia Midnight Seedless  
Powell Summer Navel®  
Valencia Delta Seedless  
Navel Fukumoto  
Clemenrubi®  
Navel Chislett  
Satsuma Iwasaki

### Nuestra oferta varietal comprende:

Mandarinos, Naranjos, Limoneros, Limas, Pomelos y Patrones



En este trabajo se ha utilizado la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, que ha permitido estudiar el comportamiento de diferentes genotipos de cítricos con diferente tolerancia al estrés salino evitando el efecto de la raíz. Para ello se cultivaron brotes de los diferentes genotipos sin sistema radicular. A diferencia de lo observado *ex vitro* (Tabla 1), cuando los brotes se cultivaron sin raíz todos los genotipos acumularon concentraciones similares de  $\text{Cl}^-$ , con independencia de su tolerancia al estrés salino en campo (Fig. 1). MC manifestó los mismos síntomas foliares que los observados en los genotipos sensibles Cit y CC (Fig 2 y 3). El método descrito permitió disponer de brotes de genotipos sensibles y tolerantes a la salinidad acumulando cantidades similares de  $\text{Cl}^-$ , algo que no es posible en condiciones de cultivo *ex vitro*, lo que permitió estudiar otros procesos bioquímicos involucrados en la respuesta de los cítricos al estrés salino.

En algunos cultivos, la tolerancia a la salinidad se ha relacionado con una mejora de la respuesta de estas plantas al estrés oxidativo. En plantas intactas de los genotipos sensibles Cit y CC se observó un incremento en los niveles de MDA que no se produjo en el genotipo tolerante MC cuando las plantas se sometieron a estrés salino, (Tabla 1). Este incremento no se produjo cuando las plantas se cultivaron *in vitro* desprovistas de raíz, sin embargo las hojas manifestaban los síntomas característicos del estrés por salinidad (amarillamiento que progresó a necrosis del tejido), lo que nos lleva a concluir que no existe correlación entre el daño foliar observado y el estrés oxidativo.

El ABA juega un papel decisivo en el ajuste de las plantas a condiciones de estrés abiótico, es la señal que comunica la existencia de un estrés hídrico de la raíz al brote (Gómez-Cadenas y col. 1998). Se ha demos-

trado que, plantas intactas de CC responden a la salinidad acumulando ABA en las hojas (Gómez-Cadenas y col. 1998). Sin embargo, cuando los brotes de CC se cultivaban *in vitro* desprovistos del sistema radicular no se observaba acumulación de esta fitohormona. Estos resultados coinciden con los obtenidos en maíz donde el tratamiento con NaCl no inducía acumulación de ABA en hojas, mientras que el mismo tratamiento causaba una importante acumulación de la hormona en las raíces.

Cuando los brotes de CC se cultivaban en condiciones de estrés salino desprovistos de raíces no se producía un incremento en la concentración de ABA, probablemente debido a que la biosíntesis de esta hormona tenga lugar fundamentalmente en las raíces y la ausencia de este órgano hace imposible que esta síntesis tenga lugar. También podría deberse a que la señalización tenga lugar antes de los 10 ddt (momento en que se hicieron las primeras determinaciones). Para descartar esta posibilidad y conocer los efectos del estrés salino a tiempos cortos, se hizo un estudio en el que se determinaron los mismos parámetros después de 2, 5 y 10 ddt. La acumulación de  $\text{Cl}^-$  fue gradual y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de MDA y ABA en los brotes salinizados, lo que descarta una señalización temprana mediada por ABA.

A la vista de los resultados podemos concluir que, cuando los brotes se cultivan sin sistema radicular y se someten a estrés salino, todos los genotipos acumulan cantidades similares de  $\text{Cl}^-$  y muestran la misma sintomatología foliar independientemente de su tolerancia a la salinidad cuando se cultivan en campo. La falta de acumulación de MDA y los patrones de señalización hormonal comunes en todos los genotipos estudiados, tanto a tiempos de estudio cortos como en experimentos a

largo plazo, indican que, bajo las mismas condiciones de estrés salino y con el mismo nivel de  $\text{Cl}^-$  en hojas, no existen diferencias bioquímicas entre los genotipos sensibles (Cit y CC) y el genotipo tolerante a la sal MC. Por tanto, la raíz es un órgano clave no sólo para la exclusión de iones  $\text{Cl}^-$  sino también responsable de la señalización hormonal del estrés en cítricos.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y la Fundació Bancaixa/Universitat Jaume I a través de la concesión de los proyectos AGL2010-22195-C03-01/AGR y P1 1B2009-01, respectivamente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arbona V, Gómez-Cadenas A (2008) Hormonal modulation of Citrus responses to flooding. *J Plant Growth Regul* 27:241-250.
- Arbona V, Flors V, García-Agustín P, Jacas J, 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, Hossain Z, López-Climent MF, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A (2008) Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiol Plant* 132:452-466.
- Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, 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.
- Gómez-Cadenas A, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M (1998) Involvement of abscisic acid and ethylene in the response of citrus seedlings to salt shock. *Physiol Plant* 103:475-484.
- López-Climent MF, Arbona V, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A (2008) Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus. *Env Exp Bot* 62:176-184.
- Moya JL, Gómez-Cadenas A, Primo-Millo E, Talon M (2003) Chloride absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water use. *J Exp Bot* 54:825-833.
- Moya JL, Tadeo FR, Gómez-Cadenas A, Primo-Millo E, Talon M (2002) Transmissible salt tolerance traits identified through reciprocal grafts between sensitive Carrizo and tolerant Cleopatra citrus genotypes. *J Plant Physiol* 159:991-998.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.