



Tolerancia a la salinidad en dos portainjertos de citrus: crecimiento, composición mineral y ajuste osmótico

Salinity tolerance in two citrus rootstocks: growth, mineral composition and osmotic adjustment

Diego Ariel Meloni
René Noelia David

Gilles Ayrault
Gabriela Abdala

Originales
Recepción: 14/04/2008
Aceptación: 29/09/2008

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la tolerancia al estrés salino en el portainjerto Citrumelo cultivar 75 AB (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*), en comparación con Mandarino Cleopatra (*Citrus reticulata*), conocido por su elevada tolerancia. Se incubaron plántulas entre toallas de papel, humedecidas con agua destilada o soluciones de NaCl 30 mM.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con 3 repeticiones, y los datos se analizaron mediante ANOVA y Test de Tukey. Luego de 41 días de ensayo se determinó el peso fresco, contenido relativo de agua (CRA), concentración de prolina y composición mineral. El crecimiento de Cleopatra fue más sensible a la salinidad que el de Citrumelo cultivar 75 AB. El CRA se mantuvo constante en ambos portainjertos. El ajuste osmótico se realizó mediante la acumulación de prolina en hojas; su concentración fue mayor en Citrumelo 75 AB. Este último excluyó los iones Na⁺ y Cl⁻ de la parte aérea, restringiéndolos al sistema radicular, mientras que en Cleopatra se observó lo opuesto.

Se concluye que Citrumelo cultivar 75 AB es más tolerante a la salinidad que Cleopatra, y excluye los iones Na⁺ y Cl⁻ de la parte aérea.

SUMMARY

The aim of this paper was to evaluate the salt-stress tolerance of the 75 AB Citrumelo cultivar (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*) in comparison with the Cleopatra Mandarin (*Citrus reticulata*) which is known worldwide due to its high stress resistance. Seedlings of both species were incubated in between paper towels damped with distilled water or 30 mM NaCl solutions.

The experimental design was completely randomized with 3 replica and the data were analyzed using ANOVA and the Tukey test. After 41 days, fresh weight, relative water content (RWC), proline concentration, and mineral composition were determined. Growth in Cleopatra was more sensitive to salinity than that of the 75 AB Citrumelo cultivar, whereas relative water content kept constant in both rootstocks. The osmotic adjustment occurred by accumulating proline in leaves being its concentration higher in the 75 AB Citrumelo. The latter excluded Na⁺ and Cl⁻ ions from the aerial part of the plant and limited them to the root system while the contrary was observed for Cleopatra.

The 75 AB Citrumelo cultivar is more tolerant to salinity than Cleopatra and excludes both Na⁺ and Cl⁻ ions from its aerial part.

Palabras clave

estrés salino • relaciones hídricas •
nutrición mineral • *Citrus reticulata* •
Citrus paradisi x *Poncirus trifoliata*

Keywords

salinity stress • water relations • mine-
ral nutrition • *Citrus reticulata* • *Citrus*
paradisi x *Poncirus trifoliata*

INTRODUCCIÓN

La acumulación de sales solubles en el suelo limita la producción agrícola en las regiones áridas y semiáridas. El problema afecta aproximadamente el 25% de los 230 millones de hectáreas irrigadas del planeta (1).

Los citrus se cultivan preferentemente en regiones semiáridas, donde se requiere de irrigación para lograr una máxima producción. En dichas áreas, las altas concentraciones salinas en suelos y aguas de riego pueden inhibir su crecimiento y disminuir la producción (16). Aunque las especies de citrus son clasificadas como sensibles a la salinidad, se mencionan diferencias significativas en el nivel de tolerancia de los distintos genotipos (2). Por este motivo resulta de gran interés el mejoramiento genético tendiente a la obtención de cultivares con elevada tolerancia a la salinidad y el estudio de las bases fisiológicas de dicho comportamiento.

La disminución en el crecimiento en plantas sometidas al estrés salino puede deberse a numerosos factores, entre los que se destacan el estrés hídrico generado por el bajo potencial osmótico de la solución del suelo, el desbalance nutricional y la toxicidad de los iones Na^+ y Cl^- (14).

Algunas especies desarrollan mecanismos que les permiten tolerar estas condiciones. Así, la síntesis de solutos osmocompatibles, como azúcares solubles y prolina, y la acumulación de iones en vacuola contribuyen a disminuir el potencial osmótico de los tejidos, manteniendo un gradiente de potencial hídrico entre el suelo y la planta. Este mecanismo, denominado ajuste osmótico, garantiza la absorción de agua y la manutención de la turgencia celular (17).

Otras especies excluyen los iones Na^+ y Cl^- de la parte aérea, restringiéndolos al sistema radicular, lo que evita el efecto tóxico de estos iones (6).

Objetivo

- Evaluar la tolerancia al estrés salino en el portainjerto Citrumelo Cultivar 75 AB (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*), registrado por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Argentina (4) en comparación con Mandarino Cleopatra (*Citrus reticulata*), conocido mundialmente por su elevada tolerancia al estrés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de ambos portainjertos fueron cosechadas de plantas seleccionadas en la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes, San Miguel de Tucumán, Argentina. Se colocaron a germinar entre toallas de papel, humedecidas con agua destilada, durante 30 días. Posteriormente se colocaron lotes de 25 plántulas, entre toallas de papel humedecidas con agua destilada o soluciones de NaCl 30 mM. Las toallas se enrollaron, se cubrieron con bolsas de polietileno para disminuir las pérdidas de agua por evaporación y se dispusieron verticalmente en cámara de crecimiento a 25°C y con un fotoperíodo de 12 horas. Luego de 41 días de ensayo, las plántulas fueron extraídas, separadas en raíz y parte aérea y pesadas.

En cada tratamiento se extrajeron muestras de hojas para la determinación del contenido relativo de agua (CRA), mediante la siguiente ecuación (9):

$$\text{CRA (\%)} = [(\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PSAT} - \text{PS})] * 100$$

donde:

PF: peso fresco

PS: peso seco

PSAT: peso del material vegetal saturado en agua

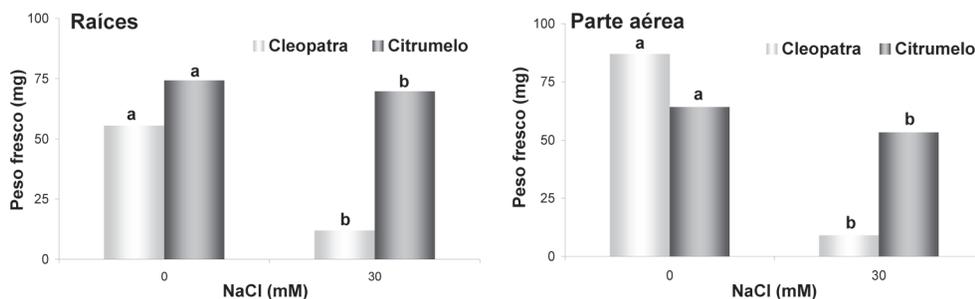
Se determinó la concentración de prolina en raíces y hojas mediante el método de Bates et al. (3). Para ello, el material se homogeneizó en 10 ml de solución de ácido sulfosalicílico 3% (v/v) y se filtró a través de papel Whatman N° 1. De dicho filtrado se tomaron alícuotas de 2 ml, a las que se le adicionaron 2 ml de solución de ninhidrina ácida y 2 ml de ácido acético glacial. Se incubó en baño María a 100°C durante una hora, terminándose la reacción al colocar los tubos en baño de hielo. Por último se adicionaron 4 ml de tolueno, aspirándose el cromóforo de la fase acuosa. Se leyó absorbancia a 520 nm con espectrofotómetro Shimadzu y se calculó la concentración de prolina, con auxilio de una curva patrón.

Para la determinación de la composición mineral, el material se secó en estufa a 60°C y se digirió en una mezcla de ácido nítrico y perclórico (2:1 v/v). Las concentraciones de Na⁺ y K⁺ se determinaron mediante espectrofotometría de llama, Ca⁺² y Mg⁺² mediante espectrofotometría de absorción atómica. El Cl⁻ fue extraído en agua y determinado mediante titulación con AgNO₃ (13).

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con 3 repeticiones, y los datos fueron analizados mediante ANOVA y Test de Tukey al 5% de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

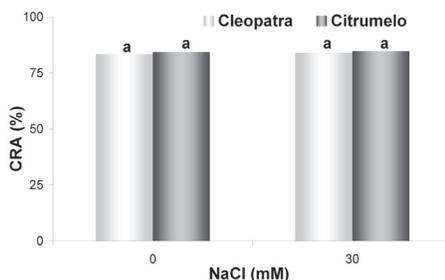
El crecimiento de ambos genotipos fue afectado por la salinidad, siendo Cleopatra más sensible que Citrumelo (gráfico 1, pág. 100). En Cleopatra, el NaCl redujo en 78% el peso fresco de la parte aérea y 89% el peso fresco de la raíz, con respecto al testigo. En Citrumelo 75 AB el efecto fue menos acentuado, con una disminución del 17 y 6% en el peso de la parte aérea y el sistema radicular, respectivamente.



Letras diferentes indican diferencias significativas al 5% por el Test de Tukey.

Gráfico 1. Efecto del NaCl sobre el peso fresco de raíces y parte aérea de Citrumelo 75 AB y Mandarino Cleopatra.

Pese a la inhibición en el crecimiento, ambos genotipos lograron ajustarse osmóticamente, ya que el CRA se mantuvo constante en todos los tratamientos (gráfico 2). Por lo tanto, el crecimiento no fue inhibido por la pérdida de turgencia celular.

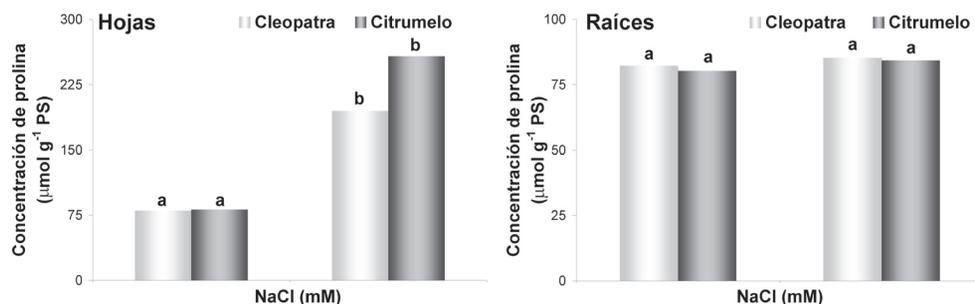


Letras diferentes indican diferencias significativas al 5% por el Test de Tukey.

Gráfico 2.

Efecto del NaCl sobre el contenido relativo de agua en hojas de Citrumelo 75 AB y Mandarino Cleopatra.

En concordancia con estos resultados, tanto Cleopatra como Citrumelo incrementaron la concentración foliar de prolina en 142 y 218% respectivamente, en relación con el testigo, en tanto que en ambos genotipos la concentración de prolina en raíces se mantuvo constante en todos los tratamientos (gráfico 3).



Letras diferentes indican diferencias significativas al 5% por el Test de Tukey.

Gráfico 3. Efecto del NaCl sobre las concentraciones de prolina en hojas y raíces de Citrumelo 75 AB y Mandarino Cleopatra.

La prolina es considerada un soluto osmocompatible, ya que contribuye al ajuste osmótico celular, manteniendo un gradiente de potencial hídrico, lo que permite absorber agua y mantener la turgencia celular. También se sugieren otras funciones, como la protección de la estructura de las proteínas contra la desnaturalización, la estabilización de membranas celulares, interactuando con fosfolípidos y sería una fuente de energía y nitrógeno (7).

La bibliografía menciona las especies de citrus como acumuladoras de prolina, incluso en condiciones óptimas de crecimiento (15). Peso a ello, las concentraciones de este soluto en hojas de plantas de Citrumelo 75 AB incubadas en 30 mM de NaCl superan los valores observados en otras especies. Las concentraciones del orden de $258 \mu\text{mol g}^{-1}$ PS son similares a las encontradas en plantas transgénicas del portainjerto Carrizo (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf) transformadas con el gen mutante p5cs, que les permite incrementar la síntesis de prolina (8). Esta característica podría conferirle tolerancia a mayores niveles de salinidad, y a condiciones de estrés hídrico. En plántulas de Citrumelo incubadas en 30 mM de NaCl, las concentraciones de Cl^- en hojas y raíces fueron aproximadamente 8 y 5 veces mayores que las observadas en el testigo, tal como se advierte en la siguiente tabla.

Efecto del NaCl (0, 30 mM) sobre la concentración de iones ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PS) en hojas y raíces de Citrumelo y Mandarino Cleopatra.

| Portainjerto | NaCl (mM) | Cl^- | Na^+ | K^+ | Ca^{+2} | Mg^{+2} |
|-----------------|-----------|---------------|---------------|--------------|------------------|------------------|
| Hojas | | | | | | |
| Citrumelo 75 AB | 0 | 23 a | 14 a | 1201 a | 285 a | 23 a |
| | 30 | 193 b | 192 b | 1542 b | 277 a | 20 b |
| Cleopatra | 0 | 25 a | 30 a | 1975 a | 460 a | 17 a |
| | 30 | 487 b | 761 b | 1281 b | 300 b | 13 b |
| Raíces | | | | | | |
| Citrumelo 75 AB | 0 | 44 a | 23 a | 1778 a | 154 a | 76 a |
| | 30 | 231 b | 472 b | 752 b | 200 b | 78 a |
| Cleopatra | 0 | 14 a | 19 a | 1939 a | 235 a | 63 a |
| | 30 | 306 b | 137 b | 1285 b | 192 b | 65 a |

Letras diferentes en cada columna, para cada portainjerto, indican diferencias significativas por el Test de Tukey al 5% de probabilidad.

Este efecto fue más acentuado en Cleopatra en la cual hojas y raíces de plántulas sometidas a 30 mM de NaCl presentaron concentraciones foliares de Cl^- 19 y 21 veces superiores a las del testigo. Estos resultados indican que Citrumelo excluye el Cl^- de la parte aérea, restringiéndolo al sistema radicular. Dicho ión puede ser compartimentalizado en vacuolas de las células de la raíz, contribuyendo al ajuste osmótico, tal como se ha observado en otras especies (6).

Pese a que en todos los casos el NaCl incrementó las concentraciones de Na^+ , ambos genotipos mostraron un patrón de distribución diferencial de este catión. Mientras Citrumelo acumuló el Na^+ principalmente en las raíces, Cleopatra lo hizo en las hojas, alcanzando valores próximos a los $800 \mu\text{mol g}^{-1}$ PS. Un mecanismo similar fue reportado previamente en los portainjertos Carrizo y "Sour Orange" (5).

Estos resultados demuestran que Citrumelo posee un mecanismo que le permite excluir el Na^+ de la parte aérea. La retraslocación de Na^+ posibilita regular su concentración en la parte aérea y ha sido demostrado en algunas especies (18). Esto le confiere a Citrumelo una ventaja adaptativa con respecto a Cleopatra, ya que el Na^+ está involucrado en la inhibición no estomática de la fotosíntesis, que genera disminución en el crecimiento de especies sensibles al estrés (18).

El NaCl incrementó en 28% la concentración de K^+ en las hojas de Citrumelo, pero la redujo en raíces en 58%. En Cleopatra la concentración de este catión disminuyó 35 y 34% en hojas y raíces, respectivamente.

Ciertos efectos adversos de la salinidad han sido atribuidos a deficiencias de K^+ , aunque en el caso de citrus no siempre se observa una reducción en la concentración de este catión en las plantas sometidas a estrés (2).

La concentración de Ca^{+2} se mantuvo constante en hojas de Citrumelo y se incrementó en las raíces. En Cleopatra se registró un descenso en las concentraciones en raíces y hojas. El Ca^{+2} contribuye a dar estructura a las membranas celulares, y su desplazamiento por Na^+ , en plantas sometidas a estrés salino, puede alterar la permeabilidad selectiva.

En estos casos, la inhibición en el crecimiento celular suele estar asociada a la pérdida de K^+ a través de las membranas (12). Así, la disminución de la concentración K^+ y la manutención de los niveles de Ca^+ en raíces de Citrumelo, indicarían que dicha reducción no se debió a la pérdida de este ión a través de las membranas.

Estos resultados sugieren la traslocación del K^+ desde las raíces hacia las hojas, contribuyendo al ajuste osmótico, o para compensar el incremento de la concentración de iones Cl^- en estos tejidos. La traslocación de K^+ ha sido demostrada en otros géneros como *Brassica* y *Hordeum* (10, 11, 19). Wolf y Jeschke (19) también observaron la traslocación de K^+ desde hojas adultas hacia hojas jóvenes vía floema y la retraslocación de Na^+ hacia hojas jóvenes y adultas a través del xilema, en plantas de cebada sometidas a estrés salino.

El NaCl redujo las concentraciones de Mg^{+2} en hojas de Citrumelo y Cleopatra, aunque no afectó sus niveles en las raíces. El Mg^{+2} forma parte de la molécula de clorofila, y afecta el tamaño, estructura y funcionamiento de los cloroplastos (18).

De esta manera, una deficiencia en Mg^{+2} puede inhibir la fotosíntesis, contribuyendo a la inhibición del crecimiento. La elevada tolerancia a la salinidad de este nuevo cultivar amerita la realización de estudios de producción a campo, para considerar su utilización como portainjerto en zonas áridas y semiáridas.

CONCLUSIONES

- ❖ El cultivar Citrumelo 75 AB es más tolerante a la salinidad que Cleopatra.
- ❖ Tanto Citrumelo 75 AB como Cleopatra se ajustan osmóticamente mediante la acumulación de prolina en hojas.
- ❖ Citrumelo 75 AB excluye los iones Cl^- y Na^+ de la parte aérea, compartimentalizándolos en el sistema radicular, mientras que Cleopatra los acumula en la parte aérea.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvez Oliveira, L. A.; L. Paes Barreto; E. Becerra Neto; V. Ferreira dos Santos; J. C. Araújo Costa. 2006. Solutos orgánicos em genótipos de sorgo sob estresse salino. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. 41: 31-35.
2. Al-Yassin, A. 2004. Influence of salinity on citrus: a review paper. Journal of Central European Agriculture. 5: 263-272.
3. Bates, L. S.; R. P. Waldren; J. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil. 39: 205-207.
4. Boletín Oficial de la República Argentina n° 30.868. 2006. p. 22.
5. Cámara Zapata, J. M.; F. G. García-Sánchez.; V. Martínez; M. Nieves; A. Cerdá. 2004. Effect of NaCl on citrus cultivars. Agronomie. 24: 155-160.
6. Chen, S.; J. Li; E. Fritz; S. Wang; A. Hüttermann. 2002. Sodium and chloride distribution in roots and transport in three poplar genotypes under increasing NaCl stress. Forest Ecology and Management. 168: 217-230.
7. Claussen, W. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. Plant Science. 168: 241-248.
8. Correa Molinari, H.; C. J. Marur; J. C. Bepalhok filho; A. K. Kobayashi; M. Pileggi.; R. Pereira Leite Júnior; L. F. Protasio Pereira; L. Gonzaga Esteves Vieira. 2004. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. Plant Science. 7: 1375-1381.
9. Hall, D. O.; J. M. O Scurlock; H. R. Bolhàr-Nordenkampf; R. C. Leegood; S. P. Long. 1993. Photosynthesis and Production in a Changing Environment. Chapman & Hall. London. England. p. 113-127.
10. Jeschke, W. D.; O. Wolf. 1985. Na^+ -dependent net K^+ retranslocation in leaves of *Hordeum vulgare*, cv. California Mariout and *Hordeum distichon*, cv. Villa under salt stress. Journal of Plant Physiology. 121: 211-223.
11. Kwon, T.; P. J. C. Harris; W. F. Bourne. 1999. Partitioning of Na^+ , K^+ , Proline and total sugar in relation to the salinity tolerance of *Brassica juncea* and *Brassica rapa*. Journal of the Korean Society for Horticultural Science. 40: 425-430.
12. Liu, T.; J. V. Staden. 2001. Growth rate, water relations and ion accumulation of soybean callus lines differing in salinity tolerance under salinity stress and its subsequent relief. Plant Growth Regulation 34: 277-285.
13. Malavolta, E.; G. Vitti; S. Oliveira. 1989. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. São Paulo. 201 p.
14. Meloni, D. A.; M. A. Oliva; H. A. Ruiz; C. A. Martinez. 2001. Contribution of Proline and Inorganic Solutes to Osmotic Adjustment in Cotton under Salt Stress. Journal of Plant Nutrition. 24: 99-612.

15. Notle, K. D.; A. D. Hanson; D. Gage. 1997. Proline accumulation and methylation to proline betaine in Citrus: implications for genetic engineering of stress resistance. *Journal of American Society of Horticultural Science*. 122: 8-13.
16. Ruiz, D; V. Martínez; A. Cerdá. 1997. Citrus response to salinity: growth and nutrient uptake. *Tree Physiology*. 17:141-150.
17. Souza Lima, M. G.; N. Fernández Lopes; M. A. Bacarin; C. Rodríguez Mendes. 2004. Efeito do estresse salino sobre a concentração de pigmentos de prolina em folhas de arroz. *Bragantia*. 63:335-340.
18. Umezawa, T.; K. Shimizu; M. Kato; T. Ueda. 2001. Effects of non-stomatal components on photosynthesis in soybean under salt stress. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*. 45: 57-63.
19. Wolf, O.; W. D. Jeschke. 1987. Modeling of sodium and potassium flows via phloem and xylem in the shoot of salt-stressed barley. *Journal of Plant Physiology*. 128: 371-386.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina.

Las semillas fueron gentilmente cedidas por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, San Miguel de Tucumán, Argentina.