ITEA (2001). Vol. 97V N.° 1, 52-59

FLUORESCENCIA DE CLOROFILA *IN VIVO* EN PATRONES DE CÍTRICOS Y SUS COMBINACIONES BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO

F.J. Bleda Fernández*, R. Madrid Vicente, A. García Lidón*, I. Mateo Bernal*, P. Gómez López*, I. Porras Castillo***

* Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (CIDA), Unidad de Citricultura, 30150 La Alberca, Murcia, España
e-mail: Ignacio. Porras@carm.es

** Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología, Facultad de Química, Universidad de Murcia, Apartado 4021, 30800 Murcia, España

RESUMEN

La cinética de inducción de fluorescencia de clorofila o efecto Kautsky, en hojas adaptadas a la oscuridad que son sometidas a una posterior irradiación de luz, fue descubierta en 1931 por Hans Kautsky. El objeto de estudio de esta investigación es demostrar la utilidad de las medidas de la cinética de inducción de fluorescencia de clorofila *in vivo* para detectar respuestas frente a la salinidad en hojas de tres patrones de cítricos sin injertar y de sus diferentes combinaciones de injertos: *Citrus macrophylla* Wester (Mc), 'mandarino Cleopatra' (Cl) y 'citrange Carrizo' (Cz) y las combinaciones: Cl/Mc, Cz/Mc, Mc/Cl, Cz/Cl, Mc/Cz. y Cl/Cz. Las plantas fueron regadas con soluciones salinas de diferente concentración: T_0 (0 mmol/L de NaCl), T_1 (25 mmol/L de NaCl) y T_2 (50 mmol/L de NaCl). Se observó una disminución de los valores del parámetro de fluorescencia medido al aumentar la concentración de NaCl en la solución nutricional.

Palabras clave: Salinidad, *C. macrophylla*, 'Citrange Carrizo', 'Mandarino Cleopatra'.

SUMMARY

CHLOROPHYLL FLUORESCENCE *IN VIVO* IN CITRUS ROOTSTOCKS AND THEIR COMBINATIONS UNDER SALT STRESS CONDITIONS

The chlorophyll fluorescence induction kinetics or Kautsky effect, in dark-adapted leaves upon a sudden irradiation, was detected in 1931 by Hans Kautsky. Measurements of chlorophyll fluorescence *in vivo* were made to responses and degrees of salt stress in leaves of three citrus rootstocks without grafting and their combinations. *Citrus macrophylla* Wester' (Mc), 'Cleopatra mandarin' (Cl) and 'Carrizo citrange' (Cz) and the combinations: Cl/Mc, Cz/Mc, Mc/Cl, Cz/Cl, Mc/Cz, and Cl/Cz. They were grown in three differents sodium chloride levels in the nutrient solutions: T_0 (0 mmol/L), T_1 (25 mmol/L) and T_2, (50 mmol/L). The chlorophyll fluorescence parameter measured decreased when the sodium chloride level increased.

Key words: Salinity, *Citrus macrophylla*, 'Carrizo citrange', 'Cleopatra mandarin'.

Introducción

Las fluorescencia de clorofila es una técnica no destructiva con las plantas, de fácil manejo y respuesta rápida, que permite la realización de experiencias con un elevado número de repeticiones, lo que facilita la interpretación estadística de los resultados. A su vez, esta técnica puede suministrar información acerca de la identidad de varios pigmentos, su organización, transferencia de energía de excitación entre ellos y sobre diversas reacciones de transferencia de electrones específicas del fotosistema II (FII).

Se consideran tres períodos en la cinética de la fluorescencia emitida por la clorofila (KAUSKY y HIRSCH, 1931), pudiendo subdividir el primero en otros dos:

1. Se da inicialmente un rápido incremento de la fluorescencia hasta el nivel F_i; alcanzando posteriormente un máximo de fluorescencia (F_M o P), puramente fotoquímico e independiente de los cambios de temperatura; no puede ser inhibido por la cianida. Dicha medida es la que se utiliza en este trabajo y se alcanza en apenas 3 segundos.

2. La fluorescencia disminuye lentamente, esta disminución está fuertemente influenciada por la temperatura y puede ser inhibida por la cianida.

3. Se alcanza un período de fluorescencia constante, llamado fase estacionaria, algunos minutos después de la irradiación, este valor se denomina T y es próximo al valor inicial F_0 (ligeramente superior).

Como decíamos, nos centramos en el primer período, cuando se alcanza el valor máximo (F_M), esto es, los valores de fluorescencia F_0 y F_M, expresando los resultados como fluorescencia variable: F_V/F_M, siendo $F_V = F_M - F_0$. La razón F_V/F_M es proporcional a la eficiencia fotoquímica máxima de las hojas (DEMMING-ADAMS y ADAMS, 1992; BUTLER y KITAJIMA, 1975). Este parámetro es una de las variables más estudiadas por numerosos autores en una gran variedad de especies, estableciendo como valor medio 0,832 (BJÖKMAN y DEMMING, 1987).

También se pueden analizar otros indicadores o parámetros relacionados con la eficiencia fotoquímica y su variación ante cualquier situación de estrés. Las medidas de fluorescencia de clorofila pueden ser un método para la valoración de la tolerancia de las plantas a condiciones medioambientales específicas o inducidas (MOHAMMED *et al.*, 1995); su posible aplicación para valorar la tolerancia a la salinidad ha sido discutida por SMILLIE y NOTT (1982), recientemente HAKAM *et al.* (2000) han utilizado esta técnica para valorar los daños causados por el frío en rosas.

Se pretende verificar la posible utilidad de este método no destructivo de medida de salinidad en las plantas de cítricos.

Material y métodos

La investigación se realizó en un invernadero climatizado con temperaturas máximas entre 28 y 32ºC y mínimas entre 10 y 12ºC, humedad relativa media del 62,9% y fotoperíodo de 16 horas, situado en el Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (C.I.D.A.) en La Alberca (Murcia).

Se utilizaron tres patrones de cítricos: *Citrus macrophylla* Wester (Mc), 'mandarino Cleopatra' (Cl) y 'citrange Carrizo' (Cz), y las combinaciones entre ellos: Cl/Mc, Cz/Mc, Mc/Cl, Cz/Cl, Mc/Cz y Cl/Cz. Se aplicaron tres niveles salinos: T_0 (0 mM de NaCl), T_1 (25 mM de NaCl) y T_2 (50 mM de NaCl). Las plantas de seis meses de edad se

colocaron en contenedores de plástico de tres litros de capacidad con sustrato de arena de cuarzo en julio de 1997. El riego se realizó cada dos días, aplicando al mismo tiempo la concentración salina, la cual estaba incluída en la solución nutritiva.

Cada nivel salino, a su vez, fue aplicado a cuatro repeticiones dentro de una parcela elemental de dos plantas. Las mediciones de fluorescencia fueron realizadas en abril de 1998, al finalizar el ensayo de salinización, tomando 8 hojas por combinación.

Las medidas de fluorescencia de clorofila, fueron efectuadas en las hojas de las plantas con un monitor de inducción de fluorescencia 'FIM 1500' (Analytical Development Company Ltd.). Dicho aparato emite una radiación de luz roja para medidas *in vivo* a 650 nm, próxima a la máxima absorción de la clorofila a (665 nm extraída en acetona), registrándose posteriormente la fluorescencia emitida. Previamente, las plantas fueron sometidas a condiciones de oscuridad durante media hora con el objeto de desacoplar la transferencia de electrones del Fotosistema II, de esta manera una gran parte de la energía captada por la clorofila activa se emite en forma de fluorescencia. El mecanismo de emisión de fluorescencia, es debida fundamentalmente a la excitación de la clorofila del Fotosistema II (KRAUSE y WEIS, 1991; LITCHTENTHALER, 1992; GOVINDJEE, 1995).

Resultados y discusión

De los resultados obtenidos, cabe destacar que en el nivel T0, el patrón 'mandarino Cleopatra' sin injertar y las dos combinaciones de 'citrange Carrizo' y *C. macrophylla* injertados sobre 'mandarino Cleopatra' dieron los mayores valores absolutos de fluorescencia, aunque ninguno de los mismos llega al valor medio de 0,832 establecido para una gran variedad de especies. Igualmente, al nivel T1 de salinidad los mayores valores de fluorescencia correspondieron a las combinaciones de 'mandarino Cleopatra' injertado sobre 'citrange Carrizo', 'citrange Carrizo' sin injertar y 'mandarino Cleopatra' y 'citrange Carrizo' sobre '*Citrus macrophylla*'. En el nivel T2 los mayores valores de fluorescencia se obtuvieron en las combinaciones 'mandarino Cleopatra' injertado sobre 'citrange Carrizo', y 'mandarino Cleopatra' y 'citrange Carrizo' sobre *Citrus macrophylla*, repitiéndose las combinaciones con mayor porcentaje de fluorescencia emitida en los niveles T1 y T2, con excepción del patrón 'citrange Carrizo', que ya no muestra un valor elevado de fluorescencia en el nivel T2. En los 3 patrones sin injertar se observan diferencias significativas entre los niveles T0 y T2, lo cual indica una clara disminución en la emisión de fluorescencia de clorofila, es decir, que en dichas plantas, los patrones sin injertar demuestran estar bajo un marcado estrés salino, el cual disminuye la eficiencia fotoquímica máxima de las hojas, este resultado también se encuentra en las combinaciones *Citrus macrophylla* injertado sobre 'citrange Carrizo' y 'citrange Carrizo' injertado sobre 'mandarino Cleopatra'. Luego estas dos combinaciones y los tres patrones sin injertar son las plantas más afectadas por un estrés salino, más acentuado en el patrón *macrophylla* (con un 34% de reducción), estrés moderado en 'Carrizo' injertado sobre 'Cleopatra' (25%) y menos afectadas por el estrés la combinación *macrophylla*/ 'Carrizo' (18%) y los patrones sin injertar 'Cleopatra' (13%) y 'Carrizo' (13%).

En la figura 1 se muestran los valores de fluorescencia de la clorofila a en los distin-

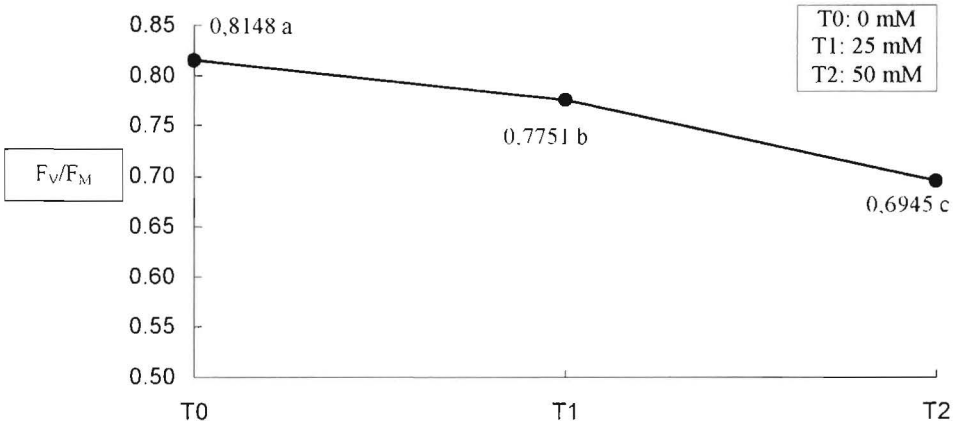


Figura 1. Medidas de la emisión de fluorescencia de clorofila a en todas las plantas (patrones sin injertar y combinaciones de injertos en los 3 niveles salinos). Test múltiple de Duncan, significativo al 95%.
Figure 1. Measurements of chlorophyll a fluorescence in all plants (rootstocks without scion and their combinations in the 3 saline levels). Duncan multiple test, significant to 95%.

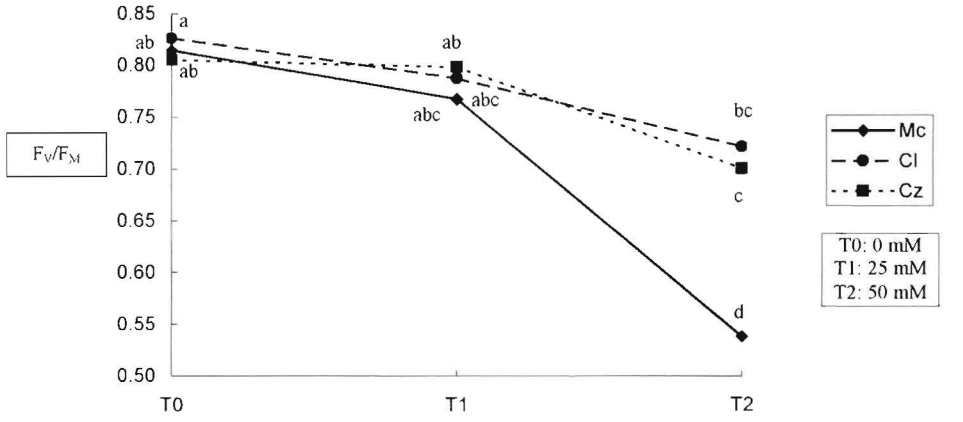


Figura 2. Medidas de la emisión de fluorescencia de clorofila a en los patrones de cítricos sin injertar en los tres niveles salinos. Test múltiple de Duncan, significativo al 95%.
Figure 2. Measurements of chlorophyll a fluorescence in citrus rootstocks without scion in the 3 saline levels. Duncan multiple test, significant to 95%.

tos niveles salinos y sin diferenciar las plantas utilizadas. A medida que aumenta la concentración salina aplicada se obtienen menores valores de fluorescencia, encontrándose diferencias significativas entre los tres niveles salinos.

Por otra parte, en la figura 2, se muestra la variación de las medidas de fluorescencia de clorofila a con la concentración de NaCl adicionada a la disolución nutritiva en los distintos patrones de cítricos sin injertar. Se observa una disminución de las medidas de la fluorescencia en todos los patrones sin injertar conforme aumenta el nivel de salinidad, siendo dicha disminución significativa en *C. macrophylla* al pasar del nivel T1 al T2. En los niveles salinos T0 y T1 no se aprecian diferencias, sin embargo en el nivel T2 los valores obtenidos por el *C. macrophylla* son bastante menores que los correspondientes a 'citrange Carrizo' y 'mandarino Cleopatra', encontrándose diferencias significativas entre la fluorescencia del patrón *C. macrophylla* y los otros dos.

Como se puede observar en la figura 3, en el nivel T2 de salinidad los injertos de 'mandarino Cleopatra' y de 'citrange Carrizo' sobre *C. macrophylla* dieron valores mayores de fluorescencia respecto al patrón *C. macrophylla* sin injertar, encontrándose diferencias significativas en el nivel T2.

En la figura 4 se encuentran diferencias significativas entre los valores del nivel T2 para la combinación 'citrange Carrizo' sobre 'mandarino Cleopatra' con respecto al patrón sin injertar y a la combinación *C. macrophylla* sobre 'mandarino Cleopatra', correspondiendo el valor más bajo al injerto de 'citrange Carrizo'. Encontramos la única diferencia significativa entre el nivel T0 y el T1 de salinización, la cual se da en la combinación 'citrange Carrizo' injertado sobre 'mandarino Cleopatra'.

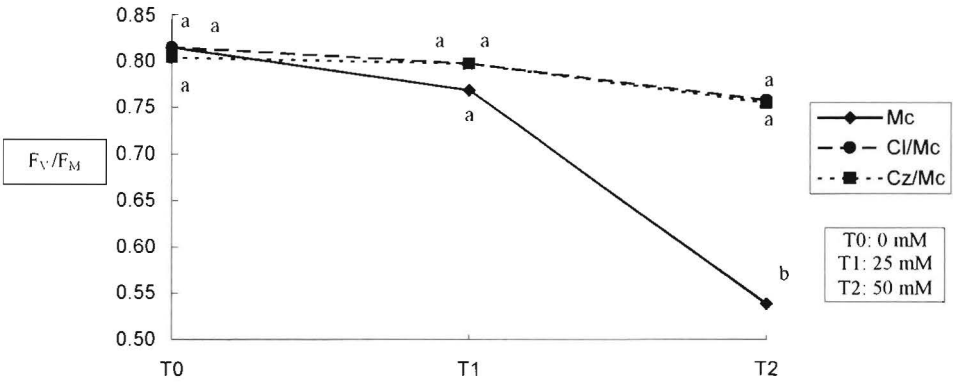


Figura 3. Medidas de la emisión de fluorescencia de clorofila a en el patrón *C. macrophylla* sin injertar e injertado con 'mandarino Cleopatra' y 'citrange Carrizo' en los tres niveles salinos. Test múltiple de Duncan, significativo al 95%.

Figure 3. Measurements of chlorophyll a fluorescence in C. macrophylla *rootstock without scion and their combinations with 'Cleopatra mandarin' and ' Carrizo citrange' in the 3 saline levels. Duncan multiple test, significant to 95%.*

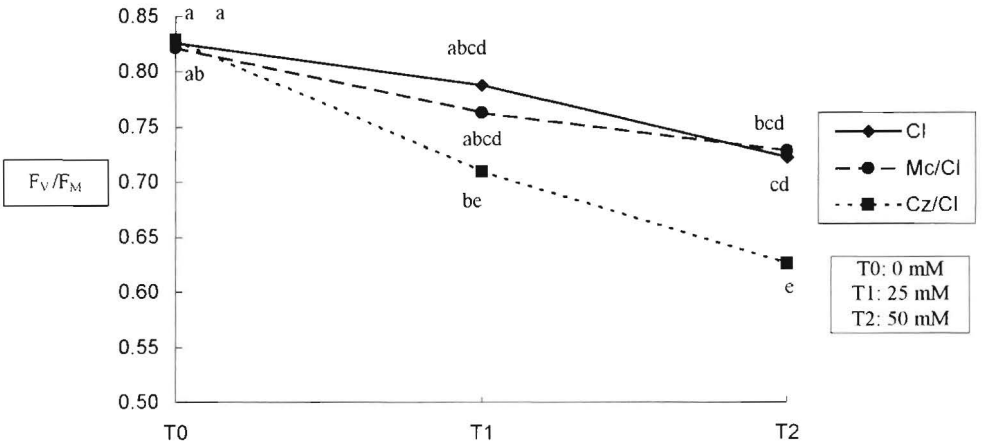


Figura 4. Medidas de la emisión de fluorescencia de clorofila a en el patrón 'mandarino Cleopatra' sin injertar e injertado con *C. macrophylla* y 'citrange Carrizo' en los tres niveles salinos. Test múltiple de Duncan, significativo al 95%.

Figure 4. Measurements of chlorophyll a fluorescence in 'Cleopatra mandarin' rootstock without scion and their combinations with C. macrophylla *and 'Carrizo citrange' in the 3 saline levels. Duncan multiple test, significant to 95%.*

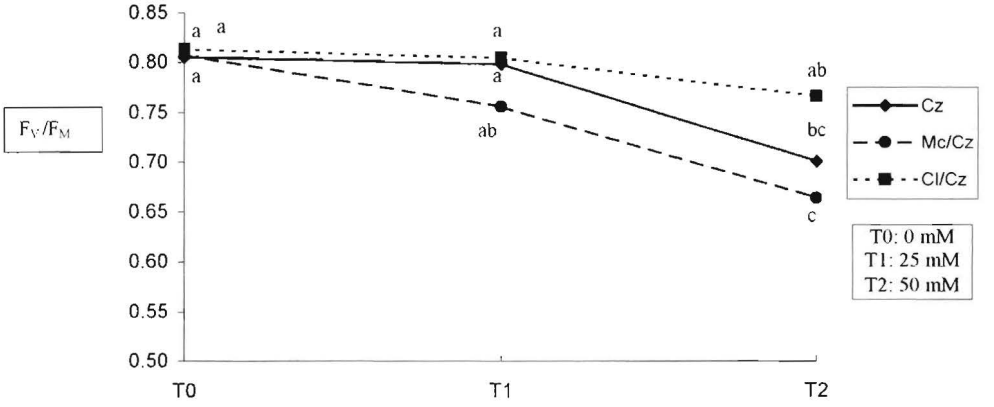


Figura 5. Medidas de la emisión de fluorescencia de clorofila a en el patrón 'citrange Carrizo' sin injertar e injertado con *C. macrophylla* y 'mandarino Cleopatra' en los tres niveles salinos. Test Múltiple de Duncan significativo al 95%.

Figure 5. Measurements of chlorophyll a fluorescence in 'Carrizo citrange' rootstock without scion and their combinations with C. macrophylla *and 'Cleopatra mandarin' in the 3 saline levels. Duncan multiple test, significant to 95%.*

En la figura 5 se observa que hay diferencias significativas entre la combinación de 'mandarino Cleopatra' injertado sobre 'citrange Carrizo' y *C. macrophylla* injertado también sobre 'citrange Carrizo' en el nivel T2 de salinidad, mostrando el valor más bajo esta última combinación. No se encuentran diferencias significativas en este nivel, entre el patrón 'citrange Carrizo' sin injertar y las dos combinaciones indicadas anteriormente.

Diversos autores han estudiado la tolerancia a la salinidad de estos patrones y obtienen resultados parecidos aunque no iguales, ya que en nuestro ensayo el *C. macrophylla* es el patrón que dio menores valores de fluorescencia. Así, CARO *et al.* (1973) obtienen una mayor tolerancia de 'mandarino Cleopatra' seguido de *C. macrophylla*, siendo el menos tolerante el 'citrange Troyer', en base al porcentaje de germinación obtenido cuando las semillas de estos patrones fueron sumergidas en distintas soluciones salinas. CARO *et al.* (1977) también obtuvieron los mismos resultados atendiendo al parámetro de la longitud del tallo en plantas regadas con soluciones salinas. GUILLÉN *et al.* (1978) basándose en la composición foliar de plántulas sometidas a estrés salino obtuvo igualmente una mayor tolerancia del 'mandarino Cleopatra' frente al 'citrange Troyer' y *C. macrophylla* y CERDÁ *et al.* (1990) encontraron un menor porcentaje de reducción de cosecha en el 'mandarino Cleopatra' con relación a *C. macrophylla* como consecuencia del estrés salino a que fueron sometidas las plantas. BAÑULS y PRIMO (1995) encontraron marcadas diferencias entre 'citrange Troyer' y 'mandarino Cleopatra'. Se ha de tener en cuenta que en los trabajos mencionados anteriormente se ha utilizado el patrón 'citrange Troyer' y por el contrario no se han realizado ensayos con el patrón 'citrange Carrizo', aunque ambos tienen una tolerancia a la salinidad baja (PRALORAN, 1977; POMARES, 1985) por lo que se puede considerar que se habrían obtenido resultados similares de haber sido ensayado el patrón 'citrange Carrizo'.

GARCÍA-LEGAZ (1991) afirma que en las diferencias de comportamiento de las distintas combinaciones patrón/injerto frente a la salinidad, tiene más importancia el portainjerto que la variedad injertada, aunque en los valores de fluorescencia que hay en un mismo nivel salino entre el patrón sin injertar y las distintas combinaciones injertadas sobre él se encuentran diferencias significativas para el mayor nivel de salinidad (T2) en *C. macrophylla* y 'mandarino Cleopatra'; no encontrándose diferencias significativas en los otros dos niveles.

Conclusiones

La fluorescencia de clorofila a resulta ser una técnica de interés como indicadora del estrés salino, ya que es un método no destructivo y su manejo es sencillo, aunque poco resolutiva ya que sólo puede apreciar diferencias cuando las plantas son fertirrigadas con soluciones salinas de elevada concentración.

Los valores de fluorescencia de la combinación 'mandarino Cleopatra' injertado sobre 'citrange Carrizo' son los mayores en las concentraciones salinas utilizadas (T1 y T2).

Las combinaciones de 'macrophylla' injertado sobre 'Carrizo' y 'Carrizo' injertado sobre 'Cleopatra' y los tres patrones sin injertar son las plantas más afectadas por estrés salino, las medidas de fluorescencia del patrón *C. macrophylla* dan valores sensiblemente diferentes con relación al resto de combinaciones injertadas sobre él, sufriendo la mayor disminución de las medidas de fluorescencia.

Bibliografía

BAÑULS J., PRIMO E., 1995, Effects of salinity on some Citrus scion-rootstock combinations. Annals of Botany 76, 97-102.

BJÖRKMAN O., DEMMING, B., 1987, Photon yield of O2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. Planta 170, 489-504.

BUTLER W.L., KITAJIMA M., 1975, A tripartite model for chloroplast fluorescence. International Congress on Photosynthesis, Elsevier, Amsterdam, pp. 13-24.

CARO M., CERDÁ A., FERNÁNDEZ F.G., GUILLÉN M.G., 1973, Tolerancia a la salinidad de portainjertos cítricos durante la germinación. I Congreso Mundial de Citricultura. Murcia-Valencia, Tomo I, pp. 313-316.

CARO M., FERNÁNDEZ F.G., CERDÁ A., GUILLÉN, M.G., 1977, Efectos del cloruro sódico en el agua de riego sobre el desarrollo de portainjertos cítricos. A. T. A. 17(4), 501-508.

CERDA A., NIEVES M., GUILLÉN M.G., 1990, Salt tolerance of lemon trees as affected by rootstock, Irrig. Sci. 11, 245-249.

DEMMING-ADAMS B., ADAMS W., 1992, Photoprotection and other responses of plants to hight light stress. Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol. 43, 599-626.

GARCÍA-LLEGAZ M.F., 1991, Influencia de la combinación patrón-injerto en el comportamiento del limonero frente a la salinidad, Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.

GUILLÉN M.G., CARO M., FERNÁNDEZ F.G., CERDÁ A., 1978, Foliar composition of Citrus seedlings irrigated with saline waters. Commun. in Soil Science and Plant Analysis. 9(7), 595-606.

GOVINDJEE, 1995, Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. Aust. J. Plant Physiol. 22, 131-160.

HAKAM N., KHANIZADEH S., DEELL J.R., RICHER C., 2000, Assesing Chilling Tolerance in Roses using Chlorophyll Fluorescence, Hort Science 35(2), 184-186.

KAUTSKY H., HIRSCH A., 1931, Neue Versuche zur Koklensäureassimilation, Natrwissenchaften 19, 964.

KRAUSE G.H., WEIS E., 1991, Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annu. Rev. Plant Physiol, Plant Mol. Biol. 42, 313-349.

LICHTENTHALER H.K., 1992, The Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics, Photosynthetica 27(1-2), 45-55.

MOHAMMED G.H., BINDER W.D., GILLIES S.L., 1995, Chlorophyll fluorescence a review of its practical forestry applications and instrumentation. Scand. J. For. Res. 10, 383-410.

PRALORAN J.C., 1977, Los agrios. Ed. Blume. 520 pp.

POMARES F., 1985, La salinidad del suelo en los cítricos. Levante Agrícola 24, 123-134.

SMILLIE R.M., NOTT R., 1982, Salt tolerance in crop plants monitored by chlorophyll fluorescence *in vivo*. Plant Physiol. 70, 1049-1054.

(Aceptado para publicación el 10 de enero de 2001)