



Sociedad
Española
de **Ciencias
Hortícolas**

86

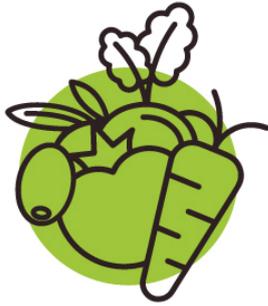
**OCTUBRE
2021**

ACTAS DE HORTICULTURA

**Comunicaciones Técnicas
Sociedad Española de
Ciencias Hortícolas**

**XVI Congreso Nacional de
Ciencias Hortícolas**

**Córdoba
17-21 de octubre de 2021**



XVI Córdoba 2021
Congreso Nacional
Ciencias Hortícolas

ACTAS DE HORTICULTURA Nº 86

Comunicaciones Técnicas Sociedad Española de Ciencias Hortícolas

XVI Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas,

Actas del XVI Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas celebrado en octubre del año 2021 en Córdoba.

Sociedad Española de Ciencias Hortícolas

Editor: Lorenzo León Moreno

ISBN: 978-84-09-38188-3

Resistencia a salinidad en mutantes de *Citrus macrophylla*

Pérez-Jiménez, M., Córdoba, F., Celdrán-Sánchez, V., García-Almodóvar, R.C. y Pérez-Tornero, O.

Equipo de Mejora Genética de Cítricos, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, C/Mayor s/n, 30150-La Alberca (Murcia), Spain.

Autor para correspondencia: mrgperezjimenez@gmail.com

Palabras clave: estrés salino, rayos gamma, mejora genética, mutagénesis.

Resumen

Los cítricos son plantas sensibles a salinidad que crecen en zonas áridas o semiáridas tendentes a la acumulación de sales. Esto ha hecho que muchos de los esfuerzos dedicados a la mejora de patrones de cítricos, vayan enfocados al desarrollo de genotipos resistentes a altas concentraciones de sal en el medio. La mutagénesis inducida ha demostrado ser una buena herramienta en este sentido, ya que es capaz de cambiar una característica discreta sin alterar el fondo genético de la planta. En este estudio se evaluó la resistencia a salinidad de cuatro mutantes (MM3B, MM4A, MM4B, MMN1) obtenidos previamente por radiación gamma de explantos cultivados *in vitro* de *Citrus macrophylla* y seleccionados previamente en medio salino. Para ello, se tomaron plantas en maceta de cada uno de estos genotipos, usando *Citrus macrophylla* como control, se regaron con una solución que contenía NaCl a una concentración de 100 mM durante 8 semanas, y se tomaron datos relativos al crecimiento de la planta y el daño en hoja. También, se cuantificó la cantidad de Na, Cl⁻ y NO₃⁻ en hoja para conocer los niveles de absorción de iones y si se había producido alguna alteración en su dinámica. Todos los mutantes mostraron una mayor resistencia a salinidad en comparación con *Citrus macrophylla*. Así, las plantas de *Citrus macrophylla* sufrieron daño en un mayor porcentaje de sus hojas y tuvieron un menor crecimiento que los mutantes. Además, se detectó un menor incremento de iones tóxicos en todos los mutantes. Por un lado, todos los mutantes presentaron un menor incremento de Cl⁻, tras la etapa en salinidad, que *Citrus macrophylla*. En cuanto al Na, fueron los mutantes MM4B y MMN1 los que presentaron menor acumulación que los demás genotipos. Además, las plantas que presentaron un menor incremento de Cl⁻ en hoja (MM3B y MM4A), también fueron capaces de amortiguar la caída en la absorción de NO₃⁻, lo que minimizaría el impacto del medio salino en la planta.

INTRODUCCIÓN

El proceso de desertificación unido al uso de aguas de mala calidad, produce una acumulación de sales en el suelo que supone un factor de estrés para las plantas cultivadas que viene asociado a pérdidas en la productividad y daño en los cultivos. Dentro de los cultivos más dañados por la salinidad se encuentran los individuos pertenecientes al género *Citrus*, un género cultivado mayormente en regiones áridas y semiáridas (FAO, 2017) y que se ha descrito como muy sensible a la presencia de sales (Mass et al., 1993).

La salinidad produce estrés osmótico y toxicidad debida a la presencia excesiva de los iones que componen la sal. Por un lado, el aumento de la presión osmótica dificulta el proceso de absorción de agua por las raíces, y por otro la toxicidad produce disfunciones importantes en la planta, lo que se traduce en daño en hoja, ralentización o paralización del

crecimiento y descenso de la productividad (Munns and Tester, 2008).

El creciente aumento de la desertificación ha aumentado el interés por portainjertos y variedades que sean capaces de resistir estas condiciones. Así, varios autores han llevado a cabo estudios en este sentido (Gomez-Cadenas et al., 2003; Navarro et al., 2014). Se sabe que la primera regulación del transporte de iones en cítricos tiene lugar en el sistema radicular, que haría las funciones de filtro para el resto de la planta. De ahí la importancia de la elección de un buen portainjerto. De entre todos los estudiados, se ha demostrado que *Citrus macrophylla* es uno de los más tolerantes al estrés salino (Gómez-Cadenas et al., 2003), pero no lo suficiente para resistir las futuras condiciones impuestas por el cambio climático.

Los programas de mejora clásica de patrones de cítricos acarream un proceso largo en el que la probabilidad de obtener nuevos individuos con las características deseadas es bastante restringida. Por ello, han surgido algunas alternativas como las mutaciones inducidas por rayos gamma, donde es posible alterar algunos caracteres sin modificar el fondo genético de la planta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones experimentales

Se preseleccionaron 4 mutantes por su buen comportamiento en condiciones salinas (MM3B, MM4A, MM4B, MMN1) (Tallón et al., 2015). Para este ensayo, se prepararon 8 clones de cada uno de los genotipos y de *C. macrophylla*, que se usó como control. Las plantas, que fueron elegidas por criterios de homogeneidad, crecieron en maceta de 0,5 l y se mantuvieron en cámara climática a 25 °C, 60 % de HR y un fotoperiodo de 16 h de luz. A continuación, las plantas fueron sometidas a riego con 100 mM de NaCl durante 8 semanas.

Estado de la planta y crecimiento

Se tomaron datos de la altura de las plantas antes y después del tratamiento salino para averiguar el incremento de altura durante el experimento. Por otro lado, al acabar el experimento se anotó el número de total de hojas y las dañadas por genotipo.

Contenido iónico

Para conocer el contenido en Na, Cl⁻ y NO₃⁻ en hoja, se liofilizaron y se molieron hojas de cada uno de los genotipos empleados en este experimento. Para el análisis de Na, el material molido se calcinó a 550 °C, y se digirió posteriormente con HNO₃ 0,7 N. Para la determinación, se utilizó un espectómetro de plasma (ICP-OES) (Varian Vista-MPX, Varian Australia, Mulgrave, Vic., Australia).

Por otro lado, los aniones se analizaron tras disolver 0,4 g del material molido en 20 ml de agua desionizada. Para la determinación se utilizó un cromatógrafo (METROHM 861 Advanced Compact IC; METROHM 838 Advanced Sampler) con una columna METROHM Metrosep A Supp7 250/4.0 mm.

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a una prueba de homogeneidad de la varianza y distribución normal. La significancia se determinó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con una significancia de (P < 0.05) diferencias entre medias calculada mediante el test de Múltiples Rangos de Duncan, utilizando el programa informático Statgraphics

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la exposición a 100 mM de NaCl las plantas mostraron un evidente daño en hoja ocasionado por la sal (Tabla 1). El mayor porcentaje de hojas dañadas con respecto al total se encontró en *C. macrophylla* con casi un 35 % de hojas afectadas. El resto de mutantes presentaron porcentajes menores de hojas dañadas, destacando MM4B y MMN1 con un 1,71 y un 9,77 %. Tras el periodo de riego con sal, se observó que las plantas mutantes elongaron más que el control representado por *C. macrophylla*. Estos daños observados en *C. macrophylla*, ya fueron encontrados en estudios previos con niveles similares de sal (Navarro et al., 2014, Alvarez-Gerding et al., 2015), resultados que en este estudio han sido mejorados por los mutantes.

Los resultados obtenidos por el porcentaje de hojas dañadas y el de elongación indican que el proceso de mutagénesis al que fue sometido el material vegetal de *C. macrophylla* ha implementado un aumento en la resistencia a salinidad de la que ya que contaba *C. macrophylla*. Esta mejora de la resistencia mediante métodos de mutagénesis en frutales ya se demostró en experimentos publicados por Coto et al en 2014 en aguacate, donde encontraron embriones con morfología normal bajo condiciones de salinidad.

Aunque cuando exponemos material vegetal a una fuente de radiación no conocemos el número, ni el tipo de mutaciones que se están produciendo, dados los resultados (Fig. 1), si es posible inferir que los cambios producidos en los mutantes van referidos a una alteración en la acumulación o entrada de iones tóxicos derivados de la sal. Los datos concernientes el incremento en contenido de Cl⁻ en hoja fue significativamente menor en los mutantes que en plantas de *C. macrophylla* (Fig. 1). Los mutantes que menos aumentaron su contenido en Cl⁻ fueron MM3B y MM4A. Por otro lado, los mutantes MM4B y MMN1 obtuvieron un mayor incremento de Cl⁻ que los otros dos, aunque en menor medida que en *C. macrophylla*. En el caso del Na, los mutantes MM4B y MMN1 presentaron un menor incremento en Na que los otros dos mutantes y *C. macrophylla* (Fig. 1). De entre MM4B y MMN1, este último presentó un menor incremento que el primero. En global, los mutantes acumularon menos iones tóxicos que *C. macrophylla*.

Hasta ahora se había identificada la moderada resistencia de *C. macrophylla* a salinidad en una limitada capacidad para excluir iones Na (Conesa et al., 2011; Navarro et al., 2014). Sin embargo, los mutantes MM4B y MMN1 evaluados en este estudio acumularon menos Na porcentualmente que *C. macrophylla* por lo que podrían haber visto mejorado este mecanismo durante el proceso de mutagénesis. Igualmente, el incremento de Cl⁻ fue menor en los mutantes que en *C. macrophylla* también como resultado de la mutagénesis. Ambos mecanismos podrían haber hecho que los mutantes soportaran mejor el periodo de exposición a la sal produciendo menor daño en hoja y una mayor elongación de la planta en condiciones de salinidad.

Se sabe que la presencia excesiva de Cl⁻ hace que se reduzca la absorción de N a favor del Cl⁻, ya que las proteínas responsables de la absorción celular del NO₃⁻ no pueden discriminar entre NO₃⁻ y Cl⁻ haciendo que proporcionalmente baje la absorción de NO₃⁻ y aumente la de Cl⁻ (Geilfus, 2018). Esto puede verse en los datos relativos a la acumulación de NO₃⁻ en hoja, que cayó muchísimo más en *C. macrophylla* que en los mutantes, y menos en aquellos que acumularon menos Cl⁻ (Fig. 1). Así, MM3B y MM4A habrían desarrollado algún mecanismo con el cual bloquear la absorción excesiva de Cl⁻ permitiendo que un mayor contenido de NO₃⁻ entre en la raíz disminuyendo no solo la toxicidad por Cl⁻ sino también los que se deberían a las carencias de NO₃⁻.

Aunque los datos son preliminares, los resultados expuestos en este experimento son prometedores desde el punto de vista de la obtención de patrones con una mayor resistencia a salinidad. Sin embargo, estos genotipos aún no han sido probados como patrones, por lo que el resto de características deseables en un patrón aún no han sido estudiadas. En cualquier caso podrían suponer una gran incorporación como germoplasma en programas de mejora genética de patrones de cítricos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Referencias

- Alvarez-Gerding, X., Espinoza, C., Inostroza-Blancheteau, C. and Arce-Johnson, P. (2015). Molecular and physiological changes in response to salt stress in *Citrus macrophylla* W plants overexpressing Arabidopsis CBF3/DREB1A. *Plant Physiol. Biochem.* 92, 71-80.
- Conesa, A., Legua, P., Navarro, J.M., Pérez-Tornero, O., García-Lidón, A. and Porras I. (2011). Recovery of different citrus rootstock seedlings previously irrigated with saline waters. *J. Am. Pomol. Soc.* 65, 158–66.
- Coto, O., Rodríguez, N.N., Fuentes, J.L., Alvarez, A., Machado, M., Santiago, L., Zamora, V. and Ramos-Leal, M. (2014). Chapter 13 – Mutation-based breeding of avocado in Cuba: state of the art. In: N.B. Tomlekova, M.I. Kozgar and M.R. Wani (eds.) *Mutagenesis: exploring genetic diversity of crops*. Wageningen Academic Publishers.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. FAOSTAT Statistics Database. Available online at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Accessed July 31, 2019).
- Geilfus, C.M. (2018). Chloride: from Nutrient to Toxicant. *Plant Cell Physiol.* 59(5),877–886.
- Gomez-Cadenas, A., Iglesias, D.J., Arbona, V., Colmenero-Flores, J.M., Primo-Millo, E. and Talon, M. (2003). Physiological and molecular responses of Citrus to salinity. *Rec. Res. Dev. Plant Mol. Biol.* 1, 281–298.
- Mass, E. V. (1993). Salinity and Citriculture, *Tree Physiol.* 12, 195-216.
- Munns, R. and Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review Plant Biol.* 59, 651–681.
- Navarro, F.M., Pérez-Tornero, O. and Morte, A. (2014). Alleviation of salt stress in citrus seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi depends on the rootstock salt tolerance. *J. Plant Physiol.* 171, 76– 85.
- Tallón, C. I., Porras, I. and Pérez-Tornero, O. (2015). Radiosensitivity of seeds and nodal segments of citrus rootstocks irradiated in vitro with γ -rays from ^{137}Cs . *Proc. XIIth Intl. Citrus Congress. Acta Hort.* 1065.

Tabla 1. Porcentaje de hojas dañadas con respecto al total en condiciones de salinidad y porcentaje del incremento en la elongación del tallo en condiciones de salinidad con respecto a las condiciones previas sin sal en plantas de *Citrus macrophylla* y los mutantes MM3B, MM4A, MM4B y MMN1.

Genotipos	<i>C. macrophylla</i>	MM3B	MM4A	MM4B	MMN1
Hojas dañadas	34,83 a	23,72 b	16,76 bc	1,71 d	9,77 cd
Elongación	39,15 b	46,74 a	50,73 a	46,68 a	47,32 a

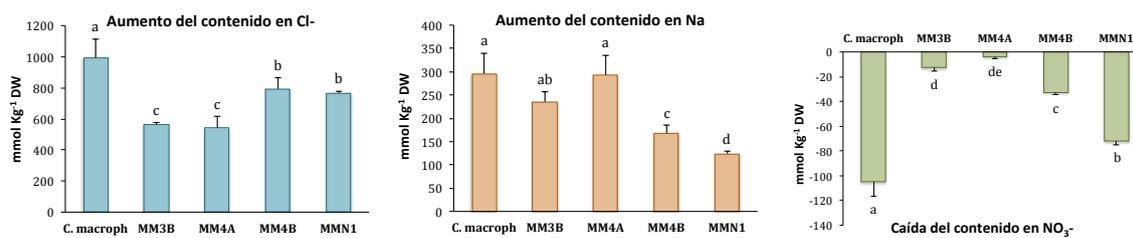


Fig. 1. Aumento del contenido en cloruro y sodio y caída en nitrato en hoja después de la exposición a salinidad de *Citrus macrophylla* y los mutantes MM3B, MM4A, MM4B y MMN1.