

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**  
**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**

**Master Universitario Oficial en Técnicas Avanzadas para la  
Investigación y Producción en Fruticultura**



**Caracterización de las respuestas  
bioquímicas a la inundación de tres  
cultivares de granado con diferente  
tolerancia a este estrés**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**AUTOR:**

Antonio Olmo Vega

**DIRECTORES**

Francisco García Sánchez

Juan José Martínez Nicolás

**Septiembre 2015**





## UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Se autoriza al alumno **D. Antonio Olmo Vega** a realizar el Trabajo Fin de Master titulado: "Caracterización de las respuestas bioquímicas a la inundación de tres cultivares de granado con diferente tolerancia a este estrés" bajo la dirección de **D. Francisco García Sánchez** y **D. Juan José Martínez Nicolás**, debiendo cumplir las directrices marcadas para la redacción del mismo, que están a su disposición en la Normativa para la realización de Trabajos Fin de Máster que se halla en la página Web.

Orihuela, a 11 de marzo de 2015

El Director del Máster Oficial en Técnicas Avanzadas para la Investigación  
y la Producción en Fruticultura

Fdo.: Juan José Martínez Nicolás

TRIBUNAL	
FECHA:	
PRESIDENTE:	FIRMA:
SECRETARIO:	FIRMA
VOCAL:	FIRMA

# MÁSTER OFICIAL EN TÉCNICAS AVANZADAS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PRODUCCIÓN EN FRUTICULTURA

## INFORME Y VISTO BUENO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO 2014/2015

Director/es del trabajo	Área/s de Conocimiento
Francisco García Sánchez Juan José Martínez Nicolás	Nutrición Vegetal Producción Vegetal

Declara/n que el Trabajo Fin de Máster

Título del Trabajo
Caracterización de las respuestas bioquímicas a la inundación de tres cultivares de granado con diferente tolerancia a este estrés
Alumno/a
Antonio Olmo Vega



cumple los requisitos necesarios para poder ser defendido ante el tribunal correspondiente y emite/n el siguiente:

Informe
El alumno, Antonio Olmo, ha trabajado de forma rigurosa, constante y satisfactoria durante la realización de este Trabajo Fin de Máster (TFM). Ha participado de forma plena en el experimento, tanto en la parte de campo, como en la de laboratorio, habiendo realizado las analíticas, tabulado y analizado los datos e interpretado los resultados, para finalmente redactar este trabajo fin de master. Por lo que entendemos que el trabajo realizado contribuye de forma muy positiva en su formación académica e investigadora. Así nuestra satisfacción con su trabajo, disposición, actitud y rendimiento es plena.

Valoración del trabajo del estudiante (de 0 a 10):

10

Orihuela, a 03 de Septiembre de 2015

 
Firma/s director/es trabajo

SR. D. JUAN JOSÉ MARTÍNEZ NICOLÁS, DIRECTOR DEL MÁSTER OFICIAL EN TÉCNICAS AVANZADAS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PRODUCCIÓN EN FRUTICULTURA

## REFERENCIAS TRABAJO FIN DE MASTER

### Identificaciones

**Autor:** Antonio Olmo Vega

**Título:** Caracterización de las respuestas bioquímicas a la inundación de tres cultivares de granado con diferente tolerancia a este estrés

**Director:** Francisco García Sánchez

**Codirector:** Juan José Martínez Nicolás

**Año:** 2015

**Titulación:** Master Universitario Oficial en Técnicas Avanzadas para la Investigación y Producción en Fruticultura

### Palabras clave

**Especie vegetal:** *Punica granatum* L.

**Varietades:** Mollar de Elche, Valenciana, Wonderful

**Localidad:** Santomera, Murcia

**Tipo de proyecto:** Experimental

**Keywords:** *Water stress, flooding, abscisic acid, oxidative stress, carbohydrates*

### Otros datos

**Nº de citas bibliográficas:** 79

**Nº de figuras:** 2

**Nº de gráficos:** 5

**Nº de tablas:** 3

**Nº de fotos:** 10

## **Resumen**

El granado (*Punica granatum* L.) es conocido por su gran resistencia a estreses abióticos como salinidad o condiciones de sequía. Sin embargo, su comportamiento bajo condiciones de inundación, muy comunes en la zona del Levante español debido sobre todo a la presencia de suelos pesados, todavía no ha sido estudiado en profundidad.

Con el objetivo de caracterizar las respuestas bioquímicas de tres cultivares de granado que presentan diferente tolerancia a la inundación se realizó un experimento en invernadero, con tres de las variedades más utilizadas en el sureste español: 'Mollar de Elche', 'Valenciana' y 'Wonderful'. Las plantas se sumergieron en contenedores de 20 litros de capacidad, quedando el nivel de agua a 3 cm por encima de la zona radicular durante 6 días. Se ha observado previamente que la tolerancia de estos tres cultivares es diferente, siendo 'Mollar de Elche' y 'Wonderful' más tolerantes que 'Valenciana'. Con el fin de profundizar más en su comportamiento, se tomaron muestras de material vegetal y se realizó el análisis bioquímico en el laboratorio de solutos orgánicos, estrés oxidativo y respuesta hormonal. La inundación aumentó la concentración de solutos orgánicos como carbohidratos o prolina en las hojas, principalmente en 'Valenciana', no mostrando diferencias significativas en compuestos de amonio cuaternario (QAC). Tampoco aumentó la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ni en 'Mollar de Elche' ni en 'Wonderful' mientras que 'Valenciana' sí que se vio afectada. De igual forma, 'Valenciana' fue la única en no mostrar un incremento de ABA en las hojas como consecuencia de la inundación. Este estudio coincide con lo observado en un ensayo fisiológico previo acerca de la baja tolerancia de estos tres cultivares a la asfixia radicular causada por la inundación.

## **Abstract**

*The pomegranate tree (*Punica granatum* L.) is widely known as extremely resistant to an abiotic stress such as drought or salinity conditions. However, its behavior under flooding stress and the effect of anaerobic root conditions have not yet been studied. The experiment was carried out with the three most used cultivars in the southeast of Spain: 'Mollar de Elche', 'Valenciana', and 'Wonderful'. Pomegranate cuttings were grown in a fertilized substrate under greenhouse conditions. After three*

*weeks, 6 plants of each cultivar had been submerged in pots with fresh water for six days. Biochemical parameters like organic solutes, oxidative stress and hormonal response were determined in leaf and root samples. Flooding increased organic solutes concentration in leaf tissues mainly in 'Valenciana' as proline or carbohydrates whilst QAC increase was no significant. However, 'Valenciana' hormonal response was the lower in comparison with 'Mollar de Elche' and 'Wonderful'. In addition 'Valenciana' was the only one that showed an increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> despite any cultivar had significant differences in MDA under flooding conditions. This study agreed with previous physiologic experiment which showed for the first time the low tolerance of these three cultivars due to hypoxic and anoxic conditions.*



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	1
1.1.1. Origen.....	1
1.1.2. Etimología y botánica.....	2
1.2. DATOS AGRONÓMICOS.....	3
1.2.1. Ecología.....	3
1.2.2. Material vegetal.....	4
1.2.3. Variedades.....	4
1.2. INUNDACIÓN.....	7
1.2.1. Efectos de la inundación sobre los suelos.....	7
1.2.2. Procesos fisiológicos alterados por la inundación.....	8
1.2.3. La inundación en la Vega Baja y Bajo Vinalopó.....	11
1.3. EL GRANADO EN INUNDACIÓN.....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	14
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	14
3.2. CONDICIONES DE CULTIVO.....	14
3.3. TRATAMIENTO INUNDACIÓN.....	16
3.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	18
3.4.1. Determinación de prolina.....	18
3.4.2. Determinación de compuestos de amonio cuaternario.....	19
3.4.3. Determinación de carbohidratos.....	19
3.4.4. Estrés oxidativo.....	21
3.4.5. Respuesta hormonal (ABA).....	22
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	22
<b>4. RESULTADOS</b> .....	24
4.1. CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO.....	24
4.2. CONCENTRACIÓN DE PROLINA Y COMPUESTOS DE AMONIO CUATERNARIO EN HOJAS Y RAÍZ.....	24
4.3. CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS.....	26
4.4. ESTRÉS OXIDATIVO.....	27
4.5. RESPUESTA HORMONAL (ABA).....	28
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	30
<b>6. CONCLUSIÓN</b> .....	35
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	36



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Concentración de O <sub>2</sub> .....	23
<b>Gráfico 2:</b> Concentración de prolina y QAC foliar. ....	24
<b>Gráfico 3:</b> Concentración de prolina radicular. ....	24
<b>Gráfico 4:</b> Estrés oxidativo: concentración de MDA y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	27
<b>Gráfico 5:</b> Respuesta hormonal: concentración de ABA en hoja y raíz.....	28

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Clasificación sistemática del granado. ....	3
<b>Tabla 2:</b> Concentración de carbohidratos en hoja. ....	26
<b>Tabla 3:</b> Concentración de carbohidratos en raíz. ....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Centros de origen y diversidad de las plantas cultivadas según Vavilov. ....	2
<b>Figura 2:</b> Gota fría a finales de agosto de 2013. ....	1111

## ÍNDICE DE FOTOS

<b>Foto 1:</b> Árbol adulto de granado ( <i>Punica granatum</i> L.) en plena producción.....	1
<b>Foto 2:</b> Variedad ‘Mollar de Elche’.....	5
<b>Foto 3:</b> Variedad ‘Valenciana’.....	6
<b>Foto 4:</b> Variedad ‘Wonderful’.....	7
<b>Foto 5:</b> Vista parcial del invernadero donde se realizó el ensayo.....	15
<b>Foto 6:</b> Plantas de granado tratamiento control (T0). ....	16
<b>Foto 7:</b> Planta de granado tratamiento inundación (T1). ....	17
<b>Foto 8:</b> Planta de granado tratamiento inundación (T1). ....	17
<b>Foto 9:</b> Oxímetro portátil Crison Oxi 330i Fuente: Net-Interlab, 2007.....	18
<b>Foto 10:</b> Día 6 de inundación. ‘Mollar de Elche’, ‘Valenciana’ y ‘Wonderful’.....	29

## 1. INTRODUCCIÓN



### 1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El granado (*Punica granatum* L.) es un árbol frutal caducifolio que puede alcanzar hasta 8 metros de altura en estado salvaje y cuyo fruto es la granada. Es un frutal muy interesante para zonas áridas y semiáridas ya que es capaz de adaptarse a distintas zonas, en las que otros, serían incapaces de dar una producción rentable (Melgarejo y Salazar, 2003).



**Foto 1: Árbol adulto de granado (*Punica granatum* L.) en plena producción.  
Fuente: Región de Murcia digital.**

#### 1.1.1. Origen

El granado es un frutal cuyo cultivo se conoce desde la antigüedad. Es uno de los frutales bíblicos, como la vid, el olivo o la palmera que también se cita en el Corán. Esta especie podría tener su origen en Persia, aunque fenicios y griegos lo cultivaban, tal y como se puede apreciar en sus escritos.

El científico ruso Vavilov sitúa su origen en el Centro de diversidad IV, Centro de Oriente Próximo, que incluye el interior de Asia Menor, la Transcaucasia, Irán y las tierras altas de Turkmenistán (Figura 1). A este centro también pertenecen otros frutales como la higuera, manzano, peral, membrillero, cerezo, almendro, avellano, castaño, entre otras especies vegetales (Sánchez-Monge, 1974).



**Figura 1: Centros de origen y diversidad de las plantas cultivadas según Vavilov.**  
Fuente: Sánchez-Monge (1974).

### 1.1.2. Etimología y botánica

El nombre del género, *Punica* deriva de los fenicios, quienes fueron unos difusores activos de su cultivo, en parte por razones de tipo religioso. El nombre de la especie *granatum* deriva del adjetivo del latín *granatus*, que significa “con granos”. Sin embargo, en el Latín clásico el nombre de la especie era *malum punicum* ó *malum granatum*, en donde *malum* es manzana. Esto ha influido en el nombre *pomegranate* (en inglés), que se le da en muchos idiomas (ej. alemán *granatapfel*, manzana con semillas). Incluso *pomegranate* tiene este mismo significado, *pomum* es el nombre en latín para manzana.

El granado pertenece a la familia *Punicaceae* que sólo posee el género *Punica* L. (Font Quer, 1959) De este género las dos especies más conocidas son: *Punica granatum* L., granado cultivado por sus frutos y *Punica nana* L., granado enano, de uso ornamental y frutos no comestibles. En ocasiones esta especie es considerada una variedad de *P. granatum*, denominándose como *P. granatum* var. *nana* L.

El granado cultivado, *Punica granatum* L., es una especie diploide cuyo número somático es  $2n = 16$  y su número haploide de cromosomas es  $n=8$  (Westwood, 1982) ó  $2n = 16$  ó  $18$  (Mars, 1998).

<b>CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA</b>	
División:	Fanerógamas
Clase:	Dicotiledóneas
Orden:	Myrtales
Familia:	Punicaceae
Género:	<i>Punica</i>
Especie:	<i>P. granatum</i>

**Tabla 1: Clasificación sistemática del granado.**

**Fuente: Tratado de Fruticultura para zonas áridas y semiáridas (Melgarejo y Salazar, 2003).**

## 1.2. DATOS AGRONÓMICOS

### 1.2.1. Ecología

Este frutal se adapta a todo tipo de suelos y climas, es tolerante a la sequía, a la salinidad, a la clorosis férrica y a la caliza activa. Es capaz de vegetar en las peores condiciones de cultivo del Sureste español y con frecuencia se cultiva junto a otros frutales como la higuera (*Ficus carica* L.) y la palmera datilera (*Phoenix dactylifera* L.), que también son muy resistentes a los factores indicados anteriormente (Melgarejo y Martínez, 1992; Melgarejo, 1993).

#### Clima

Los climas más convenientes para el granado son el tropical y subtropical, donde el periodo de más altas temperaturas coincide con la época de maduración de los frutos. Fuera de las regiones subtropicales, el granado se adapta bien en zonas donde la temperatura no llega a los  $-15^{\circ}\text{C}$ . Durante el reposo invernal, puede soportar temperaturas inferiores a  $-7^{\circ}\text{C}$  pero presenta una gran sensibilidad a heladas tardías durante el periodo vegetativo, prefiriendo un clima templado e incluso caluroso antes que los relativamente fríos (Sandoval, 2003).

#### Suelo

El granado no es exigente en suelo, sin embargo, da mejores resultados en suelos profundos, en zonas de depósito de sedimentos. El suelo ideal debe ser ligero, permeable, profundo y fresco y aunque no le afecte apenas la alcalinidad o acidez del suelo, los terrenos alcalinos le son más favorables.

En tierras de secano, la sequía en el momento de la floración puede provocar la caída de la flor y reducir la cosecha al mínimo. En las tierras de regadío, sus necesidades hídricas son muy reducidas y abusar de los riegos poco antes de entrar el fruto en envero, puede ser causa de su agrietamiento (Melgarejo y Salazar, 2003).

### 1.2.2. Material vegetal

La diversidad genotípica de la especie es muy grande, en el mundo han sido citadas más de 500 variedades de granada, lo que da una idea de la riqueza genética existente. Sin embargo, los estudios relacionados con el cultivo, estudios fisiológicos o de selección y caracterización del material vegetal son muy recientes. Hasta hace unos 30 años los ensayos científicos eran realmente escasos, aunque en este último periodo se está produciendo un extraordinario interés científico debido a sus propiedades para afrontar muchos problemas que afectan a la salud humana.

### 1.2.3. Variedades

En España se distinguen tradicionalmente dos grandes grupos varietales de interés comercial, el grupo Mollar y el grupo Valencianas. El grupo Mollar es el más importante, constituido por un gran número de individuos, que se caracterizan por su gran calidad, buena productividad y época de recolección entre el 25 de septiembre y el 15 de noviembre. El grupo Valencianas, constituido también por un gran número de individuos, se caracteriza por presentar menor calidad que el grupo Mollar y por ser de recolección temprana, los árboles son significativamente más pequeños y la recolección se realiza entre el 5 de agosto y el 20 de septiembre (Melgarejo, 2010).

La Comunidad Valenciana, junto a la Región de Murcia, son las principales zonas productoras de granada a nivel nacional y más concretamente en los municipios alicantinos de Elche, Crevillente, Albuera y San Isidro. La variedad más cultivada es la variedad población denominada ‘Mollar de Elche’, seguida de la variedad población ‘Valenciana’ (Martínez y Hernández, 2010).

Los principales países productores de granada y competidores de España (China, EEUU, Israel, Turquía, Túnez, Marruecos, Irán e India entre otros), se caracterizan por producir variedades de sabor ácido. La variedad de granada mundialmente más conocida y cultivada es la variedad ‘Wonderful’, por lo que, además del material



autóctono cultivado en España, en los últimos años se han introducido nuevos cultivares principalmente de ‘Wonderful’ (Melgarejo, 2010).

Las variedades de granado en España se catalogan de acuerdo a la clasificación propuesta por Melgarejo (1993) en función de su acidez valorable expresado en % de ácido cítrico: variedades dulces (0,15-0,48%), agridulces (0,54-0,91%) y agrias (2,34-2,69%).

### ‘Mollar de Elche’

La variedad población denominada ‘Mollar de Elche’ (Foto 2), es originaria de Elche, Alicante. Es un árbol muy vigoroso de rápido desarrollo, forma redondeada y frutos de calibres medios-grandes. Madura entre octubre y noviembre y la recolección se realiza desde finales de septiembre. El color externo del fruto es rojo-amarillento y el color interior es rojo claro, posee semillas dulces y de piñón blando.



**Foto 2: Variedad ‘Mollar de Elche’.**  
**Fuente: Cambayas y elaboración propia.**

### ‘Valenciana’

La variedad población denominada ‘Valenciana’, es una variedad temprana, de porte vigoroso, aunque de menor vigor que el grupo varietal Mollar. Posee un fruto de calibre medio, forma redondeada, semillas dulces, piñón inapreciable. Color interno rosa claro y color externo rosa intenso (Foto 3).



**Foto 3: Variedad ‘Valenciana’.**  
**Fuente: Cambayas y elaboración propia.**

### ‘Wonderful’

‘Wonderful’ es la variedad más difundida en el mundo, existiendo actualmente mucha variabilidad genética, por lo que existen algunas diferencias en cuanto a su caracterización. No obstante, todas las accesiones suelen reunir características comunes como el tamaño mediano del árbol, frutos de calibre medio a grande, corona alargada, color externo rojo, semillas de color rojo intenso, pequeñas, piñón semiduro y de sabor ácido (Foto 4).



**Foto 4: Variedad 'Wonderful'.  
Fuente: Cambayas y elaboración propia.**

## 1.2. INUNDACIÓN

La inundación es un problema importante en muchas áreas del mundo y existen numerosas especies sensibles a estas condiciones. Dudal (1976), estimó que un 12% de los suelos del mundo son susceptibles de sufrir inundaciones eventuales. Considerables y persistentes inundaciones, se dan en zonas agrícolas de secano anegando cultivos (Jackson, 2006). La inundación de los suelos no solo sucede en áreas de lluvias intensas sino también en regiones áridas como resultado del desbordamiento de los ríos, las tormentas, el exceso de riego, drenajes inadecuados y depósitos de aguas por diques (Kozłowski y Pallardy, 1997). En algunos suelos, la inundación puede darse debido a una disminución de la infiltración al perder los suelos su capacidad de drenaje. Por ejemplo, la alteración de las condiciones físicas del suelo al aumentar la concentración de  $\text{Na}^+$  puede causar la dispersión de los coloides y producir el bloqueo de los poros del suelo, lo que puede provocar un encharcamiento de los mismos (Ghassemi *et al.*, 1995).

### 1.2.1. Efectos de la inundación sobre los suelos

La inundación del suelo pone en acción una diversidad de procesos físicos, químicos y biológicos que alteran las propiedades del suelo e impiden un buen crecimiento de las plantas. Los cambios en la estructura del suelo posteriores a la



inundación incluyen la descomposición de agregados, dispersión de las arcillas, y destrucción de los agentes cementantes (Ponnamperuma, 1984). Dentro de los principales cambios químicos se incluyen la disminución de la concentración de O<sub>2</sub> (hipoxia) o la desaparición total de éste (anoxia), acumulación de CO<sub>2</sub>, incremento de las sustancias minerales en disolución, reducción del Fe y Mn, descomposición anaeróbica de la materia orgánica y formación de compuesto tóxicos (Janiesch, 1991).

La inundación elimina el O<sub>2</sub> del suelo debido a que el agua ocupa los poros previamente llenos de aire. Los organismos aeróbicos, típicos de suelos bien drenados son reemplazados en los suelos inundados por los anaerobios, en un principio bacterias, las cuales producen desnitrificación y reducción de Mn, Fe y S.

Muchos compuestos potencialmente tóxicos son acumulados en los suelos inundados. Metano, etano, propileno, ácidos insaturados, aldehídos, cetonas, diaminas, mercaptanos, y compuesto heterocíclicos son productos del metabolismo anaeróbico de los microorganismos. El etileno es producido por plantas inundadas (Kozlowski y Pallardy, 1984) y por el metabolismo microbiano (Lynch, 1975; Lindberg *et al.*, 1979).

#### 1.2.2. Procesos fisiológicos alterados por la inundación

La inundación durante la fase de crecimiento vegetativo afecta adversamente a todos los estados de desarrollo de las plantas intolerantes a la inundación, mientras que la inundación durante la estación de letargo, generalmente tiene un pequeño efecto a corto plazo (Kozlowski, 1982; 1984; Kozlowski y Pallardy, 1997). Las respuestas de la planta a la inundación durante la estación de crecimiento incluyen inhibición en la germinación de semillas y del crecimiento vegetativo y reproductivo, cambios en la anatomía de la planta, promoción de senescencia temprana y mortalidad. La respuesta específica de las plantas varía con gran cantidad de factores incluyendo las especies vegetales y genotipos, edad de las plantas, propiedades del agua de inundación, y momento y duración de la inundación (Kozlowski, 1984). La inhibición del crecimiento son preludios típicos a la mortalidad de la planta (Shul'ga y Maksimov, 1991). Estos efectos que sufren las plantas cuando están bajo inundación pueden ser debidos a múltiples disfunciones fisiológicas. Esto incluye alteraciones a nivel de carbohidratos, procesos de intercambio gaseoso, nutrición mineral, relaciones hídricas, cambios en la respiración y síntesis de hormonas (Kennedy *et al.*, 1991).

La inundación de los suelos, generalmente, es seguida por una relativamente rápida disminución en la tasa de fotosíntesis en muchas especies de plantas tanto gimnospermas como angiospermas. Diversos estudios han mostrado que la fotosíntesis puede ser reducida por la inundación desde unas pocas horas después de que se produzca la inundación hasta unos días después (Beckman *et al.*, 1992). Por ejemplo, la tasa de fotosíntesis de las plántulas de *Pseudotsuga menziesii* se redujo considerablemente 5 días después de someter las plantas a inundación (Zaerr, 1983), mientras que, la fotosíntesis de 4 portainjertos cítricos fue afectada significativamente en tan solo 24 horas (Phung y Knipling, 1976). En muchas plantas la reducción tan rápida de la fotosíntesis está correlacionada con el cierre de estomas que disminuye la concentración de CO<sub>2</sub> en las cavidades subestomáticas (Pezeshki *et al.*, 1996).

Ahora bien, este cierre de estomas puede ser debido a una pérdida de turgor celular como consecuencia de la deshidratación de la hoja, o a un cierre activo de los estomas como consecuencia de una respuesta hormonal. Algunos investigadores han sugerido que el cierre estomático de las plantas inundadas está asociado con una disminución de la conductividad hidráulica de la raíz (Davies y Flore 1986a) que limita el transporte del agua hacia la parte aérea del árbol. Así la conductividad hidráulica de las plantas *Vaccinium corymbosum* disminuyó unas horas después de que el suelo fuera inundado y esto fue debido como consecuencia de un cierre estomático (Davies y Flore 1986a, 1986b). Syvertsen *et al.*, (1983) también observaron una disminución de la conductividad hidráulica de la raíz en plantas de cítricos junto con una disminución de la conductancia estomática. Sin embargo, otros estudios han mostrado que el cierre estomático inducido por la inundación no está asociado con una reducción en el turgor de la hoja o en el potencial hídrico de la hoja. Así, aunque la inundación del suelo indujo el cierre estomático en las plántulas de *Melaleuca quinquenervia* este no creó un déficit hídrico en la parte aérea (Sena-Gomes y Kozlowski, 1980).

El cierre estomático de las plantas inundadas, puede resultar una señal hormonal transmitida desde la raíz a la parte aérea. El ABA y las citoquininas han sido implicadas en el cierre estomático de las plantas que están creciendo en suelos encharcados (Zhang y Davies, 1990; Else *et al.*, 1996). La inundación del suelo fue rápidamente seguida de una acumulación de ABA en las hojas (Shaybany y Martin, 1977) y esta acumulación de ABA fue correlacionada con el cierre estomático (Zhang *et al.*, 1987).

La reducción en la tasa de fotosíntesis de muchas plantas inundadas está altamente correlacionada con el cierre estomático. Sin embargo, otras veces nos encontramos que la fotosíntesis disminuye mucho más que la conductancia estomática lo que indica que además de factores estomáticos aparecen factores no estomáticos. La inhibición no estomática podría involucrar cambios en las enzimas de carboxilación y pérdida de clorofilas. Por ejemplo, los periodos cortos de inundación disminuyeron la fotosíntesis de *Vaccinium* spp. por reducción de la conductancia estomática (Crane y Davies, 1989), sin embargo, inundaciones a largo plazo disminuyeron no solo la conductancia estomática sino también redujeron la eficacia de la carboxilación y el rendimiento del cuántico de la luz (Davies y Flore, 1986b). Similarmente en *Prunus cerasus*, la disminución de la fotosíntesis de las plantas inundadas fue atribuida a la disminución estomática, pero cuando la inundación continuó, las limitaciones no estomáticas dominaron progresivamente (Beckman *et al.*, 1992). En condiciones de hipoxia de la rizosfera asociada con la inundación, la capacidad fotosintética y la conductancia estomática de las plántulas de *Taxodium distichum* se vieron reducidas. Una disminución en la actividad ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa estaba entre uno de los motivos que contribuyó a la pérdida de la capacidad fotosintética (Pezeshki, 1994).

La inundación del suelo afecta no sólo a la síntesis de carbohidratos sino también a su transporte hacia los sumideros meristemáticos y a su utilización en el metabolismo y la producción de tejidos nuevos. Además de que en condiciones de inundación el ciclo de Krebs queda prácticamente inhibido. Se sabe que algunos componentes de la ruta glucolítica pueden ser estimulados incluyendo las actividades enzimáticas como piruvato descarboxilasa, lactato deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa (Kennedy *et al.*, 1991).

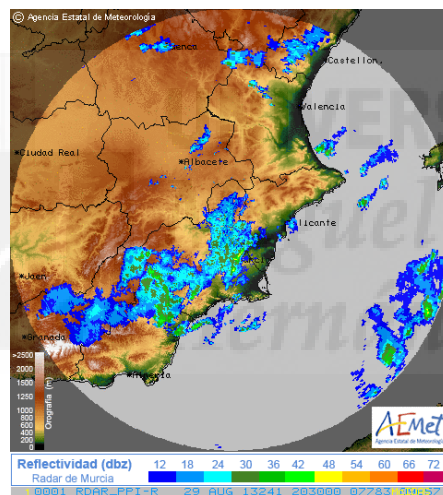
La inundación, frecuentemente, causa un cambio en la distribución de compuestos fotosintéticos en las plantas. Por ejemplo, la inundación suprimió la altura y el crecimiento del tallo en las plántulas de *Acer platanoides* pero incrementó el crecimiento de los tejidos de la corteza, indicando un cambio en la distribución de carbohidratos (Yamamoto y Kozlowski, 1987). En algunas especies, la inundación altera el uso proporcional de carbohidratos para la producción de células del xilema y para el engrosamiento de sus paredes. En las plántulas *Fraxinus myshurica*, la

inundación incrementó el número de fibras libriformes pero inhibió el engrosamiento de sus paredes (Yamamoto *et al.*, 1995).

### 1.2.3. La inundación en la Vega Baja y Bajo Vinalopó

En el sureste de España este estrés tiene relativamente una gran importancia debido tanto al fenómeno conocido como “gota fría”, como a los tradicionales riegos por inundación que se dan en la zona.

En los meses de otoño y verano, es cuando aparece este fenómeno donde las intensas lluvias llegan a inundar durante días o semanas los suelos agrícolas, sobre todo aquellos caracterizados por una textura arcillosa o aquellos que debido a la salinidad, poseen altas concentraciones de sodio y por tanto, baja permeabilidad y tasa de infiltración.



**Figura 2: Gota fría a finales de agosto de 2013.**  
Fuente: AEMET - El tiempo de la huerta de Murcia (2013).

Estas comarcas se caracterizan por largos periodos de sequía, con lluvias torrenciales concentradas provocando graves daños tanto en ciudades como en explotaciones agrícolas. En la figura 2, se observa una gran tormenta ocurrida el 29 de agosto de 2013 en el sureste español, con precipitaciones de 35 mm/h (AEMET, 2013). El 30 de septiembre de 1997 cayeron en Alicante 35 mm en apenas 15 minutos, registrándose 270 mm en un día (Olcina y Rico, 2000), causando pérdidas millonarias en la provincia de Alicante.

También existen problemas de asfixia radicular en suelos regados por inundación y que carecen de un adecuado sistema de drenaje. Esta inundación

continuada, provoca una disminución del oxígeno como resultado de las diferentes reacciones químicas y bioquímicas que se dan en el suelo. A los pocos días de inundación, el O<sub>2</sub> prácticamente ha desaparecido, afectando negativamente al desarrollo del cultivo con importantes daños en especies poco tolerantes a la asfixia radicular e incluso la muerte de árboles, con las consiguientes pérdidas económicas.

### 1.3. EL GRANADO EN INUNDACIÓN

Muy poco se ha escrito acerca de la tolerancia del granado en condiciones de asfixia radicular debido a la inundación. Únicamente Olmo-Vega *et al.*, (2015) describieron las respuestas morfológicas y fisiológicas de las mismas tres variedades estudiadas en este trabajo.

En él concluyeron que el granado (*Punica granatum* L.) es un frutal muy sensible a la inundación. No obstante esta tolerancia depende del cultivar siendo ‘Mollar de Elche’ la variedad más tolerante mientras ‘Valenciana’ fue la más sensible. Las plantas de las tres variedades sufrieron déficit hídrico en las hojas bajo condiciones de inundación, debido a la pérdida de turgor celular siendo esta más acusada en ‘Valenciana’. Las plantas de granado, como la mayoría de las plantas que sufren algún tipo de estrés osmótico, incrementaron la concentración de solutos intracelulares como respuesta a la inundación, pero esto fue insuficiente para que se favoreciera el ajuste osmótico. La inundación disminuyó la conductancia estomática y la asimilación neta de CO<sub>2</sub> de las plantas de las tres variedades, debido posiblemente a factores no estomáticos. La nutrición mineral de las plantas de granado se vio alterada por la inundación, pudiendo causar problemas de deficiencia de K en las tres variedades y de toxicidad específica de Fe en ‘Valenciana’.

## 2. OBJETIVOS

El granado (*Punica granatum* L.) es conocido por su gran resistencia a estreses abióticos como salinidad, caliza activa o condiciones de sequía. Sin embargo, el comportamiento de diferentes variedades de granado bajo condiciones de asfixia radicular no ha sido todavía estudiado en profundidad; a pesar de que este cultivo puede sufrir periodos de inundación en el levante español en aquellas zonas agrícolas que tienen suelos muy pesados con una tasa de permeabilidad baja, debido al fenómeno conocido como “gota fría”. Ante esta situación, los agricultores deberían escoger aquellas variedades que sean más tolerantes a este estrés para minimizar las pérdidas en la producción que suceden cuando se den estos episodios de gota fría.

Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo de investigación fue profundizar en los mecanismos bioquímicos relacionados con la diferente tolerancia de estas tres variedades. Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- a) Determinar bajo estas condiciones de estrés, cómo es afectada la distribución, concentración y composición de carbohidratos y solutos orgánicos.
- b) Evaluar el daño en las membranas celulares producido por las especies reactivas de oxígeno (ROS).
- c) Conocer la respuesta hormonal mediante el estudio de la síntesis de ácido abscísico (ABA) y su transporte en la planta en estas condiciones.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL

Para realizar el ensayo, se emplearon plantas de granado (*Punica granatum* L.) obtenidas en un vivero comercial mediante estaquillado leñoso, realizado 11 meses antes de la recepción de los plantones en la finca en Marzo de 2013. Se plantaron en macetas 36 plantas de granado, 12 de cada variedad ('Mollar de Elche', 'Valenciana' y 'Wonderful') con 15-20 cm de altura aprox.

#### 3.2. CONDICIONES DE CULTIVO

El ensayo fue realizado durante el mes de junio de 2013, en un invernadero en la finca experimental "Tres Caminos", perteneciente al Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) en el término municipal de Santomera (Murcia).

El invernadero (Foto 5), es de tipo multitunel, con cerramientos laterales contruidos a base de placas de policarbonato y cubierta de polietileno. Tiene una superficie de 650 m<sup>2</sup> y 4,5 m de altura hasta la cabeza de pilares. Para el control de la temperatura, dispone de un sistema de refrigeración del tipo *Cooling-system* que mantiene la temperatura por debajo de los 30°C en verano. Además, el invernadero dispone de ventiladores y de un sistema de calefacción con generador de aire caliente por combustión indirecta (Modelo *SIAL Mirage 65*) que mantiene la temperatura por encima de los 9°C en invierno, y malla térmica para retener el calor. El control de la humedad se realiza mediante un equipo de humidificación con compresor de aire (Modelo *Ingersoll-Rand SSR*), manteniendo la humedad relativa durante el día en un 65%. Para el control de la radiación se dispone de una malla de sombreado *Aluminy col* 30%. El invernadero incluye un sistema de sensores de irradiación, de temperatura y de humedad relativa colocados a una altura de 1,5 m.

La recepción del material vegetal se realizó en marzo de 2013, trasplantándose a macetas de 1 litro de capacidad, con sustrato universal compuesto de turba, fibra de coco y perlita (5:4:1 Compost Reciclables S.L. Spain). Para el riego, se empleó solución nutritiva *Hoagland*: 6 mM KNO<sub>3</sub>, 4 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 μM Fe<sup>+2</sup>, quelatado, 25 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 μM MnSO<sub>4</sub>, 2 μM ZnSO<sub>4</sub>, 0,5 μM CuSO<sub>4</sub>, 0.4 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>27</sub>O<sub>24</sub>. Esta solución nutritiva se preparó a partir de los fertilizantes comerciales KNO<sub>3</sub>, CaNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> y un complejo de micronutrientes.



Las plantas fueron bien regadas 3 veces por semana durante los meses de marzo, abril y mayo mediante un sistema de riego localizado con goteros autocompensantes y autodrenantes de  $4 \text{ l h}^{-1}$  hasta el día 5 de junio que comenzó el ensayo. El agua empleada para la preparación de las soluciones nutritivas provenía del trasvase Tajo-Segura y se desionizó mediante un sistema de ósmosis inversa modelo KP-HWL.



**Foto 5: Vista parcial del invernadero donde se realizó el ensayo de inundación en granado.**  
**Fuente: Estudio de la tolerancia a la salinidad, toxicidad por boro e inundación en plantas de *Jatropha curcas* L. (Simón, 2012).**

El control fitosanitario se realizó mediante aplicaciones foliares de imidacloprid (Confidor) junto con regulador del pH para combatir los ataques de pulgón.



### 3.3. TRATAMIENTO INUNDACIÓN

El día 5 de junio, se procedió a realizar el ensayo de inundación consistente en dos tratamientos:

- T0: Tratamiento control sin inundación. Se seleccionaron seis plantas aleatoriamente de cada variedad ('Mollar de Elche', 'Valenciana' y 'Wonderful') y se continuaron regando bien con la SN *Hoagland* mediante el sistema de riego localizado mencionado anteriormente (Foto 6).



**Foto 6: Plantas de granado tratamiento control (T0).**

- T1: Tratamiento inundación. Se seleccionaron aleatoriamente 6 plantas de cada variedad y se colocaron en recipientes individuales de 20 L (Foto 7) con agua procedente del trasvase Tajo-Segura cuya composición fue de 8,86 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ , 1,16 mM  $\text{HCO}_3^-$ , 3 mM  $\text{Cl}^-$ , 3,5 mM  $\text{K}^+$ , 0,12 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 2,22 mM  $\text{Mg}^{2+}$  y 4,13 mM  $\text{Na}^+$ . Las macetas con las plantas fueron sumergidas dentro del recipiente y el nivel del agua se mantuvo 3 cm por encima de la base del tallo (Foto 8).



**Foto 7: Planta de granado tratamiento inundación (T1).**



**Foto 8: Planta de granado tratamiento inundación (T1).**

La concentración de oxígeno del agua empleada para realizar la inundación de las raíces, fue medida con un oxímetro portátil *Crison Oxi 330i* (Foto 9), los días 0, 2, 5 y 6 del ensayo. A partir de los parámetros medidos y los síntomas visuales observados, se decidió cosechar las plantas para su posterior análisis en laboratorio a los seis días de comenzar el ensayo. Se muestrearon separadamente las hojas, el tallo y la raíz de cada una individualmente.

Todas las partes fueron bien lavadas con agua destilada y un 80% del material vegetal fue destinado a peso seco y el 20% restante se congeló en nitrógeno líquido y se guardó en un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis en el laboratorio.



Foto 9: Oxímetro portátil *Crison Oxi 330i*  
Fuente: Net-Interlab, 2007

### 3.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

#### 3.4.1. Determinación de prolina

Al final del experimento se midió la concentración de prolina en hoja y raíz siguiendo el siguiente protocolo descrito por Bates *et al.*, (1973):

1. Se pesó 0,0600 g de material seco en viales de centelleo.
2. Se añadió 1 ml de una disolución de ácido sulfosalicílico al 3%.
3. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
4. Se tomó 0,125  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y se le añadió 0,125  $\mu\text{l}$  de ácido acético glacial y 0,125  $\mu\text{l}$  de ninhidrina ácida\* recién preparada. Al mismo tiempo se preparó la curva estándar con el patrón de prolina.
5. A continuación esta mezcla se calentó a  $90^{\circ}\text{C}$  en el baño durante una hora.
6. Posteriormente, se enfrió en hielo y se añadió 4 ml de tolueno.

7. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (*Helios α Cambridge, UK*) a 520 nm.

(\*) Preparación ninhidrina ácida: 2,5 gr de ninhidrina + 60 ml de ácido acético glacial + 20ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 6M.

#### 3.4.2. Determinación de compuestos de amonio cuaternario

Los compuestos de amonio cuaternario (QAC) se midieron en hoja y fueron extraídos del material vegetal seco siguiendo el protocolo de Grieve and Grattan (1983) y utilizando como estándar glicina-betaina.

1. Se pesó 0,0200 g de muestra en un eppendorf de 1,5 ml.
2. Se añadió 1 ml de agua ultrapura y se dejó en agitación durante 24 h a 30°C.
3. Pasado este tiempo, se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 4.600 rpm.
4. Se tomaron 250 µl del sobrenadante y se pasó a un eppendorf nuevo al que se le añadió 250 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1N).
5. Se mezcló bien y se dejó 1 h en hielo.
6. Mientras estaba en el hielo, se añadió 250 µl de KI-I<sub>2</sub>, se mezcló bien y se mantuvo en el frigorífico a 4°C en reposo durante 16 horas.
7. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 0°C.
8. Se retiró el sobrenadante y se desechó, observándose los cristales precipitados.
9. Se disolvieron los cristales con 1 ml de 1,2-dicloroetano.
10. Se tomó 200 µl y se midió la absorbancia a 365 nm en una placa de cuarzo.

#### 3.4.3. Determinación de carbohidratos

Se determinó la concentración de carbohidratos no estructurales en hoja y raíz, incluyendo azúcares solubles, azúcares reductores y almidón. Primero, se realizó la extracción mediante el siguiente procedimiento:

1. Se pesó 30 mg de muestra seca.
2. Se añadió 0,9 ml de etanol (80%) y se mantuvo en agitación durante 30 minutos.

3. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 3 minutos y posteriormente se realizaron dos lavados de lavados:
4. Primer lavado: Se decantó el sobrenadante en eppendorfs nuevos y se le añadió a los pellets 300  $\mu$ l de etanol (80%). Se volvieron a centrifugar a 10.000 rpm durante 3 minutos.
5. Segundo lavado: Se decantó de nuevo el sobrenadante en el eppendorf anterior y se volvió a añadir 300  $\mu$ l de etanol (80%) y se centrifugó otros 3 minutos.
6. Se decantó nuevamente el sobrenadante obteniéndose como volumen final en el eppendorf 1,5 ml.

Se obtuvieron dos eppendorfs por cada muestra, una fase líquida y otra fase sólida:

- Fase líquida: Se mantuvieron en frío durante 16 horas.
- Fase sólida: Se dejaron secar evaporándose el etanol.

Azúcares solubles. Método de la antrona (Hodge y Hofreites, 1962):

1. Se cogió 30  $\mu$ l de la fase líquida y se añadió 270  $\mu$ l de agua ultrapura.
2. Se añadió al eppendorf 1 ml de la disolución de antrona (0,2%) preparada con  $H_2SO_4$  (97%).
3. Se tomó 200  $\mu$ l de la mezcla y se midió en una placa de cuarzo a 625 nm.

Azúcares reductores. (Nelson, 1944; Somogyi, 1952):

1. Se cogió una alícuota de 50  $\mu$ l de la fase líquida y se añadió 50  $\mu$ l de agua ultrapura.
2. Se añadió 100  $\mu$ l del Reactivo A\* (Azul) y se puso durante 10 minutos en el baño a 90°C.
3. Después se añadió 100  $\mu$ l de Reactivo B\* (Sensible a la luz) y se mezcló bien.
4. Se añadió 700  $\mu$ l de agua ultrapura y se midió la absorbancia a 520 nm.

(\*) Preparación del Reactivo A: Cobre alcalino tartatro.

Solución 1: Se disolvió 2,5 g de  $Na_2HPO_4$  anhidro, 2 g de  $NaHCO_3$ , 2,5 g de tartatro de sodio y potasio y 20 g de  $Na_2SO_4$  anhidro en 80 ml de agua destilada. Se completó hasta 100 ml.



Solución 2: Por otro lado, se disolvió 15 g de  $\text{CuSO}_4$  10% en un pequeño volumen de agua ultrapura. Se añadió una gota de sulfúrico y se completó hasta 100 ml.

Finalmente, se mezcló 96 ml de solución 1 con 4 ml de solución 2.

(\*) Preparación del reactivo B: Reactivo de arsenomolibdato.

Se disolvió 2,5 g de molibdato de amonio en 45 ml de agua agregando 2,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Luego se añadió 0,3 g de  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  disuelto en 25 ml de agua ultrapura. Se mezcló bien y se dejó incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 24-48 horas en una botella opaca (sensible a la luz).

Almidón (Haissig y Dickson, 1979).

1. A la fase sólida obtenida anteriormente, se le añadió primero 100  $\mu\text{l}$  de MES (0,5 M) a  $\text{pH} = 5$ , luego 0,0592 mg de almidón sintético por muestra y por último 760  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura.
2. Se agitó a 4.600 rpm durante 5 min y se mantuvo en agitación durante 16 h a  $30^\circ\text{C}$ .
3. Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de la mezcla y se le añadió 200  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura.
4. Se añadió 600  $\mu\text{l}$  de antrona (0,2%) preparada con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (97%).
5. Se enfrió con hielo y se tomaron 200  $\mu\text{l}$  de muestra y se dispuso en la placa de cuarzo donde se midió la absorbancia a 625 nm.

#### 3.4.4. Estrés oxidativo

Análisis de malondialdehído (MDA) (Hodges *et al.*, 1999)

1. Se pesó 500 mg de material vegetal fresco congelado a  $-80^\circ\text{C}$  y se homogeneizó con 5 ml de etanol filtrándose con una gasa estéril.
2. Se centrifugó a 4.500 rpm durante 10 minutos.
3. Se tomaron dos alícuotas del sobrenadante de 250  $\mu\text{l}$  cada una y se pusieron en dos eppendorfs térmicos distintos.
4. Al primero se le añadió 250  $\mu\text{l}$  de TCA al 20%. Al segundo se le añadió 250  $\mu\text{l}$  de una mezcla de TCA al 20% + TBA al 0,5%.

5. Se introdujeron en un baño a 90°C durante 1 hora y posteriormente se dejaron enfriar.
6. Se dispensó en pocillos en una placa y se leyeron las absorbancias a las siguientes longitudes de onda: 440, 532 y 600 nm.

La concentración de MDA se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} & [(A_{532+TBA}) - (A_{600+TBA}) - (A_{532-TBA} - A_{600-TBA})] = A \\ & [(A_{440+TBA} - A_{600+TBA}) \times 0,0571] = B \\ & \text{MDA}_{\text{equivalentes}} \text{ (nmol/ml)} = [(A - B) / 157000] \times 10^6 \end{aligned}$$

#### Análisis de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Brennan y Frenkel, 1977)

1. Se pesó 500 mg de material vegetal fresco congelado y se homogeneizó con 10 ml de acetona fría filtrándose con papel Watman n° 1.
2. Se tomó 2 ml del filtrado y se trató con 1 ml de reactivo de titanio al 20% y con 1 ml de amonio concentrado, con el objetivo de precipitar los complejos de hidroperóxido de titanio.
3. Se centrifugó a 7.500 rpm durante 30 min.
4. Se decantó el sobrenadante y se disolvió el pellet con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N).
5. Se dispensó en la cubeta de cuarzo y se leyó la absorbancia a 415 nm.

#### 3.4.5. Respuesta hormonal (ABA)

Para conocer la respuesta hormonal en ABA de las plantas, se realizó un análisis de savia. La concentración de ABA en la savia del xilema, fue medido en material fresco de hoja y raíz liofilizado, por radioinmunoensayo (Quarrie *et al.*, 1988) usando el anticuerpo monoclonal AFRC MAC 252 (proporcionado amablemente por Dr. G. Butcher, *Babraham Bioscience Technologies, Cambridge, UK*). Los volúmenes utilizados en el ensayo fueron 50 µl.

#### 3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En este experimento el tratamiento estadístico de los datos incluye una estadística descriptiva básica, seguida de un análisis de la varianza (ANOVA) y test de

separación de medias de Duncan cuando el ANOVA fue significativo a ( $P < 0,05$ ). Se ha determinado una tabla de correlaciones de Pearson para las principales variables medidas y/o analizadas, calculándose las curvas de regresión lineal entre las variables correlacionadas entre sí. El programa informático utilizado fue el IBM SPSS Statistics 22. Para la elaboración de gráficos se empleó el SigmaPlot 11.0 Systat Software.

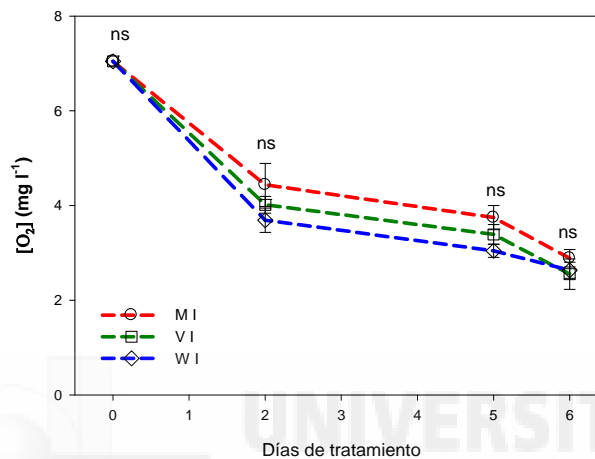




## 4. RESULTADOS

### 4.1. CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO

La concentración inicial de Oxígeno en el agua [O<sub>2</sub>] (Gráfico 1) fue de 7,05 mg l<sup>-1</sup>. Con la inundación se produjo una rápida reducción de casi el 45% al segundo día de ensayo (4,04 mg l<sup>-1</sup>) disminuyendo progresivamente y de igual forma en todas las variedades, hasta el sexto día (2,7 mg l<sup>-1</sup>).

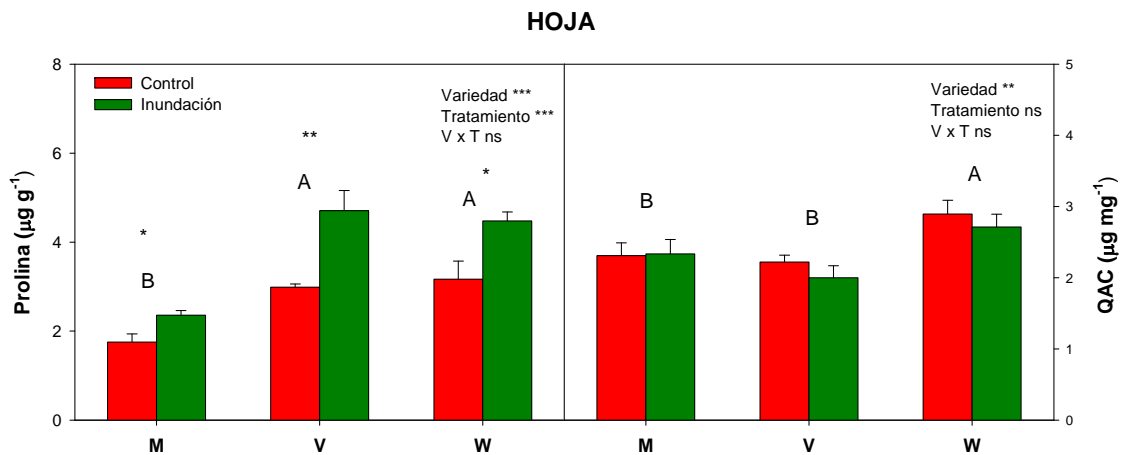


**Gráfico 1:** Concentración de O<sub>2</sub> del agua utilizada para la inundación de las plantas de granado para los distintos días de tratamiento (6 días): MI='Mollar de Elche' Inundación; VI='Valenciana' Inundación; WI='Wonderful' Inundación. ns indica diferencias no significativas para P>0,05. Las barras verticales representan el error estándar (n=6).

### 4.2. CONCENTRACIÓN DE PROLINA Y COMPUESTOS DE AMONIO CUATERNARIO EN HOJAS Y RAÍZ

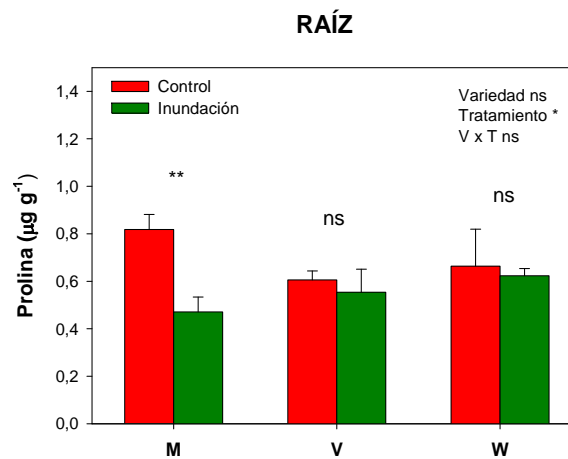
Los datos del gráfico 2 presentan la concentración en hoja de los solutos orgánicos: prolina y compuestos de amonio cuaternario (QAC). En situaciones sin estrés, la concentración de prolina es significativamente mayor tanto en 'Valenciana' (2,99 µg g<sup>-1</sup>) como en 'Wonderful' (3,17 µg g<sup>-1</sup>) respecto a 'Mollar de Elche' (1,76 µg g<sup>-1</sup>). También se observaron diferencias en la concentración de QAC en 'Wonderful', con valores superiores a los de las otras dos variedades. Debido a la inundación, se produjo un incremento significativo en la concentración de prolina foliar en las plantas de las tres variedades estudiadas; en 'Valenciana' fue en la que mayor aumento se produjo (46%) aumentando hasta 4,71 µg g<sup>-1</sup>. La inundación afectó también a las otras dos variedades aunque de menor forma, produciéndose un aumento del 30% en 'Wonderful' (4,48 µg g<sup>-1</sup>) y del 25% en 'Mollar de Elche' (2,36 µg g<sup>-1</sup>).

No se observaron diferencias significativas en la concentración foliar de QAC en las plantas inundadas respecto a las control.



**Gráfico 2:** Concentración de prolina y QAC foliar de las plantas de granado de las variedades: M ('Mollar de Elche'), V ('Valenciana') y W ('Wonderful') en el tratamiento control e inundación. Como la interacción es no significativa, las letras mayúsculas diferentes dentro de cada gráfica indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las variedades independientemente del tratamiento. En el ANOVA ns, \*, \*\* y \*\*\* indican diferencias no significativas, y significativas a  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$  respectivamente. Las barras verticales representan el error estándar ( $n=6$ ).

En los datos obtenidos para prolina en raíz (Gráfico 3), no se observaron diferencias significativas entre variedades en su concentración en condiciones control. No obstante, la inundación disminuyó un 42% la concentración de prolina en la raíz de 'Mollar de Elche' no mostrando diferencias significativas en el resto de variedades.



**Gráfico 3:** Concentración de prolina radicular de las plantas de granado de las variedades: M ('Mollar de Elche'), V ('Valenciana') y W ('Wonderful') en el tratamiento control e inundación. En el ANOVA ns, \* y \*\* indican diferencias no significativas, y significativas a  $P < 0,05$  y  $P < 0,01$  respectivamente. Las barras verticales representan el error estándar ( $n=6$ ).

### 4.3. CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS

En la tabla 2 se puede observar la concentración de carbohidratos presentes en las hojas de granado. ‘Valenciana’ fue la que mayor concentración de azúcares solubles totales (AST) ( $97,4 \text{ mg glucosa g}^{-1}$ ) y azúcares reductores (AR) ( $87,6 \text{ mg glucosa g}^{-1}$ ) tiene en condiciones control. ‘Mollar de Elche’ fue la variedad con mayor diferencia entre la concentración de AST ( $83,9 \text{ mg glucosa g}^{-1}$ ) y AR ( $42 \text{ mg glucosa g}^{-1}$ ). La concentración de almidón en ‘Wonderful’ ( $7,96 \text{ mg glucosa g}^{-1}$ ) fue más del doble que la observada en ‘Mollar de Elche’ ( $3,47 \text{ mg glucosa g}^{-1}$ ), siendo la de ‘Valenciana’ de  $6,20 \text{ mg glucosa g}^{-1}$ .

La inundación afectó significativamente en la concentración de carbohidratos en las hojas, aumentando en las tres variedades los AST, AR y almidón excepto en ‘Mollar de Elche’ donde la concentración de almidón se mantuvo constante. La variedad ‘Valenciana’ obtuvo los valores más altos en la concentración de AST y AR en inundación, siendo  $131,1$  y  $87,6 \text{ mg glucosa g}^{-1}$  respectivamente.

La inundación afectó de igual forma a las tres variedades, para la concentración de carbohidratos foliares.

**Tabla 2: Concentración de carbohidratos en hoja: Azúcares reductores, azúcares solubles y almidón, de las plantas de granado en el tratamiento control e inundación.**

HOJA				
Variedad	Tratamiento	Azúcares solubles totales (mg glucosa g <sup>-1</sup> )	Azúcares reductores (mg glucosa g <sup>-1</sup> )	Almidón (mg glucosa g <sup>-1</sup> )
M	Control	$83,9 \pm 5,2$	$42,0 \pm 4,4$	$3,42 \pm 0,33$
	Inundación	$101,6 \pm 5,5$	$68,1 \pm 7,1$	$3,47 \pm 0,32$
V	Control	$97,4 \pm 1,7$	$77,0 \pm 6,6$	$6,20 \pm 0,47$
	Inundación	$131,1 \pm 10,1$	$87,6 \pm 7,7$	$4,63 \pm 0,44$
W	Control	$64,71 \pm 2,9$	$61,7 \pm 3,4$	$7,96 \pm 0,49$
	Inundación	$98,09 \pm 10,2$	$76,5 \pm 8,0$	$6,16 \pm 0,63$
ANOVA				
<b>Variedad</b>		**	***	***
<b>Tratamiento</b>		**	***	*
<b>Variedad x Tratamiento</b>		ns	ns	ns

M=‘Mollar de Elche’, V=‘Valenciana’, W=‘Wonderful’.

ns, \*, \*\* y \*\*\* indican diferencias no significativas, y significativas a  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  y  $P < 0,001$  respectivamente (n=6).

La concentración de carbohidratos en raíz (Tabla 3) muestra que existen diferencias significativas entre ‘Mollar de Elche’ y ‘Valenciana’ con ‘Wonderful’; esta última fue la variedad con los valores más bajos tanto en AST, AR como en almidón.

El tratamiento de inundación afectó significativamente disminuyendo la concentración de AST y AR en las plantas de las tres variedades estudiadas. ‘Valenciana’ fue la más afectada en AR alcanzando valores de  $19,10 \text{ mg glucosa g}^{-1}$ . La concentración de almidón no se vio alterada por la inundación en ninguna de las tres variedades.

Las tres variedades respondieron de igual forma bajo las condiciones de inundación.

**Tabla 3: Concentración de carbohidratos en raíz: Azúcares reductores, azúcares solubles y almidón, de las plantas de granado en el tratamiento control e inundación.**

<b>RAÍZ</b>				
<b>Variedad</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Azúcares solubles totales (mg glucosa g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Azúcares reductores (mg glucosa g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Almidón (mg glucosa g<sup>-1</sup>)</b>
<b>M</b>	Control	53,05 ± 2,48	32,60 ± 1,78	1,95 ± 0,23
	Inundación	43,50 ± 3,16	25,82 ± 2,34	1,78 ± 0,21
<b>V</b>	Control	57,40 ± 1,15	35,33 ± 0,81	1,76 ± 0,12
	Inundación	44,06 ± 6,03	19,10 ± 1,61	2,11 ± 0,16
<b>W</b>	Control	41,01 ± 4,58	26,73 ± 2,83	1,50 ± 0,17
	Inundación	38,02 ± 5,62	19,87 ± 2,32	1,56 ± 0,13
<b>ANOVA</b>				
<b>Variedad</b>		*	*	ns
<b>Tratamiento</b>		*	***	ns
<b>Variedad x Tratamiento</b>		ns	ns	ns

M=‘Mollar de Elche’, V=‘Valenciana’, W=‘Wonderful’.

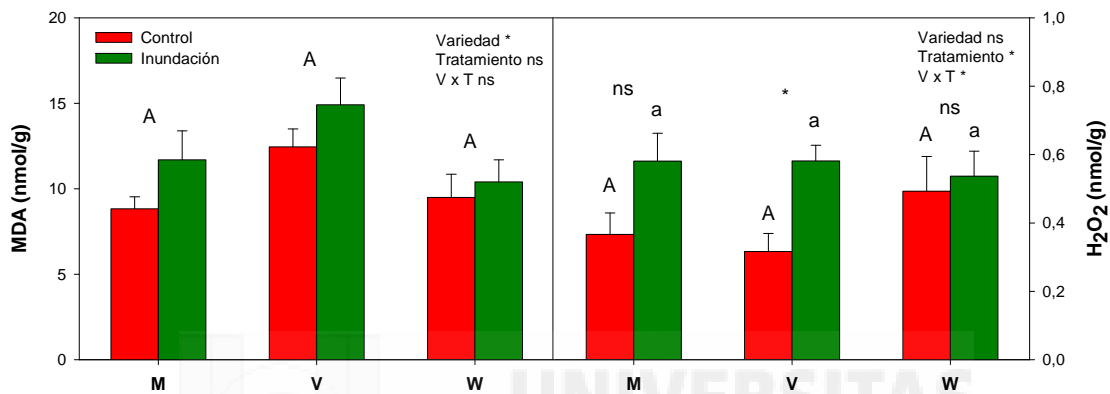
ns, \* y \*\*\* indican diferencias no significativas, y significativas a  $P < 0,05$  y  $P < 0,001$  respectivamente (n=6).

#### 4.4. ESTRÉS OXIDATIVO

La concentración inicial de MDA, fue mayor en las plantas de ‘Valenciana’ ( $12,45 \text{ nmol g}^{-1}$ ) aunque no mostraron diferencias significativas con las plantas de las otras dos variedades. De igual forma, ‘Wonderful’ fue la que mayor concentración

inicial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentó (0,54 nmol g<sup>-1</sup>) sin diferencias significativas entre las otras dos variedades (Gráfico 4).

La inundación no afectó a la concentración de MDA en ninguna variedad. No obstante, el tratamiento de inundación sí que afectó en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma distinta entre variedades, aumentando significativamente en las plantas inundadas de ‘Valenciana’ de 0,32 nmol g<sup>-1</sup> a 0,58 nmol g<sup>-1</sup>, lo que supone un incremento del 45%, pero no mostrando diferencias significativas en ‘Mollar de Elche’ y ‘Wonderful’.



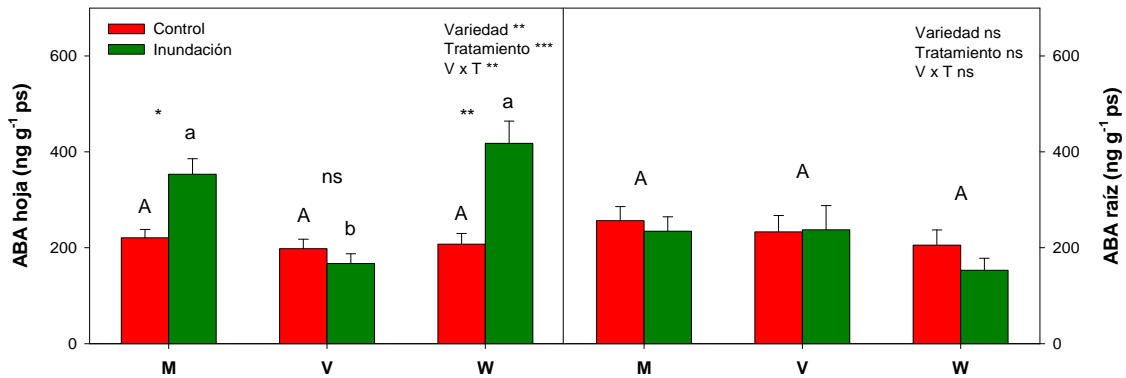
**Gráfico 4: Estrés oxidativo: concentración de MDA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las plantas de granado de las variedades: M (‘Mollar de Elche’), V (‘Valenciana’) y W (‘Wonderful’) en el tratamiento control e inundación. Letras mayúsculas diferentes dentro de cada gráfica indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las variedades para el tratamiento control (no inundación). Si la interacción es no significativa, las letras mayúsculas diferentes dentro de cada gráfica indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las variedades, independientemente del tratamiento. Letras minúsculas diferentes dentro de cada gráfica indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las variedades para el tratamiento inundación. En el ANOVA ns y \* indican diferencias no significativas, y significativas a  $P < 0,05$  respectivamente. Las barras verticales representan el error estándar (n=6).**

#### 4.5. RESPUESTA HORMONAL (ABA)

La concentración de ácido abscísico (ABA) en condiciones control, fueron similares para las plantas de las tres variedades de granado estudiadas, con valores en torno a 210 ng g<sup>-1</sup> ps en hoja y 230 ng g<sup>-1</sup> ps en raíz (Gráfico 5).

La inundación, mostró distintas respuestas dependiendo de la variedad, siendo ‘Wonderful’ la que más aumentó la concentración de ABA, alcanzando una concentración de 417 ng g<sup>-1</sup> ps, lo que supone casi el doble de su valor inicial. ‘Mollar de Elche’, presentó un aumento menor pero también significativo con una concentración de 353 ng g<sup>-1</sup> ps, lo que supuso un aumento de un 37%. Por otro lado, ‘Valenciana’ no mostró diferencias significativas en condiciones de inundación respecto al control.

La concentración de ABA en la raíz fue similar tanto en plantas control como en inundadas, no observándose tampoco diferencias significativas con las variedades.



**Gráfico 5: Respuesta hormonal: concentración de ABA en hoja y raíz en las plantas de granado de las variedades: M ('Mollar de Elche'), V ('Valenciana') y W ('Wonderful') en el tratamiento control e inundación. Letras mayúsculas diferentes dentro de cada gráfica indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las variedades para el tratamiento control (no inundación). Si la interacción es no significativa, las letras mayúsculas diferentes dentro de cada gráfica indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las variedades independientemente del tratamiento. Letras minúsculas diferentes dentro de cada gráfica indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las variedades para el tratamiento inundación. En el ANOVA ns y \* indican diferencias no significativas, y significativas a  $P < 0,05$  respectivamente. Las barras verticales representan el error estándar ( $n=6$ ).**

## 5. DISCUSIÓN

El granado podría ser considerado un cultivo sensible a la inundación, aunque su tolerancia relativa depende de la variedad. En este experimento, de los tres cultivares utilizados, las plantas ‘Valenciana’ son más sensibles que los otros cultivares ensayados. En el estudio morfológico y fisiológico que hicimos de este mismo ensayo, y que fue publicado recientemente, Olmo-Vega *et al.*, 2015, observaron que .las plantas de ‘Valenciana’, mostraron visualmente síntomas de estrés severo al sexto día de ensayo, apreciándose de forma mucho más leve en ‘Mollar de Elche’ y en ‘Wonderful’ (Foto 10). Además, las plantas Valenciana bajo inundación tuvieron un menor potencial hídrico, conductancia estomática y tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> que los otros dos cultivares (datos no mostrados). En base a esta información, en este proyecto el objetivo fue caracterizar las respuestas bioquímicas de estas tres variedades teniendo en cuenta que tienen diferente tolerancia a este estrés.



**Foto 10:** Día 6 de inundación. De izquierda a derecha ‘Mollar de Elche’, ‘Valenciana’ y ‘Wonderful’.

En cuanto a la concentración de oxígeno en el agua que se utilizó en la inundación, se observó una disminución progresiva a lo largo de los seis días del ensayo. Esta reducción habría causado una bajada de la permeabilidad radicular incrementando la resistencia a la entrada del agua en las raíces y disminuyendo la conductancia hidráulica radicular (Smith *et al.*, 1990; Zhang y Tyerman, 1991; Nicolás



*et al.*, 2005) lo que impide la absorción de agua por la planta afectando negativamente a las relaciones hídricas de las plantas de granado causando un déficit hídrico en las hojas (Olmo-Vega, *et al.*, 2015).

La acumulación de solutos orgánicos que no inhiben los procesos metabólicos, como los carbohidratos, la prolina y los compuestos de amonio cuaternario (QAC), es una respuesta típica de las plantas que sufren estrés hídrico bien por salinidad o por sequía para lograr un equilibrio osmótico en el citoplasma. Altas concentraciones de solutos orgánicos reducen el potencial hídrico de las hojas al reducir el potencial osmótico, pero el potencial de turgor se mantiene constante evitando así problemas de deshidratación, este mecanismo es conocido como “ajuste osmótico” (Chaum y Kirdmanee, 2009). En este ensayo, la inundación cambió el modelo de distribución de carbohidratos en la planta favoreciendo su acumulación en hojas (órganos fuente) y la disminución en las raíces (órganos sumidero). También aumentó la concentración de prolina en las hojas, pero estos incrementos no fueron suficientes para que se produjera un proceso de ajuste osmótico que se mantuvo constante durante los seis días; sin embargo, la turgencia de las células en las plantas inundadas sí que se vio afectada en las tres variedades, pero de forma más acusada en las plantas de la especie ‘Valenciana’ (Olmo-Vega, *et al.*, 2015).

La concentración y distribución de carbohidratos totales no estructurales (CTN) en plantas que sufren algún tipo de estrés abiótico, no responden a un único modelo. En general, en la bibliografía nos encontramos que la sequía, salinidad y bajas temperaturas incrementan la concentración de azúcares solubles totales mientras que el exceso de luz, toxicidad por metales pesados, deficiencias nutricionales y alta concentración de ozono disminuyen la concentración (Rosa *et al.*, 2009).

En condiciones de inundación, la disminución de la fotosíntesis está generalmente acompañada de una acumulación de CTN en hojas en plantas resistentes a la inundación, empleándose como reserva disponible para el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas una vez que el estrés ha cesado (Chen *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2008). En plantas sensibles a la inundación como *Jatropha curcas*, la concentración total de CTN en hojas y raíces tendió a disminuir (Simón *et al.*, 2012) debido quizás a la reducción de  $A_{CO_2}$  que disminuye la concentración de fotoasimilados sintetizados por la planta y/o quizás al aumento del consumo de azúcares para poder



llevar a cabo procesos metabólicos fermentativos bajo condiciones de hipoxia o anoxia (Sairam *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2009).

En el caso del granado, la concentración de azúcares tanto solubles como reductores aumentó significativamente en las hojas como respuesta a la inundación, mientras que el almidón disminuyó. Esto podría ser debido a la inhibición del transporte de fotoasimilados desde las hojas (órganos fuente) hacia otros tejidos (órganos sumidero) para el desarrollo vegetativo, lo que hace que pese a que la capacidad fotosintética disminuya, los carbohidratos se van acumulando en las hojas. Por otro lado, la disminución de la concentración de almidón en las hojas de las plantas inundadas también podría contribuir a la acumulación de carbohidratos en las hojas como un intento de las plantas de ajustarse osmóticamente, aunque ya vimos en la sección anterior que este incremento no fue lo suficientemente intenso para lograr disminuir el potencial osmótico.

Las variedades ‘Valenciana’ y ‘Mollar de Elche’ obtuvieron valores significativamente mayores que ‘Wonderful’ en la concentración de AST en los distintos tejidos vegetales estudiados. Esto podría deberse a que según la clasificación de Melgarejo y Salazar, (1993) para variedades de granado, ‘Wonderful’ se encuentra en el grupo varietal de semiagrias mientras que las otras dos en dulces.

Los daños severos que causó la inundación en no fueron debidos por estrés oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son compuestos producidos bajo situaciones de hipoxia o anoxia dañando el metabolismo celular oxidando las proteínas lipídicas de la pared celular (Moller *et al.*, 2007). ‘Valenciana’ fue la única variedad que mostró un aumento significativo de la concentración de  $H_2O_2$  en las plantas inundadas. Esto podría estar relacionado con la disminución de su  $F_v/F_m$ , ya que igualmente fue la única variedad en mostrar diferencias significativas (datos no mostrados).

Cuando la  $A_{CO_2}$  disminuye en un alto porcentaje debido a factores no estomáticos, como en el caso de ‘Valenciana’ (Olmo-Vega *et al.*, 2015), se crea un exceso de NADPH (poder reductor producido en la fase luminosa de la fotosíntesis) de tal manera que los electrones en lugar de participar en los procesos redox de la cadena lineal de transporte, son diversificados al oxígeno generando especies reactivas de oxígeno (ROS) como el  $H_2O_2$  que causan daños en la estructura de los cloroplastos (Yordanova y Popova, 2007). Sin embargo, no se observó un aumento significativo en la concentración de MDA en ninguna de las tres variedades estudiadas. Esto indica que

el estrés sufrido y la disminución del desarrollo vegetativo, no fue debido a daños en las paredes celulares pese a la presencia significativa de  $H_2O_2$  en ‘Valenciana’. Quizás factores no enzimáticos (ácido ascórbico, glutatión,  $\alpha$ -Tocoferol y carotenoides) o enzimáticos (Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Glutatión Peroxidasa (GPX)), controlaron los niveles de ROS protegiendo la degradación de las membranas.

La señalización hormonal entre la raíz-parte aérea regulada por el ABA, podría haber jugado un papel importante en la diferente tolerancia a la inundación observada entre las variedades. Cambios medioambientales en la zona radicular, tienen gran influencia en la fisiología de la planta mediante la transmisión de señales químicas a la parte aérea (Davies y Zhang, 1991). Se ha propuesto que la anoxia, desencadena una vía de transducción de señales que inducen algunos eventos metabólicos y que crean una serie de respuestas fisiológicas y morfológicas (Dat *et al.*, 2004). Muchos de esos cambios fisiológicos se deben a alteraciones en la concentración de hormonas como el ácido abscísico (ABA) (Zhang y Zhang, 1994) como promotor del cierre estomático en situaciones de inundación mejorando así la tolerancia al estrés reduciendo las pérdidas de agua por transpiración (Wu *et al.*, 1997). Tradicionalmente, se ha aceptado la hipótesis de la producción radicular de ABA (Zhang y Davies, 1987; Neuman y Smith, 1991; Castonguay *et al.*, 1993). Sin embargo, otros ensayos plantean que no son las raíces las promotoras de la síntesis de ABA sino las hojas adultas basales marchitas (guisante, Jackson *et al.*, 1988; Zhang y Zhang, 1994; cítricos, Rodríguez-Gamir *et al.*, 2011). En el ensayo de granado, no se observó en ninguna variedad estudiada un aumento en la concentración radicular de ABA; sin embargo las variedades ‘Mollar de Elche’ y ‘Wonderful’ sí que presentaron un aumento significativo de su concentración en las hojas. ‘Valenciana’ no mostró ningún cambio en su concentración foliar debido probablemente al rápido estrés sufrido que no dio tiempo a que el ABA o sus precursores ascendieran hacia la parte aérea del árbol.

Como se ha sugerido anteriormente, una posible causa del cierre estomático producido en las tres variedades, podría ser debida a la pérdida de turgor celular como consecuencia de la deshidratación de las hojas y no por la concentración foliar de ABA. La conductancia estomática de ‘Wonderful’ en inundación, fue menor que la de ‘Mollar de Elche’, sin embargo la concentración de ABA al sexto día era mayor en ‘Wonderful’ que en ‘Mollar de Elche’. Así mismo, ‘Valenciana’ fue la que más rápidamente presentó cierre estomático y mayor caída de  $A_{CO_2}$  sin embargo su producción de ABA fue nula.

En plantas de judía (*Vigna radiata*) inundadas se produjo una rápida reducción de la tasa fotosintética y de  $F_v/F_m$  sin incremento foliar de ABA, lo que puede indicar que la reducción de la fotosíntesis no está completamente relacionada con el ABA (Ahmed, *et al.*, 2006).

Lo anteriormente expuesto puede sugerir, como han indicado otros autores, que el rápido cierre estomático producido en inundación, ocurre independientemente del incremento de ABA foliar, siendo este significativo en la regulación estomática en inundaciones prolongadas. En cítricos, la disminución de  $g_s$  se produjo a los 7 días mientras que el aumento de ABA en las hojas se observó a los 21 días (Rodríguez-Gamir *et al.*, 2011). Algunos estudios en tomate han detectado incrementos en el pH xilemático en suelos inundados en comparación con las plantas no inundadas (Else *et al.*, 2006; Jackson, 2006) reduciendo la  $g_s$  sin que esta sea atribuida al incremento de ABA (Else *et al.*, 1996). Es por tanto que, otra opción que merece la pena considerar, es que la reducción de la conductancia estomática producida en las plantas de granado se haya producido debido a una disminución de la conductividad hidráulica de la raíz afectada por la hipoxia, reduciéndose así el flujo de agua (Andersen *et al.*, 1984; Davies y Flore, 1986a; Birner y Steudle, 1993; Else *et al.*, 1995; Else *et al.*, 2001).

## 6. CONCLUSIÓN

Como la concentración de oxígeno del agua inundada disminuyó a lo largo del ensayo de forma similar en las tres variedades estudiadas, y en las tres variedades no se observó ningún mecanismo adaptativo propio de las plantas adaptadas a la inundación, se podría decir que para una misma concentración de oxígeno en el suelo la variedad ‘Valenciana’ es mucho más sensible que las otras dos variedades (según el estudio fisiológico y morfológico no mostrado en esta memoria).

Las plantas de granado, como la mayoría de las plantas que sufren algún tipo de estrés osmótico, incrementaron la concentración de solutos intracelulares como respuesta a la inundación, pero esto fue insuficiente para que se favoreciera el ajuste osmótico.

La inundación afectó a la distribución de carbohidratos en las plantas, produciendo un aumento de la concentración de los mismos en las hojas (órganos fuente) y disminución en la raíz (órganos sumidero), lo que indicaría que este estrés abiótico podría estar inhibiendo el transporte de fotoasimilados en la planta.

Ninguna variedad presentó daños oxidativos en las membranas celulares, determinado por el MDA, lo que indicaría que las plantas de granado tienen un sistema eficiente en la desintoxicación de radicales libres de  $O_2$ , y que por tanto la severa reducción que se produjo en la biomasa foliar no fue debido al estrés oxidativo.

El ABA, hormona encargada de transmitir a la parte aérea de las plantas cambios medioambientales que se producen en la zona radicular, podría haber tenido una función relevante en este ensayo; ya que las plantas más tolerantes a la inundación, ‘Wonderful’ y ‘Mollar de Elche’ acumularon altas concentraciones de ABA foliar, mientras que en ‘Valenciana’ la concentración de ABA no fue alterada.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- AEMET. (2013). Agencia Estatal de Meteorología. El tiempo de la huerta de Murcia. Murcia: AEMET.
- Ahmed, S., Nawata, E. y Sakuratani, T. (2006). Changes of endogenous ABA and ACC, and their correlations to photosynthesis and water relations in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczak cv. KPS1) during waterlogging. *Environmental and Experimental Botany*. 57, 278-284.
- Andersen, P.C., Lombard, P.B. y Westwood, M.N. (1984). Effect of root anaerobiosis on the water relations of several *Pyrus* species. *Physiologia Plantarum*. 62, 245-252.
- Bates, L., Waldren, R.P. y Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 39, 205-207.
- Beckman, C., Perry, R.L. y Flore, J.A. (1992). Short-term flooding affects gas exchange characteristics of containerized sour cherry trees. *Hortscience*. 27, 1297-1301.
- Birner, T.P. y Steudle, E. (1993). Effects of anaerobic conditions on water and solute relations and on active transport in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta*. 190, 474-483.
- Brennan, T. y Frenkel, C. (1977). Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiology*. 59, 411-416.
- Cambayas Coop V. (2010). Productos Cambayas. Granadas.  
<<http://www.cambayas.com/productos.php?seccion=granadas>> [Consulta: 20 de febrero de 2015]
- Castonguay, Y., Nadeau, P. y Simard, R.R. (1993). Effects of flooding on carbohydrate and ABA levels in roots and shoots of alfalfa. *Plant Cell and Environment*. 16, 695-702.
- Cham, S. y Kirdmanee, C. (2009). Effect of salt stress on proline accumulation, photosynthetic ability and growth characters in two Maize cultivars. *Pakistan. Journal Botany*. 41(1), 87-98.
- Chen, H., Qualls, R.G. y Blank, R.R. (2005). Effect of soil flooding on photosynthesis, carbohydrate partitioning and nutrient uptake in the invasive exotic *Lepidium latifolium*. *Aquatic Botany*. 82, 250-268.
- Crane, J.H. y Davies, F.S. (1989). Flooding responses of *Vaccinium* species. *Hortscience*. 24, 203-210.
- Dat, J.F., Capelli, N., Folzer, H., Bourgeade, P. y Badot, P.M. (2004). Sensing and signaling during plant flooding. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42, 273-282.
- Davies, F.S. y Flore, J.A. (1986a). Flooding, gas exchange and hydraulic conductivity of highbush blueberry. *Physiologia Plantarum*. 67, 545-551.
- Davies, F.S. y Flore, J.A. (1986b). Short-term flooding effects on gas exchange and quantum yield of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). *Plant Physiology*. 81, 289-292.
- Davies, W.J. y Zhang, J. (1991). Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42, 55-76.
- Dudal, R. (1976). Inventory of the major soils of the world with special reference to mineral stress hazards. En: Wright, M.J. (ed.) *Plant adaptation to mineral stress in problem soils*. Cornell Univ. New York: Ithaca. pp. 3-13.
- Else, M.A., Coupland, D., Dutton, L. y Jackson, M.B. (2001). Decreased root hydraulic conductivity reduces leaf water potential, initiates stomatal closure and slows leaf expansion in flooded plants of castor oil (*Ricinus communis*) despite diminished delivery of ABA from the roots to shoots in xylem sap. *Physiologia Plantarum*. 111, 46-54.
- Else, M.A., Davies, W.J., Malone, M. y Jackson, M.B. (1995). A negative hydraulic message from oxygen-deficient roots of tomato plants? Influence of soil flooding on leaf water potential, leaf expansion, and synchrony between stomatal conductance and root hydraulic conductivity. *Plant Physiology*. 109, 1017-1024.
- Else, M.A., Taylor, J.M. y Atkinson, C.J. (2006). Anti-transpirant activity in xylem sap from flooded tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants is not due to pH mediated redistributions of sourced ABA. *Journal of Experimental Botany*. 57, 3349-3357.
- Else, M.A., Tiekstra, A.E., Croker, S.J., Davies, W.J. y Jackson, M.B. (1996). Stomatal closure in flooded tomato plants involves abscisic acid and a chemically unidentified anti-transpirant in xylem sap. *Plant Physiology*. 112, 239-247.
- Font-Quer, P. (1959). Curso de Botánica general y aplicada. Barcelona: Labor S.A. pp. 483.
- Ghassemi, F., Jakeman, A.J. y Nix, H.A. (1995). Salinisation of land and water resources. *CAB International, Wallingford, England*.
- Grieve, C.M. y Grattan, S.R. (1983). Rapid assay for determination of water-soluble quaternary ammonium-compounds. *Plant and Soil*. 70, 303-307.
- Haissig, B.E. y Dickson, R.E. (1979). Starch measurements in plant tissue using enzymatic hydrolysis. *Plant Physiology*. 47, 151-157.

- Hodge, J.E. y Hofreites, B.T.** (1962). Determination of reducing sugars and carbohydrates. En: Whistler, R.L. y Wolfrom, M.L. (eds) *Methods in carbohydrate chemistry*. New York: Academic Press. pp. 380-394.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F. y Prange, R.K.** (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*. 207, 604-611.
- Jackson, M.B.** (2006). Plant survival in wet environments: resilience and escape mediated by shoot systems. En: Bobbink, R., Beltman, B., Verhoeven, J.T.A. y Whigham, D.E. (eds.) *Wetlands: Functioning, Biodiversity, Conservation, and Restoration. Ecological Studies*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 15-36.
- Jackson, M.B., Young, S. y Hall, K.C.** (1988). Are roots a source of abscisic acid for the shoots of flooded pea plants? *Journal of Experimental Botany*. 39, 1631-1637.
- Janiesch, P.** (1991). Ecophysiological adaptations of higher plants to waterlogging. En Rozema, J. y Verkleij, J.A.C. (eds.) *Ecological Responses to Environmental Stresses*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer. pp. 50-60.
- Kennedy, R.A., Fox, T.C., Everard, J.D. y Rumpho, M.E.** (1991). Biochemical adaptations to anoxia: potential role of mitochondrial metabolism to flood tolerance in *Echinochloa phyllopogon* (barnyard grass). En: Jackson, M.B., Davies, D.D. y Lambers, H. (eds.) *Plant Life Under Oxygen Deprivation*. The Hague: SPB Academic Publishing. pp. 217-227.
- Kozlowski, T.T.** (1982). Water supply and tree growth. Part II. *Flooding Forestry Abstract*. 43, 145-161.
- Kozlowski, T.T.** (1984). Responses of woody plants to flooding. En: Kozlowski, T.T. (ed.) *Flooding and Plant Growth*. Orlando, FL: Academic Press. pp. 129-163.
- Kozlowski, T.T.** (1997). Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology Monograph*. 1, 1-17.
- Kozlowski, T.T. y Pallardy, S.G.** (1984). Effects of flooding on water, carbohydrate, and mineral relations. En: Kozlowski, T.T. (ed.) *Flooding and Plant Growth*. Orlando, FL: Academic Press. pp. 165-193.
- Kozlowski, T.T. y Pallardy, S.G.** (1997). Growth control in woody plants. San Diego: *Academic Press*.
- Lindberg, T., Granhall, U. y Berg, B.** (1979). Ethylene formation in some coniferous forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 11, 637-643.
- Lynch, J.M.** (1975). Ethylene in the soil. *Nature*. 256, 576-577.
- Mars, M.** (1998). Pomegranate plant material: genetic resources and breeding (review) Orihuela (Alicante): I Symposium Internacional sobre el granado. MV-0.
- Martínez, J.J. y Hernández, F.** (2010). Material vegetal y técnicas de cultivo. En Hernández, F., Legua, P. y Melgarejo, P. (eds.) *I Jornadas Nacionales sobre el granado: Producción, economía, industrialización, alimentación y salud*. Valencia: SPE3. pp. 29-40.
- Medina, C.L., Sánchez, M.C., Tucci, M.L.S., Sousa, C.A.F., Cuzzuol, G.R.F. y Joly, C.A.** (2009). *Erythrina speciosa* (Leguminosae-Papilionoideae) under soil water saturation: morphophysiological and growth responses. *Annals of Botany*. 104, 671-680.
- Melgarejo, P.** (2010). Conferencia general: El granado, su problemática y usos. En: Hernández, F., Legua, P. y Melgarejo, P. (eds.) *I Jornadas Nacionales sobre el granado: Producción, economía, industrialización, alimentación y salud*. Valencia: SPE3. pp. 7-27.
- Melgarejo, P. y Martínez, R.** (1992). El granado. Madrid: *Ed. Mundi-Prensa*. pp. 163.
- Melgarejo, P. y Salazar, D.M.** (1993). Tipificación varietal de granado (*Punica granatum* L.). *Agrícola Vergel*. 260-262.
- Melgarejo, P. y Salazar, D.M.** (2003). Capítulo II. Granado. Tratado de Fruticultura, Vol. II. Madrid: *Ed. Mundi-Prensa*. pp. 167-218.
- Nelson, M.** (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 153-375.
- Neuman, D.S., Smith, B.A.** (1991). The influence of leaf water status and ABA on leaf growth and stomata of *Phaseolus* seedlings with hypoxic roots. *Journal of Experimental Botany*. 42, 1499-1506.
- Nicolás, E., Torrecillas, A., Dell'Amico, J. y Alarcón, J.J.** (2005). The effect of short-term flooding on the sap flow, gas exchange and hydraulic conductivity of young apricot trees. *Trees*. 19, 51-57.
- Olcina, J. y Rico, A.M.** (2000). Estudios sobre lluvias torrenciales e inundaciones en la provincia de Alicante. *Serie Geográfica*. 9, 71-92.
- Olmo-Vega, A., García-Sánchez, F., Simón, S., Simón, I., Lidón, V., Melgarejo, P. y Martínez-Nicolás, J.J.** (2015). Estudio de las respuestas fisiológicas de distintas variedades de granado a la inundación. *Agrícola Vergel*. 384 pp. 193-198.



- Olmo-Vega, A., García-Sánchez, F., Simón, S., Simón, I., Lidón, V., Melgarejo, P. y Martínez-Nicolás, J.J. (2015). Efectos de la inundación en tres variedades de granado: aspectos fisiológicos y morfológicos. *XIV Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas*. Orihuela.
- Pezeshki, S.R. (1994). Responses of baldcypress (*Taxodium distichum*) seedlings to hypoxia: leaf protein content, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity and photosynthesis. *Photosynthetica*. 30, 59-68.
- Pezeshki, S.R., Pardue, J.H. y DeLaune, R.D. (1996). Leaf gas exchange and growth of flood-tolerant and flood-sensitive tree species under low soil redox conditions. *Tree Physiology*. 16, 453-458.
- Phung, J.T. y Knipling, E.B. (1976). Photosynthesis and transpiration of citrus seedlings under flooded conditions. *HortScience*. 11, 131-133.
- Ponnamperuma, F.N. (1984). Effects of flooding on soils. En: Kozłowski, T.T. (ed.) *Flooding and Plant Growth*. Orlando, FL: Academic Press. pp. 9-45.
- Quarrie, S.A., Whitford, P.N., Appleford, N.E.J, Wang, T.L., Cook, S.K., Henson, I.E. y Loveys, B.R. (1988). A monoclonal antibody to (S)- abscisic acid: its characterization and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta*. 173, 330-339.
- Región de Murcia digital. (2004). Historia de la majada.  
<[http://www.regmurcia.com/servlet/s.SI?sit=a,139,c,373,m,1871&r=ReP-13897-DETALLE\\_REPORTAJESPADRE](http://www.regmurcia.com/servlet/s.SI?sit=a,139,c,373,m,1871&r=ReP-13897-DETALLE_REPORTAJESPADRE)> [Consulta: 01 de Marzo 2015]
- Rodríguez-Gamir, J., Ancillo, G., González-Mas, M.C., Primo-Millo, E., Iglesias, D.J. y Forner-Giner, M.A. (2011). Root signalling and modulation of stomatal closure in flooded citrus seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49, 636-645.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J.A., Hilal, M. y Prado, F.E. (2009). Soluble sugars-Metabolism, sensing and abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*. 4, 388-393.
- Sairam, R.K., Kumutha, D., Ezhilmathi, K., Deshmukh, P.S. y Srivastava, G.C. (2008). Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. *Plant Biology*. 52, 401-412.
- Sánchez-Monge, E. (1974). Fitogenética (mejora de plantas). Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias-Ministerio de Agricultura. pp. 456.
- Scholander, P., Hammel, H., Bradstreet, E.Y. y Hemmingsen, E. (1965). Sap pressure in vascular plants. *Science*. 148, 339-346.
- Sena-Gomes, A.R. y Kozłowski, T.T. (1980). Responses of *Pinus halepensis* seedlings to flooding. *Canada Journal of Forest Research*. 10, 308-311.
- Shaybany, B. y Martin, G.C. (1977). Abscisic acid identification and its quantitation in leaves of *Juglans* seedlings during waterlogging. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 102, 300-302.
- Simón, I. (2012). *Estudio de la tolerancia a la salinidad, toxicidad por boro e inundación en plantas de Jatropha curcas L.* Tesis. Orihuela: UMH.
- Smith, G.S., Judd, M.J., Miller, S.A. y Buwalda, J.G. (1990). Recovery of kiwi vines from transient waterlogging of the root system. *New Phytologist*. 115, 325-333.
- Somogyi, M. (1952). Note on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*. 195, 19-23.
- Syvetsen, J.P., Zablutowicz, R.M. y Smith, Jr. M.L. (1983). Soil temperature and flooding effects on two species of citrus. I. Plant growth and hydraulic conductivity. *Plant and Soil*. 72, 3-12.
- Westwood, N.H. (1982). Fruticultura de Zonas Templadas. Madrid: Ed. Mundi-Prensa. pp. 461.
- Wu, Y., Kuzma, J., Marechal, E., Graeff, R., Lee, H.C., Foster, R. y Chua, N.H. (1997). Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* 278, 2126-2130.
- Yamamoto, F., Kozłowski, T.T. (1987). Effects of flooding, tilting of stems, and ethrel application on growth, stem anatomy, and ethylene production of *Acer platanoides* seedlings. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 2, 141-156.
- Yamamoto, F., Sakata, S. y Tenazawa, K. (1995). Physiological, morphological and anatomical responses of *Fraxinus mandshurica* seedlings to flooding. *Tree Physiology*. 15, 713-719.
- Yordanova, R.Y. y Popova, L.P. (2007). Flooding-induced changes in Photosynthetic activity and oxidative status in maize plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 29, 535-541.
- Zaerr, J. (1983). Short-term flooding and net photosynthesis in seedlings of three conifers. *Forestry Science*. 29, 71-78.
- Zhang, J. y Davies, W.J. (1987). ABA in roots and leaves of flooded pea plants. *J. Exp. Bot.* 38, 649-659.

- Zhang, J. y Davies, W.J.** (1990). Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. *Plant Cell Environment*. 13, 277-286.
- Zhang, J. y Zhang, X.** (1994). Can early wilting of old leaves account for much of the ABA accumulation in flooded pea plants? *Journal of Experimental Botany*. 45, 1335-1342.
- Zhang, J., Schurr, U. y Davies, W.J.** (1987). Control of stomatal behaviour by abscisic acid which apparently originates in the roots. *Journal of Experimental Botany*. 38, 1174-1181.
- Zhang, W.B. y Tyerman, S.D.** (1991). Effects of low oxygen concentration and azide on hydraulic conductivity and osmotic volume of the cortical cells of roots. *Australian Journal of Plant Physiology*. 18, 603-613.



