

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA TOLERANCIA A LA INUNDACIÓN, SALINIDAD Y TOXICIDAD POR BORO EN TRES VARIEDADES DE GRANADO (*Punica granatum* L.)

ANTONIO OLMO VEGA

2021

DIRECTOR

Dr Juan José Martínez Nicolás

CODIRECTOR

Dr Francisco García Sánchez

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

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS Y TECNOLOGÍAS
AGRARIAS, AGROAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS**





**PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS Y TECNOLOGÍAS
AGRARIAS, AGROAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS**

**ESTUDIO DE LA TOLERANCIA A LA
INUNDACIÓN, SALINIDAD Y TOXICIDAD POR
BORO EN TRES VARIEDADES DE GRANADO
(*Punica granatum* L.)**

ANTONIO OLMO VEGA

TESIS DOCTORAL

2021

DIRECTOR

DR. JUAN JOSÉ MARTÍNEZ NICOLÁS

CODIRECTOR

DR. FRANCISCO GARCÍA SÁNCHEZ

ESTUDIO DE LA TOLERANCIA A LA INUNDACIÓN, SALINIDAD Y TOXICIDAD POR BORO EN TRES VARIEDADES DE GRANADO (*Punica granatum* L.)

CALIDAD DEL COMPENDIO DE CADA PUBLICACIÓN

Esta tesis se presenta como compendio de las siguientes publicaciones:

Olmo-Vega, A., García-Sánchez, F., Simón-Grao, S., Simón, A., Lidón, V., Nieves, M., Martínez-Nicolás, J.J. (2017). Physiological responses of three pomegranate cultivars under flooded conditions. *Scientia Horticulturae*. 224, 171–179.

DOI: 10.1016/j.scienta.2017.06.013

JCR (2019) 2,769. HORTICULTURAE. CUARTIL: Q1

Olmo, A., García-Sánchez, F., Simón, I., Lidón, V., Alfosea-Simón, M., Cámara-Zapata, J.M., Martínez-Nicolás, J.J., Simón-Grao, S. (2019). Characterization of the ecophysiological responses of three pomegranate cultivars to salinity. *Photosynthetica*. 57(4), 1015–1024.

DOI: 10.32615/ps.2019.103

JCR (2019) 2,562. PLANT SCIENCES. CUARTIL: Q2

Olmo-Vega, A., Simón-Grao, S., Simón, I., Alfosea-Simón, M., Martínez-Nicolás, J.J., García-Sánchez, F. (2020). The high tolerance of different pomegranate cultivars to the excess of Boron in irrigation water is due to their capacity to limit Boron transport from the root to the leaves. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 184, 142–149.

DOI: 10.1002/jpln.202000301

JCR (2019) 2,823. AGRONOMY. CUARTIL: Q2

Physiological responses of three pomegranate cultivars under flooded conditions

Antonio Olmo-Vega ^a, Francisco García-Sánchez ^b  , Silvia Simón-Grao ^b, Inmaculada Simón ^a, Vicente Lidón ^a, Manuel Nieves ^a, Juan J. Martínez-Nicolás ^a  

Editor: Satoru Kondo

ISSN: 0304-4238 1874-9380

Ámbito de la publicación: Horticulture

Categoría JCR	Categoría del cuartil	Rango	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
Horticulture	Q1	5/36	2,769 (2019)	2,844

DOI: 10.32615/ps.2019.103

.57 (4): 1015-1024, 2019

Characterization of the ecophysiological responses of three pomegranate cultivars to salinity

A. OLMO*, F. GARCIA-SANCHEZ**+, I. SIMON*, V. LIDON*, M. ALFOSEA-SIMON**, J.M. CAMARA-ZAPATA*, J.J. MARTINEZ-NICOLAS*+, and S. SIMON-GRAO**

Editor: Yours, AE

ISSN: 1573-9058

Ámbito de la publicación: Plant sciences

Categoría JCR	Categoría del cuartil	Rango	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
Plant Sciences	Q2	67/234	2,562 (2019)	2,838

The high tolerance of different pomegranate cultivars to the excess of boron in irrigation water is due to their capacity to limit boron transport from the root to the leaves

Antonio Olmo-Vega¹, Silvia Simón-Grao², Inmaculada Simón¹, Marina Alfosea-Simón¹, Juan José Martínez-Nicolás^{1*}, and Francisco García-Sánchez^{2*}

¹ Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández, Carretera de Beniel, km 3.2, Orihuela, Alicante, Spain

² Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus Universitario de Espinardo, Espinardo 30100, Murcia, Spain

Editor: Karl H. Mühling

ISSN: 1522-2624

Ámbito de la publicación: Agronomy

Categoría JCR	Categoría del cuartil	Rango	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
Agronomy	Q2	24/91	2,083 (2019)	2,823



Dr. Dña. Juana Fernández López, Catedrática de Universidad y Coordinadora del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (ReTos-AAA) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH).

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada "**Estudio de la tolerancia a la inundación, salinidad y toxicidad por boro en tres variedades de granado (*Punica granatum* L.)**", de la que es autor el Ingeniero Agrónomo **D. Antonio Olmo Vega**, ha sido realizada bajo la dirección del **Dr. Juan José Martínez Nicolás**, Catedrático de Escuela Universitaria de la UMH y la codirección del **Dr. Francisco García Sánchez**, Científico Titular del CEBAS-CSIC, actuando como tutora la **Dra. Dña. María Asunción Amorós Marco**, Profesora Titular de la UMH. Considero que la tesis es conforme en cuanto a forma y contenido a los requerimientos del Programa de Doctorado ReTos-AAA, siendo, por tanto, apta para su exposición y defensa pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Orihuela a veintiuno de mayo de dos mil veintiuno.

Dra. Dña. Juana Fernández López

Coordinadora del Programa Doctorado ReTos-AAA



Esta memoria ha sido presentada por **D. Antonio Olmo Vega**, Ingeniero Agrónomo y Máster en Técnicas Avanzadas para la Investigación y Producción en Fruticultura por la Universidad Miguel Hernández de Elche para obtener el título de doctor.

Fdo. Antonio Olmo Vega

Esta tesis doctoral ha sido dirigida por el **Dr. Juan José Martínez Nicolás**, Catedrático de Escuela Universitaria del Departamento de Producción Vegetal y Microbiología de la Universidad Miguel Hernández de Elche y codirigida por el **Dr. Francisco García Sánchez**, Científico Titular del Departamento de Nutrición Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC).

Dr. Juan José Martínez Nicolás

Dr. Francisco García Sánchez

Catedrático de Escuela
Universitaria

Científico Titular

Dpto. Producción Vegetal y
Microbiología (UMH)

Dpto. Nutrición Vegetal
(CEBAS-CSIC)

Orihuela, mayo de 2021

Agradecimientos

A mis directores de la tesis Dr. Juan José Martínez Nicolas y Dr. Francisco García Sánchez, por su gran implicación y apoyo durante estos años, resolviendo siempre de forma eficiente cualquier problema que nos ha ido surgiendo.

Al departamento de Producción Vegetal y Microbiología de la EPSO y al grupo de trabajo de Nutrición Vegetal del CEBAS-CSIC (Silvia Simón, Marina Alfosea, Inma Simón, Vicente Lidón y a sus técnicos Ginés, Joaquín, Alejandro y Julián), por su imprescindible colaboración y por los buenos ratos que hemos pasado juntos tanto en la finca experimental de Santomera como en los laboratorios del CEBAS. Gran grupo tanto en lo profesional como en lo personal.

A mis compañeros de la EPSO y de Lancaster, por las experiencias vividas durante mis años en la universidad y a los amigos que me llevo para toda la vida.

Especial mención a mi familia, amigos y pareja, por su apoyo incondicional y por los momentos de alegría, positivismo y motivación cuando más lo he necesitado.

Y, en general, a todas esas personas amarillas que me han ayudado a crecer y que han contribuido al muy buen recuerdo que me llevo de mis años de doctorando.

A todos ellos, muchas gracias.

A mi familia, que crece día a día y a todos los que se sienten parte de ella

ÍNDICE

1. ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS	1
2. ESTRUCTURA DE LA TESIS	7
3. RESUMEN Y ABSTRACT	13
4. INTRODUCCIÓN	19
4.1. IMPORTANCIA SOCIO-ECONÓMICA DEL GRANADO EN EL SURESTE ESPAÑOL	21
4.2. PROBLEMAS A LOS QUE SE ENFRENTA LA AGRICULTURA EN EL LEVANTE ESPAÑOL	23
4.3. RESPUESTAS DE LOS CULTIVOS A LA INUNDACIÓN	24
4.4. RESPUESTAS DE LOS CULTIVOS A LA SALINIDAD	28
4.5. RESPUESTAS DE LOS CULTIVOS AL EXCESO DE BORO	31
5. OBJETIVOS	37
6. MATERIALES Y MÉTODOS	41
6.1. MATERIAL VEGETAL	43
6.2. CONDICIONES DE CULTIVO	43
6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL	44
6.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	49
6.4.1 Concentración de oxígeno agua inundación	49
6.4.2 Relaciones hídricas	49
6.4.3 Parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas	50
6.4.4 Parámetros de crecimiento vegetativo	51
6.4.5 Concentración de prolina y compuestos de amonio cuaternario	51
6.4.6 Concentración de carbohidratos	51
6.4.7 Concentración de nutrientes minerales y cloruros	52
6.4.8 Concentración de MDA y H ₂ O ₂	52
6.4.9 Concentración de ABA	52
6.4.10 Relaciones alométricas	52
6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
7. PUBLICACIONES	57
7.1. PUBLICACIÓN 1	59

7.2. PUBLICACIÓN 2	71
7.3. PUBLICACIÓN 3	85
8. RESUMEN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	97
8.1. PUBLICACIÓN 1	99
8.1.1 Resumen de resultados y discusión	99
8.1.2 Conclusiones	103
8.2. PUBLICACIÓN 2	104
8.2.1 Resumen de resultados y discusión	104
8.2.2 Conclusiones	107
8.3. PUBLICACIÓN 3	108
8.3.1 Resumen de resultados y discusión	108
8.3.2 Conclusiones	111
9. CONCLUSIONES GENERALES	113
10. INVESTIGACIONES FUTURAS	119
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

1. ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

1. ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

ABREVIACIONES

ABA	Ácido abscísico
C_{A1}	Contenido del nutriente en la parte aérea en el muestreo para t1
C_{A2}	Contenido del nutriente en la parte aérea en el muestreo para t2
CE	Conductividad eléctrica
C_{T1}	Contenido total de boro en el muestreo para t1
C_{T2}	Contenido total de boro en el muestreo para t2
E	Transpiración foliar
LDW	Peso seco de hoja
M₁	Biomasa total seca en el muestreo para t1
M₂	Biomasa total seca en el muestreo para t2
MDA	Malondialdehído
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
PSII	Fotosistema II
QAC	Compuestos de amonio cuaternario
R₁	Peso seco radicular muestreo para t1
R₂	Peso seco radicular muestreo para t2
RDW	Peso seco de raíz
RGR	Tasa de crecimiento relativo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RS	Azúcares reductores
CRA	Contenido relativo de agua
SDW	Peso seco de tallo
SN	Solución nutritiva
t₁	Tiempo muestreo 1
t₂	Tiempo muestreo 2
TDW	Peso seco total
TNC	Carbohidratos no estructurales
TSS	Azúcares solubles totales

SÍMBOLOS

Ψ_w	Potencial hídrico
Ψ_π	Potencial osmótico
Ψ_p	Potencial de turgor
A_{CO_2}	Asimilación neta de CO_2
g_s	Conductancia estomática
C_i	Concentración subestomática de CO_2
Φ_{PSII}	Eficiencia cuántica del PSII
F_v'/F_m'	Eficiencia de las antenas en los centros de reacción del PSII
qP	Coefficiente de decaimiento fotoquímico o quenching fotoquímico

2. ESTRUCTURA DE LA TESIS

2. ESTRUCTURA DE LA TESIS

Para la elaboración de la presente tesis doctoral se ha seguido la metodología basada en la publicación de un compendio de artículos de investigación siguiendo la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

La estructura de esta tesis doctoral consta de las siguientes partes:

- **Resumen.** Incluye una exposición abreviada de los resultados y conclusiones más relevantes.
- **Introducción.** Contiene una breve revisión bibliográfica sobre la importancia del cultivo del granado, de las particularidades edafoclimáticas e hídricas de las zonas de cultivo en el sureste español y de los mecanismos fisiológicos implicados en los estreses que se han aplicado en el estudio.
- **Objetivos.** Se describen los objetivos generales de la tesis, así como los objetivos específicos.
- **Resumen de la metodología.** Se explican las condiciones experimentales de los ensayos llevados a cabo, así como las distintas determinaciones realizadas e instrumental utilizado para la medición de los parámetros analizados.
- **Publicaciones científicas.** Artículos publicados que componen la base de la tesis doctoral, el estudio de las respuestas ecofisiológicas y mecanismos de adaptación de tres de los estreses abióticos más comunes en el cultivo del granado.
 - En la primera publicación (*Scientia Horticulturae*. 224, 171–179), las plantas fueron sometidas a condiciones de inundación, causando situaciones de hipoxia y anoxia radicular.
 - En la segunda publicación (*Photosynthetica*. 57(4), 1015–1024), se aplicaron distintos tratamientos salinos mediante el agua de riego.
 - En la tercera publicación (*Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 184, 142–149), se emplearon distintas concentraciones de boro en el agua de riego 0,25-10 mg B L⁻¹.
- **Resumen de los resultados, discusión y conclusiones.** Análisis y resumen de los resultados y conclusiones obtenidos en cada uno de los ensayos realizados.

- **Conclusiones generales.** Conclusiones globales de los estudios que forman parte de la tesis doctoral.
- **Investigaciones futuras.** Posibles nuevas líneas de trabajo futuras.
- **Referencias bibliográficas.** Todas las referencias utilizadas para la elaboración de esta memoria, sin tener en cuenta el apartado 7 de Publicaciones.

3. RESUMEN Y ABSTRACT

3. RESUMEN

El granado (*Punica granatum* L.) es un cultivo importante del sureste español, conocido por su gran resistencia a estreses abióticos como la salinidad o la sequía. Sin embargo, no se conoce todavía su comportamiento bajo situaciones de inundación o riego con exceso de boro. Estas condiciones son muy comunes en la zona del levante español debido, por un lado, a la presencia de suelos pesados con alto contenido en sodio y a las lluvias torrenciales que se dan en primavera y otoño y, por otro lado, al riego frecuente de aguas procedentes de desaladoras con alto contenido en boro. Aunque se sabe que este frutal es tolerante a la salinidad, no se conoce con detalle sus mecanismos fisiológicos de adaptación a este estrés. La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal caracterizar las respuestas de los árboles de granado a estos tres estreses: inundación, salinidad y riego con exceso de boro. Para ello, se realizaron tres experimentos independientes en invernadero con tres de las variedades más cultivadas en España: ‘Mollar de Elche’, ‘Valenciana’ y ‘Wonderful’, correspondiendo cada uno de ellos a un capítulo de la tesis.

En el experimento de inundación se sumergió la zona radicular de las plantas en contenedores llenos de agua durante 6 días; en el ensayo de salinidad se aplicaron 7 tratamientos salinos (0, 40, 60, 80, 100, 120, 140 mM de NaCl) durante 60 días; y en el ensayo de boro las plantas se regaron con 5 tratamientos con diferentes concentraciones de B (mg L^{-1} B): T0 (0,25), T1 (1,25), T2 (2,5), T3 (5) y T4 (10) durante 60 días. En el transcurso de los ensayos se midieron parámetros de crecimiento, intercambio gaseoso, fluorescencia de clorofilas, relaciones hídricas, concentración de cloruro, boro y elementos minerales tanto en raíces como en hojas, concentración de ácido abscísico, MDA, y osmolitos como carbohidratos, prolina y compuestos de amonio cuaternario (QAC).

Las conclusiones más significativas para cada uno de los experimentos fueron:

- **Inundación:** Las variedades de granado son muy sensibles a las condiciones de inundación; sin embargo, se pudo observar diferente tolerancia relativa entre ellas. De las tres variedades estudiadas, ‘Valenciana’ fue en la que antes se vieron efectos negativos en las relaciones hídricas, parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas. En esta variedad también se produjo la mayor reducción en la biomasa seca total y se dio una respuesta hormonal deficiente. Entre las otras dos variedades, se observó que a la variedad ‘Mollar de Elche’ le afectó menos la inundación que a ‘Wonderful’.

- **Salinidad:** Los resultados mostraron que el granado es una planta tolerante a la salinidad, gracias a su capacidad para acumular mayor concentración de cloruros en raíz y limitar su transporte a la parte aérea de la planta. No obstante, se apreciaron algunos efectos negativos en las hojas como consecuencia de la toxicidad por cloruros que causaron daños en la asimilación neta de CO₂, procesos de captación de luz y en los procesos bioquímicos de la fotosíntesis. La variedad ‘Valenciana’ presentó una menor sensibilidad a la toxicidad por cloruro que las variedades ‘Mollar de Elche’ y ‘Wonderful’.
- **Exceso de boro:** En este ensayo se observó que los árboles de granado son muy tolerantes al exceso de boro en el agua de riego. Esto es gracias a que estos árboles pueden restringir el transporte de B desde la raíz a la parte aérea del árbol, evitando así concentraciones tóxicas en las hojas. Además, esta baja tasa de transporte está relacionada con la alta capacidad que tienen las raíces de acumular gran cantidad de boro sin que su desarrollo se vea afectado. No se observaron grandes diferencias entre los tres cultivares ensayados.

ABSTRACT

Pomegranate (*Punica granatum* L.), is an important crop in the southeastern area on Spain and is known for its great resistance to abiotic stresses such as salinity or drought. However, up to today, the effect of irrigation with water that contains a high concentration of Boron or its behaviour under flooding conditions has not yet been studied deeply. These two conditions are very common in eastern Spain. On the one hand, due to the presence of heavy soils and torrential rains that occur in spring and autumn, and, on the other, to the frequent irrigation of water, from desalination plants, with high boron content. Although it is known that this fruit tree is tolerant to salinity, its physiological mechanisms of adaptation to this stress are not known in detail. The main objective of this doctoral thesis is to characterise the responses of pomegranate trees to these three stresses: flooding, salinity and irrigation with excess boron. To do this, three independent greenhouse experiments were carried out with three of the most popular varieties cultivated in Spain: 'Mollar de Elche', 'Valenciana' and 'Wonderful'. Each of these stresses corresponds to a chapter of the thesis. In the flood experiment, plants were submerged for six days in containers filled with water. In the salinity trial, seven saline treatments (0, 40, 60, 80, 100, 120, 140 mM NaCl) were applied for 60 days. And, in the

boron trial, the plants were watered for 60 days with five treatments with different concentrations of B (mg L^{-1} B): T0 (0.25), T1 (1.25), T2 (2.5), T3 (5) and T4 (10). During the course of the experiments, growth parameters, gas exchange, chlorophyll fluorescence, water relations, concentration of chloride, boron and mineral elements in both roots and leaves, concentration of abscisic acid and secondary osmolytes such as carbohydrates, proline and quaternary ammonium compounds were measured.

The most significant conclusions for each of the experiments were:

- **Flooding:** Pomegranate varieties are very sensitive to flooding conditions. However, different relative tolerance between them were observed. Of the three varieties studied, the one that previously exhibited negative effects on water relations, gas exchange parameters and chlorophyll fluorescence was 'Valenciana'. In this variety, the greatest reduction in total dry biomass and a poor hormonal response was observed. Between the other two varieties, it was observed that 'Mollar de Elche' was less affected by the flooding than 'Wonderful'.
- **Salinity:** The results showed that the pomegranate is a salinity-tolerant plant thanks to its ability to accumulate a higher concentration of chlorides in the root and limiting its transport to the aerial part of the plant. However, there were some negative effects on the leaves as a consequence of chloride toxicity that caused damages to the net assimilation of CO_2 , light capture processes, and the biochemical processes of photosynthesis. The 'Valenciana' variety presented a lower sensitivity to chloride toxicity relative to 'Mollar de Elche' and 'Wonderful' varieties.
- **Boron excess:** In this assay it was observed that pomegranate trees are very tolerant to boron excess in irrigation water. And, this is thanks to the fact that these trees can restrict the absorption of B from the root to the aerial part of the trees, thus avoiding toxic concentrations in the leaves. In addition, this low transport rate is related to the high capacity of the roots to accumulate a large amount of B without affecting it. No great differences in behaviour was observed among the three cultivars tested.

4. INTRODUCCIÓN

4. INTRODUCCIÓN

4.1. IMPORTANCIA SOCIO-ECONÓMICA DEL GRANADO EN EL SURESTE ESPAÑOL

En la actualidad, el granado es uno de los cultivos frutales emergentes más importantes a nivel mundial. El área total dedicada al cultivo de granadas en el mundo está por encima de 450.000 ha con una producción superior a las 4.500.000 t, siendo los principales países productores India, China e Irán, donde se concentra casi el 90% de la producción mundial (Mercasa, 2019). Sin embargo, otros países como Egipto, Israel o España con superficies mucho menores, son los que más se han desarrollado en exportaciones, investigación, desarrollo de nuevos mercados y creación de nuevas variedades (Melgarejo et al. 2015). España es el principal productor y exportador de granadas de la UE, destacando por encima de países productores de la cuenca mediterránea como Turquía y Túnez tanto por aspectos referentes al cultivo como por tener una red comercial más desarrollada y moderna (Melgarejo et al. 2012).

El granado en España se ha caracterizado históricamente por ser un cultivo de gestión familiar predominando las fincas de pequeño tamaño (menos de 1,4 ha de media) y con una superficie de cultivo estable durante años en torno a las 2.500 ha (Bartual et al. 2013). En los últimos años han sido muchos los estudios que han mostrado las propiedades beneficiosas para la salud de la granada, lo que ha conducido a un aumento de la demanda a nivel mundial y a un incremento en los precios en origen (0,822 € kg⁻¹ para la variedad ‘Valenciana’ y 0,544 € kg⁻¹ para la ‘Mollar de Elche’ en 2017) (Fernández-Zamudio et al. 2017). Esto ha supuesto que la superficie de cultivo haya aumentado considerablemente, pasando de las 2.500 ha en 2010 a 5.645 ha en 2019 con un aumento de producción desde 26.582 t en 2010 a 72.065 t en 2017 (Figura 1) (MAPA, 2010, 2020).

La Comunidad Valenciana es la principal productora de granadas a nivel nacional, destacando el sur de Alicante con una superficie de 3.761 ha y una producción de 51.325 t en 2019 (MAPA, 2020). En la actualidad, la producción de granadas ha dejado de ser un cultivo marginal para pasar a ser uno de los cultivos más rentables de la provincia de Alicante con una gran importancia socioeconómica.

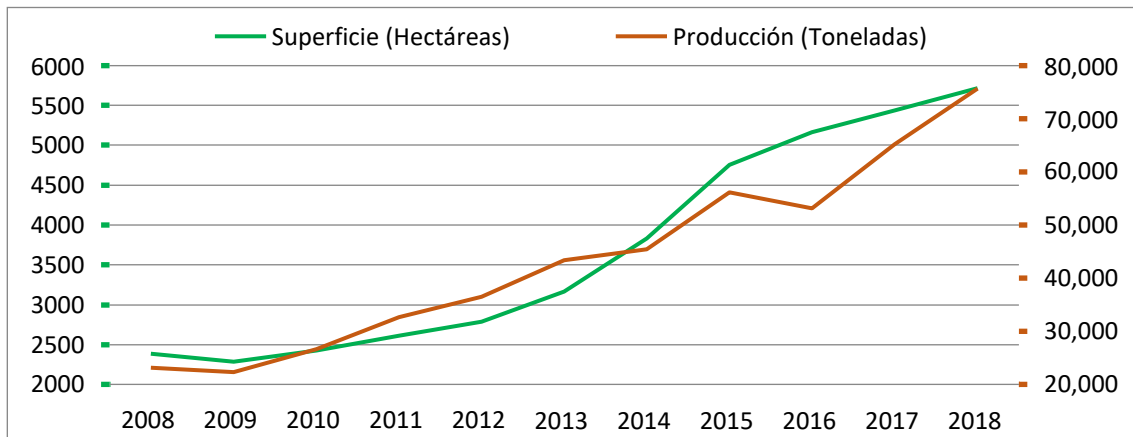


Figura 1. Evolución de la superficie total de granado en España (ha) y de la producción (t).

Fuente: MAPA, 2018.

En España se distinguen tradicionalmente dos grandes grupos varietales de interés comercial, el grupo Mollar y el grupo Valenciana. El grupo Mollar es el más importante, constituido por un gran número de clones, que se caracterizan por su alta calidad, buena productividad y amplia época de recolección que va desde el 25 de septiembre al 15 de noviembre. El grupo Valenciana, constituido también por un gran número de clones, se caracteriza por ser de recolección temprana, entre el 5 de agosto y el 20 de septiembre, y en comparación con el grupo Mollar tienen significativamente menos vigor y frutos de menor calidad (Melgarejo, 2010). Los principales países productores de granada y competidores de España, se caracterizan por producir variedades de sabor más ácido que las españolas. Hoy en día, la variedad de granada mundialmente más conocida y cultivada es ‘Wonderful’ que no pertenece al grupo de variedades Valenciana o Mollar (Figura 2). Es por eso que, en España, además de cultivar material vegetal autóctono, se ha introducido en los últimos años el cultivo de la ‘Wonderful’ por su alta demanda (Melgarejo, 2010).



Figura 2. A) ‘Mollar de Elche’. B) ‘Valenciana’. C) ‘Wonderful’.

Fuente: Cambayas Coop, 2020.

4.2. PROBLEMAS A LOS QUE SE ENFRENTA LA AGRICULTURA EN EL LEVANTE ESPAÑOL

Hoy en día, uno de los principales problemas a los que se enfrenta la agricultura en el mundo es el cambio climático. Los resultados del 5º Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC) confirman que el principal problema del cambio climático en todo el mundo, relacionado con la agricultura, será el incremento de la temperatura y los cambios en los patrones de distribución de la lluvia, intensificándose fenómenos meteorológicos extremos como las lluvias torrenciales y las sequías prolongadas (IPCC, 2014). Esto tendrá un gran impacto negativo en los cultivos de los países de clima mediterráneo como España, ya que causarán disminuciones significativas en la productividad agrícola. Además, se producirán frecuentes inundaciones como consecuencia de episodios de “gota fría” o de DANA (depresión atmosférica aislada en niveles altos), que perjudicarán seriamente a los cultivos (De Ollas et al. 2019). En septiembre del año 2019 las provincias de Murcia y Alicante sufrieron los efectos de una DANA, llegando a superar los 400 litros por metro cuadrado en Orihuela en apenas 24 horas (MITECO, 2019).

Según el análisis del Centro de Estudios Hidrográficos del CEDEX (CEDEX, 2017), las sequías serán cada vez más frecuentes y la competencia por los escasos recursos hídricos disponibles entre la agricultura, la industria y la población pueden restringir actividades de desarrollo e intensificar los conflictos existentes. Se estima que en las distintas cuencas hidrográficas españolas a final de este siglo, las reducciones de las aportaciones naturales pueden variar entre un 20% y un 40%, dependiendo de la proyección climática considerada (CEDEX, 2017).

Los diferentes recursos hídricos de los que disponen las zonas agrícolas del levante español se ven, hoy en día, bajo mucha presión. Los recursos superficiales procedentes de las lluvias de una región, sobre todo en los territorios más secos, están muy regulados por lo que no se prevé construir un número significativo de nuevas infraestructuras como canales, embalses, etc. Por otra parte, los acuíferos tienen unos índices de explotación muy elevados generándose graves situaciones de insostenibilidad en las que las extracciones superan la recarga natural, por lo que tampoco se prevé un aumento significativo de las captaciones subterráneas. No se vislumbra pues, en el futuro, un aumento de los recursos convencionales; por lo que, en los territorios con balances hídricos frágiles, la utilización de aguas salinas, la reutilización de aguas

residuales o la desalación, conjuntamente con la gestión de la demanda de los distintos sectores, están llamadas a jugar un papel clave sobre todo en situaciones extremas (Cabrera et al. 2019).

Por tanto, una gestión planificada y sostenible de los recursos, asegurando la sostenibilidad ambiental, así como el conocimiento de los requerimientos hídricos de los cultivos y la selección de variedades tolerantes son, hoy día, los objetivos prioritarios para la agricultura.

4.3. RESPUESTAS DE LOS CULTIVOS A LA INUNDACIÓN

El sureste español se caracteriza por un clima semiárido con una precipitación media anual que no sobrepasa los 300 mm (clasificación climática de Köppen–Geiger: BSh). Sin embargo, estas precipitaciones se concentran a finales de verano en forma de lluvias torrenciales. Además, en zonas de cultivo de granado existen suelos pesados, de baja permeabilidad y con alto contenido en sodio que causa dispersión de los coloides y el bloqueo de los poros del suelo, lo que facilita aún más su encharcamiento. Por todo esto, es frecuente que los cultivos en estas áreas sufran problemas de inundación.



Figura 3. Finca con granados en Elche tras una lluvia.

Fuente: Onda Cero Elche, 2019.

En condiciones de inundación, el agua ocupa los poros de aire del suelo saturándolo, disminuyendo su capacidad de difusión de gases y bajando la concentración de oxígeno en el suelo (Bhatt et al. 2015). Las condiciones de hipoxia y anoxia producen la descomposición anaeróbica de la materia orgánica, formando compuestos tóxicos que afectan seriamente a la absorción de agua y nutrientes por las raíces e incrementan la concentración de Fe y Mn en el suelo (Pucciarello y Perata,

2012; Syvertsen y García- Sánchez, 2014). Estos cambios producen en la planta la disminución de la tasa de asimilación neta de CO₂, alteraciones del estado hídrico, desequilibrios nutricionales y daños oxidativos, lo que conduce a que los cultivos experimenten epinastia, clorosis foliar, necrosis y abscisión foliar, causando una reducción de la producción y del crecimiento vegetativo (Jackson et al. 2002). En especies que no conviven frecuentemente con este estrés, se producen cambios morfológicos como un aumento de la relación raíz/parte aérea (Gimeno et al. 2012). Una respuesta común en estas plantas es también un rápido cierre estomático para evitar la pérdida de agua por transpiración (Arbona et al. 2008) regulado por un incremento del ácido abscísico (ABA) (Wu et al. 1997).

Para paliar los efectos negativos del déficit de oxígeno en el suelo, las plantas tolerantes a la inundación desencadenan una serie de señales químicas en la raíz que se transmiten a la parte aérea de la planta con el objetivo de inducir respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Colmer y Voisenek, 2009; Striker y Colmer, 2016). Una adaptación primaria de las plantas a la inundación es la capacidad de absorción de oxígeno por los tejidos aéreos y su transporte basípeto a través del tallo (Colmer, 2003). Por este mecanismo, la absorción de minerales por las raíces aumenta y los compuestos tóxicos de los suelos inundados son oxidados a compuestos no tóxicos gracias a la acción de microorganismos aeróbicos asociados a las raíces (Armstrong, 1975; Kozłowski y Pallardy, 1997). En estas condiciones también se activan los sistemas antioxidantes para disminuir la concentración de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y evitar así la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Lin et al. 2013). La absorción de oxígeno por los tejidos aéreos y su transporte y difusión eficiente hacia las raíces, son favorecidos por la producción de lenticelas hipertrofiadas, tejidos aerenquimáticos y raíces adventicias (Tewari y Mishra, 2018) (Figura 4). Una o más de estas adaptaciones pueden estar presentes en una misma planta cuando está sujeta a inundación (Hook, 1984). Las lenticelas facilitan el transporte de oxígeno a las raíces, contribuyendo a la recuperación y mantenimiento de la respiración aeróbica en plantas sometidas a inundación (Ferreira et al. 2009). La formación de lenticelas hipertrofiadas incluye un incremento de la actividad del felógeno y elongación de las células (Ángeles et al. 1986), además de favorecer la liberación de compuestos potencialmente tóxicos asociados con anaerobiosis como acetaldehído, etanol y etileno (Chirkova y Gutman, 1972). El etileno es un importante regulador de diversas respuestas adaptativas de las plantas bajo condiciones de inundación (Jackson, 2009). El aumento de la

concentración de etileno induce la formación de aerénquima, que facilita la aireación de órganos que se encuentran en ambientes acuáticos (Sasidharan y Voesenek, 2015). Se trata de un tejido parenquimático formado por separación o desintegración de células y su posterior ampliación a través del colapso de dichas células (Shimamura et al. 2007). Se ha observado en plantas de *Pinus serotina* y *Pinus taeda* que su mejor adaptación a las condiciones de inundación con respecto a *Pinus clausa* fue debido principalmente a la formación de tejidos aerenquimáticos en las raíces (Topa y McLeod, 1986). Las raíces adventicias son producidas sobre las raíces originales pudiendo aparecer por encima y/o por debajo de la porción sumergida del tallo, compensando fisiológicamente la pérdida de las funciones del sistema radicular original cuando están bajo inundación gracias a su alta porosidad que ayuda a la absorción de agua y nutrientes (Zhang et al. 2017), aumentando así la biomasa de la planta (Colmer, 2003). En algunas especies como la palma (*Elaeis guineensis*), la formación de neumatóforos mejoró la respuesta a la inundación, aumentando la biomasa radicular cuanto mayor era su número (da Ponte et al. 2019).

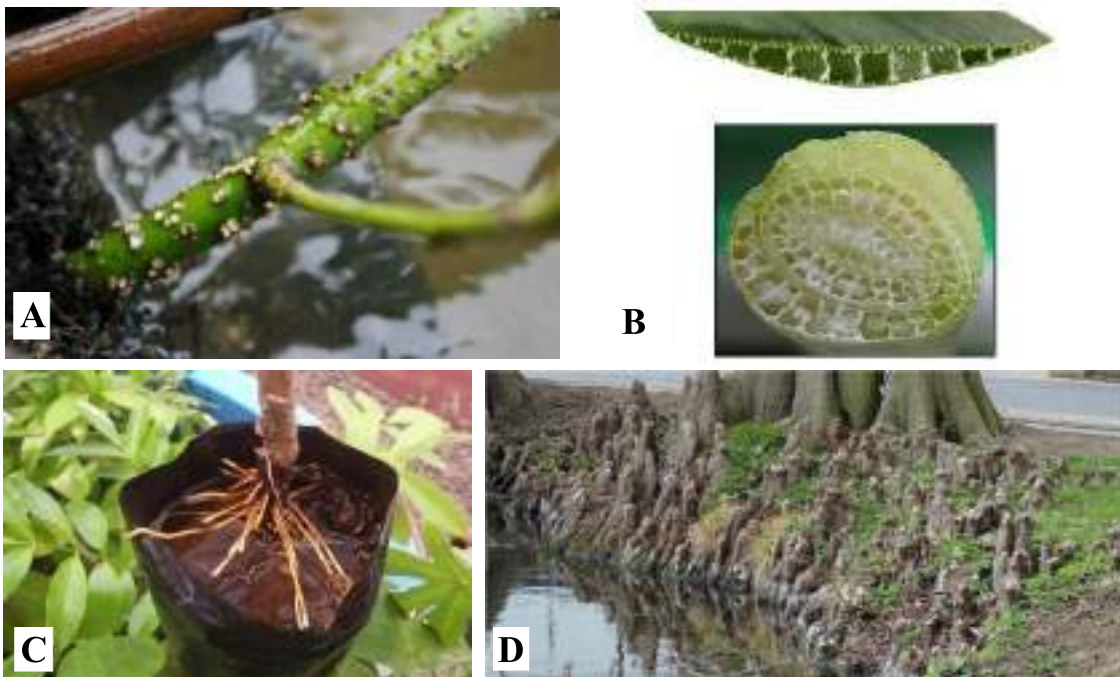


Figura 4. **A)** Lenticelas hipertrofiadas en tallo de aguacate (*Persea americana*). **B)** Aerénquima de hoja y tallo de espadaña (*Typha domingensis*). **C)** Raíces adventicias en ingá (*Inga uruguensis*). **D)** Neumatóforos en ciprés calvo (*Taxodium distichum*).

Fuente: **A)** Reuben Hofshi, 2014; **B)** Sofia Cerasoli, 2014; **C)** Bender et al. 2016; **D)** Lefeure, 2015.

La mayoría de los cultivos de frutales del área mediterránea del sureste español son muy sensibles a las condiciones de inundación. En los cítricos, por ejemplo, no se ha observado ninguna respuesta específica de estos árboles a las condiciones de hipoxia o anoxia, aunque sí que se han visto diferentes sensibilidades entre sus portainjertos. Los investigadores Partiya et al. (2017), estudiaron en Irán la tolerancia relativa de portainjertos de naranjo amargo, limón rugoso, naranjo trifoliado, citrange Troyer y dos variedades locales, CRC1 y CRC2. Observaron que naranjo trifoliado y citrange Troyer fueron los que más toleraron este estrés en un período de 60 días y que esta respuesta estuvo relacionada con la actividad de la enzima guaiacol peroxidasa, lo que sugiere que los sistemas antioxidantes pueden jugar un papel importante en la tolerancia a la inundación de este cultivo. En el género *Prunus* también se encuentra un gran rango de tolerancia a este estrés que va desde tolerantes a muy sensibles. Los portainjertos del género *Prunus*, *P. cerasifera* Ehrh. y *P. domestica* (L.), se consideran relativamente tolerantes a las inundaciones, mientras que *P. persica*, así como patrones híbridos de *P. persica* × *P. dulcis* [Mill.] D. A. Webb, se consideran sensibles a este tipo de estrés (Martinazzo et al. 2011; Insausti y Gorjon, 2013). El patrón híbrido melocotón-almendra ‘Monegro’ fue el más sensible a la inundación en un experimento en el que se evaluaron 12 portainjertos del género *Prunus*, ya que tras un período de inundación, el 80% de los árboles murieron (Mestre et al. 2015). Sin embargo, los portainjertos de ciruelo puros o híbridos mostraron una gran tolerancia medida por el porcentaje de mortalidad. El portainjerto de ciruelo mirobolano Sansavini 2/5 (Sr. S. 2/5) tiene una alta tolerancia a las inundaciones del suelo (Dichio et al. 2004), y se pueden utilizar como portainjertos para árboles de melocotonero (Muleo et al. 2006). Ziegler et al. (2017), identificaron que la mayor porosidad radical constitutiva de las raíces de estos árboles hace que sean tolerantes a la inundación.

En el caso del granado, en la bibliografía no se ha encontrado ningún estudio en el que se haga referencia a su tolerancia ni a la caracterización de sus respuestas fisiológicas para este estrés. Sí que se realizó un estudio en India en el que se comparó el riego por inundación con el riego por goteo, y que se concluyó que el riego por goteo incrementa en un 40% la producción de los árboles (Singh y Sharma, 2013). Además, los agricultores productores de granada del levante español indican que, en años de excesivas lluvias o DANA, los árboles de granado adquieren un color amarillento que en situaciones severas conduce a la disminución de la producción y la calidad de la cosecha. Esto parece indicar que los árboles de granado son muy sensibles al exceso de

agua en la zona radicular. Por lo tanto, en esta tesis doctoral es la primera vez que se estudia la tolerancia relativa de tres variedades de granado y se caracterizan las respuestas fisiológicas de este cultivo a la inundación.

4.4. RESPUESTAS DE LOS CULTIVOS A LA SALINIDAD

La falta de precipitaciones en la zona del levante español produce problemas de salinidad, ya que la escasez de agua de buena calidad obliga a los agricultores a utilizar aguas procedentes de acuíferos con una elevada concentración de sales solubles, principalmente NaCl. Se estima que en torno al 29% del suelo cultivable de la Comunidad Valenciana está afectado de forma alta o muy alta por la degradación física del suelo debido a la salinidad (de Paz et al. 2006). La salinidad produce cambios en diversas rutas metabólicas y fisiológicas dependiendo de la duración y severidad del estrés (Munns, 2005). Se ha descrito que produce un efecto devastador en las plantas en dos fases: i) la fase osmótica, más rápida, que reduce el crecimiento vegetativo y el desarrollo de hojas jóvenes y ii) la fase de toxicidad iónica, más lenta, donde se produce una acumulación de sal en hojas, daños en el aparato fotosintético y acelera la senescencia de hojas adultas y la muerte de la planta en especies susceptibles (Rahnama et al. 2010).

Bajo condiciones salinas, el potencial osmótico de la solución del suelo es muy bajo, lo que disminuye la disponibilidad y absorción de agua por las raíces, provocando la deshidratación de las hojas (Shabala y Munns, 2017). Este efecto osmótico, junto con la síntesis rápida del ABA en las raíces y su inmediata translocación a las hojas a través del xilema (Fricke, 2004), provoca un rápido y transitorio cierre estomático disminuyendo, por tanto, la conductancia estomática (Blatt y Armstrong, 1993). La inhibición de la conductancia estomática provoca una disminución del CO₂ que llega al mesófilo, reduciendo así la fotosíntesis neta (Brugnoli y Björkman, 1992). Esto ocasiona estrés oxidativo debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o radical hidroxilo (OH), que producen daños en la membrana por peroxidación lipídica y oxidación de proteínas y ácidos nucleicos (Ahmad et al. 2010). También se ha observado la reducción del contenido de clorofilas como una respuesta común en plantas bajo condiciones de estrés salino (Chutipaijit et al. 2011).

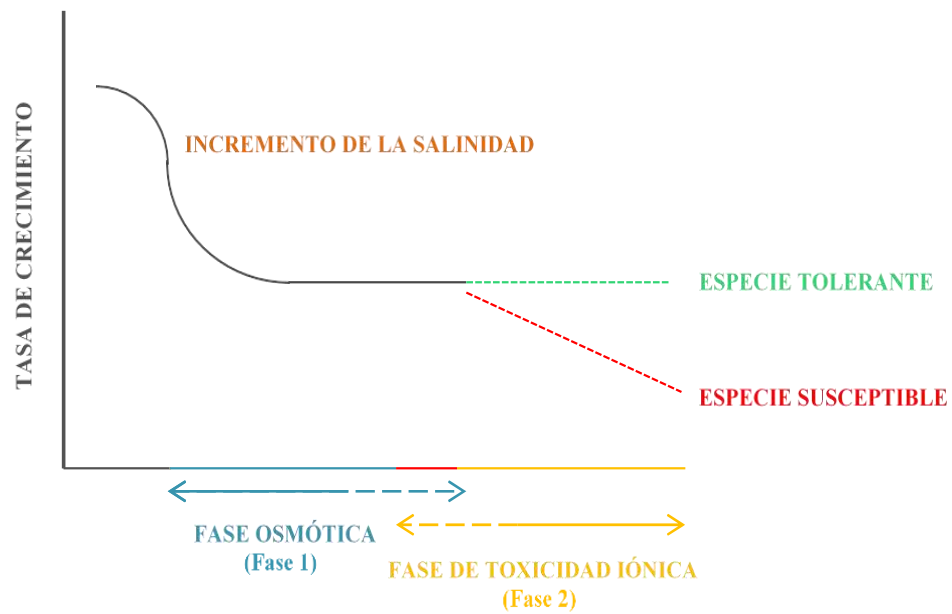


Figura 5. Respuesta en el crecimiento en las dos fases contra el estrés salino.

Fuente: Modificación de Munns y Tester, 2008.

En los suelos salinos, el Na^+ y Cl^- son, por lo general, los iones predominantes. A pesar de la esencialidad del cloruro como nutriente para todas las plantas superiores y del sodio para muchas halófilas y algunas especies C_4 , en suelos salinos la concentración de ambos iones supera con creces los demás nutrientes y conduce a su acumulación en el tejido de la planta produciendo toxicidad (Shabala y Munns, 2017). La elevada concentración de Na^+ y Cl^- en las hojas excede la capacidad de compartimentación en las vacuolas, dando como resultado condiciones tóxicas en el citoplasma (Munns, 2002). Una elevada concentración de Na^+ extracelular favorece su transporte pasivo a través de la membrana plasmática hasta el citosol produciendo un desbalance de la relación K^+/Na^+ lo que supone la muerte celular, la disminución del área foliar fotosintéticamente activa y la reducción de la biomasa total (Munns et al. 2006). El aumento en la concentración de iones Na^+ y Cl^- en el suelo provoca desequilibrios nutricionales en la planta (Hu y Schmidhalter, 2005). Las interacciones $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ y $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ disminuyen la absorción de N (Rozeff, 1995), y elevados niveles de Na^+ reducen la disponibilidad de K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} (Epstein, 1983). Las deficiencias de micronutrientes son comunes bajo condiciones de estrés salino debido al incremento del pH del suelo (Zhu et al. 2004).

La homeostasis y compartimentación de iones no sólo es indispensable para el crecimiento normal de las plantas, sino que también es un proceso crucial como mecanismo de adaptación bajo estrés salino (Hasegawa, 2013). Una respuesta común ante una elevada concentración de sales en el citoplasma es su secuestro en los tejidos más viejos, como en hojas adultas, sacrificándolos posteriormente (Zhu, 2003).

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 (Bartels y Sunkar, 2005). 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” (Cha-Um y Kirdmanee, 2009). Los azúcares estabilizan la membrana plasmática durante condiciones de estrés mediante interacciones con fosfolípidos. Un alto contenido en cloruros puede causar el incremento en los niveles de carbohidratos en tejidos de la planta o la degradación de almidón, como sucede en especies tolerantes a la salinidad, las cuales tienen menos acumulación de almidón (Libal-Weksler et al. 1994).

La mayoría de los árboles frutales del área mediterránea son sensibles a la salinidad, como el manzano (*Malus domestica*), el albaricoque (*Prunus armeniaca*), el ciruelo europeo (*Prunus domestica*), el melocotonero (*Prunus persica*) y especies pertenecientes al género *Citrus*; otros cultivos como el pistacho (*Pistacia vera*), el olivo (*Olea europaea*) y la higuera (*Ficus carica*), son moderadamente tolerantes, mientras que otros como la palmera datilera (*Phoenix dactylifera*) son muy tolerantes (Gucci y Tattini, 1997). Dentro de esta clasificación, el granado se incluye dentro de los cultivos considerados tolerantes a la salinidad. Existen varios trabajos en los que se comparan variedades en relación a su crecimiento vegetativo y algunos parámetros nutricionales y fisiológicos. Por ejemplo, en las variedades de granado ‘Rabab’ y ‘Shishegap’ regadas con 30 y 60 mN NaCl + CaCl₂, se observó que la salinidad afectó al crecimiento y a la concentración y distribución de macronutrientes, favoreciendo el transporte de K⁺ como mecanismo para limitar la movilización de cloruros a los brotes (Karimi et al. 2014). Las variedades iraníes ‘Malas’ y ‘Shishe’ sufrieron una reducción significativa en el contenido relativo de agua, la conductancia estomática, clorofila total, carbohidratos y parámetros de fluorescencia de clorofilas cuando aumentó la conductividad eléctrica del agua de riego en tratamientos con niveles de 1,5-12 dS m⁻¹ (Khayyat et al. 2016). Sin

embargo, Okhovatian-Ardakani et al. 2010, demostraron distintos grados de tolerancia a la salinidad dependiendo del cultivar para unos niveles de conductividad eléctrica de 4-10 dS m⁻¹. En ‘Wonderful’, los estudios presentados por Mastrogiannidou et al. (2016), indican que esta variedad presenta mecanismos que alivian los efectos negativos de la salinidad manteniendo niveles normales de contenido de agua, fluorescencia de clorofila y la actividad enzimática en árboles regados con aguas salinas, independientemente del tipo de sal (NaCl; KCl; Na₂SO₄), siempre y cuando se mantenga un programa de fertilización adecuado (Mastrogiannidou et al. 2016). A pesar de todos estos trabajos, en la bibliografía científica no existen estudios eco-fisiológicos enfocados a conocer cómo responden las hojas de granado a la toxicidad y al efecto osmótico de la salinidad. Para caracterizar estas respuestas es necesario relacionar parámetros de intercambio gaseoso con estudios de fluorescencia de clorofilas, concentración de cloruros en las hojas y estudios de relaciones hídricas, lo que permite conocer si las alteraciones de la tasa de asimilación neta de CO₂ se deben a factores estomáticos o factores no estomáticos y, dentro de estos, a los procesos relacionados con la eficiencia fotosintética de la luz o los procesos bioquímicos de asimilación de CO₂.

4.5. RESPUESTAS DE LOS CULTIVOS AL EXCESO DE BORO

Una de las consecuencias de la sobreexplotación de las aguas subterráneas para uso agrícola es el descenso de los niveles freáticos de los acuíferos, originando problemas de agotamiento y salinización e intrusión marina en aquellas zonas situadas cerca de la costa (Pellicer-Martínez et al. 2015). Circunstancia que, además de suponer un problema para la sostenibilidad de la actividad agraria, impide el cumplimiento del principio de conservación del buen estado ecológico de las masas de agua, objetivo central de la Directiva Marco del Agua (European Commission, 2000). Para paliar los efectos de la sequía en los cultivos y minimizar el agotamiento de los recursos hídricos subterráneos, los agricultores de las zonas semiáridas como el sureste español, tienen que utilizar para el riego aguas de origen no convencional procedentes de plantas desaladoras marinas y/o de depuradoras urbanas e industriales. El uso de agua desalada con fines agrícolas está ampliamente extendido en España y su utilización es cada vez mayor. Las desaladoras españolas producen unos 3 hm³ día⁻¹ de los cuales, el 22% son para su uso en la agricultura (Zarzo, 2018). La cuenca hidrográfica del Segura fue la que más agua desalada produjo entre el 2012 y 2015 con 159 hm³ año⁻¹ (Cabrera et al.

2019). Este tipo de aguas, sin embargo, tienen un problema que es la gran concentración de boro que contienen (Martínez-Álvarez et al. 2016; Mendoza-Grimón et al. 2019), siendo a concentraciones elevadas tóxico para los cultivos, especialmente para los cultivos leñosos del área mediterránea.

En suelos con un pH de 5,5-7,5, el boro se encuentra principalmente bajo la forma no disociada de ácido bórico H_3BO_3 , forma en la que es fácilmente absorbido por las plantas a través de las raíces (Camacho-Cristóbal et al. 2008). Hasta finales de los 90 se pensaba que la única forma de absorción del boro por la planta era mediante difusión pasiva a través de la membrana plasmática debido a la alta permeabilidad de la bicapa lipídica al H_3BO_3 (Raven, 1980). Sin embargo, estudios más recientes muestran que cuando la concentración de B en la disolución del suelo es alta, es absorbido de forma pasiva por las raíces, mientras que en condiciones de baja o muy baja concentración se produce de forma activa (Tanaka y Fujiwara, 2008). Una vez absorbido por las raíces, el B es translocado a las hojas adultas a través del xilema debido a que son estas hojas las de mayor tasa de transpiración (Chatzissavvidis y Therios, 2011). Sin embargo, en algunas especies, incluyendo el género *Pyrus*, *Malus* o *Prunus*, se ha observado que el B se ha distribuido uniformemente en toda la planta a través del floema, encontrándose mayores concentraciones en tejidos jóvenes que en hojas adultas (Brown y Hu 1996; Camacho-Cristóbal et al. 2008).

El boro es uno de los ocho micronutrientes esenciales en las plantas, no obstante, su función aún no se comprende completamente (Landi et al. 2019). Se sabe que está involucrado en la formación de las paredes celulares a través de la unión borato-diol de dos moléculas de ramnogalacturonano II (Goldbach y Wimmer, 2007). También se ha reportado que es responsable de la integridad de las membranas y que está involucrado en el metabolismo de los carbohidratos, en la acumulación de fenol y en otras actividades metabólicas (Brown et al. 2002). A pesar de su esencialidad, existe un rango muy estrecho entre toxicidad, normalidad y deficiencia (Princi et al. 2016). Esto varía mucho entre especies y tejidos de la planta (raíz, tallo y hoja), siendo las plantas sensibles las que muestran mayor reactividad frente a pequeños cambios en la concentración de boro, mientras que las más tolerantes tienen mayor capacidad de adaptación a rangos más amplios sin que afecte significativamente su crecimiento vegetativo (Ozturk et al. 2010). Estudios fisiológicos han sugerido que debido a su importante papel en la estructura y función de las paredes celulares, la deficiencia de B podría reducir la expansión celular, lo que conduciría al rápido cese del alargamiento de

la raíz y a la reducción de la expansión foliar (Dell y Huang, 1997). La elevada concentración de B en las hojas de los cultivos produce una alteración en una amplia gama de procesos fisiológicos, que incluye: i) disminución de la tasa fotosintética y la eficiencia del fotosistema II; ii) aumento de la peroxidación de lípidos; iii) alteraciones en las enzimas dentro de las vías antioxidantes; iv) aumento de la permeabilidad de las membranas; v) reducción de la extrusión de protones en las raíces; vi) deposición de suberina y lignina y vii) desequilibrios nutricionales (Simón-Grao et al. 2018; Simón-Grao et al. 2019). Estas alteraciones producen necrosis en hojas y tallo, disminución del crecimiento vegetativo y malformación de frutos (Princi et al. 2016). En cuanto a los cambios morfológicos en las hojas, no existe consenso sobre si el exceso de B produce una reducción del grosor (observado en cítricos por Papadakis et al. 2004), o si por el contrario disminuye (observado en níspero por Papadakis et al. 2018). Esto quizás dependa de las especies estudiadas, así como de la concentración de B aplicada en el estudio (Landi et al. 2019).

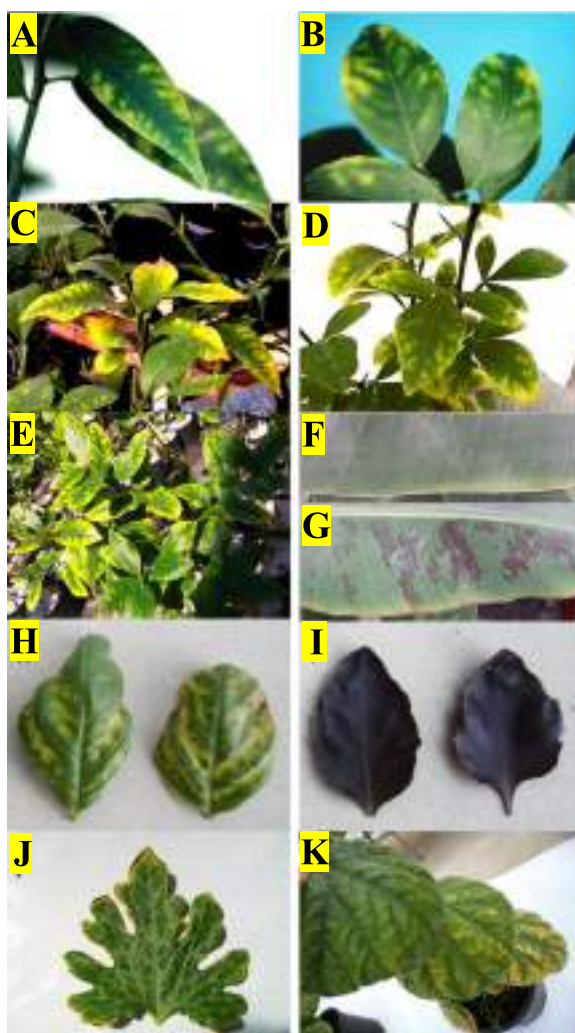


Figura 6. Síntomas de toxicidad por B en especies donde es relativamente inmóvil vía floema:

- A) Mandarino (*Citrus reticulata*).
- B) Naranja dulce (*Citrus sinensis*).
- C) Naranja amargo (*Citrus aurantium*).
- D) Swingle citrumelo (*X Citroncirus*).
- E) Limón (*Citrus limon*).
- F,G) Banana (*Musa paradisiaca*).
- H) Albahaca verde (*Ocimum basilicum*).
- I) Albahaca lila (*Ocimum sanctum*).
- J) Calabacín (*Cucurbita pepo*).
- K) Pepino (*Cucumis sativus*).

Fuente: Landi et al. (2019).

El grado de tolerancia al boro en las plantas puede deberse a la capacidad que tengan estas de reducir su acumulación en tejidos y/o de desactivar o paliar su toxicidad. En el primer caso, se ha visto que algunas plantas tienen una baja tasa de absorción y transporte desde la raíz hacia las hojas, en el que podría estar involucrada una salida de B desde las células de la raíz hacia la rizosfera. En el segundo caso, los mecanismos que pueden reducir su toxicidad pueden ser: i) la síntesis de compuestos polioles cuya estructura química permite acomplejar al B y movilizarlo a tejidos de la planta menos sensibles; ii) el incremento de la capacidad antioxidante para desactivar las especies reactivas de oxígeno y iii) la compartimentación del boro en las paredes celulares que son menos sensibles a su toxicidad (Landi et al. 2019).

En cuanto a cómo responde el granado al riego con altas concentraciones de boro, apenas se tiene información científica de su grado de tolerancia relativa y de cuáles son los mecanismos de adaptación que se dan en esta especie. Las únicas publicaciones que hay hasta la fecha, son las realizadas por Sarafi et al. (2013, 2017), que estudiaron el comportamiento de las variedades 'Ermioni' y 'Wonderful' al emplear agua de riego con altas concentraciones de boro ($0-10 \text{ mg L}^{-1}$). En este trabajo se pone de manifiesto que los árboles de granado acumulan una alta concentración de B en las raíces, seguido del tallo y las hojas. En este último tejido la concentración de B no sobrepasó los 160 ppm. En cuanto a los parámetros medidos de concentración foliar de prolina, macronutrientes y micronutrientes, intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas, no se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos de boro. Por lo tanto, este trabajo permite concluir que los árboles de granado son tolerantes al exceso de boro en el agua de riego en un amplio rango de concentraciones. En este cultivo tampoco es muy común aplicar fertilizantes de B para mejorar el rendimiento de los árboles, aunque hay algunos trabajos que indican que aplicaciones foliares en forma de ácido bórico a una dosis de 20 y 40 g L^{-1} antes de abrir las yemas y otro en los últimos días de la floración, puede mejorar el cultivo al incrementar el área foliar, la concentración de clorofilas en las hojas, el cuajado de los frutos, el peso de frutos, los sólidos solubles totales y la acidez valorable (Aziz et al. 2018). Generalmente, también se obtienen buenos resultados en el rendimiento agronómico de este cultivo cuando el boro es aplicado con otros nutrientes y/o materias activas como zinc (Davaranpanah et al. 2016; Tanuja et al. 2016) y calcio + ácido giberélico (Korkmaz et al. 2016).

5. OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

El granado (*Punica granatum* L.) es un frutal tradicional de las zonas de cultivo del sureste español, capaz de adaptarse a las condiciones medioambientales que sufren estas áreas como la salinidad o la sequía. Sin embargo, el cambio climático provoca que los cultivos se enfrenten a otros tipos de estreses que antes no se daban tan frecuentemente, como son las inundaciones o el exceso de boro en el agua de riego. Esto es debido a las lluvias cada vez más torrenciales debido al fenómeno conocido como “gota fría” o DANA y/o a la utilización de aguas desaladas con alto contenido en boro. Ante esta situación y para seguir desarrollando el cultivo del granado de una forma sostenible y de calidad, es preciso seleccionar aquellas variedades que sean más tolerantes, o al menos, las que se vean menos afectadas a estos estreses (inundación, salinidad y exceso de boro). Además, para desarrollar futuras estrategias agronómicas que ayuden a mitigar los efectos negativos de estos estreses, es también necesario adquirir primero conocimientos científicos básicos de cómo se comportan las diferentes variedades de granado ante estas situaciones de estrés a diferentes niveles, incluyendo el fisiológico, nutricional, morfológico y bioquímico.

Por lo tanto, el **objetivo general** de este trabajo de investigación fue conocer la tolerancia relativa a la inundación, salinidad y toxicidad por boro de las tres variedades de granado más populares del levante español (‘Mollar de Elche’, ‘Valenciana’ y ‘Wonderful’), y establecer qué mecanismos morfológicos, nutricionales, fisiológicos y/o bioquímicos están relacionados con dicha tolerancia. Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- a. Determinar el impacto de la inundación, salinidad y exceso de boro en el desarrollo vegetativo de las plantas para establecer la tolerancia relativa de las tres variedades estudiadas a cada uno de estos estreses.
- b. Medir parámetros relacionados con el intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas, relaciones hídricas, concentración de elementos minerales, concentración de carbohidratos y solutos orgánicos, respuesta hormonal y daño oxidativo en las tres variedades de granado de interés para establecer los mecanismos que determinan la diferente tolerancia entre variedades.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. MATERIAL VEGETAL

Para realizar los tres ensayos de esta tesis se emplearon plántones de granado (*Punica granatum* L.) de nueve meses (inundación y boro) y once meses de edad (salinidad), obtenidos mediante estaquillado leñoso y enraizados en el vivero comercial Caliplant (Murcia). La recepción del material vegetal se realizó tres meses antes del inicio de los ensayos, con 20-30 cm de altura aproximadamente, trasplantándose a macetas de 2 litros de capacidad y fertirrigándose tres veces por semana hasta el inicio de los ensayos.

6.2. CONDICIONES DE CULTIVO

Los ensayos fueron realizados en un invernadero de 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 (Figura 7) en el que se hicieron los ensayos es de tipo multitúnel, con cerramientos laterales contruidos a base de placas de policarbonato y cubierta de polietileno. Tiene una superficie de 650 m² y 4,5 m de altura hasta la cabeza de pilares. Para el control de la temperatura dispone de un sistema de refrigeración de tipo *cooling system* que mantiene la temperatura por debajo de los 30 °C en verano, y para el control de la radiación solar una malla de sombreo Aluminet-30%. El invernadero incluye un sistema de sensores de radiación, temperatura y humedad relativa colocados a una altura de 1,5 m. Todos los datos se recogen periódicamente y son almacenados en una base de datos para su posterior análisis.

El sustrato empleado para los tres ensayos es un sustrato universal compuesto de turba, fibra de coco y perlita (5:4:1 Compostreciclable S.L. Spain). Para el riego se empleó un sistema de riego localizado con goteros autocompensantes y antidrenantes de 4 L h⁻¹. Las plantas se regaban con solución nutritiva Hoagland de la siguiente composición: 6 mM KNO₃, 4 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 20 µM Fe⁺² quelatado, 25 µM H₃BO₃, 2 µM MnSO₄, 2 µM ZnSO₄, 0,5 µM CuSO₄, 0,4 µM (NH₄)₆MoO₇O₂₄·6H₂O. Esta solución nutritiva se preparó a partir de los fertilizantes comerciales KNO₃, CaNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ y un complejo de micronutrientes. 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. El control fitosanitario se realizó mediante aplicaciones foliares de imidacloprid (Confidor) junto con regulador del pH para combatir los ataques de pulgón.

El control del riego se hizo a demanda, fijando el volumen y frecuencia del riego de tal manera que en cada evento de riego se producía un 30% de drenaje, y controlando que la conductividad eléctrica no sobrepasaba el 20% de la solución nutritiva. Cuando esto sucedía se cambiaba el riego para drenar el 40% del volumen regado.



Figura 7. Vista parcial del invernadero donde se realizó el ensayo de inundación en granado.

6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la tesis se realizaron tres ensayos independientes en los que se sometieron las plantas a condiciones de inundación, salinidad y toxicidad por boro. Los ensayos de campo se llevaron a cabo durante primavera-verano y principios de otoño en el caso del boro, realizándose mediciones *in situ* durante esas fechas. Tras la finalización de los ensayos, se analizaron las muestras cosechadas en los laboratorios de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO) y del CEBAS-CSIC. A continuación, se describe brevemente cómo se realizaron dichos experimentos y los parámetros que se midieron para evaluar el comportamiento morfológico, fisiológico, bioquímico y nutricional de las plantas a estos estreses.

El ensayo de **inundación** fue el primero en llevarse a cabo y fue realizado durante el mes de junio, usando 36 plantas de granado, 12 de cada cultivar (‘Mollar de Elche’, ‘Valenciana’ y ‘Wonderful’). Se seleccionaron de forma aleatoria 6 plantas de cada cultivar para cada uno de los dos tratamientos realizados: un tratamiento control sin inundación (T0), en el que las plantas se continuaron regando en buenas condiciones con la SN Hoagland mediante el sistema de riego localizado (Figura 8); y un tratamiento de inundación (T1), en el que 6 plantas de cada cultivar se colocaron en recipientes individuales de 20 L y fueron sumergidas en agua ayudadas por un peso para que no flotaran y se mantuviera el nivel del agua a 3 cm por encima del cuello de la planta (Figura 9). El agua empleada para la inundación era procedente del trasvase Tajo-Segura ($CE = 0,8 \text{ dS m}^{-1}$) (mM): $8,86 \text{ SO}_4^{2-}$, $1,16 \text{ HCO}_3^-$, 3 Cl^- , $3,5 \text{ K}^+$, $1,2 \text{ Ca}^{2+}$, $2,22 \text{ Mg}^{2+}$ y $4,13 \text{ Na}^+$.

A los 0, 2, 5 y 6 días de iniciarse el experimento, se realizaron las mediciones indicadas en la tabla 3. A partir de los parámetros medidos y los síntomas visuales observados, se decidió cosechar las plantas para su posterior análisis en laboratorio a los 6 días de comenzar el ensayo. Se muestrearon separadamente las hojas, el tallo y la raíz de cada una individualmente. 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 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior análisis en el laboratorio.



Figura 8. Ensayo inundación, tratamiento control (T0).



Figura 9. Ensayo inundación, tratamiento inundación (T1).

El ensayo de **salinidad** se llevó a cabo en junio del año siguiente y para su realización se emplearon 126 plantas de granado, 42 de cada variedad (‘Mollar de Elche’, ‘Valenciana’ y ‘Wonderful’) (Figura 10). Los tratamientos salinos (0, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 mM NaCl) se impusieron añadiendo NaCl a la solución nutritiva en la cantidad exacta para alcanzar dicha concentración. Al principio del ensayo, se utilizó una concentración salina de partida de 20 mM NaCl, la cual se iba incrementando de 20 en 20 mM cada día sucesivamente hasta alcanzar la concentración deseada para cada tratamiento. Con esto se consiguió que las plantas no sufrieran ningún choque osmótico.



Figura 10. Ensayo salinidad.

El diseño experimental fue bifactorial, factor cultivar (C) con 3 cultivares y el factor tratamiento salino (S) con 7 tratamientos salinos (Tabla 1). Cada combinación Cultivar \times Tratamiento salino (C \times S) contaba con 6 plantas colocadas aleatoriamente en el invernadero. La duración del experimento fue de 60 días y al finalizar se procedió a hacer las medidas analíticas correspondientes indicadas en la tabla 3. Para el análisis de carbohidratos y cloruros se cosecharon 10 hojas de cada planta.

Tabla 1: Concentración de sal en mM NaCl y g L⁻¹, y la conductividad eléctrica (CE) del agua de riego en cada uno de los tratamientos ensayados.

Tratamiento	Concentración (mM de NaCl)	Dosis de NaCl (g 120 L ⁻¹)	CE agua de riego (dS m ⁻¹)
T0	0	0	3,4
T1	40	280,8	5,5
T2	60	421,2	8,0
T3	80	561,6	9,6
T4	100	702,0	11,2
T5	120	842,4	12,9
T6	140	982,8	14,0

El ensayo de **boro** comenzó en agosto del tercer año de la tesis y se emplearon en total 120 plantas, 40 de cada cultivar ('Mollar de Elche', 'Valenciana' y 'Wonderful'). El diseño experimental fue bifactorial, con el factor cultivar (C) con 3 cultivares y el factor tratamiento de boro (B) con 5 niveles (mg L⁻¹ B): T0 (0,25), T1 (1,25), T2 (2,5), T3 (5) y T4 (10) (Tabla 2), con 8 plantas por cada cultivar y tratamiento de boro. El boro fue aplicado como ácido bórico. La duración del ensayo fue de 60 días y se realizaron tres cosechas de material vegetal, una en el día 0 (inicio de los tratamientos), otra a los 30 días (verano) y la última a los 60 días (otoño) tras el inicio de los tratamientos. En cada cosecha se separaron las hojas, tallo y raíz y se tomaron muestras para su posterior análisis

Tabla 2: Concentración de boro en mg L⁻¹ B del agua de riego en cada uno de los tratamientos ensayados.

Tratamiento	Dosis de B (mg L ⁻¹ B)
T0	0,25
T1	1,25
T2	2,5
T3	5
T4	10



Figura 11. Ensayo de boro.

Tabla 3: Medidas analíticas realizadas a lo largo de los experimentos o al final de los mismos.

Medidas analíticas	Exp. Inundación	Exp. Salinidad	Exp. Boro
Concentración de oxígeno agua inundación	X	-	-
Relaciones hídricas	X	X	-
Intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas	X	X	X
Crecimiento vegetativo	X	-	X
Prolina y compuestos de amonio cuaternario	X	-	-
Carbohidratos	X	X	-
Nutrición mineral	X	-	-
MDA y peróxido de hidrógeno	X	-	-
ABA	X	-	-
Cloruros	-	X	-
Boro	-	-	X
Estudio alométrico	-	-	X

6.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

6.4.1 Concentración de oxígeno agua inundación

Durante los 6 días que duró el ensayo de inundación se tomaron lecturas periódicas de la $[O_2]$ del agua que inundaba las plantas con un oxímetro portátil (Crison 330i).

6.4.2 Relaciones hídricas

Para determinar el estado hídrico de las plantas se midió en las hojas el potencial hídrico (Ψ_w), potencial osmótico (Ψ_π) y el potencial de turgor (Ψ_p). El potencial hídrico de la hoja se midió a mediodía (12:00-14:00) los días 0, 2, 5 y 6 en la inundación, y al finalizar los experimentos de salinidad y boro. Para ello, se empleó una cámara de presión tipo Scholander (PMS Instrument, Corvallis, OR; Scholander et al. 1965). Tras la medida del Ψ_w , en el ensayo de inundación las hojas fueron inmediatamente envueltas en papel de aluminio, congeladas por inmersión en nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas en bolsas de plástico herméticas a $-18\text{ }^\circ\text{C}$. Después de descongelar las hojas, se midió el Ψ_π de la savia extraída con una jeringuilla utilizando un osmómetro (Digital Osmometer, Wescor, Logan, UT) a $25 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$. El Ψ_p se calculó como la diferencia entre Ψ_w y Ψ_π .

El contenido relativo de agua (CRA) fue medido en hojas similares a las utilizadas para medir el potencial hídrico. Para ello, al mediodía (12:00-14:00) se cogieron hojas que fueron inmediatamente pesadas para obtener su peso fresco. Las hojas fueron colocadas en viales con los peciolos sumergidos en agua desionizada (Figura 12) y se mantuvieron así durante toda la noche en oscuridad a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Al día siguiente, las hojas fueron pesadas nuevamente (peso saturado) y secadas a $60\text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h (peso seco), determinándose el CRA mediante la expresión (Morgan, 1984):

$$[(\text{CRA} = (\text{peso fresco} - \text{peso seco}) / (\text{peso saturado} - \text{peso seco}) \times 100)]$$

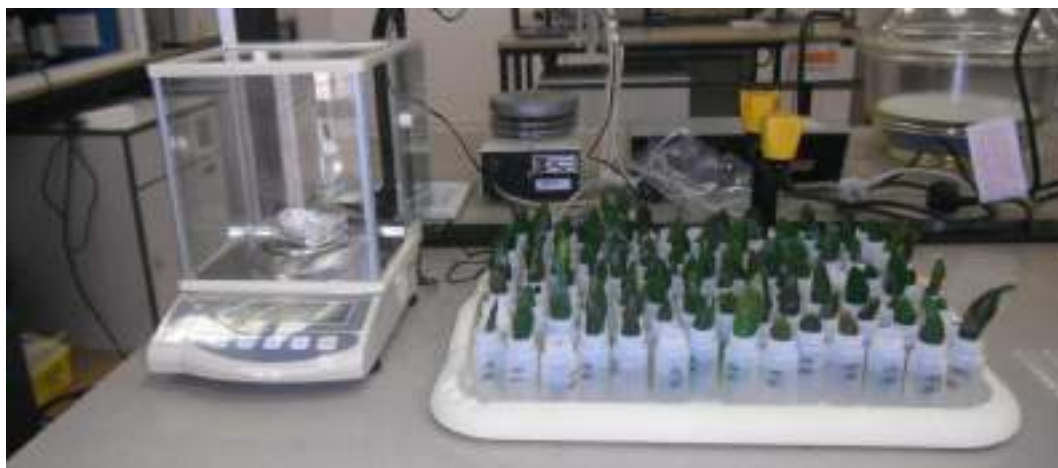


Figura 12. Hojas sumergidas por los peciolos en agua desionizada para el cálculo del CRA.

6.4.3 Parámetros de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas

Las medidas de los parámetros de intercambio gaseoso se realizaron con un equipo de fotosíntesis portátil CIRAS-2 (PP System), utilizando una cámara estándar de 2 cm × 3 cm, con fuente de luz LED (PAR: 1.000 mol m⁻² s⁻¹) y concentración de CO₂ (400 ppm). El equipo determinaba la asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}), la conductancia estomática (g_s), la transpiración foliar (E) y la concentración subestomática de CO₂ (C_i). Estos parámetros de intercambio gaseoso se midieron entre las 9:00 y las 11:00 de la mañana para evitar valores altos de déficit de presión de vapor, en una hoja adulta totalmente expandida y en todas las plantas utilizadas en los ensayos.

Las medidas de fluorescencia de clorofilas se realizaron paralelamente a las de parámetros de intercambio gaseoso, en las mismas hojas, utilizando un sistema de fluorescencia de clorofilas (Modelo FMS-2, Hansatech Instruments) (Figura 13). Antes de la medida las hojas fueron adaptadas a la oscuridad durante media hora con unas pinzas con el objeto de desacoplar la transferencia de electrones del fotosistema II (Φ_{PSII}); de esta manera, una gran parte de la energía captada por las clorofilas se emite en forma de fluorescencia. Los parámetros medidos fueron: la eficiencia cuántica del PSII (Φ_{PSII}), la eficiencia de las antenas en los centros de reacción del PSII (Fv'/Fm') y el coeficiente de decaimiento fotoquímico o quenching fotoquímico (qP).



Figura 13. Medidor de fluorescencia y pinzas de adaptación a la oscuridad.

6.4.4 Parámetros de crecimiento vegetativo

Para conocer el crecimiento vegetativo de las plantas, estas se cosecharon pesando separadamente hojas, tallo y raíz. Una vez pesados los diferentes tejidos, se lavaron todas las partes con agua destilada y se secaron en una estufa a 60 °C durante 48 h. Tras este período de tiempo, se pesó el material seco obteniéndose los siguientes parámetros de crecimiento: peso seco de hoja (LDW), peso seco de tallo (SDW) y peso seco de raíz (RDW), y con estos datos se calculó el peso seco total (TDW). Más tarde, empleando un molino de carga IKA[®], las muestras fueron molidas como paso previo a los diferentes análisis químicos realizados.

6.4.5 Concentración de prolina y compuestos de amonio cuaternario

La concentración de prolina se midió en material seco de hojas y raíces con ácido sulfosalicílico (3%) siguiendo el protocolo descrito por Bates et al. (1973). Los compuestos de amonio cuaternario (QAC) fueron medidos siguiendo el protocolo de Grieve y Grattan (1983), utilizando glicina-betaína como estándar.

6.4.6 Concentración de carbohidratos

La concentración de carbohidratos no estructurales (TNC) en hojas y raíces se determinó mediante una extracción con etanol (80%) del material vegetal seco, midiendo los azúcares solubles (TSS) mediante el método de la antrona (Hodge y Hofreites, 1962) y los azúcares reductores (RS) mediante el protocolo descrito por Nelson (1944) y Somogyi (1952). La concentración de almidón se midió del pellet seco obtenido en el análisis de los TNC realizando una extracción con MES (0,5 M) a pH = 5 y midiéndose con el protocolo de Haissig y Dickson (1979).

6.4.7 Concentración de nutrientes minerales y cloruros

Para la determinación de los nutrientes en las muestras de material vegetal, se siguió el método de Chapman y Pratt (1961) realizando una digestión en bloques digestores con ácido nítrico y perclórico (Figura 14). La fracción líquida resultante se analizó en un espectrofotómetro de emisión óptica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES) ICAP 6500. Para analizar la concentración de cloruros en los diferentes tejidos de las plantas se realizó una extracción del material seco con agua desionizada y se midió empleando un clorímetro Corning 926 (Sherwood, UK).



Figura 14. Muestras decoloradas en el digestor y muestras reposando a temperatura ambiente.

6.4.8 Concentración de MDA y H₂O₂

El daño oxidativo en las células generado por la inundación, se cuantificó mediante el análisis de malondialdehído (MDA) (Hodges et al. 1999) y del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Brennan y Frenkel, 1977), empleando material vegetal fresco congelado y expresándose en nmol g⁻¹.

6.4.9 Concentración de ABA

La concentración de ABA en las hojas y raíces fue medido en muestras liofilizadas por radioinmunoensayo (Quarrie et al. 1988), usando el anticuerpo monoclonal AFRC MAC 252 (Babraham Bioscience Technologies, Cambridge, UK). Estos análisis fueron realizados en la Universidad de Lancaster (UK) en el laboratorio del Dr. Ian Dodd.

6.4.10 Relaciones alométricas

En el ensayo de boro se realizó un estudio alométrico calculando la tasa de crecimiento relativo (RGR) y la absorción y transporte de boro de las plantas. La RGR se calculó en los dos períodos de crecimiento (verano y otoño) siguiendo esta fórmula:

$$RGR = \frac{[\ln(M_2) - \ln(M_1)]}{(t_2 - t_1)}$$

Donde M_2 y M_1 corresponden a la biomasa total seca de la planta correspondientes al tiempo transcurrido entre los muestreos sucesivos (t_2 y t_1 , respectivamente). La tasa de absorción neta de los nutrientes por la raíz y su transporte desde la raíz hasta la parte aérea de la planta fue calculada como se describe a continuación (García-Sánchez et al. 2005):

$$Uptake = \frac{(\ln(R_2) - \ln(R_1))}{(R_2 - R_1)} \times \frac{(C_{T2} - C_{T1})}{(t_2 - t_1)} \mu mol g^{-1} d^{-1}$$

Donde R_2 y R_1 corresponden al peso seco radicular y C_{T2} y C_{T1} son el contenido total de B en todos los tejidos de la planta (hojas + tallo + raíz) correspondientes a dos muestreos sucesivos (t_2 y t_1 , respectivamente). El contenido de cada nutriente en cada órgano se determinó como el producto entre el peso seco de cada tejido y la concentración de cada uno de estos nutrientes en dichos tejidos.

$$Transport = \frac{(\ln(R_2) - \ln(R_1))}{(R_2 - R_1)} \times \frac{(C_{A2} - C_{A1})}{(t_2 - t_1)} \mu mol g^{-1} d^{-1}$$

Donde R_2 y R_1 corresponden al peso seco radicular y C_{A2} y C_{A1} son el contenido de estos nutrientes en la parte aérea de la planta (hojas + tallo) correspondientes a dos muestreos sucesivos (t_2 y t_1 , respectivamente).

6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico de los datos del ensayo de inundación incluye una estadística descriptiva básica (valor medio y error estándar), seguida de un análisis de la varianza (ANOVA) y test de separación de medias de Duncan cuando el ANOVA fue significativo ($P < 0,05$). El tamaño muestral constaba de 6 plantas por variedad y tratamiento ($n=6$). En los ensayos de salinidad y boro el tratamiento estadístico de los datos incluye una estadística descriptiva básica (valor medio y error estándar) para cada combinación Cultivar \times Tratamiento salino y Cultivar \times Tratamiento con boro, análisis de la varianza bifactorial (ANOVA) y test de separación de medias de Duncan para cada cultivar en aquellos parámetros en los que en el ANOVA el factor principal del estrés

fuera significativo ($P < 0,05$). Cada combinación Cultivar \times Tratamiento salino ($C \times S$) contaba con 6 plantas ($n = 6$) mientras que en el ensayo de boro, cada combinación Cultivar \times Tratamiento con boro estaba formado por 8 plantas ($n=8$). En el estudio de la tolerancia a la salinidad, se hizo una regresión lineal y exponencial de la biomasa seca total frente a la conductividad eléctrica (CE) de la solución nutritiva.

El paquete estadístico utilizado en los tres ensayos fue el IBM SPSS Statistics 22 (Armonk, NY). Para la elaboración de gráficos se empleó el SigmaPlot 13.0 Systat Software (San José, CA).

7. PUBLICACIONES

7.1. PUBLICACIÓN 1

Physiological responses of three pomegranate cultivars under flooded conditions

Olmo-Vega, A., García-Sánchez, F., Simón-Grao, S., Simón, A., Lidón, V., Nieves, M., Martínez-Nicolás, J.J.

Scientia Horticulturae. 224, 171–179.

Factor de impacto: 2,769 Q1 (2019) (Categoría Horticulture)

Physiological responses of three pomegranate cultivars under flooded conditions



Antonio Olmo-Vega^a, Francisco García-Sánchez^b, Silvia Simón-Grao^b, Inmaculada Simón^a, Vicente Lidón^a, Manuel Nieves^a, Juan J. Martínez-Nicolás^a

^a Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández, Ctra. de Beniel, km 3.2, Orihuela, Alicante, Spain

^b Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CSIC, Campus Universitario de Espinardo, Espinardo 30100, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Chlorophyll fluorescence
Flooding stress
Punica granatum
Stomatal conductance
Water relations

ABSTRACT

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is known for its great resistance to abiotic stresses such as salinity or drought. However, its behavior under flooding – which is very common in the southeast of Spain, due mainly to the presence of heavy soils – has not yet been studied. This experiment was carried out in a greenhouse, with three of the pomegranate varieties most used in southeastern Spain: 'Mollar de Elche', 'Valenciana', and 'Wonderful'. The plants were immersed in containers of 20 liters capacity, leaving the water level three centimeters above the root zone for six days. Measurements of growth parameters, water relations, gaseous exchange parameters, chlorophyll fluorescence, organic solutes, oxidative stress, and the hormonal response were performed. The first variety that showed symptoms of stress was 'Valenciana', the one whose water relations, gaseous exchange parameters, total dry biomass, and chlorophyll fluorescence were affected most. It was also the one with the worst hormonal response. The flooding also negatively affected the growth parameters of 'Wonderful' and 'Mollar de Elche', but much less than in 'Valenciana'. From this study we can conclude that flooding tolerance of pomegranate crops depend on the cultivar. So, 'Valenciana' cultivar was the most sensitive and 'Mollar de Elche' the most tolerant.

1. Introduction

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is one of the most important emerging fruit crops worldwide. The total area devoted to pomegranate cultivation in the world is over 302,000 ha, with more than 76% in five countries (India, Iran, China, Turkey, and the United States). However, other countries, such as Spain, Egypt, and Israel, with areas of between 2400 and 16,000 ha, have developed much more with regard to ex-ports, research, market development, and new varieties (Quiroz, 2009; Melgarejo et al., 2012).

Pomegranate is known for its extreme resistance to abiotic stresses, such as salinity or drought (Parvizi et al., 2014; Mastrogiannidou et al., 2016), so its cultivation has displaced other, traditional Mediterranean fruit trees, such as citrus, in areas where the latter are not so profitable. Pomegranate is a crop with great adaptation to a wide range of climates and soil conditions (Rodríguez et al., 2012; Sharma et al., 2015; Hmid et al., 2016). There are several regions of pomegranate production in

the world, being able to develop the crop in soils with different texture including clay soils, clay loam, chestnut, loamy, loamy-pebble soils, sandy loam soils rich with humus, black earth (Chernozem), light humus soils with pebble inclusions, Yellow yellow soils (Zheltozen), on podzolclay, alluvial soils, on seaside sands, gravel talus dry rocky hills, alkali soils, lime-rich soils as well as on limestone-rich lands of arid hills (Teixeira da Silva et al., 2013). This crop can tolerate well wet soils (Badizadegan, 2015), although high soil moisture may lead to wilt disease (Sharma et al., 2006); however, it has not been reported how flooding condition can affect to this crop.

Southeastern Spain is characterized by a semi-arid climate with an average annual precipitation that does not exceed 300 mm. However, the precipitation is concentrated in late summer, in the form of tor-rential rains. This is a meteorological phenomenon known as "cold drop", a relatively frequent and intense rainy phenomenon on the Iberian Peninsula, particularly on the Spanish East to South-East in-lands and coasts (Diez et al., 2013). These flash flood events in

Abbreviations: Ψ_p , turgor potential; Φ_{PSII} , photochemical efficiency of PSII; Ψ_w , leaf water potential; Ψ_{π} , osmotic potential; ABA, abscisic acid; A_{CO_2} , net assimilation of CO_2 ; C_i , intercellular CO_2 concentration; F_v/F_m' , antennas efficiency in the PSII reaction centers; g_s , stomatal conductance; LDW, leaf dry weight; MDA, malondialdehyde; PAR, photo-synthetically active radiation; PQ, photochemical quenching; PSII, photosystem II; QAC, quaternary ammonium compounds; RDW, root dry weight; ROS, reactive oxygen species; RS, reducing sugars; RWC, relative water content; SDW, stem dry weight; TDW, total dry weight; TNC, total nonstructural carbohydrates; TSS, total soluble sugars

Corresponding authors.

E-mail addresses: fgs@cebas.csic.es (F. García-Sánchez), juanjose.martinez@umh.es (J.J. Martínez-Nicolás).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.013>

Received 20 February 2017; Received in revised form 17 May 2017; Accepted 10 June 2017

Available online 11 July 2017

0304-4238/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Mediterranean area are widely recorded because of their economic impact caused by the high volume of discharge, even in some years it has been reported precipitation of 200 mm/day (Ibarra, 2012). In addition, many soils of these areas, has a significant clay content and low permeability due to high sodium concentration, it causes dispersion of colloids and blockage of pores in the soil, which further facilitates their waterlogging. So, it is common for crops in these areas to suffer flood problems. Under flood conditions, water occupies the soil air pores, saturating them, reducing the gas diffusion capacity, and lowering the concentration of oxygen in the soil. The resulting conditions of hypoxia and anoxia produce anaerobic decomposition of organic matter

– leading to the formation of toxic compounds, which seriously affect the uptake of water and nutrients by the roots, and increasing the concentrations of soluble Fe and Mn in the soil (Pucciarello and Perata, 2012; Syvertsen and García-Sánchez, 2014; Bhatt et al., 2015). These changes produce in the plant a decrease in the net assimilation rate of CO₂, alterations of the water status, nutritional imbalances, and intensification of the oxidative stress. This leads to epinasty, foliar chlorosis, necrosis, and foliar abscission, resulting in reduced vegetative growth and crop yield (Jackson et al., 2009). Plants, in order to alleviate the negative effects of oxygen deficiency in the soil, activate a series of morphological, physiological, and biochemical mechanisms. The typical morphological mechanisms are found mainly in forest plants: the appearance of adventitious roots (Kissmann et al., 2014), hypertrophied lenticels (Du et al., 2012), or aerenchyma (Wang and Cao, 2012). In species not adapted to this stress, morphological changes are related more to an increase in the root/shoot ratio (Gimeno et al., 2012). In addition, in all plants, the first response is usually stomatal closure to avoid water loss through transpiration (Arbona et al., 2008). In these conditions, antioxidant systems are also activated to reduce the concentration of reactive oxygen species (ROS) and thereby prevent lipid peroxidation of cell membranes (Lin et al., 2013). It has also been shown that anoxia triggers a series of chemical signals in the root that are transmitted to the aerial parts of the plant with the aim of inducing physiological responses (Dat et al., 2004). In many plants, an increase in abscisic acid (ABA) has been observed that promotes stomatal closure in flood situations, thus improving tolerance of this stress (Wu et al., 1997).

Since the responses of pomegranate plants to flood conditions are not known, the main objective of this work was to study the relative tolerance to flooding of the three pomegranate cultivars currently grown the most in the southeast of Spain ('Mollar de Elche', 'Valenciana', and 'Wonderful'), and to establish the morphological, physiological, and/or biochemical mechanisms related to their differing tolerance. Our results could be of interest to scientists who study how plants behave under adverse conditions; to plant breeders attempting to enhance flooding tolerance; to farmers, to provide them with varieties they can plant on flood-prone soils; and to different agricultural sectors involved with pomegranates that believe that the use of rootstocks could be a good strategy to improve this crop.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and experimental conditions

Pomegranate seedlings were obtained from woody cuttings in a commercial nursery (Caliplant, Murcia, Spain) nine months before the plants were taken to the test greenhouse. Here, the plants were cultivated before the treatments started. The climatic characteristics of the greenhouse were: maximum photosynthetically active radiation (PAR) of 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, day/night temperature of 35/18 \pm 3 °C, day/night relative humidity of 55/75 \pm 5%, and a natural photoperiod of 16 h. Thirty-six plants (30–40 cm in height) were transplanted in individual 4 l pots, using 12 plants of each variety 'Mollar de Elche' (M), 'Valenciana' (V), and 'Wonderful' (W). The plants were watered three times per week, by a localized irrigation system with self-compensating

and anti-draining drippers (4 l h⁻¹), with a complete Hoagland nutrient solution of 7.75 mM NO₃⁻, 0.7 mM H₂PO₄⁻, 4.05 mM K⁺, 2.20 mM Ca²⁺, 0.5 mM Mg²⁺, 0.5 mM SO₄²⁻, and 0.6 mM Fe. Pots containing a universal substrate (Projar S.L. Spain) of 50% fine blond peat moss and 45% black peat moss blended with 5% perlite; with particle size ranged in 0–10 mm and density of 280 g/l. After three months of plant acclimation, the flood treatment was imposed by submerging the plants, six of each variety in 20 l containers (one container per plant), to 3 cm above the base of the stem with tap water of (mM) 8.86 SO₄²⁻, 1.16 HCO₃⁻, 3 Cl⁻, 3.5 K⁺, 1.2 Ca²⁺, 2.22 Mg²⁺, 4.13 Na⁺; and electrical conductivity EC = 0.8 dS m⁻¹. Seedlings remained submerged in these containers fill out with tap water during only once period of six days. After this period the plants were harvested. During flooding period, every day tap water without oxygen was added to replenish the water lost by evapotranspiration. Six non-flooded plants of each variety were taken as controls, maintaining the same irrigation regime as mentioned previously.

2.2. Concentration of O₂

During the six days of the trial, [O₂] readings of the water that was flooding the plants were taken with a portable oximeter (Crison 330i). There was a progressive decrease in the [O₂] during the six days of testing, with a rapid reduction on the second day of almost 45% and a final concentration of 2.7 mg l⁻¹, without significant differences among the varieties tested (Fig. 1).

2.3. Measurements of water relations

To determine the water status of the plants the water potential (Ψ_w), osmotic potential (Ψ_π), and turgor potential (Ψ_p) were measured in the leaves. The Ψ_w of the leaf was measured at midday (12:00–14:00) on days 0, 2, 5, and 6 of the assay. A Scholander type pressure chamber (PMS Instruments, Corvallis, OR; Scholander et al., 1965) was used. After the Ψ_w was measured, the leaves were immediately wrapped tightly in aluminum foil, frozen in liquid nitrogen, and stored in airtight plastic bags at -18 °C. After thawing, the Ψ_π of the extracted sap was measured at 25 \pm 1 °C, with an osmometer (Digital Osmometer, Wescor, Logan, UT). The Ψ_p was calculated as the difference between Ψ_w and Ψ_π . The relative water content (RWC) was measured in leaves similar to those used to measure Ψ_w . At midday, leaves were picked and immediately weighed to obtain the fresh weight. The leaves were placed in vials with their petioles immersed in deionized water and kept

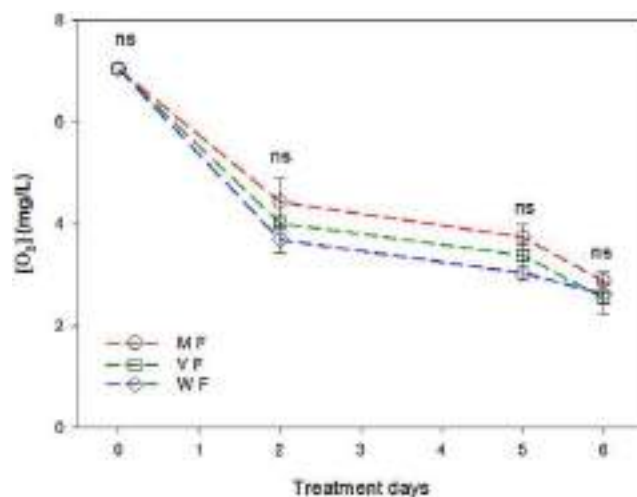


Fig. 1. Oxygen (O₂) concentration of the water used for the flooding of the pomegranate plants, on the different days of treatment (6 days): MI = 'Mollar de Elche' Flood; VI = 'Valenciana' Flood; WI = 'Wonderful' Flood. Ns indicates non-significant differences for P < 0.05. Vertical bars represent the standard error (n = 6).

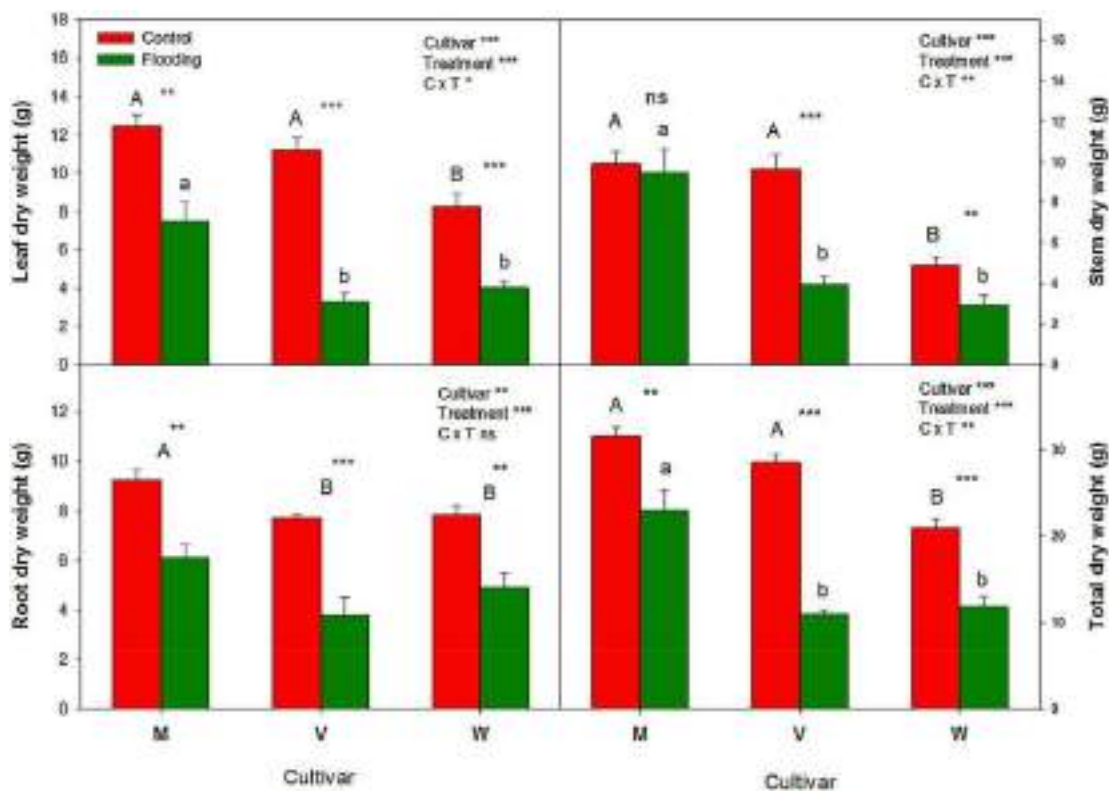


Fig. 2. Growth parameters of the pomegranate plants of the varieties M ('Mollar de Elche'), V ('Valenciana'), and W ('Wonderful') in the control and flood treatments. Different capital letters within each graph indicate significant differences ($P < 0.05$) among the varieties for the control (non-flood) treatment. If the interaction is not significant, the different capital letters within each graph indicate significant differences ($P < 0.05$) among the varieties for the control and flood treatments. Different lowercase letters within each graph indicate significant differences ($P < 0.05$) among the varieties for the flood treatment. In the ANOVA, ns, *, **, and *** indicate non-significant differences and significant at $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively. Vertical bars represent the standard error ($n = 6$).

overnight in the dark at 4 °C. The following day, the leaves were weighed again (saturated weight) and dried at 60 °C for 48 h (dry weight), the RWC being determined by the expression (Morgan 1984):

$$[(RWC = (\text{fresh weight} - \text{dry weight}) / (\text{saturated weight} - \text{dry weight}) \times 100)]$$

2.4. Parameters of gas exchange and chlorophyll fluorescence

The gaseous exchange measurements were carried out on the same days as those of the water relations, using CIRAS-2 portable PP photo-synthesis equipment connected to a standard 2 cm × 3 cm chamber with a LED light source (PAR: 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); the CO₂ concentration (400 ppm) was constant in the measuring chamber. The net assimilation of CO₂ (A_{CO2}), the stomatal conductance (g_s), and the substomatal CO₂ concentration (C_i) were determined. The chlorophyll fluorescence parameters measured were as follows: the quantum efficiency of PSII, $\Phi\text{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$; the antennae efficiency of PSII, $F_v / F_m' = (F_m' - F_0') / F_m'$; and the photochemical quenching co-efficient, $qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$, where F_s is the steady-state fluorescence yield, F_m is the maximal value when all reaction centers are closed after a pulse of saturating light (12,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 0.8 s), and F₀' is the minimal fluorescence in the light-adapted state that is obtained by turning off the actinic light temporarily and applying a pulse of far-red light (735 nm) to drain the electrons from PSII.

2.5. Growth parameters

At the end of the experiment, the plants were harvested and the leaves, stem, and root were weighed separately, washed with distilled water, and dried in an oven at 60 °C for 48 h. After this period of time,

the dry material was weighed and the following growth parameters were obtained: leaf dry weight (LDW), stem dry weight (SDW), root dry weight (RDW), and their sum, the total dry weight (TDW). The dried material was milled using an IKA® mill and the milled samples were stored for further analysis.

2.6. Proline, quaternary ammonium compounds, and non-structural carbohydrates

At the end of the experiment the proline concentration in the dry leaf and root material was measured with sulfosalicylic acid (3%), following the protocol described by Bates et al. (1973). Quaternary ammonium compounds (QAC) were measured according to Grieve and Grattan (1983), using glycine betaine as standard. The concentrations of non-structural carbohydrates (TNC) in the leaves and root were determined by means of an ethanolic extraction (80%) of the dry plant material: soluble sugars (TSS) were determined in aliquots using the anthrone method (Hodge and Hofreites 1962), and reducing sugars (RS) by the protocol described by Nelson (1944) and Somogyi (1952). The starch concentration was obtained from the dry pellet by extraction with MES (0.5 M, pH 5) and measurement with the protocol of Haissig and Dickson (1979).

2.7. Oxidative stress

The damage caused to the cell membranes by oxidative stress was calculated by the analysis of malondialdehyde (MDA, Hodges et al., 1999) and hydrogen peroxide (H₂O₂; Brennan and Frenkel, 1977), using frozen fresh plant material, and was expressed in nmol/g.

2.8. Hormonal response (ABA)

The concentration of ABA in leaves and roots was measured in lyophilized samples of fresh material by radioimmunoassay (Quarrie et al., 1988), using the monoclonal antibody AFRC MAC 252 (Bab-raham Bioscience Technologies, Cambridge, UK).

2.9. Statistical analysis

The statistical treatment of the data included a basic descriptive analysis followed by an analysis of variance (ANOVA), and Duncan's mean separation test when ANOVA was significant ($P < 0.05$). The analyses were performed using SPSS 22 for Windows (SPSS Science, Chicago, IL). For the elaboration of graphs, SigmaPlot 11.0 (Systat Software) was used.

3. Results

3.1. Plant growth parameters

The vegetative growth data (Fig. 2) show significant differences among the varieties tested in the control treatment, being greater total biomass dry weight for 'Mollar de Elche' and 'Valenciana' than for 'Wonderful'. The flood treatment reduced LDW and RDW in all three varieties, and SDW in 'Valenciana' and 'Wonderful'. The largest reduction in shoot growth occurred in 'Valenciana' variety, with a 71% decrease in LDW and 59% in SDW; for 'Mollar de Elche' it was 40% in LDW, and for 'Wonderful' 51% in LDW and 40% in SDW, compared to the respective control plants. As for the root, the three varieties suffered similar decreases due to flooding, with an average RDW reduction of 40%. These reductions in leaf, stem, and root growth resulted in the TDW of the plants being reduced by 27% in the case of 'Mollar de Elche', 61% for 'Valenciana', and 43% for 'Wonderful', relative to the control values.

3.2. Water relations

The data of Ψ_w , Ψ_{π} , and Ψ_p measured over the six days of treatment (Fig. 3) show that the three varieties had, under control conditions, values of approximately -1.2 MPa (Ψ_w), -2.9 MPa (Ψ_{π}), and 1.8 MPa (Ψ_p). Under flooding conditions, the first variety in which Ψ_w decreased was 'Wonderful', on the second day of the assay; however, from this day on it remained stable at -1.6 MPa. The Ψ_{π} was not affected by the flood treatment, so the decrease in Ψ_w was due to the decrease in Ψ_p – which, on the second day, reached a value of 1.2 MPa, remaining constant throughout the rest of the assay.

The Ψ_w of the plants of 'Valenciana' was not affected on the second day of the assay but it suffered a significant decrease subsequently, reaching -3.0 MPa on day 5 and -3.9 MPa on day 6. The decrease on the fifth day was due to a drop in both Ψ_{π} and Ψ_p , although the fall in Ψ_p was more intense than that of Ψ_{π} . On the sixth day, however, the decline in Ψ_w was due exclusively to the loss of turgor.

In flooded conditions, 'Mollar de Elche' showed values of Ψ_w of -1.8 MPa throughout the assay, although significant differences from the control only occurred at the end of the experiment, and this was due to the fall in Ψ_p .

Considering the relative water content (RWC, Table 1), significant differences were observed between control and flood treatment and among the varieties tested. In the control treatment, 'Wonderful', 'Mollar de Elche', and 'Valenciana' had an RWC of 91%, 87%, and 84%, respectively; in the flooded plants, the values were lowered being 71% for 'Valenciana', and 81% for 'Mollar de Elche' and 'Wonderful'.

3.3. Parameters of gas exchange and chlorophyll fluorescence

Under control conditions, the variety 'Wonderful' had the highest

mean values during the assay, for both A_{CO_2} ($6.35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and g_s ($130.83 \text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). There were no differences between varieties 'Mollar de Elche' and 'Valenciana' for these parameters (Fig. 4). On the second day of the flood treatment, a significant difference was observed only in the A_{CO_2} of 'Valenciana', namely a decrease with respect to non-flooded plants. On days 5 and 6, the A_{CO_2} and g_s of plants of all varieties were negatively affected by the flood, 'Mollar de Elche' being the one with the smallest reduction of these parameters. On the other hand, the substomatal concentration of CO_2 (C_i) was increased significantly by flooding on the fifth and sixth days in the plants of 'Valenciana'.

Regarding the three fluorescence parameters, the three varieties showed similar values under control conditions for Φ_{PSII} , F_v/F_m' , and qP (Fig. 5). The flood treatment did not affect these variables in plants of 'Mollar de Elche' and 'Wonderful' during the six days of the assay, obtaining mean values of 0.32 for Φ_{PSII} , 0.67 for F_v/F_m' , and 0.47 for qP . In contrast, in 'Valenciana', Φ_{PSII} did decrease on the fifth and sixth days. This was due exclusively to the decrease in qP , since F_v/F_m' was not affected.

3.4. Proline, quaternary ammonium compounds, and non-structural carbohydrates

Under control conditions, 'Valenciana' had the highest foliar concentrations of total soluble sugars and reducing sugars, while 'Wonderful' had the highest concentrations of starch and proline (Table 1). Flooding had a general effect on all three varieties, since in all of them the total soluble sugars, reducing sugars, and proline increased: by 34%, 28%, and 45%, respectively.

With respect to the carbohydrates in the root, differences were observed both among the varieties and between the treatments, in the total soluble sugars and reducing sugars. Thus, 'Valenciana' had the highest concentrations, and the flooding reduced the total soluble sugars and reducing sugars by 23 and 46%, respectively.

3.5. Oxidative stress

In the control treatment, no significant differences were observed in MDA and H_2O_2 among the varieties tested, although their concentrations tended to be higher in varieties 'Valenciana' (12.45nmol g^{-1}) and 'Wonderful' (0.54nmol g^{-1}), respectively (Fig. 6). The flooding did not affect the concentration of MDA in any variety and only affected the concentration of H_2O_2 in the plants of 'Valenciana'. Thus, the non-flooded plants had a concentration of 0.32nmol g^{-1} ; in the flooded plants it was 0.58nmol g^{-1} , representing an increase of 81%.

3.6. Hormonal response (ABA)

The concentration of abscisic acid (ABA) in non-flooded plants was similar for the three varieties of pomegranate, for both leaves and roots (Fig. 7). The response to flooding differed, depending on the variety. The concentration of ABA increased most in the variety 'Wonderful', reaching a concentration of $417 \text{ng g}^{-1} \text{dw}$, almost double its initial value. 'Mollar de Elche' showed a smaller but also significant increase, of 37%, to a concentration of $353 \text{ng g}^{-1} \text{dw}$. On the other hand, 'Valenciana' did not show a significant difference in flood conditions, when compared to the control plants. The concentration of ABA in the root was not affected by the flooding in any variety.

4. Discussion

The results of this experiment showed that the three pomegranate cultivars assayed were sensitive to the flooding condition imposed, since after six days under these conditions the reduction of growth exceeded 30% in all three varieties tested. For species that are not tolerant of this stress, it has been observed that a period of 10–20 days

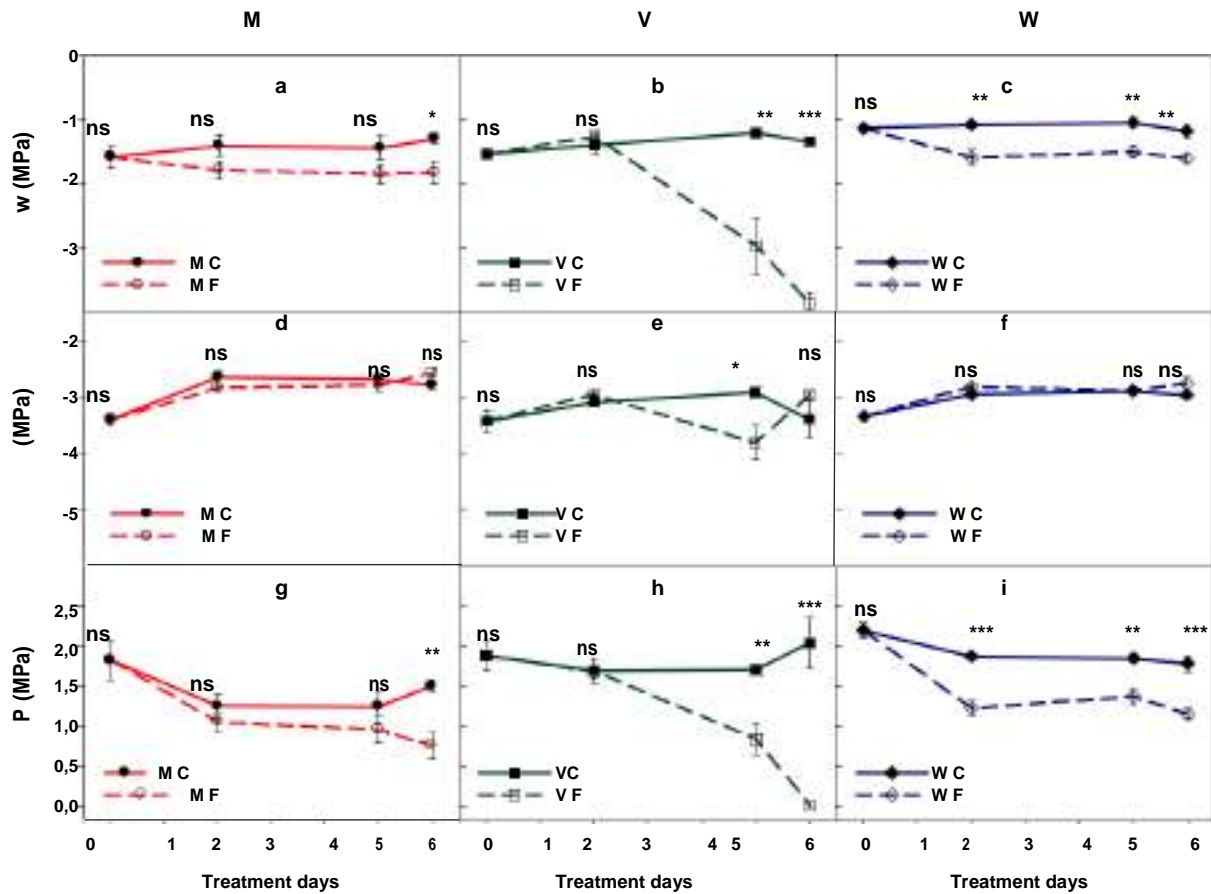


Fig. 3. Water relations: water potential (Ψ_w), osmotic potential (Ψ_{π}), and turgor potential (Ψ_p) of the pomegranate plants in the control and flood treatments on the different days of treatment (6 days): MC = 'Mollar de Elche' Control, MF = 'Mollar de Elche' Flooding, VC = 'Valenciana' Control, VF = 'Valenciana' Flooding, WC = 'Wonderful' Control, WF = 'Wonderful' Flooding. ns, *, **, and *** indicate non-significant differences and significant at $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively. Vertical bars represent the standard error ($n = 6$).

of flooding reduces vegetative growth by 30–50% (Striker et al., 2007; Tewari et al., 2016). Of the three varieties studied, the most sensitive was 'Valenciana', as it showed the greatest reduction of total dry bio-mass. In addition, on the third day of flooding, visual symptoms such as leaf curl and epinasty were observed, which only occurred in the other two varieties on the sixth day. 'Valenciana' was also the only variety in which leaf abscission was observed at the end of the experiment. Of the other two varieties, 'Mollar de Elche' exhibited higher tolerance than 'Wonderful', according to the growth parameters. The decreases in total

dry biomass were due to decreases in both the aerial parts (leaves + stem) and roots, with no morphological changes or new structures appearing. Other, flood-tolerant species are capable of developing adaptive mechanisms, such as the formation of lateral and adventitious roots on the stem (Yu et al., 2015; Azizi et al., 2017). This response of the pomegranate plants was to be expected since it is a species of arid or semi-arid zones.

Flooding induced water deficit in the leaves of the pomegranate plants, as indicated by the low values of RWC and Ψ_w (Table 1 and

Table 1

Concentrations of carbohydrates and organic solutes, and leaf RWC: reducing sugars, soluble sugars, starch, proline, glycine betaine, and RWC of pomegranate plants in the control and flood treatment.

LEAF							
Variety	Treatment	Total soluble sugars (mg glucose g ⁻¹)	Reducing sugars (mg glucose g ⁻¹)	Starch (mg glucose g ⁻¹)	Proline (μg g ⁻¹)	Glycine-betaine (μg g ⁻¹)	RWC (%)
M	Control	83.9 ± 5.2	42.0 ± 4.4	3.42 ± 0.33	1.76 ± 0.18	2.31 ± 0.18	87.42 ± 2.02
	Flood	101.6 ± 5.5	68.1 ± 7.1	3.47 ± 0.32	2.36 ± 0.10	2.33 ± 0.20	81.43 ± 2.67
V	Control	97.4 ± 1.7	77.0 ± 6.6	6.20 ± 0.47	2.99 ± 0.07	2.22 ± 0.10	84.69 ± 1.73
	Flood	131.1 ± 10.1	87.6 ± 7.7	4.63 ± 0.44	4.71 ± 0.45	2.00 ± 0.17	71.46 ± 4.21
W	Control	64.71 ± 2.9	61.7 ± 3.4	7.96 ± 0.49	3.17 ± 0.40	2.90 ± 0.19	91.51 ± 2.17
	Flood	98.09 ± 10.2	76.5 ± 8.0	6.16 ± 0.63	4.48 ± 0.20	2.71 ± 0.18	80.68 ± 3.86
ANOVA							
Variety		**	***	***	***	**	*
Treatment		**	***	*	***	ns	***
Variety × Treatment		ns	ns	ns	ns	ns	ns

M = 'Mollar de Elche', V = 'Valenciana', W = 'Wonderful'.

ns, *, **, and *** indicate differences that are non-significant and significant at $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively ($n = 6$).

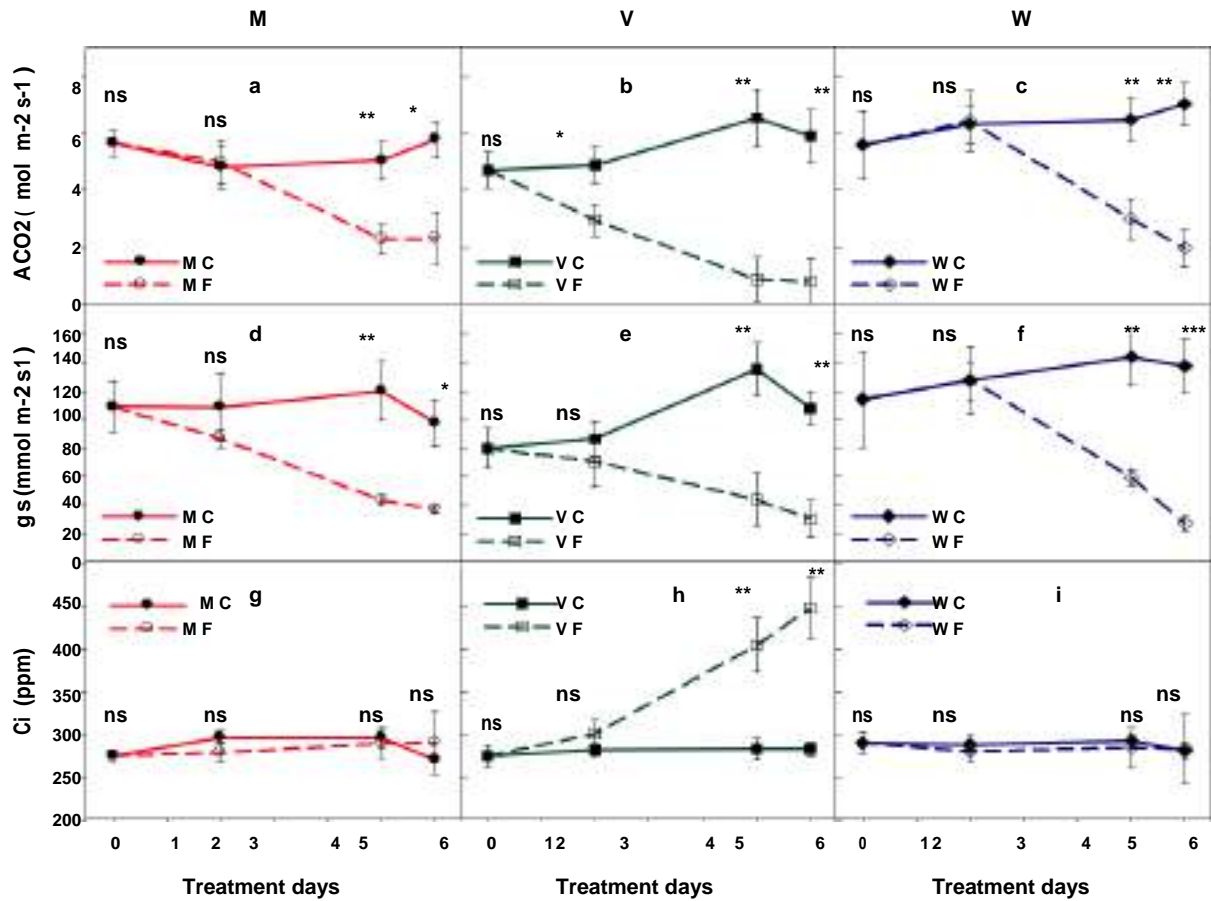


Fig. 4. Gas exchange parameters: net CO₂ assimilation (A_{CO2}), stomatal conductance (g_s), and substomatal concentration of CO₂ (C_i) of the pomegranate plants in the control and flood treatments on the different days of treatment (6 days): MC = 'Mollar de Elche' Control, MF = 'Mollar de Elche' Flooding, VC = 'Valenciana' Control, VF = 'Valenciana' Flooding, WC = 'Wonderful' Control, WF = 'Wonderful' Flooding. Ns, *, **, and *** indicate non-significant differences and significant at P < 0.05, P < 0.01, and P < 0.001, respectively. Vertical bars represent the standard error (n = 6).

Fig. 3); the variety in which these parameters decreased the most was 'Valenciana'. The concentration of oxygen in the soil (Fig. 1) decreased progressively throughout the six days of the assay. In these conditions of anoxia the root hydraulic conductivity could have diminished, which would explain why the loss of water from the aerial parts of the plant by transpiration exceeded the uptake of water by the roots, causing dehydration of the plants and a decline in the leaf Ψ_w (Chaudhary et al., 2016). However, since the concentration of oxygen in the root zone was the same for all three varieties, this indicates that – in the same conditions of anoxia – the roots of 'Valenciana' are more sensitive than those of the other two varieties. These data also suggest that pomegranate plants do not have an effective adaptive mechanism that allows them to adjust osmotically to the water deficit caused by flooding, thus avoiding dehydration of the leaves. In all three varieties tested, the fall in Ψ_w was due to a decrease in Ψ_p , whereas Ψ_{π} was hardly affected. Although flooding increased the foliar concentrations of proline and total soluble sugars (Table 1), compounds considered as osmoregulators, this was not enough to produce an effective osmotic adjustment (Table 2).

One of the first responses of plants to flooding stress is stomatal closure, to prevent water loss and dehydration of tissues (Pucciariello and Perata, 2012). However, in plants that are not tolerant of flooding, stomatal closure is due to the loss of cellular turgor caused by the decrease in the hydraulic conductivity – which limits the transport of water to the aerial parts (Chaudhary et al., 2016). In our assay, on the fifth day of flooding, stomatal conductance decreased in the three varieties of pomegranate. The water relations and gas exchange data suggest that this decrease was due to the loss of cellular turgor, since a

relationship between Ψ_w and turgor with regard to stomatal conductance was observed (Figs. 3 and 4). This means that the stomatal closure in flooded pomegranate plants was due not to an active mechanism of adaptation, but to a loss of cellular turgor provoked by dehydration.

Another of the gas exchange parameters affected by the flooding treatment was A_{CO2}; again, the plants affected most during the assay were those of variety 'Valenciana'. Although a decrease in A_{CO2} can, occasionally, be due to stomatal closure, here it appears that the decline in A_{CO2} was due to non-stomatal factors since the C_i was not decreased by flooding. In addition, this explanation is quite clear in the variety 'Valenciana', in which the flooding decreased the A_{CO2} before the Ψ_p (Figs. 3 and 4) and increased the C_i. The decrease of A_{CO2} by non-stomatal factors is due to metabolic damage – such as decreases in the efficiency of the carboxylation enzymes and of the photochemical reactions of photosystem II, the loss of chlorophylls, and problems related to the processes of light harvesting (Yordanova and Popova, 2007; Amri et al., 2014). In our study the chlorophyll fluorescence data of the 'Valenciana' plants indicate that the decrease in A_{CO2} was related to the biochemical transformation of the light energy, since the fall in the Φ_{PSII} was due exclusively to qP and not to F_v/F_m (Fig. 5).

Another effect of flooding was on the concentrations of carbohydrates (total soluble sugars, reducing sugars, and starch) in the different parts of the pomegranate plants; in general, it provoked an accumulation in the leaves and a decrease in the roots. It has been reported that, in flood conditions, plants accumulate carbohydrates in the leaves, which constitute a reserve available for growth, development, and reproduction once the stress has ceased (Pociecha et al., 2016). In our

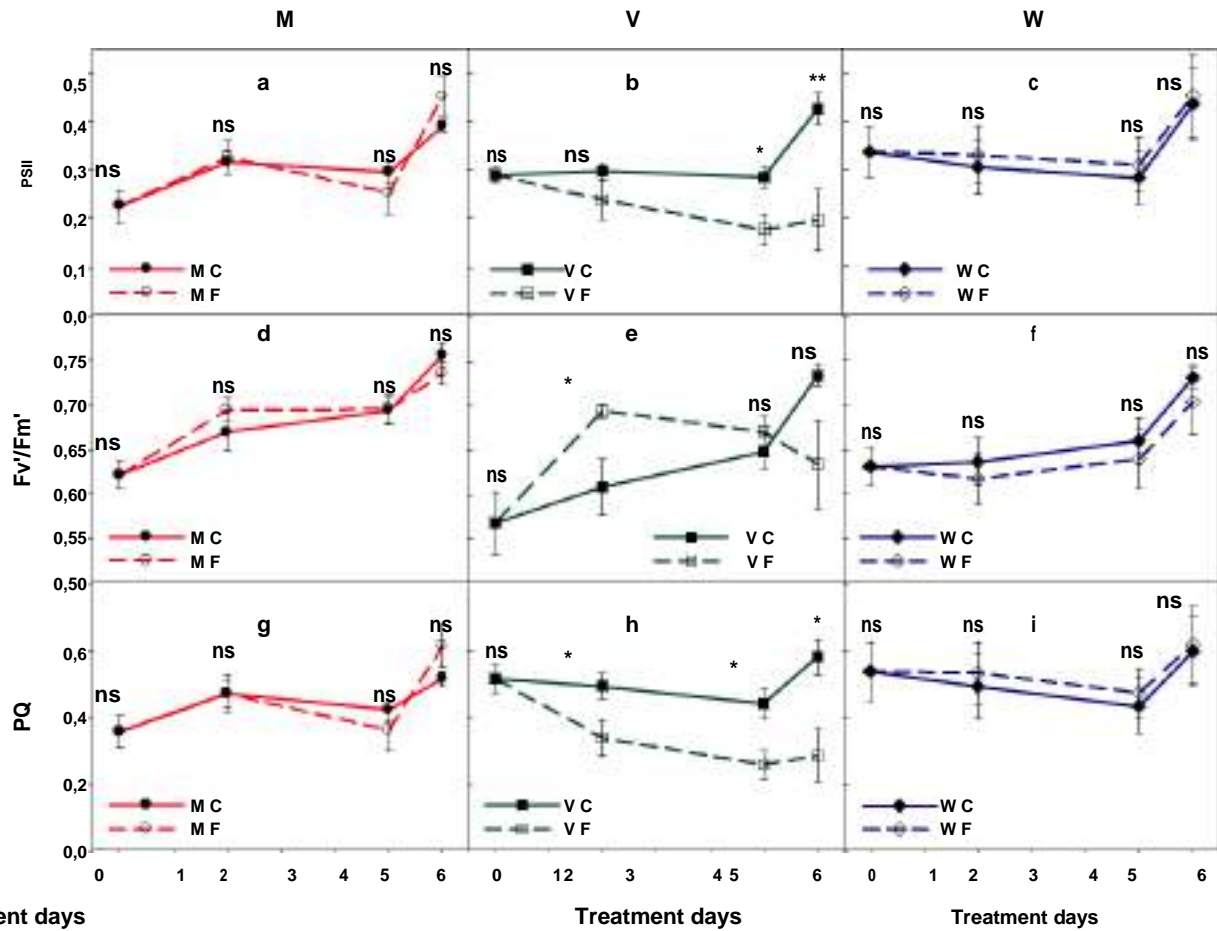


Fig. 5. Chlorophyll fluorescence parameters: chemical efficiency of PSII (Φ_{PSII}), efficiency of the antennas in the PSII reaction centers (F_v/F_m'), and photochemical quenching (PQ) of pomegranate plants in the control and flooding treatments, on the different days of treatment (6 days): MC = 'Mollar de Elche' Control, MF = 'Mollar de Elche' Flooding, VC = 'Valenciana' Control, VF = 'Valenciana' Flooding, WC = 'Wonderful' Control, WF = 'Wonderful' Flooding. Ns, *, and ** indicate non-significant differences and significant at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. Vertical bars represent the standard error ($n = 6$).

experiment, for all three pomegranate varieties, the concentrations of both soluble and reducing sugars increased significantly in the leaves as a response to flooding, while starch decreased. This could be due to inhibition of the transport of photo-assimilates from the leaves (source organs) to other tissues (sink organs), causing carbohydrates to accumulate in the leaves even though the A_{CO_2} decreased. On the other hand, the decrease in the starch concentration in the leaves of the flooded plants also indicates that the leaves may have had a higher carbon demand, perhaps accumulating osmoregulatory compounds in an attempt to adjust osmotically – although, as mentioned in the previous section, this was not intense enough to decrease the Ψ_{π} . In the case of the decline in root carbohydrates, in addition to the fact that the

transport of photo-assimilates from the leaves to the roots could have decreased, it should not be ruled out that this decline was due to greater consumption of sugars by the roots in order to carry out fermentative metabolic processes under conditions of hypoxia or anoxia (Hossain and Uddin, 2011).

Reactive oxygen species (ROS) are harmful compounds that accumulate in plants when they suffer some kind of stress, including flooding (Loreti et al., 2016). In our study, however, no significant increase in the MDA concentration was observed in any of the three varieties, including the most sensitive, 'Valenciana'. This suggests that pomegranate plants have an effective antioxidant system that neutralizes ROS. These systems consist of non-enzymatic (ascorbic acid,

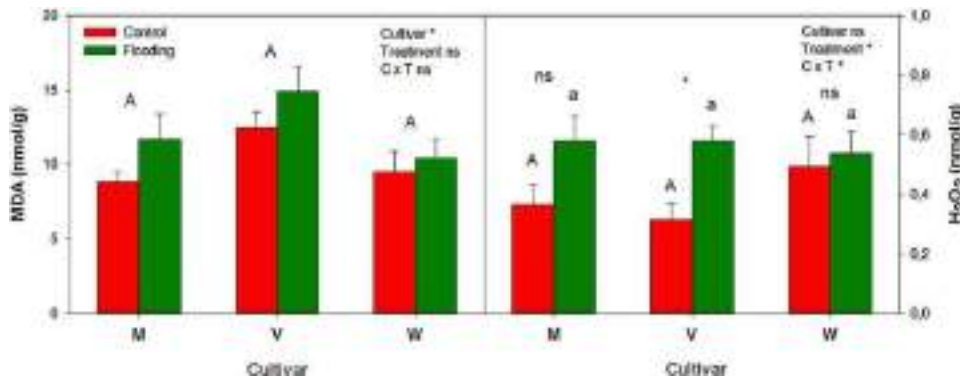


Fig. 6. Oxidative stress: concentrations of MDA and H_2O_2 in the pomegranate plants of the varieties M ('Mollar de Elche'), V ('Valenciana'), and W ('Wonderful') in the control and flood treatments. Different capital letters within each graph indicate significant differences ($P < 0.05$) among the varieties for the control (non-flood) treatment. If the interaction is not significant, the different capital letters within each graph indicate significant differences ($P < 0.05$) among the varieties, regardless of the treatment. Different lowercase letters within each graph indicate significant differences ($P < 0.05$) among the varieties for the flood treatment. In the ANOVA, ns and * indicate non-significant differences and significant at $P < 0.05$, respectively. Vertical bars represent the standard error ($n = 6$).

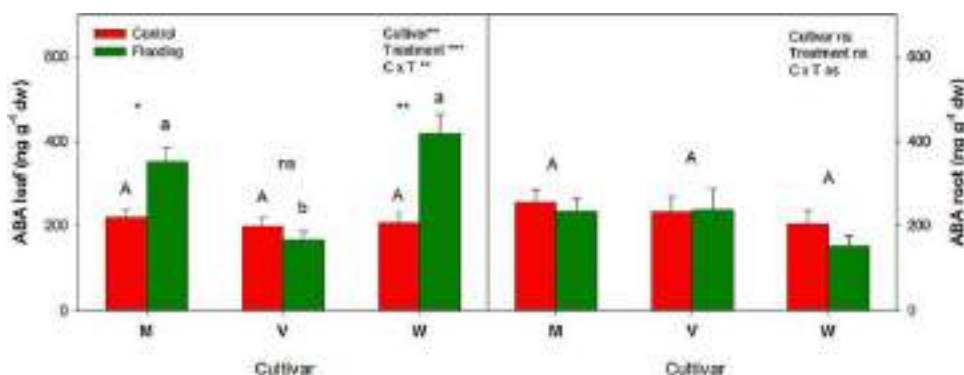


Fig. 7. Hormonal response: concentration of ABA in the leaves and roots of the pomegranate plants of the varieties M ('Mollar de Elche'), V ('Valenciana'), and W ('Wonderful') in the control and flood treatments. Different capital letters within each graph indicate significant differences ($P < 0.05$) among the varieties for the control (non-flood) treatment. If the interaction is not significant, the different capital letters within each graph indicate significant differences ($P < 0.05$) among the varieties regardless of the treatment. Different lowercase letters within each graph indicate significant differences ($P < 0.05$) among the varieties for the flood treatment. In the ANOVA, ns and * indicate non-significant differences and significant at $P < 0.05$, respectively. Vertical bars represent the standard error ($n=6$).

Table 2
Concentrations of carbohydrates and organic solutes in roots: reducing sugars, soluble sugars, starch, and proline of pomegranate plants in the control and flood treatment.

ROOT									
Variety	Treatment	Total soluble sugars (mg glucose g ⁻¹)		Reducing sugars (mg glucose g ⁻¹)		Starch (mg glucose g ⁻¹)		Proline (µg g ⁻¹)	
M	Control	53.05	± 2.48	32.60	± 1.78	1.95	± 0.23	0.82	± 0.06
	Flood	43.50	± 3.16	25.82	± 2.34	1.78	± 0.21	0.47	± 0.06
V	Control	57.40	± 1.15	35.33	± 0.81	1.76	± 0.12	0.61	± 0.03
	Flood	44.06	± 6.03	19.10	± 1.61	2.11	± 0.16	0.55	± 0.09
W	Control	41.01	± 4.58	26.73	± 2.83	1.50	± 0.17	0.66	± 0.14
	Flood	38.02	± 5.62	19.87	± 2.32	1.56	± 0.13	0.62	± 0.03
ANOVA									
Variety		*		*		ns		ns	
Treatment		*		***		ns		ns	
Variety × Treatment		ns		ns		ns		ns	

M = 'Mollar de Elche', V = 'Valenciana', W = 'Wonderful'.

ns, *, **, and *** indicate differences that are non-significant and significant at $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively ($n = 6$).

glutathione, α -tocopherol, and carotenoids) and enzymatic (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX)) components.

Abscisic acid is one of the most important of the root-shoot signaling hormones that regulate, among other things, plant transpiration. In our work, it appears that the most-tolerant varieties, 'Mollar de Elche' and 'Wonderful', had a response model that was different to that of the sensitive variety 'Valenciana' – since in this latter variety the foliar ABA concentration was not altered by flooding, while in the other two it increased. This is probably due to the fact that in 'Valenciana' the water deficit developed very rapidly, Ψ_w passing from -1.8 MPa on day 2 of flooding to -3.7 MPa on day 5, so that there was not enough time for ABA or its precursors to ascend to the aerial parts of the trees. Furthermore, in this assay we found no relationship between the ABA concentration and g_s . Thus, for the plants exposed to flooding, the g_s of 'Wonderful' was lower than that of 'Mollar de Elche', even though the concentration of ABA on the sixth day was greater in 'Wonderful' than in 'Mollar de Elche'. The above may suggest that in pomegranate plants the rapid stomatal closure produced in response to flooding occurs independently of the increase in foliar ABA, this hormone being re-sponsible for stomatal closure only during long periods of flooding – as has been seen in other experiments. For example, in citrus, a decrease in g_s was found to occur on day 7 under flood conditions, while a significant increase in ABA in the leaves occurred at 21 days (Rodríguez-Gamir et al., 2011). Studies of tomato detected increases in the xylem pH in plants growing in flooded soils, compared to non-flooded soils; the associated reduction in the g_s was not attributed to the increase in ABA (Else et al., 2006; Negin and Moshelion, 2016).

5. Conclusions

From this experiment it can be concluded that the three

pomegranate cultivars assayed were sensitive to flooding – in the face of which it exhibits no morphological, physiological, or biochemical adaptation mechanisms. Hence, the plants suffer water deficit problems that negatively alter photosynthesis, as shown by the decreases in A_{CO_2} , g_s , and Φ_{PSII} . On the other hand, although these three cultivars were sensitive to the flooding condition imposed, some varieties respond better than others: 'Mollar de Elche' and 'Wonderful' are more tolerant than 'Valenciana'. This seems to be due to the detrimental effects caused by flooding in 'Valenciana', rather than to the possible adaptation mechanisms that 'Mollar de Elche' and 'Wonderful' possess. Everything indicates that the roots of the variety 'Valenciana' are very sensitive to flooding – which considerably reduces their hydraulic conductance, thereby rapidly imposing water deficit on the plants. Future work should focus on how flooding affects the physico-chemical properties of the roots of the different varieties of pomegranate.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Project on Genetic Resources, Preservation of Endangered Species: pomegranate and quince, Ref. RFP2012-00009-00-00, funded by INIA-MINECO and FEDER, for the maintenance of the pomegranate tree and quince collection in which this study was performed.

References

- Amri, M., El Ouni, M.H., Salem, M.B., 2014. Water logging affect the development, yield and components, chlorophyll content and chlorophyll fluorescence of six bread wheat genotypes (Triticum aestivum L.). Bulg. J. Agric. Sci. 20 (3), 647–657.
- Arbona, V., Hossain, Z., Lopez-Climent, M.F., Perez-Clemente, R.M., Gomez-Cadenas, A., 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to water logging stress tolerance in citrus. Physiol. Plantarum 132, 452–466.
- Azizi, S., Tabari, M., Striker, G.G., 2017. Growth, physiology, and leaf ion concentration responses to long-term flooding with fresh or saline water of Populus euphratica. S.

- Afr. J. Bot. 108, 229–236.
- Badizadegan, M., 2015. Growth of pomegranate (*Punica granatum* L.) as affected by soil moisture tension. *J. Hort. Sci.* 50, 227–232.
- Bates, L., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207.
- Bhatt, R.M., Upreti, K.K., Divya, M.H., Bhat, S., Pavithra, C.B., Sadasiva, A.T., 2015. Interspecific grafting to enhance physiological resilience to flooding stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Sci. Horti.* 182, 8–17.
- Brennan, T., Frenkel, C., 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol.* 59, 411–416.
- Chaudhary, S., Kusakabe, A., Melgar, J.C., 2016. Phytophthora infection in flooded citrus trees reduces root hydraulic conductance more than under non-flooded condition. *Sci. Horti.* 202, 107–110.
- Diez, J.J., Esteban, M.D., López-Gutiérrez, J.S., Negro, V., 2013. Meteorological influence on inland and coastal floods in the east of Spain. *J. Coastal Res.* 29 (6A), 72–80.
- Dat, J.F., Capelli, N., Folzer, H., Bourgeade, P., Badot, P.M., 2004. Sensing and signaling during plant flooding. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 273–282.
- Du, K., Xu, L., Wu, H., Tu, B., Bo, Z., 2012. Ecophysiological and morphological adaptation to soil flooding of two poplar clones differing in flood-tolerance. *Flora* 207, 96–106.
- Else, M.A., Taylor, J.M., Atkinson, C.J., 2006. Anti-transpirant activity in xylem sap from flooded tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants is not due to pH mediated re-distributions of sourced ABA. *J. Exp. Bot.* 57, 335–349.
- Gimeno, V., Syvertsen, J.P., Simón, I., Nieves, M., Díaz-López, L., Martínez, V., García-Sánchez, F., 2012. Physiological and morphological responses to flooding with fresh or saline water in *Jatropha curcas*. *Environ. Exp. Bot.* 78, 47–55.
- Grieve, C.M., Grattan, S.R., 1983. Rapid assay for determination of water-soluble quaternary ammonium-compounds. *Plant Soil* 70, 303–307.
- Haissig, B.E., Dickson, R.E., 1979. Starch measurements in plant tissue using enzymatic hydrolysis. *Plant Physiol.* 47, 151–157.
- Hmid, I., Hanine, H., Elothmani, D., Oukabli, A., 2016. The physico-chemical characteristics of Moroccan pomegranate and evaluation of the antioxidant activity for their juices. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2016.06.002>. (in press).
- Hodge, J.E., Hofreites, B.T., 1962. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: Whistler, R.L., Wolfrom, M.L. (Eds.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Academic Press, New York.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., 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.
- Hossain, M.A., Uddin, S.A., 2011. Mechanisms of water logging tolerance in wheat: morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. *Aust. J. Crop Sci.* 5 (9), 1094–1101.
- Ibarra, E.M., 2012. A geographical approach to post-flood analysis: the extreme flood event of 12 October 2007 in Calpe (Spain). *Appl. Geogr.* 32, 490–500.
- Jackson, M.B., Ishizawa, K., Ito, O., 2009. Evolution and mechanisms of plant tolerance to flooding stress. *Ann. Bot.* 103, 137–142.
- Kissmann, C., da Veiga, E.B., Eichemberg, M.T., Habermann, G., 2014. Morphological effects of flooding on *Styrax pohlilii* and the dynamics of physiological responses during flooding and post-flooding conditions. *Aquat. Bot.* 119, 7–14.
- Lin, K.H., Kuo, W.S., Chiang, C.M., Hsiung, T.C., Chiang, M.C., Lo, H.F., 2013. Study of sponge gourd ascorbate peroxidase and winter squash superoxide dismutase under respective flooding and chilling stresses. *Sci. Horti.* 162, 333–340.
- Loreti, E., Veen, H., Perata, P., 2016. Plant responses to flooding stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33, 64–71.
- Mastrogiannidou, E., Chatzissavvidis, C., Antonopoulou, C., Tsabardoukas, V., Giannakoula, A., Therios, I., 2016. Response of pomegranate cv. 'wonderful' plants to salinity. *J. Soil Sci. Plant Nutr. Epub.* <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162016005000032>.
- Melgarejo, P., Martínez, J.J., Hernández Fca Legua, P., Melgarejo-Sánchez, P., Martínez, R., 2012. The pomegranate tree in the World: its problems and uses. II International Symposium on the Pomegranate. *Options méditerranéennes* n° 103.
- Morgan, J.M., 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 35, 299–319.
- Negin, B., Moshelion, M., 2016. The evolution of the role of ABA in the regulation of water-use efficiency: From biochemical mechanisms to stomatal conductance. *Plant Sci.* 251, 82–89.
- Nelson, M., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153–375.
- Parvizi, H., Sepaskhah, A.R., Ahmadi, S.H., 2014. Effect of drip irrigation and fertilizer regimes on fruit yields and water productivity of a pomegranate (*Punica granatum* (L.) cv 'Rabab') orchard. *Agric. Water Manage.* 146, 45–56.
- Pociecha, E., Rapacz, M., Dziurka, M., Kolaszińska, I., 2016. Mechanisms involved in the regulation of photosynthetic efficiency and carbohydrate partitioning in response to low- and high-temperature flooding triggered in winter rye (*Secale cereale*) lines with distinct pink snow mold resistances. *Plant Physiol. Biochem.* 104, 45–53.
- Pucciariello, C., Perata, P., 2012. Flooding tolerance in plants. In: Shabala, S. (Ed.), *Plant Stress Physiology*. CABI, UK.
- Quarrie, S.A., Whitford, P.N., Appleford, N.E.J., Wang, T.L., Cook, S.K., Henson, I.E., Loveys, B.R., 1988. A monoclonal antibody to (S) abscisic acid: its characterization and use in a radioimmuno assay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta* 173, 330–339.
- Quiroz, I., 2009. Granados, perspectivas y oportunidades de un negocio emergente: Antecedentes de mercado. *Fundación Chile*.
- Rodríguez-Gamir, J., Ancillo, G., González-Mas, M.C., Primo-Millo, E., Iglesias, D.J., Forner-Giner, M.A., 2011. Root signalling and modulation of stomatal closure in flooded citrus seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 636–645.
- Scholander, P., Hammel, H., Bradstreet, E.Y., Hemmingsen, E., 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148, 339–346.
- Sharma, K.K., Sharma, J., Kumar, P., 2006. Important diseases, disorders and insect-pest of pomegranate and their management. *Technol. Bull. Nat. Res. Centre Pomegranate Solapur* 1, 1–16.
- Sharma, S.D., Kumar, P., Bhardwaj, S.K., Chandel, A., 2015. Agronomic performance, nutrient cycling and microbial biomass in soil as affected by pomegranate based multiple crop sequencing. *Sci. Horti.* 197, 504–515.
- Somogyi, M., 1952. Note on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19–23.
- Striker, G.G., Insausti, P., Grimoldi, A.A., 2007. Effects of flooding at early summer on plant water relations of *Lotus tenuis*. *Lotus Newsl.* 37, 1–7.
- Syvertsen, J.P., García-Sánchez, F., 2014. Response to abiotic stresses of plants of Mediterranean-type ecosystems, in: Tattini, M., Loreto, F. (Eds.), *Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in citrus*. *Environ. Exp. Bot.* 103, 128–137.
- Teixeira da Silva, J.A., Rana, T.S., Narzary, D., Verma, N., Meshram, D.T., Ranade, S.A., 2013. Pomegranate biology and biotechnology. *Rev. Sci. Horti.* 77, 19–24.
- Tewari, S., Arora, N.K., Miransari, M., 2016. Plant growth promoting rhizobacteria to alleviate soybean growth under abiotic and biotic stresses. In: Miransari, M. (Ed.), *Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production*. Academic Press, Elsevier USA.
- Wang, G.B., Cao, F.L., 2012. Formation and function of aerenchyma in bald cypress (*Taxodium distichum* (L.) Rich.) and Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum* (L.) Roxb.) under flooding. *S. Afr. J. Bot.* 81, 71–78.
- Wu, Y., Kuzma, J., Marechal, E., Graeff, R., Lee, H.C., Foster, R., Chua, N.H., 1997. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* 278, 2126–2130.
- Yordanova, R.Y., Popova, L.P., 2007. Flooding-induced changes in photosynthesis and oxidative status in maize plants. *Acta Physiol. Plant.* 29, 535–541.
- Yu, B., Zhao, C.Y., Li, J., Li, J.Y., Peng, G., 2015. Morphological, physiological, and biochemical responses of *Populus euphratica* to soil flooding. *Photosynthetica* 53 (1), 110–117.

7.2. PUBLICACIÓN 2

Characterization of the ecophysiological responses of three pomegranate cultivars to salinity

Olmo, A., García-Sánchez, F., Simón, I., Lidón, V., Alfosea-Simón, M., Cámara-Zapata, J.M., Martínez-Nicolás, JJ., Simón-Grao, S.

Photosynthetica. 57(4), 1015–1024.

Factor de impacto: 2,562 Q2 (2019) (Categoría Plant Sciences)

Characterization of the ecophysiological responses of three pomegranate cultivars to salinity

A. OLMO*, F. GARCIA-SANCHEZ**+, I. SIMON*, V. LIDON*, M. ALFOSEA-SIMON**, J.M. CAMARA-ZAPATA*, J.J. MARTINEZ-NICOLAS*+, and S. SIMON-GRAO**

*School of Engineering of Orihuela, University of Miguel Hernández, Ctra. de Beniel, km 3.2, Orihuela, Alicante, Spain**

*Centre of Edaphology and Applied Biology of Segura, CEBAS-CSIC, University Campus of Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia, Spain***

Abstract

In order to understand photosynthetic responses of pomegranate plants (*Punica granatum* L.) to salinity, an experiment was conducted with three varieties, ‘Mollar de Elche’, ‘Valenciana’, and ‘Wonderful’, irrigated with seven salt concentrations (0, 40, 60, 80, 100, 120, and 140 mM NaCl). At the end of the experiment, parameters of gas exchange, chlorophyll fluorescence, water relations, and sugar and chloride concentrations were measured in leaves. As the concentration of NaCl increased, the concentration of Cl⁻ in leaves was elevated, and the CO₂ assimilation rate, stomatal conductance, variable fluorescence/maximum fluorescence ratio, PSII quantum yield, and total soluble sugars decreased. In ‘Valenciana’, the decrease of the net assimilation of CO₂ could occur due to the closure of stomata, while in ‘Mollar’ and ‘Wonderful’, this was due to damage caused by Cl⁻ toxicity. The study of carbohydrates also suggests a different behavior of carbon metabolism in the three varieties.

Additional key words: chloride toxicity; fruit tree; oxidative stress; photosynthesis; sodium toxicity; water stress.

Introduction

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is a very interesting fruit tree for arid and semiarid areas in any part of the world, as it adapts well to every type of soil and climates found in these regions. In the southeast of Spain, these trees are able to grow in poor soils and climates, and are frequently cultivated with other fruit trees, such as figs (*Ficus carica* L.) and date palms (*Phoenix dactylifera* L.), which are also resistant to drought, salinity, iron chlorosis, and active limestone (Melgarejo 1993). Nevertheless, studies have shown that under hypoxia and anoxia conditions, the growth of pomegranate trees is significantly affected, as a result of the water relations and parameters of gas exchange being affected (Olmo-Vega *et al.* 2017).

On the eastern side of Spain, the scarcity of good quality water, due to the lack of precipitation (Köppen-Geiger climate classification: BSh; annual rainfall of 344 mm), creates salinity problems in agricultural soils. Faced with the lack of water, the growers are obliged to use water from subterranean aquifers that have a high concentration

of soluble salts, mainly NaCl. In Spain, it is estimated that almost 3% of its arable land (3.5 million hectares) is seriously affected by salinity, resulting in damage to agricultural production, while 15% of this surface is in serious risk of salinization (Stolte *et al.* 2015).

The negative effects caused by salinity on crops can be mainly summarized in two factors: the osmotic effect and the toxic effect, although in some cases, nutritional alterations can be also observed (Parihar *et al.* 2015). Depending on the soil salinity, the exposure time of the plants to salinity, and the cultivar, one or the other factor can be given, or the combination of both. The osmotic effect refers to the salinity of the soil impeding the uptake of water by roots as it is retained by salts in the soil, resulting in alterations in the water status of plants, leading to the dehydration of tissues (Shabala and Munns 2017). This is one of the first visible symptoms when plants are watered with saline water, together with observed decrease in the elongation rate of leaves, due to changes in the water status of the cells. The other previously mentioned effect is toxicity, and it refers to the negative effects caused

Received 31 October 2018, *accepted* 24 July 2019.

+Corresponding author; email: fgs@cebas.csic.es (F. Garcia-Sanchez), juanjose.martinez@umh.es (J.J. Martinez-Nicolas)

Abbreviations: DM – dry mass; C_i – intercellular CO₂ concentration; E – transpiration rate; F_v/F_m' – antennas efficiency in the PSII reaction centers; g_s – stomatal conductance; P_N – net photosynthetic rate; q_P – photochemical quenching; RS – reducing sugars; RWC – relative water content; TNC – total nonstructural carbohydrates; TSS – total soluble sugars; Φ_{PSII} – photochemical efficiency of PSII; Ψ_w – leaf water potential.

Acknowledgements: The authors are grateful to the Project on Genetic Resources, Preservation of Endangered Species: Pomegranate and Quince (RFP2012-00009-00-00), funded by INIA-MINECO and FEDER, for the maintenance of the pomegranate tree and quince collection in which this study was performed.

by the high concentration of Cl^- and Na^+ in the plant tissues, especially in leaves. Despite the essential nature of Cl^- as a nutrient in higher plants and Na^+ as a mineral nutrient for many halophytes and some C_4 species, the concentrations of both ions in saline soils clearly exceeds the concentrations of the other nutrients, which results in their accumulation in the plant's tissues, causing toxicity, thereby affecting the correct functioning of plants at the physiological and metabolic levels, among others effects (Shabala and Munns 2017).

It is known that Spanish varieties of pomegranate trees are very tolerant to irrigation with saline water; however, there is a lack of research on the effects of salinity at the physiological level, specifically on the parameters of gas exchange, chlorophyll (Chl) fluorescence, water relations, and concentration of sugars, all of which are used to determine the physiological status of the plants (Ashraf and Harris 2013). According to Sun *et al.* (2018), pomegranate plants are very tolerant to saline water irrigation up to an EC of 15 dS m^{-1} . In the Iranian varieties 'Malas' and 'Shishe', it has been shown that when the salinity in the irrigation water increased from 1.05 to 4.61 and 7.46 dS m^{-1} , relative water content, stomatal conductance, total Chl, sugars, and Chl fluorescence parameters decreased (Khayat *et al.* 2014, 2016). Okhovatian-Ardakani *et al.* (2010) observed different levels of salinity tolerance in a study with ten Iranian cultivars of pomegranate watered with 4, 7, and 10 dS m^{-1} ; however, the differential responses were not directly related to the accumulation of Cl^- and/or Na^+ in the leaves. This suggests that the variations in the salinity tolerance between the pomegranate cultivars could depend on complex adaptation mechanisms acquired through time.

It is known that the variety 'Wonderful', one of the most popular varieties in southeastern Spain, is very tolerant to salinity, as it has mechanisms that mitigate the negative effects of this stress, thereby maintaining the normal water content, Chl fluorescence, and the activity of certain enzymes under high NaCl , KCl or Na_2SO_4 salt treatments (Mastrogiannidou *et al.* 2016). However, little is known about the physiological response to salinity of the cultivars 'Mollar' and 'Valenciana', two of the most popular native cultivars in southeastern Spain. Thus, the objective of the present work was to understand the responses of pomegranate cultivation to salinity, in order to elucidate the possible mechanisms of adaptation of these plants to adverse conditions. A three-tier study was planned: 1) physiological: to characterize gas exchange, chlorophyll fluorescence, and water relations; 2) nutritional: to know the accumulation of chloride in leaves; and 3) biochemical: to study the primary C metabolism related with sugars (total soluble sugars, reducing sugars, and starch).

Materials and methods

Plant material and growing conditions: Pomegranate plants (*Punica granatum* L.) were obtained in a commercial nursery through woody cuttings, which were performed 11 months after the start of the assay. In total, 126 plants were used, 42 from each variety ('Mollar', 'Valenciana',

and 'Wonderful'), which were approximately 15–20 cm in height. These plants were transplanted to 3.5-L pots which contained a substrate composed of peat, coconut fiber, and perlite (5:4:1, *Universal Substrate, Compost Reciclables*, Murcia, Spain). The experiment was conducted from the middle of May to the last week of June in 2016, in a multi-tunnel greenhouse in the experimental field 'Tres Caminos', belonging to the Center of Edaphology and Applied Biology of the Segura (CEBAS-CSIC) in the municipality of Santomera (Murcia, Spain). To control the temperature, a cooling system was used (*Novedades Agrícolas*, Murcia, Spain), which maintained the temperature under 30°C in the summer, and the control of humidity was managed with humidification equipment equipped with an air compressor (*Ingersoll-Rand, SSR*, Dublin, Ireland), which maintained the relative humidity above 65% throughout the day. To control the solar radiation, a shade netting was used (*Aluminet 30%*, *Novedades Agrícolas*, Murcia, Spain), and for irrigation, a Hoagland nutrient solution was utilized, composed of 6 mM KNO_3 , 4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgSO_4 , 20 μM EDDHA-Fe, 25 μM H_3BO_3 , 2 μM MnSO_4 , 2 μM ZnSO_4 , 0.5 μM CuSO_4 , 0.4 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$. This nutrient solution was prepared from the commercial fertilizers KNO_3 , CaNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , and a mix of micronutrients. The water used for the preparation of the nutrient solutions came from the Tajo-Segura transfer, and it was deionized with an inverse osmosis system (*KP45HWL, CWG*, Zagreb, Croatia). The treatments with NaCl were imposed by watering with a salt concentration of 20 mM NaCl at first, and this concentration was increased daily in 20 mM increments successively until the desired concentration for each treatment was reached (mM NaCl): T0 (0), T1 (40), T2 (60), T3 (80), T4 (100), T5 (120), and T6 (140). Thus, the plants did not suffer any osmotic shock. T0 was the control treatment where no NaCl was added. These NaCl concentrations are equivalent to the next electrical conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$) of 2.4, 5.5, 8.0, 9.6, 11.2, 12.9, 14.0, and the nutrient solution had a pH of 6.5 in all NaCl treatment.

A bifactorial experimental design was utilized, consisting of factors cultivar (C), with three cultivars, and factor of salt treatment (S) with seven saline treatments. Each combination cultivar \times salt treatment (C \times S) used six plants that were randomly placed in the greenhouse. The duration of the experiment was 70 d, and then the corresponding analytical measurements were performed.

Parameters of gas exchange and chlorophyll (Chl) fluorescence:

At the end of the experiment, the following gas-exchange parameters were measured: net assimilation of CO_2 (P_N), stomatal conductance (g_s), leaf transpiration (E), and intercellular CO_2 concentration (C_i). These parameters were measured between 8:00 and 11:00 h using a portable gas analyzer for the measurement of photosynthesis and gas exchange (*CIRAS-2, PP-System*, Amesbury, Massachusetts, USA). During the measurement phase, the equipment was configured to maintain a constant intensity of light [PAR of $1,000 \mu\text{mol}(\text{photon}) \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$] and CO_2 concentration (400 ppm) in the measuring chamber.

Chl measurements were performed on the same days and the same leaves used for measuring the gas-exchange parameters, using a modulated pulse portable fluorimeter (FMS-2, Hansatech Instruments, Norfolk, UK). The leaves used were previously conditioned in the dark for 30 min and illuminated for 5 μ s to induce fluorescence. The initial (F_0) and maximum (F_m) fluorescence were determined, and the variable fluorescence ($F_v = F_m - F_0$), the F_v/F_m ratio, and the F_v/F_0 ratio were calculated. This equipment was also used to calculate the fluorescence kinetics of leaves adapted to light. The parameters measured were: PSII quantum yield, $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_0')/F_m'$; PSII maximum efficiency, $F_v'/F_m' = (F_m' - F_0')/F_m'$; and photochemical quenching decay, $q_p = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$, where F_s is the fluorescence performance in a stable state, F_m' is the maximum value when all the reaction centers are closed after a saturating light pulse [12,000 μ mol(photon) $m^{-2} s^{-1}$ for 0.8 s], and F_0' is the minimum fluorescence in the state of adaptation to the light obtained by temporarily turning off the actinic light and applying a pulse of far-red light (735 nm) to drain the PSII of electrons.

Water relations: To understand the water status of the plants, a plant water status study was conducted at the end of the experiment by measuring the midday water potential (Ψ_w) and relative water content (RWC). The Ψ_w was determined by using a pressure chamber (Model 670, PMS Instrument, Corvallis, Oregon, USA) in completely expanded leaves found in the middle part of the plant (Scholander *et al.* 1965). The values were recorded as psi (pounds per square inch) and transformed to MPa with the following equation: $\Psi_w = [-(0.0687 \times \text{psi} + 0.091)/10]$. The RWC was measured in leaves similar to those used to measure water potential. The leaves were collected at midday (11:00–12:00 h) and were immediately weighed to obtain their fresh mass. The leaves were then placed in scintillation vials with the petioles submerged in deionized water, and were maintained at this state overnight in the dark at 4°C. Then, the saturated leaves were measured once again and dried at 60°C for 48 h to obtain their dry mass (Morgan 1984). The RWC was calculated as: $\text{RWC} = [(\text{fresh mass} - \text{dry mass}) \times 100]/(\text{saturated mass} - \text{dry mass})$.

Determination of carbohydrates and chlorides: At the end of the experiment, ten leaves from each plant were taken to determine the carbohydrates and the Cl^- contents. The total nonstructural carbohydrate (TNC) content in leaves was determined through extraction with ethanol (80%) of the dry plant material. Anthrone method (Hodge and Hofreiter 1962) was used to determine the total soluble sugars (TSS). Reducing sugars (RS) were analysed with the protocol described by Nelson (1944) and Somogyi (1952). The concentration of starch was obtained from the dry pellet, through an extraction with MES (0.5 M) at pH 5, and measuring it by using the protocol by Haissig and Dickson (1979). The concentration of Cl^- was measured with a chlorometer (Corning 926, Sherwood Scientific, Cambridge, England), after a previous extraction with deionized water.

Statistical analysis: The statistical treatment of the data included a basic statistic description (mean values and standard errors of the repetitions for each cultivar \times salt treatment combination), two-way analysis of variance (ANOVA), and Duncan's test for the separation of means for each cultivar, for those parameters where the main factor of salinity was significant ($P < 0.05$) in the ANOVA. Each cultivar \times salt treatment ($C \times S$) used six plants. The statistical package used was IBM SPSS Statistics 22 (Armonk, NY). For the creation of the graphics and regression analysis, the software program SigmaPlot 13.0 (Systat Software, San Jose, CA) was utilized.

Results

Gas exchange: In general, the salinity decreased P_N , g_s , and E , although their response was dependent on the cultivar. The P_N of the variety 'Mollar' decreased slightly with the increase of salinity in the irrigation water, this decrease became significant at T4 (100 mM) with a reduction of 36% compared to the control, reaching a reduction of 56% in treatment T6 (140 mM, Fig. 1). In the case of the variety 'Valenciana', a decrease of 50% was already observed in the lowest salt treatment (T1, 40 mM) with respect to the control. However, the application of higher salinity did not result in a significant variation until T6 (60%). On the other hand, in 'Wonderful', the P_N was progressively reduced until T3 (80 mM, a 43% reduction), and starting at this point, it decreased more slowly until reaching a final reduction of 61%. The C_i was not affected by the salt treatment in varieties 'Mollar' and 'Wonderful', while in the variety 'Valenciana', only a significant decrease was evidenced starting with the T3 treatment, after which it became stable. In the variety 'Mollar', the g_s significantly decreased in the first treatment, after which, it was maintained statistically stable until T6, where it decreased again. In variety 'Valenciana', T1 significantly decreased g_s for more than 50% with respect to the control values (T0), without significant differences found in any of the treatments with higher salt concentrations. In variety 'Wonderful', g_s started to decrease from T2 reaching the maximum reduction in T6 treatment, although there were not significant differences between T2, T3, T4, and T5 treatments. The salt treatments induced significant reductions of E ; in the varieties 'Mollar' and 'Valenciana', the leaf E significantly decreased at the T1 treatment, while in the variety 'Wonderful', the decrease of this parameter was significant starting with the T5 concentration (120 mM).

The P_N showed a significant polynomial relationship with g_s , as the g_s increased, the P_N was enhanced, with a linear section observed in the g_s range between 20–60 $\text{mol } m^{-2} s^{-1}$ (Fig. 2A). However, the P_N had a good linear correlation with the quantum yield of PSII (Φ_{PSII} , Fig. 2C), but the correlations with the leaf chlorine concentration were very weak (Fig. 2D). P_N showed a good correlation with C_i (Fig. 2B), although the regression model depended on pomegranate variety. Thus, 'Mollar' and 'Valenciana' varieties fitted to a linear regression, while 'Wonderful' fitted to a quadratic regression.

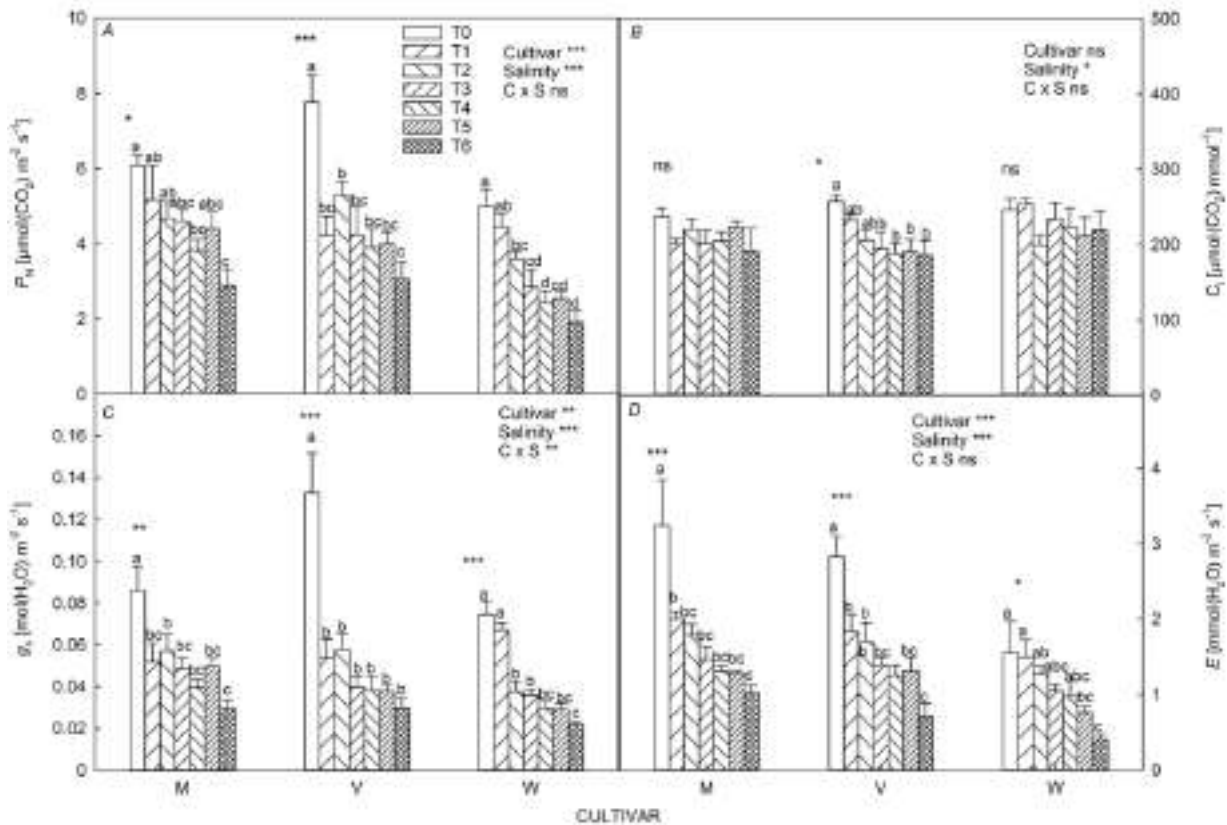


Fig. 1. Parameters of gas exchange. Net assimilation of CO₂ (P_N) (A), intercellular CO₂ (C_i) (B), stomatal conductance (g_s) (C), and leaf transpiration (E) (D) in three different cultivars of pomegranate: ‘Mollar’ (M), ‘Valenciana’ (V), and ‘Wonderful’ (W), watered with seven salt treatments: 0 mM (control, T0), 40 mM (T1), 60 mM (T2), 80 mM (T3), 100 mM (T4), 120 mM (T5), and 140 mM (T6) NaCl for 70 d. The vertical bars represent the standard error of the mean ($n = 6$). The lowercase letters indicate significant differences between the salt treatments at $P < 0.05$ established by *Duncan's* multiple range test. In the ANOVA, ns indicates insignificant differences at 95%. *, **, and *** indicate significant differences at $P < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively.

Chl fluorescence parameters: According to the ANOVA for the Chl fluorescence parameters (Fig. 3), it could be observed that the four parameters studied, quantum yield of PSII (Φ_{PSII}), photochemical quenching coefficient (qp), performance of PSII antenna (F_v/F_m'), and variable fluorescence/maximum fluorescence ratio (F_v/F_m), were strongly influenced by the cultivar as well as by salinity. There was also a highly significant interaction in F_v/F_m , and a moderately significant one in the F_v/F_m' ratio.

The varieties ‘Mollar’ and ‘Wonderful’ showed a progressive and significant decrease in Φ_{PSII} as the concentration of NaCl increased in the nutrient solution, as opposed to the behavior of ‘Valenciana’, where the decrease was less pronounced, and there was hardly a significant difference between the treatments (Fig. 3A). For the qp , in the variety ‘Mollar’, the behavior was irregular with respect to salinity (Fig. 3B), with a significant decrease with the application of T3 (80 mM), a posterior increase until reaching statistically equal values to the control when reaching treatment T5 (120 mM), to the later decrease with treatment T6 (140 mM). The variety ‘Valenciana’, on the other hand, did not show significant differences in this parameter in the different salt treatments. However, the variety ‘Wonderful’ showed a trend similar to the decrease of Φ_{PSII} . In the variety ‘Mollar’, F_v/F_m'

decreased significantly when the salinity reached the T3 values, being maintained for treatments T4, T5, and T6 (Fig. 3C). Similarly, in the variety ‘Valenciana’, F_v/F_m' was significantly reduced with T3, and then remained stable in the latter treatments with higher concentrations of salt. In the variety ‘Wonderful’, the behavior was similar as the one seen for the quantum yield of PSII. F_v/F_m' progressively decreased with increasing NaCl concentration in the nutrient solution, with significant decrease under T3, T4, and T5. For the response of F_v/F_m , it was observed in the variety ‘Mollar’, that the values of the F_v/F_m ratio significantly decreased with the application of T3, becoming stable when the concentration increased (Fig. 3D). However, the variety ‘Valenciana’ showed an irregular behavior after the application of different salt concentrations, showing a significant decrease with the application of T4, but obtaining similar values for T3 and T6. The variety ‘Wonderful’ showed a more regular behavior, with the F_v/F_m values decreasing with increasing NaCl concentration in the nutrient solution, with significant decreases found in T4 and T5.

Concentration of chloride in leaves: The three varieties showed a similar behavior in their concentration of Cl⁻ in leaves with respect to the salt treatments (Fig. 4).

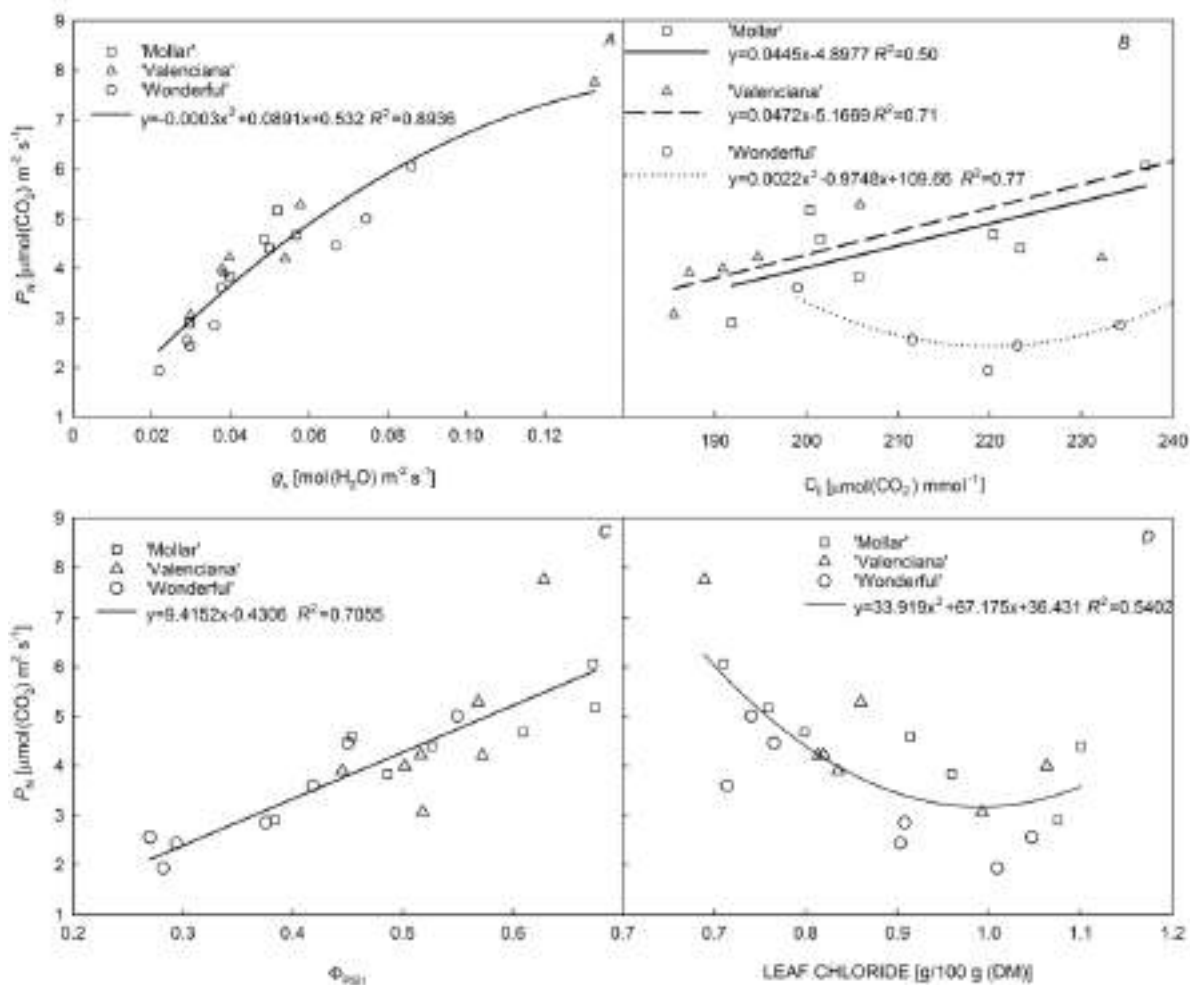


Fig. 2. Regressions of the net assimilation of CO₂ (P_N) with stomatal conductance (g_s) (A), intercellular CO₂ concentration (C_i) (B), quantum efficiency of PSII (Φ_{PSII}) (C), and leaf chloride concentration (D).

The concentration showed a regular increase when the concentration of NaCl increased in the nutrient solution, reaching the highest values in T5 (120 mM), with these being similar to those found in T6 (140 mM).

Water relations: The water potential at midday (Ψ_w) decreased as the concentration of NaCl increased in the nutrient solution, and this behavior was similar in all the cultivars according to the ANOVA (no interaction was found between salinity and cultivar). The Ψ_w of the variety ‘Mollar’ (Fig. 5) showed significant decrease with the application of treatments T1, T3, T4, and T6. In the variety ‘Valenciana’, there were significant changes with the application of T1, T5, and T6, but reached lower values with respect to ‘Mollar’ and ‘Wonderful’. In this last variety, the tendency followed a stepwise pattern, with significant changes occurring for T1, T3, and T5 treatments. Regarding the relative water content, no significant differences were found between treatments for any of the cultivars studied.

Concentration of carbohydrates: Table 1 shows the results of the leaf carbohydrate concentrations and their

ANOVA. For the variety ‘Mollar’, the TSS showed a general tendency to decrease as the concentration of salt increased in the irrigation water. This decrease ranged from 86.9–78.1 mg g⁻¹(DM) from control to T6 treatment. Although a significant increase of these sugars was observed in treatments T4 (100 mM) and T5 (120 mM) relative to the control, before decreasing again to values of 78.1 mg g⁻¹(DM). In the case of starch, the concentrations of 17.4 mg g⁻¹(DM) obtained initially tended to increase until the application of T3 (80 mM), and then decreased to values that were statistically similar to the initial ones. The RS tended to increase progressively from the initial values of 30.6 mg g⁻¹(DM), reaching a maximum value of 61.6 mg g⁻¹(DM) with NaCl concentration of 100 mM, after which it was reduced to 56.9 mg g⁻¹(DM). For the TSS:RS ratio, the values decreased from an initial value of 2.91 to 1.45, which suggests a response of this variety to salinity resulting in the storage of reducing sugars as opposed to soluble ones.

In the case of the variety ‘Valenciana’, the soluble sugars, as well as the starch, showed a general tendency to increase, shifting from initial values of 68.6 and 17.6 mg g⁻¹(DM), respectively, to final values of 107.0

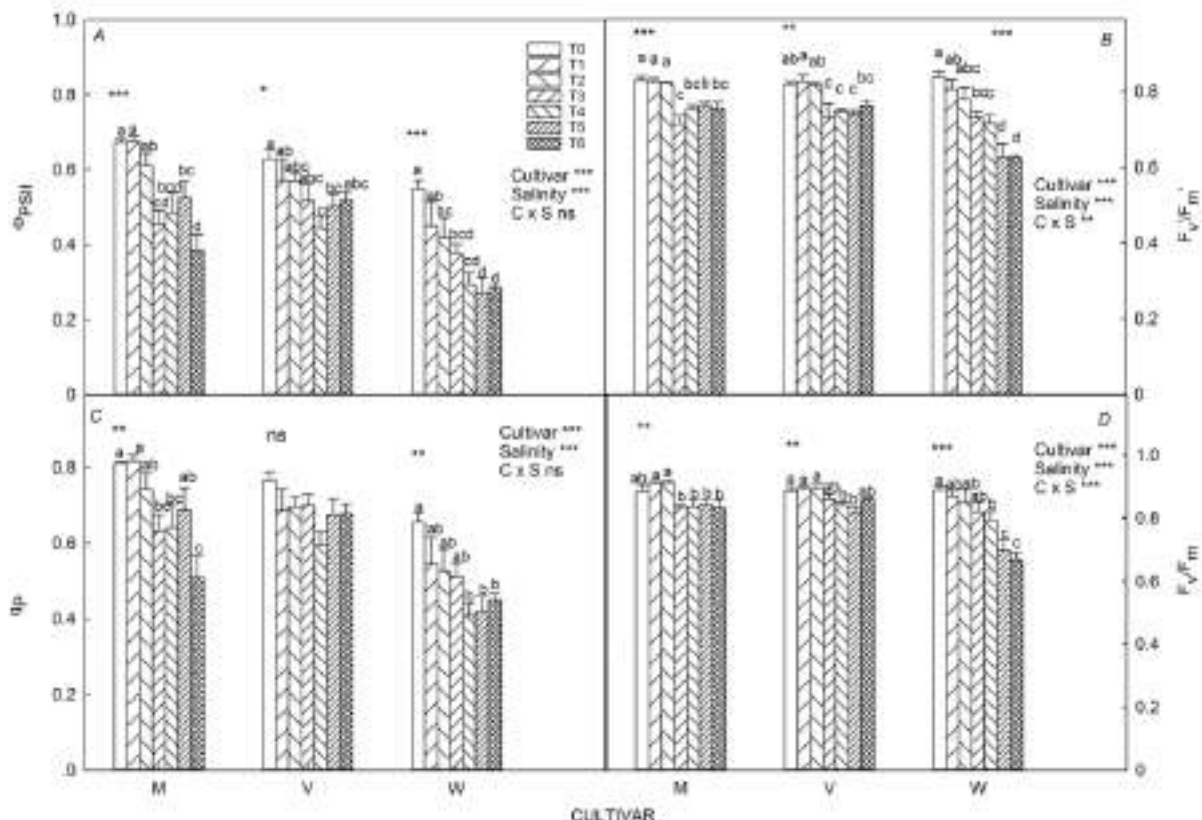


Fig. 3. Chlorophyll fluorescence. Quantum efficiency of PSII (Φ_{PSII}) (A), performance of the PSII antenna (F_v/F_m) (B), photochemical coefficient (q_p) (C), and variable fluorescence/maximum fluorescence ratio (F_v/F_m) (D) in three cultivars of pomegranate: ‘Mollar’ (M), ‘Valenciana’ (V), and ‘Wonderful’ (W); watered with seven salt treatments: 0 mM (control, T0), 40 mM (T1), 60 mM (T2), 80 mM (T3), 100 mM (T4), 120 mM (T5), and 140 mM (T6) NaCl for 70 d. The vertical bars represent the standard error of the mean ($n = 6$). The lowercase letters indicate significant differences between the salt treatments at $P < 0.05$ established by Duncan’s multiple range test. In the ANOVA, ns indicates insignificant differences at 95%. *, **, and *** indicate significant differences at $P < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively.

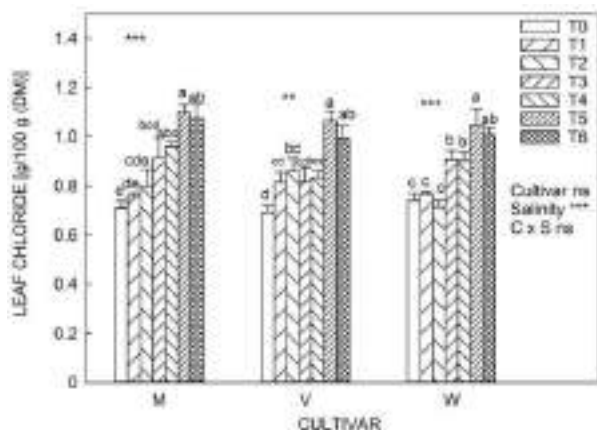


Fig. 4. Leaf chloride concentration in three cultivars of pomegranate: ‘Mollar’ (M), ‘Valenciana’ (V), and ‘Wonderful’ (W), watered with seven salt treatments: 0 mM (control, T0), 40 mM (T1), 60 mM (T2), 80 mM (T3), 100 mM (T4), 120 mM (T5), and 140 mM (T6) NaCl for 70 d. The vertical bars represent the standard error of the mean ($n = 6$). The lowercase letters indicate significant differences between the salt treatments at $P < 0.05$ established by Duncan’s multiple range test. In the ANOVA, ns indicates insignificant differences at 95%. *, **, and *** indicate significant differences at $P < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively.

and 23.5 mg g^{-1} (DM), respectively. The RS values were generally found to be stable, with a single increase in T5, while the TSS:RS ratio showed an irregular tendency, with decreases alternating with significant increases under increasing salinity.

In the variety ‘Wonderful’, the TSS initially increased from control values of 29.4 to 61.5 mg g^{-1} (DM) (T2), and from here the concentration was maintained statistically stable. However, the starch in the leaves showed another pattern. Under control conditions, the starch concentration was 20.9 mg g^{-1} (DM), and the salt treatments T1, T5, and T6 decreased it, reaching the lowest value in T5. On the other hand, the salt treatments T2, T3, and T4 did not alter the leaf starch concentration relative to the control treatment. The RS concentration was generally maintained constant, with a slight increase towards the final salt concentrations (T5 and T6). Given that the RS did not vary in an important manner as compared to the TSS, the TSS:RS ratio increased significantly, from 0.91 in the control treatment to 2.21 in the treatment with 80 mM of NaCl (T3). However, this value significantly decreased to 1.46 (T5) and 1.20 (T6), coinciding with the increase of the RS in the last treatments.

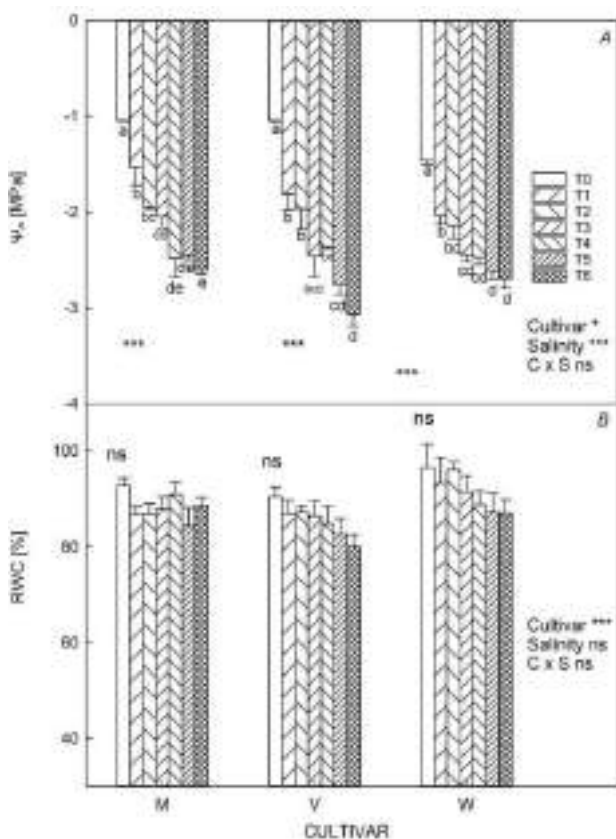


Fig. 5. Water potential at midday (Ψ_w) (A) and relative water content (RWC) (B) in three cultivars of pomegranate: 'Mollar' (M), 'Valenciana' (V), and 'Wonderful' (W), watered with seven salt treatments: 0 mM (control, T0), 40 mM (T1), 60 mM (T2), 80 mM (T3), 100 mM (T4), 120 mM (T5), and 140 mM (T6) NaCl for 70 d. The vertical bars represent the standard error of the mean ($n = 6$). The lowercase letters indicate significant differences between the salt treatments at $P < 0.05$ established by Duncan's multiple range test. In the ANOVA, ns indicates insignificant differences at 95%. *, **, and *** indicate significant differences at $P < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively.

Discussion

In this work, we observed that salinity in the irrigation water altered the physiological processes of pomegranate plants related to gas-exchange processes, Chl fluorescence, water relations, and carbon metabolism, as reported by the decrease of the variables net CO_2 assimilation, stomatal conductance, F_v/F_m ratio, quantum yield of PSII, TSS, and TSS:RS ratio. The net assimilation of CO_2 results (Fig. 1) showed no significant interaction between $C \times S$, which means that the response of these three varieties was similar, with a decrease of P_N observed with increasing NaCl concentration in the nutrient solution. It should be highlighted that in the variety 'Valenciana', the P_N was significantly reduced starting from T1 (40 mM NaCl), while in the varieties 'Mollar' and 'Wonderful', P_N was reduced starting at T4 (100 mM NaCl) and T2 (60 mM), respectively. Also, the salt treatments which produced a reduction of P_N equal or higher than 50%, relative

to the control treatment, was T6 for 'Mollar', T1 for 'Valenciana', and T4 for 'Wonderful'. This suggests that the photosynthetic apparatus of the variety 'Valenciana' was either more sensitive to salinity than that of the other two, or this variety has a series of physiological mechanisms for palliating the negative effects of salinity, which were different from the other two varieties. On the other hand, the causes responsible for the decrease of P_N were different for each cultivar. The effect of salinity on the P_N in many species of plants occurs due to two factors: stomatal and/or nonstomatal. The stomatal factor refers to the closing of stomata which causes a reduction in the partial pressure of CO_2 in the mesophyll cells of the leaves, while the nonstomatal factor refers to the damages caused to the metabolic processes of CO_2 fixation (Lawlor and Cornic 2002, Meloni *et al.* 2003, DeRidder and Salvucci 2007). The parameter of intercellular concentration (C_i ; Farquhar and Sharkey 1982) provides us with information which of the two factors was responsible for the loss of P_N . In our experiment, it could be observed that salinity decreased C_i in the variety 'Valenciana', which implied that the decrease of P_N was due to the stomata closure. However, in the other two varieties ('Mollar' and 'Wonderful'), the P_N decreased due to metabolic damage, as shown by C_i , which did not change with salinity. Aside from the C_i values, the parameters obtained by the Chl fluorescence study support the hypothesis that the nonstomatal factors were important in the reduction of the P_N in the varieties 'Wonderful' and 'Mollar', as in these plants, an important reduction of quantum yield of PSII (Φ_{PSII}) was observed (a reduction of 48 and 41%, respectively), and this was due to the reduction of F_v/F_m' and q_p as well. The decrease of these factors means that these plants lowered efficiency of converting light energy to chemical energy (Maxwell and Johnson 2000) due to the damage in processes of capture and transport of light energy from the photosynthetic pigments to the reaction center of PSII (F_v/F_m'), as well as the metabolic processes related to the Calvin cycle (q_p). In the regression study of the parameters of gas exchange as compared to the parameters of Chl fluorescence, this idea can be clearly observed, where the decrease of the P_N is accompanied with a decrease of Φ_{PSII} (Fig. 2C), F_v/F_m' , and q_p (data not shown).

The reduction and/or inhibition of the plant's growth, when exposed to salt (NaCl) in the nutrient solution, can be attributed to drastic changes of the water status of plants (osmotic effect of salinity), toxicity due to the excessive accumulation of Cl^- and Na^- in the different plant tissues, and the nutritional disequilibrium caused by alterations in the absorption of essential nutrients (Munns 2002, Rodrigues 2007). The study conducted in our assay of water and mineral nutrition (analysis of Cl^- in leaves), showed that, when the concentration of NaCl increased in the nutrient solution, the concentration of Cl^- increased in the leaves, while the water potential decreased. This behavior was similar in all three varieties, as a significant interaction between $C \times S$ in the ANOVA was not found. Despite the fact that the water potential decreased with salinity, the RWC was not affected significantly. This result allowed us to discard the osmotic effect of the salinity as

Table 1. Total soluble sugars (TSS), starch, reducing sugars (RS), and total soluble sugars:reducing sugars ratio (TSS:RS) in three different cultivars of pomegranate: ‘Mollar’, ‘Valenciana’, and ‘Wonderful’, watered with seven salt treatments: 0 mM (control, T0), 40 mM (T1), 60 mM (T2), 80 mM (T3), 100 mM (T4), 120 mM (T5), and 140 mM (T6) NaCl for 70 d. In the ANOVA, ** and *** indicate significant differences at $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively. The lowercase letters indicate significant differences between the salt treatments at $P < 0.05$ established by Duncan's multiple range test. The values are means \pm SE ($n = 6$).

Cultivar	Treatment	TSS [mg g ⁻¹ (DM)]	Starch [mg g ⁻¹ (DM)]	RS [mg g ⁻¹ (DM)]	TSS:RS
‘Mollar’	T0	86.9 \pm 0.49 _a	17.4 \pm 0.49 _c	30.6 \pm 2.50 _c	2.91 \pm 0.23 _a
	T1	72.7 \pm 3.11 _b	21.9 \pm 0.43 _b	51.3 \pm 2.24 _{ab}	1.41 \pm 0.04 _c
	T2	73.7 \pm 1.20 _b	25.1 \pm 0.37 _a	50.9 \pm 2.02 _{ab}	1.46 \pm 0.07 _c
	T3	79.1 \pm 2.88 _b	24.6 \pm 0.33 _a	60.9 \pm 1.32 _a	1.30 \pm 0.05 _c
	T4	93.7 \pm 1.63 _a	20.3 \pm 0.59 _b	61.6 \pm 2.01 _a	1.53 \pm 0.07 _c
	T5	93.3 \pm 1.64 _a	20.9 \pm 0.40 _b	46.3 \pm 4.62 _b	2.12 \pm 0.26 _b
	T6	78.1 \pm 2.75 _b	18.2 \pm 0.81 _c	56.9 \pm 7.06 _{ab}	1.45 \pm 0.16 _c
ANOVA		***	***	**	***
‘Valenciana’	T0	68.6 \pm 3.58 _c	17.6 \pm 0.39 _b	26.4 \pm 1.00 _c	2.59 \pm 0.06 _a
	T1	70.8 \pm 2.71 _c	17.6 \pm 0.26 _b	53.8 \pm 1.64 _b	1.32 \pm 0.07 _c
	T2	88.8 \pm 3.54 _b	22.7 \pm 0.85 _a	42.8 \pm 5.64 _b	2.18 \pm 0.22 _{ab}
	T3	85.0 \pm 2.02 _b	22.8 \pm 0.63 _a	43.2 \pm 0.60 _b	1.96 \pm 0.06 _b
	T4	93.2 \pm 4.93 _b	19.4 \pm 0.57 _b	43.4 \pm 2.25 _b	2.14 \pm 0.04 _{ab}
	T5	94.0 \pm 3.59 _b	22.3 \pm 0.56 _a	65.5 \pm 3.44 _a	1.45 \pm 0.11 _c
	T6	107.4 \pm 4.44 _a	23.5 \pm 0.54 _a	48.3 \pm 3.49 _b	2.27 \pm 0.20 _{ab}
ANOVA		***	***	***	***
‘Wonderful’	T0	29.4 \pm 2.05 _c	20.9 \pm 0.39 _a	32.5 \pm 2.44 _{bc}	0.91 \pm 0.06 _c
	T1	34.8 \pm 4.19 _c	18.6 \pm 0.80 _{bc}	31.5 \pm 1.89 _{bc}	1.10 \pm 0.12 _{bc}
	T2	61.5 \pm 3.46 _{ab}	20.0 \pm 0.77 _{ab}	39.5 \pm 3.92 _b	1.64 \pm 0.22 _{ab}
	T3	57.6 \pm 4.23 _{ab}	20.7 \pm 0.68 _{ab}	26.8 \pm 2.12 _c	2.21 \pm 0.27 _a
	T4	54.1 \pm 1.39 _{ab}	19.6 \pm 0.60 _{abc}	36.9 \pm 2.80 _{bc}	1.50 \pm 0.12 _{bc}
	T5	50.9 \pm 1.83 _b	13.8 \pm 0.47 _d	36.6 \pm 4.58 _{bc}	1.46 \pm 0.15 _{bc}
	T6	63.8 \pm 3.06 _a	17.6 \pm 0.25 _c	53.2 \pm 3.08 _a	1.20 \pm 0.04 _{bc}
ANOVA		***	***	**	**
Cultivar		***	***	***	***
Salinity		***	***	***	***
C \times S		***	***	***	***

being responsible for the reduction of the P_N . All the data point out that the decrease of the P_N was due to the toxicity of Cl^- in the ‘Mollar’ and ‘Wonderful’ varieties, and the stomatal closure in ‘Valenciana’. Another result from this study was the finding that the concentration of Cl^- in the leaves was relatively low for the high concentrations of NaCl in the irrigation water, when compared with other crops such as citrus (Syvertsen and Garcia-Sanchez 2014). Mastrogiannidou *et al.* (2016) and Karimi and Hasanpour (2014) proposed that the pomegranate tree could employ mechanisms of restriction against the transport of Cl^- from the root to the shoot of the trees, which allows them to resist the high salinity in the irrigation water. Also, it has been shown that this crop is very resistant against drought (Pourghayoumi *et al.* 2017). Taking into account that the tolerance of the plants to drought and Cl^- toxicity depends on water-use efficiency, among other factors, we could suggest that the pomegranate plants could be resistant to these stresses due to the control they have over leaf transpiration, although this hypothesis has yet to be proven. Although in most plant species salinity causes altera-

tions in the process of CO_2 fixation, a single model that estimates how this stress influences the concentration, composition, and distribution of carbohydrates in plants is not available. In various plant species, such as olive trees, salinity induces an increase of the TNC in the leaves, with these carbohydrates intervening in the process of osmotic adjustment that are necessary for maintaining the cellular turgor in the leaves under conditions of low water potential in soil (Tattini *et al.* 2009). In other species of plants, such as citrus, in which the process of osmotic potential fundamentally depends on the accumulation of Cl^- and Na^+ , the leaf concentrations of carbohydrates decrease due to the decrease of the P_N (Arbona *et al.* 2005). The increase in the concentration of carbohydrates could be one of the mechanisms employed by plants to resist problems resulting from salinity, through an osmotic adjustment and/or through combating oxidative stress. In our experiment, the concentration of the TSS in the leaves of varieties ‘Valenciana’ and ‘Wonderful’ increased with salinity, while the variety ‘Mollar’ was hardly affected. Also, in the variety ‘Mollar’ and ‘Valenciana’, the concentration of the

RS increased. This implies that in the variety 'Valenciana', the carbon metabolism could have been adjusted so that the carbohydrates intervened in the processes of osmotic adjustment as well as in the deactivation of free radicals of oxygen, while in the varieties 'Wonderful' and 'Mollar', it tends to be directed towards the osmotic adjustment of the plant, or the protection against oxidative stress, respectively. This response was completely different to the one found for the varieties of Iranian pomegranates 'Malas Torsh', 'Malas Shirin', 'Alak Torsh', 'Malas-e-Saveh', and 'Shishe-Kab', where a decrease in the concentration of TSS in the leaves was observed in trees watered with saline water (Naeini *et al.* 2006, Khayyat *et al.* 2014).

Conclusion: In this experiment, we described the eco-physiological responses of three pomegranate varieties ('Mollar', 'Valenciana', and 'Wonderful'), using the measurement of parameters of gas exchange, chlorophyll fluorescence, water relations, and the leaf concentration of carbohydrates and Cl⁻. Although the pomegranate trees are very resistant to salinity, as shown by studies by Maas and Hoffman (1977) and Steppuhn *et al.* (2005), in our experiment, a different behavior was found in the studied varieties. The variety 'Valenciana' showed a reduction in the PN due to stomatal closure, while the varieties 'Mollar' and 'Wonderful' could reduce PN due to damages to their photosynthetic apparatus caused by Cl⁻ toxicity. Also, in the variety 'Valenciana', the carbon metabolism under stress conditions was presumably directed towards the plant osmotic adjustment, as well as towards the reduction of reactive oxygen species. Future research studies should be focused on elucidating the role of antioxidant systems of pomegranate trees in the response to salinity, as it is well known that these plants have fruits and leaves with a great antioxidant capacity.

References

- Arbona V., Marco A., Iglesias D. *et al.*: Carbohydrate depletion in roots and leaves of salt-stressed potted *Citrus clementina* L. – *Plant Growth Regul.* **46**: 153-160, 2005.
- Ashraf M., Harris P.J.C.: Photosynthesis under stressful environments: An overview. – *Photosynthetica* **51**: 163-190, 2013.
- DeRidder B.P., Salvucci M.E.: Modulation of Rubisco activase gene expression during heat stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) involves post-transcriptional mechanisms. – *Plant Sci.* **172**: 246-254, 2007.
- Farquhar G.D., Sharkey T.D.: Stomatal conductance and photosynthesis. – *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**: 317-345, 1982.
- Haissig B.E., Dickson R.E.: Starch measurements in plant tissue using enzymatic hydrolysis. – *Physiol. Plantarum* **47**: 151-157, 1979.
- Hodge J.E., Hofreiter B.T.: Determination of reducing sugars and carbohydrates. – In: Whistler R.L., Wolfrom M.L. (ed.): *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Pp. 380-394. Academic Press, New York 1962.
- Karimi H.R., Hasanpour Z.: Effects of salinity and water stress on growth and macro nutrients concentration of pomegranate (*Punica granatum* L.). – *J. Plant Nutr.* **37**: 1937-1951, 2014.
- Khayyat M., Tehranifar A., Davarynejad G.H., Sayyari-Zahan M.H.: Vegetative growth, compatible solute accumulation, ion partitioning and chlorophyll fluorescence of 'Malas-e-Saveh' and 'Shishe-Kab' pomegranates in response to salinity stress. – *Photosynthetica* **52**: 301-312, 2014.
- Khayyat M., Tehranifar A., Davarynejad G.H., Sayyari-Zahan M.H.: Effects of NaCl-salinity on some leaf nutrient concentrations, non-photochemical quenching and the efficiency of the PSII photochemistry of two Iranian pomegranate varieties under greenhouse and field conditions: Preliminary results. – *J. Plant Nutr.* **39**: 1752-1765, 2016.
- Lawlor D.W., Cornic G.: Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. – *Plant Cell Environ.* **25**: 275-294, 2002.
- Maas E.V., Hoffman G.J.: Crop salt tolerance – Current assessment. – *J. Irr. Drain. Div.-ASCE* **103**: 115-134, 1977.
- Mastrogiannidou E., Chatzissavvidis C., Antonopoulou C. *et al.*: Response of pomegranate cv. Wonderful plants to salinity. – *J. Soil Sci. Plant Nut.* **16**: 621-636, 2016.
- Maxwell K., Johnson G.: Chlorophyll fluorescence: a practical guide. – *J. Exp. Bot.* **51**: 659-668, 2000.
- Melgarejo P.: [Varietal characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.)] – *Agricola Vergel* **12**: 260-262, 1993. [In Spanish]
- Meloni D.A., Oliva M.A., Martínez C.A., Cambraia J.: Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. – *Environ. Exp. Bot.* **49**: 69-76, 2003.
- Morgan J.M.: Osmoregulation and water stress in higher plants. – *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 299-319, 1984.
- Munns R.: Comparative physiology of salt and water stress. – *Plant Cell Environ.* **25**: 239-250, 2002.
- Naeini M.R., Khoshgoftarmanesh A.H., Fallahi E.: Partitioning of chlorine, sodium, and potassium and shoot growth of three pomegranate cultivars under different levels of salinity. – *J. Plant Nutr.* **29**: 1835-1843, 2006.
- Nelson M.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. – *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380, 1944.
- Okhovatian-Ardakani A., Mehrabian M., Dehghani F., Akbarzadeh A.: Salt tolerance evaluation and relative comparison in cutting of different pomegranate cultivars. – *Plant Soil Environ.* **56**: 176-185, 2010.
- Olmo-Vega A., García-Sánchez F., Simón-Grao S. *et al.*: Physiological responses of three pomegranate cultivars under flooded conditions. – *Sci. Hortic.-Amsterdam* **224**: 171-179, 2017.
- Parihar P., Singh S., Singh R. *et al.*: Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. – *Environ. Sci. Pollut. R.* **22**: 4056-4075, 2015.
- Pourghayoumi M., Bakhshi D., Rahemi M. *et al.*: The physiological responses of various pomegranate cultivars to drought stress and recovery in order to screen for drought tolerance. – *Sci. Hortic.-Amsterdam* **217**: 164-172, 2017.
- Rodrigues C.R.F.: [Effects of sodium chloride on growth and accumulation of castor bean nutrients.] PhD Thesis. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007. [In Spanish]
- Scholander P.F., Hammel H.T., Bradstreet E.D., Hemmingsen E.A.: Sap pressure in vascular plants. – *Science* **148**: 339-346, 1965.
- Shabala S., Munns R.: Salinity stress: physiological constraints and adaptive mechanisms. – In: Shabala S. (ed.): *Plant Stress Physiology*. Pp. 24-63. CABI, Wallingford 2017.
- Somogyi M.: Note on sugar determination. – *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23, 1952.
- Steppuhn H., van Genuchten M.T., Grieve C.M.: Root-zone salinity: II. Indices for tolerance in agricultural crops. – *Crop Sci.* **45**: 221-232, 2005.

Stolte J., Tesfai M., Øygarden L. *et al.*: Soil Threats in Europe: Status, Methods, Drivers and Effects on Ecosystem Services. Pp. 69-78. Office for Official Publications of the European Community, Luxembourg 2015.

Sun Y., Niu G., Masabni J.G., Ganjegunte G.: Relative salt tolerance of 22 pomegranate (*Punica granatum*) cultivars. – HortScience **53**: 1513-1519, 2018.

Syvertsen J.M., Garcia-Sanchez F.: Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in citrus. – Environ. Exp. Bot. **103**: 128-137, 2014.

Tattini M., Traversi M.L., Castelli S. *et al.*: Contrasting response mechanisms to root-zone salinity in three co-occurring Mediterranean woody evergreens: a physiological and biochemical study. – Funct. Plant Biol. **36**: 551-563, 2009.

© The authors. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons BY-NC-ND Licence.

7.3. PUBLICACIÓN 3

The high tolerance of pomegranate trees to the excess of B in irrigation water is due to their capacity to limit B transport from the root to the leaves

Olmo-Vega, A., Simón-Grao, S., Simón, I., Alfosea-Simón, M., Martínez-Nicolás, J.J., García-Sánchez, F.

Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 184, 142–149.

Factor de impacto: 2,823 Q2 (2019) (Categoría Agronomy)

The high tolerance of different pomegranate cultivars to the excess of Boron in irrigation water is due to their capacity to limit Boron transport from the root to the leaves

Antonio Olmo-Vega¹, Silvia Simón-Grao², Inmaculada Simón¹, Marina Alfosea-Simón¹, Juan José Martínez-Nicolás^{1*}, and Francisco García-Sánchez^{2*}

¹ Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández, Carretera de Beniel, km 3.2, Orihuela, Alicante, Spain

² Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus Universitario de Espinardo, Espinardo 30100, Murcia, Spain

Abstract

Background: Presently, irrigation waters often have a high concentration of boron (B), and the fruit trees in the Mediterranean areas, in general, are exposed to a high risk of B toxicity.

Aims: To test the hypothesis that pomegranate trees are very tolerant to the presence of B in the irrigation water, to elucidate the physiological mechanisms behind this tolerance, and to assess differences between different varieties.

Methods: In this study, the physiological and nutritional behavior of three pomegranate cultivars ('Mollar de Elche', 'Valenciana', and 'Wonderful'), treated with five B concentrations (0.25, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 mg L⁻¹), were studied. At day 30 and 60 after the start of the treatments, growth measurements, gas exchange parameters and organic solutes were recorded.

Results: Almost no significant differences were observed between the B treatments for any of the cultivars. Increasing the B concentration in the nutrient solution increased B concentrations in the leaves, but they never exceed 40 mg kg⁻¹ of B. In the roots, however, B concentrations were very high, up to 400 mg kg⁻¹.

Conclusion: Pomegranate trees are very tolerant to B excess due to their ability to accumulate B in great quantities in the root, without causing toxicity to this part of the plant, thus limiting its transport to the shoots.

Key words: boron uptake and transport / boron toxicity / gas exchange parameters / *Punica granatum* / Mollar / Wonderful

Accepted November 21, 2020

1 Introduction

In Mediterranean countries, climatic change effects are being observed regularly (IPCC, 2014), exemplified by the lack of water, as the drought periods are becoming longer and more intense, seriously harming the crops (De Ollas et al., 2019). Farmers, in order to palliate these effects, must use water from non-conventional sources, such as water from salt water desalinating plants and/or urban and industrial purification plants. The problem is that these waters contain a high concentration of B (Mendoza-Grimón et al., 2019), which tends to be toxic for the crops, especially the woody crops grown in the Mediterranean region. Crops, such as citrus, figs, grapevines, apricots or peaches, are very sensitive to the excess of B, with a threshold of toxicity set at 0.5 mg L⁻¹ (Mengel and Kirkby, 2001).

The high concentration of B in the crops affects several physiological processes, including: (1) decreases in the photosynthetic rate and the efficiency of photosystem II, (2) an increase in lipid peroxidation, (3) alterations of the enzymes

within the antioxidant pathways, (4) an increase in membrane permeability, (5) a reduction in the extrusion of protons in roots, (6) a deposition of suberin and lignin, and (7) a nutritional disequilibrium (Simón et al., 2013; Simón-Grao et al., 2019), which results in necrosis in leaves and shoots, decreases in vegetative growth, misshaping of fruits, etc. (Princi et al., 2016a).

The plant's degree of tolerance to B tends to be due to their capacity to reduce the accumulation of B in their tissues and/or the deactivation or palliation of its toxicity (Landi et al., 2019). In the first case, it has been observed that some plants have a low rate of B absorption and transport from the roots to the leaves, where the B exclusion from the root cells to the rhizosphere could be involved. In the second case, the mechanisms that can reduce B toxicity could be the synthesis of polyol compounds whose chemical structure allows for the complexation of B, mobilizing it to plant tissues that are less sensitive; the increase of the antioxidant capacity to deacti-



* Correspondence: J. J. Martínez Nicolás;
e-mail: juanjose.martinez@umh.es

vate the reactive oxygen species produced; and the compartmentalization of B to the vacuoles and cell walls, which are less sensitive to its toxicity (Landi et al., 2019).

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is one of the most important emerging fruit trees in the world. The total area dedicated to its cultivation is larger than 302,000 ha, and the most important countries are India, Iran, China, Turkey, United States, and Spain (Hernández et al., 2012). Pomegranate is known for its low tolerance to flooding (Olmo-Vega et al., 2017), but it is also very resistant to other abiotic stresses such as salinity or drought (Olmo et al., 2019). Thus, its cultivation has displaced other traditional Mediterranean fruit crops such as citrus, in areas where they are not profitable. As for the response of this fruit tree to high concentrations of B, farmers have observed that these trees grow well in areas where a risk of suffering from this type of toxicity exists. However, scientific knowledge on the mechanisms of adaptation of these trees for growing in these habitats is still lacking. In the present study, we wanted to test the hypothesis that pomegranate trees are very tolerant to the presence of high B in the irrigation water. At the same time, we aimed to elucidate the physiological mechanisms underlying this tolerance, especially related to the absorption and transport processes of B in trees, and the effect of B excess on photosynthesis. To this end, three different varieties were assessed.

2 Material and methods

2.1 Plant material and experimental conditions

For the present study, pomegranate cultivars of 'Mollar de Elche', 'Valenciana', and 'Wonderful' were utilized. They were obtained through hardwood cuttings from a commercial nursery nine months before taking the plants to the research greenhouse. Once the plants were received, they were transplanted into 4-L pots filled with a mix of white and black peat, coconut fiber and perlite in a 5:4:1 ratio (Projar, Spain) and placed in a greenhouse. Pots were watered with a local irrigation system with self-compensating and self-draining drippers with a flow rate of 4 L h⁻¹ and with a complete Hoagland nutrient solution composed of 7.75 mM NO₃⁻, 0.7 mM H₂PO₄⁻, 4.05 mM K⁺, 2.20 mM Ca²⁺, 0.5 mM Mg²⁺, 0.5 mM SO₄²⁻, and 0.6 mM Fe. The environmental characteristics of the greenhouse were in summer: photosynthetically active radiation (PAR) of 1000 mmol m⁻² s⁻¹, an average temperature of 26.0°C, average relative humidity of 27.7%, and a natural photoperiod of 15 h, and in autumn: photosynthetically active radiation (PAR) of 1000 mmol m⁻² s⁻¹, an average temperature of 23.8°C, average relative humidity of 42.1%, and a natural photoperiod of 9 h. A total of 120 plants were utilized, 40 from each cultivar ('Mollar de Elche', 'Valenciana', and 'Wonderful'). The experiment lasted 60 d, with 3 harvests of plant material (leaf, stem, and root) for the corresponding analyses, one day at day 0 (starting treatment, August 15, 2017), one at day 0 (starting treatment, August 15, 2017), another on September 15, 2017 (summer period), and the last on October 15, 2017 (autumn period). The experimental design was two-factor, with the factor cultivar (C) with 3 cultivars and the factor B treatment (B) with 5 concentrations of B (mg L⁻¹): T0 (0.25), T1 (1.25), T2 (2.5), T3 (5.0), and T4 (10.0). B was applied as boric acid to the nutrient solution.

2.2 Growth parameters

In each of the three samplings conducted (at days 0, 30, and 60), the leaves, stems and roots were weighed separately. Afterwards, they were washed with abundant distilled water and dried in an oven at 60°C for 48 h. Afterwards, the dried material was weighed, and the following growth parameters were obtained: leaf biomass, stem biomass, and root biomass as dry weight (g dw), utilizing this data to calculate total biomass. The dry material was milled with an IKA analytical mill and the milled samples were saved for their posterior analyses.

2.3 Concentration of B in different plant tissues

For the determination of B in the plant material samples, the method by Chapman and Pratt (1961) was followed. For this, 100 mg of dry plant material were weighed, 3 mL of nitric-perchloric acid were added, and left at room temperature for 12 h. Afterwards, a digestion was made in a block digester in various stages, starting with a temperature of 50°C for approximately 2 h, and progressively increasing every 2–3 h until reaching 200°C, maintaining this temperature constant until complete de-coloration (approximately 3 h). Once at room temperature, the residue containing the B was re-dissolved in 50 mL deionized water. The resulting samples were analyzed with an ICAP 6500 inductively coupled plasma optical emission spectrophotometer (ICP-OES). Thus, the concentrations of B were obtained for the three plant tissues for each of the harvests conducted during the experiment. In addition, it was also checked that B concentrations in the plant tissue was not altered by washing the leaves with distilled water. To this end, leaf samples from trees watered with high B concentration were divided into two halves, one of which was washed with distilled water, while the other half was not washed. Subsequently, B concentrations were determined, and no significant differences were observed in the leaf B concentrations of both portions (data not shown).

2.4 Allometric study of the relative growth rate, absorption and transport of B

The relative growth rate (RGR), the net rate of nutrient absorption (uptake) through the root and its transport from the root to the aerial part of the plant were calculated according to García-Sánchez et al. (2005)

$$RGR = \frac{[\ln(W_2) - \ln(W_1)]}{(t_2 - t_1)} \quad (1)$$

$$Uptake = \frac{(\ln(R_2) - \ln(R_1))}{(R_2 - R_1)} \times \frac{(C_2 - C_1)}{(t_2 - t_1)} \mu\text{mol g}^{-1} \text{d}^{-1} \quad (2)$$

$$Transport = \frac{(\ln(R_2) - \ln(R_1))}{(R_2 - R_1)} \times \frac{(Cs_2 - Cs_1)}{(t_2 - t_1)} \mu\text{mol g}^{-1} \text{d}^{-1} \quad (3)$$

where W is the dry weight of the plants at harvest times t_2 and t_1 ; R is the root dry weight; C is the total boron content of the whole plant at two consecutive harvests (t_1 and t_2); C_s is the boron content of the aerial part of the plant.

2.5 Gas exchange parameters and chlorophyll fluorescence

The measurements of gas exchange were conducted on day 30, after the start of the experiment (summer) and two days before the harvesting of the plants. For the gas exchange measurements, a portable photosynthesis measuring equipment was utilized (CIRAS-3, PP System), connected to a standard 2 cm · 3 cm chamber, with an LED light source (PAR: 1000 mmol m⁻² s⁻¹), and a constant concentration of CO₂ (400 ppm) in the measuring chamber. The net assimilation rate of CO₂ (A_{CO2}), the stomatal conductance (g_s), the sub-stomatal concentration of CO₂ (C_i) and the water use efficiency (WUE, A_{CO2}/foliar transpiration) were determined.

2.6 Statistical analysis

In this study, the statistical treatment of the data included a basic statistical description (mean value and standard error of the repetitions for each cultivar · B treatment combination), a two-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test for each cultivar for the parameters with a significant ANOVA ($p < 0.05$). For each B treatment and variety,

average data are presented from 8 plants ($n = 8$). The statistical package used was IBM SPSS v22 (Armonk, NY). For the creation of the graphics, SigmaPlot 13.0 (Systat Software, San Jose, CA) was used.

3 Results

3.1 Growth parameters of plants

The vegetative growth data (Fig. 1) at the start of the study shows the presence of significant differences between the three varieties, with higher growth values observed in the varieties 'Mollar de Elche' and 'Valenciana' as compared to 'Wonderful'.

During the summer period, the application of the B treatments affected the three cultivars differently. The 'Mollar de Elche' plants had a decreased total dry biomass in the T2 and T3 treatments, and the 'Valenciana' ones starting with T2, as compared to their respective controls (T0). Meanwhile, the 'Wonderful' plants did not suffer negative effects with the B treatments, and its growth tended to increase with the T2 treatment.

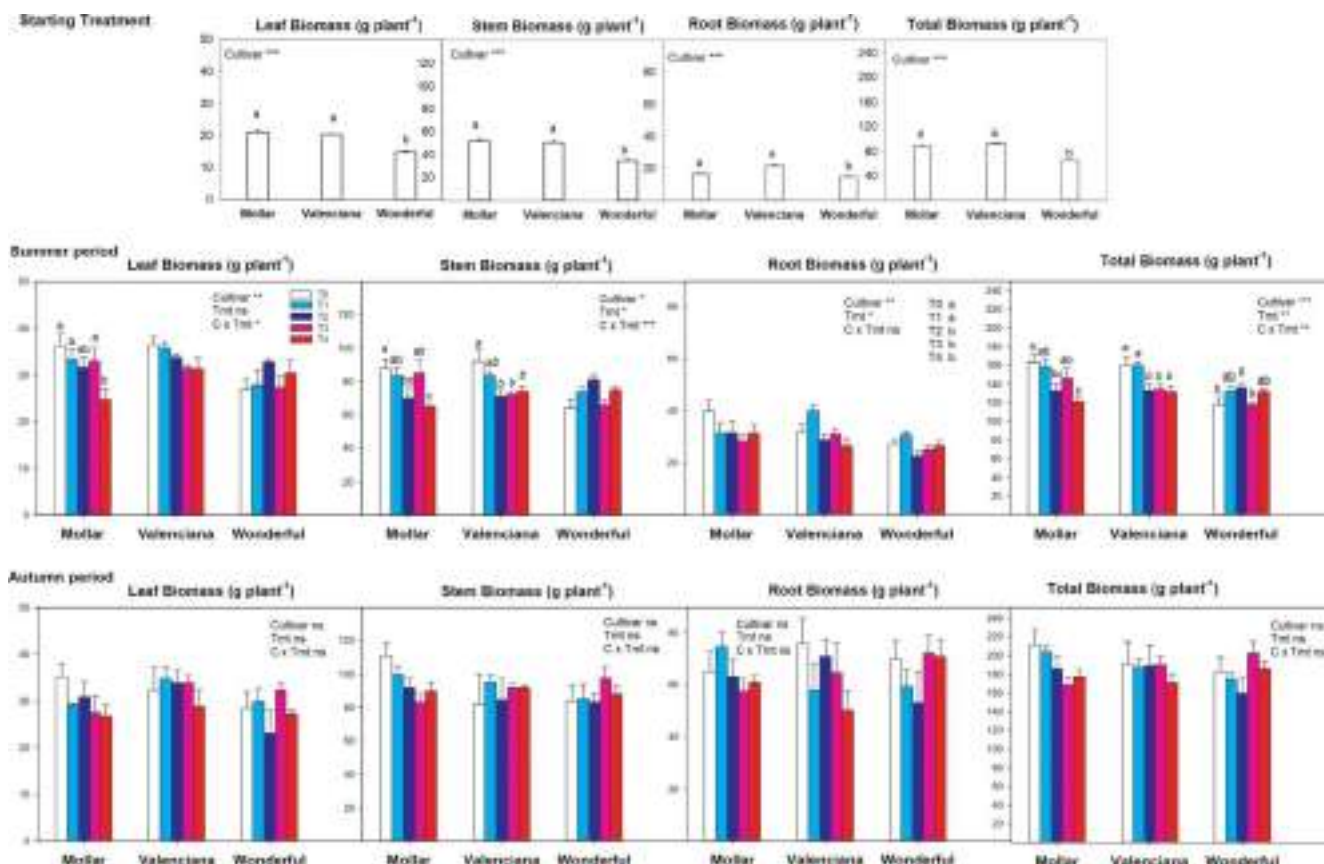


Figure 1: Growth parameters of the pomegranate plants of the varieties 'Mollar de Elche', 'Valenciana', and 'Wonderful' at the start of the experiment, and the end of the summer and autumn periods, in the five treatments (mg L⁻¹ B): T0 (0.25), T1 (1.25), T2 (2.5), T3 (5.0), and T4 (10.0). In the two-way ANOVA, ns, *, **, *** indicate non-significant differences, and significance at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively. The vertical bars represent the standard error ($n = 8$). When the interaction was not significant and one or both factors significant ($p < 0.05$), then lower-case letters, placed next to the treatment abbreviations, indicate differences between B treatments, independently of the cultivars factor. In case of significant interactions, different lower-case letters next to the bars indicate significant differences ($p < 0.05$) between the B treatments for each of the varieties (a, b, and c for 'Mollar de Elche'; a, b, and c for 'Valenciana'; a, b, and c for 'Wonderful'). Duncan's test was utilized for the separation of means.

During the autumn period, no significant differences were observed in the growth of the plants of the three varieties in any of the three treatments studied; indicating that the negative effect of B observed in summer was reversed during this season. It is also important to highlight that the differences in total biomass observed between the two periods, was due to the growth of the roots in autumn, as the shoot biomass did not increase.

3.2 Concentration of B in the plants

During the summer period, the concentration of B significantly increased in all the plant tissues starting with T2 (2.5 mg L⁻¹ B) in all three cultivars tested, without significant differences being observed between them. The concentrations of B in leaves, stems and roots ranged from 14.5–30, 9.8–59, and 19–398 mg B kg⁻¹ dw, respectively. Therefore, the increase of B in roots with increasing B supply, was greater than in the remaining tissues (Fig. 2).

During the autumn period, the concentration of B did not increase compared to the summer period, with the same previous models maintained. However, in autumn, a significant interaction between root B concentration and pomegranate cultivar was observed. This was shown as a similar concentration of B in treatments T2 and T3 for the 'Mollar de Elche' and 'Valenciana' plants, while in 'Wonderful', there were differences between these two treatments.

3.3 Absorption and transport of B

The relative growth rate (RGR) from the start of the experiment until the end of the summer period was different between the tested cultivars (Fig. 3). For the 'Mollar de Elche' plants, the RGR significantly decreased in the treatment with the highest concentration of B, T4, while in the 'Valenciana' plants this decrease started with the T2 treatment. However, in the case of 'Wonderful', the RGR was not significantly altered. During the autumn period, there was a great variability in the data, with a significant interaction between cultivar and B treatment. The RGR was not significantly different between T0 and the rest of the treatments for the 'Mollar de Elche' and 'Valenciana' plants, while it was less for the T2 treatment with respect to T0 for 'Wonderful'.

The quantity of B absorbed by the plants per unit of root weight and day, during the summer and autumn periods, progressively increased when the concentration of B increased in the nutrient solution, although significant differences were not found between T0 and T1. This result was similar in the three varieties. However, the values were 2.5 times greater in the summer than in the autumn period.

B transport from the root to the shoots in the summer period increased in proportion to the concentration of B in the nutrient solution of the three cultivars assayed, although significant differences were not observed between T0 and T1, and no significant differences were found between the three cultivars either. In the case of the autumn period, the transport was very low, and did not reach 1 mg B g⁻¹ root dw d⁻¹ in any

of the cases, and the variability of the data was too large for making any relevant conclusions.

3.4 Gas exchange parameters

The A_{CO2} significantly decreased with the highest B treatment, T4, as compared to T0, independently of the variety, but no differences were observed in the T0–T3 range (Fig. 4). For g_s, the only significant difference observed was between the T0 and T3 treatments, where the g_s decreased in T3 as compared to T0, and this was independent of the variety. As for the WUE and PSII parameters, no differences were observed neither between cultivars, the B treatments nor their interaction.

4 Discussion

There is a small range between toxicity, sufficiency, and deficiency of B in plants (Princi et al., 2016b). This varies much between species and plant tissues (root, stem, and leaves), with sensitive plants showing the highest reactivity when facing small changes in the concentration of B, while tolerant ones have a greater capacity to adapt to broader ranges of B supply without significant effects on their vegetative growth (Ozturk et al., 2010). The results obtained in the present experiment indicate that pomegranates are very tolerant to irrigation water with high concentrations of B. In the three cultivars studied, scarce differences were observed in vegetative growth in B treated (1.25, 2.5, 5.0, 10.0 mg B L⁻¹) as compared to the control (0.25 mg L⁻¹) plants, or between the summer and autumn periods (Fig. 1). This is in line with observations by Sarafi et al. (2017), who did not see significant differences in the vegetative growth of the pomegranate cultivars 'Ermioni' and 'Wonderful' when treated with 5 and 10 mg L⁻¹ of B. In general, the fruit trees grown in the Mediterranean area, such as figs, grapevines, citrus and peaches, do not tolerate more than 0.5 mg L⁻¹ of B, while alfalfa, carrot, sugar beet, cotton and radish crops tolerate concentrations higher than 4 mg L⁻¹ (Mengel and Kirkby, 2001; Batar et al., 2009). Therefore, in pomegranate, we find a crop that is very tolerant to high levels of B, perhaps being the most tolerant crop in the Mediterranean area (Sarafi et al., 2017).

The physiological mechanisms underlying the tolerance to excess B are not yet known in depth. However, a direct relationship was shown between the content of leaf B and the severity of the symptoms (Furlani et al., 2003). As Landi et al. (2019) suggest in their review, there are tolerant species with a low rate of absorption and transport of B from the roots to the shoots and/or that compartmentalize B in vacuoles and cell walls, as these structures are less sensitive to B toxicity. In the case of pomegranate, the concentration of B in the leaves was so low that it never exceeded 40 mg kg⁻¹. Thus, it seems that in these trees, the transport of B from the roots to the shoots was impeded, so that its accumulation in the leaves did not become toxic (Fig 2). With respect to the distribution of B in the plant, a great difference between tissues was observed. The maximum concentration in the root was 400 mg kg⁻¹, while in the stem and leaves it was 60 and 40 mg kg⁻¹, respectively. These data clearly show a concen-

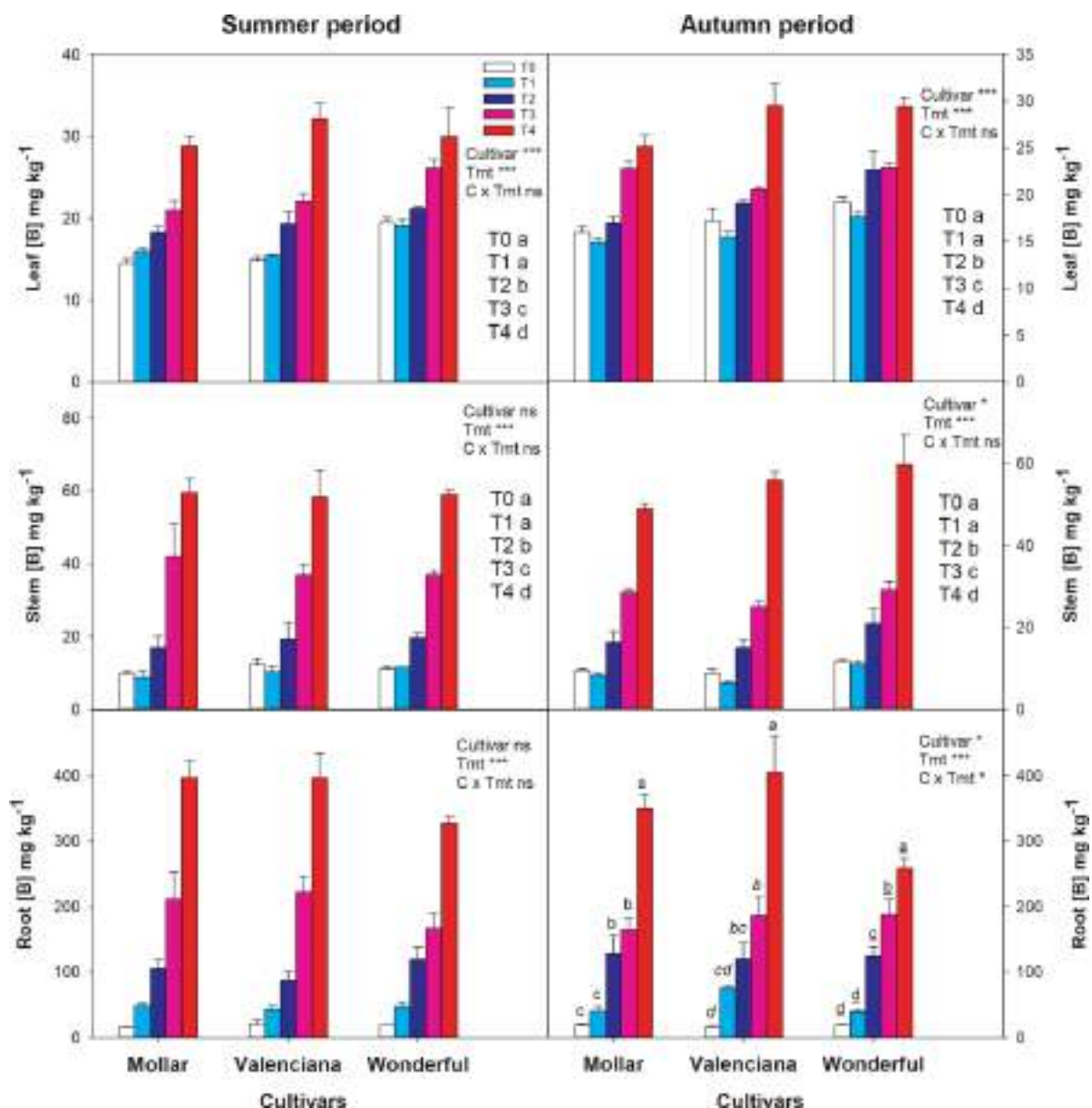


Figure 2: Concentration of B in the leaves, stems and roots of the pomegranate plants during the summer and autumn period for the varieties 'Mollar de Elche', 'Valenciana', and 'Wonderful'. Bars represent mean values for the five treatments (mg L⁻¹ B): T0 (0.25), T1 (1.25), T2 (2.5), T3 (5.0), and T4 (10.0). In the two-way ANOVA, ns, *, **, *** indicate non-significant differences, and significance at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively. The vertical bars represent the standard error ($n = 8$). When the interaction was not significant and one or both factors significant ($p < 0.05$), then lower-case letters, placed next to the treatment abbreviations, indicate differences between B treatments, independently of the cultivars factor. In case of significant interactions, different lower-case letters next to the bars indicate significant differences ($p < 0.05$) between the B treatments for each of the varieties (a, b, and c for 'Mollar de Elche'; a, b, and c for 'Valenciana'; a, b, and c for 'Wonderful'). Duncan's test was utilized for the separation of means.

tration gradient root > stem > leaf. This suggests that pomegranate plants have the capacity of storing a great quantity of B in the roots, thus impeding its transport and accumulation in the leaves, and preventing problems in their vegetative growth.

The vegetative growth of the three pomegranate cultivars was greater in summer than in autumn (Fig. 3). This is because pomegranate plants arrest their growth during autumn, followed by a decrease in the rate of transpiration.

This decrease could explain the significant decrease in the rate of absorption and transport of B observed in autumn as compared to the summer period (Fig. 3). In many species of plants, once B is absorbed by the root, it is translocated to the shoots through the xylem, following the transpiration stream (*Chatzissavvidis and Therios, 2011*). Accordingly, in pomegranates, the B uptake by roots was transpiration-dependent, as in summer the leaf transpiration and B uptake were higher than during the autumn period. However, B transport from roots to the shoot were also controlled and/or restricted by a

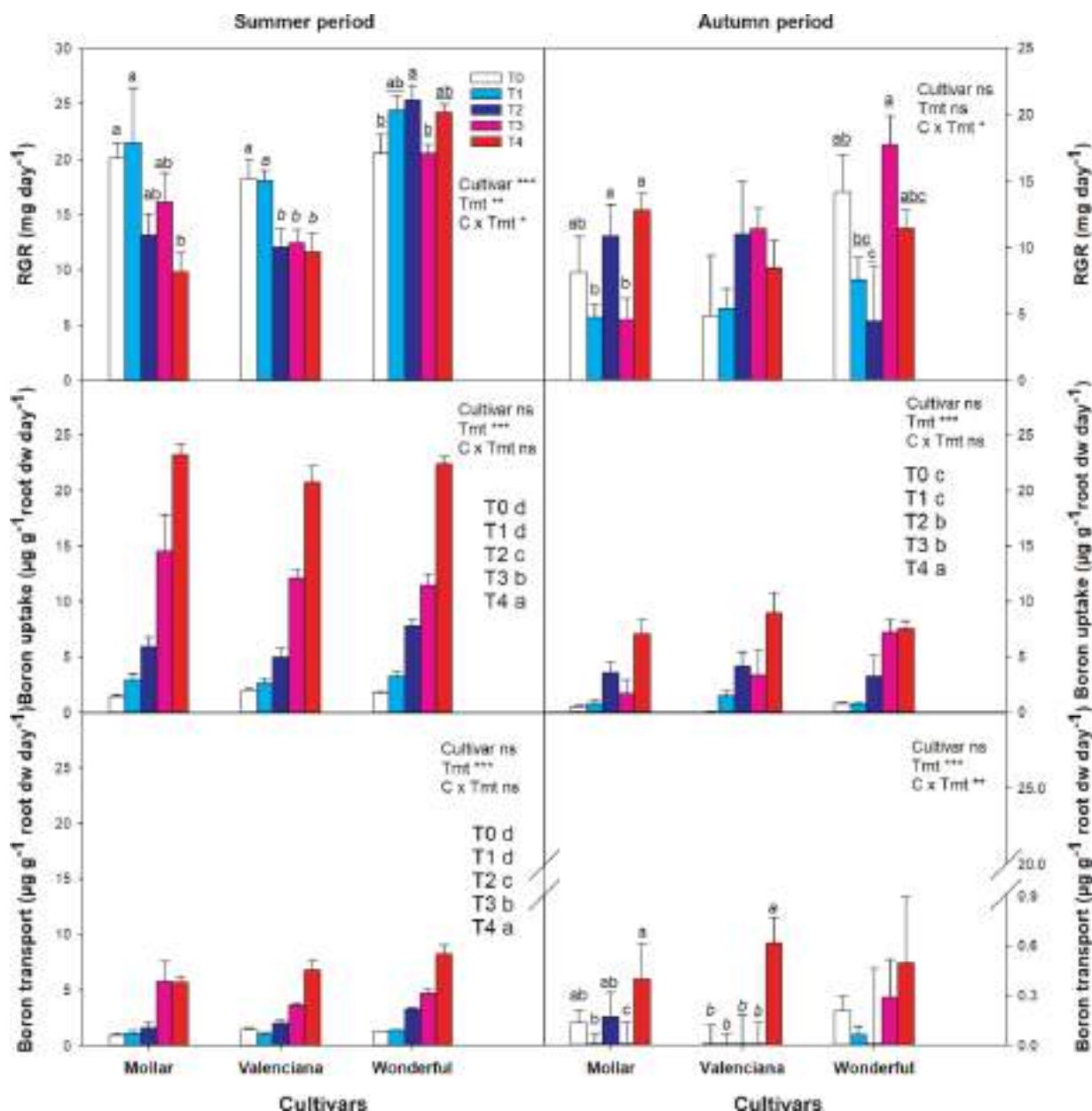


Figure 3: RGR, B uptake, and B transport during the summer and autumn period for the pomegranate plants of the varieties 'Mollar de Elche', 'Valenciana', and 'Wonderful'. Bars represent mean values for the five treatments (mg L⁻¹ B): T0 (0.25), T1 (1.25), T2 (2.5), T3 (5.0), and T4 (10.0). In the two-way ANOVA, ns, *, **, *** indicate non-significant differences, and significance at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively. The vertical bars represent the standard error ($n = 8$). Duncan's test was utilized for the separation of means. When the interaction between factors was not significant, but one or both factors significant ($p < 0.05$), then lower-case letters, placed next to the treatment abbreviations, indicate differences between B treatments, independently of the cultivars factor. In case of significant interactions, different lower-case letters next to the bars indicate significant differences ($p < 0.05$) between the B treatments for each of the varieties (a, b, and c for 'Mollar de Elche'; a, b, and c for 'Valenciana'; a, b, and c for 'Wonderful'). Duncan's test was utilized for the separation of means.

mechanism still unknown in these plants and, thus, foliar transpiration was not solely responsible for the leaf B concentrations in pomegranates. In some tree species that synthesize sorbitol, B distribution in the shoots can be affected by the transport of a B-diol complex in the phloem, as observed by Brown and Hu (1996) in almond [*Prunus amygdalus* B. syn. *P. dulcis* (Mill.)], apple (*Malus domestica* B.) and nectarine (*Prunus persica* L. B. var. *nectarine* M.). Further studies are needed to clarify, which process might be responsible for the

restricted transport of B from roots to the shoot in pomegranates.

In this study, it is important to highlight that despite the pomegranates accumulating a great concentration of B in the roots, their growth was hardly affected (Figs. 1 and 2). This behavior is interesting with respect to the behavior of other plants, where it has been observed that one of the phenotypic effects of B toxicity is the inhibition of root growth (Landi et al., 2019).

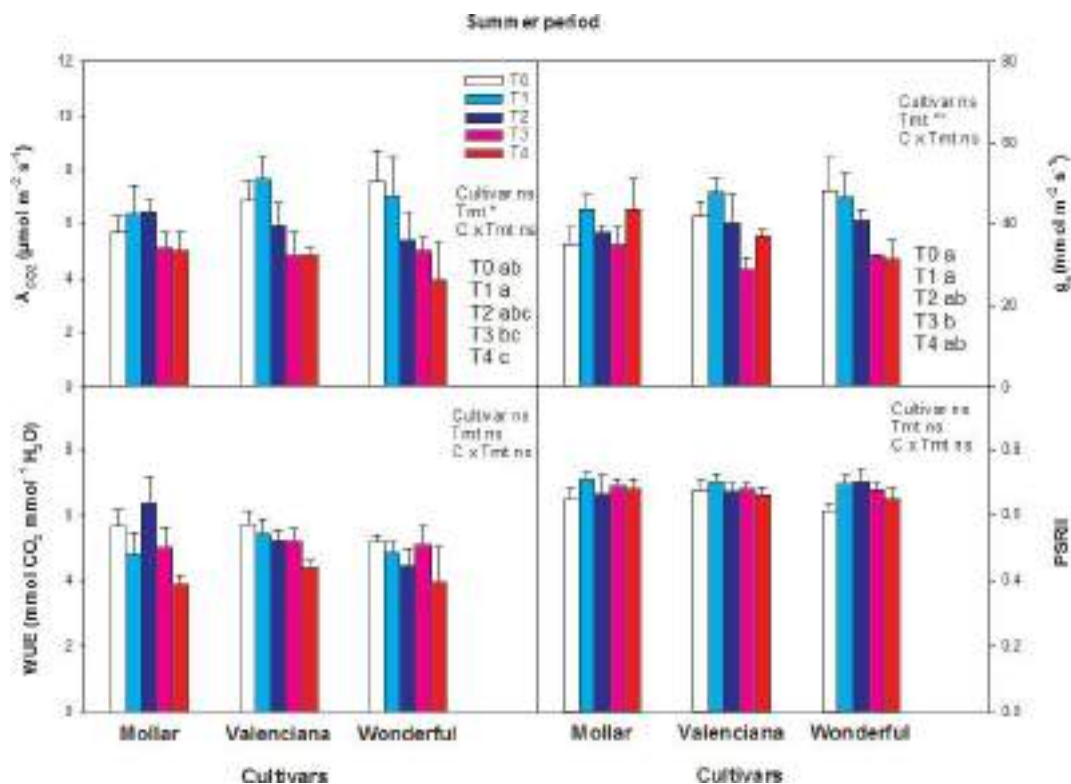


Figure 4: Gas exchange parameters: net assimilation of CO₂ (A_{CO_2}), stomatal conductance (g_s), water use efficiency (WUE) and the parameter of chlorophyll fluorescence maximum quantum efficiency in leaves adapted to light (PSII) for the pomegranate plants of the varieties ‘Mollar de Elche’, ‘Valenciana’, and ‘Wonderful’ in the five treatments (mg L⁻¹ B): T0 (0.25), T1 (1.25), T2 (2.5), T3 (5.0), and T4 (10.0). In the two-way ANOVA, ns, *, **, *** indicate non-significant differences, and significance at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively. The vertical bars represent the standard error ($n = 8$). When the interaction between factors was not significant, and the effect of B treatment significant ($p < 0.05$), lower case letters, placed next to the treatment abbreviations, indicate differences between B treatments, independently of the cultivars factor.

In crops, there is significant reduction in root growth when B concentrations exceed 120 mg kg⁻¹ in tomato (Princi et al., 2016a), 220 mg kg⁻¹ in grapevines (Gunes et al., 2006), and 120 mg kg⁻¹ in citrus (Simón-Grao et al., 2019). However, despite the high accumulation of B in pomegranate roots, there was hardly any variation in the growth of the root. These interesting results require new research studies to identify underlying mechanisms, with the possible involvement of transporters that avoid the unloading of B into the xylem, the compartmentalization of B into the vacuoles, the high antioxidant capacity that may help roots avoid toxicity and/or the re-distribution of B from the leaves to the roots through the complexation of B with molecules such as polyols (Landi et al., 2019).

High levels of shoot B could negatively affect the photosynthetic parameters of plants due to stomatal as well as non-stomatal factors (Wang et al., 2011). In our experiment, the gas exchange parameters were barely affected by B toxicity in the leaves as the high B accumulation capacity of the root impeded the arrival of B to the plant shoots (Fig. 4).

In this experiment, no significant differences were observed between the cultivars in response to the B supply in the nutrient solution, at least at the end of the autumn period, which indicates that the relative tolerance to B excess among

these three pomegranate cultivars did not depend on the cultivar utilized. All three cultivars limited the concentration of B in the leaves thanks to the accumulation of B in the root, and in this tissue, B toxicity was almost null. Nevertheless, this is not always observed in other species. Our results also do not rule out the possibility of intraspecific differences in tolerance for other genotypes, as has, e.g., been observed in crops such as wheat (Kayihan et al., 2017), pepper (Sarafi et al., 2018), or olive trees (Rostami et al., 2017).

5 Conclusions

Results of the present study indicate that pomegranate plants are tolerant to excess B in the irrigation water, at least up to a concentration of 10 mg L⁻¹. This is likely due to the plant's ability to restrict the transport of B from the roots to the shoots, thus avoiding toxic concentrations in leaves. The low B transport rate from roots to shoots could be related with the high capacity of accumulating a high amount of B in the roots without growth inhibition in this plant tissue. Hardly any differences were observed in the responses of the three cultivars ‘Mollar de Elche’, ‘Valenciana’, and ‘Wonderful’, in what seems to be an innate response of the pomegranate crop. Therefore, it can be concluded that pomegranate could be a suitable fruit tree for planting in soils with high B concentra-

tions or in fields that, for some reason or another, have to be irrigated with water from non-conventional sources.

Acknowledgments

The authors are grateful to the *Project on Genetic Resources, Preservation of Endangered Species: pomegranate and quince*. Ref. RFP2012-00009-00-00, funded by INIA-MINECO and FEDER for the maintenance of pomegranate tree and quince collection with which this study was performed.

Data Availability Statement

Research data are not shared.

References

- Batar, T., Koksall, N. S., Yersel, S. A. (2009): Production and characterization of wall plaster with borax and paper wastes and perlite additives. *Ekoloji* 18, 45–53.
- Brown, P. H., Hu, H. (1996): Phloem mobility of boron is species dependent: Evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species. *Ann. Bot.* 77, 497–506.
- Chapman, H. D., Pratt, P. F. (1961): Ammonium vanadate-molybdate method for determination of phosphorus, in University of California (ed.): *Methods of Analysis for Soils, Plants and Water*. University of California, Division of Agricultural Science, Riverside, CA, USA, pp. 184–203.
- Chatzissavvidis, C., Therios, I. (2011): Boron in Higher Plants, in Perkins, G. L. (ed.): *Boron: Compounds, Production and Application*. Nova Science Publishers, New York, NY, USA, pp. 147–176.
- De Ollas, C., Morillón, R., Fotopoulos, V., Puértolas, J., Ollitrault, P., Gómez-Cadenas, A., Arbona, V. (2019): Facing climate change: Biotechnology of iconic Mediterranean woody crops. *Front. Plant Sci.* 10. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00427>.
- Furlani, A. M. C., Carvalho, C. P., De Freitas, J. G., Verdial, M. F. (2003): Wheat cultivar tolerance to boron deficiency and toxicity in nutrient solution. *Sci. Agric.* 60, 359–370.
- García-Sánchez, F., Botia, P., Fernández-Ballester, G., Cerdá, A., Lopez, V. M. (2005): Uptake, transport, and concentration of chloride and sodium in three citrus rootstock seedlings. *J. Plant Nutr.* 28, 1933–1945.
- Gunes, A., Soyomezoglu, G., Inal, A., Bagci, E. G., Coban, S., Sahin, O. (2006): Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity. *Sci. Hortic.* 110, 279–284.
- Hernández, F., Legua, P., Melgarejo-Sánchez, P., Martínez Font, R. (2012): The Pomegranate Tree in the World: Its Problems and Uses. II International Symposium on the Pomegranate. Options Méditerranéennes. Séries A: Mediterranean Seminars. CIHEAM-IAMZ, Zaragoza, Spain.
- IPCC (2014): *Climate Change 2014: Synthesis Report*. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva, Switzerland.
- Kayihan, C., Öz, M. T., Eyidogan, F., Yücel, M., Öktem, H. A. (2017): Physiological, biochemical, and transcriptomic responses to boron toxicity in leaf and root tissues of contrasting wheat cultivars. *Plant Mol. Biol. Rep.* 35, 97–109.
- Landi, M., Margaritopoulou, T., Papadakis, I. E., Araniti, F. (2019): Boron toxicity in higher plants: An update. *Planta* 250, 1011–1032.
- Mendoza-Grimón, V., Fernández Vera, J. R., Hernandez-Moreno, J. M., Palacios-Díaz, M. P. (2019): Sustainable irrigation using non-conventional resources: What has happened after 30 years regarding boron phytotoxicity? *Water* 11. DOI: <https://doi.org/10.3390/w11091952>.
- Mengel, K., Kirkby, E. A. (2001): Boron, in Mengel, K., Kirkby, E. A. (eds.): *Principles of Plant Nutrition*, 5th Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 621–638.
- Olmo, A., García-Sánchez, F., Simón, I., Lidón, V., Alfosea-Simón, M., Cámara-Zapata, J. M., Martínez-Nicolás, J. J., Simón-Grao, S. (2019): Characterization of the ecophysiological responses of three pomegranate cultivars to salinity. *Photosynthetica* 57, 1015–1024.
- Olmo-Vega, A., García-Sánchez, F., Simón-Grao, S., Simón, I., Lidón, V., Nieves, M., Martínez-Nicolás, J. J. (2017): Physiological responses of three pomegranate cultivars under flooded conditions. *Sci. Hortic.* 224, 171–179.
- Ozturk, M., Sakcali, S., Gucel, S., Tombuloglu, H. (2010): Boron and Plants, in Ashraf, M., Ozturk, M., Ahmad, M. S. A. (eds.): *Plant Adaptation and Phytoremediation*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 275–311.
- Princi, M. P., Lupini, A., Araniti, F., Longo, C., Mauceri, A., Sunseri, F., Abenavoli, M. R. (2016b): Boron toxicity and tolerance in plants: recent advances and future perspectives, in Ahmad, P. (ed.): *Plant Metal Interactions*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 115–147.
- Princi, M. P., Lupini, A., Longo, C., Miller, A. J., Sunseri, F., Abenavoli, M. R. (2016a): Long- and short-term effects of boron excess to root form and function in two tomato genotypes. *Plant Physiol. Biochem.* 109, 9–19.
- Rostami, H., Tabatabaei, S. J., Nahandi, F. Z. (2017): Effects of different boron concentration on the growth and physiological characteristics of two olive cultivars. *J. Plant Nutr.* 40, 2421–2431.
- Sarafi, E., Chatzissavvidis, C., Therios, I. (2017): Response of two pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars to six boron concentrations: Growth performance, nutrient status, gas exchange parameters, chlorophyll fluorescence, and proline and carbohydrate content. *J. Plant Nutr.* 40, 983–994.
- Sarafi, E., Siomos, A., Tsouvaltzis, P., Therios, I., Chatzissavvidis, C. (2018): Boron toxicity effects on the concentration of pigments, carbohydrates and nutrient elements in six non-grafted pepper cultivars (*Capsicum annum* L.). *Ind. J. Plant Physiol.* 23, 474–485.
- Simón, I., Díaz-López, L., Gimeno, V., Nieves, M. A., Pereira, W. E., Martínez, V. C., Lidón, V., García-Sánchez, F. (2013): Effects of boron excess in nutrient solution on growth, mineral nutrition, and physiological parameters of *Jatropha curcas* seedlings. *Plant Soil* 176, 165–174.
- Simón-Grao, S., Nieves, M., Cámara-Zapata, J. M., Martínez-Nicolás, J. J., Rivero, R. M., Fernández-Zapata, J. C., García-Sánchez, F. (2019): The Former Alcaide nº5 citrus genotype shows a different physiological response to the excess of boron in the irrigation water in relation to its two genotype progenitors. *Sci. Hortic.* 245, 19–28.
- Wang, J. Z., Tao, S. T., Qi, K. J., Wu, J., Wu, H. Q., Zhang, S. L. (2011): Changes in photosynthetic and antioxidative system of pear leaves to boron toxicity. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 19693–19700.

8. RESUMEN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

8.1. PUBLICACIÓN 1

Physiological responses of three pomegranate cultivars under flooded conditions

Olmo-Vega, A., García-Sánchez, F., Simón-Grao, S., Simón, A., Lidón, V., Nieves, M., Martínez-Nicolás, J.J.

Scientia Horticulturae. 224, 171–179.

Factor de impacto: 2,769 Q1 (2019) (Categoría Horticulture)

El objetivo de este experimento fue estudiar el comportamiento de tres variedades de granado bajo condiciones de inundación, con el fin de establecer los mecanismos morfológicos, fisiológicos y/o bioquímicos que están relacionados con la tolerancia relativa entre estas tres variedades.

8.1.1 Resumen de resultados y discusión

En este ensayo se pone de manifiesto que el granado es una especie sensible a la inundación, ya que tras 6 días en estas condiciones la reducción del crecimiento estuvo por encima del 30% en todas las variedades. La mayor reducción de la parte aérea se dio en la variedad ‘Valenciana’, con una disminución del 71% del LDW y del 59% del SDW; mientras que para ‘Mollar de Elche’ fue del 40% en LDW y 5% en SDW; y para ‘Wonderful’ del 51% del LDW y 40% del SDW, en comparación a sus respectivos tratamiento control. En cuanto a la raíz, las tres variedades sufrieron una disminución similar por la inundación, con una reducción media del RDW del 40%. Para otras especies no tolerantes a este estrés se ha observado que tras un período entre 10 y 20 días de inundación se produce la reducción del crecimiento vegetativo entre 30-50% (Striker et al. 2007; Tewari et al. 2016). De las tres variedades estudiadas, la más sensible fue ‘Valenciana’, ya que mostró la mayor reducción de la biomasa seca total. Además, al tercer día de inundación, se observaron síntomas visuales como enrollamiento foliar y epinastia, mientras que estos síntomas tan solo se dieron en las otras dos variedades al sexto día. ‘Valenciana’ fue también la única variedad en la que se observó abscisión de hojas al final del experimento. Entre las otras dos variedades,

‘Mollar de Elche’ presentó una mayor tolerancia que ‘Wonderful’ según los parámetros de crecimiento. En este ensayo también se vio que la disminución de la biomasa seca total fue debida tanto a la disminución de la parte aérea (hoja + tallo) como de la raíz, no observándose ningún cambio morfológico o aparición de nuevas estructuras, que si suele ocurrir en otras especies tolerantes capaces de desarrollar mecanismos adaptativos, como formación de raíces laterales y adventicias en el tallo (Yu et al. 2015; Azizi et al. 2017). Esta respuesta en las plantas de granado era de esperar ya que es una especie que procede de zonas áridas o semiáridas y no está adaptada a episodios de inundación.

En cuanto a las respuestas fisiológicas, la inundación en las plantas de granado indujo un déficit hídrico en las hojas, siendo ‘Valenciana’ la que obtuvo el valor mínimo de CRA con un 71%, seguido de ‘Mollar de Elche’ y ‘Wonderful’ con un 81% en ambas variedades. La concentración de oxígeno en el agua de inundación disminuyó progresivamente a lo largo de los 6 días del ensayo. En estas condiciones de hipoxia las raíces podrían haber disminuido su conductividad hidráulica, por lo que la pérdida de agua en la parte aérea por transpiración excedió a la que es capaz de absorber por la raíz, provocando la deshidratación de las plantas y la caída del potencial hídrico (Chaudhary et al. 2016). No obstante, ya que la concentración de oxígeno en la zona radicular fue igual para las tres variedades, se podría concluir que en idénticas condiciones de anoxia las raíces de ‘Valenciana’ son más sensibles que las de las otras dos variedades. Las plantas de ‘Valenciana’ sufrieron un importante descenso del Ψ_w llegando al quinto día de ensayo a -3 MPa y al sexto día a -3,9 MPa, mientras que las de ‘Mollar de Elche’ y ‘Wonderful’ tuvieron un valor promedio durante todo el ensayo de -1,8 MPa y -1,6 MPa respectivamente. Este estudio de relaciones hídricas también sugiere que las plantas de granado no tienen un mecanismo adaptativo efectivo para ajustarse osmóticamente al déficit hídrico causado por la inundación y así evitar la deshidratación de las hojas. En todas las variedades ensayadas, la caída del Ψ_w fue debido a un descenso del Ψ_p , mientras que el Ψ_π apenas se vio afectado. Aunque la inundación incrementó la concentración foliar de prolina y azúcares solubles totales, esto no fue suficiente para que se produjera un ajuste osmótico eficaz.

Una de las primeras respuestas de las plantas al estrés por inundación es el cierre estomático para evitar la pérdida de agua e impedir la deshidratación de los tejidos (Pucciariello et al. 2012). Sin embargo, en plantas no tolerantes a la inundación el cierre estomático se debe más bien a la pérdida de turgor celular provocada por la disminución

de la conductividad hidráulica, que limita el transporte de agua hacia la parte aérea (Chaudhary et al. 2016). En nuestro ensayo, al quinto día de inundación las tres variedades de granado disminuyeron la conductancia estomática de forma significativa. Los datos de relaciones hídricas e intercambio gaseoso sugieren que esta disminución fue debido a la pérdida de turgor celular, ya que se observó una relación entre el potencial hídrico y turgor con respecto a la conductancia estomática. Esto quiere decir que el cierre estomático en plantas de granado inundadas no es debido a un mecanismo activo de adaptación, sino que fue causado como consecuencia de la pérdida de turgor celular por deshidratación. Otro de los parámetros de intercambio gaseoso afectados por el tratamiento de inundación fue A_{CO_2} , siendo una vez más las plantas de la variedad ‘Valenciana’ las más afectadas durante el ensayo. Aunque la disminución de la A_{CO_2} en ocasiones puede ser debida al cierre de estomas, en este ensayo parece ser que fue debido a factores no estomáticos ya que la concentración de C_i no disminuyó con el tratamiento de inundación. Además, esta idea queda bastante clara en la variedad ‘Valenciana’ en la que la inundación disminuyó la A_{CO_2} antes que el potencial de turgor, e incrementó significativamente la concentración del CO_2 subestomático (C_i). La disminución de la A_{CO_2} por factores no estomáticos se debe a daños metabólicos como la disminución de la eficiencia de los enzimas de carboxilación y las reacciones fotoquímicas del fotosistema II, la pérdida de clorofilas y problemas relacionados con los procesos de captación de la luz (Yordanova and Popova 2007; Amri et al. 2014). En nuestro ensayo los datos de fluorescencia de clorofilas en las plantas de ‘Valenciana’ nos indican que uno de los factores que causó la disminución de la A_{CO_2} podría estar relacionado con la transformación de la energía lumínica en bioquímica, ya que la caída del rendimiento cuántico fotosintético (Φ_{PSII}) fue debido exclusivamente a qP y no a F_v'/F_m' .

Otro de los efectos que causó la inundación en las plantas de granado fue observado en la concentración de carbohidratos (azúcares solubles totales, azúcares reductores y almidón) entre los diferentes tejidos de las plantas, produciéndose, en general, una acumulación en las hojas y una disminución en las raíces. En condiciones de inundación se ha descrito que en las plantas se produce una acumulación de carbohidratos en las hojas empleándose como reserva disponible para el crecimiento, desarrollo y reproducción una vez que el estrés ha cesado (Pociecha et al. 2016). En nuestro experimento, para cualquier variedad ensayada, 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), lo que hace que, pese a que la A_{CO_2} disminuyó, los carbohidratos se fueron acumulando en las hojas. Por otro lado, la disminución de la concentración de almidón en las hojas de las plantas inundadas también podría indicar que las hojas tienen una mayor demanda de carbono, quizás para acumular compuestos osmoreguladores como un intento de ajustarse osmóticamente, aunque ya vimos en la sección anterior que este incremento no fue lo suficientemente intenso para disminuir el potencial osmótico. En el caso de la reducción de carbohidratos en la raíz, además del hecho de que el transporte de fotoasimilados desde las hojas a la raíz podría disminuir, tampoco hay que descartar que esta disminución se deba a un mayor consumo de azúcares que tienen que realizar las raíces para llevar a cabo procesos metabólicos fermentativos en condiciones de hipoxia o anoxia (Hossain y Uddin, 2011).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son compuestos dañinos que se producen en las plantas cuando sufren algún tipo de estrés incluyendo la inundación (Loreti et al. 2016). En nuestro ensayo, sin embargo, no se observó un aumento significativo en la concentración de MDA en ninguna de las variedades estudiadas, incluyendo 'Valenciana', que fue la variedad más sensible de las tres. Esto nos sugiere que las plantas de granado podrían tener un sistema antioxidante eficaz para neutralizar las ROS. Estos sistemas pueden ser no enzimáticos (ácido ascórbico, glutatión, α -Tocoferol y carotenoides) o enzimáticos (superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX)).

El ácido abscísico (ABA) es una de las hormonas de señalización raíz-parte aérea más importantes que regulan, entre otras cosas, la transpiración de las plantas. En nuestro ensayo parece ser que las variedades más tolerantes, 'Mollar de Elche' y 'Wonderful', tuvieron un modelo de respuesta diferente a 'Valenciana', la variedad más sensible. 'Wonderful' fue la variedad que más aumentó la concentración de ABA, alcanzando una concentración de $417 \text{ ng g}^{-1} \text{ ps}$, lo que supone casi el doble de su valor inicial. 'Mollar de Elche' presentó un aumento menor pero también significativo, con una concentración de $353 \text{ ng g}^{-1} \text{ ps}$, lo que supuso un aumento de un 37%. Por otro lado, 'Valenciana' no mostró diferencias significativas en condiciones de inundación respecto a las plantas control. Probablemente, esto podría ser debido a que en 'Valenciana' el

déficit hídrico se desarrolló muy rápidamente, pasando el Ψ_w de -1,8 a -3,7 MPa del segundo al quinto día de inundación, por lo que no dio tiempo a que el ABA o sus precursores ascendieran hacia la parte aérea del árbol. Sin embargo, en este ensayo no encontramos ninguna relación entre la concentración de ABA y g_s . En inundación, la g_s de 'Wonderful' 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'. Lo anteriormente expuesto puede sugerir que en plantas de granado el rápido cierre estomático producido en inundación ocurre independientemente del incremento de ABA foliar, siendo esta hormona responsable del cierre estomático solamente en largos períodos de inundación como se ha visto en otros experimentos.

8.1.2 Conclusiones

De este ensayo se puede concluir que el granado es una planta muy sensible a la inundación en la que no se dan mecanismos de adaptación morfológicos, fisiológicos o bioquímicos. Estas plantas sufren problemas de déficit hídrico que alteran negativamente la fotosíntesis, como muestra la disminución de la A_{CO_2} , g_s y Φ_{PSII} . Por otro lado, a pesar de que estas plantas son muy sensibles a la inundación, unas variedades son más sensibles que otras, así los cultivares 'Mollar de Elche' y 'Wonderful' son más tolerantes que 'Valenciana'. La diferente tolerancia entre cultivares se debe más bien a los efectos perjudiciales que causa la inundación en 'Valenciana' que a los posibles mecanismos de adaptación que tengan las variedades 'Mollar de Elche' y 'Wonderful'. Todo apunta a que las raíces de la variedad 'Valenciana' son muy sensibles a las condiciones de inundación disminuyendo considerablemente su conductancia hidráulica, lo que hace que sufran rápidamente déficit hídrico. Futuros trabajos deberían ir enfocados a estudiar cómo afecta la inundación a las propiedades físico-químicas de las raíces de las distintas variedades de granado.

8.2. PUBLICACIÓN 2

Characterization of the ecophysiological responses of three pomegranate cultivars to salinity

Olmo, A., García-Sánchez, F., Simón, I., Lidón, V., Alfosea-Simón, M., Cámara-Zapata, J.M., Martínez-Nicolás, J.J., Simón-Grao, S.

Photosynthetica. 57(4), 1015–1024.

Factor de impacto: 2,562 Q2 (2019) (Categoría Plant Sciences)

El objetivo de este trabajo fue conocer las respuestas del cultivo de granado a la salinidad con el fin de elucidar los posibles mecanismos de adaptación que tienen estas plantas a estas condiciones medioambientales adversas. Se planteó un estudio a tres niveles, fisiológico: estudiando parámetros de intercambio gaseoso, fluorescencia de clorofilas y relaciones hídricas; nutricional: estudiando la acumulación de cloruro en hojas y raíces; y bioquímico: estudiando metabolismo primario relacionado con los carbohidratos (azúcares solubles totales, azúcares reductores y almidón).

8.2.1 Resumen de resultados y discusión

En este ensayo se puede ver que la salinidad altera los procesos fisiológicos de las plantas de granado relacionados con los parámetros de intercambio gaseoso, fluorescencia de clorofilas, relaciones hídricas y metabolismo del carbono. Sin embargo, de las tres variedades ensayadas, ‘Valenciana’ mantuvo en mejor estado los procesos fotosintéticos y producción de carbohidratos.

En los parámetros de intercambio gaseoso no se observó una interacción significativa en la A_{CO_2} entre el cultivar \times salinidad, es decir, que la respuesta de estas tres variedades fue similar: al aumentar la concentración de NaCl en la solución nutritiva disminuyó la A_{CO_2} . Cabe destacar que en la variedad ‘Valenciana’ la A_{CO_2} se redujo significativamente desde el tratamiento T1 (40 mM NaCl), mientras que en las variedades ‘Mollar’ y ‘Wonderful’ se redujeron significativamente desde el tratamiento T4 (100 mM NaCl) y T2 (60 mM), respectivamente. Además, el tratamiento salino a partir del cual se produjo un reducción igual o superior al 50% de la fotosíntesis neta con

respecto a su control fue T6 para Mollar, T1 para ‘Valenciana’ y T4 para ‘Wonderful’. Esto sugiere que el sistema fotosintético de la variedad ‘Valenciana’, o es más sensible a la salinidad que el de las otras dos, o que esta variedad pone en marcha una serie de mecanismos fisiológicos para paliar los efectos negativos de la salinidad diferentes a los de las otras dos variedades. Según los estudios llevados a cabo en este experimento y la relación entre ellos, parece ser que la segunda opción es la más factible. Así, las causas de la disminución de A_{CO_2} por la salinidad fueron diferentes entre las variedades ensayadas. El efecto de la salinidad en la A_{CO_2} en muchas especies de plantas se puede deber a dos factores: estomático y no estomático. En nuestro experimento, se observó que en los tratamientos salinos la C_i disminuyó en ‘Valenciana’ lo que significa que la disminución de A_{CO_2} se debió a un cierre de los estomas; sin embargo, las otras dos variedades disminuyeron la A_{CO_2} como consecuencia de daños metabólicos, ya que en C_i no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos salinos y control. Por otro lado, los parámetros de fluorescencia de clorofilas avalan la hipótesis de que los factores no estomáticos fueron relevantes en la reducción de la A_{CO_2} en las variedades ‘Wonderful’ y ‘Mollar de Elche’, ya que en estas plantas se observó un descenso importante de actividad del PSII debido a la disminución tanto de F_v'/F_m' como del qP . La disminución de estos parámetros significa que estas plantas han perdido eficiencia en los procesos de convertir la energía luminosa en energía química (Maxwell and Johnson 2000), debido tanto a daños en el proceso de captación y transporte de energía lumínica desde los pigmentos fotosintéticos hasta el centro de reacción del PSII (F_v'/F_m'), como de los procesos metabólicos relacionados con el ciclo de Calvin (qP). En el estudio de regresión de los parámetros de intercambio gaseoso frente a los parámetros de fluorescencia de clorofila se ve claramente esta idea, ya que un descenso de la A_{CO_2} fue acompañado paralelamente de un descenso de actividad del PSII, F_v'/F_m' y qP .

Al incrementar la concentración de NaCl en la solución de riego, incrementó la concentración de Cl⁻ en hojas y, paralelamente, disminuyó el potencial hídrico. Este comportamiento fue similar para las tres variedades ya que no hubo una interacción significativa entre la variedad × salinidad en el ANOVA. A pesar de que el potencial hídrico disminuyó con la salinidad, el CRA apenas fue afectado. Este resultado nos permite descartar que el efecto osmótico de la salinidad (deshidratación) fuera el responsable del comportamiento de estas plantas ante la salinidad. Todos los datos

apuntan a que la disminución de la A_{CO_2} fue debida a la toxicidad del Cl^- en ‘Mollar’ y ‘Wonderful’, y al cierre estomático en ‘Valenciana’. Sin embargo, para saber por qué en esta variedad el Cl^- es menos tóxico, sería necesario evaluar el sistema antioxidante de cada variedad para ver si ‘Valenciana’ tiene un sistema más potente que las otras.

Otros de los resultados reveladores de este estudio fue encontrar que la concentración de Cl^- en las hojas fue baja a pesar de las altas concentraciones de NaCl empleadas en el riego, y que esta baja concentración de Cl^- foliar fue correlacionado con las altas concentraciones que se dieron en la raíz. Esto nos indica que el granado es capaz de limitar la concentración de Cl^- en las hojas a expensas de acumularlo en la raíz. Esta hipótesis parece coincidir con las propuestas por Karimi et al. (2014) y Mastrogiannidou et al. (2016). Estos autores sugirieron que los granados de la variedad ‘Wonderful’ y ‘Shishegap’ podrían presentar mecanismos de restricción del transporte de Cl^- que les permiten resistir la salinidad, manteniendo buenos niveles hídricos, fluorescencia de clorofilas y actividad enzimática.

Aunque en la mayoría de las especies la salinidad produce alteraciones en los procesos de captación y asimilación de CO_2 , no hay un modelo único y general de cómo influye este estrés en la concentración, composición y distribución de carbohidratos producidos por la maquinaria fotosintética de las plantas. En nuestro ensayo la concentración de carbohidratos en las hojas de las variedades ‘Valenciana’ y ‘Wonderful’ aumentó, mientras que en la variedad ‘Mollar de Elche’ apenas se modificó este parámetro. El incremento de los carbohidratos en estas dos variedades puede ser uno de los mecanismos empleados para resistir los problemas ocasionados por la salinidad, mediante un ajuste osmótico. Según esto, ‘Mollar de Elche’ podría ajustarse osmóticamente con otros solutos cuyo gasto energético es mayor, lo que le llevaría a disponer de menos energía para mantener el crecimiento vegetativo. Naeini et al. (2005) observaron que las plantas de granado iraní ‘Malas Torsh’, ‘Malas Shirin’ y ‘Alak Torsh’, incrementaron la producción de almidón y azúcares reductores frente a la de azúcares solubles. En el caso de ‘Valenciana’ y ‘Wonderful’ la concentración de azúcares solubles (ayudan al ajuste osmótico) y azúcares reductores (ayudan a paliar estrés oxidativo) incrementó con la salinidad, mientras que ‘Mollar de Elche’ priorizó el incremento de azúcares reductores con respecto a la síntesis de solubles. Este diferente modelo de respuesta en el metabolismo del carbono podría estar relacionado con la diferente tolerancia a la salinidad observada entre especies.

8.2.2 Conclusiones

En este experimento hemos descrito las respuestas ecofisiológicas de tres variedades de granado a la salinidad, haciendo medidas de parámetros de intercambio gaseoso, fluorescencia de clorofilas, relaciones hídricas y concentración foliar de carbohidratos y Cl^- . Aunque los árboles de granado son muy resistentes a la salinidad, como muestran los estudios de Maas y Hoffman (1977) y Steppuhn et al. (2005), en nuestro ensayo vemos un diferente comportamiento entre las variedades estudiadas. La variedad ‘Valenciana’ redujo la A_{CO_2} debido al cierre estomático, mientras que las variedades ‘Mollar’ y ‘Wonderful’ podrían haber reducido la A_{CO_2} por daños que causó la toxicidad del Cl^- en su aparato fotosintético. Además, en la variedad ‘Valenciana’ el metabolismo del carbono en condiciones de estrés va dirigido presumiblemente tanto a que la planta se ajuste osmóticamente como a reducir las especies reactivas de oxígeno. Futuras investigaciones deberían ir encaminadas a dilucidar qué papel juegan los sistemas antioxidantes de plantas de granado en las respuestas a la salinidad, ya que es bien conocido que estas plantas tienen en frutos y hojas una gran capacidad antioxidante.

8.3. PUBLICACIÓN 3

The high tolerance of pomegranate trees to the excess of B in irrigation water is due to their capacity to limit B transport from the root to the leaves

Olmo-Vega, A., Simón-Grao, S., Simón, I., Alfosea-Simón, M., Martínez-Nicolás, J.J., García-Sánchez, F.

Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 184, 142–149.

Factor de impacto: 2,823 Q2 (2019) (Categoría Agronomy)

En este estudio queremos testar la hipótesis de que los árboles de granado son muy tolerantes a la presencia de boro en el agua de riego. También queremos conocer los mecanismos fisiológicos que hacen que esto sea posible en relación a la absorción y transporte de boro en los árboles y a sus efectos de toxicidad en la fotosíntesis. Todo ello se realizará en tres variedades para estudiar si existen diferencias entre ellas.

8.3.1 Resumen de resultados y discusión

Los resultados obtenidos en este experimento muestran que el granado es una especie muy tolerante al riego con altas concentraciones de boro. En los tres cultivares estudiados apenas se observaron diferencias en el crecimiento vegetativo entre los tratamientos altos de boro (1,25, 2,5, 5, 10 mg L⁻¹) frente al tratamiento control (0,25 mg L⁻¹), ni en verano ni en el período de otoño. Esto coincide con los resultados de Sarafi et al. (2017), en los que no se observaron diferencias significativas en el crecimiento vegetativo de los cultivares de granado ‘Ermioni’ y ‘Wonderful’ en los tratamientos con 5 y 10 mg L⁻¹ de boro en comparación con el riego sin boro. En general, los frutales cultivados en el área mediterránea como higuera, vid, cítricos y melocotonero, no toleran más de 0,5 mg L⁻¹ de B, mientras que los cultivos de alfalfa, zanahoria, remolacha azucarera, algodón y nabo, toleran concentraciones por encima de 4 mg L⁻¹ de B (Mengel y Kirkby, 2001; Batar et al. 2009). Por tanto, en los árboles de granado nos encontramos con un cultivo muy tolerante a altos niveles de boro, posiblemente el de mayor tolerancia en frutales del área mediterránea. Esto es posible, según los datos aportados en este ensayo, porque en

estos árboles la concentración de B en las hojas es muy baja a pesar de regar con aguas de alta concentración de B. En este experimento, la concentración foliar de boro no superó los 40 mg kg^{-1} , por lo que podría ser que en estos árboles se impida su transporte desde la raíz hacia la parte aérea, de tal forma que su acumulación en las hojas nunca llega a ser tóxica. En cuanto a la distribución de B en la planta, se observó una gran diferencia entre sus tejidos. La máxima concentración en la raíz fue de 400 mg kg^{-1} , mientras que en el tallo y la hoja fue de 60 y 40 mg kg^{-1} , respectivamente. Con estos datos se ve claramente un gradiente de concentración raíz > tallo > hoja. Esto sugiere que el granado tiene la capacidad de almacenar gran cantidad de boro en las raíces e impedir que se transporte y acumule en las hojas evitando así que su toxicidad afecte al desarrollo vegetativo de este cultivo.

En el estudio realizado en verano y otoño, se pudo observar que el crecimiento vegetativo y la absorción de boro por las plantas, independientemente de los cultivares ensayados, fue mayor en verano que en otoño, debido a que los granados en otoño sufren una fuerte parada vegetativa acompañada de un descenso en la tasa de transpiración. Esto podría haber producido también el descenso significativo de la tasa de absorción y transporte de boro que se observó en este mes con respecto al período de verano. En muchas especies de plantas, una vez que el boro es absorbido por las raíces es traslocado hacia la parte aérea a través del xilema siguiendo el flujo de transpiración (Chatzissavvidis y Therios, 2011). Sin embargo, nuestros datos en granado muestran claramente que el transporte desde la raíz hacia las hojas de este elemento quedaría controlado y/o restringido por algún mecanismo todavía no conocido para estas plantas, por lo que la regla de la transpiración foliar como responsable de la distribución de boro en las plantas no siempre se cumple. Camacho-Cristóbal et al. (2008) también observaron que en especies como el peral (*Pyrus communis*), el manzano (*Malus domestica*) o el melocotonero (*Prunus persica*), el boro seguía distribuyéndose uniformemente por toda la planta pese al descenso de la tasa de transpiración, lo cual podría indicar un transporte a través del floema no vinculado al flujo de transpiración (Brown y Shelp, 1997).

En este experimento es importante destacar que a pesar de que las plantas acumularon una gran concentración de boro en las raíces, el crecimiento apenas se vio afectado. Este comportamiento resulta interesante con respecto al de otras especies, en el que la inhibición del crecimiento radicular fue el primer efecto fenotípico de la

toxicidad por boro (Turan et al. 2009). En cultivos como el tomate se produce una reducción significativa del crecimiento radicular a partir de 120 mg kg^{-1} (Princi et al. 2016), en vid a partir de 220 mg kg^{-1} (Gunes et al. 2006) y en cítricos a partir de 120 mg kg^{-1} (Simón-Grao et al. 2019). Sin embargo, pese a la alta acumulación de boro en las raíces del granado, no hubo apenas variación en el crecimiento radicular. Estos interesantes resultados requieren de más investigaciones para identificar qué mecanismos hacen esto posible, en los que podrían estar involucrados la intervención de transportadores que eviten la descarga de B en el xilema, la compartimentación de B en las vacuolas, una alta capacidad antioxidante que repare la toxicidad en las raíces o formación de complejos poliol-B que inactiven su toxicidad (Landi et al. 2019).

Niveles altos de boro en las hojas pueden afectar negativamente a los parámetros fotosintéticos debido tanto a factores estomáticos como a no estomáticos (Ardic et al. 2009; Whang et al. 2011). En nuestro experimento los parámetros de intercambio gaseoso apenas se vieron afectados debido a que la capacidad de acumulación del boro en la raíz impidió que el B llegara a la parte aérea de las plantas. En otros cultivos sensibles como los cítricos, sí que se produce una reducción de la tasa de asimilación neta de CO_2 debido tanto a factores estomáticos como no estomáticos (Simón-Grao et al. 2019).

En cuanto a las variedades ensayadas, su comportamiento con respecto a la concentración de B en la solución nutritiva fue muy parecido entre ellas, lo que indica que la tolerancia del granado a este estrés no depende a grandes rangos del cultivar empleado, sino que es algo innato para este cultivo. Los resultados obtenidos con los tres cultivares respaldan la hipótesis de que estos árboles limitan la concentración de B en las hojas gracias a la acumulación de B en la raíz y en este tejido su toxicidad es prácticamente nula. No obstante, no en todas las especies es así. Se han visto diferencias de tolerancia intraespecíficas como en trigo, donde la variedad ‘Bolal’ es más tolerante que ‘Atay’ (Kayihan et al. 2017), en pimiento la variedad ‘Salomon’ es más tolerante que ‘Odysseo’ (Sarafi et al. 2018) y en arboles de olivo la variedad ‘Konservolia’ es más tolerante que ‘Amygdalolia’ (Rostami et al. 2017).

La concentración de nutrientes y de solutos orgánicos como la prolina no se vio alterada con los tratamientos de boro aplicados en nuestro ensayo. Sin embargo, en otros estudios sí se han visto interacciones entre el boro y otros nutrientes, como la relación antagonica entre el fósforo y el boro en cultivos como *Jatropha curcas* (Simón et al.

2013) y la correlación negativa con el potasio en hojas, tallo y raíz en olivo (Chatzissavvidis y Therios, 2011). Además, las plantas que sufren altas concentraciones de B responden aumentando la concentración de prolina (Karabal et al. 2003) y de azúcares reductores (Papadakis et al. 2018) como mecanismo defensivo frente a especies reactivas de oxígeno (ROS), evitando así daños en la membrana celular y en el aparato fotosintético debido a la toxicidad. Nuestros datos muestran una vez más que los árboles de granado, gracias a la acumulación de B en la raíz y sus mecanismos para impedir su toxicidad, se muestran insensibles al riego con alta concentración de B en la solución nutritiva.

8.3.2 Conclusiones

En este experimento se ha puesto de manifiesto que las plantas de granado son muy tolerantes al exceso de B en el agua de riego por lo menos hasta una concentración de 10 mg L^{-1} . Esto es gracias a que estos árboles pueden restringir la absorción de B desde la raíz a la parte aérea del árbol evitando así concentraciones tóxicas en las hojas. Además, esta limitación en la tasa de transporte puede estar relacionada con la alta capacidad que tienen de acumular gran cantidad de B en sus raíces y anular su toxicidad en esta parte de la planta. En este ensayo, apenas se han visto diferencias en el comportamiento entre los tres cultivares ensayados ‘Mollar de Elche’, ‘Valenciana’ y ‘Wonderful’, en lo que parece ser una respuesta innata de este cultivo, quedando demostrado en los tres cultivares los mecanismos de tolerancia descritos anteriormente. Por lo tanto, se puede decir que el granado sería un buen frutal para aquellos suelos con alta concentración de boro o en aquellas parcelas que se rieguen con aguas no convencionales como las procedentes de las desaladoras. Este ensayo abre nuevas líneas de investigación dirigidas a descifrar por qué el cultivo de granado se comporta de forma tan distinta a otros frutales del área mediterránea en cuanto a la tolerancia al riego con agua con alta concentración de B.

9. CONCLUSIONES GENERALES

9. CONCLUSIONES GENERALES

En general, los ensayos realizados en esta tesis permiten concluir lo siguiente:

Inundación:

- El cultivo de granado es muy sensible a las condiciones de inundación. En un período de inundación de 6 días se redujo su crecimiento en más de un 30%.
- Entre las tres variedades ensayadas, ‘Valenciana’ es más sensible que ‘Mollar de Elche’ o ‘Wonderful’.
- Los procesos fisiológicos de los árboles de granado se ven muy afectados cuando sufren inundación. La disminución de la concentración de oxígeno en la solución del suelo produce una caída del potencial hídrico, a la vez que se desencadena el cierre de estomas y la disminución de la tasa de asimilación neta de CO₂. Este último efecto se debe a factores no estomáticos, como indican la caída de qP en el estudio de fluorescencia de clorofilas y el incremento de C_i en las medidas de intercambio gaseoso.
- La inundación no produce estrés oxidativo en las hojas de los árboles de granado a pesar de la caída de la tasa de asimilación neta de CO₂, posiblemente debido a que estos árboles tienen un potente sistema antioxidante.
- La inundación produce alteraciones en el metabolismo del C y la distribución de los carbohidratos en las plantas. En los cultivares ensayados se observó un incremento de la concentración de carbohidratos totales y de azúcares reductores en las hojas paralelamente a una disminución del almidón.
- El modelo de respuesta hormonal del ABA entre las tres variedades es diferente y podría estar relacionado con la diferente sensibilidad a la inundación observada entre ellas. En la más sensible, ‘Valenciana’, no se producen cambios en la concentración de esta hormona, mientras que en ‘Mollar de Elche’ y ‘Wonderful’, sí que se observó un incremento que le permitió retrasar los efectos negativos producidos por las condiciones de inundación.

Salinidad

- El cultivo de granado es muy tolerante al riego con aguas salinas, aunque después de un período de riego de 60 días se observaron alteraciones en sus respuestas ecofisiológicas. Estas respuestas dependieron de la variedad.
- En la variedad 'Valenciana' disminuyó la tasa de asimilación neta de CO_2 a partir de una concentración de NaCl de 40 mM NaCl ; mientras que en 'Mollar de Elche' y 'Wonderful' disminuyó a partir de 100 y 60 mM NaCl , respectivamente.
- En 'Valenciana' se observó la mayor disminución de la tasa de asimilación neta de CO_2 , sin embargo, esto parece ser un mecanismo de adaptación para impedir daños en las hojas. La reducción de C_i sugiere que el descenso de A_{CO_2} se debió a factores estomáticos (cierre de estomas).
- La reducción de A_{CO_2} en las variedades 'Mollar de Elche' y 'Wonderful' se produjo debido a factores no estomáticos, provocados por la toxicidad de los iones Cl^- . Los cambios en C_i y en los parámetros de fluorescencia de clorofilas Φ_{PSII} , F_v'/F_m' y qP , indican que en estas hojas se dañaron los procesos de captación de la luz y los mecanismos bioquímicos de la absorción de CO_2 .
- Los resultados obtenidos en el análisis de carbohidratos y solutos orgánicos también revelaron un diferente comportamiento en el metabolismo del C y los procesos de ajuste osmótico entre las tres variedades ensayadas. En 'Valenciana' los datos apuntan a que, bajo condiciones salinas, en el metabolismo del C se intensifican los procesos relacionados tanto con el ajuste osmótico como con la desactivación de las especies reactivas de oxígeno. En las otras dos variedades no se llegan a activar estos dos mecanismos simultáneamente; en 'Wonderful' se activan los procesos de ajuste osmótico y en 'Mollar de Elche' los mecanismos relacionados con el estrés oxidativo.

Exceso de boro en el agua de riego

- El cultivo de granado es muy tolerante al riego con alta concentración de boro. En nuestro ensayo se vio que el riego con soluciones nutritivas que tuvieron un rango de boro entre 0,25-10 mg L⁻¹ no afectaron a las plantas de ‘Valenciana’, ‘Mollar de Elche’ y ‘Wonderful’. Esto indica que este frutal tiene una mayor tolerancia al exceso de boro que la mayoría de los frutales del área mediterránea.
- En este experimento no se observaron diferencias en la tolerancia relativa y las respuestas fisiológicas al riego con alta concentración de boro entre las tres variedades ensayadas ‘Valenciana’, ‘Mollar de Elche’ y ‘Wonderful’.
- Los mecanismos por los cuales los árboles de granado son muy tolerantes al exceso de boro en el agua de riego están relacionados con los procesos de absorción y transporte de este nutriente. Estos árboles pueden acumular una alta concentración de boro en las raíces limitando su transporte hacia la parte aérea del árbol. Así, la concentración máxima de boro que se observó en las hojas no sobrepasó los 40 mg kg⁻¹.
- Los parámetros fisiológicos relacionados con los procesos de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas no fueron alterados por la alta concentración de B en el agua de riego, lo que es debido a que la concentración de B en las hojas se mantuvo en valores dentro del rango de la normalidad.
- Las raíces de los árboles de granado son capaces de acumular un gran contenido de boro (hasta 400 mg kg⁻¹) sin que se vea afectado su crecimiento. Por lo tanto, esta parte de la planta tiene mecanismos eficaces para tolerar una alta concentración de boro.

10. INVESTIGACIONES FUTURAS

10. INVESTIGACIONES FUTURAS

En esta tesis hemos visto que los árboles de granado son sensibles a condiciones de inundación y tolerantes a la salinidad y a la alta concentración de boro en el agua de riego. De estos tres estreses, no hubo diferencias significativas entre variedades en el caso del boro. Sin embargo, en la inundación, ‘Mollar de Elche’ y ‘Wonderful’ fueron más tolerantes que ‘Valenciana’, mientras que en condiciones de salinidad este orden se invirtió, siendo ‘Valenciana’ la variedad más tolerante. Esta tesis puede ser el punto de partida para iniciar diferentes líneas de investigación relacionados con: i) la utilización de portainjertos en granado; ii) diseñar estrategias para paliar los efectos negativos de estos estreses y iii) adquirir más conocimiento científico para descifrar los mecanismos que hacen que este cultivo sea tolerante a la salinidad y al exceso de boro, así como explicar las diferentes respuestas que se dieron entre las distintas variedades ensayadas.

I) Utilización de portainjertos en granado

El conocimiento del comportamiento diferencial del material vegetal de granado español, puede derivar en el interés de utilizar patrones para el cultivo del granado que le permitan a esta especie adaptarse mejor a los diferentes tipos de suelo y de agua con los que se ve obligada a convivir. En la actualidad, hay una gran cantidad de variedades de granado que se han ido introduciendo en España procedente de otros países. Estas nuevas variedades tienen un comportamiento agronómico excelente en cuanto a la producción y calidad de la cosecha, pero tienen problemas a la hora de adaptarse a las condiciones específicas del área mediterránea, donde los árboles sufren períodos de prolongada sequía, inundación estacional o se riegan con aguas de baja calidad con altas concentraciones de NaCl y B. El uso de patrones en granado es un tema, como muchos otros, olvidado en esta especie por su condición de “frutal subutilizado”. Sin embargo, tal y como se ha observado en los experimentos que componen esta memoria de tesis doctoral, las variedades presentan diferentes comportamientos ante un estrés abiótico determinado. La selección de variedades tolerantes y su uso como portainjerto podrían maximizar el potencial productivo de las variedades de mayor interés y aumentar la rentabilidad de las explotaciones. Esta línea de investigación que se propone es innovadora en España y también a nivel internacional.

II) Diseñar estrategias agronómicas para paliar los efectos negativos de la inundación.

Como ya hemos visto en esta tesis doctoral, los árboles de granado son muy tolerantes a la salinidad y al exceso de boro en el agua de riego, pero tienen el problema de su baja tolerancia a la inundación. En estos árboles, en un corto período de tiempo bajo condiciones de inundación, se producen efectos drásticos que pueden llegar a provocar su muerte. En un futuro, debido a las consecuencias del cambio climático, se prevé que se vayan a intensificar los fenómenos de “gota fría” o DANA como la producida en septiembre de 2019 en el sur de Alicante, que provocó pérdidas millonarias en la agricultura incluyendo las explotaciones de granado. Ya que estos árboles son muy sensibles a los períodos de inundación, sería interesante diseñar una serie de estrategias agronómicas que induzcan tanto mecanismos de defensa en estas plantas como que ayuden a los árboles a recuperarse después del estrés.

Hoy en día, se ha visto que la aplicación de ciertas sustancias podría paliar los efectos negativos de los estreses abióticos en los cultivos. Estas sustancias se utilizan para formular productos bioestimulantes que están relacionados con la agricultura ecológica. Por lo tanto, es fundamental validar estos productos específicos para combatir los efectos negativos de la inundación en los granados. Materias activas como extractos botánicos y de algas, aminoácidos, metaloides, sílica, quitosano y nanopartículas están teniendo bastante éxito en otros cultivos. Es por eso que habría que considerar la apertura de una línea de investigación encaminada a conocer y desarrollar diversas materias activas en el cultivo del granado para conocer tanto su modo de actuación, como la dosis, frecuencia y forma de aplicación.

III) Adquirir conocimiento científico para descifrar los mecanismos que hacen que este cultivo sea tolerante a la salinidad y al exceso de boro.

En esta tesis ha quedado patente que el cultivo de granado es tolerante a la salinidad y al exceso de boro en el agua de riego. Se ha llegado a esta conclusión a partir de una serie de estudios fisiológicos, bioquímicos y nutricionales. Sin embargo, todavía han quedado muchos aspectos por resolver. Uno de ellos es el de conocer qué mecanismos tienen los árboles de granado para concentrar una alta cantidad de boro en las raíces sin que se vea afectado su desarrollo y de cómo limita su transporte hacia la parte aérea del árbol. Para descifrar estos mecanismos se plantean como líneas futuras una serie de experimentos enfocados a conocer: i) los mecanismos que regulan la descarga de B en el xilema de la raíz, haciendo especial hincapié en los transportadores de B; ii) determinar qué papel juegan los procesos de compartimentación de B en las vacuolas; iii) identificar los sistemas antioxidantes en las raíces que reparan o evitan las especies reactivas de oxígeno generadas por la toxicidad de B; iv) determinar la importancia de las moléculas del tipo polirol en la distribución de B y su toxicidad en las plantas, etc.

En el experimento de la salinidad se ha puesto de manifiesto la diferente respuesta que tienen las variedades de granado. ‘Valenciana’ se protege de los efectos de la salinidad activando los procesos de ajuste osmótico, producción de compuestos antioxidantes y cerrando los estomas; en ‘Wonderful’ solo se activan los procesos de ajuste osmótico; mientras que en ‘Mollar de Elche’ solo se produce la síntesis de compuestos antioxidantes. Para comprender mejor este comportamiento en futuras investigaciones se pretende analizar esta respuesta a nivel metabólico mediante técnicas de H-RMN que permitan caracterizar los diferentes procesos del metabolismo primario de las plantas.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, P., Jaleel, C.A. y Sharma, S. (2010). Antioxidative defence system, lipid peroxidation, proline metabolizing enzymes and Biochemical activity in two genotypes of *Morus alba* L. subjected to NaCl stress. *J. Plant Physiol.* 57, 509–517.
- Amri, E., Mirzaei, M., Moradi, M., y Zare, K. (2011). The effects of spermidine and putrescine polyamines on growth of pomegranate (*Punica granatum* L. cv 'Rabbab') in salinity circumstance. *J. Plant Physiol. Biochem.* 3(3), 43–49.
- Amri, M., El Ouni, M.H. y Salem, M.B. (2014). Waterlogging affect the development, yield and components, chlorophyll content and chlorophyll fluorescence of six bread wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.). *Bulg. J. Agric. Sci.* 20(3), 647–657.
- Ángeles, G., Evert, R.F. y Kozlowski, T.T. (1986). Development of lenticels and adventitious roots in flooded *Ulmus americana* seedlings. *Can. J. For. Res.* 16, 585–590.
- Arbona, V., Hossain, Z., Lopez-Climent, M.F., Perez-Clemente, R.M. y Gómez-Cadenas, A. (2008). Antioxidant enzymatic activity is linked to water logging stress tolerance in citrus. *Physiol. Plantarum.* 132, 452–466.
- Ardic, M., Sekmen, A., Tokur, S., Ozdemir, F. y Turkan, I. (2009). Antioxidant responses of chickpea plants subjected to boron toxicity. *Plant Biol.* 11(3), 328–338.
- Armstrong, W. (1975). Waterlogged soils. En: Etherington, J.R. (ed.). *Environ. Plant Ecology*. New York: Wiley. 181–218.
- Aziz, M.A.L., Noori, A.M., Al-Qadi, R.A. y Muhsin, M.H. (2018). The role of nitrogen and boron fertilizers on growth and yield in pomegranate (*Punica granatum* L.). *Plant Archives.* 18(2), 1957–1960.
- Azizi, S., Tabari, M. y Striker, G.G. (2017). Growth, physiology, and leaf ion concentration responses to long-term flooding with fresh or saline water of *Populus euphratica*. *S. Afr. J. Bot.* 108, 229–236.
- Bartels, D. y Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24(1), 23–58.
- Bartual, J., Fernandez-Zamudio, M.A. y De-Miguel, M.D. (2013). Situation of the Production, Research and Economics of the Pomegranate Industry in Spain. *III International Symposium on Pomegranate and Minor Mediterranean Fruits. Acta Hortic.* 1089, 345–349.
- Batar, T., Koksall, N.S. y Yersel, S.A. (2009). Production and characterization of wall plaster with borax and paper wastes and perlite additives. *Ekoloji* 18(72), 45–53.
- Bates, L., Waldren, R.P. y Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil.* 39, 205–207.
- Bender, B., Capellesso, E.S., Lottici, M.E., Sentkovski, J., Mielniczki-Pereira, A.A., Rosa, L.M.G. y Sausen, T.L. (2017). Growth responses and accumulation of soluble sugars in *Inga marginata* Wild. (Fabaceae) subjected to flooding under contrasting light conditions. *Braz. J. Biol.* 77(2), 260–266.
- Bhatt, R.M., Upreti, K.K., Divya, M.H., Bhat, S., Pavithra, C.B. y Sadasiva, A.T., (2015). Interspecific grafting to enhance physiological resilience to flooding stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Sci. Horti.* 182, 8–17.

- Blatt, M.R. y Armstrong, F.** (1993). K⁺ channels of stomatal guard cells: abscisic-acid-evoked control of the outward rectifier mediated by cytoplasmic pH. *Planta*. 191(3), 330–341.
- Brennan, T. y Frenkel, C.** (1977). Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol.* 59, 411–416.
- Brown, P.H. y Hu, H.** (1996). Phloem mobility of boron is species dependent: evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species. *Ann. Bot.* 77(5), 497–506.
- Brown, P.H. y Shelp, B.J.** (1997). Boron mobility in plants. *Plant Soil.* 193(1-2), 85–101.
- Brown, P.H., Bellaloui, N. y Wimmer, M.A.** (2002). Boron in plant biology. *Plant Biol.* 4, 205–223.
- Brugnoli, E. y Björkman, O.** (1992). Growth of cotton under continuous salinity stress: influence on allocation pattern, stomatal and non-stomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. *Planta*. 187. 335–347.
- Cabrera, E., Estrela, T. y Lora, J.** (2019). Desalination in Spain. Past, present and future. *Ingeniería del agua*. 23(3), 199–214.
- Cabrera, E., Estrela, T. y Lora, J.** (2019). Pasado, presente y futuro de la desalación en España. *Ingeniería del agua*. 23(3), 199–214.
- Camacho-Cristóbal, J.J., Rexach, J. y González-Fontes, A.** (2008). Boron in plants: deficiency and toxicity. *J. Integr. Plant Biol.* 50(10), 1247–1255.
- Cambayas Coop V.** (2020). Productos Cambayas Granadas.
<<http://www.cambayas.com/productos.php?seccion=granadas>> [Consulta: 6 de octubre de 2020].
- CEDEX.** (2017). Evaluación del impacto del cambio climático en los recursos hídricos y sequías en España. Anexo 4: *Impacto del cambio climático en el régimen de sequías*. Madrid, julio de 2017.
- Cerasoli, S.** (2014). Ecofisiologia da Respiração das Plantas. Centro de Estudos Florestais.
<<https://docplayer.com.br/58868727-Ecofisiologia-da-respiracao-das-plantas.html>> [Consulta: 6 de octubre 2020].
- Chapman, H.D. y F.P. Pratt.** (1961). Ammonium vandate-molybdate method for determination of phosphorus: Methods of analysis for soils, plants and water. California University, Agriculture Division. pp. 184–203.
- Chatzissavidis, C. y Therios, I.** (2011). Boron in higher plants. En: Perkins, G.L. (ed.). *Boron: compounds, production and application*. Nova Science Publishers, New york, pp. 147–176.
- Chaudhary, S., Kusakabe, A. y Melgar, J.C.** (2016). Phytophthora infection in flooded citrus trees reduces root hydraulic conductance more than under non-flooded condition. *Sci. Horti.* 202, 107–110.
- Cha-Um, S. y Kirdmanee, C.** (2010). Effect of glycinebetaine on proline, water use, and photosynthetic efficiencies, and growth of rice seedlings under salt stress. *Turk. J. Agric. For.* 34, 517–527.
- Chirkova, T.V. y Gutman, T.S.** (1972). Physiological role of branch lenticels in willow and poplar under conditions of root anaerobiosis. *Soviet Plant Physiol.* 19, 289–295.
- Chutipaijit, S., Cha-um, S. y Sompornpailin, K.** (2011). High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. spp. indica. *Aust. J. Crop Sci.* 5, 1191–1198.
- Colmer, T.D.** (2003). Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and

- radial oxygen loss from roots. *Plant Cell Environ.* 26, 17–36.
- Colmer, T.D. y Voeselek, L.A.C.J.** (2009). Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Funct. Plant Biol.* 36, 665–681.
- Da Ponte, N.H.T., Santos, R.I.N., Filho, W.R.L.L., Cunha, R.L., Magalhaes, M.M. y Pinheiro, H.A.** (2019). Morphological assessments evidence that higher number of pneumatophores improves tolerance to long-term waterlogging in oil palm (*Elaeis guineensis*) seedlings. *Flora.* 250, 52–58.
- Davarpanah, S., Tehranifar, A., Davarynejad, G., Abadía, J. y Khorasani, R.** (2016). Effects of foliar applications of zinc and boron nano-fertilizers on pomegranate (*Punica granatum* cv. Ardestani) fruit yield and quality. *Sci. Hortic.* 210, 57–64.
- De Ollas, C., Morillón, R., Fotopoulos, V., Puértolas, J., Ollitrault, P., Gómez-Cadenas, A. y Arbona, V.** (2019). Facing Climate Change: Biotechnology of Iconic Mediterranean Woody Crops. *Front Plant Sci.* 10–427.
- De Paz, J.M., Sánchez, J. y Visconti, F.** (2006). Combined use of GIS and environmental indicators for assessment of chemical, physical and biological soil degradation in a Spanish Mediterranean región. *J. Environ. Manage.* 79, 150–162.
- Dichio, B., Xiloyannis, C., Celano, G. y Vicinanza, L.** (2004). Performance of new selections of *Prunus* rootstocks, resistant to root knot nematodes, in waterlogging conditions. *Acta Hortic.* 658, 403–406.
- Epstein, E.** (1983). Crops tolerant of salinity and other mineral stresses. En: Nugent, J. y O'Connor, M. *Better Crops for Food.* 2, 61–82.
- European Commission.** (2016). Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. 327, 1–73.
- Fernández-Zamudio, M.A., De-Miguel, M.D. y Melián, A.** (2017). La rentabilidad económica de las explotaciones de frutales: el caso de los cítricos y el granado. *Levante Agrícola.* 438, 254–259.
- Ferreira, C.S., Piedade, M.T.F., Franco, A.C., Goncalves, J.F.C. y Junk, W.J.** (2009). Adaptive strategies to tolerate prolonged flooding in seedlings of floodplain and upland populations of *Himatanthus sucuuba*, a Central Amazon tree. *Aquatic Bot.* 90, 246–252.
- Fricke, W., Akhiyarova, G., Veselov, D. y Kudoyarova, G.** (2004). Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves. *J. Exp. Bot.* 55, 1115–1123.
- García-Sánchez, F., Botia, P. y Fernández-Ballester, G.** (2005). Uptake, transport, and concentration of chloride and sodium in three citrus rootstock seedlings. *J. Plant Nutr.* 28(11), 1933–1945.
- Gimeno, V., Syvertsen, J.P., Simón, I., Nieves, M., Díaz-López, L., Martínez, V. y García-Sánchez, F.** (2012). Physiological and morphological responses to flooding with fresh or saline water in *Jatropha curcas*. *Environ. Exp. Bot.* 78, 47–55.
- Grieve, C.M. y Grattan, S.R.** (1983). Rapid assay for determination of water-soluble quaternary ammonium-compounds. *Plant Soil.* 70, 303–307.
- Goldbach, H.E. y Wimmer, M.A.** (2007). Boron in plants and animals: is there a role beyond cell-wall structure? *J. Plant. Nutr. Soil. Sci.* 170, 39–48.
- Gunes, A., Soylemezoglu, G., Inal, A., Bagci, E.G., Coban, S. y Sahin, O.** (2006). Antioxidant and

- stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L) to boron toxicity. *Sci Horti*. 110, 279–284.
- Haissig, B.E. y Dickson, R.E.** (1979). Starch measurements in plant tissue using enzymatic hydrolysis. *Plant Physiol.* 47, 151–157.
- Hasegawa, P.M.** (2013). Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environ. Exp. Bot.* 92, 19–31.
- 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.
- Hook, D.D.** (1984). Adaptations to flooding with fresh water. En: Kozlowski, T.T. (ed.). *Flooding and Plant Growth*. Orlando, FL: Academic Press. pp 265–294.
- Hossain, M.A. y Uddin, S.A.** (2011). Mechanisms of water logging tolerance in wheat: morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. *Aust. J. Crop Sci.* 5(9), 1094–1101.
- Hu, Y. y Schmidhalter, U.** (2005). Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of Plants. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 168, 541–549.
- IPCC.** (2014). Climate Change 2014: Synthesis Report. En: Pachauri, R.K. y Meyer, L.A. (eds.). *Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC, Geneva, Switzerland, 151.
- Jackson, M.B.** (2002). Long-distance signalling from roots to shoots assessed: the flooding story. *J. Exp. Bot.* 53, 175–181.
- Jackson, M.B., Ishizawa, K. e Ito, O.** (2009). Evolution and mechanisms of plant tolerance to flooding stress. *Ann. Bot.* 103, 137–142.
- Karabal, E., Yucel, M. y Oktem, H.A.** (2003). Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. *Plant Sci.* 164, 925–933.
- Karimi, H.R. y Hasanpour, Z.** (2014). Effects of salinity and water stress on growth and macro nutrients concentration of pomegranate (*Punica granatum* L.). *J. Plant Nutr.* 37, 1937–1951.
- Khayyat, M., Tehranifar, A., Davarynejad, G.H. y Sayyari-Zahan, M.H.** (2016). Effects of NaCl salinity on some leaf nutrient concentrations, nonphotochemical quenching and the efficiency of the PSII photochemistry of two Iranian pomegranate varieties under greenhouse and field conditions: Preliminary results. *J. Plant Nutr.* 39(12). 1752–1765.
- Korkmaz, N., Askin, M.A., Ercilsi, S. y Okatan, V.** (2016). Foliar application of calcium nitrate, boric acid and gibberellic acid affects yield and quality of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus.* 15(3), 105–112.
- Kozlowski, T.T. y Pallardy, S.G.** (1997). Growth control in woody plants. *Biol. Plant.* 40, 336.
- Landi, M., Margaritopoulou, T., Papadakis, I.E. y Araniti, F.** (2019). Boron toxicity in higher plants an update. *Planta.* 250, 1011–1032.
- Lefeure, M.** (2015). Neumatóforos de ciprés de Louisiana.
 <<https://www.fond-ecran-image.com/es245024es-Neumatoforos-de-cipres-de-Louisiana.jpg>>

[Consulta: 6 de octubre de 2020]

- Libal-Weksler, Y., Nir, M., Ben-Hayyim, G. y Tel-Or, E.** (1994). Starch metabolism in salt tolerant and salt sensitive shamouti callus. *Plant Physiol. Biochem.* 32, 655–659.
- Lin, K.H., Kuo, W.S., Chiang, C.M., Hsiung, T.C., Chiang, M.C. y Lo, H.F.** (2013). Study of sponge gourd ascorbate peroxidase and winter squash superoxide dismutase under respective flooding and chilling stresses. *Sci. Horti.* 162, 333–340.
- Loreti, E., Veen, H. y Perata, P.** (2016). Plant responses to flooding stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33, 64–71.
- M., Camacho-Cristóbal, J.J., Rexach, J. y González-Fontes, A.** (2008). Boron in plants: deficiency and toxicity. *J. Integr. Plant Biol.* 50(10), 1247–1255.
- MAPA.** (2010). Anuario de estadística agroalimentaria. Madrid: MAPA.
- MAPA.** (2018). Anuario de estadística agroalimentaria. Madrid: MAPA
- MAPA.** (2020). Anuario de estadística agroalimentaria. Madrid: MAPA.
- Martínez-Alvarez, V., Martín-Gorrioz, B. y Soto-García, M.** (2016). Seawater desalination for crop irrigation — A review of current experiences and revealed key issues. *Desalination.* 381, 58–70.
- Mastrogiannidou, E., Chatzissavvidis, C., Antonopoulou, C., Tsabardoukas, V., Giannakoula, A. y Therios, I.** (2016). Response of pomegranate cv. wonderful plants to salinity. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 16(3), 621–636.
- 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. 7–27.
- Melgarejo, P., Martínez, J.J., Hernández Fca Legua, P., Melgarejo-Sánchez, P., Martínez, R.,** (2012). The pomegranate tree in the World: Its problems and uses. *II International Symposium on the Pomegranate.* Options méditerranéennes n° 103.
- Melgarejo-Sánchez, P., Martínez, J.J., Hernández, F., Legua, P., Martínez, R. y Melgarejo, P.** (2015). The pomegranate tree in the World: New cultivars and uses. *III International Symposium on Pomegranate and Minor Mediterranean Fruits. Acta Horti.* 1089, 327–332.
- Mendoza-Grimón, V., Fernández-Vera, J.R., Hernandez-Moreno, J.M. y Palacios-Díaz, M.P.** (2019). Sustainable Irrigation Using Non-Conventional Resources: What has Happened after 30 Years Regarding Boron Phytotoxicity? *Water.* 11(9), 1952.
- Mengel, K. y Kirkby, E.A.** (2001). Boron. En: Mengel K. y Kirkby E.A. (eds.). *Principles of plant nutrition.* 5th ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp. 621–638.
- Mercasa.** (2020). La DOP Granada Mollar de Elche. Diferenciación en el contexto internacional. <https://www.mercasa.es/media/publicaciones/257/La_DOP_Granada_Mollar_de_Elche.pdf> [Consulta: 6 de octubre de 2020]
- Mestre, L., Reig, G., Betrán, J.A., Pinochet, J. y Moreno, M.A.** (2015). Influence of peach-almond hybrids and plum-based rootstocks on mineral nutrition and yield characteristics of ‘Big Top’ nectarine in replant and heavy-calcareous soil conditions. *Sci. Horti.* 192, 475–481.
- MITECO.** (2019). Temporal de lluvia sin precedentes en los últimos 100 años en la Vega Baja del Segura. <https://www.miteco.gob.es/en/prensa/190919aemetdanadatosdestacados_tcm38-501461.pdf>

[Consulta: 6 de octubre de 2020]

- Morgan, J.M.** (1984). Osmoregulation and water stress in higher plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 35, 299–319.
- Muleo, R., Iacona, C., Pistelli, L. y Loreti, F.** (2006). A novel Mr. S. 2/5 peach rootstock clone tolerant to flooding stress. *Adv. Hortic. Sci.* 20, 208–214.
- Munns, R.** (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25, 239–250.
- Munns, R.** (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytol.* 167, 645–663.
- Munns, R. y Tester, M.** (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 59, 651–681.
- Munns, R., James, R.A. y Lauchli, A.** (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 5, 1025–1043.
- Naeini, M.R., Khoshgoftarmanesh, A.H., Lessani, H. y Fallahi, E.** (2005). Effects of Sodium Chloride-Induced Salinity on Mineral Nutrients and Soluble Sugars in Three Commercial Cultivars of Pomegranate, *J. Plant. Nutr.* 27(8), 1319–1326.
- Nelson, M.** (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153–375.
- Okhovatian-Ardakani, A., Mehrabian, M., Dehghani, F. y Akbarzadeh, A.** (2010). Salt tolerance evaluation and relative comparison in cutting of different pomegranate cultivars. *Plant Soil Environ.* 56(4), 176–185.
- Onda Cero Elche.** (2020). La granada de Elche aguanta la lluvia y el granizo de la gota fría. <https://www.ondacero.es/emisoras/comunidad-valenciana/elche/directo/granada-elche-aguanta-lluvia-granizo-gota-fria_201909165d7fa8090cf26d8cd65fe569.html> [Consulta: 6 de octubre de 2020]
- Ozturk, M., Sakcali, S., Gucel, S. y Tombuloglu, H.** (2010). Boron and plants. En: Ashraf, M., Ozturk, M. y Ahmad, M. (eds.). *Plant Adaptation Phytoremediation*. Springer, Dordrecht. pp. 275–311.
- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Bosabalidis, A.M., Therios, I.N., Patakas, A. y Giannakoula, A.** (2004). Boron toxicity in ‘Clementine’ mandarin plants grafted on two rootstocks. *Plant Sci.* 166(2), 539–547.
- Papadakis, I.E., Tsiantas, P.I., Tsaniklidis, G., Landi, M., Psychoyou, M. y Fasseas, C.** (2018). Changes in sugar metabolism associated to stem bark thickening partially assist young tissues of *Eriobotrya japonica* seedlings under boron stress. *J. Plant Physiol.* 231, 337–345.
- Partiya, R., Ghazvini, R.F., Fifaei, R. y Ghasemnezhad, M.** (2018). Response of Different Citrus Genotypes to Continuous Flooding Conditions. *Int. J. Hortic. Sci. Tech.* 5(2), 253–263.
- Pellicer-Martínez, F., González-Soto, I. y Martínez-Paz, J.M.** (2015). Analysis of incorporating groundwater exchanges in hydrological models. *Hydrol. Process.* 29(19), 4361–4366.
- Pociecha, E., Rapacz, M., Dziurka, M. y Kolasińska, I.** (2016). Mechanisms involved in the regulation of photosynthetic efficiency and carbohydrate partitioning in response to low-and high temperature flooding triggered in winter rye (*Secale cereale*) lines with distinct pink snow mold resistances. *Plant Physiol. Biochem.* 104, 45–53.
- Princi, M.P., Lupini, A., Araniti, F., Longo, C., Mauceri, A., Sunseri, F. y Abenavoli, M.R.** (2016). Boron toxicity and tolerance in plants: recent advances and future perspectives. *Plant Metal*

- Interact.* 5, 115–147.
- Pucciariello, C. y Perata, P.**, (2012). Flooding tolerance in plants. En: Shabala, S. (ed.). *Plant Stress Physiol.* CABI, UK.
- 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.
- Rahnama, A., James, R.A., Poustini, K. y Munns, R.** (2010). Stomatal conductance as a screen for osmotic stress tolerance in durum wheat growing in saline soil. *Funct. Plant Biol.* 37(3), 255–263.
- Raven, J.** (1980). Short-and long-distance transport of boric acid in plants. *New Phytol.* 84(2), 231–249.
- Rostami, H., Tabatabaei, S.J. y Nahandi, F.Z.** (2017). Effects of different boron concentration on the growth and physiological characteristics of two olive cultivars. *J. Plant Nutr.* 40(17), 2421–2431.
- Rozeff, N.** (1995). Sugarcane and salinity-A review paper. *Sugarcane*. 5, 8–19.
- Sarafi, E., Chatzissavvidis, C. y Therios, I.** (2013). Response of two pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars to five B concentrations: Growth, performance, B, chlorophyll and proline concentration. *Conference: XVII Int. Plant Nutr. Colloquium & Boron Satellite Meeting*.
- Sarafi, E., Chatzissavvidis, C. y Therios, I.** (2017). Response of two pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars to six boron concentrations: Growth performance, nutrient status, gas exchange parameters, chlorophyll fluorescence, and proline and carbohydrate content. *J. Plant Nutr.* 40(7), 983–994.
- Sarafi, E., Siomos, A., Tsouvaltzi, P., Therios, I. y Chatzissavvidis, C.** (2018). Boron toxicity effects on the concentration of pigments, carbohydrates and nutrient elements in six non-grafted pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Ind. J. Plant Physiol.* 23, 474.
- Sasidharan, R. y Voeselek, L.A.** (2015). Ethylene-mediated acclimations to flooding stress. *Plant Physiol.* 169, 3–12.
- Scholander, P., Hammel, H., Bradstreet, E.Y. y Hemmingsen, E.** (1965). Sap pressure in vascular plants. *Science*. 148, 339–346.
- Shabala, S. y Munns, R.** (2017). Salinity stress: physiological constraints and adaptive mechanisms. En: Shabala, S. (ed.). *Plant Stress Physiology*. CABI, Wallingford. pp. 24–63.
- Shimamura, S., Yoshida, S. y Mochizuki, T.** (2007). Cortical aerenchyma formation in hypocotyl and adventitious roots of *Luffa cylindrica* subjected to soil flooding. *Ann. Bot.* 100, 1431–1439.
- Simón, I., Díaz-López, L., Gimeno, V., Nieves, M.A., Pereira, W.E., Martínez, V.C., Lidon, V. y García-Sánchez, F.** (2013). Effects of boron excess in nutrient solution on growth, mineral nutrition, and physiological parameters of *Jatropha curcas* seedlings. *Plant Soil*. 176(2), 165–174.
- Simón-Grao, S., Nieves, M., Cámara-Zapata, J.M., Martínez-Nicolás, J.J., Rivero, R.M., Fernández-Zapata, J.C. y García-Sánchez, F.** (2019). The Forner Alcaide no. 5 citrus genotype shows a different physiological response to the excess of boron in the irrigation water in relation to its two genotype progenitors. *Sci. Hortic.* 245, 19–28.
- Simón-Grao, S., Nieves, M., Martínez-Nicolás, J.J., Cámara-Zapata, J.M., Alfosea-Simón, M. y García-Sánchez, F.** (2018). Response of three citrus genotypes used as rootstocks grown under

- boron excess conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 159, 10–19.
- Singh, D. y Sharma, V.** (2013). Impact of micro-irrigation practices on farmers economy of Kullu district in Himachal Pradesh. *Prog. Hortic.* 45(2), 340–344.
- Somogyi, M.** (1952). Note on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19–23.
- Striker, G.G. y Colmer, T.D.** (2016). Flooding tolerance of forage legumes. *J. Exp. Bot.* 68, 1851–1872.
- Striker, G.G., Insausti, P. y Grimoldi, A.A.** (2007). Effects of flooding at early summer on plant water relations of *Lotus tenuis*. *Lotus Newsl.* 37, 1–7.
- Syvertsen, J.P. y García-Sánchez, F.** (2014). Response to abiotic stresses of plants of Mediterranean-type ecosystems. En: Tattini, M. y Loreto, F. (eds.). *Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in citrus*. *Environ. Exp. Bot.* 103, 128–137.
- Tanaka, M. y Fujiwara, T.** (2008). Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Plfugers Arch.* 456, 671–677.
- Tanuja, D.K., Rana y Rawat, S.S.** (2016). Effect of foliar application of zinc and boro non yield and quality of pomegranate (*Punica granatum L.*) cv. Ganesh under subtropical conditions of Garhwal Hills. *HortFlora Research Spectrum.* 5(1), 61–64.
- Tewari, S. y Mishra A.** (2018). Flooding Stress in Plants and Approaches to Overcome. *Plant Metabol. Regul. Under Environ. Stress.* 18, 355–366.
- Tewari, S., Arora, N.K. y Miransari, M.** (2016). Plant growth promoting rhizobacteria to alleviate soybean growth under abiotic and biotic stresses. En: Miransari, M. (ed.). *Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production*. Academic Press, Elsevier USA.
- Topa, M. y McLeod, K.W.** (1986). Responses of *Pinus clausa*, *Pinus serotina* and *Pinus taeda* seedlings to anaerobic solution culture. I. Changes in growth and root morphology. *Physiol. Plant.* 68(3), 523–531.
- Turan, M., Taban, N. y Taban, S.** (2009). Effect of calcium on the alleviation of boron toxicity and localization of boron and calcium in cell wall of wheat. *Notulae Botanicae Hortici Agrobotanici Cluj-Napoca.* 37(2), 99–103.
- Whang, J.Z., Tao, S.T., Qi, K.J., Wu, J., Wu, H.Q. y Zhang, S.L.** (2011). Changes in photosynthetic and antioxidative system of pear leaves to boron toxicity. *Afr. J. Biotech.* 10, 19693–19700.
- 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.
- Yordanova, R.Y. y Popova, L.P.** (2007). Flooding-induced changes in photosynthesis and oxidative status in maize plants. *Acta Physiol. Plant.* 29, 535–541.
- Yu, B., Zhao, C.Y., Li, J., Li, J.Y. y Peng, G.** (2015). Morphological, physiological, and biochemical responses of *Populus euphratica* to soil flooding. *Photosynthetica.* 53(1), 110–117.
- Zarzo, D. y Prats, D.** (2018). Desalination and energy consumption. What can we expect in the near future? *Desalination.* 427, 1–9.
- Zhang, Q., Huber, H., Beljaars, S.J., Birnbaum, D., de Best, S., de Kroon, H. y Visser, E.J.** (2017). Benefits of flooding-induced aquatic adventitious roots depend on the duration of submergence: linking plant performance to root functioning. *Ann. Bot.* 120(1), 171–180.
- Zhu, J.K.** (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6(5), 441–445

- Zhu, Z.J., Wei, G.Q., Li, J., Qian, Q.Q. y Yu, J.Q.** (2004). Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Sci.* 167, 527–533.
- Ziegler, V.H., Ploschuk, E., Weibel, A. e Insausti, P.** (2017). Short-term responses to flooding stress of three *Prunus* rootstocks. *Sci. Hortic.* 224, 135–141.

