

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

“Trabajo Final para optar al Grado de Ingeniero Agrónomo”

**EFEECTO DE LA SALINIDAD SOBRE EL CONTENIDO DE GIBERELINAS EN
UNA LEGUMINOSA HALOFITA CON TOLERANCIA DIFERENCIAL A NaCl Y
Na₂SO₄**

Román Javier Gagliano

DNI: 31.863. 919

Directora: Dra Virginia Luna

Co –Directora: Dra. Analía Llanes

Río Cuarto, Córdoba, Argentina

Junio de 2012

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE EL CONTENIDO DE GIBERELINAS EN UNA
LEGUMINOSA HALOFITA CON TOLERANCIA DIFERENCIAL A NaCl Y Na₂SO₄

Autor: Román Javier Gagliano

DNI: 31863919

Directora: Dra Virginia Luna

Co –Directora: Dra. Analía Llanes

Aprobado y corregido de acuerdo a las sugerencias del jurado evaluador:

Ing. Agr. MSc Inés Moreno

Ing. Agr. MSc Carmen Cholaky

Fecha de presentación:

Aprobado por Secretaria Académica:

Secretario Académico:

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco a mi papá, mamá y abuela Esílda que me acompañaron en esta aventura que significó la carrera y que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos. A mi hermano, abuelos y tíos que siempre estuvieron presentes.

Agradezco a la Dra. Analia Llanes por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la co-dirección de este trabajo. A la Dra Virginia Luna por el apoyo y ánimo que me brindó y a todos los que conforman el Laboratorio de Fisiología Vegetal que de una u otra manera me brindaron su confianza.

Gracias también a mi novia, compañeros y demás personas que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante estos años de carrera.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | i |
| SUMMARY | ii |
| 1-INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Fundamentación | 1 |
| 2- ANTECEDENTES GENERALES | 2 |
| 2.1. Efectos de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas | 2 |
| 2.2. Hormonas vegetales: importancia de las Giberelinas | 3 |
| 2.3. Metabolismo de las giberelinas | 4 |
| 2.4. Regulación de la ruta de giberelinas por retroalimentación | 6 |
| 2.5. Efecto de la salinidad sobre las giberelinas | 7 |
| 2.6. Mecanismos antagónicos de la interacción giberelinas y ácido abscísico | 8 |
| 2.7. <i>Prosopis strombulifera</i> , un modelo para estudiar la tolerancia a salinidad | 8 |
| 3-HIPOTESIS | 11 |
| 4-OBJETIVOS | 11 |
| 4.1. Objetivo general | 11 |
| 4.2. Objetivos específicos | 11 |
| 5- MATERIALES Y MÉTODOS | 12 |
| 5.1. Cultivo de plantas en medio hidropónico | 12 |
| 5.2. Análisis estadísticos | 14 |
| 5.3. Determinación de parámetros de crecimiento | 14 |
| 5.4. Determinación de GAs endógenas | 14 |
| 6- RESULTADOS | 16 |
| 6.1. Crecimiento de plantas en medio hidropónico | 16 |
| 6.1.1. Crecimiento de radícula | 16 |
| 6.1.2. Determinación del número de hojas | 17 |
| 6.1.3. Crecimiento parte aérea | 17 |
| 6.2. Contenido endógeno de Giberelinas activas | 18 |
| 6.2.1. Contenido de GA1 en raíces | 19 |

| | |
|---|----|
| 6.2.2. Contenido de GA1 en hojas | 19 |
| 6.2.3. Contenido de GA3 en raíces | 20 |
| 6.2.4. Contenido de GA3 en hojas | 21 |
| 6.2.5. Contenido de GA4 en raíces | 22 |
| 6.2.6. Contenido de GA4 en hojas | 23 |
| 6.2.7. Contenido de Giberelinas inactivas | 24 |
| 6.2.8. Contenido de GA8 en raíz | 24 |
| 6.2.9. Contenido de GA8 en hojas | 25 |
| 6.2.10. Contenido de GA34 en raíces | 26 |
| 6.2.11. Contenido de GA34 en hojas | 27 |
| 7- DISCUSIÓN | 29 |
| 8- CONCLUSIONES | 33 |
| 9- BIBLIOGRAFIA | 34 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema de la ruta de biosíntesis de las Giberelinas. | 6 |
| Figura 2. Esquema de la regulación por retroalimentación negativa de genes de biosíntesis y retroalimentación positiva de genes por catabolismo. | 7 |
| Figura 3. Cultivo de plantas de <i>P. strombulifera</i> en medio hidropónico | 13 |
| Figura 4. Crecimiento de radícula en plantas controles y tratadas con NaCl, Na ₂ SO ₄ y la mezcla de sales. | 16 |
| Figura 5. Numero de hojas en plantas controles y en tratadas con NaCl, Na ₂ SO ₄ y la mezcla de sales. | 17 |
| Figura 6. Crecimiento de parte aérea en plantas controles y tratadas con NaCl, Na ₂ SO ₄ y la mezcla de sales. | 18 |
| Figura 7. Contenido endógeno de GA1 en raíces de plantas controles y tratadas con NaCl, Na ₂ SO ₄ y la mezcla de sales. | 19 |
| Figura 8. Contenido endógeno de GA1 en hojas de plantas controles y tratadas con NaCl, Na ₂ SO ₄ y la mezcla de sales. | 20 |
| Figura 9. Contenido endógeno de GA3 en raíces de plantas controles y tratadas con NaCl, Na ₂ SO ₄ y la mezcla de sales. | 21 |
| Figura 10. Contenido endógeno de GA3 en hojas de plantas controles y tratadas con NaCl, Na ₂ SO ₄ y la mezcla de sales. | 22 |
| Figura 11. Contenido endógeno de GA4 en raíces de plantas controles y tratadas con NaCl, Na ₂ SO ₄ y la mezcla de sales. | 23 |
| Figura 12. Contenido endógeno de GA4 en hojas de plantas controles y tratadas con NaCl, Na ₂ SO ₄ y la mezcla de sales. | 24 |
| Figura 13. Contenido endógeno de GA8 en raíces de plantas controles y tratadas con NaCl, Na ₂ SO ₄ y la mezcla de sales. | 25 |
| Figura 14. Contenido endógeno de GA8 en hojas de plantas controles y tratadas con NaCl, Na ₂ SO ₄ y la mezcla de sales. | 26 |
| Figura 15. Contenido endógeno de GA34 en raíces de plantas controles y tratadas con NaCl, Na ₂ SO ₄ y la mezcla de sales. | 27 |
| Figura 16. Contenido endógeno de GA34 en hojas de plantas controles y tratadas con NaCl, Na ₂ SO ₄ y la mezcla de sales. | 28 |

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cronograma de pulsos salinos, cada 48 hs a partir de plántulas de 21 días de edad.

RESUMEN

Prosopis strombulifera presenta una respuesta halofítica frente a NaCl, es poco tolerante a Na₂SO₄ y las respuestas fisiológicas y bioquímicas son intermedias cuando ambas sales están presentes. La hipótesis de este trabajo fue que los niveles endógenos de GAs modulan la respuesta de tolerancia a la salinidad en *P. strombulifera*; dicha respuesta medida como crecimiento de la planta, varía según el agente salinizante. El objetivo fue confeccionar las curvas de crecimiento para esta especie y analizar los niveles endógenos de giberelinas activas (GA1, GA3 y GA4) e inactivas (GA8 y GA34) en raíces y hojas de plántulas cultivadas hidropónicamente en soluciones iso-osmóticas de NaCl, Na₂SO₄ y la mezcla de ambas sales. Los resultados mostraron un incremento en las GAs activas en hojas, coincidiendo con los bajos niveles de GA8 y GA34. En hojas y raíces de plántulas tratadas con NaCl se observó gran acumulación de GA4 a moderada salinidad (-1.88 MPa) coincidiendo con el crecimiento óptimo para esta especie. Esta tendencia se mantuvo a -2.6 MPa. Las hojas de plántulas tratadas con sulfato a -2.6 MPa registraron bajos niveles de GA4 y GA1, coincidiendo con el efecto tóxico del anión sulfato sobre el crecimiento, que se acentúa a medida que aumenta la salinidad. Las tratadas con la mezcla de sales presentaron niveles intermedios de GA4 y GA1, coincidiendo con el efecto observado de reversión parcial de la toxicidad por la mezcla de sales. La GA3 fue casi no detectable en todos los tratamientos. En raíces, las plantas tratadas con NaCl registraron mayor contenido de GA34 y GA8 (metabolismo activo), siendo menor en las tratadas con sulfato. Los resultados demuestran que GA4 es la forma activa predominante encontrada en esta especie, y el hecho de que se observaron niveles mayores de GA34 en comparación a la GA8 sugiere un rol para GA4 en la tolerancia a salinidad por NaCl.

SUMMARY

P. strombulifera presents a halophytic response to NaCl, while has less tolerant to Na₂SO₄ and physiological and biochemical responses are intermediate when both salts are present. The hypothesis of this study was that endogenous levels of GAs modulate the response of salt tolerance in *P. strombulifera*, this response was measured as plant growth which varies with the salt in the culture. The aim was to analyze growth parameters and endogenous levels of active (GA1, GA3 and GA4) and inactive gibberellins (GA8 and GA34) in roots and leaves of seedlings grown hydroponically in iso-osmotic solutions of NaCl, Na₂SO₄ and the mixture of both salts. The results showed an increase in active GAs in leaves, coinciding with low levels of GA8 and GA34. In leaves and roots of NaCl treated plants showed a great accumulation of GA4 to moderate salinity (-1.88 MPa), coinciding with the optimum growth for this species. This trend was maintained at -2.6 MPa. Leaves of sulfate treated plants to -2.6 MPa showed low levels of GA4 and GA1, coinciding with the toxic effect of sulfate anion on growth, which is accentuated with increasing salinity. Those treated with the mixture of salts showed intermediate levels of GA4 and GA1, coinciding with the observed effect of partial reversal of the mixture of salts toxicity. The GA3 was lesser detectable in all treatments. In roots of NaCl treated plants showed higher content of GA34 and GA8 (active metabolism), being lower in those treated with sulphate. Our results show that GA4 is the active form predominantly found in this species, and the fact that there were higher levels of GA34 compared to the GA8 suggests a role for GA4 in tolerance to NaCl salinity.

1-INTRODUCCION

1.1. Fundamentación

Ciertas condiciones de estrés ambiental como la sequía, elevadas temperaturas, la salinidad y el pH del suelo son los mayores factores que limitan la productividad y el rendimiento de los cultivos, debido a que afectan la mayoría de las funciones de la planta (Shao *et al.*, 2007). Especialmente la salinidad es un problema en aumento que afecta el 20% de la superficie mundial cultivada y casi la mitad del área bajo irrigación, al punto que el mejoramiento genético de las plantas para tolerancia a salinidad se ha convertido en una necesidad urgente para el futuro de la agricultura en las regiones áridas y semiáridas (Flowers, 2006).

La salinidad puede producirse por causas naturales como la descomposición de la roca madre del suelo, el insuficiente drenaje, la superficialidad de las capas de agua subterráneas o como resultado de la actividad humana, a través de la explotación de zonas petroleras, el excesivo uso de fertilizantes químicos, plaguicidas, agua para riego de mala calidad, entre otros. Por lo tanto la salinidad ocasiona la pérdida de las propiedades físicas y químicas de los suelos, como así también pérdidas económicas ocasionando una disminución en el rendimiento de los cultivos (Cisneros *et al.*, 1997; Lavado, 2008).

Las sales en el suelo pueden encontrarse de varias formas: precipitadas bajo la forma de cristales, disueltas en la solución, o bien retenidas, adsorbidas en el complejo de intercambio. El contenido en sales en cualquiera de estas tres situaciones cambia continuamente al ir cambiando la humedad edáfica, pasando las sales de una posición a otra. Así, en el período seco, la cristalización aumenta, las sales en solución disminuyen (aunque la solución se concentra) y aumentan las adsorbidas, mientras que, en el período húmedo, el comportamiento es inverso (Manchanda y Garg, 2008). La sal más frecuente en los suelos salinos es el cloruro sódico, junto con los sulfatos sódico y magnésico. El sulfato sódico es muy frecuente en los suelos salinos y, debido a que su solubilidad se ve afectada fuertemente por la temperatura, se tiende a concentrar en la superficie, ya que durante el período cálido asciende a la superficie formando parte de las eflorescencias (rasgo muy típico de los suelos salinos). Los mantos freáticos siempre contienen sales disueltas en mayor o menor proporción y en las regiones áridas estas sales ascienden a través del suelo por capilaridad.

En general, la existencia de mantos freáticos superficiales ocurre en las depresiones y tierras bajas, y de aquí la relación entre la salinidad y la topografía (Rengasamy, 2006).

En la República Argentina existen aproximadamente 34.000.000 hectáreas sometidas a excesos de agua y sales (incluyendo solo los ambientes húmedos y las áreas bajo riego), creándose condiciones ecológicas extremas que reducen drásticamente su productividad debido a un alto dinamismo espacial y temporal dado por factores climáticos, edáficos y de manejo. Se considera que Argentina ocupa el tercer lugar luego de Rusia y Australia, en suelos afectados por salinidad (Lavado, 2008). Esta condición afecta particularmente a las zonas áridas y semiáridas, pero no de manera exclusiva ya que existen suelos afectados por salinidad también en ambientes húmedos.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1. Efectos de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas

Los efectos del estrés salino en las plantas ocasionan problemas de germinación, inhibición del crecimiento vegetal y disminución en la producción de granos. La tolerancia a la salinidad es un fenómeno complejo. Los estudios de las interacciones fisiológicas, bioquímicas y metabólicas indicaron que las respuestas de las especies vegetales al estrés salino varían con la concentración de sal, el tipo de sal presente, la longitud del periodo de exposición, las variedades o cultivares y la etapa del crecimiento y desarrollo (Munns y Tester 2008). La salinidad impone a las plantas restricciones hídricas por el descenso del potencial hídrico del suelo (efecto osmótico) y también efectos derivados del exceso de iones en sí, ya sea por la acumulación de iones potencialmente dañinos para el crecimiento y desarrollo o por desbalances nutricionales causados por las concentraciones elevadas de algunos iones (principalmente sodios, cloruros y sulfatos). Los dos componentes del estrés salino, efecto osmótico y toxicidad iónica tienen sus efectos deletéreos a nivel celular. Según Munns *et al.*, (1995), en las plantas cultivadas hay una primera fase de reducción del crecimiento causada por el potencial osmótico de la solución del suelo que rodea a las raíces, que disminuye la disponibilidad de agua por las mismas y en consecuencia afectaría a todas las especies de manera similar. Una segunda fase comienza cuando las hojas han acumulado

sal en cantidades que resultan tóxicas, provocando daño metabólico y reduciendo así el aporte de asimilados a las zonas de crecimiento.

La tolerancia al estrés salino puede definirse como la habilidad inherente que poseen las plantas de resistir los efectos de las elevadas concentraciones de sales en las raíces o en las hojas sin un efecto significativo (Shannon y Grieve, 1999). Teniendo en cuenta este concepto, las plantas pueden clasificarse de acuerdo a su sensibilidad en glicófitas y halófitas. Las plantas halófitas pueden completar su ciclo de vida bajo las condiciones salinas más variadas, no solo tolerando altos niveles de salinidad, sino presentando niveles óptimos de crecimiento bajo estas condiciones (Khan y Ungar, 2000). Los trabajos sobre este tipo de plantas sentaron las bases para la comprensión de los mecanismos que contribuyen a su tolerancia a la salinidad y establecieron la noción de que tales mecanismos son comunes para plantas halófitas y glicófitas (Munns y Tester 2008). Los mecanismos bioquímicos y moleculares para enfrentar el estrés salino incluyen la producción de solutos compatibles, para aumentar la presión osmótica del citoplasma (los cuales pueden acumularse en altos niveles sin perjudicar la bioquímica celular), la exclusión o secreción de Na^+ de las células o de los tejidos para mantener las concentraciones iónicas internas bajas, o la compartimentalización celular de los iones. Las plantas tolerantes tienen la capacidad de acumular iones Na^+ Cl^- en las vacuolas para mantener en el citoplasma concentraciones sustancialmente muy bajas de iones que evitan así la inhibición de procesos metabólicos (Blumwall *et al.*, 2000; Parks *et al.*, 2005). También se producen cambios en los patrones fotosintéticos (Bayuelo-Jimenez *et al.*, 2003), alteraciones en la estructura de las membranas (Singh *et al.*, 2002) y un efecto inhibitorio sobre el crecimiento a varios niveles involucrando gran cantidad de procesos celulares tales como la división y expansión celular. Estos procesos celulares son regulados por hormonas manteniendo la homeostasis cuando es alterada por salinidad. Sin embargo, las plantas son capaces de percibir la salinidad y responder con diversas estrategias para poder sobrevivir. En este sentido, existen varios trabajos que demuestran que los niveles endógenos de los hormonas vegetales, principalmente aquellas que son reguladores del crecimiento, como las giberelinas, producen un efecto benéfico aliviando los efectos adversos del estrés salino (Xiong y Zhu, 2002; Rodríguez *et al.*, 2006).

2.2. Hormonas vegetales: importancia de las giberelinas

Las hormonas vegetales controlan una gran cantidad de respuestas afectando el crecimiento y desarrollo de las plantas a distintas condiciones ambientales (Yu *et al.*, 2004). Estos compuestos pueden interactuar en caminos complementarios o antagónicos para otorgar protección frente a un estrés biótico o abiótico (Cosgrove *et al.*, 2000). Frente a salinidad, se afecta la productividad de las plantas reduciendo el área fotosintética por inhibición de la división y expansión celular durante el crecimiento de la hoja, y afectando los programas de desarrollo: emergencia de hojas, producción de primordios laterales y formación de órganos reproductivos. Sin embargo, los mecanismos que regulan el crecimiento de las hojas y el desarrollo del vástago bajo la fase osmótica de la salinidad aún no son conocidos. Se ha hipotetizado que la inhibición del crecimiento foliar podría ser regulado por hormonas o sus precursores, ya que la reducción en la tasa de crecimiento de la hoja es independiente del suplemento de carbohidratos, el estado hídrico, la deficiencia de nutrientes, y la toxicidad iónica. Debido a que los meristemas vegetales son tejidos de crecimiento activo donde predomina la división celular, las señales ambientales pueden modular las respuestas al crecimiento desde cambios en el nivel de fitohormonas y así controlar el particionamiento entre diferentes tejidos (fuente y destino) (Hartig y Beck, 2006). Los cambios hormonales no solo influyen las respuestas adaptativas sino también afectan el crecimiento normal de todos los órganos y así la productividad económica. Por lo tanto, las fitohormonas son consideradas un componente primario de los caminos de señalización controlando estos procesos. De esta manera, la plasticidad integrada en el desarrollo de las plantas probablemente involucra la comunicación a larga distancia entre diferentes órganos y diferentes cambios en los niveles hormonales del vástago y raíz, teniendo las fitohormonas como las giberelinas y ácido abscísico (ABA) un papel esencial (Sachs, 2005, Albacete *et al.*, 2008).

2.3. Metabolismo de las giberelinas

Las Giberelinas (GAs) son compuestos naturales que actúan como reguladores endógenos del crecimiento y controlan diversos aspectos del desarrollo como la germinación, la expansión de las hojas, la elongación del tallo y raíz, el desarrollo de la flor y del fruto y el tiempo de floración (Swain y Singh, 2005). El metabolismo de las GAs ha

sido estudiado en profundidad y está bien caracterizado (Sponcel y Hedden, 2004). La biosíntesis de GAs se inicia con la formación de Kaureno y finaliza mediante reacciones sucesivas de oxidación, con la interconversión de las distintas GAs. La biosíntesis se puede dividir en tres partes:

1. Desde geranylgeranildifosfato a ent-kaureno por medio de dos diterpenos sintasas, copalil difosfato sintasa (CPS) y ent-kaureno sintasa (KS), enzimas que catalizan la ciclación y se localizan en los proplastidios de los tejidos meristemáticos de los brotes.
2. De ent-kaureno a GA₁₂-aldehído por medio de dos monooxigenasas dependientes de citocromo P450, ent-kaureno oxidasa (KO) y ácido ent-kaurenoico oxidase (KAO), enzimas (proteínas microsomales) ligadas a las membranas del retículo endoplasmico que catalizan la conversión de ent-kaureno en GA₁₂ y GA₅₃.
3. Desde GA₁₂ y GA₅₃ en diferentes GAs a través de procesos oxidativos catalizados por dioxigenasas solubles localizadas en el citoplasma y con requerimientos de 2-oxoglutarato, cosustratos y cofactores.

A pesar de ser más de 100 el número hallado en plantas, solo unas pocas son las que demuestran actividad biológica. Las GA₁₉ que portan un grupo hidroxilo en la posición 3β, como GA₁, GA₄, GA₃ y GA₇ exhiben la actividad biológica más elevada. Las formas activas de GAs no se encuentran en todos los órganos de su síntesis. Distintos intermediarios se trasladan por el floema, distribuyéndose a varios órganos de destino donde se completa la conversión a su forma activa. El fotoperiodo de día largo y las condiciones de bajas temperaturas son determinantes en la conversión de intermediarios de GAs inactivas a moléculas activas. Existen interacciones entre la síntesis y degradación de GAs con otras hormonas como auxinas (AIA). De esta manera, la presencia de AIA estimula la síntesis de GA₁ provocando el consiguiente crecimiento. Por otro lado, las auxinas además pueden inhibir la degradación de GA₁ a GA₈ (inactiva) para poder mantener la acción de GA₁ estimulando respuestas de crecimiento (Thomas *et al.*, 1999).

El ent-kaureno es oxidado a ent-kaurenol, ent-kaurenol y ácido ent-kaurenico por la KO, a continuación, al ácido ent-kaurenico es oxidado a ácido ent-7α-hidroxicaurénico, el cual por una contracción del anillo B produce GA₁₂, últimos 3 pasos catalizados por la KAO (Olszewski *et al.*, 2002). La tercera parte de la vía de biosíntesis de las GAs ocurre en el citoplasma de las células y es catalizada, en su mayor parte, por dioxigenasas dependientes

de 2-cetoglutarato y Fe^{+2} (Yamaguchi, 2008). El proceso metabólico luego de la formación de GA_{12} puede variar según la especie, e incluso puede ser diferente entre los tejidos de una misma planta (ver Figura 1).

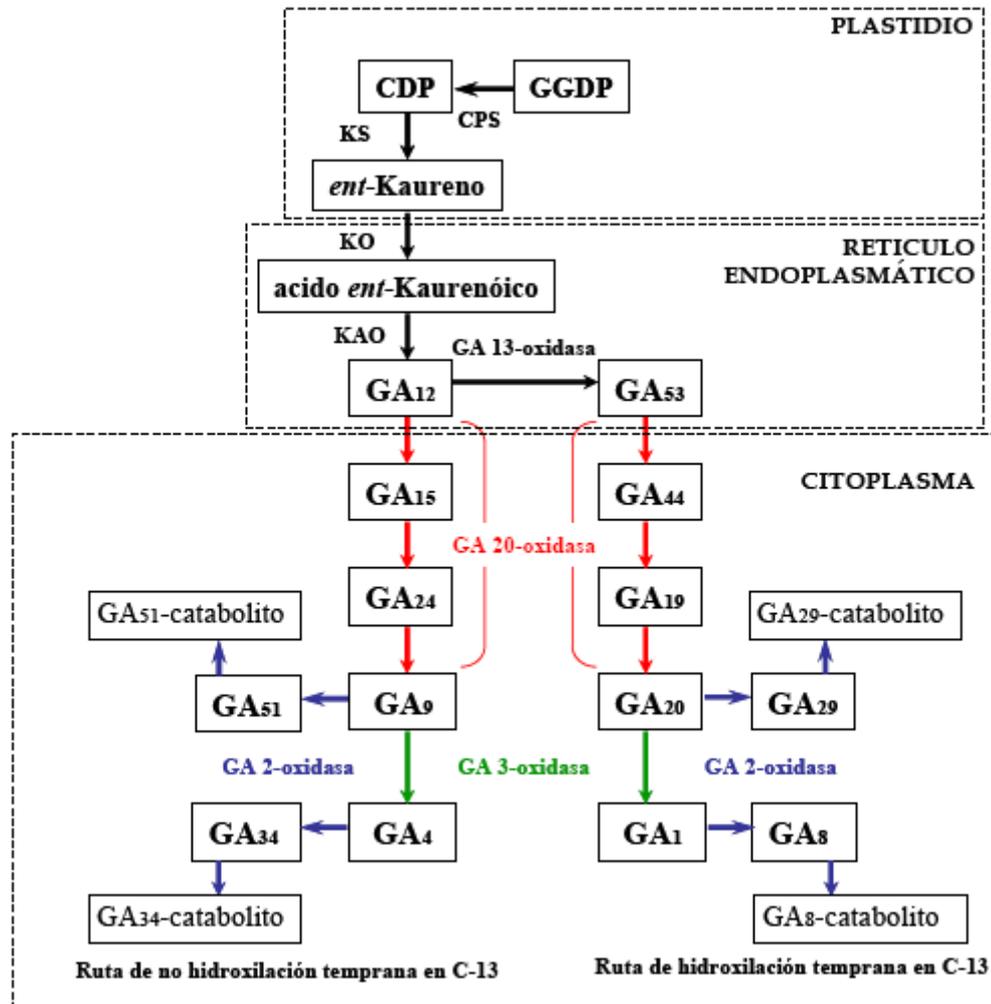


Figura 1: Esquema de la ruta de biosíntesis de las Giberelinas (Adaptado de Sponcel y Hedden, 2004).

2.4 Regulación de la ruta de biosíntesis de giberelinas por retroalimentación

Las GAs activas ejercen a través de su modo de acción un mecanismo de regulación sobre la biosíntesis de GAs, de manera que la síntesis de novo y el catabolismo de éstas, están controlados por los niveles endógenos de las GAs activas en la planta (Elliott *et al.*,

2001; Israelsson *et al.*, 2004). La regulación transcripcional de los genes implicados en el metabolismo de las GAs tiene lugar mediante un mecanismo de retroalimentación negativa en el caso de los genes biosintéticos (GA20oxidasa y GA3oxidasa), o positiva en el caso de los genes catabólicos (GA2oxidasa). Este mecanismo está inducido por la respuesta a las GAs activas (Yamaguchi y Kamiya, 2000), proporcionando de este modo a las plantas un control homeostático de sus niveles endógenos de GAs activas. Estos resultados, ponen de manifiesto la regulación transcripcional de la mayoría de los genes del metabolismo de GAs, mediante un mecanismo de retroalimentación que originan los niveles endógenos de GAs activas (ver Figura 2) (Phillips *et al.*, 1995; Yamaguchi y Kamiya, 2000). Para controlar los niveles de GAs activas en las plantas, este tipo de regulación transcripcional de las dioxigenasas es importante, pues la sobreexpresión de estos genes produce una alteración en los niveles de GAs activas en las plantas transgénicas (Hedden y Phillips, 2000). En plantas deficientes en GA (*gib-1* de tomate) o en plantas silvestres tratadas con inhibidores de la biosíntesis de GAs, las bajas concentraciones de GAs son la razón del aumento de los niveles de transcritos del gen GA20oxidasa; dichos niveles disminuyen con la aplicación de GA exógena (Martin *et al.*, 1996, Toyomasu, 1997).

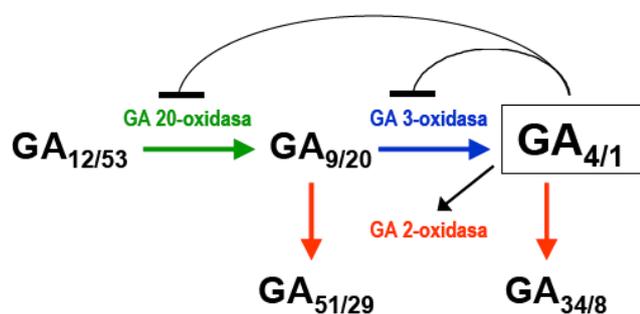


Figura 2: Esquema de la regulación por retroalimentación negativa de genes de biosíntesis (GA 20-oxidasa, GA 3-oxidasa) y retroalimentación positiva de genes de catabolismo (GA 2-oxidasa) de GAs (Adaptado de Yamaguchi y Kamiya, 2000)

2.5 Efecto de la salinidad sobre las giberelinas

Existen numerosos trabajos que confirman el potencial de GAs para estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones normales, sin embargo, pocos trabajos muestran el rol que cumplen las GAs frente a salinidad. En este sentido, Chakraborti y

Mukherji (2003) demostraron que pretratamientos con giberelinas (GA3) en hojas de *Vigna radiata* aliviaron los efectos adversos del estrés por NaCl. Las GAs pueden aliviar el efecto de la sal sobre el contenido de pigmentos y en la eficiencia en el uso del agua (Aldesuquy y Ibrahim, 2001). Por otro lado, se estudió el efecto de la aplicación de GA3 (10-5 M) en plantas de *Brassica junca* sobre los efectos del estrés salino en el crecimiento, y la aplicación de esta hormona mitigó los efectos adversos de la salinidad (Shah, 2007). Sin embargo, otros investigadores sugieren un incremento de la protección contra el estrés en plantas de cebada inhibiendo la síntesis de GAs mediante Paclobutrazol (Bottini *et al.*, 2004). Por lo tanto, el rol de la acción de GAs aún no es claro y se observa que numerosas interacciones funcionales positivas y negativas con otras hormonas endógenas y señales ambientales afectan las respuestas de las GAs. Numerosos genes son afectados tanto por los niveles de las giberelinas como por su interacción con otras hormonas, lo que sugiere la existencia de mecanismos complejos entre las diferentes vías de señalización aun no descubiertos (Nemhauser *et al.*, 2006).

2.6 Mecanismos antagónicos de la interacción giberelinas y ácido abscísico

Las fitohormonas GAs y ABA juegan un papel antagónico en la regulación de numerosos procesos del desarrollo. Mientras las giberelinas se asocian con la promoción de la germinación, el crecimiento y la floración, ABA inhibe estos procesos. La relación entre estas dos hormonas regula la transición de la embriogénesis en la germinación de las semillas (Hedden, 1997). Durante la germinación de semillas de cereales, el embrión en desarrollo libera GAs a las células de la aleurona, que inducen la transcripción de varios genes que codifican enzimas hidrolíticas, incluyendo la α -amilasa. Estas enzimas hidrolizan el almidón y las proteínas del endosperma y suministran los nutrientes necesarios para el desarrollo del embrión. Por el contrario, ABA inhibe la transcripción de la α -amilasa en la capa de aleurona de semillas de cereales. El promotor de la α -amilasa contiene un elemento de respuesta a las GAs, necesario tanto para su activación por las GAs y la represión por ABA (Rogers y Rogers, 1992). Por otro lado, en plántulas de *Arabidopsis*, las GAs promueven el crecimiento de la raíz mientras que el ABA lo suprime, y ambos efectos parecen estar mediados por las proteínas DELLA, las cuales son componentes clave de la ruta de señalización de las GAs. (Achard *et al.*, 2004; Reyes y Chua, 2007). Sin embargo, el rol de ABA y GAs en el crecimiento de plántulas frente a condiciones adversas aún no están claras.

2.7 *Prosopis strobilifera*, un modelo para estudiar la tolerancia a salinidad

En nuestro país existen poblaciones de leguminosas exitosamente adaptadas a ambientes salinos y diferenciadas evolutivamente en su estrategia de tolerancia a la sal. En ciertas regiones áridas pueden encontrarse algunos miembros de la subfamilia Mimosoidea como el género *Prosopis*, dentro del cual existen muchas especies que son importantes como componentes arbustivos de zonas salinas en América (Burkart, 1976).

El área de distribución del género *Prosopis* es muy amplia, principalmente en zonas áridas y semiáridas del mundo, existiendo 44 especies ubicadas principalmente en América del Sur. Dentro del género existen variados tipos biológicos, es decir, subarbustos, arbustos y árboles que en su gran mayoría se comportan como oportunistas respecto del uso del agua, manteniendo pulsos de crecimiento en momentos de disponibilidad hídrica y entrando en receso vegetativo durante las etapas de sequía (Passera, 2000). Las especies de este género también exhiben un alto grado de tolerancia a la salinidad, ubicándose entre las especies del ambiente terrestre más resistentes a concentraciones salinas extremas (Arce y Balboa, 1998). Por esto se pueden encontrar múltiples adaptaciones morfológicas en ellas que les confieren características especiales para poder vivir en estos ambientes, como el ajuste osmótico, engrosamiento de cutículas y existencia de células epidérmicas de gran volumen para evitar la pérdida de agua.

La especie subarborescente *Prosopis strobilifera* (Lam) Benth se distribuye desde el desierto de Arizona (USA) hasta la Patagonia (Argentina), zonas donde debe tolerar prolongados periodos de sequía, siendo muy abundante en las áreas salinas de Córdoba y San Luis (Cantero *et al.*, 1996). Es un subarborescente de base leñosa y altura variable (50 cm a 1.5 m), tallos flexuosos con estipulas leñosas espinosas, divergentes y rectas, hojas uni-yungas, pinas con foliolos alternos algo distanciados, con 3 o más foliolos de cada lado de la pina. Las flores amarillas conforman un capítulo globoso, con fruto amarillo formando un espiral simple, denso y cerrado. Esta especie es xerofita y halófila, se propaga vegetativamente por largos rizomas leñosos. De la Vega (1996) informó que esta especie era capaz de sobrevivir en cultivos hidropónicos con 1M de NaCl, observándose tanto a nivel de raíz como de hoja cambios metabólicos (enzimáticos) que acompañan la adaptación de esta especie a concentraciones cada vez más altas de sal.

Teniendo en cuenta la distribución de la especie subarabustiva *Prosopis strombulifera* en zonas donde debe tolerar prolongados períodos de sequía y su abundancia en las áreas salinas de Córdoba y San Luis, donde las proporciones de NaCl y Na₂SO₄ son semejantes. Por lo tanto, en el laboratorio de Fisiología Vegetal, de la Universidad Nacional de Río Cuarto, se comenzó a investigar tomando a esta especie como un nuevo modelo de planta tolerante a salinidad. Esta especie permitirá ampliar el conocimiento de los mecanismos de respuesta a salinidad que operan en modelos ya existentes como *Arabidopsis thaliana* y *Thellungiella halophila*. Estos estudios también podrían llevar a la identificación de nuevos mecanismos de tolerancia no conocidos en glicófitas.

Investigaciones realizadas con *Prosopis strombulifera* han revelado la estimulación de todos los parámetros de crecimiento de plántulas hasta un Ψ_0 de -1.9 MPa (500 mM) con NaCl, lo que indica que esta especie es una euhalófito (para esta sal), dato no informado previamente en la bibliografía (Sosa, 2005). Anatómicamente, las raíces de plantas tratadas presentaron un desarrollo precoz de la endodermis (típico de una planta exclusora) y un parénquima cortical altamente vacuolizado, (Reinoso *et al.*, 2004). Esta especie no es tolerante a Na₂SO₄ ya que el crecimiento general de la planta se vio fuertemente afectado, encontrándose una precoz acumulación de cloruros en hojas por fallas en el mecanismo de exclusión a nivel de raíz (Reginato, 2009). En las hojas, a partir de un potencial de $-1,9$ MPa se observa una mayor vacuolización en el parénquima en empalizada, especialmente el dispuesto en la cara abaxial, donde se acumularía la gran cantidad de cloruros encontrada en estos órganos.

En relación al ABA, los niveles variaron según el tipo de sal y su concentración, si bien la mayor acumulación se registró en plantas controles. La disminución en el nivel de ABA a -1.8 MPa en todas las raíces salinizadas podría relacionarse con el hecho de que esa concentración de sal no implica estrés para la planta, principalmente en las tratadas con NaCl, en las que se observaron valores máximos de crecimiento (respuesta halofítica). En presencia de sulfato, las hojas presentaron creciente contenido de ABA coincidiendo con síntomas de toxicidad. En todos los tratamientos, las raíces y hojas acumularon principalmente el conjugado de ABA y glucosa (ABA-glucosilester: ABA-GE). También se observaron bajos niveles de los hidroxilados de ABA, como el ácido dihidrofaseico (DPA) y el ácido faseico (PA) no fue detectado en la mayoría de los casos. Es destacable la elevada acumulación de ABA-GE en raíces y hojas sometidas a altas concentraciones de sal (700 mM, $\Psi_0 = -2.6$ MPa), principalmente con sulfato, confirmando que ABA-GE sería la forma de transporte de ABA hacia las hojas donde se registraron los mayores niveles de ABA libre (Llanes, 2010).

La breve reseña de antecedentes expuesta en los párrafos anteriores en relación al rol de las GAs como reguladores del crecimiento en situaciones de salinidad, y teniendo en cuenta las características anatómicas y fisiológicas de *P. strombulifera*, pone de manifiesto cuánto queda aún por dilucidar para llegar a comprender la regulación de este tipo de respuestas.

3-HIPOTESIS

Los niveles endógenos de GAs modulan la respuesta de tolerancia a la salinidad en *P. strombulifera*; dicha respuesta medida como crecimiento de la planta, varía según el agente salinizante.

Para probar esta hipótesis se realizará un cultivo hidropónico utilizando diferentes concentraciones de las sales mayoritarias del suelo (NaCl y Na₂SO₄, y su mezcla iso-osmótica) y se evaluará el crecimiento de las plantas y los niveles de las giberelinas activas y sus metabolitos comparándolos con plantas creciendo en Hoagland (controles).

4-OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Profundizar el estudio de los mecanismos de tolerancia a la salinidad que operan en halófitas.

4.2. Objetivos específicos

1) Confeccionar la curva de crecimiento de las plantas de *P. strombulifera* sometidas a concentraciones crecientes de las siguientes sales: NaCl, Na₂SO₄, de su mezcla iso-osmótica

(NaCl +Na₂SO₄), comparándola con una situación testigo o control (solución nutritiva de Hoagland, sin sal).

2) Determinar los niveles endógenos de GAs biológicamente activas (GA1, GA3 y GA4, GA34 y GA8) en raíces y hojas de plántulas controles y tratadas con concentraciones crecientes de NaCl, Na₂SO₄ y su mezcla iso-osmótica respecto a la situación testigo o control.

3) Identificar correlaciones entre los parámetros de crecimiento y los niveles endógenos de GAs en las respuestas al efecto de las diferentes sales utilizadas en este trabajo.

5- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivo de plantas en medio hidropónico

Frutos de *Prosopis strombulifera* fueron recolectados de las salinas de San Luis, cuya localización geográfica es 33 43' latitud sur y 66 37' longitud oeste, a 400-500 m.s.n., con una temperatura media anual de 15-20 °C. El área pertenece al bosque de algarrobos situado en una depresión salina, en la región fitogeográfica del El Monte, con un régimen anual de lluvias de 300 a 400 milímetros. El suelo posee una textura franco-arenosa, con abundante material calcáreo y moderada salinidad con una conductividad eléctrica en superficie de 8 dS/m (Sosa, 2005).

Los frutos fueron recogidos al azar a partir de 100 plantas dentro de la misma población. Las semillas fueron seleccionadas visualmente para el tamaño uniforme y el aspecto sano y se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado durante 12 min, se lavaron durante 12 hs en agua corriente y se colocaron a germinar en estufa a 37°C durante 24 hs. Cuando las radículas tuvieron aproximadamente 1,5 mm de longitud se colocaron en bandejas plásticas, colocando 300 plantas en cada una en un volumen de 4 litros de solución hidropónica. Para la hidroponía se preparó una solución de Hoagland al 10% y al cabo de una semana se aumentó la concentración al 25%.

Cuando las plántulas alcanzaron los 21 días de edad, se comenzó con los tratamientos que consistieron en el agregado de 38 mM de Na₂SO₄ y 50 mM de NaCl para los tratamientos monosalinos y la mezcla isoosmótica de ambas sales para el tratamiento bisalino cada 48 hs, dejando como controles plántulas que permanecieron en Hoagland 25% durante todo el experimento (ver Tabla 1). Las bandejas se mantuvieron en una cámara de crecimiento Fitotrón Conviron Modelo E15 con 16 hs de luz a 250 μmol. m⁻² seg⁻¹ y 8 hs de oscuridad, a 28° y 20° C de temperatura respectivamente y 70% de humedad relativa (ver Figura 3). Los pulsos de sal fueron aditivos hasta obtener un potencial final de -2.6 MPa el cual corresponde a una concentración de 700 mM de NaCl y 530 mM de Na₂SO₄. Después de 24 hs de alcanzarse los potenciales de -1, -1.88 y -2.6 MPa (36, 57 y 71 días desde el inicio del experimento), se tomaron muestras de hojas y raíces para los análisis posteriores, congelándolas en nitrógeno líquido y conservándolas en freezer a -80 °C hasta su uso. Para las determinaciones de giberelinas el material vegetal fue liofilizado durante 48 hs.

| DIAS DE PULSO | mM de Na ₂ SO ₄ | mM de NaCl | mM de Na ₂ SO ₄ / NaCl | Pot. Osmótico (MPa) |
|-----------------------------------|---------------------------------------|------------|--|---------------------|
| Primer pulso | 37,9 | 50 | 18,95/25 | -0,3 |
| Segundo pulso | 75,8 | 100 | 37,9/50 | -0,47 |
| Tercer pulso | 113,7 | 150 | 56,8/75 | -0,65 |
| Cuarto pulso | 151,7 | 200 | 75,85/100 | -0,82 |
| Quinto pulso (recoleccion) | 189,7 | 250 | 94,8/125 | -1 |
| Sexto pulso | 227,5 | 300 | 113,75/150 | -1,18 |
| Septimo pulso | 265,4 | 350 | 132,7/175 | -1,35 |
| Octavo pulso | 303,3 | 400 | 151,7/200 | -1,53 |
| Noveno pulso | 341,2 | 450 | 170,6/225 | -1,71 |
| Décimo pulso (recoleccion) | 379,2 | 500 | 189,6/250 | -1,88 |
| Décimo primer pulso | 417,1 | 550 | 208,5/275 | -2,06 |
| Décimo segundo pulso | 455 | 600 | 227,5/300 | -2,24 |
| Décimo tercer pulso | 492,9 | 650 | 246,4/325 | -2,42 |
| Décimo cuarto pulso (recoleccion) | 530,8 | 700 | 265,4/350 | -2,6 |

Tabla 1: Cronograma de pulsos salinos, cada 48 h a partir de plántulas de 21 días de edad.

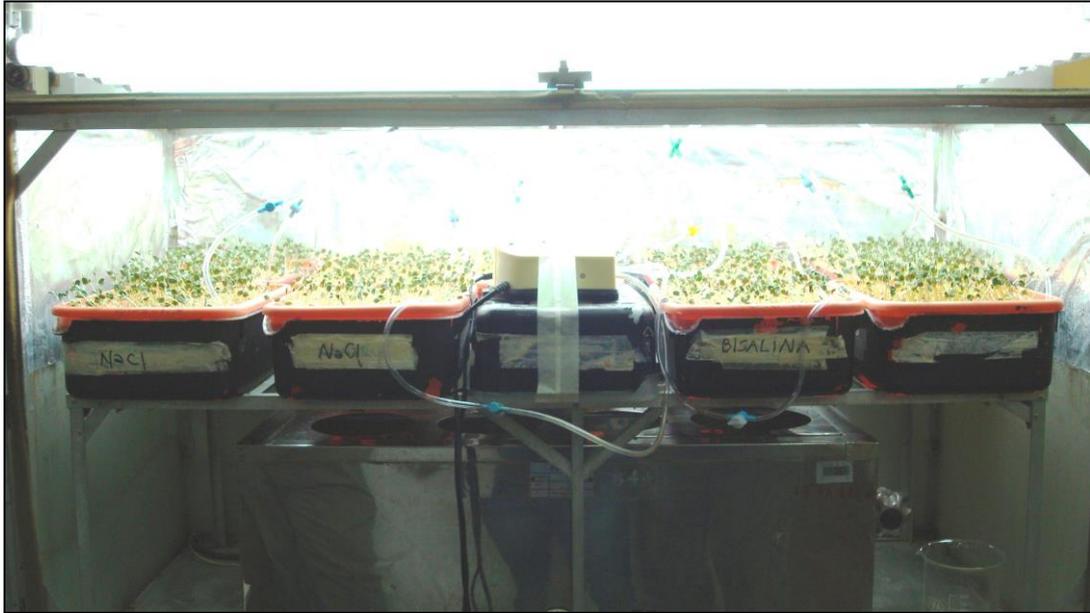


Figura 3: Cultivo de plantas de *P. strombulifera* en medio hidropónico.

Los cultivos hidropónicos se realizaron por triplicado, y cada uno de los estudios bioquímicos que se describen a continuación se realizó con tres muestras de material proveniente de cada uno de los cultivos.

5.2 Análisis estadísticos

El diseño para esta experiencia es un arreglo factorial sobre un diseño completo al azar. Para los parámetros de crecimiento se tomaron 30 datos por tratamientos, es decir, la combinación de los niveles de los tres factores: cuatro potenciales (-0,3, -1, -1,9 y -2,6), cuatro tipos de soluciones, en cuatro tiempos de cultivo. Para la determinación de giberelinas se tomaron tres datos por tratamiento, la combinación de los niveles de los tres factores: potenciales (-1, -1,9 y -2,6), cuatro tipo de soluciones en tres tiempos de cultivo.

Los datos correspondientes a las determinaciones de giberelinas (GA1, GA3, GA4, GA8 y GA34) y los parámetros de crecimiento (longitud de raíz, longitud para aérea y numero de hojas) que se presentan a continuación fueron analizados utilizando el programa InfoStat (v 2011). Para cada variable se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y los datos fueron sometidos a un análisis a posteriori, para lo cual se utilizó la prueba de

comparaciones múltiples de Tuckey. Las diferencias significativas fueron consideradas por el valor $p < 0,05$.

5.3. Determinación de parámetros de crecimiento

Para medir el crecimiento se eligieron al azar 30 plantas de los controles y de cada uno de los tratamientos con las sales, las que se continuaron midiendo hasta el final del experimento. Se midieron a los 22, 29, 40 y 48 días de cultivo registrándose altura total de tallos, número de hojas y longitud total de raíces. Se calculó el promedio de las mediciones, con sus desvíos y se graficaron.

5.4. Determinación de GAs endógenas

El equivalente a 100 microgramos de peso seco de material vegetal, raíces y hojas, fue homogeneizado con N_2 líquido y se le colocaron 5 ml de buffer de extracción a pH 2.8-3. Como estándar interno se agregó 50 ng de GA1, GA4, GA3, GA34 y GA8 deuterados (L. Mander, Camberra, Australia). Se dejó equilibrar 30 minutos en oscuridad a 4°C. Luego de centrifugar y transferir el sobrenadante a otro tubo, se agregó igual cantidad de acetato de etilo y se sometió a evaporación total de la fase orgánica. Esta fase se retomó con MeOH (100%) y se purificó mediante filtros. Se recolectó en eppendorf y se llevó a sequedad total. Los extractos se retomaron con 100 μ l de MeHO (100%), se colocaron en viales específicos conteniendo insertos de 150 μ l de capacidad, inyectando en el equipo una alícuota de 10 μ l de cada muestra. Las corridas cromatográficas fueron realizadas en un cromatógrafo líquido LC Alliance (Waters 2695) con autoinyección y detector de UV, acoplado a un espectrómetro de masas tándem (MS-MS) Micromass Quattro Ultima Pt, monitoreado mediante el Software MassLynx V4.1. Finalmente los datos fueron expresados como valores en nanogramos (ng) del compuesto, en gramos (g) de peso seco (PS) de la muestra obtenidos en 3 experimentos independientes en los que se utilizaron ambas sales.

6-RESULTADOS

6.1. Crecimiento de plantas en medio hidropónico

6.1.1. Crecimiento de radícula

Al inicio de los pulsos salinos (22 días de cultivo) las plantas tratadas presentaban una longitud de raíz similar a la de los controles. Tras aumentar la concentración de sales el crecimiento de la radícula en plantas tratadas con NaCl fue levemente mayor en comparación a lo observado en los otros tratamientos. Es importante destacar que las plántulas tratadas con Na_2SO_4 no manifestaron un marcado desarrollo durante los primeros pulsos de sal, pero se observó una estimulación de crecimiento después de -1,9 MPa, alcanzando valores similares a los registrados en plantas tratadas con NaCl. No se detectaron diferencias significativas entre la longitud de las raíces en plántulas creciendo en la mezcla de sales y las plántulas controles. En forma general, se observó un crecimiento lento hasta los -1MPa en los tratamientos de Na_2SO_4 , la mezcla de sales y los controles, que luego aumentó levemente, mientras que frente al tratamiento con NaCl el crecimiento fue en aumento desde inicios de la experiencia (ver Figura 4)

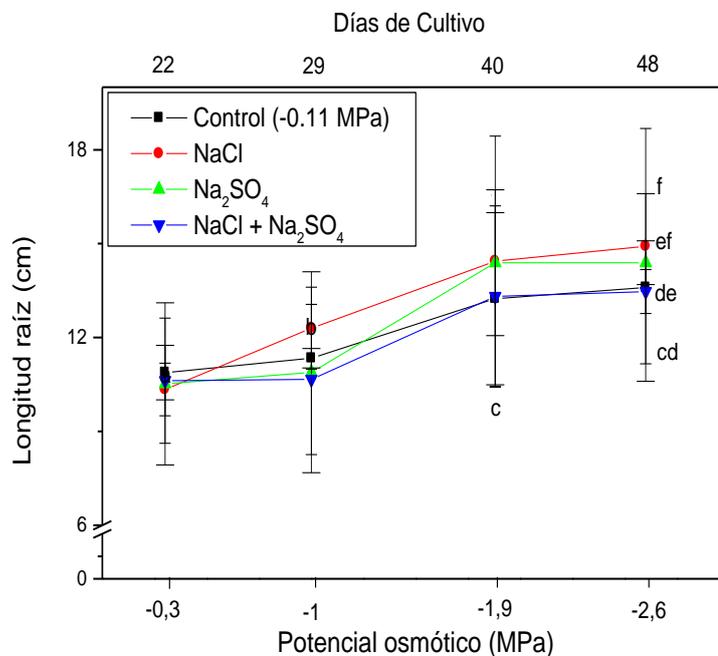


Figura 4: Crecimiento de radícula en plántulas controles (Ψ_o : 0,11 MPa) y tratadas con NaCl, Na_2SO_4 y la mezcla de sales. Los puntos corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.1.2. Determinación del número de hojas

En relación al número de hojas no se observaron diferencias significativas entre las plántulas tratadas y los controles hasta los 40 días de cultivo. Sin embargo, es destacable que a partir de los 29 días de cultivo se registró un marcado incremento en el número de hojas en todos los tratamientos. A -2.6 MPa se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo las plantas tratadas con Na_2SO_4 las que presentaron el menor número de hojas, seguido por el tratamiento con NaCl y la mezcla de sales (ver Figura 5).

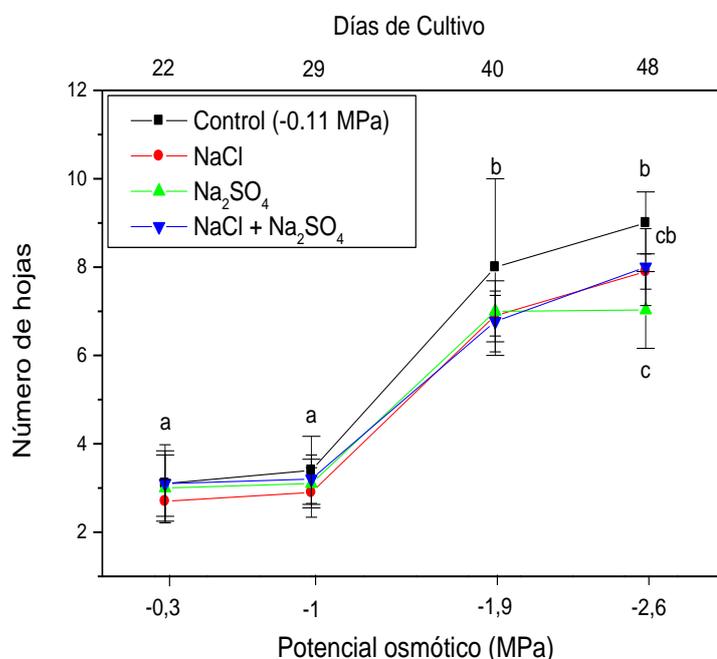


Figura 5: Número de hojas en plantas controles (Ψ_o : 0,11 MPa) y tratadas con NaCl, Na_2SO_4 y la mezcla de sales. Los puntos corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.1.3. Crecimiento parte aérea

En la figura 6 se observa que la longitud de la parte aérea no se modificó por los tratamientos salinos a bajos potenciales (-0.3 y -1 MPa), mientras que a partir de -1.9 MPa comenzaron a observarse diferencias entre los tratamientos. Las plántulas tratadas con

Na₂SO₄ y la mezcla de sales presentaron el menor crecimiento de la parte aérea, siendo las plántulas tratadas con NaCl las que registraron el mayor crecimiento sin detectarse diferencias significativas con los controles. Esta tendencia se mantiene a -2.6 MPa, siendo las plántulas tratadas con Na₂SO₄ las que poseen el menor crecimiento de la parte aérea y las con NaCl la mayor longitud.

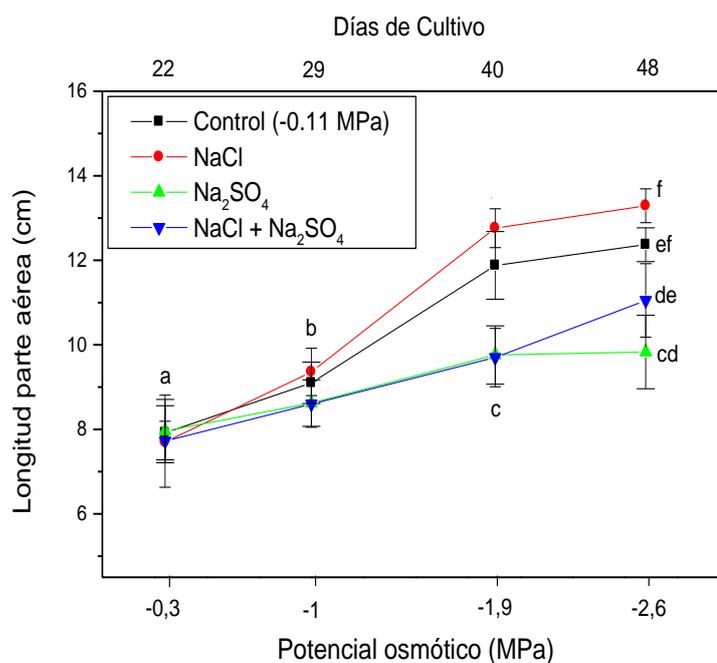


Figura 6: Crecimiento de parte aérea en plantas controles (Ψ_o : 0,11 MPa) y tratadas con NaCl, Na₂SO₄ y la mezcla de sales. Los puntos corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

6.2. Contenido endógeno de Giberelinas activas

A continuación se presentan los resultados obtenidos de las determinaciones de GAs endógeno. El contenido endógeno de GAs activas (GA1, GA3, GA4) mostró una tendencia diferente según el tipo de sal, la concentración de la misma y el órgano analizado.

6.2.1. Contenido de GA1 en raíces

Los tratamientos salinos no mostraron diferencias significativas en los niveles de GA1 en las raíces en comparación con los controles, sin embargo, se observó un leve aumento de esta fitohormona a los -1MPa en presencia del tratamiento con NaCl y una leve disminución en la mayor concentración de sal de Na₂SO₄ (ver Figura 7).

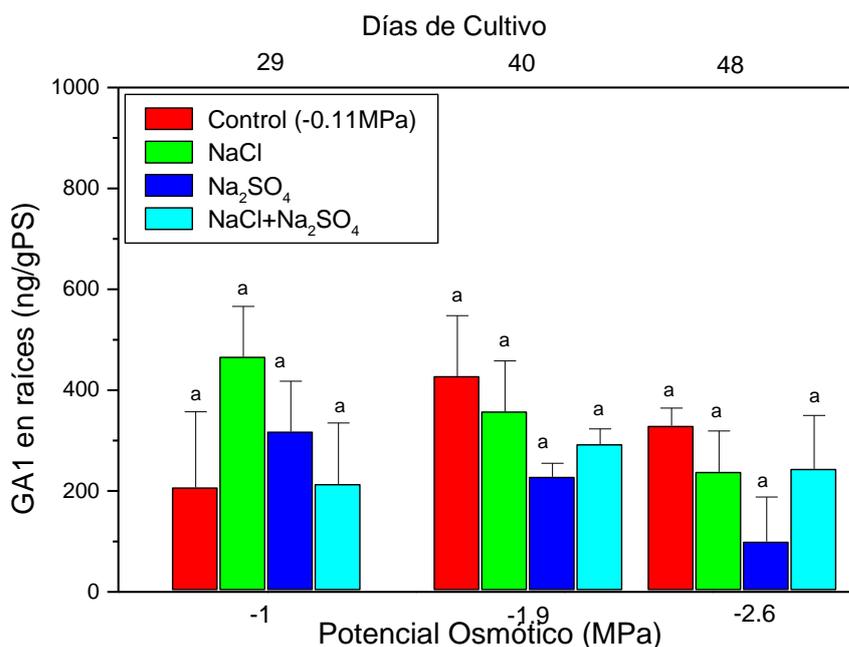


Figura 7: Contenido endógeno de GA1 en raíces en plantas controles (Ψ_o : 0,11 MPa) y tratadas con NaCl, Na₂SO₄ y la mezcla de sales. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.2.2. Contenido de GA1 en hojas

En las plantas tratadas con NaCl el contenido de GA1 en hojas fue disminuyendo a medida que aumentaba la concentración de sal. En las hojas de plántulas tratadas con NaCl a -1 MPa se observó que éstas registraron un incremento de aproximadamente 2 veces más GA1 que las plantas controles y las tratadas con sulfato, alcanzando la mayor concentración en comparación a los otros tratamientos. A -1.9 MPa los tratamientos salinos incrementaron el contenido de GA1 en hojas, sin embargo al incrementar la concentración de sal (-2.6 MPa)

se observa una disminución en esta fitohormona en los tratamientos salinos, siendo la menor concentración de GA1 la observada en hojas de plántulas tratadas con sulfato. Respecto a las plantas tratadas con la mezcla de sales los valores se mantuvieron sin variaciones significativas hasta el final del experimento (ver Figura 8).

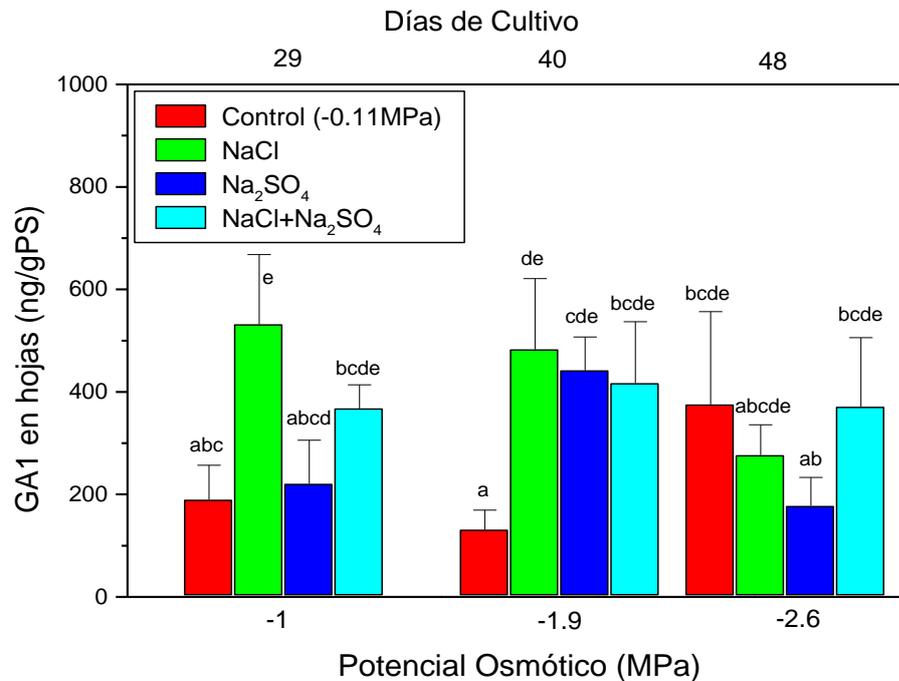


Figura 8: Contenido endógeno de GA1 en hojas de plantas controles (Ψ_0 : 0,11 MPa) y tratadas con NaCl, Na₂SO₄ y la mezcla de sales. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.2.3. Contenido de GA3 en raíces

En la Figura 9, se observa que en los tratamientos salinos disminuyó significativamente el contenido de GA3 en raíces en comparación al observado en las plántulas controles. A partir de -1.9 MPa, las raíces de plántulas tratadas con sulfato presentan el menor contenido de esta hormona. Es importante mencionar que el tratamiento con la mezcla de sales aumentó el nivel de GA3 alcanzando a los controles.

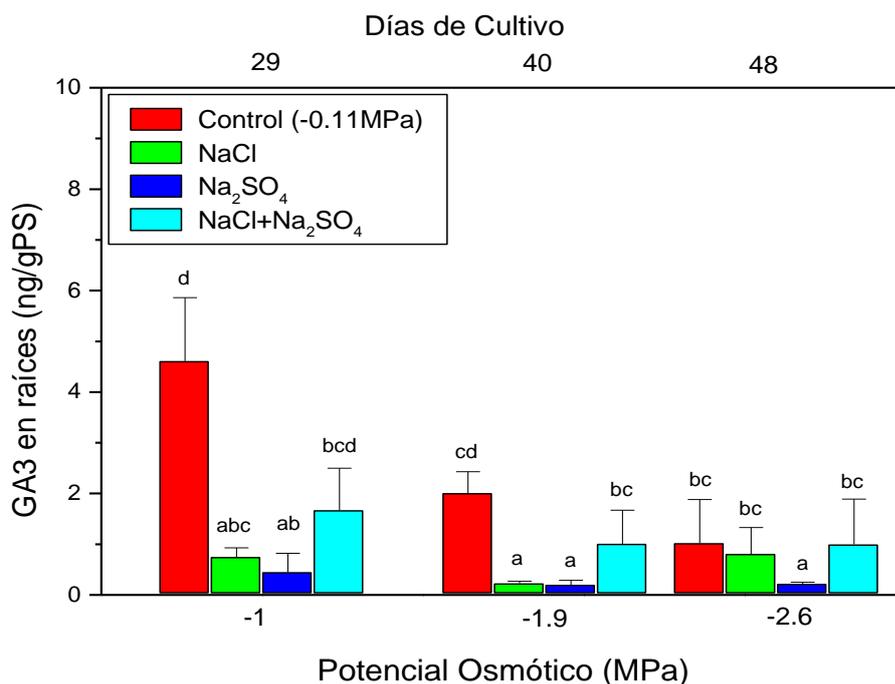


Figura 9: Contenido endógeno de GA3 en raíces de plantas controles (Ψ_0 : 0,11 MPa) y tratadas con NaCl, Na₂SO₄ y la mezcla de sales. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.2.4. Contenido de GA3 en hojas

A diferencia de lo observado en raíces con esta hormona, se observan incrementos con los tratamientos salinos. A baja y moderada concentración de NaCl (-1 y -1.9 MPa) se registró un incremento en el contenido de GA3 en hojas en comparación a los controles, en cambio el tratamiento con sulfato solo produjo un aumento solo a moderada salinidad y disminuyó significativamente a alta salinidad. El tratamiento con la mezcla de sales no produjo efectos sobre el contenido de esta hormona (Figura 10).

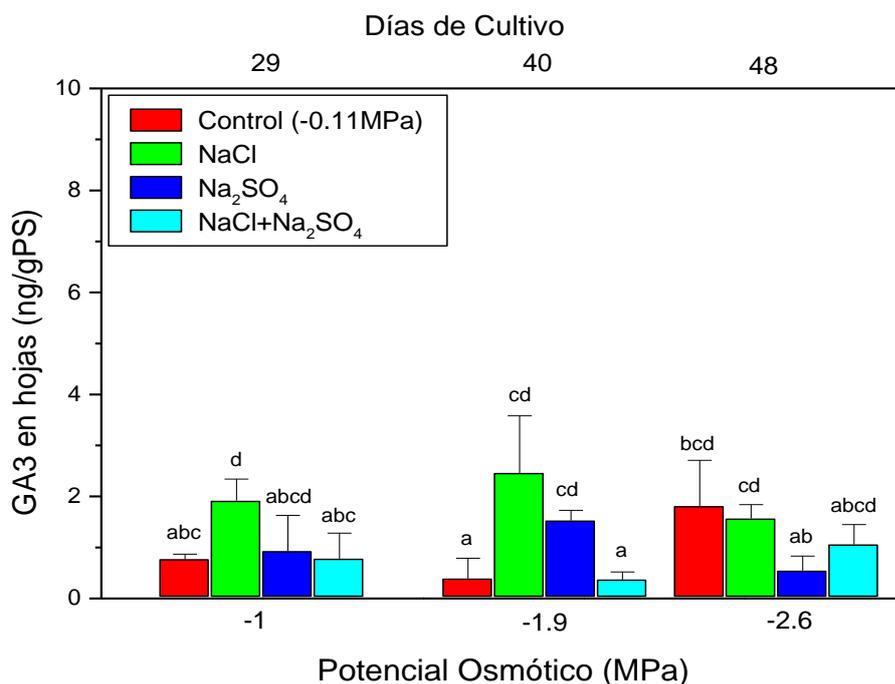


Figura 10: Contenido endógeno de GA3 en hojas de plantas controles (Ψ_0 : 0,11 MPa) y tratadas con NaCl, Na₂SO₄ y la mezcla de sales. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.2.5. Contenido de GA4 en raíces

En la figura 11 se observa que los niveles de esta hormona fueron mayores a los observados para GA1 y GA3 tanto en raíces como en hojas. Es destacable el incremento significativo ($p < 0.05$) observado en las raíces de plantas tratadas con NaCl a lo largo de toda la experiencia. Mientras en los tratamientos con sulfato, solo a bajas concentraciones se registraron aumentos en la concentración de esta hormona. No se observaron diferencias en los tratamientos con la mezcla de sales y los controles.

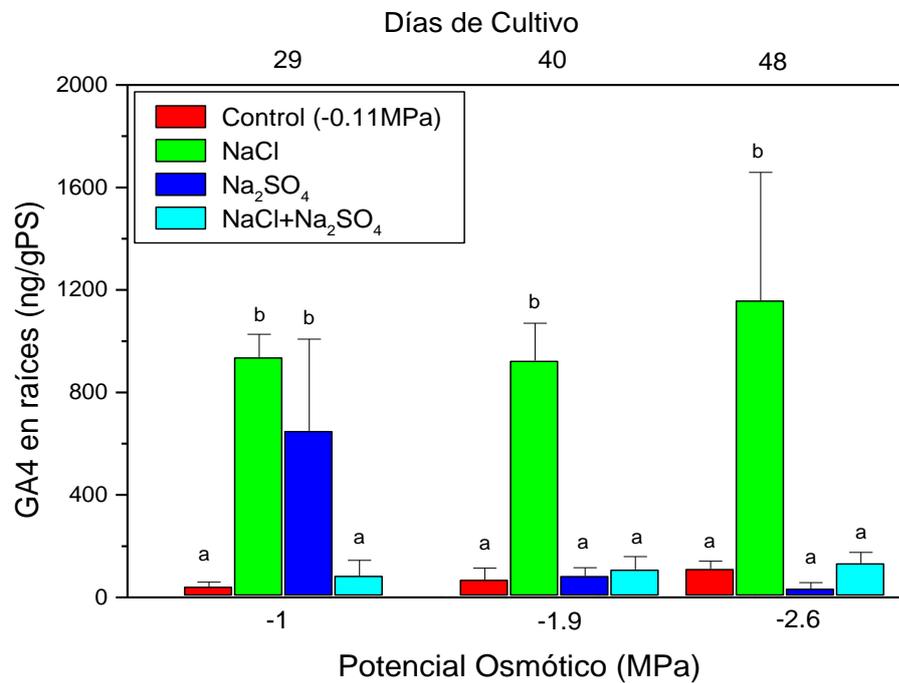


Figura 11: Contenido endógeno de GA4 en raíces de plantas controles (Ψ_o : 0,11 MPa) y tratadas con NaCl, Na₂SO₄ y la mezcla de sales. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.2.6. Contenido de GA4 en hojas

En relación a los niveles de GA4 en hojas, al igual que en raíces, el tratamiento con NaCl incrementó los niveles de esta hormona. Por el contrario, no se observaron diferencias entre los otros tratamientos sobre el contenido de GA4 (ver Figura 12).

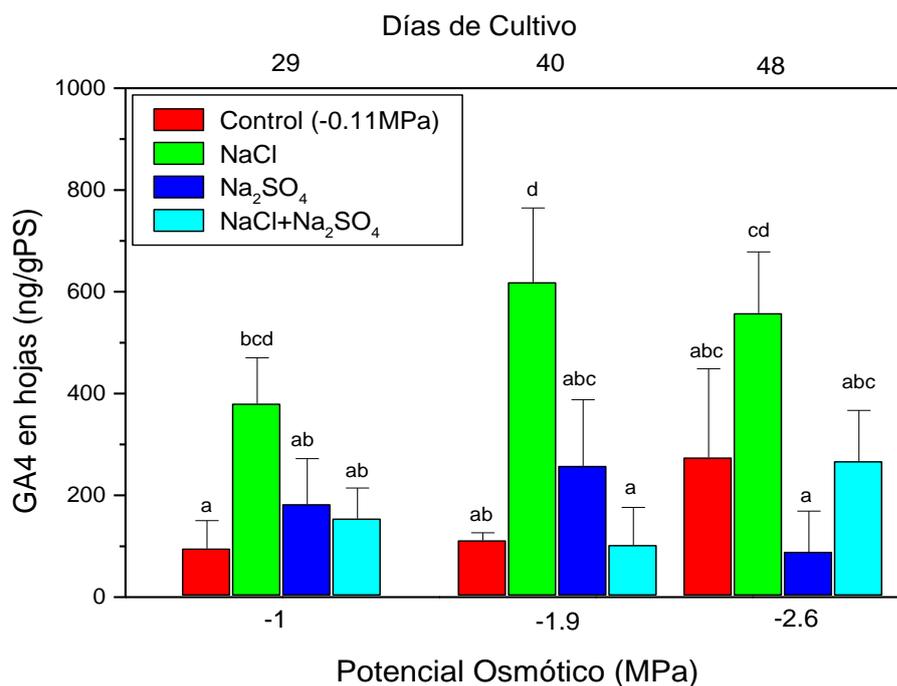


Figura 12: Contenido endógeno de GA4 en hojas de plantas controles (Ψ_0 : 0,11 MPa) y tratadas con NaCl, Na₂SO₄ y la mezcla de sales. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.2.7. Contenido de Giberelinas inactivas

A continuación se presentan los resultados obtenidos de las determinaciones de GAs inactivas (GA8 y GA34), las cuales mostraron una tendencia diferente según el tipo de sal, la concentración de la misma y el órgano analizado.

6.2.8. Contenido de GA8 en raíz

En relación al contenido de GA8 en raíces a -1 MPa los tratamientos salinos provocaron diferentes efectos. Frente a NaCl se observó una disminución de GA8 mientras que en Na₂SO₄ aumentó el contenido de esta hormona en comparación a los controles. A lo largo de la experiencia, los controles registraron los mayores niveles de GA8 mientras que no se detectaron diferencias entre los tratamientos salinos (ver Figura 13).

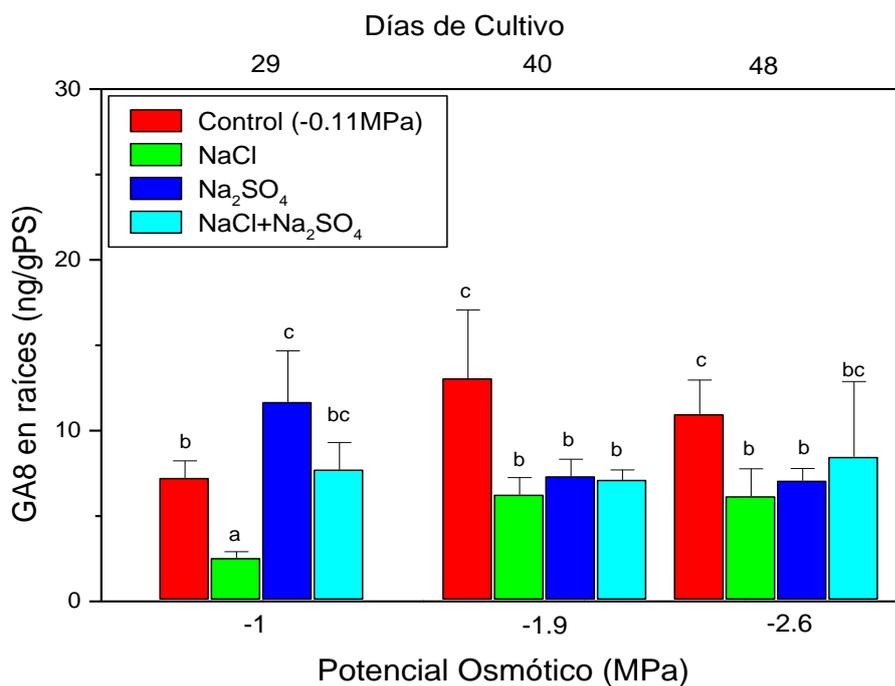


Figura 13: Contenido endógeno de GA8 en raíces de plantas controles (Ψ_o : 0,11 MPa) y tratadas con NaCl, Na₂SO₄ y la mezcla de sales. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.2.9. Contenido de GA8 en hojas

Similar a lo observado con GA34, a bajas concentraciones de sal, el tratamiento con Na₂SO₄ produce un incremento en los niveles de GA8. El tratamiento con NaCl también incrementó los niveles de esta hormona. A -1.9 MPa los tratamientos elevaron los niveles de esta hormona, sin detectarse diferencias entre ellos. En cambio, al finalizar la experiencia, los controles incrementaron los niveles de GA34 alcanzando los niveles observados con el tratamiento con Na₂SO₄, el menor valor fue observado en el tratamiento con NaCl (ver Figura 14).

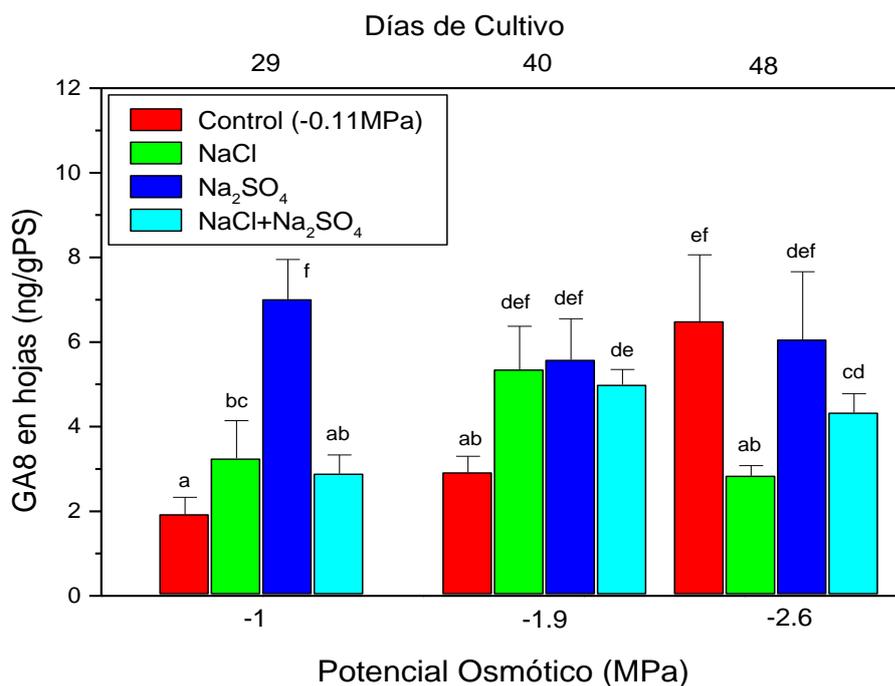


Figura 14: Contenido endógeno de GA8 en hojas de plantas controles (Ψ_o : -0,11 MPa) y tratadas con NaCl, Na₂SO₄ y la mezcla de sales. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas ($p < 0,05$).

6.2.10. Contenido de GA34 en raíces

En relación a GA34, se observa el mayor contenido a inicios del experimento con el tratamiento de NaCl, seguida por los valores obtenidos en el tratamiento con sulfato (-1MPa). A partir de -1.9 MPa los niveles de GA34 disminuyeron significativamente en las hojas de plántulas tratadas con NaCl, en comparación a los controles, mientras que no se observaron diferencias entre las tratadas con sulfato y la mezcla de sales. Sin embargo, a -2.6 MPa, las hojas de plántulas tratadas presentaron menor contenido de GA34 que las controles, siendo el menor contenido observado en hojas de plántulas tratadas con sulfato (Figura 15).

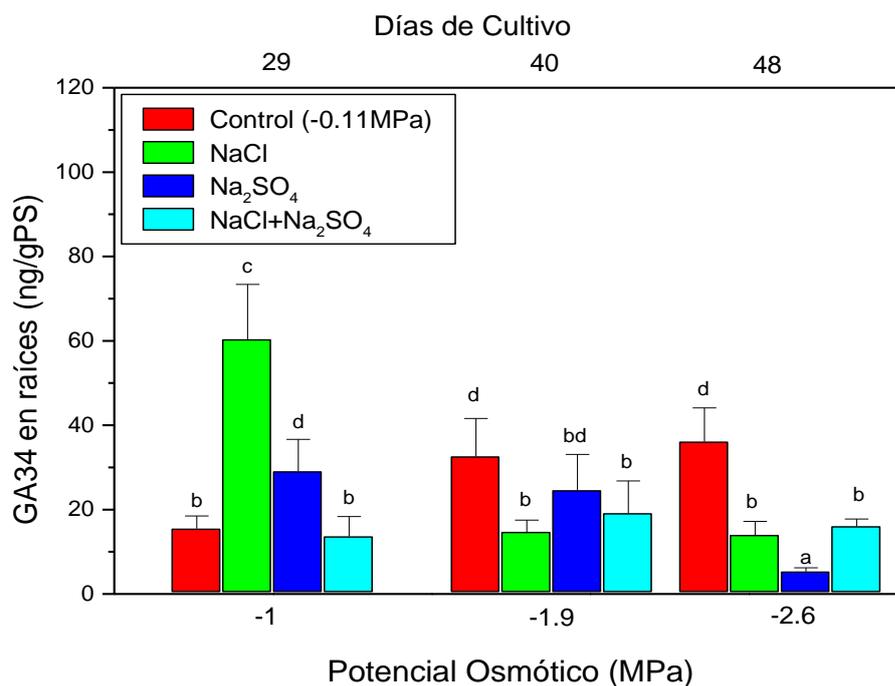


Figura 15: Contenido endógeno de GA34 en raíces de plantas controles (Ψ_0 : -0,11 MPa) y tratadas con NaCl, Na₂SO₄ y la mezcla de sales. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.2.11. Contenido de GA34 en hojas

A baja y moderada salinidad, las hojas de plántulas tratadas con NaCl y Na₂SO₄ registraron los mayores niveles de GA34, alcanzando un valor 6 veces mayor a los controles. A los 48 días de cultivo, los controles incrementaron los niveles de GA34 alcanzando a los valores registrados en las plántulas tratadas con NaCl, es destacable que las plántulas tratadas con Na₂SO₄ presentaron el menor contenido de esta hormona mientras que en la mezcla de sales se observaron valores intermedios entre este tratamiento y los controles (Figura 16).

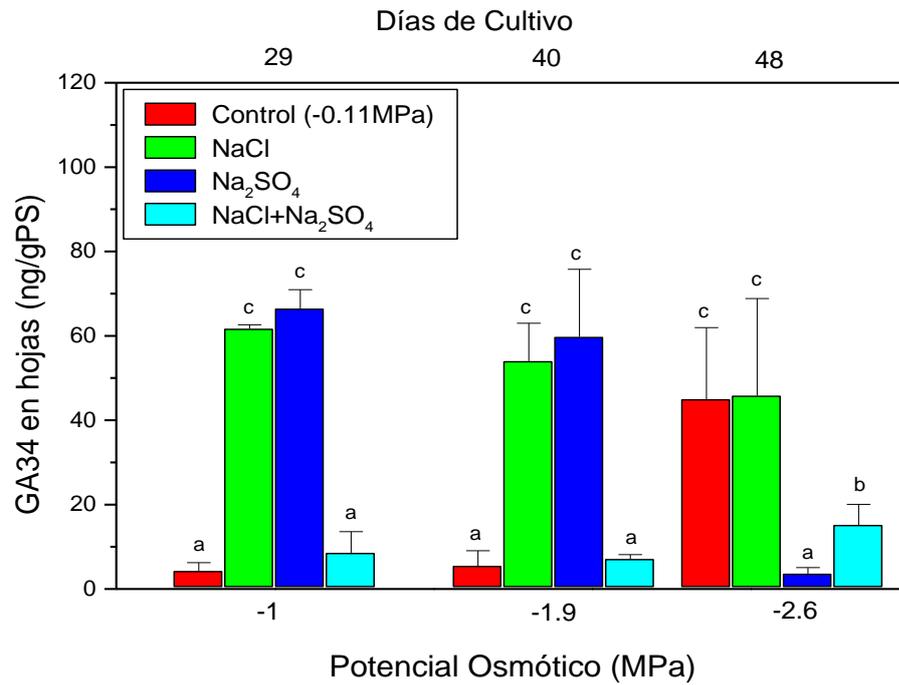


Figura 16: Contenido endógeno de GA34 en hojas de plantas controles (Ψ_0 : -0,11 MPa) y tratadas con NaCl, Na₂SO₄ y la mezcla de sales. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamierntos ($p < 0,05$).

7-DISCUSIÓN

Como se ha descrito anteriormente, las altas concentraciones de sal en el medio pueden afectar el crecimiento de las plantas de diferentes maneras, dependiendo del tipo de sal presente en el suelo y de la etapa del crecimiento, siendo el estadio de plántula una fase crítica en el establecimiento de una especie bajo condiciones naturales en un medio salino. La partición de asimilados entre el tallo y la raíz en respuesta a salinidad es también influenciada por el genotipo, la disponibilidad de nutrientes, edad de la planta, y otras variables edáficas y ambientales. (Hasegawa *et al.*, 2000; Achard *et al.*, 2004). Así dependiendo de la especie, el grado de estrés salino y la composición de la solución externa, el crecimiento del sistema radical puede ser estimulado, inhibido o no ser afectado. Los resultados observados en *P. strombulifera* ponen de manifiesto que las respuestas observadas en los parámetros de crecimiento analizados mostraron diferencias de acuerdo al tipo de sal utilizada y al potencial osmótico generado por ellas, de manera análoga a lo observado en resultados previos (Reinoso *et al.*, 2004; 2005; Reginato, 2009, Llanes, 2010).

La estimulación en el crecimiento radical a bajas concentraciones salinas puede ser interpretada como un mecanismo adaptativo generalizado que poseen las plantas para favorecer la absorción de agua y nutrientes en las primeras instancias del estrés salino. Esta estimulación también ha sido registrada bajo estrés hídrico moderado, por lo que se debería principalmente al componente osmótico de la salinidad (Harrouni, 1989). Es importante destacar que tanto en la curva de crecimiento radical como en la longitud de parte aérea se observa la estimulación del crecimiento a NaCl, lo que constituye una respuesta interesante que difiere de los resultados obtenidos en otras especies de *Prosopis*. Catalán *et al.*, (1994) observaron en plántulas de *P. flexuosa* una reducción del crecimiento del 25% con 200 mM de NaCl y del 50% con 400 mM de la misma sal. Almeida Viégas *et al.*, (2004) mostraron inhibición del crecimiento de plántulas de *P. juliflora* por tratamientos con 100 mM NaCl. En cambio, los resultados de crecimiento con el tratamiento con Na₂SO₄ demuestran que esta sal no sólo no provocó una estimulación del crecimiento como la observada con NaCl, sino que por el contrario, la sal de sulfato inhibió el crecimiento en relación a las plantas controles y a las tratadas con cloruro, registrándose diferencias significativas en la mayor concentración de sal (-2.6 MPa) principalmente en la longitud de la parte aérea.

El crecimiento con la mezcla de sales fue intermedio al obtenido en los tratamientos monosalinos como se corrobora en las curvas de crecimiento. De esta manera, los datos de crecimiento de plántulas en cultivo hidropónico obtenidos con el tratamiento bisalino

confirman la existencia de fenómenos de toxicidad por SO_4^- ya informados anteriormente (Reinoso *et al.*, 2005 Reginato, 2009), como también que éstos son aliviados, con la mezcla de sales por fenómenos de antagonismo iónico y competencia mutua.

En relación al número de hojas, los resultados mostraron el efecto de los tratamientos salinos en la disminución de este parámetro, principalmente frente a sulfato, produciéndose el menor número de hojas en el potencial mas bajo en comparación a los otros tratamientos salinos. La disminución en el número de hojas en condiciones de salinidad se debe principalmente a la pérdida de las hojas más viejas y senescentes, que acumulan grandes cantidades de iones y siendo este un patrón frecuentemente observado en muchas halófitas (Flowers, 2004).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, las GAs juegan un rol importante en mediar los efectos del estímulo ambiental sobre el desarrollo de las plantas. Esos estímulos ambientales, como la salinidad, pueden alterar las giberelinas activas afectando la transcripción de genes por caminos específicos de su biosíntesis (Yamaguchi y Kamiya, 2000). En relación al papel que las giberelinas desempeñarían en plantas sometidas a estrés salino, los antecedentes se basan fundamentalmente sobre aplicaciones exógenas de estos reguladores. En este sentido, pretratamientos con GA3 en hojas de *Vigna radiata* aliviaron los efectos adversos del estrés por NaCl (Chakraborti y Mukherji, 2003), y el efecto de la sal sobre el contenido de pigmentos y en la eficiencia en el uso del agua (Aldesuquy e Ibrahim, 2001). También se ha propuesto que los radicales libres inducidos por la peroxidación de lípidos fueron inhibidos por GA (Hedden, 1997). Recientemente, se informó que GA3 (10^{-5} M) aplicada en plantas de *Brassica junca* mitigó los efectos adversos de la salinidad (Shah, 2007), y que la aplicación de GA3 a plantas de trigo incrementó la producción de granos, la cual fue atribuida a la inducción por GAs de la entrada y particionamiento de iones y homeostasis de hormonas bajo condiciones salinas (Iqbal y Ashraf, 2010). Estas investigaciones muestran que las GAs podrían desempeñar algún papel, ya sea directo o indirecto, en la tolerancia de cultivos creciendo bajo condiciones de salinidad.

Dentro del grupo de las giberelinas activas, GA1 se identificó en gran número de especies y en ellas se considera que es la principal GA activa; por otro lado, GA4 también está presente en varias especies y sería la más importante en *Arabidopsis* y algunos miembros del género *Cucurbita*. Sin embargo, las funciones relativas de GA1 versus GA4 aún no están claras si bien se sabe que son las principales responsables del control del crecimiento de los tallos. En *P. strombulifera*, los resultados demuestran que GA4 es la forma activa predominante encontrada en esta especie, en comparación con la GA1 y GA3,

siendo esta última casi no detectable en todos los tratamientos.

Además, se observó en las hojas y raíces de plántulas tratadas con NaCl gran acumulación de GA4 a moderada salinidad (-1.9 MPa) coincidiendo con el crecimiento óptimo para esta especie. Esta tendencia se mantuvo a -2.6 MPa, alcanzando los valores más elevados de esta fitohormona. Por otro lado, las hojas de plántulas tratadas con sulfato a -2.6 MPa registraron bajos niveles de GA4 y GA1, coincidiendo con el menor crecimiento relacionado al efecto tóxico del anión sulfato, que se acentúa a medida que aumenta la salinidad. Por otro lado, las plantas tratadas con la mezcla de sales presentaron niveles intermedios de GA4 y GA1, coincidiendo con el efecto observado de reversión parcial de la toxicidad por la mezcla de sales.

Por lo tanto, los resultados observados en *P. strombulifera* en relación a los elevados niveles de GA4 encontrados en las plantas tratadas con NaCl en comparación a la GA1 y GA3, sugieren un rol para GA4 en la tolerancia a salinidad por cloruros.

En cuanto a los niveles endógenos de giberelinas inactivas, las raíces de las plantas tratadas con NaCl registraron mayor contenido de GA34 y GA8, en relación a las tratadas con sulfato, lo cual se correlaciona con el perfil de GAs activas observado principalmente en las plantas tratadas con NaCl. Es importante destacar que en todos los casos se registraron niveles mayores de GA34 (catabolito de GA4) en comparación a los de GA8 sugiriendo nuevamente un rol para GA4 en la tolerancia a salinidad por NaCl.

Los resultados del perfil de GAs activas obtenidos en este trabajo se correlacionan con datos previos obtenidos en el laboratorio de Fisiología Vegetal, en los cuales las plantas tratadas con NaCl presentaron menores niveles de ABA en comparación con las tratadas con sulfato. Las plantas que poseen crecimiento óptimo a concentraciones moderadas de NaCl, poseen bajos niveles de ABA (Llanes 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las plantas con crecimiento óptimo poseen elevadas concentraciones de GA4. Por lo tanto puede observarse una correlación entre giberelinas y ABA, en la cual, la mayor acumulación de GA activa (GA4) en estas plantas que registraron menor contenido de ABA podría deberse a una competencia de intermediarios comunes de la síntesis de carotenoides y GA, ambos a partir del precursor geranyl-geranyl bifosfato (Lefsrud *et al* 2006). La cadena de eventos que conducen a esta divergencia metabólica no ha sido dilucidada.

Por otro lado, es importante destacar que varios estudios sugieren un rol de las GAs en la elongación de la raíz primaria (Fukaki y Tasaka, 2009). Las GAs afectan la expansión celular en la zona de elongación de la raíz vía la desestabilización de las proteínas DELLA

tipo represor de GA1 (RGA). Recientemente, se demostró que GA1 cumple un rol en la expansión celular en la endodermis en la zona de elongación de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* (Uehara *et al.*, 2008). En nuestro estudio, las plantas que presentan menor contenido de GA4 y menor GA1, son aquellas cuyas raíces de plántulas fueron tratadas con Na₂SO₄, las cuales presentan menor longitud y desarrollo de la raíz (Reinoso *et al.*, 2005), comparados con los controles, con lo cual podría sugerir que niveles superiores de GAs activas son necesarios para la elongación y desarrollo de la raíz principalmente frente a condiciones de salinidad.

8. CONCLUSIONES

1- En este trabajo se pudo comprobar que diferentes niveles de giberelinas modulan la respuesta de tolerancia a salinidad en la halófito *P. strombulifera* determinada por los parámetros del crecimiento. Los niveles de esta fitohormona varían según las sales presentes en la solución del cultivo, por lo tanto es importante considerar la composición química del suelo salino (proporción y tipo de cationes y aniones) como requisito previo a cualquier estudio de mejoramiento para incrementar la tolerancia a salinidad de los cultivos.

2- Los resultados de este trabajo sugieren que aplicaciones foliares de GA4 en plantas creciendo en suelos salinos podrían constituir una herramienta tecnológica válida para lograr cultivos con mayor masa vegetativa en el período juvenil alcanzando una mayor eficiencia fotosintética y favoreciendo a la etapa reproductiva. Esta sugerencia se basa en que las GAs poseen una función importante en el proceso del alargamiento de las células recientemente formadas en los ápices y que la estructura general de la parte aérea de la planta es crítica para incrementar la productividad. Además, la masa vegetativa disminuye en condiciones de salinidad en la mayoría de las especies de leguminosas cultivadas.

3- Este estudio realizado en *P. strombulifera* contribuye a incrementar el conocimiento sobre la fisiología de plantas del género *Prosopis*, el cual posee un importante valor económico y de conservación. Este conocimiento permitirá incrementar el desarrollo y crecimiento de las plantas, mejorando la reforestación de los suelos del área de distribución del género *Prosopis* para revertir los procesos de degradación y desertificación.

9. BIBLIOGRAFIA

ACHARD, P., A. HERR, D.C. BAULCOMBE y N.P. HARBERD. 2004. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. **Development** 131: 3357–3365.

ALBACETE, A., M.E. GHANEM, C. MARTINEZ-ANDUJAR, M. ACOSTA, J. SANCHEZ-BRAVO, V. MARTINEZ, S. LUTTS, I.C. DODD y F. PEREZ-ALFOCEA. 2008. Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum L.*) plants. **J Exp Bot** 59:4119–4131.

ALDESUQUY, H.S. y A.H. IBRAHIM. 2001. Interactive effect of seawater and growth bio-regulators on water relations, abscisic acid concentration and yield of wheat plants. **Crop Sci.** 187: 185-193.

ALMEIDAS-VIEGAS A., M MARTINS FAUSTO, J. QUEIROZ, I. ALMEIDA ROCHA, J. GOMEZ SILVEIRA y P. ALMEIDA VIEGÁS. 2004. Growth and total-N content of *Prosopis juliflora* (S.V.) DC are stimulated by low NaCl levels. **Braz. J. Plant Physiol.** 16: 65-68.

ARCE P. y O. BALBOA. 1998. Some aspects of the biology of *Prosopis* growing in Chile. En: The current state of knowledge on *Prosopis juliflora* Ed Habit MA, Rome: FOA, 313-322p.

BAYUELO-JIMÉNEZ J. S., D. G. DEBOUCK y J. P. LYNCH .2003. Growth, gas exchange, water relations, and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. **Field Crop Res.** 80: 207-222.

BLUMWALD, E., G.S.AHARON y M.P. APSE. 2000. Sodium transport in plant cells. **Biochimica et Biophysica** 1465: 140-151.

- BOTTINI, R., F. CASSÁN y P. PICCOLI. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 65: 497-503.
- BURKART, A. 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae) Catalogue of the recognized species of *Prosopis*. **J. Arnold Arbo.** 57: 450-425.
- CANTERO, J., A. CANTERO y J. CISNEROS. 1996. La vegetación de los paisajes hidrohalomórficos del centro de la Argentina. Universidad Nacional de Río Cuarto. 298pp
- CATALÁN, L., M. BALZARINI, E. TALEISNIK, R. SERENO y U. KARLIN. 1994. Effects of salinity on germination and seedling growth of *Prosopis flexuosa* (D.C.). **For. Ecol. Manage.** 63: 347–357
- CHAKRABORTI, N. y S. MUKHERJI. 2003. Effect of Phytohormone pretreatment on nitrogen metabolism in *Vigna radiata* under salt stress. **Biol. Plant.** 46: 63-66.
- CHAKRABORTI, N., y S. MUKHERJI. 2003. Effect of phytohormone pretreatment on nitrogen metabolism in *Vigna radiata* under salt stress. **Biol. Plant** 46: 63-66.
- CISNEROS J., J. J. CANTERO y A. CANTERO GUTIERREZ. 1997. Relaciones en la fluctuación del nivel freático, su salinidad y el balance hídrico, en los suelos salinos-sódicos del centro de la Argentina. **Revista UNRC** 17: 23-35.
- COSGROVED, J., S. GILROY, H. TAH KAO y J.C. SCHULTZ. 2000. Cross talk among geneticists, physiologists, and ecologists. **Plant Physiology** 124:499–505.
- DE LA VEGA A. 1996. **Variabilidad genética y estructuración poblacional en especies del genero *Prosopis* (Leguminosae). Recurso biótico para reforestar zonas áridas.** Tesis doctoral, ETSIA. Universidad Pública de Navarra. España. 145p.
- ELLIOTT R, J.J. ROSS, J.J. SMITH, D. LESTER y J. REID. 2001. Feed-forward regulation of gibberellin deactivation in pea. **J. Plant Growth. Regul.** 20: 87-94.
- FLOWER T. 2006. Preface. Plants and salinity Special Issue. **J. Exp. Bot.** 68: 57-59
- FLOWES, T. 2004. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany** 55: 307-319.
- FUKAKI, H. y M. TASAKA. 2009. Hormone interactions during lateral root formation. **Plant Molecular Biology.** 69: 437-449.

HARROUNI, M., 1989. **The effect of water stress on growth and development of barley (*Hordeum vulgare* (L.) Lam.) and tef (*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter)**. PhD Thesis. University of Wales, Bangor, UK.

HARTIG K y E. BECK. 2006. Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. **Plant Biol.** 8: 389-396.

HASEGAWA, P.M., R.A. BRESSAN., J.K. ZHU y H.J. BOHNERT. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 51: 463-499.

HEDDEN, P. 1997. Gibberellin biosynthesis: Enzymes, Genes and Their Regulation. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 48: 431-460.

HEDDEN, P. y A. L.PHILLIPS. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. **Trends in Plant Science** 12: 523-530.

IQBAL, M. y M. ASHRAF. 2010. Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis. **J. Env. Exp. Bot.** 58: 504-514.

ISRAELSSON, M., E. MELLEROWICZ, M. CHONO, J. GULLBERG y T. MORITZ. 2004. Cloning and overproduction of gibberellin 3-oxidase in hybrid aspen trees. Effects on gibberellin homeostasis and development. **Plant Physiol.** 135(1): 221-230.

KHAN M. A y I. A. UNGAR. 2000. Alleviation of salinity-enforced dormancy in *Atriplex griffithii* Moq. Var. stocksii. **Seed Sci. technol.** 28: 29-37.

LAVADO, R. 2008. Visión sintética de la distribución y magnitud de los suelos afectados por salinidad en la Argentina. Pp. 11-16 en: Taleisnik, E; K Grunberg & G. Santa María (eds.). **La salinización de suelos en la Argentina: su impacto en la producción agropecuaria**. EDUCC (Editorial Universidad Católica de Córdoba), Córdoba. ISBN 978-987-626-013-8.

LEFSRUD M. G., D. KOPSELL, D. E. KOPSELL y J. CURRAN-CELENTANO. 2006. Irradiance level affect growth parameters and carotenoid pigments in kale and spinach grown in a controlled environment. **Physiologia Plantarum** 127: 624-631.

LLANES, A. 2010. **Indicadores fisiológicos y moleculares de la tolerancia a salinidad en *Prosopis strombulifera*. Su correlación con los niveles endógenos de ABA**. Tesis, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

LOPEZ-AGUIRRE, J.G., J. FARIAS-LARIO, S. GUZMAN-GONZALES, A. MICHEL-ROSALES y J.R. DE FREITAS. 1999. Effect of sulphur application on chemical properties and microbial populations in tropical alkaline soil. **Pedobiologia** 43: 183-191.

MANCHADA, G. y N. GARG. 2008. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. **Acta physiol. Plant** 30: 595-618.

MARK, G., D. LEFSRUD, A. KOPSELL, D. KOPSELL y J.CURRAN. 2006. Irradiance levels affect growth parameters and carotenoid pigments in kale and spinach grown in a controlled environment. **Issue Physiologia Plantarum** 127: 624–631.

MARTIN, D.N., W.M. PROEBSTING, T.D. PARKS, W.G. DOUGHERTY, T. LANGE, M.J. LEWIS, P. GASKIN y P. HEDDEN. 1996. Feedback regulation of gibberellin biosynthesis and gene expression in *Pisum sativum* L. **Planta** 200: 159–166.

MUNNS, R., D. SCHACHTMAN y A. CONDON. 1995. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. **Aust. J. Plant Physiol.** 22: 561-569.

MUNNS, R. y M. TESTER. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol.** 59:651-81.

NEMHAUSER, J. L. F. HONG y J. CHORY. 2006. Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. **Cell** 126:467–475.

OLSZEWSKI, N., T.P. SUN y F. GUBLER. 2002. Gibberellin signalling, biosynthesis, catabolism, and response pathways. **Plant Cell** 14: 61-80.

PARK, S.H., M. NAKAJIMA, M. SAKANE, Z.J. XU, K. TOMIOKA y I. YAMAGUCHI. 2005. Gibberellin 2-oxidases from seedlings of adzuki bean *Vigna angularis* show high gibberellin-binding activity in the presence of 2-oxoglutarate and Co [2+]. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 69: 1498-1507.

PASSERA, C. B. 2000. Fisiología de *Prosopis* sp. **Actas de la III Reunión Nacional de la Asociación argentina de Prosopis**. Mendoza, Argentina.

PHILLIPS, A.L., D.A. WARD, S. UKNES, N.E.J. APPLEFORD, T. LANGE, A.K. HUTTLY, P. GASKIN, J.E. GRAEBE y P. HEDDEN. 1995 Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from Arabidopsis. **Plant Physiol** 108: 1049–1057.

REGINATO, M. 2009. **Respuesta de la halófito *Prosopis strombulifera* a diferentes medios salinos. Modificaciones de los parámetros morfofisiológicos y su regulación hormonal.** PhD Thesis. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

REINOSO, H., L. SOSA, L. RAMÍREZ y V. LUNA. 2004. Salt-induced changes in the vegetative anatomy of *Prosopis strombulifera* (Leguminosae). **Bot.** 82: 618-628.

REINOSO, H., L. SOSA, M. REGINATO y V. LUNA. 2005. Histological alterations induced by sodium sulfate in the vegetative anatomy of *Prosopis strombulifera* (Lam.) *Benth.* **World J. of Agric. Sci.** 1: 109-119.

RENGASAM, P. 2006. World salinization with emphasis on Australia. **J. of Exp. Botany.** 57: 1017–1023.

REYES, J. L. y N. CHUA. 2007.. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. **The Plant Journal** 49:592-606.

RODRIGUEZ, A.A., A.M. STELLA, M.M. STORNI, G. ZULPA y M.C. ZACCARO. 2006. Effects of cyanobacterial extracellular products and gibberellic acid on salinity tolerance in *Oryza sativa* L. **Saline Syst.** 2: 7-9.

ROGERS, J.C. y S. ROGERS. 1992. Definition and functional implications of gibberellin and abscisic acid cis-acting hormone response complexes. **Plant Cell** 4: 1443-1451.

SACHS, T. 2005. Auxin's role as an example of the mechanisms of shoot/root relations. **Plant Soil.** 268: 13-19.

SHAH, SH 2007. Effects of salt stress on Mustard as affected by gibberellic acid application. **Plant Physiol.** 33: 97-106.

SHANNON, M. C. y C.M. GRIEVE. 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. **Sci. hort.** 87: 5-38.

SHAO, H., L. CHUC, G. WU, J. ZHANG y Y. HUG. 2007. Changes of some anti-oxidative physiological indices under soil water deficit among 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at tillering stage. **Colloids Surf. B Biointerfaces.** 54: 143-149.

SINGH, RP, K.N.C. MURTHY y G.K. JAYAPRAKASHA. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate peel and seed extract using in vitro models. **J Agric Food Chem** 50: 81-86

SOSA, L. 2005. **Adaptaciones fisiológicas de *Prosopis strombulifera* a condiciones de salinidad por cloruros y sulfatos.** Tesis, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

SPONCEL, V. y V. HEDDEN. 2004. Gibberellin biosynthesis and inactivation. En: Davies P. **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action.** Ed: Kluwer Acad Pub, Dordrecht, the Netherlands. 63-94 p.

SWAIN, S. y D. SINGH. 2005. "Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development. **Trends in Plant Sci.** 10(3): 123-129.

THOMAS, SG, A.L. PHILLIPS y P. HEDDEN. 1999. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellins deactivation. **Pro Natl. Acad. Sci.** 96: 4698-4703.

TOYOMASU, T. 1997. Cloning and characterization of a cDNA encoding gibberellin 20-oxidase from rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiol. Plant.** 99: 111–118.

UEHARA, T., Y. OKUSHIMA, T. MIMURA, M. TASAKA y H. FUKAKI. 2008. Domain II mutations in CRANE/IAA18 suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol** 49: 1025–1038.

XIONG, L. y J.K. ZHU. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant Cell Environ.** 25:131–139.

YAMAGUCHI, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. **Annu. Rev. Plant Biol.** 59:225–51.

YAMAGUCHI, S. y Y. KAMIYA. 2000. Gibberellin Biosynthesis: Its regulation by endogenous and environmental signals. **Plant Cell Physiol.** 41: 251-257.

YU, H., T. ITO, Y. ZHAO, J. PENG, P. KUMAR y E.M. MEYEROWITZ. 2004. Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 101: 7827–7832.