

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Ciencias Naturales
Laboratorio de Fisiología Vegetal

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Papel del ácido abscísico, salicílico, etileno y óxido nítrico en la homeostasis iónica y tolerancia a salinidad de *Prosopis strombulifera*”



Lic. María Genoveva Devinar
Directora: Dra María Virginia Luna

Dedicado a...

Mis padres, Ana y Daniel, por brindarme toda su confianza y apoyo incondicional durante toda mi vida.

A Juan Pablo, por su compañía, su comprensión infinita, su paciencia, su ayuda en todo momento y por el amor que me brinda todos los días.

Mi hermana Agustina, por acompañarme y aconsejarme siempre.

Mis amigas de siempre, por su paciencia y sus palabras de aliento en todo momento.

Agradecimientos

A mi directora, la Dra. Virginia Luna por permitirme realizar esta tesis doctoral, trasmitirme sus conocimientos y por su dedicación en todo momento.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Vegetal: Analía Llanes, Celeste Varela, Julia Iparraguirre, Fabián Garello y Oscar Masciarelli por su predisposición absoluta, su constante apoyo y colaboración.

A los estimados miembros del Jurado de Tesis: el Dr. Juan José Guiamet, la Dra. Celina Luna y la Dra. Elizabeth Agostini, quienes realizaron aportes esenciales en este estudio, como así también me guiaron, incentivaron y formaron durante la realización de mi tesis doctoral.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, Bioquímicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

RESUMEN

La salinización de los suelos es el factor que más ha influido sobre el establecimiento de las poblaciones humanas. La irrigación de cultivos con agua de alto contenido salino provoca, tras la evapotranspiración, la acumulación de sales en el suelo convirtiendo en improductivos a los suelos agrícolas. El efecto de la salinidad es el resultado combinado de su compleja interacción con los procesos fisiológicos, bioquímicos y morfológicos. Sin embargo, las plantas disponen de complejos mecanismos de respuesta a estos efectos de la salinidad que incluyen el transporte de iones para reestablecer la homeostasis, biosíntesis de solutos compatibles, así como la modificación en el balance de fitohormonas y reguladores del crecimiento. Las plantas halófitas son aquellas que naturalmente toleran altas concentraciones de sales en el suelo, y esta tolerancia es debida al desarrollo de diferentes mecanismos evolutivos y moleculares. Nuestra especie en estudio, *Prosopis strombulifera*, es abundante en los suelos salinos del sur de Córdoba y San Luis, donde las proporciones de NaCl y Na₂SO₄ son semejantes. Los estudios tomando a esta especie como un nuevo modelo de planta tolerante a salinidad, la cual nos permitirá ampliar el conocimiento de los mecanismos de respuesta a salinidad que operan en modelos ya existentes como *Arabidopsis thaliana* y *Thellungiella halophila*.

El comportamiento de las fitohormonas ácido abscísico (ABA), salicílico (SA) y etileno, así como el regulador de crecimiento óxido nítrico (NO), es prácticamente desconocido en halófitas, ya que la mayor parte de los estudios han sido realizados en glicófitas. Es por esto, que la hipótesis planteada en la presente tesis doctoral es que en la especie halófitas *P. strombulifera* los reguladores del crecimiento: ABA, etileno, SA y NO están involucrados en la homeostasis iónica y en la tolerancia diferencial a las dos sales más abundantes de los suelos de las salinas de Córdoba y San Luis. Por otra parte, NaCl ha sido históricamente utilizado como único agente salinizante, razón por la cual este estudio aportará, por un lado, un avance importante en el conocimiento y comprensión de las respuestas fisiológicas particulares de plantas halófitas, y adicionalmente se obtendrá información relacionada con las respuestas diferenciales de las plantas a las distintas sales que se encuentran naturalmente en los suelos salinizados.

SUMMARY

Soil salinization is one of the most important factor that negatively affects human populations. The crop irrigation with saline water causes the accumulation of salts in the soil, generating unproductive agricultural soils. The effect of salinity to the plants is the result of a complex interaction of morphological, physiological, biochemical and molecular processes. However, plants have diverse response mechanisms which include the ion transport to re-establish the homeostasis, compatible solutes biosynthesis, as well as the balance modification of phytohormones and plant growth regulators. The halophytic plants are those which naturally tolerate high salts concentrations in the soil, and this tolerance is due to different evolutive and molecular mechanisms. The species *Prosopis strombulifera*, is an abundant halophyte in the saline areas of Córdoba and San Luis, where NaCl and Na₂SO₄ proportions are similar. The study of this species will allow us to amplify the knowledge of different mechanisms that participate in other plants models, like *Arabidopsis thaliana* y *Thellungiella halophila*.

There are many studies of the role of abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and ethylene phytohormones, as well as the plant growth regulator nitric oxide (NO) in glycophytes, but it is barely known in halophytes. Therefore, our hypothesis is that the plant growth regulators: ABA, SA, ethylene and NO in *Prosopis strombulifera* are involved in the ionic homeostasis and in the differential tolerance to the most abundant salts of saline soils of Córdoba and San Luis. On the other hand, NaCl has been used as the only saline agent. Therefore, our study will contribute to the knowledge of the individual physiological responses of halophytic plants as well as the differential responses to both salts NaCl and Na₂SO₄.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	10
1. Impacto de la salinidad en las plantas	11
2. Las salinidad y las plantas halófitas	13
3. Fotosíntesis	16
4. Respiración	20
5. Caracterización del género <i>Prosopis</i>	22
6. <i>P. strombulifera</i> , nuestro modelo para estudiar la tolerancia a salinidad	23
7. Antecedentes en <i>P. strombulifera</i>	25
8. Papel de las fitohormonas en la salinidad	27
Hipótesis, Objetivo general	30
Objetivos específicos	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
1. Cultivo de plantas en medio hidropónico	32
2. Determinación de iones Na ⁺ y K ⁺	35
3. Determinación de pigmentos fotosintéticos	35
4. Determinación del contenido de MDA	36
5. Determinación del contenido de Prolina	36
6. Determinación del potencial osmótico	37
7. Análisis de los Ácidos Salicílico y Abscísico endógenos	38
8. Determinación de fluorescencia de clorofila	38
9. Determinación del oxígeno consumido por respiración	38
10. Determinación de Óxido Nítrico	38
11. Aplicación exógena de SA	39
12. Aplicación exógena de SNP	39
13. Aplicación exógena de c-PTIO	39
14. Aplicación exógena de ACC	39
15. Análisis estadísticos	39

RESULTADOS	41
1. Respuesta diferencial de <i>Prosopis strombulifera</i> frente a NaCl y Na₂SO₄	41
1.1. Evaluación del crecimiento en tallos y raíces de <i>P. strombulifera</i>	41
1.2 Determinación de clorofilas a, b y carotenoides	42
1.3 Contenido de Na ⁺ en hojas y raíces de plantas de <i>P. strombulifera</i>	43
1.4 Contenido de K ⁺ en hojas y raíces de plantas de <i>P. strombulifera</i>	44
1.5 Relación Na ⁺ /K ⁺ en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	45
1.6 Potencial osmótico en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	46
1.7 Acumulación de Prolina en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	47
1.8 Contenido de MDA en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	48
1.9 Determinación de Fv/Fm y rendimiento cuántico del PSII	49
1.10 Determinación de Fv/Fm en condiciones de luz solar y oscuridad	50
1.11 Determinación del quenching no fotoquímico (NPQ)	51
1.12 Determinación del flujo fotosintético de electrones	52
1.13 Respiración en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	53
1.14 Niveles de SA endógenos en hojas y raíces de plantas de <i>P. strombulifera</i>	54
1.15 Niveles de ABA endógenos en hojas y raíces de plantas de <i>P. strombulifera</i>	55
1.16 Acumulación de óxido nítrico (NO) en raíces de <i>P. strombulifera</i>	56
1.17. Discusión	58
1.17.1 Crecimiento de <i>P. strombulifera</i> en diferentes sales	58
1.17.2 Homeostasis iónica y balance osmótico	59
1.17.3 Impacto de la salinidad en los procesos de fotosíntesis	67
1.17.4 Impacto de la salinidad en el proceso de respiración	70
1.17.5. Salinidad y fitohormonas	73
RESULTADOS	80
2. Efecto de la humedad relativa del ambiente sobre <i>P. strombulifera</i>	80
2.1. Evaluación del crecimiento de tallos y raíces de <i>P. strombulifera</i>	82
2.2 Determinación de clorofilas a y b	83
2.3 Niveles de SA endógeno en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	84
2.4 Niveles de ABA endógeno en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	85
2.5 Discusión	86

RESULTADOS	89
3. Efecto del tratamiento exógeno con Ácido Salicílico sobre <i>P. strombulifera</i>	89
3.1 Evaluación del crecimiento frente a la aplicación exógena de SA	89
3.2 Contenido de clorofilas a y b	90
3.3 Acumulación de carotenoides	92
3.4 Acumulación de Na ⁺ en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	93
3.5 Acumulación de K ⁺ en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	94
3.6 Relación Na ⁺ /K ⁺ en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	96
3.7 Acumulación de Prolina en raíces y hojas de <i>P. strombulifera</i>	97
3.8 Contenido de MDA en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	98
3.9 Potencial osmótico en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	99
3.10 Niveles de ABA endógenos en hojas y raíces de plantas de <i>P. strombulifera</i>	100
3.11 Acumulación de SA endógeno en hojas y raíces de plantas de <i>P. strombulifera</i>	102
3.12 Discusión	104
RESULTADOS	111
4. Efecto del tratamiento exógeno con el SNP y c-PTIO sobre <i>P. strombulifera</i>	111
4.1 Evaluación del crecimiento de tallos y raíces de <i>P. strombulifera</i>	111
4.2 Evaluación del crecimiento de tallos y raíces a -1,9 y -2,6 MPa	112
4.3 Contenido de clorofilas a y b	113
4.4 Acumulación de carotenoides	115
4.5 Potencial osmótico en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	116
4.6 Relación de Na ⁺ /K ⁺ en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	117
4.7 Contenido de Prolina en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	118
4.8 Contenido de MDA en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	120
4.9 Determinación de fluorescencia de la clorofila frente a -1,9 y -2,6 MPa	121
4.10 Determinación de ψ_{PSII} y del ETR de plantas de <i>P. strombulifera</i>	122
4.11 Respiración en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i>	123
4.12 Acumulación del contenido de Óxido Nítrico a -1,9 y -2,6 MPa	124
4.13 Discusión	125

RESULTADOS	134
5. Efecto del tratamiento exógeno con ACC sobre <i>P. strombulifera</i>	134
<i>5.1 Evaluación del crecimiento de tallos y raíces de <i>P. strombulifera</i></i>	134
<i>5.2 Contenido de clorofila a, b y carotenoides en plantas de <i>P. strombulifera</i></i>	135
<i>5.3 Relación de Na^+/K^+ en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i></i>	137
<i>5.4 Acumulación de Prolina en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i></i>	138
<i>5.5 Contenido de MDA en hojas y raíces de <i>P. strombulifera</i></i>	139
5.6 Discusión	141
6. Toxicidad iónica causada por SO_4^{2-}	145
7. CONSIDERACIONES FINALES	148
BIBLIOGRAFÍA	153

INTRODUCCIÓN

La salinización es uno de los mayores problemas ambientales que enfrenta la agricultura en la actualidad y es una amenaza para la disponibilidad de tierras cultivables, afectando casi un millón de hectáreas a nivel mundial (Munns y Tester 2008; FAO, 2008). Uno de los principales factores causantes de la salinización del suelo es el riego de las tierras cultivables con agua salina. El riego se utiliza en casi 300 millones de hectáreas en el mundo, por lo que la agricultura utiliza alrededor del 90% del total de agua disponible para producir un 36% de alimento global (ICID 2009). Se ha estimado que el incremento de la salinidad en tierras cultivables tendrá efectos devastadores, resultando en una pérdida del 30% de los suelos dentro de los próximos 25 años, y del 50% para el año 2050. Este fenómeno incluye diferentes procesos que inducen a la pérdida de fertilidad a causa de cambios químicos, físicos y biológicos, afectando las propiedades fisiológicas del suelo y las comunidades ecológicas asociadas a éste. El mayor impacto de la salinidad incluye: disminución en la producción agrícola, baja rentabilidad económica de esas tierras debido a los altos costos de manejo, erosión debida a la gran dispersión de suelos, desbalance ecológico por un incremento de las formas de vida halófitas o marinas, y por último daños en la salud humana debido principalmente a los efectos tóxicos de elementos como B, F, y Se (Koca y col., 2007). 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. Los iones y los elementos presentes se originan de procesos de mineralización y desgaste de las rocas que forman la corteza terrestre y de emanaciones del manto terrestre, a través de la actividad volcánica. En cuanto a su composición, estas sales son el resultado de la combinación de unos pocos elementos químicos, fundamentalmente: O, Ca, Mg, Na, K, Cl, S, C, N. Estos elementos necesarios para la formación de las sales son muy frecuentes en la corteza terrestre (Rengasamy, 2006).

La salinidad ha sido clasificada en salinidad “primaria”, resultado de la acumulación de sales por largos períodos de tiempo por procesos naturales; y salinidad “secundaria”, resultado de la actividad del hombre quien ha modificado el balance hidrológico en el suelo entre el agua aplicada (riego y lluvia) y el agua utilizada por los cultivos (transpiración). (Rengansamy, 2006; Manchanda y Garg, 2008). De acuerdo a Flores (1993), la salinidad

primaria está ampliamente distribuida en el globo terráqueo y se incrementa a medida que se presentan cambios climáticos mayores; procesos geomorfológicos de sedimentación, erosión y redistribución de materiales, así como cambios en la hidrología superficial y subterránea. Además de las extensas áreas de suelos con salinidad primaria en el mundo, en los últimos años se ha incrementado considerablemente la salinidad secundaria en extensos territorios, debido fundamentalmente a los efectos del regadío. Para garantizar el suministro de agua y tener agricultura, se ha implantado el riego sin haber previsto la instalación de sistemas de drenaje, lo que ha conllevado al incremento de la salinidad de los suelos, por la ascensión de las sales que se encontraban localizadas por debajo de los 20 cm. de profundidad. Esto se ve intensificado por las particularidades climáticas que aumentan su concentración en el suelo. Este problema se puede agravar con otras fuentes adicionales de electrolitos, como el uso de fertilizantes y la calidad del agua de riego. La significación relativa del aporte de cada fuente suministradora de sales, depende de las condiciones del suelo, la efectividad del drenaje, la calidad del agua de riego, la sobreexplotación del manto y las prácticas de manejo agronómico (Shabala y Munns, 2012)

1. Impacto de la salinidad en las plantas

El efecto de la salinidad en las plantas es el resultado combinado de su compleja interacción con los procesos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Turkan y Demiral, 2009). Desde el punto de vista fisiológico, la salinidad puede afectar el crecimiento de las plantas de distintas maneras, siendo los estadios de germinación y crecimiento de plántula las etapas críticas en el establecimiento de una especie bajo condiciones naturales en estos ambientes. El efecto más común es la reducción del desarrollo debido a: una disminución del potencial osmótico del medio y, en consecuencia del potencial hídrico del suelo; una toxicidad específica, normalmente asociada en la bibliografía con la absorción excesiva de Na^+ y de Cl^- ; un desequilibrio nutricional debido a la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales y la combinación de estos efectos. Como consecuencia, a menudo ocurren estreses secundarios tales como el daño oxidativo (Zhu, 2002). Sin embargo, las plantas disponen de complejos mecanismos de respuesta a estos efectos de la salinidad que incluyen: la exclusión selectiva de iones para

reestablecer la homeostasis, compartimentalización de iones en vacuolas, biosíntesis de solutos compatibles, inducción de enzimas antioxidantes, control del flujo hídrico, síntesis y estimulación de fitohormonas, entre otros (Parida y col., 2004; Adem y col., 2014). El mayor o menor grado de inhibición del crecimiento por salinidad difiere notablemente en las distintas especies y en menor grado, entre variedades de una misma especie. Shannon y Grieve (1999) afirmaron que el factor osmótico de la salinidad es responsable no sólo de la reducida tasa de crecimiento, sino también de los cambios en el color de las hojas y en la proporción raíz/tallo, mientras que el efecto iónico se manifiesta generalmente como daños en el meristema y hojas jóvenes, o como síntomas típicos de desórdenes nutricionales. Según Koyro (2006), la salinidad produce la reducción en el potencial agua del medio externo, lo cual provoca una disminución del crecimiento y se producen efectos de antagonismo o sinergismo en la absorción de iones que son de interés particular: iones que están en elevada concentración en la solución externa (por ej. Na^+ , Cl^- o Ca^{2+}), son incorporados a alta velocidad, lo cual puede provocar una acumulación excesiva en el tejido. A su vez, éstos pueden inhibir la incorporación de otros por parte de la raíz (por ej. K^+) y su transporte al tallo vía xilema, provocando eventualmente una deficiencia en los tejidos superiores. De este modo, no cabe duda que ocurren variadas interacciones iónicas en plantas bajo estrés salino que implican importantes consecuencias para el crecimiento de las mismas. En síntesis, las distintas especies emplean diferentes caminos para combatir el estrés iónico impuesto por la alta salinidad. Esto incluye restricción en la absorción de iones, un aumento en la exclusión de los mismos y su compartimentalización, y control estricto del transporte a larga distancia, fundamentalmente hacia las hojas (Shabala y Mackay, 2011).

Como se mencionó anteriormente, en sistemas naturales, el grado de salinización y el tipo de sales presentes varía en los diferentes tipos de suelo y con la fuente de provisión de agua de los mismos. En la mayoría de los casos, los principales cationes presentes en la solución son Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , mientras que los principales aniones son Cl^- , SO_4^{2-} y CO_3H^- . Bajo condiciones fisiológicas típicas, las plantas mantienen la proporción K^+/Na^+ constante. El K^+ se mantiene relativamente alto, de 80-100 mM y las concentraciones de Na^+ bajas, de 1-10 mM (Bassil y col., 2012). Un aumento en la concentración intracelular del Na^+ establecerá un gradiente de potencial electroquímico que favorecerá el transporte pasivo de

este ion al citosol. Los antiportadores de Na^+/H^+ participan en la compartimentación dentro de la vacuola y la extracción de Na^+ del citoplasma de la célula, procesos que son claves en la acción concertada para la desintoxicación y la regulación osmótica del Na^+ citoplasmático (Shabala y Mackay, 2011). Por otro lado, para compensar en el citoplasma los potenciales osmóticos generados en la vacuola, las plantas sujetas a estrés salino despliegan un complejo abanico de respuestas fisiológicas incluyendo la producción de solutos compatibles y proteínas específicas. En algunas especies, ciertas sustancias como prolina, betaínas, carbohidratos y proteínas se sintetizan en las células que están sujetas a estrés por sequía o altas concentraciones de sal, a las cuales se les conoce como osmorreguladores (Adem y col., 2014). Muchos de los solutos y proteínas del estrés poseen funciones aún desconocidas, pero probablemente detoxifican a las plantas de agentes estresantes o las previenen de posibles daños en su estructura.

En las plantas, otro proceso que resulta afectado por la exposición a altas concentraciones de sal es la fotosíntesis, en la cual se pueden alterar los eventos de captación de luz y el potencial redox y en consecuencia las alteraciones energéticas pueden ocasionar un daño oxidativo (El-baky y col., 2003; Parvaiz y Satyawati, 2008).

2. La salinidad y las plantas halófitas

La mayoría de la superficie terrestre (72%) posee altas concentraciones de iones en el suelo, principalmente iones Na^+ y Cl^- . La concentración de Na^+ en el océano es de 480 mM aproximadamente, y de 560 mM la de Cl^- ; existen también pequeñas concentraciones de otros elementos como Mg^{2+} (55 mM), SO_4^{2-} (29 mM), K^+ (10 mM) y Ca^{2+} (10 mM), y muy pequeñas cantidades de H_2PO_4 y NO_3^- (Flowers y Colmer, 2015).

Las concentraciones de Na^+ y Cl^- presentes en el agua de mar son dañinas para el crecimiento de la mayoría de las plantas, pero no de todas. Las plantas halófitas son aquellas que naturalmente toleran altas concentraciones de sales en el suelo, y esta tolerancia es debida al desarrollo de diferentes mecanismos evolutivos y moleculares (Yang y col., 2009), o inclusive algunas requieren salinidad para favorecer su desarrollo y productividad; mientras que las glicófitas reducen su crecimiento y productividad o mueren, frente a condiciones de salinidad. Las plantas halófitas responden al estrés salino a

tres niveles diferentes, celular, tisular y a nivel de planta entera. Por lo tanto, para comprender y conocer la tolerancia a salinidad en este tipo de plantas se deben estudiar los mecanismos de cada nivel individualmente. Existen gran cantidad de trabajos que estudian el efecto de la salinidad sobre las plantas cultivadas, sin embargo, pocas investigaciones son llevadas a cabo para entender cómo las halófitas responden a condiciones salinas, por lo cual resulta necesario avanzar en la comprensión de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos, y moleculares de la tolerancia a sal en plantas halófitas, en cuyo análisis se ha sugerido focalizar más atención (Flowers y Colmer, 2008; Shabala y Mackay, 2011).

El crecimiento y la supervivencia de las plantas a las condiciones de salinidad del suelo dependen tanto de la adaptación al bajo potencial agua como a la gran concentración de sodio. El estrés salino causa un desbalance iónico, con exceso de iones Na^+ y Cl^- , provocando efectos deletéreos sobre el crecimiento de las plantas; de esta manera las plantas dependen de sus adaptaciones para reestablecer la homeostasis. La salinidad implica un “shock” osmótico sobre las plantas ya que la actividad del agua disminuye causando una pérdida de la turgencia celular, la reducción en el volumen del estroma de los cloroplastos y la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs), que juegan un papel importante en la disminución de la capacidad fotosintética y por lo tanto, en el crecimiento. Debido a estos factores, la mayoría de las halofitas presentan un crecimiento reducido en condiciones de salinidad elevada (Grigore y col., 2012).

Es bien sabido que todas las plantas halófitas deben realizar ajuste osmótico para alcanzar un bajo potencial agua interno. Sin embargo, las especies difieren en los mecanismos para tal fin, que incluyen la producción de solutos osmocompatibles, la incorporación de solutos inorgánicos (iones) (Gong y col., 2005) y la succulencia (contenido de agua por unidad de superficie de la hoja) (Flowers y Colmer, 2015). Los iones monovalentes son tóxicos en las concentraciones necesarias para realizar el ajuste osmótico, por lo tanto, es necesario que Na^+ y Cl^- sean compartimentalizados, predominantemente en vacuolas, de modo que las concentraciones en el citoplasma se mantengan dentro de límites tolerables (Bassil y col., 2012). En los casos en los cuales se ha podido calcular la tasa Na^+/K^+ , los coeficientes varían entre 2,5 y 21 veces más alta en la vacuola que en el citoplasma. Curiosamente, en las vacuolas de las glicófitas esta proporción es muy inferior a la de las plantas halófitas (Ellouzi y col., 2011).

El transporte de iones a través del tonoplasto hacia el interior de la vacuola, es llevado a cabo por una fuerza motriz de protones (PMF) generada por una ATPasa- H^+ y una pirofosfatasa- H^+ vacuolar (Gaxiola y col., 2001; Bartels y Sunkar, 2005). Sin embargo, la compartimentalización de iones se basa no sólo en el transporte a través del tonoplasto sino también en la capacidad de retención de iones dentro de las vacuolas, propiedad que se correlaciona con una elevada proporción de fosfolípidos, proteínas, complementos de ácidos grasos altamente saturados, una mayor proporción de colesterol total y menor fluidez del tonoplasto (Adem y col., 2014). En *Arabidopsis* se ha propuesto que el transporte de Na^+ desde el citoplasma es mediado por un intercambio de Na^+/H^+ producido por el antiportador SOS1 ubicado en la membrana plasmática, o por NHX1 ubicado en el tonoplasto (Apse y Blumwald, 2007). Chinnusamy y col. (2004) han sugerido que SOS1 actúa como sensor de Na^+ celular, y un aumento del mismo desencadena un incremento en las concentraciones de la fitohormona ácido abscísico (ABA) y de las EROS. Sin embargo, el mecanismo de acción de las diferentes proteínas involucradas en el transporte de Na^+ intracelular aún no ha sido completamente dilucidado en halófitas.

Adicionalmente a la compartimentalización de iones, es necesaria la acumulación de solutos compatibles. Como se mencionó anteriormente, para contrarrestar el balance iónico y el potencial osmótico de las vacuolas, el citoplasma acumula compuestos de bajo peso molecular denominados solutos compatibles, es decir, solutos que no interfieren con las reacciones bioquímicas celulares (Zhifang y Loescher, 2003). La acumulación de estos compuestos dentro de los límites específicos de cada especie asegura el balance osmótico para continuar con la entrada de agua (o disminución de la salida de agua), la protección de estructuras celulares y la reducción del daño oxidativo por las EROs producidas en respuesta a salinidad (Adem y col., 2014). Los solutos que se acumulan incluyen azúcares (por ej. sacarosa) azúcar-alcoholes (por ej. sorbitol), aminoácidos (por ej. prolina), compuestos metilados (por ej. metil-prolina), betaínas (por ejemplo, glycinebetaína), entre otros (Rhodes y col., 2002, Llanes y col., 2013). El aminoácido prolina también está presente en halófitas de una amplia gama de familias, sin embargo, Tipirdamaz y col., (2006) señalan que “las especies que se comportan como acumuladoras de glicín-betaina poseen poca acumulación de prolina y viceversa”. Resultados previos en nuestro laboratorio confirman esta aseveración, ya que *P. strombulifera* no produce betaínas y en

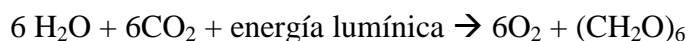
cambio acumula grandes cantidades de prolina en salinidad independientemente de la composición química de las sales, sugiriendo que actúa como señal de estrés y no de tolerancia tal como se propuso en Llanes y col. (2013).

3. Fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso biológico complejo que tiene lugar principalmente en las hojas de las plantas, las cuales están constituidas esencialmente por tejidos fotosintéticos. A nivel celular, toda la maquinaria fotosintética se localiza específicamente en los cloroplastos. Los cloroplastos son orgánulos separados del citosol por una membrana denominada envoltura cloropástica. Las membranas del interior del cloroplasto constituyen los tilacoides, las cuales están constituidas por bicapas lipídicas. Los complejos fotosintéticos se insertan transversalmente en el fluido bidimensional de las membranas tilacoidales, permitiendo el movimiento lateral de los mismos (Azcón Bieto, 2008).

Durante el proceso de fotosíntesis pueden distinguirse dos fases bien diferenciadas. Una primera etapa de absorción y conversión de energía que ocurre en los tilacoides y una segunda de asimilación de elementos constitutivos de la materia orgánica (C, H, O, N, S, etc.), la cual ocurre en el estroma del cloroplasto. La luz destinada a impulsar el proceso fotosintético es absorbida por dos tipos de pigmentos fotosintéticos: clorofilas y carotenoides, que son moléculas cromóforas sensibles a la radiación lumínica. El más importante de estos pigmentos es la clorofila, ya que interviene directamente en el proceso de absorción y transducción de la energía lumínica. Existen dos tipos de clorofilas vegetales, la clorofila *a* y *b*, las cuales están asociadas no covalentemente a los polipéptidos constitutivos de las antenas. Por lo tanto, su principal función es la absorción de luz en dichas antenas. Los principales carotenoides presentes en el cloroplasto son los α y β -carotenos, los cuales son más abundantes en los centros de reacción de los fotosistemas, siendo su función principal la de proteger el aparato fotosensible mediante mecanismos de disipación y extinción de energía. Tanto las clorofilas como los carotenoides poseen dobles enlaces conjugados, lo cual les confiere la capacidad para absorber fotones. De esta manera la energía lumínica es absorbida por estas biomoléculas fotosensibles y transformada en una forma de energía bioquímica estable. Los elementos constitutivos son tomados como

fuentes minerales inorgánicas (agua, dióxido de carbono, nitratos, sulfatos, etc.) e incorporados en biomoléculas orgánicas metabolizables. Ambas fases, la toma de energía y la toma de elementos, están perfectamente coordinadas e interrelacionadas. La primera fase es un proceso de conversión de energía lumínica en energía electroquímica. Se inicia con la absorción de la luz por ciertos complejos pigmento-proteína denominados “antenas”, cosechadoras de luz (LHC, *Light Harvesting Complexes*), y la posterior canalización de la energía de los fotones hacia los “centros de reacción” de los fotosistemas, donde la energía se transforma en un flujo de electrones entre moléculas oxido-reductoras. Las reacciones de oxido-reducción producen, en último término, dos biomoléculas estables (NADPH y ATP) que se van acumulando. Estas biomoléculas son útiles como fuente de energía asimiladora, ya que proporcionan poder de reducción NADPH y ATP, necesarios para la siguiente fase. En la segunda fase de la fotosíntesis, ocurren una serie de reacciones de asimilación de elementos necesarios para la constitución biomolecular: C, H, O, N, S, etc. El elemento esencial y mayoritario en la materia orgánica es el carbono. El carbono, en la fotosíntesis, es tomado del dióxido de carbono (CO₂) del aire. La reacción global de la fotosíntesis es la siguiente:



Como se mencionó previamente, la primera fase de la fotosíntesis es llevada a cabo en las tilacoides del cloroplasto, donde se encuentran 4 complejos proteínicos. Los 3 primeros están implicados en la transferencia electrónica a lo largo de la membrana y en la transferencia protónica a través de la membrana, del estroma al lumen tilacoidal. Además, dos de estos complejos son fotosistemas, capaces de absorber y transformar la energía fotónica en energía electroquímica redox. Se llaman fotosistemas I y II (PSI y PSII), los cuales incluyen las antenas extrínsecas LHCI y LHCII, respectivamente. En el corazón de los centros de reacción de los fotosistemas I y II se encuentran P700 y P680, respectivamente, los cuales están formados por un par de clorofilas *a*. El tercer complejo es un sistema conector entre ambos fotosistemas, llamado citocromo b₆f. Finalmente, el cuarto complejo se trata de una ATPasa que utiliza el gradiente de protones, los cuales, al fluir del lumen al estroma a favor del gradiente, proporcionan una fuerza proton-motriz que se utiliza para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi (Azcón Bieto, 2008; Taiz-Zieger, 2010).

Fotosistema II

El PSII es un macrocomplejo que cataliza la oxidación del agua y la reducción de la plastoquinona, ambas reacciones fotoinducidas. En él suceden dos procesos claves para la fotosíntesis: 1) La transducción de energía lumínica en energía redox, es decir, la transformación del flujo fotónico en flujo electrónico y 2) La hidrólisis del agua, dando como resultado electrones y protones, como así también oxígeno molecular. Desde el punto de vista estructural, este complejo multiproteínico posee 2 proteínas centrales, estructuralmente gemelas, que unen los principales cofactores implicados en la reacciones redox, denominadas D1 y D2. Unidas a estas, se encuentra la fosfoproteína PsbH, la cual une fosfato y el citocromo b559, el cual posee un grupo hemo redox y dos polipéptidos (PsbE y PsbF). Luego están las proteínas que unen específicamente clorofilas CP47 y CP43 (llamadas clorofilo-proteínas: CP), que constituyen la antena intrínseca del PSII. Todas las proteínas anteriormente nombradas forman el “núcleo” del centro de reacción del fotosistema, mientras que otras CP mas pequeñas están implicadas en la interconexión del centro de reacción con su antena extrínseca LHCII. La disposición y el número de estas CP varían según el estado funcional del PSII y su unión al LHCII. Asociadas al PSII en el lado del lumen hay 3 proteínas extrínsecas de membrana llamadas PsbO, PsbP y PsbQ, que participan de la fotólisis del agua y producción de oxígeno. También se ha identificado la proteína PsbR que posee una parte integrada en la membrana y otra extrínseca (Knoppová y col. 2014).

Fotosistema I

El PSI interviene en la parte final de la transferencia electrónica, tomando los electrones de la proteína plastocianina del lumen y cediéndolos a la ferredoxina del estroma. Estructuralmente, este fotosistema está constituido por dos grandes proteínas centrales PsaA y PsaB, las cuales unen los principales cofactores redox involucrados en la cadena de transporte de electrones, y unen también un gran número de clorofilas que funcionan como antena intrínseca del fotosistema. En el estroma, se encuentra la proteína PsaC integrada a este complejo, la cual liga los dos últimos cofactores redox. También se encuentran asociados una serie de polipéptidos transmembrana PsaI, PsaJ, PsaK y PsaL y otros que

posibilitan la interacción y transferencia redox de plastocianina y ferredoxina del PSI (Myles, 2003).

Complejos antenna LHCI y LHCII

Asociadas a cada fotosistema existen unas antenas extrínsecas, llamadas LHC (del inglés Light Harvesting Complexes: complejos colectores de luz). Las mismas, complementan la captación de luz que también tienen las antenas intrínsecas de cada fotosistema. La LHCI está constituida por polipéptidos de 4 tipos: LhcA1, A2, A3 y A4; mientras que la LHCII por polipéptidos de 3 tipos: LhcB1, B2 y B3.

El complejo antena LHCII es más variable en composición y puede moverse por dentro de las tilacoides independientemente del PSII, sufriendo redistribuciones en respuesta a estímulos ambientales. Los principales pigmentos fotosintéticos asociados a estos complejos antena son las clorofilas de la matriz polipeptídica de las LHC. También son capaces de unir carotenoides (Taiz-Zieger, 2010).

Citocromo b₆f

El citocromo b₆f es una gran proteína multimérica, la cual posee 26 α -hélices transmembrana. Este complejo es estructural y funcionalmente homólogo al complejo bc₁ de la mitocondria. Contiene dos grupos hemo con proteínas de transferencia de electrones, llamados grupo sulfo-ferro. La principal función de este complejo es conectar los dos fotosistemas, oxidando el plastoquinol (PQH₂) producido en el PSII y reduciendo la plastocianina (Pc) que se oxidará en el PSI. Estructuralmente, está compuesto por el citocromo f con un grupo hemo tipo c localizado extrínsecamente en el lumen; por el citocromo b₆, con 2 grupos hemo tipo b localizados dentro de la membrana; la proteína Rieske, la cual posee un grupo sulfo-ferro 2Fe-2S y la subunidad IV, que interviene en la unión de las quinonas.

Por otro lado, este complejo puede participar también en una vía alternativa de transferencia de electrones cíclica. Bajo ciertas condiciones, los electrones derivados del par de clorofilas P700* no son transferidos hacia el NADP⁺, sino que la ferredoxina reducida contribuye con su electrón a la plastoquinona. Luego, este electrón es luego transferido al complejo b₆f y luego nuevamente al *700. Este ciclo no genera producción de

O₂ o reducción de NADP⁺, pero si genera síntesis de ATP vía el denominado “ciclo de fotofosforilación” (Myles, 2003).

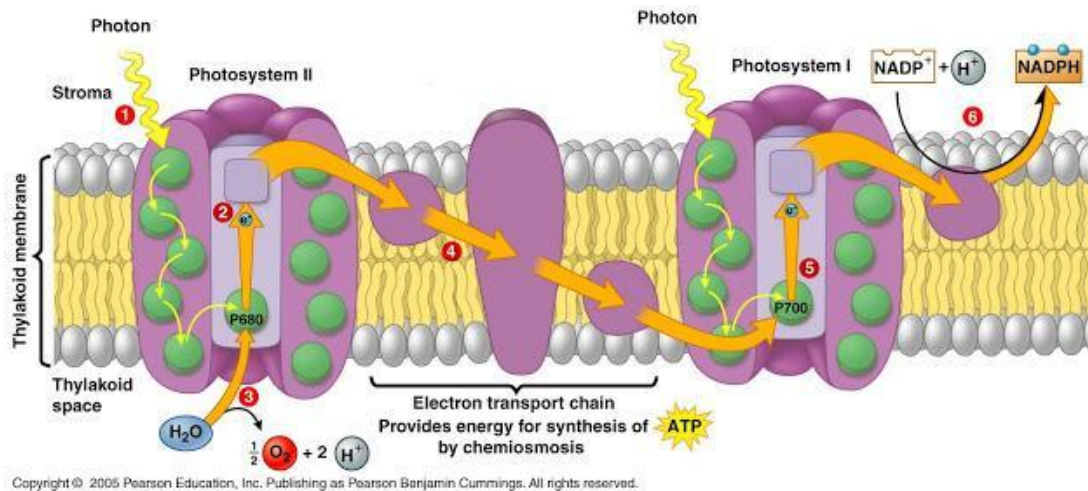


Fig.1: Cadena fotosintética de transporte de electrones

4. Respiración

El proceso de respiración implica la oxidación completa del carbono reducido que es generado durante la fotosíntesis para la síntesis de ATP. Este proceso comprende tres etapas: la glucólisis, que ocurre en el citosol, el ciclo del ácido cítrico mejor conocido como ciclo de Krebs, que ocurre en la matriz mitocondrial y la cadena de transporte de electrones, que ocurre en la membrana interna de la misma organela (Atkin y Tjoelker 2003). En términos generales, la glucólisis es un proceso en el que la sacarosa es dividida en dos azúcares de seis carbonos, los cuales entran a la cadena de reacciones y son convertidos en moléculas de piruvato que al perder un átomo de carbono, ingresan al ciclo de ácidos tricarboxílicos como Acetil-CoA, en la mitocondria; adicionalmente se obtiene energía química en forma de ATP en pequeñas cantidades, poder reductor en forma de NADH y algunos ácidos orgánicos como el malato (Rocha y col., 2010). Dentro de la mitocondria se desarrollan las dos fases de la respiración; en la matriz de esta organela se encuentra la maquinaria enzimática necesaria para dirigir el conjunto de reacciones del Ciclo de Krebs, en las cuales se obtienen como productos, dióxido de carbono (CO₂) y precursores de otras rutas metabólicas de importancia para la célula. Adicionalmente se genera una gran

cantidad de poder reductor y se sintetiza ATP (Van der Merwe y col., 2010). La última fase respiratoria, la fosforilación oxidativa, es un proceso que está acoplado a varios complejos, en su mayoría proteicos, que se encuentran embebidos en la membrana interna y consiste en una serie de reacciones de oxido-reducción que finalmente reducen la molécula de oxígeno, obteniendo como resultado agua. En esta cadena de transporte de electrones se utiliza la mayor parte de poder reductor generado en las fases anteriores y se genera un gradiente de concentración de protones hacia el espacio intermembranal, con el cual se produce la síntesis de ATP (Kadenbach y col., 2010). En la matriz mitocondrial, se encuentra la enzima NAD⁺ málica, la cual cataliza la descarboxilación del malato para producir piruvato, el cual, como se mencionó previamente, es el producto final de la glucólisis y precursor en el ciclo del ácido cítrico; con la presencia de esta enzima se asegura la continuidad del ciclo y además se regula el nivel de ácidos orgánicos dentro de la célula. En segunda instancia, junto a la membrana interna de la mitocondria se encuentran enzimas complementarias de la cadena de transporte de electrones; son cuatro enzimas NAD(P)H deshidrogenasas, dos en el lado externo y dos en el lado interno de la membrana, tres de ellas dependientes de calcio y todas bombeando electrones al pool de ubiquinonas, cuyos sustratos son NADH y NADPH que provienen de diferentes etapas de los procesos previos a la fosforilación alternativa (Schertl y Braun, 2014).

Por otro lado, se encuentra una enzima muy particular y específica de las mitocondrias vegetales, la oxidasa alternativa (AOX), la cual es una oxido-reductasa que transfiere electrones desde el ubiquinol (la forma reducida de la ubiquinona) para reducir oxígeno y producir agua (Schertl y Braun, 2014). Esta enzima, es una vía alternativa al paso de electrones por los complejos enzimáticos, sin que ocurra exportación de electrones, y por lo tanto, sin generación del gradiente de concentración de protones necesario para la producción de ATP. Siendo la fosforilación oxidativa una de las formas más eficientes de producir ATP, es difícil entender por qué la planta ha desarrollado vías alternativas precisamente para reducir esta alta eficiencia. Algunas de las explicaciones que se han encontrado están relacionadas con la necesidad de aumentar la temperatura en ciertos estadios particulares del desarrollo floral, en los que, específicamente en este tipo de tejidos, se ha observado mayor actividad de AOX, puesto que la energía que no es convertida en ATP, es disipada como calor (Taiz y Zeiger, 2010). Además, se ha

encontrado que la activación de esta vía alternativa está regulada por ciertos metabolitos, de manera que la AOX constituye un regulador de la producción de ATP (Schertl y Braun, 2014). Adicionalmente se ha observado una participación de la AOX en diferentes situaciones de estrés, en las cuales al verse afectada la tasa de respiración normal, esta vía alternativa puede ser un mecanismo para evitar la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), al evitar la sobre-reducción del pool de ubiquinonas (Sieger y col., 2005). De esta forma, la ruta alternativa podría reducir los efectos perjudiciales del estrés sobre la respiración (Jacoby y col., 2011). Cabe destacar que en la última década ha habido un incremento en el interés en las interacciones entre la respiración y la fotosíntesis, ya que hay varias vías metabólicas importantes, como la fotorrespiración y la asimilación de nitrógeno que requieren que las reacciones ocurran en ambas organelas, mitocondria y cloroplastos (Bartoli y col., 2005).

5. Caracterización del género *Prosopis*

En nuestro país existen poblaciones de leguminosas exitosamente adaptadas a ambientes salinos y diferenciadas evolutivamente en su estrategia de tolerancia a la sal. El género *Prosopis* pertenece a la familia *Fabaceae* (Leguminosae), sub-familia Mimosoideae. Según Rzedowski (1988), a nivel mundial existen 44 especies de este género, 40 de las cuales se encuentran en el continente americano, distribuidas en dos grandes centros: el norteamericano (Mexicano-Texano) y el sudamericano (Argentino-Paraguayo-Chileno) (Fig. 2). Además se han hallado 3 especies al norte de Asia y 1 al oeste de África. En America, Argentina posee 28 especies nativas, 13 de las cuales son endémicas, 6 son autóctonas de la región andina y 8 se encuentran en el estado de Texas (Burkart, 1976). Existen variados tipos biológicos de *Prosopis*, es decir, subarbustos, arbustos y árboles que en su mayoría se comportan como oportunistas respecto al 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 exhiben un alto grado de tolerancia a la salinidad, ubicándose entre las especies del ambiente terrestre más resistentes a concentraciones salinas extremas. Por este motivo, estas plantas juegan un rol importante actuando como estabilizadores del ambiente y

además producen una variedad de productos útiles al hombre que pueden contribuir a aumentar la calidad de vida de las poblaciones rurales en estas áreas (Felker, 2007). No obstante, el conocimiento de sus características fisiológicas y bioquímicas es muy limitado, probablemente porque su distribución es mayoritariamente en Centro y Sudamérica.



Fig. 2: Distribución del género *Prosopis* (Adaptado de Pasiiecznik y col., 2001)

6. *Prosopis strombulifera*, un modelo para estudiar la tolerancia a salinidad

La especie *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth. (Burkart, 1976) se distribuye desde el desierto de Arizona (USA) hasta la Patagonia (Argentina), zonas donde debe tolerar prolongados períodos de sequía. Es un arbusto espinoso de 0,15 a 1,5 m de alto con raíces rastreras subterráneas. Las ramas poseen espinas rectas y estípulas de color ceniza, de 0,1 a 2 cm de largo, fuertemente orientadas hacia abajo. Las hojas tienen un sólo par de pinnas de

1 a 3 cm de largo, con 3 a 8 pares de foliolos por pinna, siendo los foliolos cerosos, pubescentes o glabros, de 2 a 15 mm de largo, 0,8 a 2 mm de ancho, oblongos y con una a 3 nervaduras en su base. Los foliolos se dispersan a lo largo del raquis a distancias de una a tres veces su ancho. Las inflorescencias son axilares, solitarias, pedúnculo 1,5 a 5 cm de largo. Las cabezas son globosas, de alrededor de 1,5 cm de diámetro y contienen flores amarillas. Tanto el cáliz como la corola son estriados. El cáliz es lanoso, de 1,5 a 2,2 mm de largo. Los pétalos están unidos por una distancia igual a su ancho. Son de 3 a 4 mm de largo y pelosos en su interior. El estambre y el estilo se extienden arriba de la corola, y el ovario es peloso. Las vainas son de color amarillo limón cuando maduras y lanosas en su juventud. Son estrechamente enroscadas formando un cilindro denso, cerrado como un sacacorchos, de 3 a 5 cm de espesor. El exocarpio es quebradizo. El endocarpio es segmentado y fácil de abrirse. El mesocarpio es pulposo, tánico y de color rojizo. Las semillas son ovadas, verde grisáceas y de 4,5 a 5,4 mm de largo (Llanes, 2010).

Esta especie es muy abundante en las áreas salinas de Córdoba y San Luis, donde las proporciones de NaCl y Na₂SO₄ son semejantes, e inclusive en algunas muestras de suelo es mayor la de este último (Sosa y col., 2005). El área de muestreo del presente estudio está situada en el sudoeste de la provincia de San Luis, en las inmediaciones del arroyo El Bebedero, sobre la ruta nacional N°146 (33°43' Lat S; 66°37' Long O). El suelo es salino, lo cual fue demostrado a través de la medición de la CE en pasta de saturación, arrojando valores de 8 dSm⁻¹ en los primeros 10 cm de profundidad superando los 10 dSm⁻¹ a los 25-35 cm de profundidad. Con respecto a su composición química, el catión predominante es el Na⁺ y los aniones mayoritarios son el SO₄⁻² en primer lugar y el Cl⁻ en segundo lugar. El pH del suelo es de 7.5 y la textura oscila de arenosa a franco arenosa-franco limosa (Sosa, 2005). A pesar de que existe una gran variedad de iones en el suelo, la mayoría de la literatura se focaliza sobre el efecto del NaCl, sin tener en cuenta otras sales o la combinación de las mismas, limitándose la extrapolación de estos resultados a condiciones reales de campo.

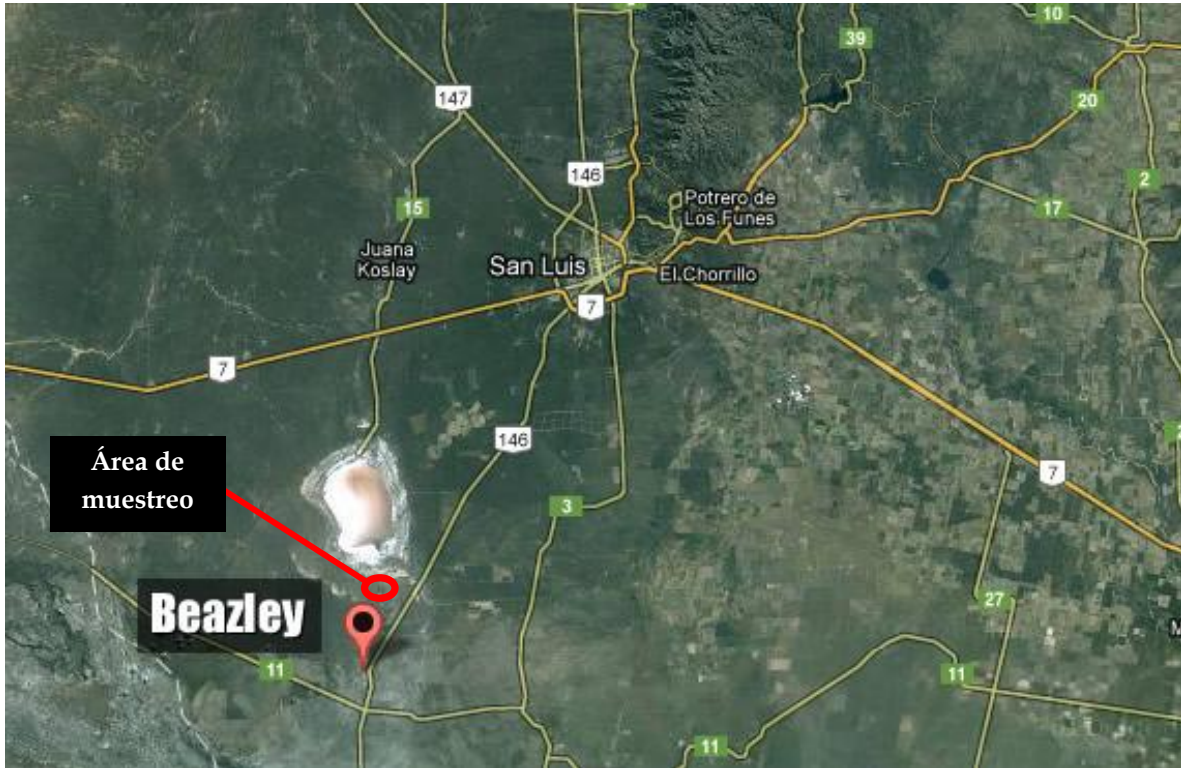


Fig 3: Área de muestreo en la provincia de San Luis de *P. strombulifera*

7. Antecedentes en *P. strombulifera*

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio se demostró que genotipos de esta especie cultivados en hidroponía exhibieron una notable tolerancia a NaCl en comparación con Na₂SO₄, ya que mostraron estimulación del crecimiento de tallos y raíces hasta concentraciones de 450 mM NaCl (Reinoso y col., 2004). Estas plantas fueron más vigorosas, tuvieron mayor número de hojas pero con folíolos más pequeños, y espinas más duras y oscuras. En este trabajo se comprobó también que *P. strombulifera* es poco tolerante a Na₂SO₄, ya que el crecimiento general de la planta se vio fuertemente afectado (Reinoso y col., 2005; Reginato y col., 2014a). Sin embargo, ambas sales incrementaron la acumulación de peso seco en hojas hasta -1.9 MPa.

Al igual que otras dicotiledóneas halófitas, *P. strombulifera* registró una importante acumulación de Na⁺ en hojas, principalmente con NaCl (0,6 mM.g⁻¹ PS en -2,6 MPa). En raíces, la acumulación de este ión fue mayor con Na₂SO₄ en todas las concentraciones. El contenido de K⁺ disminuyó en todos los casos a medida que aumentó la concentración de

sales en el medio. La acumulación de Ca^{2+} entre plantas no tratadas y tratadas fue diferente, siendo en estas últimas menor en todos los tratamientos, fundamentalmente en raíces, sugiriendo un transporte hacia hojas. La gran diferencia en la concentración de Ca^{2+} en relación con Na^+ y K^+ se debería a la presencia de canales catiónicos no selectivos que permiten un elevado flujo de estos cationes en lugar de calcio. En cuanto al NO_3^- no se registraron diferencias entre raíces tratadas y sin tratar. Se registró un contenido levemente mayor en hojas a medida que la planta maduró en todos los casos. Sin embargo, las cantidades que ingresan no alcanzan para neutralizar la gran cantidad de Na^+ . Por otro lado, el contenido de Cl^- aumentó a medida que se incrementó la concentración de NaCl en el medio. En el tratamiento con Na_2SO_4 , también se observó una importante acumulación de SO_4^{2-} en los tejidos, aunque fue mayor en hojas. Comparativamente, la acumulación de aniones fue muy inferior a la de ambos cationes (Reginato y col., 2014a).

Anatómicamente, las raíces de plántulas tratadas con ambas sales presentaron un desarrollo precoz de la endodermis y un parénquima cortical altamente vacuolizado, aunque el número de capas celulares fue 3 veces menor con NaCl que el observado en las raíces tratadas con sulfato (Reinoso y col., 2004; 2005), lo que se correlaciona con el menor contenido de Na^+ medido en estas últimas. Con respecto a las hojas, a partir de un potencial de $-1,9$ MPa se observó en ellas una mayor vacuolización de las células del parénquima empalizada, especialmente el dispuesto en la cara abaxial, donde se acumularía la gran cantidad de Na^+ encontrada en estos órganos. No se observaron estructuras especializadas de secreción de sal.

Por lo tanto, propusimos que esta especie debe disponer de mecanismos de osmorregulación y protección celular no iónicos que le permitan contrarrestar la elevada concentración de Na^+ en hojas y proteger la maquinaria fotosintética (Reginato y col., 2014a). En efecto, se demostró que *P. strombulifera* acumula, además de prolina, carbohidratos solubles y polialcoholes principalmente pinitol y manitol frente a NaCl , y también sorbitol frente a Na_2SO_4 , así como también acumulación de ácidos orgánicos del ciclo de Krebs lo cual fue interpretado como una respuesta al estrés causado por esta última sal (Llanes y col., 2013). Recientemente, se determinó una elevada producción de flavonoides principalmente en respuesta a sulfato como sistema antioxidante no enzimático

alternativo frente a la inhibición de la síntesis de carotenoides constitutivos del ciclo de las xantofilas (Reginato y col., 2014b).

8. Papel de las fitohormonas en la salinidad

Las respuestas de las plantas a estrés implican complejos cambios bioquímicos que incluyen modificaciones en el balance de fitohormonas endógenas, disminuyendo los niveles de algunas y elevando los de otras. Estas fluctuaciones hormonales alteran la dinámica celular, y por tanto, juegan un rol esencial en la regulación del crecimiento y diferentes mecanismos fisiológicos.

Es bien conocido que la concentración endógena de ABA en las plantas varía en función de los cambios ambientales, desempeñando un papel fundamental en el control de mecanismos de respuesta de tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico, principalmente estrés hídrico y salino (Peleg y Blumwald, 2011). Estas respuestas incluyen: cambios en la conductancia estomática (Wilkinson y Davies, 2010), crecimiento (Sharp y LeNoble, 2002, Hayashi y col., 2014), acumulación de osmolitos (Alves y Setter, 2004) y expresión de genes específicos (Raghavendra y col., 2010). Por este motivo, ABA es definido como la principal hormona del estrés debido a su rápida acumulación bajo estas condiciones y a su mediación en mecanismos fisiológicos y bioquímicos que ayudan a la supervivencia de las plantas frente a este tipo de situaciones (Zhang y col., 2006). La regulación de estos procesos es, en gran parte, mediada por cambios en su síntesis de novo y metabolismo (hidroxilación y conjugación) (Schwartz y col., 2003).

En trabajos previos se analizaron los niveles endógenos de ABA, ácido faseico (PA), dihidrofaseico (DPA) y ABA-glucosil-éster (ABA-GE) en raíces y hojas de plántulas cultivadas hidropónicamente en soluciones salinas iso-osmóticas de NaCl, Na₂SO₄ y la mezcla de ambas sales. Los resultados muestran que los niveles de ABA fueron diferentes según el tipo de sal y su concentración, el órgano analizado y la edad del mismo. Se observó una disminución en el nivel de ABA a -1.9 MPa en todas las raíces tratadas, lo que podría relacionarse con el hecho de que esa concentración de sal no implica estrés para la planta en el caso de las tratadas con NaCl, observándose un crecimiento óptimo que pone de manifiesto una respuesta halofítica. En presencia del ion sulfato, las hojas presentaron

mayor contenido de ABA siendo marcada esta diferencia a la más alta concentración de sal, coincidiendo con síntomas de toxicidad observados en estas plantas. En todos los tratamientos, las raíces y hojas acumularon principalmente ABA-GE, bajos niveles de DPA y en la mayoría de los casos PA no fue detectado. Es destacable la elevada acumulación de ABA-GE registrada en raíces y hojas sometidas a altas concentraciones de sal (700 mM, $\Psi_o = -2.6$ MPa), principalmente en plántulas tratadas con sulfato. Estos resultados demuestran que ABA-GE sería la forma principal de transporte de ABA hacia las hojas donde se registraron los mayores niveles de ABA libre y de actividad ABA-glicosilasa (Llanes y col., 2014).

Estas respuestas nos llevaron a interesarnos en profundizar en el estudio de los mecanismos de regulación hormonal frente al estrés generado por ambas sales, componentes mayoritarios de los suelos, resultando de gran importancia analizar el papel de otras hormonas involucradas en las respuestas a estrés, tales como ácido salicílico y etileno, así como también el segundo mensajero óxido nítrico.

El ácido salicílico (SA) es una fitohormona de naturaleza fenólica encontrada en diferentes especies vegetales, y para la cual se ha propuesto un papel importante en diferentes procesos de crecimiento y desarrollo tales como fotosíntesis, conductancia estomática, transpiración y termogénesis como inductor de la floración en gran variedad de especies (Hussein y col., 2007). También se ha demostrado su participación en la regulación de señales para expresión de genes de senescencia foliar (Volgemann y col., 2012), en la regulación del gravitropismo (Du y col., 2013), en la inhibición de la maduración de frutos (Srivastava y Dwivedi, 2000) y en el control de la incorporación de iones, su transporte por las raíces y conductancia estomática (Ben Ahmed y col., 2009). En lo que respecta a su papel en las respuestas de las plantas a condiciones ambientales adversas, el efecto del SA es un tanto ambiguo según la especie, el tipo de estrés y la dosis y tiempo de aplicación que se emplee. Numerosos trabajos han demostrado que el SA incrementa la tolerancia a estrés salino, participando en diferentes mecanismos de adaptación, como la disminución del daño fotosintético y oxidativo (Gémes y col., 2011; Xu y Tian, 2008; Arfan y col., 2007), inhibición de la acumulación de Na^+ y Cl^- (Gunes y col., 2007) y acumulación de carbohidratos solubles (Poór y col., 2011). Además, se ha observado que aplicaciones exógenas de SA inducen un aumento de los niveles de ABA, proponiendo un papel

protector frente a salinidad (Szepesi y col. 2009; Shakirova y col. 2003). Sin embargo, se ha descrito un efecto negativo del SA frente a estrés salino y osmótico, ya que estimuló la generación de las EROs y produjo un daño en la maquinaria fotosintética en plantas de *Arabidopsis thaliana*, evidenciándose síntomas de toxicidad en las mismas (Borsani y col., 2001; Hao y col., 2011).

El etileno es otra de las principales fitohormonas que regula muchos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal. Esta fitohormona regula procesos clave como lo son: el desarrollo de la raíz primaria, floración, maduración de frutos, dormición de semillas y germinación (Czarny y col., 2006; Delseny y col., 2008; Matilla y Matilla-Vázquez 2008; García y col., 2010). El etileno también es sintetizado en respuesta a diversos estímulos externos, como “wounding”, deshidratación, invasión de patógenos y anaerobiosis (Larkindale y Knight, 2002; Vahala y col., 2003; Lucena y col., 2006; Waters y col. 2007). Además, se han informado incrementos en la producción de esta hormona durante la germinación bajo condiciones de estrés salino con NaCl, particularmente en trigo (Xu y col., 2007), soja (Zhang y col., 2010), maíz (Datta y col., 1998) y también en plántulas de lechuga cultivadas con 150 mM de NaCl (Zapata y col., 2003). No obstante, su papel en la respuesta a salinidad permanece aún sin dilucidar, especialmente en plantas halofitas. La síntesis de etileno comienza con la transformación del aminoácido metionina a S-adenosilmetionina (SAM), catalizada por la enzima SAM-sintetasa. El paso limitante de la biosíntesis de etileno es la conversión del SAM a ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) y 5´metil tioadenosina (MTA) por la acción de la ACC sintetasa (ACS). El ACC es la forma de transporte del etileno, el cual es transportado hacia las hojas y oxidado a etileno (Matilla y col., 2014). Recientemente, Cao y col. (2007) han demostrado que la aplicación de ACC en plantas de *Arabidopsis* suprimió el fenotipo sensible a sal, y que la mutación del gen EIN2, componente central en la cadena de transducción de señales de etileno, resultó en un incremento en la sensibilidad a NaCl, sugiriendo que esta hormona desempeñaría un rol importante en la tolerancia a salinidad.

Como se mencionó previamente, uno de los osmolitos que más comúnmente se acumulan en plantas en respuesta a estrés abiótico es la prolina. Este compuesto se acumula en altas concentraciones en el citoplasma para contrarrestar el balance iónico en las vacuolas, sin interferir con las reacciones bioquímicas celulares. Algunas de las funciones propuestas

para su acumulación incluyen detoxificación de radicales libres y regulación celular redox (Trovato y col., 2008), siendo una respuesta común de las plantas superiores a déficits de agua, estrés salino o estrés por frío. Además de poseer un rol importante en el ajuste osmótico, la prolina actúa como un potente antioxidante no enzimático, protegiendo a las plantas frente al fuerte daño oxidativo generado por las EROs (Rejeb y col., 2014). Su producción frente a estrés salino ha sido suficientemente documentada (Meloni y col., 2001; Misra and Gupta, 2005; Llanes y col., 2010). Hamada (2001) y Sakhabutdinova y col. (2003) han sugerido que el papel protector de SA frente al estrés por salinidad estaría dado por su estimulación de la producción de prolina vía síntesis de ABA.

Por último, el óxido nítrico (NO), es una especie reactiva de nitrógeno que contiene un electrón desapareado ($:N^{\circ}=ö:$) y como tal, posee una enorme reactividad en la intermediación de procesos de óxido-reducción. Se lo ha involucrado en respuestas a estrés biótico y abiótico como sequía, salinidad, estrés por altas temperaturas, resistencia a enfermedades y apoptosis (Wang y col., 2009). Estudios previos han demostrado que aplicado exógenamente, el NO atenuó el incremento de la tasa Na/K inducido por NaCl y estimuló la ATP-asa de la membrana plasmática (PM) (Zhao y col., 2004; 2007). Recientemente, Wang y col. (2009) han propuesto que etileno y NO tendrían un efecto cooperativo en la activación de ATP-asas PM para la modulación de la homeostasis iónica requerida para la tolerancia a salinidad, y que etileno sería parte de la cadena de señales corriente abajo de NO.

El comportamiento de estos compuestos es prácticamente desconocido en halófitas, ya que la mayor parte de los estudios han sido realizados en glicófitas. Por otra parte, NaCl ha sido históricamente utilizado como único agente salinizante, razón por la cual este estudio aportará, por un lado, un avance importante en el conocimiento y comprensión de las respuestas fisiológicas particulares de plantas halófitas, y adicionalmente se obtendrá información relacionada con las respuestas diferenciales de las plantas a las distintas sales que se encuentran naturalmente en los suelos salinizados.

Por los antecedentes expuestos nos planteamos la siguiente **Hipótesis de Trabajo:** En la especie halófito *Prosopis strombulifera* los reguladores del crecimiento: ABA, etileno, SA y NO están involucrados en la homeostasis iónica y en la tolerancia diferencial a las dos sales más abundantes de los suelos de las salinas de Córdoba y San Luis.

Objetivo General

Aportar conocimiento sobre la regulación hormonal de la tolerancia a salinidad en la halófito *Prosopis strombulifera* e interpretar las posibles interrelaciones bioquímicas y fisiológicas entre estos compuestos.

Objetivos Específicos

- 1) Determinar los niveles endógenos de ácido salicílico (SA) y ácido abscísico (ABA) en hojas y raíces de plántulas de *Prosopis strombulifera* sometidas a concentraciones crecientes de NaCl y Na₂SO₄ frente a dos condiciones de humedades relativas, 30% y 70%.
- 2) Determinar los niveles endógenos de ABA y SA en hojas y raíces de plántulas de *P. strombulifera* sometidas a concentraciones crecientes de NaCl y Na₂SO₄ y previamente tratadas con SA exógeno y sin tratar.
- 3) Determinar la producción de óxido nítrico y su papel en la producción de etileno en hojas y raíces en plántulas sometidas a concentraciones crecientes de NaCl y Na₂SO₄ y previamente tratadas con un agente dador de NO, el nitroprusiato de sodio (SNP), y con c-PTIO (inhibidor de NO que específicamente atrapan el NO e impiden su acción biológica).
- 4) Determinar el crecimiento de las plantas, su potencial osmótico, estado oxidativo (MDA), síntesis de prolina, clorofilas, carotenoides y capacidad de compartimentalización de iones Na/K en hojas y raíces, en respuesta a la aplicación exógena de ACC.
- 5) Correlacionar las modificaciones observadas en los niveles hormonales con el crecimiento de las plantas, su potencial osmótico, estado oxidativo (MDA), síntesis de prolina, clorofilas, carotenoides y capacidad de compartimentalización de iones Na/K en hojas y raíces.

MATERIALES Y MÉTODOS

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. 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 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 respectivamente cada 48 hs, dejando como controles plántulas que permanecieron en Hoagland 25% durante todo el experimento (Tabla 1). Las bandejas se mantuvieron en una cámara de crecimiento Fitotrón Conviron Modelo E15 con 16 hs de luz a 250 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ y 8 hs de oscuridad, a 28° y 20° C de temperatura respectivamente y 70% de HR. Los pulsos de sal fueron aditivos hasta obtener un potencial final de -2.6 MPa el cual corresponde a una concentración de 700 mM para NaCl y 530 mM para Na₂SO₄. Después de 24 hs de alcanzarse los potenciales de -1, -1.9 y -2.6 MPa (29, 40 y 48 días desde el inicio del experimento), se tomaron muestras de hojas y raíces para los posteriores análisis, congelándolas en nitrógeno líquido y conservándolas en freezer a -80 °C hasta su uso. Para algunos análisis en los cuales se requiere material seco, las muestras fueron liofilizadas durante 48 hs.



Fig. 4: Cultivo hidropónico de *P. strombulifera*

En la **Tabla 1**, se muestra el cronograma de pulsos salinos cada 48 hs. en plantas de 21 días de edad. Cabe aclarar, que el volumen total de las bandejas plásticas que se utilizaron fue de 3,5 L, por lo que cada volumen de pulso que aparece en la tabla fue multiplicado por 3,5 de manera de alcanzar la concentración deseada. Asimismo, cada una de las soluciones salinas madre, tanto la de NaCl como la de Na₂SO₄, tienen una concentración de 1 mM, por lo que el volumen que agregue a cada bandeja coincidirá con la concentración final de cada una de las mismas en mM. El potencial osmótico de la solución de Hoagland fue de -0,3 MPa, por lo que las plantas sin salinizar fueron mantenidas a este potencial osmótico durante toda la experiencia.

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

PULSO SALINO	ml de Na ₂ SO ₄ por L Hoagland	ml de NaCl por L Hoagland	ψ _o
1° pulso- Cambio 21 días de cultivo	37.9	50	-0.3
2° pulso	75.8	100	-0.47
3° pulso	113.7	150	-0.65
4° pulso	151.6	200	-0.82
5° pulso Recolección- Cambio 29 días de cultivo	189.5	250	-1
6° pulso	227.4	300	-1.18
7° pulso	265.3	350	-1.35
8° pulso- Cambio	303.2	400	-1.53
9° pulso	341.1	450	-1.71
10° pulso Recolección- 40 días de cultivo	379.2	500	-1.88
11° pulso	416.9	550	-2.06
12° pulso-Cambio	454,8	600	-2.24
13° pulso	492.7	650	-2.42
14° pulso - Recolección 48 días de cultivo	530.6	700	-2.6

2. Determinación de iones Na⁺ y K⁺

Previo a las determinaciones se confeccionó una curva de calibración con concentraciones conocidas de Na⁺ y K⁺ registradas en el fotómetro de llama (Zeltec ZF250 IND) como meq./l. Para ello se ajustó a cero con un patrón blanco (agua deionizada) y a 100 con la muestra más concentrada (20 ppm de Na⁺ y K⁺). Se representó la intensidad emitida frente a cada concentración de patrón añadido, obteniéndose una línea recta. Luego, 1 ml del extracto se diluyó con agua deionizada hasta obtener un valor de lectura en el fotómetro de llama que estuviera comprendido en la curva patrón y los resultados fueron expresados en mmol/ g PS.

3. Determinación de pigmentos fotosintéticos

3.1.Extracción de clorofila a y b

Se pesaron 100 mg de peso fresco de hoja, se homogeneizaron en presencia de nitrógeno líquido y se agregaron 10 ml de acetona 80% v/v. Luego se pasó a un tubo Falcon y almacenó durante 1 hora a 4° C. Transcurrido este tiempo se mezcló con varilla de vidrio, se centrifugó 5 min a 5000 rpm, se pasó a un tubo limpio y se realizó su lectura en espectrofotómetro (Spectronic Helios UV-Vis Thermo Spectronic) a 650 y 665 nm (clorofila *b* y *a* respectivamente), habiendo calibrado previamente el aparato con un blanco de acetona 80% cada vez que se cambia la longitud de onda.

3.2. Extracción de carotenoides

Se trasvasó el volumen total de la extracción anterior a una ampolla de decantación, se agregaron 5 ml de NaOH 1M para saponificar y se agitó vigorosamente. Luego se agregaron 15 ml de éter sulfúrico y se particionó agitando 1 min, dejando luego decantar. Se pasó la fracción etérea a un tubo limpio y se realizó la lectura en espectrofotómetro a 450 nm (carotenos).

Para determinar la concentración de clorofila a, b y carotenos se aplicaron las fórmulas de Vernon (1960) y Mac Kinney (1941):

Clorofila a: 11,63 mg. L⁻¹(Abs 665) - 2,39 (Abs 650)

Clorofila b: 20,11 mg. L⁻¹ (Abs 650) - 5,18 (Abs 665)

Carotenos (µg/ml): Abs 450 x Vol x (10/2500)

4. Determinación del contenido de malondialdeído (MDA)

La concentración de MDA se determinó como indicador de peroxidación de lípidos según Heath y Packer (1968). El ácido tiobarbitúrico (TBA) reacciona con el grupo aldehído del MDA (producto final de la lipoperoxidación) dando un compuesto (MDA-TBA) de color rosado que posee su máximo de absorbancia en 532 nm. Para la extracción, 0,15 g de material vegetal (hojas y raíces) se homogeneizaron con nitrógeno líquido en 10 volúmenes (1,5 ml) de TCA 20% (p/v) y se centrifugó a 12.000 g durante 4 minutos. Luego, se tomaron 500 µl de sobrenadante y se agregó igual volumen de reactivo de determinación (TBA 0,5% (v/v) en TCA 20% (p/v)). Se calentaron las muestras a 95°C por 25 minutos, luego se enfriaron en baño de hielo y se centrifugaron a 9000 g durante 6 minutos. Se midió la absorbancia a 532 nm en el sobrenadante usando un blanco de TBA y sustrayendo la absorbancia de turbidez a 600 nm. La cantidad de MDA se calculó en base a una curva realizada con concentraciones conocidas de tetraetoxipropano 1 mM como testigo.

5. Determinación del contenido de Prolina

Se homogeneizaron 0,5 g de tejido fresco (hoja o raíz) con N₂ líquido y se agregaron 2 ml de agua. Se transfirió el extracto a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se colocó esta solución a 95°C durante 30 minutos. Luego se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y se tomaron 500 µl del sobrenadante al cual se agregó un volumen de 500 µl de citrato de sodio (0.2 M pH 4,6) y 2 ml del reactivo de Ninhidrina (% p/v en acético: agua 60:40 v/v). Tras 60 min en baño caliente, se transfirió a un baño de hielo y se añadieron 2 ml de tolueno, se agitó vigorosamente y se separaron las fases acuosa y orgánica mediante centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos. Por último se extrajo la fase orgánica superior y se midió la

absorbancia en espectrofotómetro a 520 nm. Para determinar la concentración de Prolina ($\mu\text{mol/gPF}$) se realizó una curva patrón con distintas soluciones de concentración conocida de este aminoácido (Bates et al., 1973).

6. Determinación del potencial osmótico

El potencial osmótico se determinó mediante la utilización de un osmómetro (Semi Micro K-7400, Knauer) que mide el descenso crioscópico de la muestra. Alrededor de 200 mg de material correspondiente a hojas y raíces de cada tratamiento fueron colocados en un tubo Falcon, congelados en nitrógeno líquido y reservados a -80°C durante 24 horas, luego se descongeló durante 10 minutos en agua a 100°C . Se llevó a centrifugar durante 30 minutos a 5000 rpm y luego con una jeringa se extrajeron 150 μl de jugo celular para medir su concentración de solutos u osmolalidad (Osmol) en el osmómetro. El potencial osmótico (ϕ_o) se expresó mediante la relación $\phi_o: C \times R \times T$, donde C es la omolalidad, T es la temperatura absoluta y R la constante de los gases (0,00831 MPa/Osmol/K) (Silva-Robledo y col., 2006).

7. Análisis de los Ácidos Salicílico y Abscísico endógenos

150 mg de material vegetal liofilizado, de raíces y hojas, fue homogeneizado con N líquido y 5 ml de buffer de extracción a pH 2.8-3. Como estándar interno se agregaron 50 ng de ABA y SA deuterados (Olchemim, Czech Republic) y se dejaron equilibrar 30 min en oscuridad a 4°C . Luego se centrifugaron las muestras 20 min. a 8000 g, se hizo una purificación por doble partición con acetato de etilo y se evaporó la fase orgánica. Esta fase se retomó con MeOH (100%) y se secó en Speedvack. Luego los extractos se retomaron con 100 μl de MeOH (100%), se colocaron en viales específicos conteniendo insertos de 150 μl de capacidad, inyectando en el equipo 10 μl de cada muestra. Las corridas cromatográficas se realizaron en un cromatógrafo líquido (LC) Alliance (Waters 2695) con autoinyección y detector de UV, acoplado a un espectrómetro de masas tandem (MS-MS) Micromass Quattro Ulttima Pt, monitoreado mediante el software MassLynx V4.1. Finalmente los datos se expresaron como ng del compuesto /g PS de muestra.

8. Determinación de fluorescencia de la clorofila

Se realizaron 4 mediciones en 4 plantas diferentes de cada bandeja con un fluorímetro de clorofila (Hansatech, UK) con amplitud de pulso modulada FMS2, en condiciones de cámara de crecimiento, luz natural y oscuridad. Los valores del flujo fotosintético de electrones fueron calculados según Rosenqvist y van Kooten (2003).

9. Determinación del oxígeno consumido por respiración

La respiración en hojas y raíces fue determinada colocando aproximadamente 500 mg de peso fresco del tejido en una cámara hermética y fue medida con un electrodo tipo Clark (Hansatech, UK), según Zhang y col. (2015).

10. Determinación de Óxido Nítrico

Pequeños segmentos de raíces de plantas de *P. strombulifera* fueron incubados con 300 μ l de buffer fosfato 100 mM (pH: 7,4) y 1 μ l de la sonda de óxido nítrico DAF-DA-FM durante 30 min a 25°C en oscuridad. Luego se realizó un lavado del material vegetal con el mismo buffer de incubación durante 10 min y se determinó la fluorescencia generada por las muestras empleando un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 ($\lambda_{\text{excitation}} = 450\text{--}490$ nm and $\lambda_{\text{emission}} = 500\text{--}550$ nm). Segmentos de raíces incubadas en el buffer fosfato sin presencia de la sonda fueron usados como controles de autofluorescencia (Galatro y col., 2013).

11. Aplicación exógena con Ácido Salicílico

Se realizó una puesta a punto del tratamiento exógeno de SA en plantas de *Prosopis strombulifera* según, Gemes y col. (2011); Poor y col., (2010) . Primeramente se aplicó esta hormona directamente en la solución de Hoagland, pero hubo un exacerbado crecimiento de hongos sobre las raíces de las mismas, por lo que se realizó un tratamiento en forma de spray sobre tallos y hojas con una solución 0,5 y 1 mM de SA. Se prepararon 100 ml de

esta solución con 1% de acetonitrilo y 5 gotitas del detergente Tween 20 de forma que el SA pueda penetrar en las plantas. Cabe aclarar que finalmente todos los experimentos se prosiguieron únicamente con la solución de 1 mM de SA, debido a que con 0,5 mM no se observaron diferencias significativas.

12. Aplicación exógena con Nitroprusiato de Sodio (SNP)

Se realizó el tratamiento exógeno de NPS en plantas de *Prosopis strombulifera* con una concentración de 100 μ M, según Wu y col. (2010); Shi y col. (2005). Esta solución fue aplicada directamente en la solución de Hoagland de todos los tratamientos evaluados (NaCl, Na₂SO₄ y sin tratamiento salino).

13. Aplicación exógena con 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (c-PTIO)

Se realizó el tratamiento exógeno de c-PTIO en plantas de *Prosopis strombulifera* con una concentración de 200 μ M, según Wang y col. (2009). Esta solución fue aplicada directamente en la solución de Hoagland de todos los tratamientos evaluados (NaCl, Na₂SO₄ y sin tratamiento salino).

14. Aplicación exógena con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC)

Se realizó el tratamiento exógeno de ACC en plantas de *Prosopis strombulifera* con una concentración de 1 mM, según Wang y col. (2009). Esta solución fue aplicada directamente en la solución de Hoagland de todos los tratamientos evaluados (NaCl, Na₂SO₄ y sin tratamiento salino).

15. Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA a tres vías utilizando el programa estadístico INFOSTAT (2011 v.). Los factores considerados fueron: concentración de SA, SNP, c-PTIO o ACC; potencial osmótico (Ψ_o) (-1.0, -1.9, o -2.6 MPa), y tratamiento salino

(ausencia de sales, NaCl, Na₂SO₄). Cuando se observó interacción entre las variables analizadas se realizó el test a posteriori Duncan y Kruskal Wallis como test no paramétrico.

RESULTADOS

1. Respuesta diferencial de *Prosopis strombulifera* frente a NaCl y Na₂SO₄

1.1. Evaluación del crecimiento en tallos y raíces de *P. strombulifera*

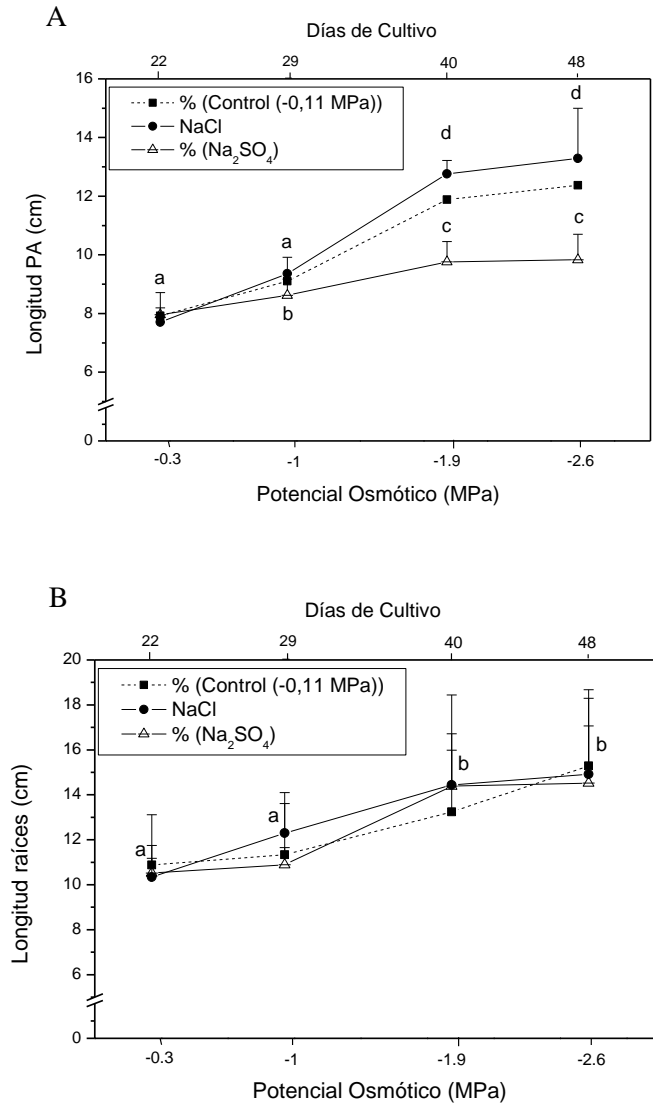


Fig. 5: Crecimiento de tallos (A) y raíces (B) de *P. strombulifera*

El crecimiento de tallos y raíces fue determinado a los 22, 29, 40 y 48 días de cultivo. Se observó una inhibición significativa del crecimiento a partir de los 40 días de cultivo en

tallos de plantas tratadas con Na_2SO_4 con respecto a aquellas tratadas con NaCl y sin tratamiento salino. Sin embargo, esta inhibición dada por Na_2SO_4 no fue significativa en raíces en ninguna de las determinaciones evaluadas.

1.2 Determinación de clorofilas *a*, *b* y carotenoides

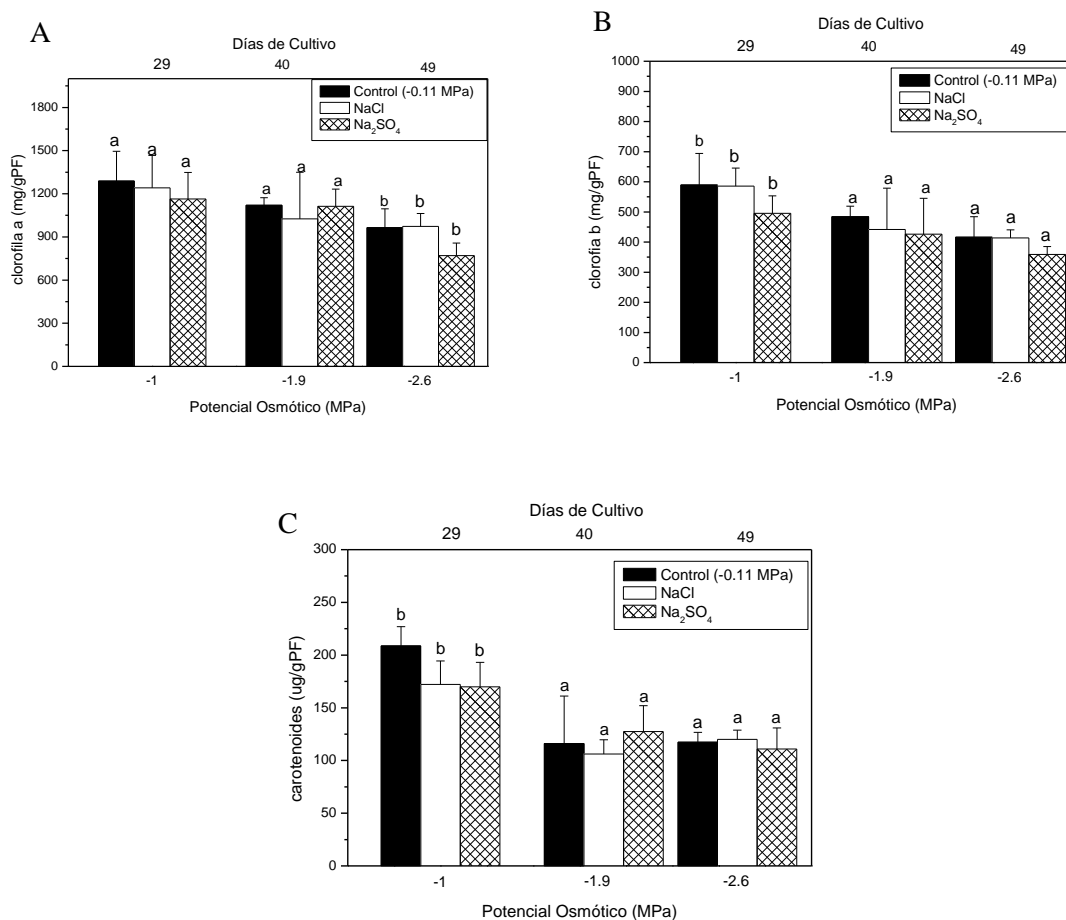


Fig. 6: Contenido de clorofila *a* (A), *b* (B) y carotenoides (C) en plantas de *P. strombulifera*

Los resultados obtenidos mostraron que tanto el contenido de clorofila *a* y *b* disminuyó a medida que aumentó la concentración de sales en el medio. Sin embargo, en el contenido de clorofila *a* esta diferencia fue significativa en el menor potencial osmótico evaluado (-2,6 MPa), mientras que en los niveles de clorofila *b* esta diferencia se observó a partir del potencial osmótico de -1,9 MPa.

Cabe destacar que los niveles de clorofilas a y b no fueron afectadas significativamente por el tipo de sal evaluado, sino que se observaron diferencias significativas únicamente entre los distintos potenciales osmóticos.

El contenido de carotenoides en estas plantas decreció a medida que disminuyó el potencial osmótico, siendo esta disminución significativa a partir del potencial osmótico -1,9 MPa. Similarmente a lo observado para el contenido de clorofilas a y b, los niveles de carotenoides registrados fueron independientes del tipo de sal evaluada.

1.3 Contenido de Na^+ en hojas y raíces de plantas de *P. strombulifera*

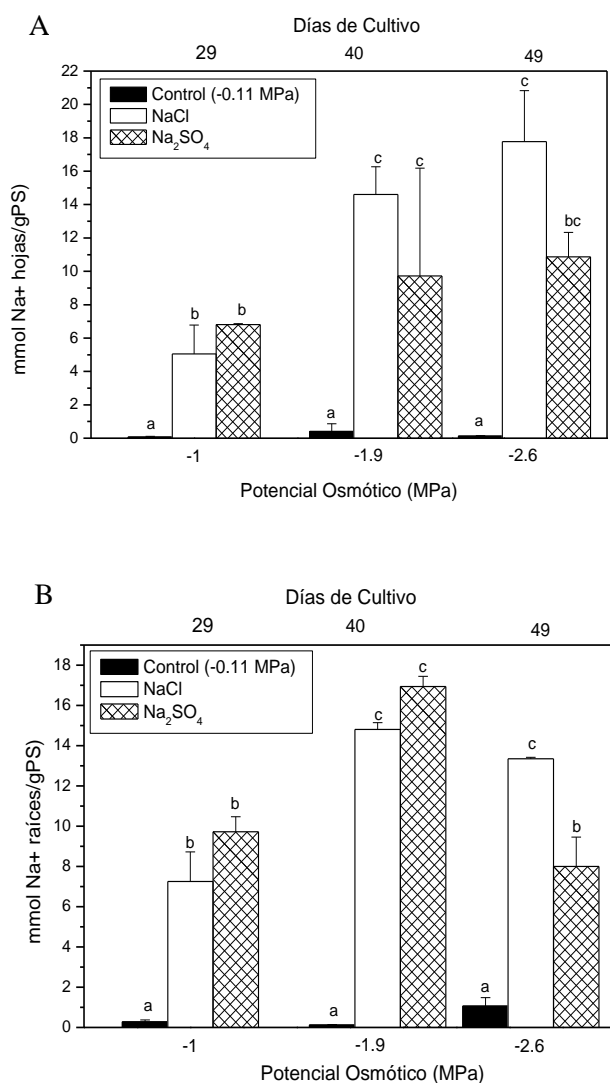


Fig. 7: Acumulación de Na^+ en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera*

Los resultados mostraron que el contenido de Na^+ tanto en raíces como en hojas de plantas salinizadas fue consistentemente mayor que el de plantas no tratadas en todos los potenciales osmóticos evaluados, no existiendo diferencias significativas entre NaCl y Na_2SO_4 .

1.4 Contenido de K^+ en hojas y raíces de plantas de *P. strombulifera*

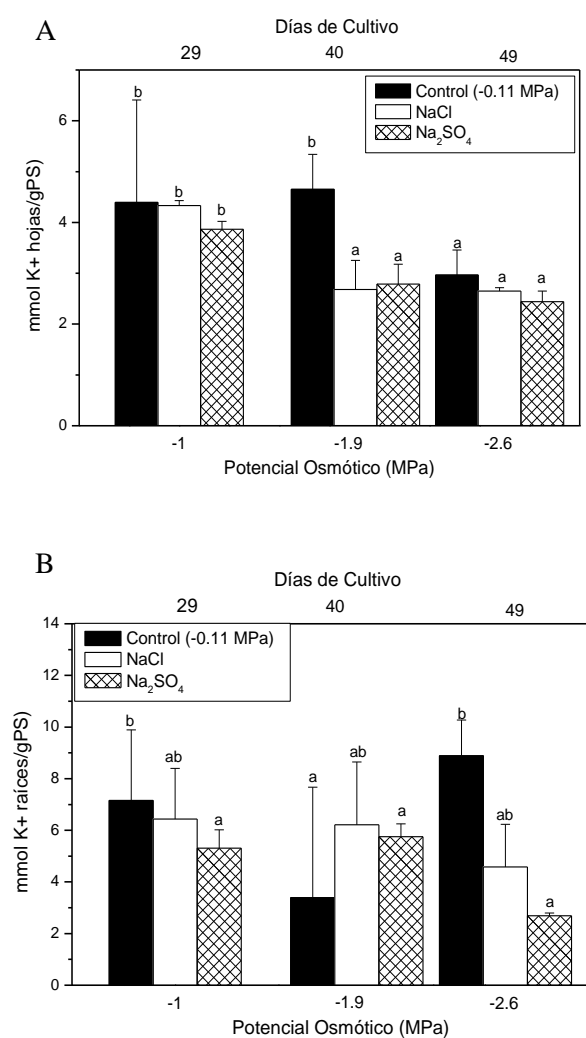


Fig. 8: Acumulación de K^+ en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera*

El contenido de K^+ en hojas disminuyó a medida que incrementó la concentración de sales en el medio, siendo esta disminución significativa a partir del potencial osmótico -1,9 MPa en plantas salinizadas y a partir de -2,6 MPa en plantas no tratadas.

En comparación con plantas no salinizadas, los menores valores de K^+ fueron registrados en raíces de plantas tratadas con la sal Na_2SO_4 y estas diferencias fueron significativas al principio y fin de la experiencia (-1 y -2,6 MPa).

1.5 Relación Na^+/K^+ en hojas y raíces de *P. strombulifera*

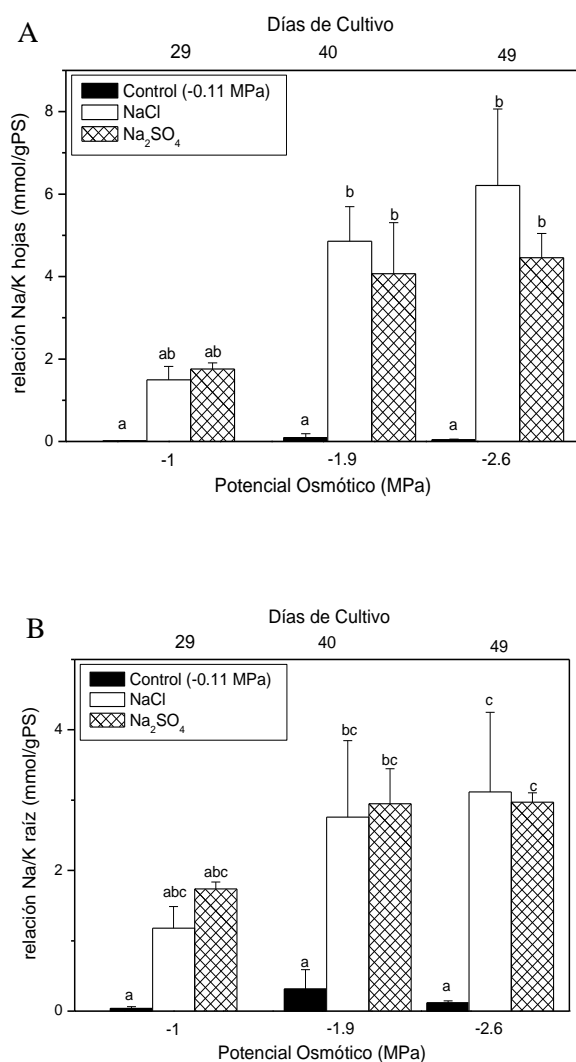


Fig. 9: Relación Na^+/K^+ en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera*

Tanto en hojas como raíces, las plantas salinizadas arrojaron valores de la relación Na^+/K^+ muy elevados con respecto a plantas no tratadas durante toda la experiencia, no existiendo diferencias significativas entre ambas sales.

1.6 Potencial osmótico en hojas y raíces de *P. strombulifera*

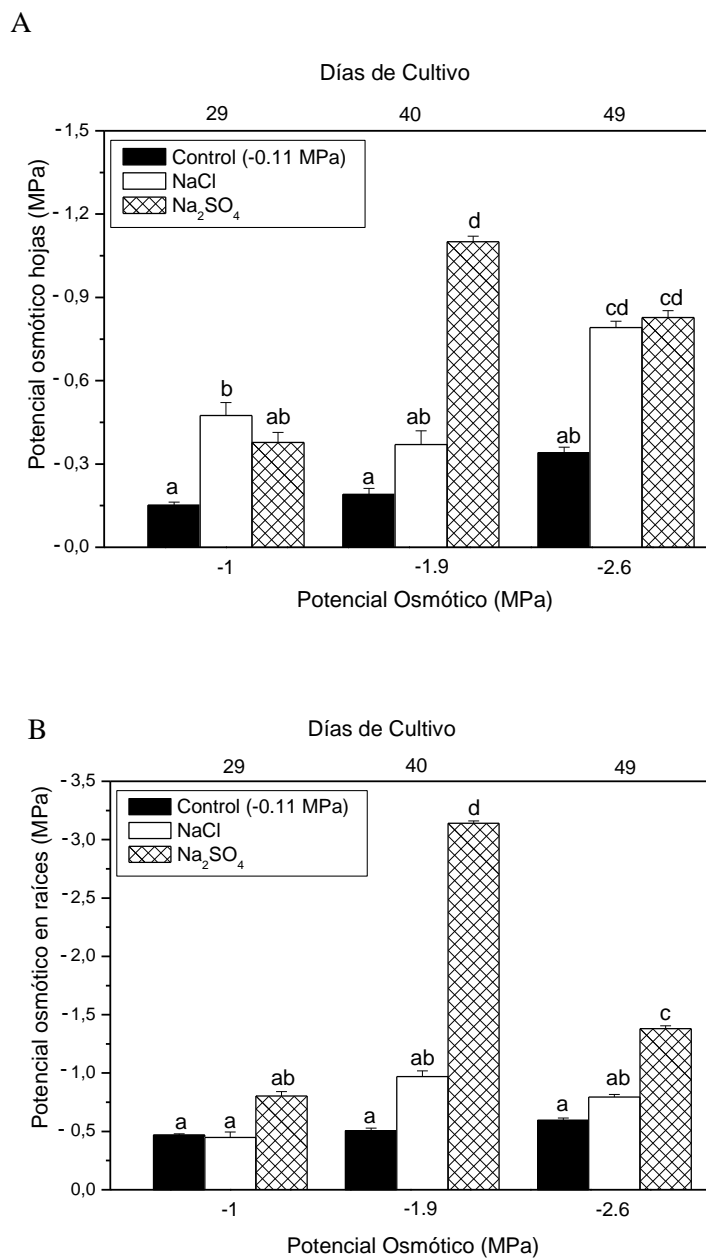


Fig. 10: Potencial osmótico en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera*

Como se observa en la Fig. 10, tanto en hojas como en raíces el menor valor de potencial osmótico tisular se vio en las plantas tratadas con Na_2SO_4 a $-1,9$ MPa, manteniéndose constante en hojas, y aumentando en raíces (recuperación por osmorregulación). Cabe destacar que el potencial osmótico de las plantas sin salinizar se mantuvo fisiológicamente normal y constante a lo largo de todo el ensayo.

1.7 Acumulación de Prolina en hojas y raíces de *P. strombulifera*

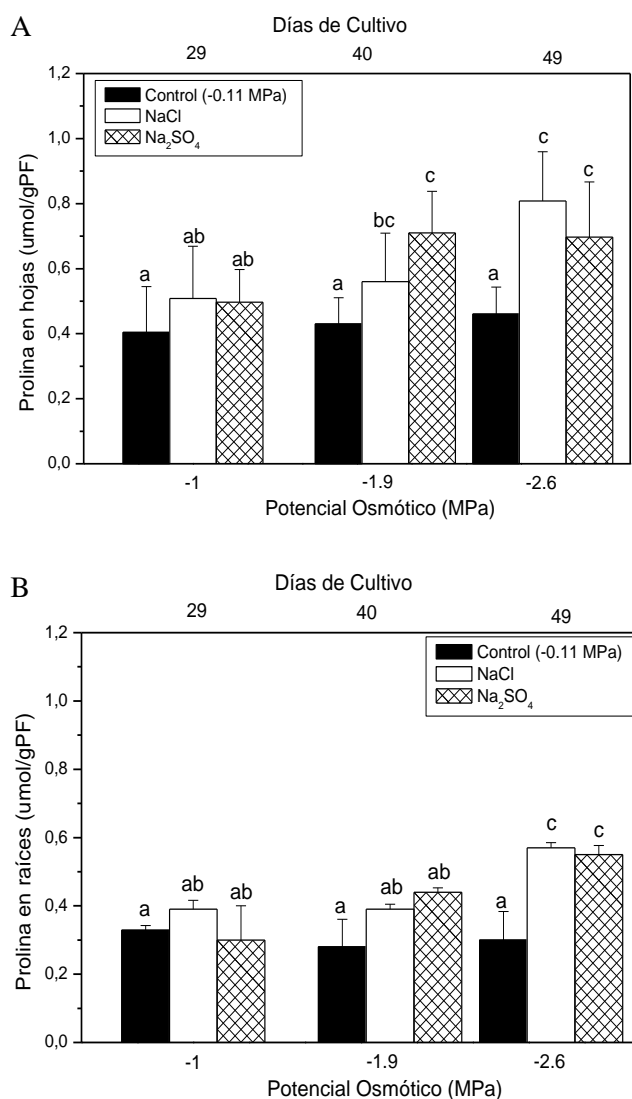


Fig. 11: Contenido de Prolina en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera*

La acumulación de Prolina incrementó significativamente a medida que disminuyó el potencial osmótico en hojas de plantas tratadas con ambas sales en relación a plantas sin salinizar. En raíces, el contenido de Prolina aumentó significativamente en plantas tratadas en el menor potencial osmótico (-2,6 Mpa), sin evidenciarse diferencias significativas para las plantas sin salinizar a lo largo de todo el experimento.

1.8 Contenido de MDA en hojas y raíces de *P. strombulifera*

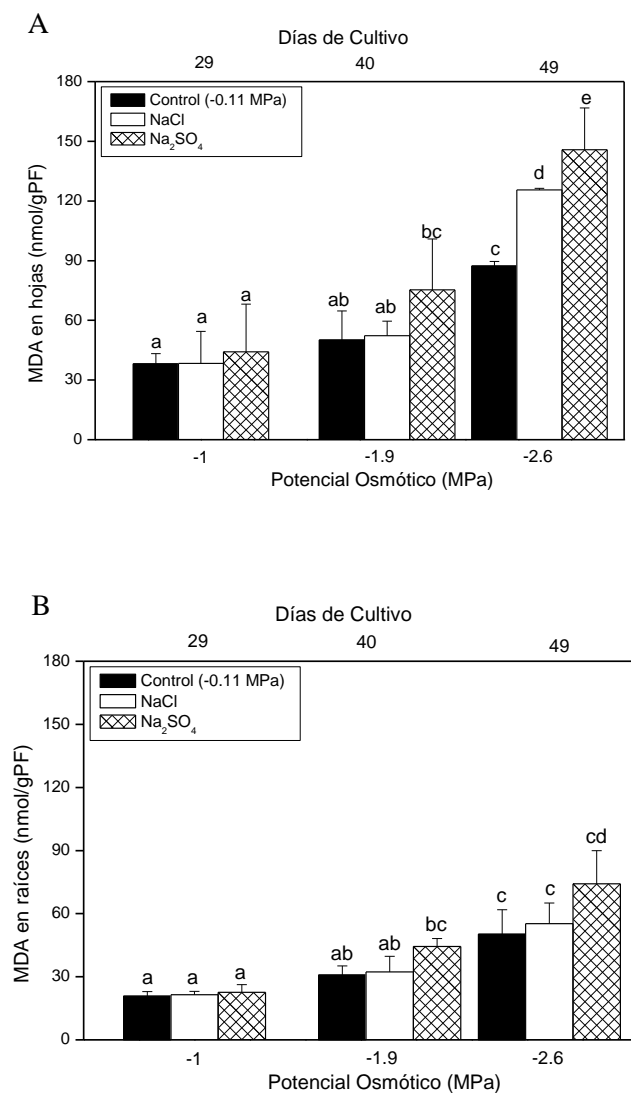


Fig. 12: Acumulación de MDA en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera*

El contenido de MDA aumenta significativamente en plantas no salinizadas a medida que transcurren los días de cultivo, en hojas y raíces de todos los tratamientos evaluados, siendo este contenido significativamente mayor en hojas de plantas tratadas con Na_2SO_4 en la mayor concentración salina.

1.9 Determinación de la fluorescencia de la clorofila y rendimiento máximo potencial del PSII

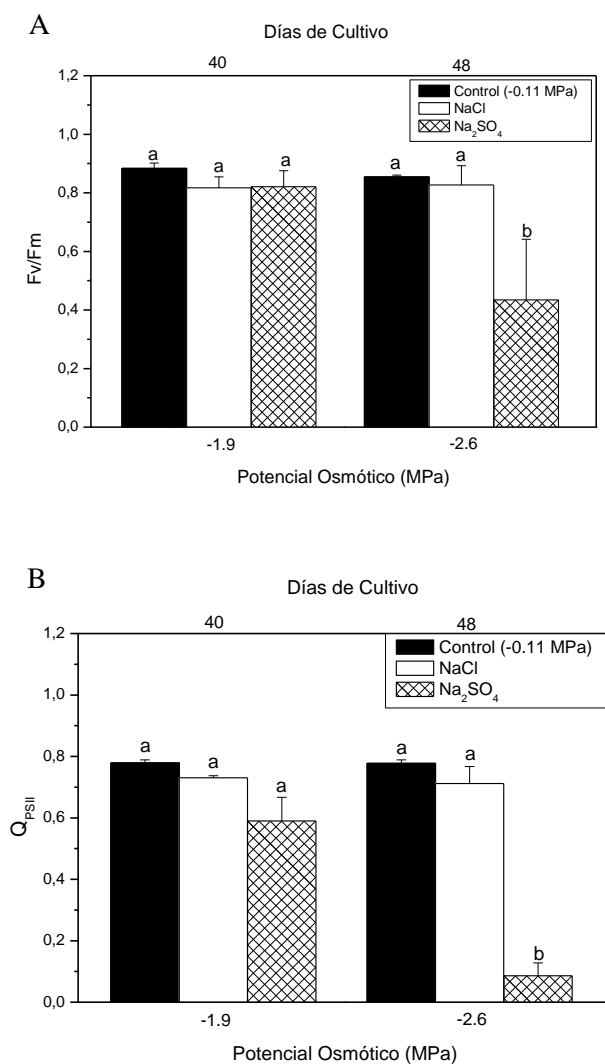


Fig. 13: Rendimiento cuántico máximo (potencial, Fv/Fm) del PSII (A) y rendimiento cuántico (Φ_{PSII}) a la luz del PSII (B) en plantas de *P. strombulifera*

Los resultados obtenidos para los niveles de F_v/F_m y Φ_{PSII} mostraron una abrupta disminución estadísticamente significativa en plantas tratadas con Na_2SO_4 en el menor potencial osmótico evaluado (-2,6 MPa), con respecto a plantas tratadas con NaCl y plantas sin salinizar.

1.10 Determinación de fluorescencia de la clorofila en condiciones de luz solar y oscuridad

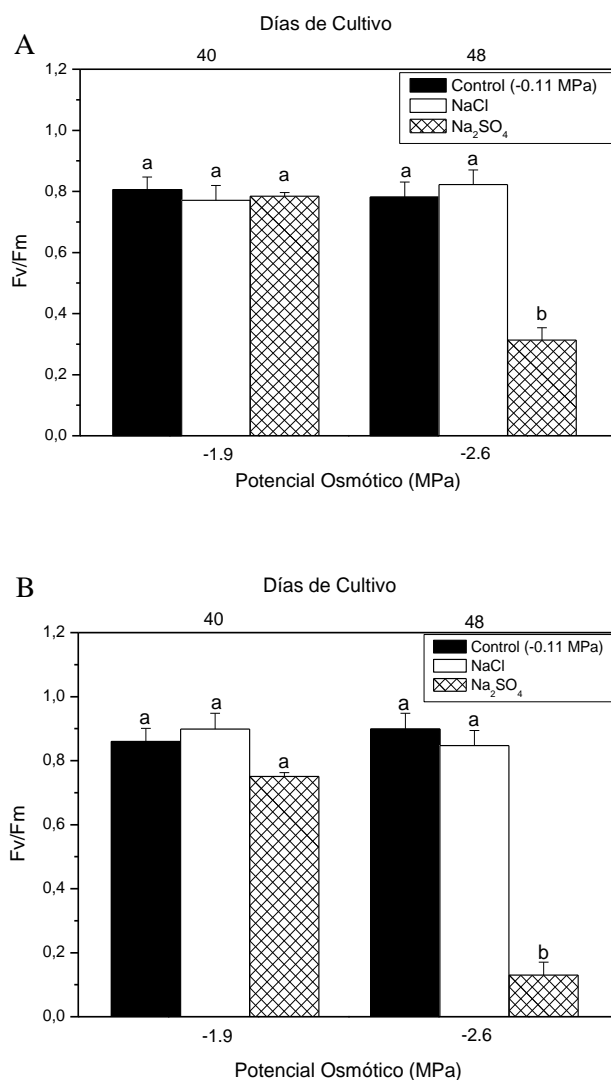


Fig. 14: Fluorescencia de la clorofila en plantas de *P. strombulifera* en condiciones de luz solar (A) y oscuridad (B)

Los resultados obtenidos de fluorescencia de la clorofila tanto en condiciones de luz solar como de plantas que permanecieron en oscuridad, muestran una marcada disminución de este parámetro en plantas tratadas con la sal Na_2SO_4 en su mayor concentración (-2,6 MPa). Sin embargo, no se muestran diferencias significativas entre plantas tratadas con NaCl y plantas que no recibieron tratamiento salino a lo largo de todo el experimento.

1.11 Determinación del quenching no fotoquímico (NPQ)

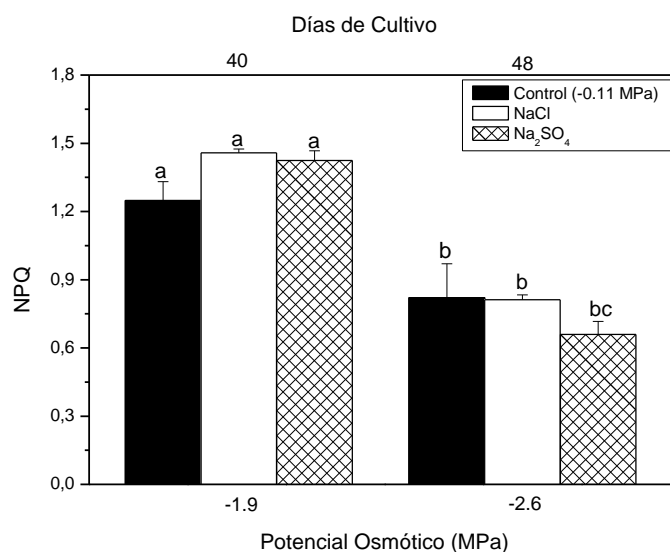


Fig. 15: Quenching no fotoquímico en plantas de *P. strombulifera*

Se observó una disminución estadísticamente significativa en los valores de NPQ a los 48 días de cultivo tanto en plantas sin salinizar como así también en aquellas salinizadas. Si bien esta disminución fue más notable para plantas tratadas con Na_2SO_4 , la misma no fue estadísticamente significativa con respecto a los demás tratamientos evaluados.

1.12 Determinación del flujo fotosintético de electrones

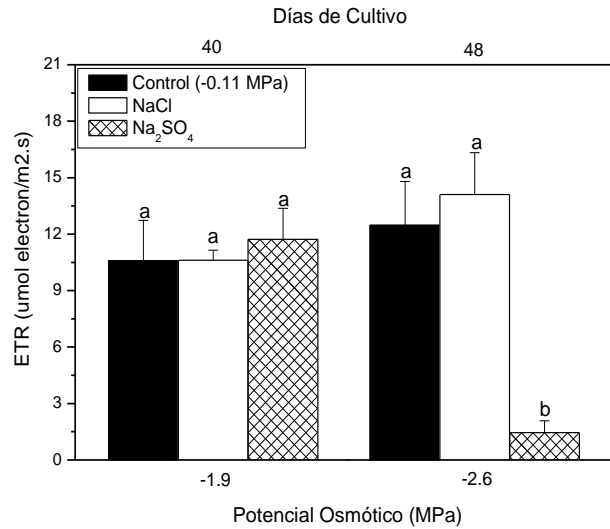


Fig. 16: Flujo fotosintético de electrones en plantas de *P. strombulifera*

De manera similar a los resultados obtenidos para la fluorescencia de la clorofila, en plantas tratadas con Na₂SO₄ se observa una clara disminución del transporte fotosintético de electrones en el menor potencial osmótico evaluado, con respecto a plantas tratadas con NaCl y sin salinizar.

1.13 Consumo de oxígeno por respiración en hojas y raíces de *P. strombulifera*

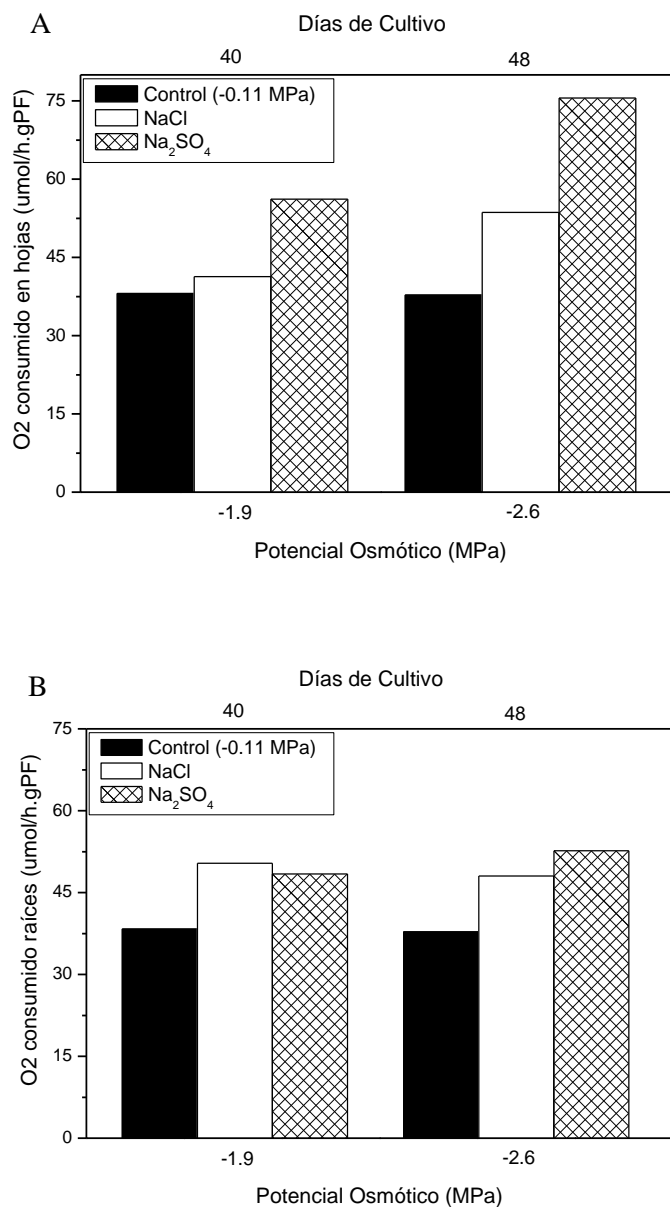


Fig. 16: Consumo de oxígeno por respiración en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera*

Se evaluó la respiración en hojas, obteniéndose los mayores niveles de O₂ consumido en plantas tratadas con Na₂SO₄, siendo esta diferencia muy pronunciada en el menor potencial evaluado. Frente a NaCl, también se observa un incremento de este valor a medida que aumenta la concentración salina, con respecto a plantas sin salinizar. En raíces, el

incremento en la respiración fue semejante para ambos tratamientos salinos y en ambos potenciales.

1.14 Niveles de SA endógenos en hojas y raíces de plantas de *P. strombulifera*

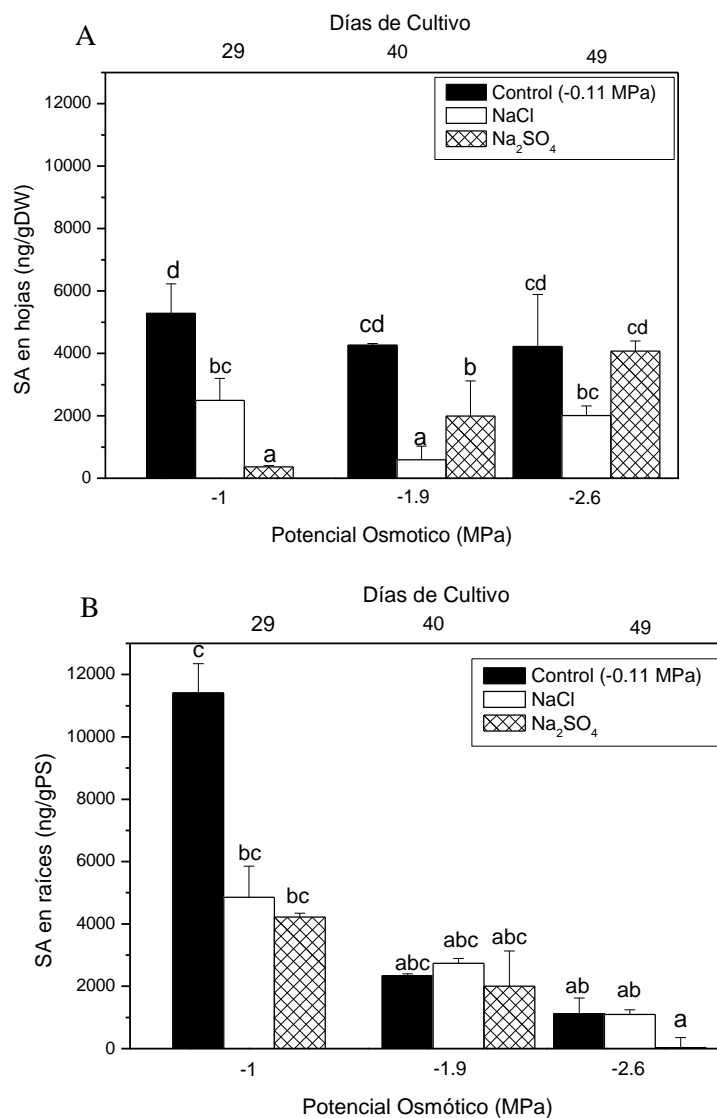


Fig. 17: Acumulación de SA endógeno en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera*

Se observó un incremento en los niveles de SA en hojas de plantas tratadas con Na₂SO₄ a medida que disminuyó el potencial osmótico. Las plantas no salinizadas mostraron valores significativamente mayores en comparación con las plantas tratadas con NaCl.

Los niveles de SA en raíces disminuyeron a lo largo de toda la experiencia para todos los tratamientos evaluados.

1.15 Niveles de ABA endógenos en hojas y raíces de plantas de *P. strombulifera*

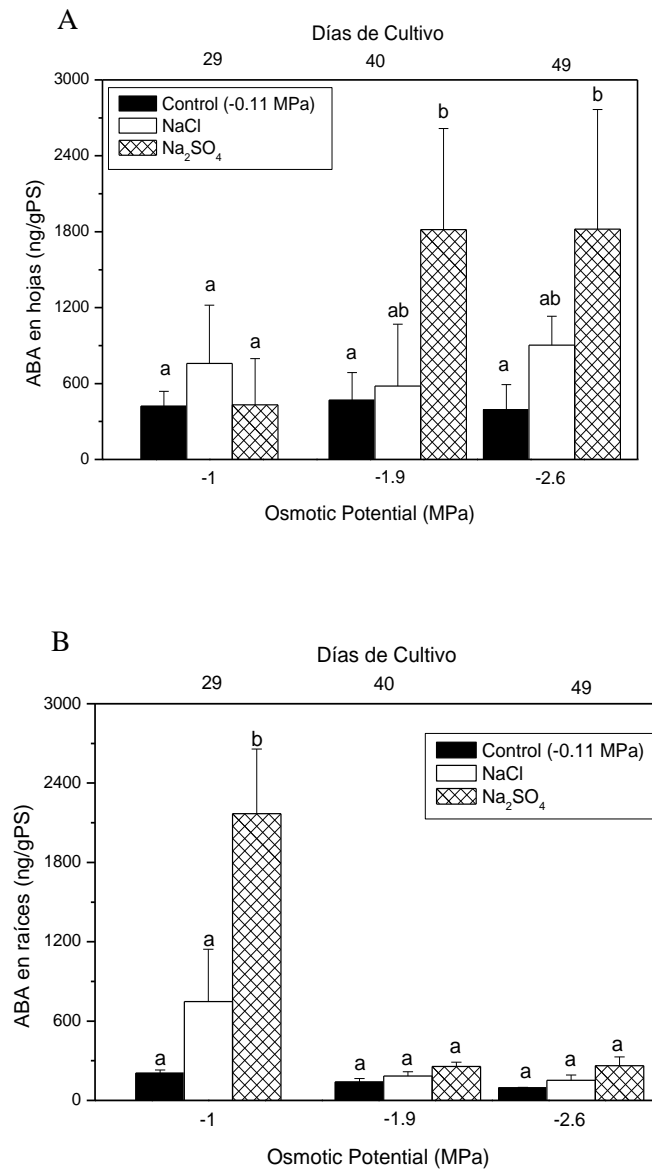


Fig. 18: Acumulación de ABA endógeno en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera*

Respecto a los niveles de ABA, se observó un alto contenido en hojas con respecto al de raíces para todos los tratamientos salinos.

Los niveles de ABA observados en hojas incrementaron significativamente en plantas tratadas con Na_2SO_4 a partir de los 40 días de cultivo, manteniéndose elevados hasta finalizar la experiencia. Frente a NaCl los niveles de esta hormona no arrojaron diferencias significativas con respecto a las plantas no tratadas en ningún potencial osmótico evaluado.

El contenido de ABA endógeno en raíces de plantas tratadas con Na_2SO_4 , se observó un pico máximo de ABA al inicio de la salinización, disminuyendo siginificativamente a medida que incrementó la concentración de esta sal. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre plantas tratadas con NaCl y plantas sin salinizar a lo largo de toda la experiencia.

1.16 Acumulación de óxido nítrico (NO) en raíces de *P. strombulifera*

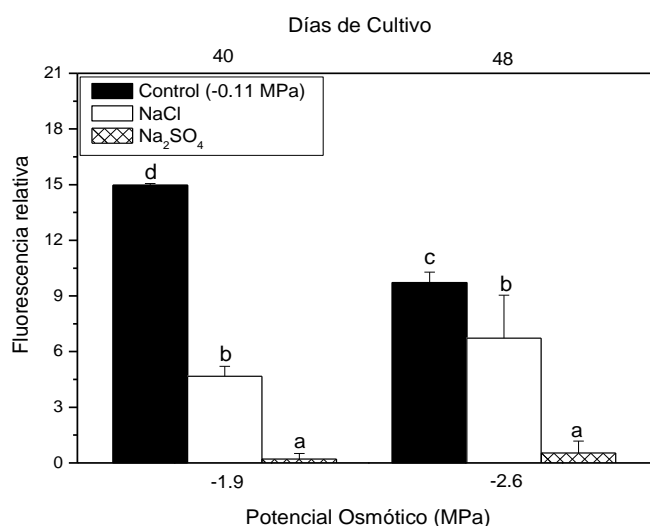


Fig. 19: Contenido de NO en plantas de *P. strombulifera*

La acumulación de NO en raíces de plantas sin tratar fue significativamente elevada en ambos días de cultivo evaluados, en comparación a raíces de plantas salinizadas. Además, los menores valores de NO fueron registrados en plantas tratadas con Na_2SO_4 , siendo esta diferencia estadísticamente significativa desde el inicio del experimento. Por su parte, en

plantas tratadas con NaCl el contenido de NO se mantuvo constante durante todo el ensayo, con un valor intermedio entre plantas tratadas con Na₂SO₄ y plantas sin salinizar.

1.17. Discusión

1.17.1 Crecimiento de *P. strombulifera* en diferentes sales

Diferentes estudios han comprobado que muchas halófitas dicotiledóneas tienen un crecimiento óptimo bajo moderada a baja salinidad. Sin embargo, esta estimulación del crecimiento no fue detectada en halófitas monocotiledóneas, las cuales crecieron mejor en ausencia de sal (Vicente y col., 2004). En estudios previos, hemos demostrado que en *P. strombulifera* hay estimulación del crecimiento hasta 450 mM de NaCl, no posee glándulas de sal en las hojas, sus tejidos desarrollan gran vacuolización y su sistema radical adquiere características particulares como precoz lignificación y suberización de la endodermis frente a salinidad (Reinoso y col. 2004; 2005).

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 anteriormente. El crecimiento de la parte aérea fue óptimo en concentraciones moderadamente altas de sal (-1.9 MPa), principalmente cuando las plantas crecieron en presencia de NaCl, lo que constituye una respuesta interesante que difiere de los resultados obtenidos en otras especies de *Prosopis*. Catalán y col. (1994) observaron en plántulas de *P. flexuosa* una reducción del crecimiento del 25% con 200 mM y del 50% con 400 mM de NaCl. Almeida Viégas y col. (2004) mostraron inhibición del crecimiento de plántulas de *Prosopis juliflora* por tratamientos con 100 mM NaCl. Asimismo, Meloni y col. (2004) demostraron una reducción significativa de la longitud de tallos y raíces de la especie *Prosopis alba*. Por todo lo expuesto, consideramos que *P. strombulifera* estaría dentro de los límites máximos de tolerancia informados para plantas halófitas, superando de manera notable a sus congéneres arbóreas y equiparando el nivel de tolerancia a NaCl de *Chenopodium rubrum*.

Por otro lado, diferentes estudios comparativos realizados con Na₂SO₄ y NaCl han demostrado que esta última tuvo efectos más severos sobre distintos parámetros de crecimiento en diversas especies (Abdelgadir y col., 2005; Turan y Aydin, 2005). Sin embargo, nuestros resultados con Na₂SO₄ demuestran que esta sal inhibió el crecimiento en relación a las tratadas con Cl⁻ registrándose diferencias significativas en el menor potencial

osmótico evaluado (-2,6 MPa), acompañado con síntomas de senescencia como clorosis, necrosis y abscisión de hojas. Estos resultados confirman observaciones previas realizadas en nuestro laboratorio, donde quedó demostrada la fuerte reducción de los parámetros de crecimiento cuando el anión SO_4^{2-} se encontraba presente en el medio. Además se observó que estas plantas mostraron una transpiración marcadamente más alta que aquellas tratadas con NaCl, probablemente causada por una falla en los mecanismos de cierre estomático (Reinoso y col. 2005; Reginato y col. 2014c; Llanes y col., 2014).

1.17.2 Homeostasis iónica y balance osmótico

Las plantas halófitas se caracterizan por su habilidad para tolerar altas concentraciones de Na^+ y Cl^- en sus tallos, las cuales son dañinas o letales para las plantas glicófitas. La clave de esta tolerancia es la habilidad de las halófitas para regular la entrada de Na^+ y Cl^- , manteniendo concentraciones citoplasmáticas de K^+ y Mg^{2+} , necesarias para la activación de actividades de enzimas esenciales (Flowers y col, 2015).

En relación a los efectos inhibitorios de las sales individuales presentes en el suelo, Datta y col. (1995) informaron que en cuatro cultivares de trigo crecidos en cultivos hidropónicos con tratamientos isoosmóticos de NaCl y Na_2SO_4 , este último tuvo un efecto más detrimental que NaCl en las 4 variedades probadas. Estos investigadores destacaron como interesante la mayor acumulación del anión Cl^- en comparación a SO_4^{2-} , pero, en contraste, el último resultó mucho más tóxico, adjudicando este hecho a la mayor movilidad de los iones Cl^- y en consecuencia, a una mayor tasa de acumulación y compartimentalización más efectiva del mismo. Esto implicaría una mayor presencia del anión SO_4^{2-} en el citoplasma que provocaría toxicidad metabólica a nivel celular.

La tolerancia al Cl^- varía entre las especies vegetales, y algunas halófitas requieren de este anión para regular su potencial osmótico y mantener la actividad estomática. Es destacable que en la concentración de NaCl en la que se observa un crecimiento óptimo (500 mM), el contenido de Cl^- sólo es de $5\text{g}\cdot 100^{-1}$ PS (Reginato y col., 2014a) en *P. strombulifera* lo que nos sugiere que sus células deben disponer de otros iones y/o solutos compatibles en altas concentraciones para el balance de cargas y para el ajuste osmótico.

Cuando se determinaron los niveles endógenos de SO_4^{-2} en plantas cultivadas en presencia de Na_2SO_4 hubo acumulación de este anión en raíces recién a 530 mM (-2,6 MPa), observándose en cambio transporte a hojas donde se acumuló desde comienzos de la salinización provocando signos visibles de toxicidad. La cantidad de SO_4^{-2} en tejido foliar fue mucho mayor que la de Cl^- pero menor que la de Na^+ , resultando de todas maneras suficiente para provocar desórdenes metabólicos a nivel celular que se manifestaron como clorosis, necrosis, y finalmente abscisión de hojas (Reginato y col., 2014a).

En relación a los cationes, el Na^+ es una citotoxina que desestabiliza las membranas y proteínas así como también afecta negativamente procesos celulares y fisiológicos fundamentales para las plantas, como la división y expansión celular, el metabolismo primario y secundario y la homeostasis de nutrientes minerales (Munns y Tester, 2008). Se ha demostrado que una incorporación de Na^+ excesiva puede resultar en una severa reducción del crecimiento o la muerte en especies glicófitas sensibles a salinidad, puede causar síntomas no letales de toxicidad en especies tolerantes, pero puede beneficiar a las especies halófitas. La tolerancia a la salinidad no se correlaciona solamente con adaptaciones a la toxicidad del Na^+ *per se*, sino que implica también adaptaciones a los efectos secundarios de la salinidad tales como el déficit hídrico y la interferencia con la toma de nutrientes. Esto último es particularmente cierto en relación a la incorporación de K^+ debido a la similitud fisicoquímica entre ambos cationes. Específicamente, un estudio reciente ha demostrado que Na^+ interfiere con los dos principales sistemas de transporte de K^+ en las raíces de plantas de *Arabidopsis*, denominados ATK1 y AtHAK5 (Aleman y col., 2011).

Es conocido que la capacidad de las plantas de tolerar el estrés salino en general depende estrechamente de su capacidad de mantener una adecuada nutrición de potasio (Maathuis y Amtmann, 1999), ya que es esencial para la vida de las plantas y es un componente mayoritario (mayor del 10%) del peso seco total de las mismas. Los roles del mismo a nivel celular pueden ser brevemente resumidos de la siguiente manera: 1) balance de cargas en el citoplasma, donde es el ión dominante para equilibrar el exceso de cargas negativas de proteínas y ácido nucleicos, 2) activación de reacciones enzimáticas cruciales tales como las que conducen a la formación de piruvato, 3) contribución principal a la regulación de la presión osmótica de la vacuola y en consecuencia a la turgencia celular, y 4) mantenimiento

del pH citoplasmático (Maathuis y Sanders, 1996). El proceso más general que requiere del movimiento de K^+ es el crecimiento vegetal. La acumulación del mismo (junto a un anión) en la vacuola crea un adecuado potencial osmótico esencial para la expansión celular; y por lo tanto, solo unos pocos iones inorgánicos son capaces de reemplazarlo (Nieves Cordones y col. 2012). En contraste, el Na^+ sólo es esencial para ciertas especies C4 en las cuales funciona como micronutriente encargado del transporte de piruvato a través de la membrana del cloroplasto (Maathuis y Amtmann, 1999). En la mayoría de las otras especies vegetales el Na^+ no actúa como un nutriente ya que no es requerido para el crecimiento, pero se ha propuesto que en muchas plantas privadas de potasio puede promover el crecimiento cuando se adiciona al medio de cultivo, actuando como elemento regulador de la turgencia celular, en particular en el caso de especies tolerantes a salinidad y halófitas.

Nuestros resultados demuestran que *Prosopis strombulifera* en condiciones de salinidad elevada acumula grandes cantidades de Na^+ en las hojas en detrimento de la acumulación de K^+ , observándose a su vez efectos diferenciales según el tratamiento salino empleado. La salinización por NaCl provocó mayor acumulación de Na^+ en las hojas que en las raíces pero recién a partir de -1.90 MPa (500 mM), observándose que con menor concentración de sal en el medio (250 mM) acumula grandes cantidades de K^+ para ajuste osmótico. A medida que se incrementó la salinidad en el medio comenzó a ingresar mayor cantidad de Na^+ a las raíces que fue exportado a la parte aérea. Asimismo, esta respuesta también fue evidenciada en las tasas de Na^+/K^+ , las cuales aumentaron a medida que disminuyó el potencial osmótico en el medio de cultivo. Kefu y col. (2003) afirman que el Na^+ atraviesa el plasmalema principalmente a través de los sistemas transportadores de K^+ que tienen afinidad por el Na^+ , y éstos incluyen a los canales rectificadores de influjo, Na^+/K^+ simportadores, transportadores de K^+ (carriers), canales catiónicos no selectivos rectificadores de eflujo y dependientes de voltaje (que dependen de procesos de despolarización de la membrana) y por último, a los canales catiónicos independientes de voltaje. Cuando la concentración externa de iones Na^+ es muy elevada, éste puede bloquear inclusive a los transportadores de alta afinidad por K^+ (Zhu, 2003) provocando una disminución del ingreso de K^+ y un aumento del ingreso de Na^+ que a su vez, ocasiona una despolarización de la membrana seguida de eflujo de K^+ y en consecuencia, una reducción

de la incorporación neta de este ión. Por lo tanto, ésta sería la causa de la disminución de la concentración de potasio en hojas causada por salinidad, con las graves consecuencias que esto genera (Chen y col., 2005). Podemos decir entonces que esta especie utiliza *ambos* cationes para ajuste osmótico bajo el tratamiento con NaCl, sin signos de toxicidad observados.

Se ha postulado que la habilidad de regular la incorporación de Na⁺ por raíz y exportarlo al tallo es crítica para la supervivencia de todas las plantas, aún de las halófitas que tienen la capacidad de excretarlo mediante glándulas (Tester y Davenport, 2003). Como se mencionó anteriormente, la alta concentración de sodio puede causar una serie de problemas metabólicos y osmóticos para la planta. Las hojas son más vulnerables que las raíces, simplemente porque el Na⁺ se acumula mayoritariamente en ellas. Las raíces tienden a mantener los niveles de Na⁺ relativamente constantes en el tiempo, regulándolos por exportación hacia el suelo o hacia las hojas; este transporte de Na⁺ es en su mayor parte unidireccional (corriente transpiratoria) resultando en una progresiva acumulación de este ión en las hojas maduras, restringiendo así la acumulación de los iones en tejidos meristemáticos (con poca capacidad de compartimentalización en vacuolas) o en tejidos fotosintéticamente activos (Hasegawa y col., 2000; Munns, 2002). Según Munns (2002), el concepto de “exclusión de sal” se refiere a la limitación de la proporción en que la sal se acumula en los órganos transpirantes. Debido a que los sistemas enzimáticos del citosol son igualmente sensibles en halófitas que en glicófitas, la planta tiende a preservar la maquinaria fotosintética y los tejidos en desarrollo de concentraciones excesivas de iones; generalmente, el Na⁺ comienza a ser inhibitorio para la mayoría de las enzimas a una concentración de 100 mM. En el caso del Cl⁻ está menos definida la concentración a la cual se torna tóxico, pero se estima que es semejante a la de Na⁺. A medida que el agua de la transpiración se evapora, la sal se deposita gradualmente en las hojas, razón por la cual su concentración es mucho mayor en las hojas maduras acelerando su senescencia y pudiendo alcanzar valores letales (abscisión). Por lo tanto, la mayor acumulación de Na⁺ observada en las plantas de *P. strombulifera* a partir de los 40 días de cultivo (500 mM) podría estar relacionada con la edad de las mismas, es decir, el tiempo durante el cual estuvieron transpirando y enviando Na⁺ a la parte aérea (si bien con nuestra metodología no podemos discriminar entre la acumulación en hojas jóvenes y adultas).

Si bien las halófitas no acumulan sal a mayor velocidad que las glicófitas, generalmente alcanzan concentraciones de Na^+ en hojas que son letales para estas últimas. Resulta obvio pensar entonces que deben operar en ellas mecanismos de control del transporte de sodio en varios niveles: 1) selectividad en la incorporación de iones por las células de la raíz, 2) regulación del vuelco al xilema, 3) remoción de sales del xilema por células de los tejidos adyacentes a la corriente transpiratoria y 4) compartimentalización eficiente de los iones que inevitablemente llegan a los tejidos (ya sea de hoja o las mismas células de la raíz) en vacuolas. La gran diferencia en los rangos de tolerancia entre halófitas dicotiledóneas y monocotiledóneas se ha atribuido a diferencias en su contenido hídrico, y por ende, al volumen vacuolar. Las primeras pueden soportar elevados niveles de Na^+ en hojas y altas tasas Na^+/K^+ porque pueden almacenar casi todo el sodio en vacuolas y requieren relativamente poco potasio para el metabolismo; las segundas en cambio, tienen menor capacidad de almacenamiento y requieren más K^+ y solutos compatibles para sus compartimentos citosólicos (Tester y Davenport, 2003). Estudios recientes realizados en la especie halófito más emparentada con *Arabidopsis*, *Thellungiella halophila*, (Volkov y col., 2003) y otro en cebada (Cuin y col., 2003) han revelado mediante experimentos con electrofisiología que también existe compartimentalización selectiva y diferencial de iones entre células de un mismo órgano, observando incrementos abruptos de Na^+ en epidermis (menos activa metabólicamente pero activa en mantener turgencia celular) y K^+ en mesófilo de hojas sometidas a estrés salino; la epidermis de *T. halophila* puede funcionar como sitio activo de almacenamiento de K^+ en baja salinidad, o de Na^+ en alta salinidad, lo cual sugiere que habría un sistema de regulación del transporte de iones con selectividad diferencial específica de cada tipo de célula de la hoja (Volkov y col., 2003).

Por otra parte, las plantas tratadas con Na_2SO_4 en nuestros experimentos también acumularon grandes cantidades de Na^+ en raíces. Aunque también hubo transporte a hojas que fue más notorio a la máxima concentración de esta sal, en general con estos tratamientos se observó una mayor dificultad para volcar iones Na^+ al xilema desde comienzos de la salinización sugiriendo algún grado de influencia sobre la permeabilidad de las membranas, con menor exclusión de Na^+ .

Los niveles de K^+ en esta especie se vieron negativamente afectados por las dos sales, disminuyendo el contenido de este ión a medida que se incrementaba la concentración de

Na⁺ en los tejidos. Sin embargo, en las hojas tratadas con NaCl, se detectó disminución de este ión recién a partir del potencial -1.9 MPa sugiriendo que hasta esta concentración el NaCl no estaría afectando la permeabilidad de las membranas, al menos en lo referido a incorporación de K⁺. En cambio, en las tratadas con Na₂SO₄, el contenido de potasio disminuyó desde el comienzo del tratamiento salino en las hojas, lo cual puede ser el resultado de un aumento en el eflujo de K⁺ desde las células por un mecanismo competitivo con el Na⁺ como se explicó anteriormente, y/o una disminución en la translocación de K⁺ desde la raíz al tallo (Maathuis y col., 1996; Zhu, 2003). Nuestros resultados, demuestran que si bien NaCl y Na₂SO₄ no tuvieron efectos muy diferentes sobre la acumulación de Na⁺ y K⁺ por las plantas, existiría un efecto aniónico específico del sulfato sobre la permeabilidad de la membrana que ocasiona toxicidad.

Con respecto al contenido de prolina, se observó una notable acumulación en respuesta a salinidad, sin distinción de la composición química de la sal. En efecto, esta acumulación fue estadísticamente significativa desde -1,9 MPa con ambas sales, incrementándose a medida que aumentaba su concentración. Esta respuesta coincide con la propuesta de Hartzendorf y Rolletschek (2001) quienes sostienen que el contenido de prolina en plantas aumenta de manera lineal con la conductividad y salinidad en el medio. No obstante, Meloni y col. (2004) observaron que en plantas de *Prosopis alba* la acumulación de prolina no fue afectada por la salinidad (0, 300, 600 mM de NaCl) y propusieron que este aminoácido no jugaría un rol importante en el mecanismo de tolerancia a salinidad en *Prosopis*. En la leguminosa *Medicago truncatula* se registró acumulación de prolina en respuesta a estrés hiperosmótico con NaCl, siendo mayor en hojas (13 veces más) que en raíces (8 veces más) en comparación a los controles (Armengaud y col., 2004). Este mismo efecto se observó en *P. strombulifera* donde la acumulación de prolina fue más importante en hojas que en raíces. Diferentes estudios realizados en especies halófitas sostienen que la acumulación de prolina es una de las adaptaciones de las plantas a salinidad y los aumentos en el nivel de este compuesto reflejan su importante participación en el ajuste osmótico (Rhodes y col., 2002; Uzilday y col., 2015). En maíz, el estrés por NaCl incrementó notablemente el contenido de prolina en cultivares con alta tolerancia lo cual fue correlacionado con la adaptación de los mismos a la salinidad, proponiéndose para este aminoácido funciones en el ajuste osmótico (Mansour, 2005). Holbrook y Putz (1996)

sostienen que el estrés salino activa mecanismos de ajuste osmótico no sólo en hojas sino también en raíces, aumentando su capacidad de extracción de agua en suelos salinos. Los resultados obtenidos en nuestros experimentos sugieren que la acumulación de prolina es una respuesta adaptativa de *P. strombulifera* a salinidad ya que existe una correlación directa entre el contenido de prolina y la intensidad de la salinización. Es decir, no se puede considerar un indicador de tolerancia dado que está presente en similares cantidades en las plantas con respuesta halofítica (NaCl) y las no tolerantes (Na₂SO₄). Además de su rol como osmorregulador, la acumulación de prolina durante el estrés podría estar relacionada al reciclado de NADPH (Hare y Cress, 1997). La inhibición de la fijación del carbono durante el estrés conduce a un incremento en la proporción NADPH/NADP⁺ y la síntesis de prolina a partir de glutamato requiere la oxidación de dos NADPH a NADP⁺, lo cual podría aliviar los efectos de la reducción de NADP⁺ causada por estrés. Para reestablecer el pool del aceptor terminal de electrones de la cadena de electrones fotosintética, la síntesis de prolina podría proveer alguna protección contra la fotoinhibición en condiciones adversas. También, mediante la síntesis de este aminoácido se podrían incrementar vías con actividad antioxidante como la vía de las pentosas fosfato antioxidantes, la cual es dependiente de la disponibilidad NADP⁺ e inhibida por NADPH. En el presente estudio, si bien no se observan diferencias significativas en el contenido de prolina entre las tratadas con NaCl y las tratadas con Na₂SO₄, los elevados niveles de este aminoácido podrían cumplir diferentes funciones según el tratamiento salino que se aplique. Funciones de ajuste osmótico, principalmente en las plántulas creciendo en presencia de NaCl, lo cual se encuentra en directa correlación con los resultados obtenidos de potencial osmótico, el cual mostró valores mayores a los obtenidos que para plantas tratadas con Na₂SO₄. De esta manera, se puede concluir que estas plantas realizan mayor ajuste osmótico mediante diferentes mecanismos, como la acumulación y compartimentalización de Na⁺ y síntesis de solutos compatibles como prolina principalmente, confirmando resultados previos de nuestro laboratorio (Llanes y col., 2013). También, el mayor contenido de agua en sus hojas observado previamente (Llanes y col., 2013) ayuda a aliviar el impacto de la acumulación excesiva de Na⁺ en los tejidos lo cual se ve favorecido por adaptaciones anatómicas como el ordenamiento radical del clorénquima alrededor de los haces conductores (Reinoso y col, 2004) y la modificación en el número y tamaño de estomas (Reginato y col, 2014c) que

permiten a *P. strombulifera* un uso más eficiente del agua bajo estas condiciones. Mientras que las plantas tratadas con Na_2SO_4 no realizan un ajuste osmótico eficiente, ya que su potencial osmótico extremadamente negativo a los 40 días de cultivo, pone de manifiesto un desbalance hídrico que tendería a equilibrarse a mayor concentración de sal por un incremento en la síntesis de prolina. Se podría sugerir que en plantas creciendo en soluciones de Na_2SO_4 el incremento de prolina podría tener un rol en la activación de peroxidasas, que se consideran las principales enzimas involucradas en la síntesis de lignina (Lin y Kao, 2001). Estos compuestos son el resultado de la polimerización oxidativa de tres alcoholes p-hidroxicinámicos, en una reacción mediada por peroxidasas, que da lugar a un heteropolímero hidrofóbico ópticamente inactivo. En este sentido, las plantas tratadas con Na_2SO_4 presentan un incremento notable en fibras y tejidos lignificados que les otorgan rasgos xeromórficos (Reinoso y col, 2004; 2005).

La peroxidación lipídica de membranas fue determinada mediante la cuantificación del compuesto malondialdehído (MDA), el cual es considerado un indicador del estrés oxidativo en plantas (Drapper y col., 1990). Numerosos estudios han demostrado que el contenido de MDA incrementa bajo estrés salino en diferentes especies como *Arabidopsis thaliana*, soja y alfalfa (Slama y col., 2014; Weisany y col., 2012; Babakhani y col, 2011).

Por otro lado, Shaddad y col. (2006) reportaron que el contenido de MDA incrementó significativamente en la variedad de trigo sensible a estrés salino cv. Sohag 3, mientras que no se observó una peroxidación lipídica significativa en la variedad tolerante cv. Giza 168, con respecto a los controles. Asimismo, en las especies halófitas *Atriplex halimus* y *A. canescens*, una concentración de 600 mM de NaCl no indujo un aumento significativo en los valores de MDA, reflejando una efectiva protección de las membranas celulares frente al daño oxidativo causado por salinidad en esa especie (Mahi y col., 2015). Nuestros resultados son coincidentes con estos estudios, ya que por un lado, se observó un aumento significativo en los valores de MDA arrojados tanto por hojas como raíces de plantas tratadas con Na_2SO_4 a lo largo de toda la experiencia, el cual se correlaciona con la inhibición del crecimiento vegetal y el gran desorden metabólico causado por esta sal (Llanes y col. 2013). En cambio, frente a NaCl no se observó aumento en el contenido de MDA en relación a plantas sin salinizar, indicando ausencia de daño en membranas

celulares en estas plantas, y por lo tanto, confirmando la tolerancia frente a esta sal en *P. strombulifera*.

1.17.3 Impacto de la salinidad en los procesos de fotosíntesis

Una de las primeras respuestas al estrés salino es una disminución en la conductancia estomática para evitar la pérdida de agua por las hojas. Sin embargo, la difusión de CO₂ dentro de las hojas también decrece, llevando a una reducción de la presión parcial interna de este gas y, consecuentemente una reducción de la fotosíntesis. Las plantas que crecen en ambientes soleados absorben luz en exceso, parte de la cual es utilizada en la cadena de transporte de electrones fotosintética; sin embargo, si este exceso de energía no puede ser disipada correctamente, ocurre una disminución en la eficiencia de la tasa fotosintética, fenómeno que se denomina “fotoinhibición” (Long y col. 1994). El grado de la fotoinhibición depende del balance entre el fotodaño del PSII y la reparación de tal daño, por lo tanto es conveniente determinar ambos parámetros por separado. Para monitorear el fotodaño se requiere inhibir completamente el proceso de reparación, lo cual puede lograrse sometiendo a las plantas frente a un inhibidor de la síntesis de proteínas, como el cloranfenicol o la lincomicina. La reparación del daño al PSII puede ser medida exponiendo las plantas a una alta intensidad de luz, la cual reduce la actividad del PSII a un 10 a 20% del nivel inicial, y luego exponiendo estas mismas plantas una intensidad de luz baja (Moon y col. 1995). Estrés abióticos adicionales o aditivos limitan aún mas la utilización de la energía induciendo una mayor fotoinhibición. Diferentes estudios han demostrado que el estrés salino induce un daño en la estructura y función del aparato fotosintético, inhibiendo directamente la actividad del PSII (review en Lu y Vonshak, 2002). Tales estudios han observado que el estrés por salinidad incrementa el fotodaño del PSII en 2 variedades de cebada luego de 7 días bajo una concentración de 120 mM de NaCl (Kalaji y col., 2011) y en sorgo creciendo bajo 250 mM de esta misma sal (Netondo y col., 2004). Sin embargo no está del todo claro si el estrés salino aceleró el fotodaño al PSII o inhibió su reparación. En *Synechocystis*, se ha comprobado que en plantas tratadas con 500 mM de NaCl se inhibió la reparación del fotodaño del PSII, pero no aceleró el mismo (Allakhverdiev y col. 2004).

Se ha sugerido que la técnica de fluorescencia de la clorofila es una herramienta interesante para la comprensión del metabolismo fotosintético y de esta forma, determinar el rendimiento de la planta en su medio o su adaptación frente a déficit hídrico, altas temperaturas, salinidad, etc. (Longenberger y col., 2009). La medida de la fluorescencia de la clorofila se basa en la relación con el proceso de fotosíntesis, ya que la luz que es absorbida por las plantas puede ser utilizada en tres procesos diferentes: para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis, puede ser disipada como calor o reemitida como luz en forma de fluorescencia de la clorofila (Maxwell y Johnson 2000). Estos tres procesos se encuentran en competencia, por lo que el incremento de uno, repercutirá en los otros dos. Con esta técnica se obtienen datos importantes, a saber: la máxima fluorescencia de la clorofila (F_m), en la cual se asume que todos los centros de reacción del PSII se encuentran cerrados (o reducidos), la mínima fluorescencia de la clorofila (F_o), en la cual se asume que todos los centros de reacción del PSII se encuentran abiertos (u oxidados), la fluorescencia variable de la clorofila (F_v), la cual se calcula como $F_v = F_m - F_o$, y la eficiencia máxima del PSII, denotada como F_v/F_m (Kalaji y col. 2011). Es muy conocido que la luz es esencial para las plantas, pero en exceso puede ser un factor limitante o incluso causar situaciones de estrés. Por este motivo, una de las principales estrategias de las plantas para evitar los efectos deletéreos causados por la energía de excitación excesiva es la disipación en forma de calor, denotada como Quenching no fotoquímico (NPQ: Non Photochemical Quenching). El valor de NPQ puede ser atribuido a 3 componentes: q_E (componente dependiente de energía del NPQ), q_T (componente dependiente del estado de transición del NPQ) y q_I (componente relacionado a la fotoinhibición del NPQ). El NPQ se calcula como $(F_m - F'_m)/F'_m$, donde F_m es la máxima fluorescencia en hojas adaptadas a oscuridad y F'_m es la máxima fluorescencia en hojas iluminadas (Maxwell y Johnson 2000). Puede tomar valores entre 0 e infinito, aunque son comunes valores entre 0 y 4. La cuantificación de la energía de excitación es importante para la comprensión de la respuesta del aparato fotosintético frente a factores ambientales, como lo es la salinidad. Koyro y col. (2013) propusieron que los altos y constantes valores de F_v/F_m obtenidos hasta una concentración de 375 mM de NaCl, combinados a los altos valores de NPQ en la halofita *Panicum turgidum* tuvieron un rol protector de la reducción de centros fotosintéticamente activos, clasificando a esta especie como tolerante a moderada salinidad. Sin embargo, en plantas de

tabaco transgénicas con senescencia tardía se demostró que los valores de NPQ incrementaron con la edad de las hojas, pero esta disipación de energía no fue suficiente para prevenir la muerte celular frente al estrés causado por un bajo suplemento nutricional (Wingler y col., 2005). La disminución observada en los valores de NPQ a medida que transcurren los días del cultivo en nuestra especie, estaría indicando que la disipación en forma de calor se disminuye a medida que envejece el cultivo, lo cual contribuye a una fotoinhibición. Cabe destacar que si bien no fue estadísticamente significativa, esta disminución fue más marcada en las plantas tratadas con Na_2SO_4 , en las cuales a su vez, se observó la fotoinhibición más fuerte en comparación a todos los tratamientos evaluados. Por lo tanto, el tratamiento con Na_2SO_4 induciría bajos valores de NPQ, los cuales estarían contribuyendo a una fuerte fotoinhibición, y por lo tanto, a los bajos niveles de Fv/Fm observados en estas plantas. Estos resultados coinciden con la fuerte inhibición en el ciclo de las xantofilas observada en un trabajo previo (Reginato y col., 2014b).

Usualmente, la eficiencia máxima del PSII es utilizada como un indicador del estado funcional del aparato fotosintético (Barbagallo y col. 2003), ya que este parámetro decae significativamente bajo la influencia de distintos factores adversos (Ehlert e Hinch, 2008; Quiles y López, 2004). En la mayoría de las plantas adultas, el valor óptimo de Fv/Fm se encuentra alrededor de 0,83 (Bjorkman y Demmig, 1987). Los valores de Fv/Fm en *A. abiad* bajo estrés salino durante 7 días, fueron solo del 25% con respecto a plantas controles, indicando que los centros de reacción de las plantas sometidas a salinidad se encontraban dañados (fotoquímicamente inactivos), reduciéndose de esta manera el transporte de electrones en el PSII (Basu y col., 1998). Luego de 7 días en condiciones de salinidad, la eficiencia fotoquímica del PSII (Fv/Fm) de plantas de cebada adaptadas a oscuridad fue mucho menor que la de plantas controles (Misra y col., 2006). De esta manera, nuestros resultados muestran que los valores de Fv/Fm en plantas tratadas con la sal Na_2SO_4 en condiciones de cámara de crecimiento, en condiciones de luz natural y plantas que permanecieron toda la noche en oscuridad, decrecieron abruptamente en el menor potencial osmótico evaluado. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la eficiencia máxima del PSII entre plantas tratadas con NaCl y plantas sin salinizar, manteniéndose constante a lo largo de todo el ensayo. Asimismo, el efecto negativo del Na_2SO_4 también se observó sobre el rendimiento máximo potencial del PSII y sobre el

transporte fotosintético de electrones (ETR), ya que ambos disminuyeron de forma abrupta a -2,6 MPa, sin diferencias significativas en los demás tratamientos. Por lo tanto, estos resultados estarían mostrando una fotoinhibición causada por Na₂SO₄ sobre el PSII, evidenciándose una sensibilidad específica de *P. strombulifera* frente a esta sal y confirmando la respuesta adaptativa de esta especie frente a NaCl.

Por otro lado, la disminución del contenido de clorofilas *a* y *b* y carotenoides frente a estrés salino es una respuesta común en plantas y ha sido suficientemente documentada (Chaves y col. 2003; Reynolds y col. 2005). En el presente estudio se observó una reducción de pigmentos fotosintéticos, sobre todo al final de la experiencia y esta respuesta fue independiente del tratamiento evaluado, ya que esta disminución se produjo tanto en plantas salinizadas como en aquellas que no recibieron tratamiento salino. Por lo tanto, estos resultados sugieren que existe un efecto de envejecimiento en la maquinaria fotosintética de plantas de *P. strombulifera*.

1.17.4 Impacto de la salinidad en el proceso de respiración

La acumulación de biomasa en plantas, la cual es afectada negativamente por salinidad, es en gran parte determinada por el balance entre fotosíntesis y respiración. Existe una fuerte correlación negativa entre la tasa de crecimiento y la cantidad de CO₂ consumido diariamente por respiración (Hauben y col., 2009), a pesar de que este fenómeno es dependiente de las condiciones de crecimiento. Estudios previos en diferentes especies indican que es evidente que el 25-60% del CO₂ asimilado se pierde diariamente por respiración (Atkin y col., 1996).

A partir de la literatura consultada, se ha hallado que el 33% de las plantas tolerantes a salinidad manifiestan un aumento en la tasa respiratoria y en un 42% se observó una disminución de este parámetro; mientras que el 58% de plantas sensibles manifestó un incremento en la tasa respiratoria y un 17% una reducción de la misma (Jacoby y col., 2011). A pesar que estos porcentajes sugieren una tendencia al aumento de la tasa respiratoria en las plantas sensibles, también podría estar indicando que un elevado valor de este parámetro en plantas bajo estrés salino puede ser tanto beneficioso como perjudicial

para el crecimiento vegetal, dependiendo del órgano y de la estrategia de tolerancia empleada. El beneficio de una alta tasa respiratoria es la mayor producción de ATP, lo cual provee a la planta de una mayor energía vital para el crecimiento de nuevo tejido y procesos de defensa, como un ajuste osmótico o exclusión de Na^+ (Yeo, 1983). Sin embargo, el costo de una elevada tasa respiratoria es que el carbono disponible es utilizado en el proceso de respiración en lugar de ser destinado a la síntesis de nuevo tejido, limitando de esta manera la capacidad de crecimiento vegetal (Poorter, 1990). Estudios previos realizados en diversas halófitas han observado que las mismas manifiestan una reducción en la respiración, tal vez porque utilizan su reserva de carbono en el tallo para mediar la tolerancia tisular (Burchet y col., 1989; Hwang y col., 1994). Por otro lado, en raíces de arroz se ha reportado que una alta tasa respiratoria puede aumentar la tolerancia a salinidad ya que permite una mayor exclusión de iones (Malagoli y col., 2008). En conclusión, la respuesta de respiración es incierta si se desea clasificar o definir una especie vegetal tolerante o sensible frente a salinidad.

Como se resume en la Figura 20, la respiración comprende la oxidación completa del carbono reducido que es generado durante la fotosíntesis para la síntesis de ATP. Este proceso comprende tres etapas: glucólisis, el ciclo del ácido cítrico y la cadena de transporte de electrones. El ácido cítrico, succínico y málico forman parte de este ciclo, donde el piruvato es oxidado y se genera gran cantidad de equivalentes reductores NADH y FADH_2 , que luego serán oxidados por la cadena de electrones en la membrana interna de las mitocondrias para la síntesis de ATP. En condiciones salinas, el crecimiento o supervivencia requiere gran costo energético para acumular sal, para la compartimentalización intracelular o la excreción por medio de glándulas de sal. Sin embargo, este costo es relativamente menor en relación al que se necesita para sintetizar solutos orgánicos para el ajuste osmótico (Yeo, 1983). El número de moles de ATP que se necesita para usar un mol de NaCl como osmolito es aproximadamente 4 en las células de la raíz, y 7 en las hojas, mientras que el número que se requiere para la síntesis de un compuesto orgánico es de un orden de magnitud superior. El ATP requerido para la síntesis o acumulación de solutos en hojas fue descrito por Raven (1985) como a 3-5 moles para Na^+ , 34 para manitol, 41 para prolina, 50 para glicínbetaína y alrededor de 52 para sacarosa (estos valores asumen una producción de 0-5 moles de ATP por fotón durante la

fotosíntesis, y nitrato como fuente de N). Sin embargo, a pesar de la demanda energética las plantas necesitan acumular grandes cantidades de solutos compatibles en el citoplasma para contrarrestar el balance iónico en las vacuolas (Zhifang y Loescher, 2003).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el O_2 consumido por respiración fue significativamente mayor en hojas de plantas tratadas con Na_2SO_4 . Por otra parte, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio se ha observado un mayor contenido de ácido málico y succínico en raíces de plantas tratadas con Na_2SO_4 , en comparación a plantas tratadas con $NaCl$ y plantas que no recibieron tratamiento salino (Llanes, 2010). Además, se comprobó que el contenido de carbohidratos solubles totales aumentó significativamente a medida que incrementó la concentración de sales en el medio, siendo este contenido mayor en raíces de plantas tratadas con Na_2SO_4 (Llanes y col., 2013). Estos resultados fueron consistentes con un incremento de fibras y ligninas, sugiriendo una alteración en el particionamiento del carbono dentro de la planta (Reinoso y col., 2004; 2005). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la mayor tasa respiratoria hallada en el presente estudio podría estar relacionada al mayor contenido de los ácidos orgánicos y carbohidratos solubles totales, conduciendo a la mayor demanda energética necesaria para la incorporación de iones y para la formación de numerosos compuestos como solutos compatibles, fibras, ligninas, etc.

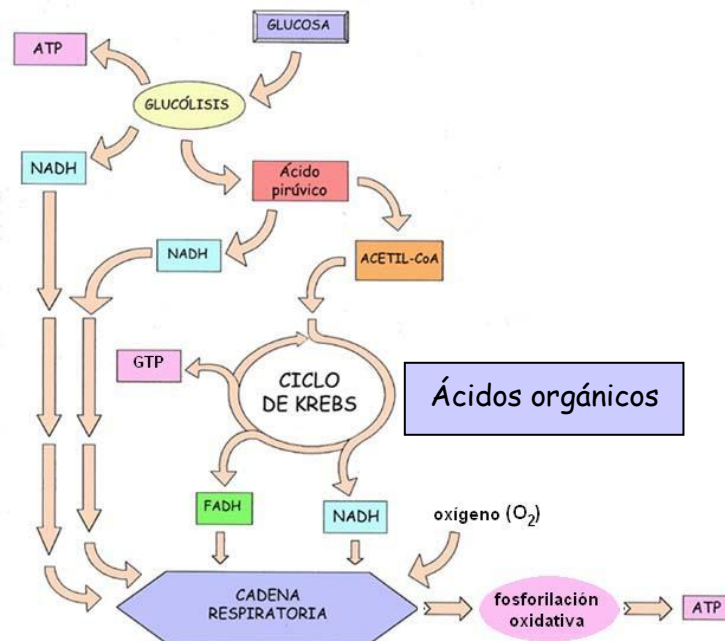


Fig. 20: Proceso de respiración en plantas

1.17.5. Salinidad y fitohormonas

Las hormonas vegetales controlan una gran cantidad de respuestas afectando el crecimiento y desarrollo de las plantas a distintas condiciones ambientales. Estos compuestos pueden interactuar en caminos complementarios o antagónicos para otorgar protección frente a un estrés biótico o abiótico (Balderas-Hernandez y col., 2013). La salinidad es un estrés abiótico de los más importantes y afecta la productividad de las plantas reduciendo el área fotosintética por inhibición de la división y expansión celular durante el crecimiento. 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 (Munns y Tester, 2008). 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 mediante cambios en el nivel de fitohormonas y así controlar el particionamiento de fotoasimilados entre diferentes tejidos (fuente y destino) (Hartig y Beck, 2006). De esta manera, la plasticidad integrada en el desarrollo de las plantas involucra la comunicación a larga distancia entre diferentes órganos y diferentes cambios en los niveles hormonales del vástago y raíz, teniendo las fitohormonas un papel esencial (Sachs, 2005; Albacete y col., 2008).

Es sabido que la fitohormona ácido abscísico (ABA) desempeña un papel importante en la adaptación de las plantas a distintos tipos de estrés ambiental estando particularmente involucrada en la respuesta frente a estrés abiótico, especialmente hídrico y salino. Sin embargo, la bibliografía sobre niveles endógenos y papel del ABA en halófitas es casi inexistente. En relación a las funciones del ABA, se conoce desde hace tiempo que actúa como una señal a larga distancia (raíz-hoja) del potencial agua del suelo. De esta manera, el ABA producido en raíces crecidas en suelos secos o salinos, es decir, con bajos potenciales agua, se transporta por xilema y regula la apertura estomática y el crecimiento de las hojas en el vástago (Zhang y col., 2006). Hartung y col., (2002) demostraron que los cambios en el pH celular juegan un papel central en la redistribución del ABA en los tejidos de la hoja

y controlan el movimiento de los estomas cuando no hay cambios significativos en la concentración del ABA en el xilema. Sin embargo, varios estudios demostraron que la conductancia estomática está relacionada directamente con la concentración del ABA en el xilema, mientras otros sugieren que la conductancia puede también responder al flujo del ABA, es decir, la cantidad de ABA que entra y se acumula en las hojas (Jarvis y Davies, 1997). Esto implica que el ABA también puede regular el movimiento estomático bajo condiciones “normales” debido a los cambios que se producen en la transpiración bajo estas condiciones. Por otro lado, un catabolismo rápido del ABA en las hojas es esencial para prevenir la acumulación del mismo y mantener la regulación de los estomas (Jia y Zhang, 1999). En relación a la acción del ABA en el cierre estomático se sabe que el aumento de esta hormona causa un incremento en los niveles de calcio citosólico, el cual actúa como segundo mensajero activando canales aniónicos localizados en la membrana plasmática (Kholer y Blatt, 2002). Ello conduce a la despolarización de la misma, salida de potasio, pérdida de turgencia y volumen de las células guarda para finalmente lograr el cierre estomático (Siegel y col., 2009). Esta hormona, también puede causar un incremento en la producción de H₂O₂ el cual actúa como molécula señal para promover el cierre del estoma (Zhang y col., 2001), y trabajos más recientes demostraron que la acumulación de óxido nítrico inducida por ABA en las células guarda también es necesaria para el cierre estomático (Lozano-Juste y León, 2010). Al parecer, el mecanismo de acción del ABA en el cierre estomático es complejo e implica un entrecruzamiento de varios caminos de señalización.

Se ha visto que adicionalmente a su bien conocida función en el cierre estomático, la tolerancia de los tejidos a situaciones estresantes se ve incrementada significativamente con elevadas concentraciones de esta hormona. Entre los mecanismos protectores dependientes de ABA citados se encuentran también la reducción del área foliar, protección del aparato fotosintético, modificación en la relación de crecimiento raíz / tallo, regulación de la síntesis de etileno y el ajuste osmótico, mediante la regulación de canales iónicos (principalmente en raíz) y la síntesis de solutos compatibles, principalmente prolina y azúcares (Alves y Setter, 2003; Peleg y Blumwald 2011).

Nuestros resultados demuestran que los niveles de ABA endógenos en *P. strombulifera* varían según el tipo y concentración de sal y el órgano analizado. La alta acumulación de

ABA observada en hojas con respecto a raíces podría deberse a su rápida biosíntesis y distribución en el mesófilo, como así también a su transporte desde raíces. La síntesis de esta hormona puede ocurrir tanto en raíces como en hojas, sin embargo, en nuestra especie, las hojas podrían ser la fuente principal de ABA o alternativamente esta hormona podría acumularse principalmente en hojas independientemente del sitio de biosíntesis. Estos resultados coinciden con estudios realizados por Maggio y col. (2007) quienes trabajaron con plantas de tomate y observaron que fue mayor la concentración de ABA en vástago que en raíz. Esta acumulación de ABA en el vástago podría involucrar la liberación de formas conjugadas almacenadas y subsecuentemente síntesis de novo.

Frente al tratamiento con Na_2SO_4 , los altos niveles de ABA observados en hojas a partir de los 40 días de cultivo y mantenidos hasta finalizar la experiencia, estarían correlacionados con los síntomas de toxicidad observados en estas plantas. Contrariamente, frente a NaCl el crecimiento fue óptimo sin visualización de síntomas de toxicidad, por lo que se podría pensar que no sería necesaria una elevada acumulación de ABA para su supervivencia. Por lo tanto, los niveles de esta hormona frente a NaCl sugieren que las plantas no están sensando un estrés excesivo y ABA sólo actuaría como mediador de respuestas de protección manteniendo un crecimiento similar al de plantas no salinizadas. Nuestros resultados coinciden con la propuesta de Zhang y col., (2006) que atribuyen a ABA un papel dual, es decir, cumpliría un papel promotor cuando se encuentra en bajas concentraciones, ya que se ha demostrado que es esencial para el crecimiento vegetativo en varios órganos (Cheng y col., 2002). Pero, tendría un papel inhibidor de procesos como la apertura estomática, expansión de la hoja, y crecimiento del vástago cuando se acumula en grandes cantidades bajo un estrés. Es necesario tener en cuenta que esta hormona se sintetiza en raíz y en hoja, y sea cual fuere su origen puede viajar desde las hojas hacia la raíz y regresar a la parte aérea en continua recirculación vía xilema y floema, mecanismo que ha sido destacado como de gran importancia para la protección de plantas de tomate bajo condiciones de estrés salino (Mulholland y col., 2003). Estos autores afirman que la función del ABA estaría directamente relacionada con el mantenimiento del crecimiento de hojas y tallo en un ritmo normal (dentro de las características de cada especie y su grado de tolerancia intrínseca), ayudando a la planta a sobrellevar el estrés ambiental a través de la regulación de la conductancia estomática por una rápida alteración de los flujos iónicos en

las células guarda (Parida y Das, 2004). Esto a su vez, provoca una disminución de la transpiración favoreciendo el mantenimiento de un potencial agua elevado en las células foliares. Por otra parte, Sharp y col. (2000), Spollen y col. (2000) y Sharp (2004) trabajando con mutantes ABA deficientes de tomate, maíz y *Arabidopsis* respectivamente, han demostrado que niveles endógenos de ABA normales (equivalentes a los del fenotipo silvestre) son necesarios para mantener el crecimiento del tallo y la expansión foliar independientemente del balance hídrico, y que en estos mutantes la ausencia de crecimiento causada por la deficiencia en esta hormona es al menos parcialmente debida a un incremento en la producción de etileno. Por lo tanto, un nivel elevado de ABA en plantas sometidas a déficit hídrico tendría la función de *mantener* el crecimiento del tallo (y no de inhibirlo como se consideraba anteriormente), pero esta acumulación de ABA en el tallo sería insuficiente para prevenir por completo la inhibición dependiente de etileno, generando una mayor sensibilidad de la parte aérea de la planta a la situación de estrés, respecto a la raíz.

Por lo tanto, en nuestros experimentos, ABA actuaría como molécula señal del estrés severo para proteger a las plantas de la toxicidad iónica causada por la presencia del anión sulfato, como así también como un factor de regulación del crecimiento vegetativo en plantas de *P. strombulifera*. Se ha propuesto que un déficit hídrico de desarrollo rápido puede perjudicar la síntesis y traslocación de osmorreguladores haciendo que la tasa de incremento en el ajuste osmótico no pueda alcanzar la velocidad de disminución del potencial agua; es decir, un establecimiento paulatino del déficit hídrico brinda una mejor oportunidad a las células de realizar ajuste osmótico (Alves y Setter, 2003). Estas afirmaciones se correlacionan con resultados previos de nuestro grupo que demuestran que las hojas de plantas tratadas con Na_2SO_4 no pueden realizar ajuste osmótico y poseen un potencial agua extremadamente negativo (Llanes y col., 2013), por lo que se sugiere que esta deshidratación gatillaría la acumulación de ABA en las hojas.

El SA es una importante molécula señal, cuyo su rol en respuesta frente a patógenos ha sido ampliamente estudiado en plantas (Yalpani y col., 1993; Halim y col., 2007). Estudios bioquímicos recientes han propuesto dos vías de biosíntesis de SA en plantas. Por un lado, se ha sugerido que el SA es sintetizado a partir del cinamato, compuesto que es producido por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL: phenylalanine ammonia lyase). La PAL es

un regulador clave de la vía de los fenilpropanoides y es inducida bajo diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico. Luego, el SA es producido por la vía del o-coumarato o por la del benzoato, dependiendo donde tome lugar la hidroxilación del anillo aromático. La otra vía de síntesis de SA implica a la enzima isocorismato sintetasa (ICS) a partir de corismato (Chen y col., 2009). No está del todo claro si una vía es más importante que la otra ni tampoco si una vía es independiente de la otra. Sin embargo, una variedad de estudios han sugerido que una actividad enzimática alta de la PAL es importante para la formación de SA, inducida por patógenos en las plantas. En efecto, en hojas de plantas de tabaco con el gen de la PAL silenciado, las cuales fueron inoculadas con el virus del mosaico de tabaco (TMV), los niveles de SA producidos fueron cuatro veces menores que los obtenidos de plantas controles (Pallas y col., 1996).

Diversas investigaciones han comprobado que el SA es capaz de incrementar la adaptación de plantas bajo condiciones de salinidad a través de varios mecanismos, tales como disminución del daño fotosintético (Arfan y col., 2007), aumento de la protección contra el estrés oxidativo (Xu y Tian 2008), acumulación de solutos compatibles (Poór y col., 2011) e inhibición de la compartimentalización de Na^+ y Cl^- (Gunes y col., 2007). Sin embargo, también se ha observado que plantas transgénicas NahG de *Arabidopsis thaliana*, deficientes en SA, mostraron una mejor adaptación frente al estrés salino en comparación a plantas salvajes. Una elevada acumulación de SA agravó el daño inducido por NaCl en procesos fotosintéticos y este fenómeno fue efectivamente revertido mediante la disminución de los niveles de SA (Hao y col., 2011).

Como fue mencionado previamente, en este trabajo se observó un elevado contenido de Na^+ en plantas tratadas con NaCl acompañado a un crecimiento óptimo sin presencia de síntomas de toxicidad, lo cual puede ser considerado como una verdadera respuesta halofítica. En estas plantas los niveles de SA se mantuvieron bajos durante toda la experiencia, siendo el contenido de Na^+ en raíces y hojas consistentemente mayor que el de plantas no salinizadas, indicando que su incorporación le permite realizar un adecuado ajuste osmótico. Por otro lado, los altos niveles de SA hallados en el presente estudio en plantas tratadas con Na_2SO_4 a los 48 días de cultivo podrían estar correlacionados con una falla en la compartimentalización de iones en comparación con plantas tratadas con NaCl, como fue previamente demostrado en nuestro laboratorio (Reginato y col., 2014a). Estas

respuestas sugieren que en *P. strombulifera* la producción de SA no es una señal hormonal de protección como ABA, sino que actuaría como señal de daño frente a situaciones de estrés. De hecho, las plantas tratadas con NaCl acumularon niveles similares de Na⁺ en hojas y raíces que aquellas tratadas con Na₂SO₄, pero fueron eficientes en la compartimentación de iones y osmorregulación, evidenciándose en su crecimiento, potencial osmótico y bajos valores de MDA, como así también en el ajuste osmótico y valores de potencial agua (Llanes y col., 2013). Una posible explicación para el éxito adaptativo de esta especie cuando crece en condiciones de elevada salinidad por NaCl podría involucrar entonces un delicado balance entre la efectiva acumulación de iones Na⁺ y K⁺ en vacuolas, exclusión de Cl⁻ y producción de solutos compatibles principalmente prolina y pinitol (Llanes y col., 2013) para mantenimiento del potencial de turgencia y de una tasa fotosintética normal evidenciada en la fluorescencia de clorofila, ψ_{PSII} y ETR. A su vez, estas respuestas serían coordinadas por las “hormonas del estrés” como mensajeros primarios.

Tal como se mencionó anteriormente, el SA es sintetizado a partir de la fenilalanina mediante la actividad de la PAL, la cual es un regulador clave de la vía de los fenilpropanoides y, por tanto, de varios compuestos fenólicos con múltiples funciones (Kong, 2015). Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento con NaCl no afectó el contenido de polifenoles de estas plantas (Reginato y col., 2014b). Sin embargo, el Na₂SO₄ indujo un marcado aumento de los flavonoles, mayormente de los flavantrioles, acompañado con un aumento significativo de los niveles de MDA, indicando un rol protector de estos compuestos para contrarrestar el daño producido por esta sal y sugiriendo que la vía de la PAL estaría aumentada cuando el anión SO₄²⁻ se encuentra presente en el medio de cultivo (Fig. 21).

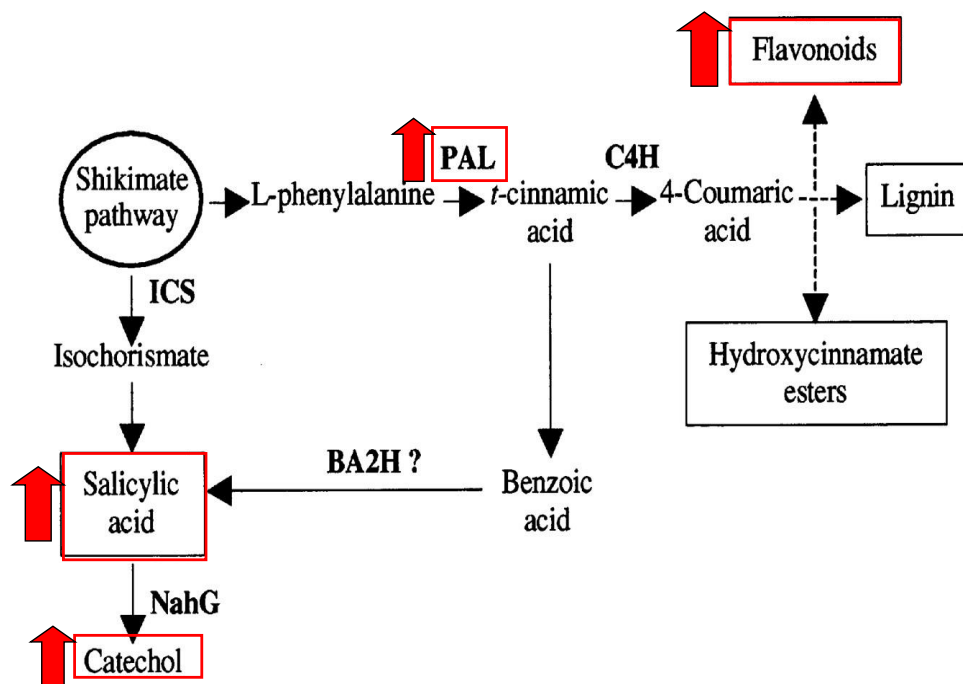


Fig. 21: Vía de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL)

Por otro lado, resulta llamativo el pico máximo de SA hallado en las raíces de plantas sin salinizar al inicio del experimento, el cual disminuye a medida que transcurren los días del cultivo. El catecol es un compuesto que es sintetizado a partir del SA por la acción de la enzima salicilato hidroxilasa (NahG). Estudios previos han postulado que el catecol posee actividad antioxidante (Zhou y Zheng, 1991). Asimismo, plantas transgénicas de *Arabidopsis*, las cuales sobreexpresan el gen NahG de la bacteria *Pseudomonas putida*, mostraron una mayor germinación en comparación a plantas silvestres, demostrando un rol inhibitorio del SA (Borsani y col., 2001). Recientemente, Lee y col. (2010) observaron que estas mismas plantas transgénicas acumularon altos niveles de catecol y fueron más eficientes en la germinación frente a elevada salinidad, por lo que propusieron al catecol como un potente antioxidante, aliviando la toxicidad causada por el estrés salino. En estudios realizados por nuestro laboratorio, se obtuvieron altos niveles de catecol en plantas sin salinizar mediante la técnica de aislamiento e identificación de polifenoles por HPLC-ESI-TOF-MS (comunicación personal de Celeste Varela). Por lo tanto, la disminución de SA observado en estas plantas a lo largo del ensayo puede deberse a que es degradado a catecol, el cual ejerce su rol como antioxidante, evidenciándose en su fenotipo saludable.

RESULTADOS

2. Efecto de la humedad relativa del ambiente sobre *P. strombulifera*

2.1. Evaluación del crecimiento de tallos y raíces de *P. strombulifera*

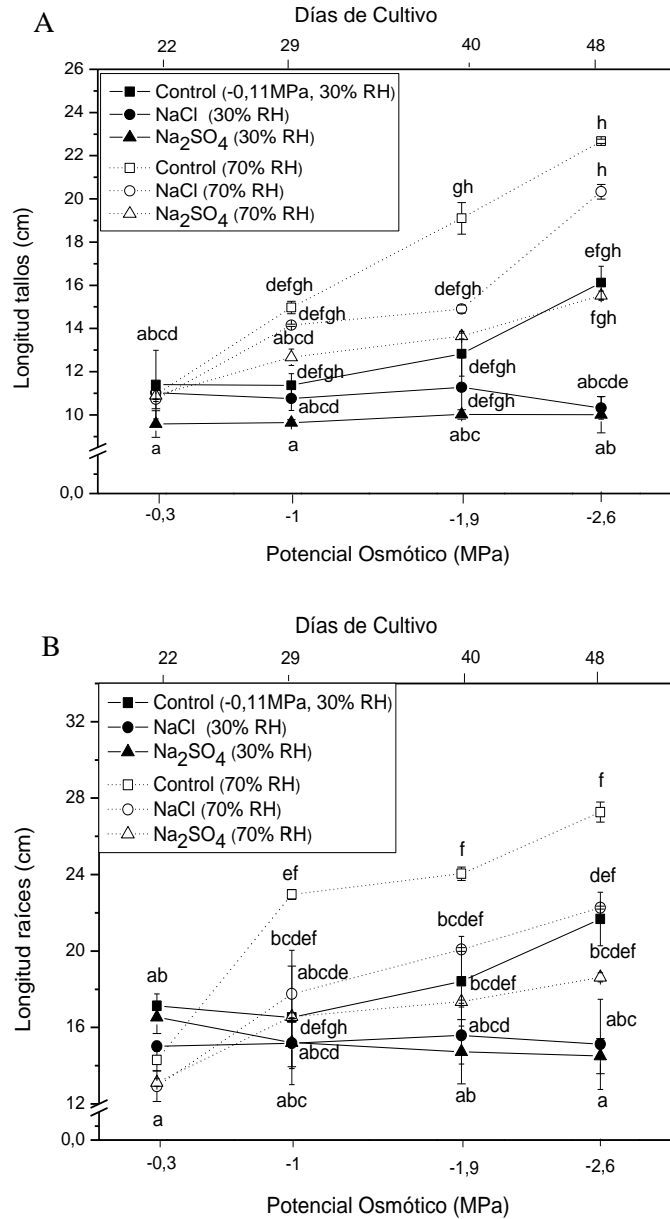


Fig. 22: Longitud de tallos (A) y raíces (B) de plantas de *P. strombulifera* a 30% y 70% HR

La triple interacción en el crecimiento de tallos fue significativa. A 30% HR ambas sales NaCl y Na₂SO₄ inhibieron el crecimiento con respecto a las plantas no salinizadas, principalmente a los 48 días de cultivo. En cambio, a 70% HR se observó una inhibición significativa del crecimiento únicamente en plantas tratadas con la sal Na₂SO₄.

En condiciones de baja humedad relativa el crecimiento de raíces de plantas tratadas fue menor que el de no tratadas a lo largo de toda la experiencia, siendo significativa esta diferencia a partir de los 40 días de cultivo. Por lo contrario, a 70% HR se observó un incremento del crecimiento en todos los tratamientos desde el inicio del experimento y no se detectaron diferencias significativas entre ellos. No obstante, el efecto de la interacción entre humedad realtiva x tipo de sal x días de cultivo sobre el crecimiento de raíces no fue significativo.

2.2 Determinación de clorofilas a y b

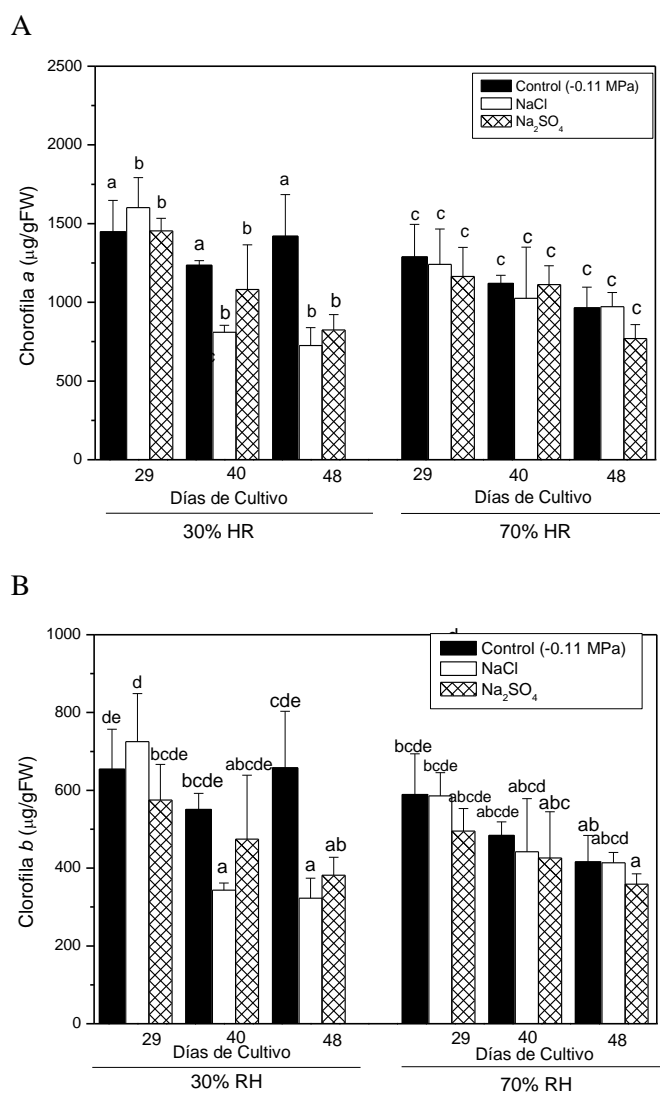


Fig. 23: Contenido de clorofilas *a* (A) y *b* (B) de plantas de *P. strombulifera* a 30% y 70% de HR

El contenido de clorofilas *a* y *b* a 30% de HR fue afectado por la salinización, independientemente del tipo de sal, disminuyendo sus niveles a medida que aumentó la concentración de sales en el medio. A 70% de HR no se hallaron diferencias significativas sobre los niveles de ambas clorofilas para ninguno de los tratamientos evaluados.

2.3 Niveles de SA endógeno en hojas y raíces de *P. strombulifera*

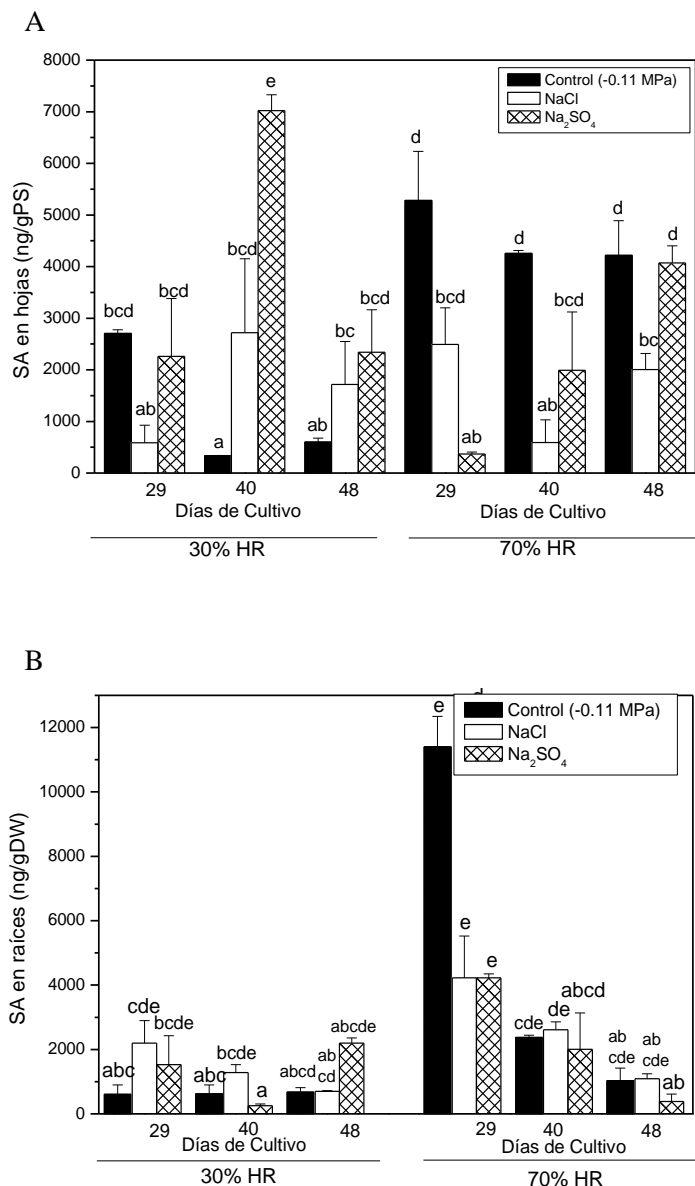


Fig. 24: Acumulación de SA en hojas (A) y raíces (B) de plantas de *P. strombulifera* a 30% y 70% de HR

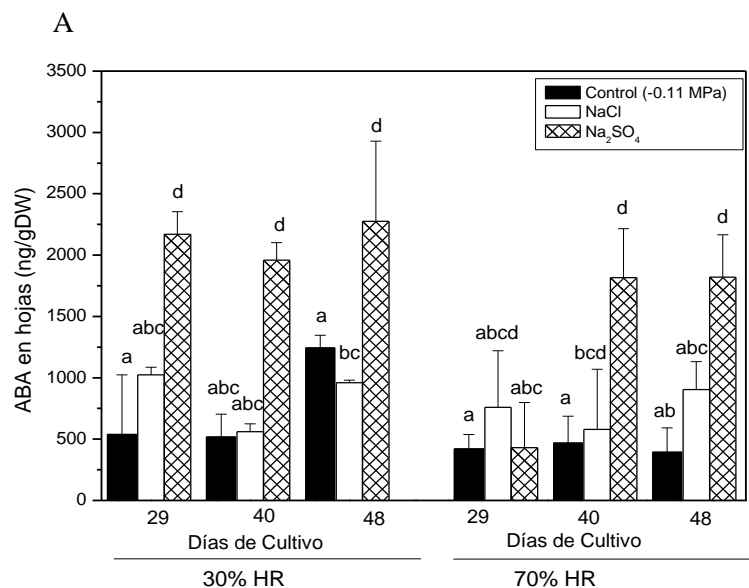
Notablemente, a 70% de HR, hubo un aumento significativo sobre la producción de SA en las plantas tratadas con Na₂SO₄ a medida que incrementaba la concentración de esta sal en el medio, duplicándose hacia el final del ensayo. Por otro lado, las plantas no salinizadas mostraron los mayores niveles de SA a lo largo de los días de cultivo, siendo estos niveles

muy similares a los obtenidos para plantas tratadas con NaCl. Bajo condiciones de baja HR, el contenido de SA tuvo un pico en hojas de plantas tratadas con Na₂SO₄ en el potencial osmótico -1,9 MPa que luego se redujo en el menor potencial osmótico evaluado.

El efecto de la interacción de HR x salinidad x días de cultivo fue estadísticamente significativo sobre el contenido de SA en raíces. A baja humedad relativa los niveles de SA fueron muy bajos durante todo el experimento, sin diferencias significativas diferentes los tratamientos.

Por otro lado, a 70% de HR los mayores niveles de SA se registraron en raíces de plantas no tratadas al comienzo de la experiencia (29 días de cultivo). La salinización indujo una disminución en los niveles de SA que se mantuvieron hasta el final.

2.4 Niveles de ABA endógeno en hojas y raíces de *P. strombulifera*



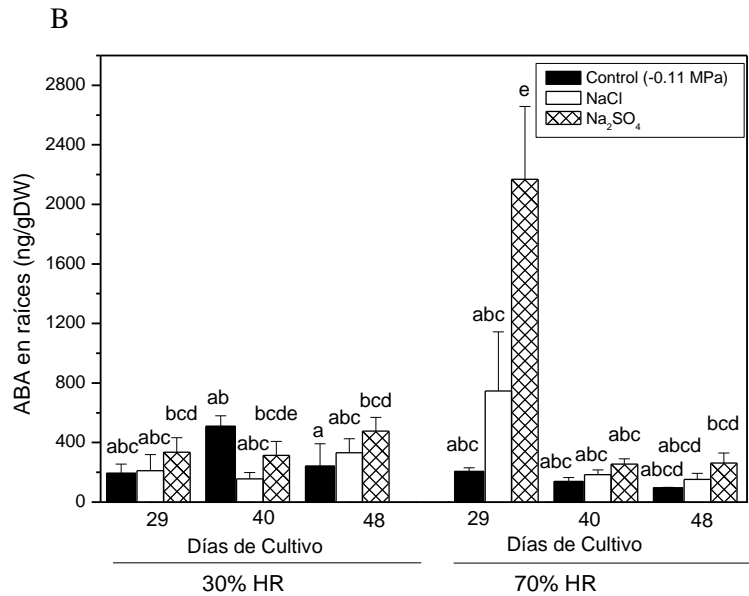


Fig. 25: Acumulación de ABA en hojas (A) y raíces (B) de plantas de *P. strombulifera* a 30% y 70% de HR

Como se observa en la Fig. 18A, a 30% de HR los niveles de ABA incrementaron drásticamente en hojas de plantas sometidas a concentraciones de Na₂SO₄ desde el inicio del tratamiento (29 días de cultivo), manteniéndose elevados hasta el final. En cambio, bajo altas condiciones de humedad el contenido de ABA en estas plantas tuvo el pico máximo a partir de los 40 días de cultivo.

En condiciones de baja humedad relativa, las raíces de plantas tratadas no mostraron diferencias significativas en los niveles de ABA en los mayores potenciales osmóticos (-1 y -1,9 MPa), mientras que a -2,6 MPa estos niveles incrementaron en plantas tratadas con Na₂SO₄, en comparación con plantas no tratadas. A 70% de HR la mayor acumulación de ABA fue observada en raíces de plantas tratadas con Na₂SO₄ al inicio de la experiencia (-1 MPa), sin hallarse diferencias significativas en ningún tratamiento en los demás potenciales evaluados.

2.5 Discusión

Variaciones en las condiciones ambientales son causantes de diferentes modificaciones en la fisiología de las plantas. La humedad relativa del ambiente produce cambios inmediatos en sistemas naturales bajo condiciones de estrés como son, la salinidad, la sequía, etc. Se ha observado que bajo condiciones de baja humedad relativa estas situaciones de estrés se potencian, ocasionando daños perjudiciales a las plantas (Neue y col. 1990).

En el presente estudio el efecto de la baja humedad quedó demostrado en una marcada inhibición del crecimiento observada tanto en tallos como en raíces de plantas tratadas con Na_2SO_4 , acompañadas con síntomas de senescencia como clorosis y necrosis. Asimismo, en plantas tratadas con NaCl también fue observada esta respuesta en el menor potencial osmótico evaluado (-2,6MPa). Estas respuestas serían causadas por un aumento en la transpiración de las plantas a través del efecto directo de la baja humedad relativa en el gradiente de presión de vapor de la hoja, lo cual genera una entrada de iones excesiva con una consecuente inhibición del crecimiento. Además, se observó una reducción significativa en el contenido de clorofilas a y b en todos los tratamientos. Por el contrario, los parámetros de crecimiento y contenido de pigmentos fotosintéticos fueron menos afectados bajo una HR de 70%. Sin embargo, la longitud de tallos y raíces de plantas tratadas con Na_2SO_4 fue menor en comparación con la de plantas tratadas con NaCl , como había sido previamente observado y discutido en la presente tesis doctoral. De esta manera, se confirma una vez más la toxicidad generada por el SO_4^{2-} cuando el mismo está presente en el medio de cultivo. Por lo tanto, estos resultados demostraron que la baja humedad relativa del ambiente acentúa los efectos tóxicos de salinidad en el crecimiento vegetativo y en la síntesis de pigmentos.

Diferentes estudios han propuesto que la acumulación de ABA endógeno es afectada por la humedad relativa del ambiente (Tan y col., 2003; Lee y col., 2006; Endo y col., 2008). Se ha observado que en espinaca (*Spinacia oleracea*) y *Tradescantia virginiana*, los niveles de ABA fueron menores en hojas crecidas bajo alta humedad, en comparación a aquellas crecidas en moderada humedad (Rezaei Nejad y Van Meeteren 2007, 2008). Sin embargo, el conocimiento de la respuesta de ABA frente a distintas condiciones de humedad es muy limitado en especies halófitas. Como era esperable, a 30% de HR se observó una alta

acumulación de ABA desde el inicio del experimento, especialmente en plantas tratadas con Na_2SO_4 , correlacionándose con los síntomas de toxicidad observados. De esta manera, ABA actuaría como molécula señal de una respuesta adaptativa para la supervivencia de las plantas frente a esta severa situación de estrés. Sin embargo, en estudios previos hemos propuesto que la presencia del anión SO_4^{2-} bloquea la actividad del ABA, inhibiendo el cierre estomático y por lo tanto incrementando la transpiración en estas plantas (Llanes y col., 2013). Contrariamente, el contenido de ABA en plantas tratadas con NaCl fue levemente modificado por la humedad relativa y concentración salina, sin diferencias significativas, lo que pone de manifiesto la elevada capacidad adaptativa de esta especie frente al NaCl.

Por otro lado, a pesar de que el rol del SA en la tolerancia frente a distintos tipos de estrés biótico y abiótico en glicófitas ha sido ampliamente estudiado, la bibliografía existente en plantas halófitas es muy escasa. A esto se le suma que la mayoría de los estudios han sido realizados con aplicaciones exógenas de SA, sin tener en cuenta los niveles endógenos de esta fitohormona. En consecuencia, se generan grandes contradicciones con respecto al rol del SA frente al estrés abiótico en plantas. A baja humedad relativa se observó que los niveles de SA incrementaron en plantas tratadas con ambas sales, siendo mayores estos niveles en plantas tratadas con Na_2SO_4 . Notablemente, el pico máximo de SA en estas plantas se observó a -1,9 MPa mientras que a 70% fue a -2,6 MPa, indicando el efecto aditivo de la baja humedad y salinidad. Como se observó previamente, los altos niveles de SA hallados en plantas tratadas con Na_2SO_4 se correlacionan con una falla en la compartimentalización de iones en comparación con plantas tratadas con NaCl. De hecho, el contenido de SA endógeno bajo el tratamiento con NaCl fue bajo y constante durante toda la experiencia. Sin embargo, cabe aclarar que la baja humedad relativa indujo un aumento de SA en estas plantas, acentuando el efecto de la salinidad. Por lo tanto, estas respuestas sugieren que en *P. strombulifera* la producción de SA no es una señal hormonal de protección como ABA, sino que actuaría como señal de daño frente a situaciones de estrés.

De esta manera, si las fitohormonas ABA y SA son consideradas como señales primarias que desencadenan diferentes eventos bioquímicos y moleculares luego de la percepción de una situación de estrés, este estudio demuestra que cuando diferentes tipos de sales (efecto

iónico), distintas concentraciones (efecto osmótico) de las mismas y diferentes condiciones de humedad relativa son aplicadas simultáneamente, éstas interactúan generando respuestas que difieren significativamente a las que se obtendrían si cada factor se aplicara por separado. Por lo tanto, los factores aplicados disparan diversos mecanismos de respuesta, como la producción de fitohormonas, modificándose como consecuencia, el crecimiento y desarrollo vegetal.

RESULTADOS

3. Efecto del tratamiento exógeno con Ácido Salicílico sobre *P. strombulifera*

3.1 Evaluación del crecimiento en tallos y raíces de *P. strombulifera* frente a la aplicación exógena de SA

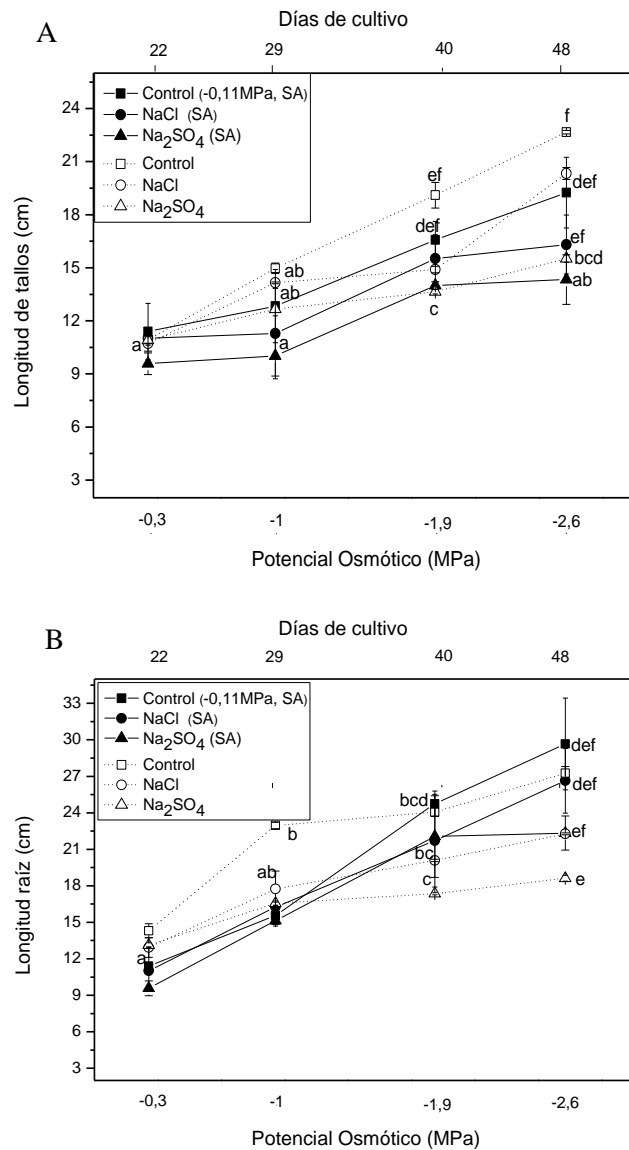
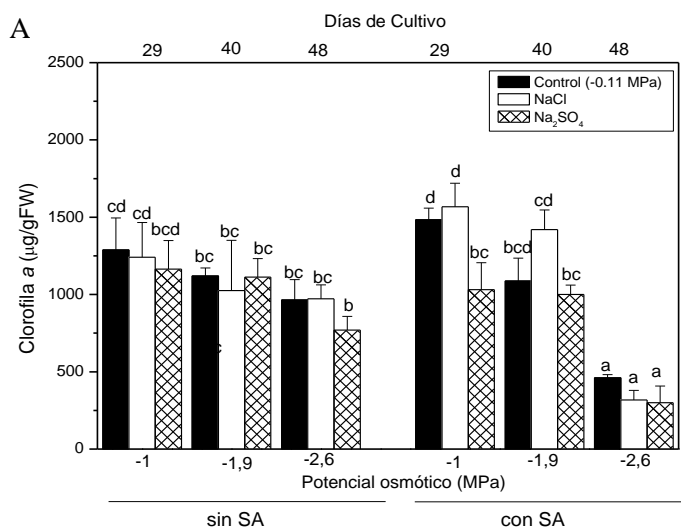


Fig. 26: Crecimiento de tallos (A) y raíces (B) de plantas de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de 1 mM de SA

El crecimiento de tallos y raíces fue determinado a los 22, 29, 40 y 48 días de cultivo, que coinciden con el inicio de los tratamientos salinos (día 22) y las fechas en las cuales se arribó a los tres potenciales osmóticos en las cuales se recolectaron muestras para las distintas determinaciones. Se evaluó el efecto de la triple interacción para el tratamiento de SA exógeno, diferentes sales aplicadas y distintas concentraciones de las mismas. Sin embargo, este efecto no fue estadísticamente significativo tanto para tallos como para raíces.

Los resultados obtenidos confirmaron la inhibición significativa del crecimiento a partir de los 40 días de cultivo en tallos de plantas tratadas con Na_2SO_4 . A pesar de que el análisis estadístico no dio diferencias entre las tratadas con SA y sin tratar, lo cual indicaría la ausencia de efecto de esta aplicación hormonal, en el gráfico se observa una clara tendencia a la inhibición por SA en todos los casos desde el inicio del tratamiento.

3.2 Contenido de clorofilas a y b



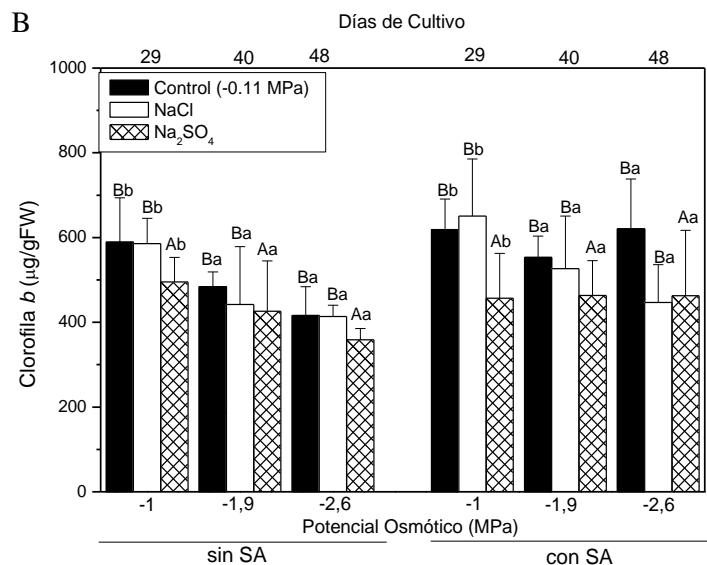


Fig. 27: Contenido de clorofila *a* (A) y *b* (B) en plantas de *P. strombulifera* con y sin aplicación de 1 mM de SA

La triple interacción entre el tratamiento exógeno con SA, tipo de sales y concentración de las mismas fue estadísticamente significativa en el contenido de clorofila *a*.

Bajo la aplicación exógena de SA, los niveles de clorofila *a* no arrojaron diferencias significativas con respecto a las plantas que no recibieron tratamiento exógeno, excepto en el menor potencial osmótico evaluado (-2,6 MPa). En el mismo, el efecto negativo del SA fue muy marcado, siendo estadísticamente significativo tanto en plantas salinizadas como en plantas sin salinizar.

El SA no indujo diferencias significativas en los niveles de clorofila *b* en ninguno de los tratamientos evaluados a lo largo de la experiencia.

3.3 Acumulación de carotenoides

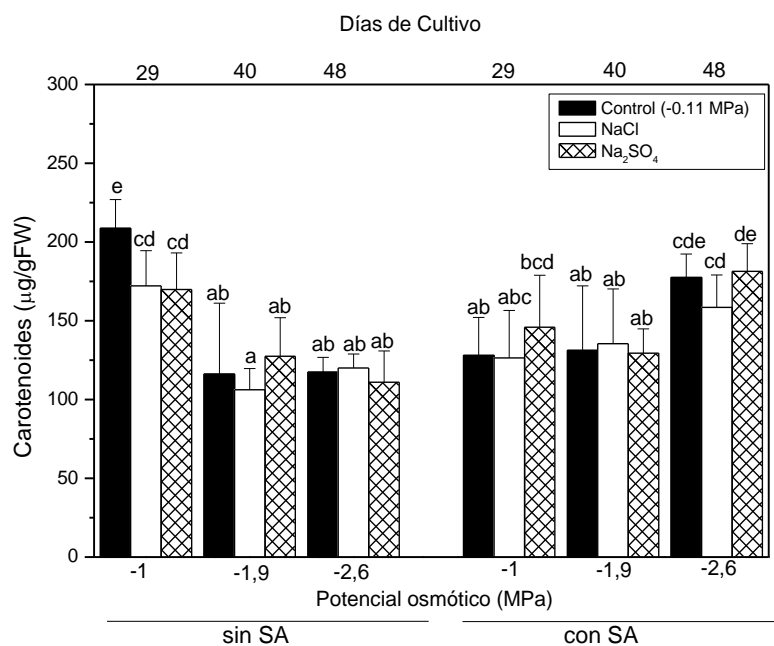


Fig. 28: Contenido de carotenoides en plantas de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de SA

Bajo la aplicación exógena con SA, la respuesta observada para el contenido de carotenoides fue inversa a lo observado en plantas no tratadas, ya que el mismo aumentó significativamente a medida que transcurrió el experimento. Sin embargo, no hubo diferencias entre el tipo de sales evaluadas.

3.4 Acumulación de Na^+ en hojas y raíces de *P. strombulifera*

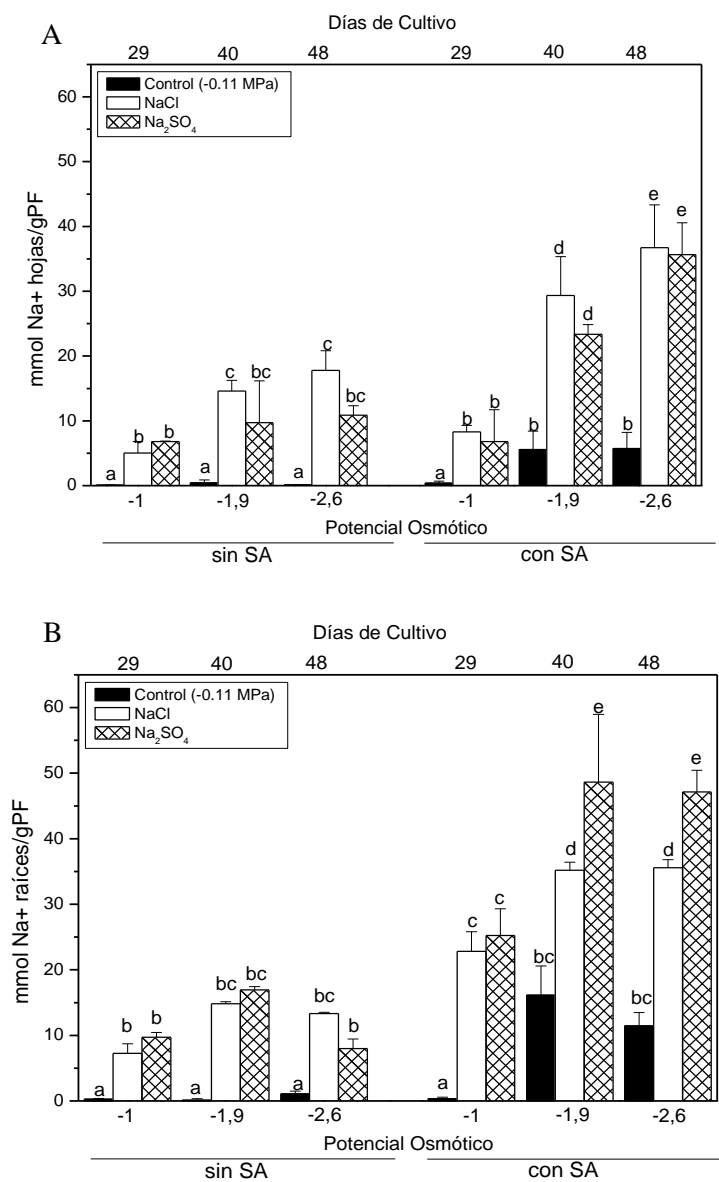


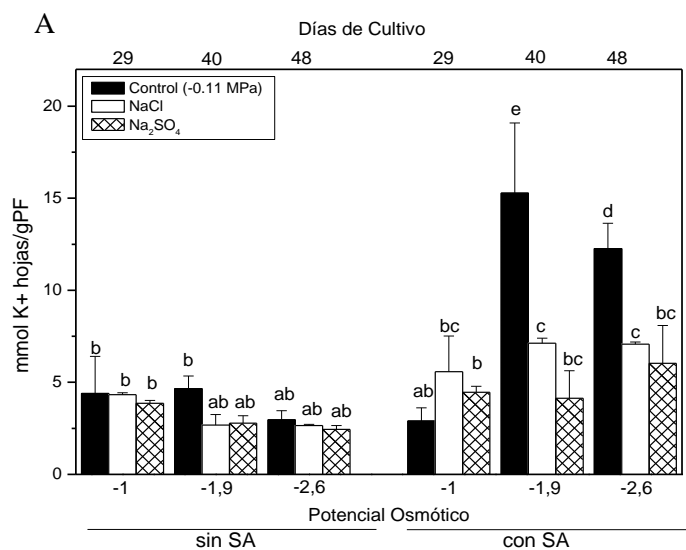
Fig. 29: Contenido de Na^+ en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de SA

La triple interacción entre el SA, distintos tipos de sales y diferentes días de cultivo evaluados fue estadísticamente significativa en el contenido de Na^+ , tanto en hojas como en raíces de *P. strombulifera*.

Es interesante destacar que la respuesta obtenida para el contenido de Na^+ en hojas de plantas no tratadas exógenamente con SA es similar a la de plantas tratadas, acentuándose esta respuesta debido al efecto del SA. De esta forma, el contenido de Na^+ en hojas de plantas salinizadas es significativamente mayor que el de plantas no salinizadas en todos los potenciales osmóticos evaluados, no existiendo diferencias significativas entre NaCl y Na_2SO_4 .

En raíces de plantas tratadas con SA, también se observa una respuesta acentuada debido a la aplicación exógena de SA, ya que los niveles de Na^+ son significativamente mayores en plantas salinizadas (principalmente con Na_2SO_4) en comparación a las plantas sin salinizar. Además, estos niveles incrementaron a medida que disminuyó el potencial osmótico en el medio de cultivo. Por otro lado, es muy interesante observar el aumento significativo del contenido de Na^+ en raíces de plantas no salinizadas a partir de los 40 días de cultivo, el cual se mantuvo constante hasta finalizar la experiencia.

3.5 Acumulación de K^+ en hojas y raíces de *P. strombulifera*



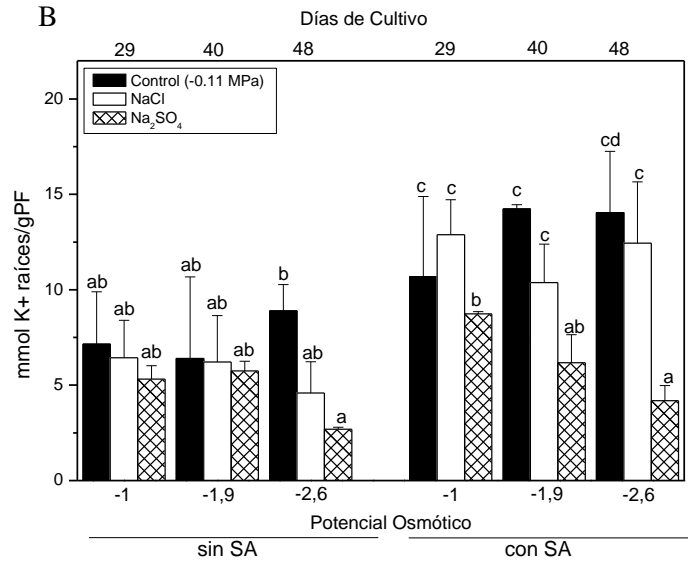


Fig. 30: Contenido de K^+ en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de SA

En las hojas de plantas que no recibieron la aplicación exógena de SA, el contenido de K^+ disminuyó levemente a medida que incrementó la concentración de sales en el medio, sin observarse diferencias significativas. Sin embargo, la aplicación exógena de SA indujo un aumento estadísticamente significativo en plantas no salinizadas a partir de los 40 días de cultivo, incrementando aún más al finalizar la experiencia. En plantas salinizadas, el contenido de K^+ se mantuvo relativamente constante durante todo el ensayo.

Bajo la aplicación exógena de SA, el contenido de K^+ en raíces fue significativamente mayor y se mantuvo constante a lo largo de toda la experiencia en plantas sin salinizar y plantas tratadas con NaCl. Sin embargo las raíces de plantas tratadas con Na_2SO_4 disminuyeron la incorporación de K^+ a medida que incrementaba la concentración de sal.

3.6 Relación Na^+/K^+ en hojas y raíces de *P. strombulifera*

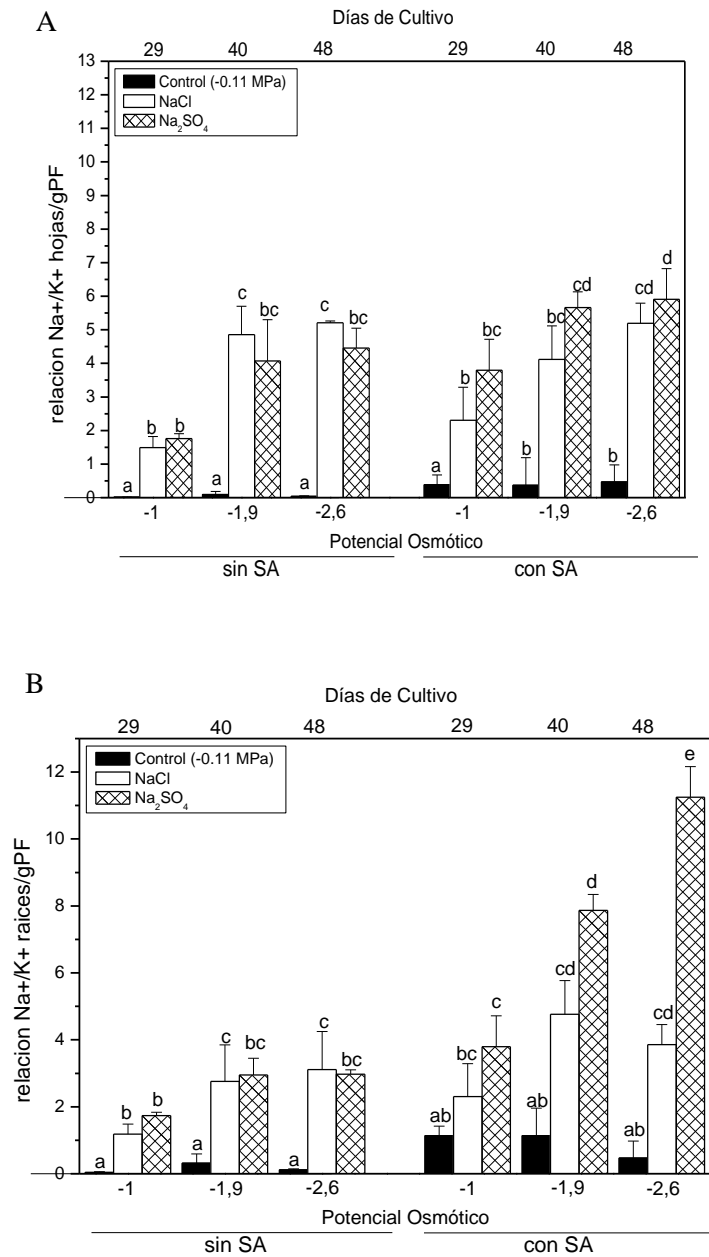


Fig. 31: Relación Na^+/K^+ en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de SA

Al igual que para el contenido de Na^+ y K^+ , el tratamiento exógeno con SA acentuó la respuesta sobre la relación Na^+/K^+ para todos los tratamientos evaluados tanto en hojas

como en raíces, siendo este aumento muy notorio y estadísticamente significativo en las raíces de plantas tratadas con Na₂SO₄ a mediana y elevada salinidad (-1,9 y -2,6 MPa).

3.7 Acumulación de Prolina en raíces y hojas de *P. strombulifera*

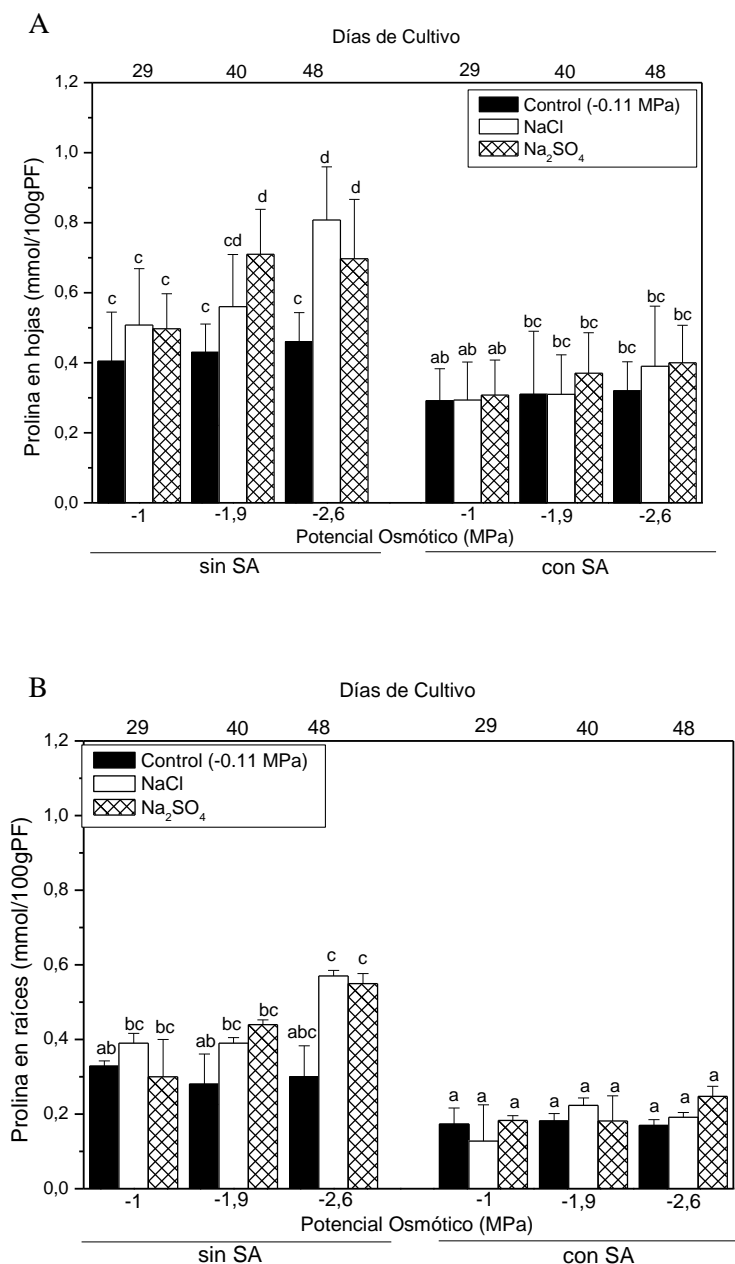


Fig. 32: Contenido de Prolina en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de SA

Llamativamente, el tratamiento exógeno con SA indujo una marcada reducción del contenido de Prolina tanto en hojas como en raíces de todos los tratamientos y días de cultivos evaluados. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre plantas sin salinizar y plantas tratadas con NaCl y Na₂SO₄.

3.8 Contenido de MDA en hojas y raíces de *P. strombulifera*

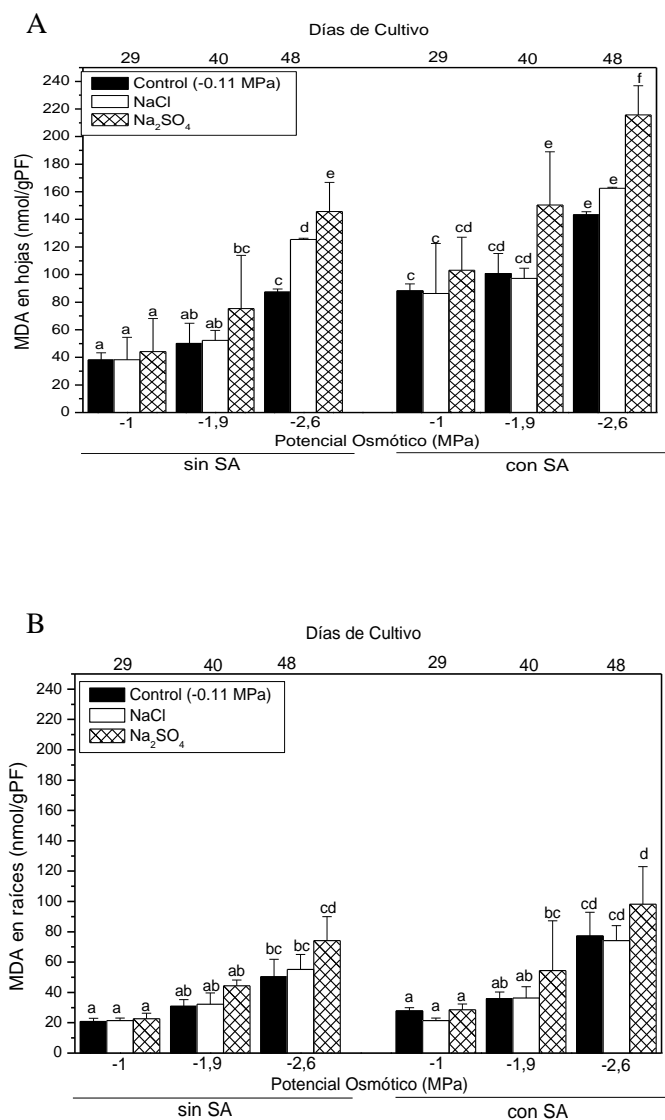


Fig. 33: Acumulación de MDA en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con y sin la aplicación exógena de SA

Bajo la aplicación exógena de SA, el contenido de MDA en hojas incrementó significativamente a medida que transcurrían los días del cultivo, siendo muy marcado este aumento en plantas tratadas con Na_2SO_4 a elevada salinidad (-2,6 MPa).

Asimismo, el contenido de MDA en raíces aumentó a lo largo de la experiencia para todos los tratamientos evaluados, pero estos valores fueron más bajos que los obtenidos en las hojas de esta halófito.

3.9 Potencial osmótico en hojas y raíces de *P. strombulifera*

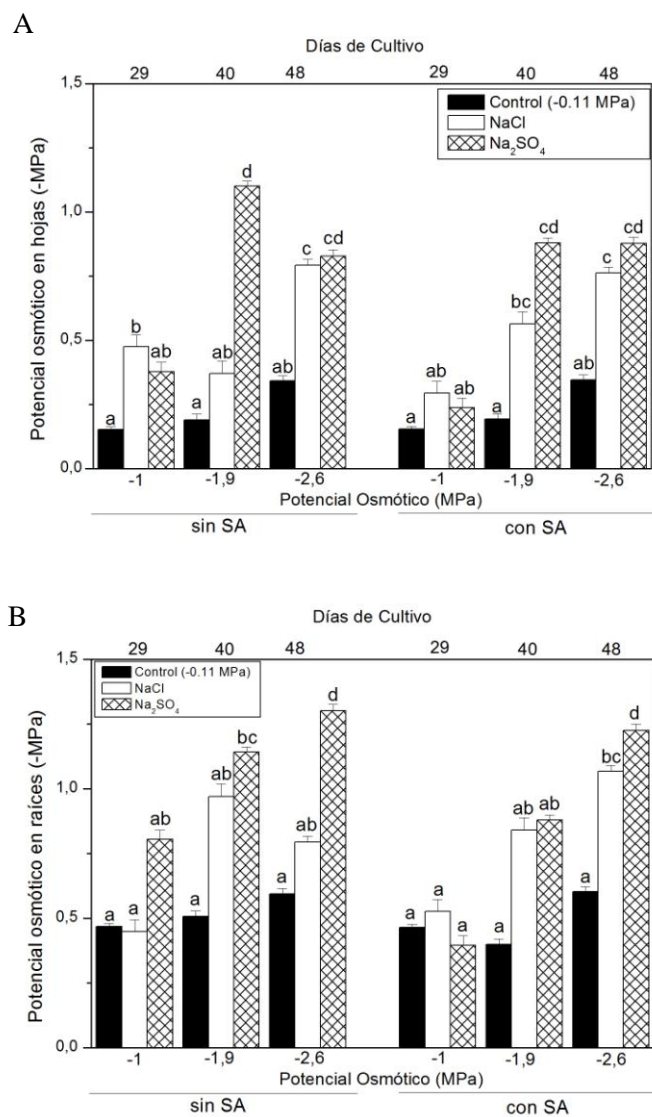
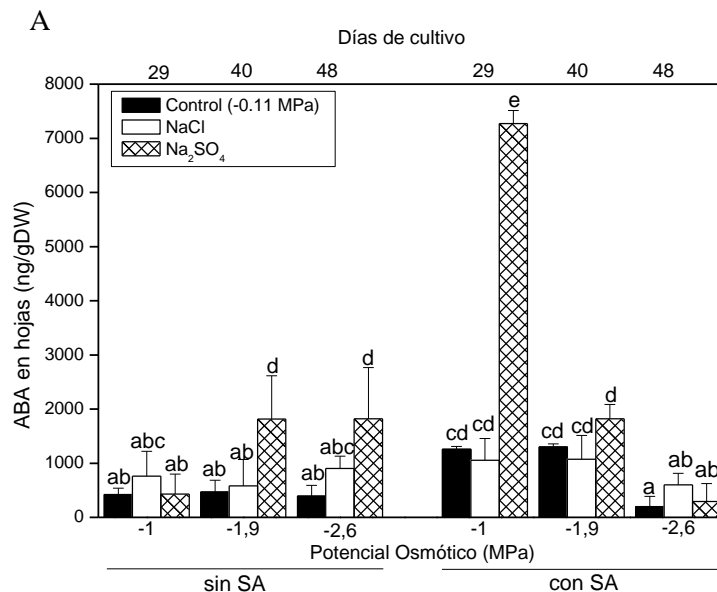


Fig. 34: Potencial osmótico en hojas (A) y raíces (B) con y sin la aplicación exógena de SA

El SA exógeno no causó un efecto significativo sobre el potencial osmótico de hojas de *P. strombulifera*, ya que se observa que estos valores fueron similares a los obtenidos para plantas que no recibieron el tratamiento exógeno.

En raíces de plantas tratadas con Na₂SO₄ en respuesta al SA exógeno el potencial osmótico disminuye significativamente a medida que aumenta la salinidad, en comparación con plantas tratadas con NaCl y plantas sin tratamiento salino. Sin embargo no se observó la fuerte disminución del potencial osmótico a -1,9 MPa que se obtuvo sin aplicación de SA.

3.10 Niveles de ABA endógenos en hojas y raíces de plantas de *P. strombulifera*



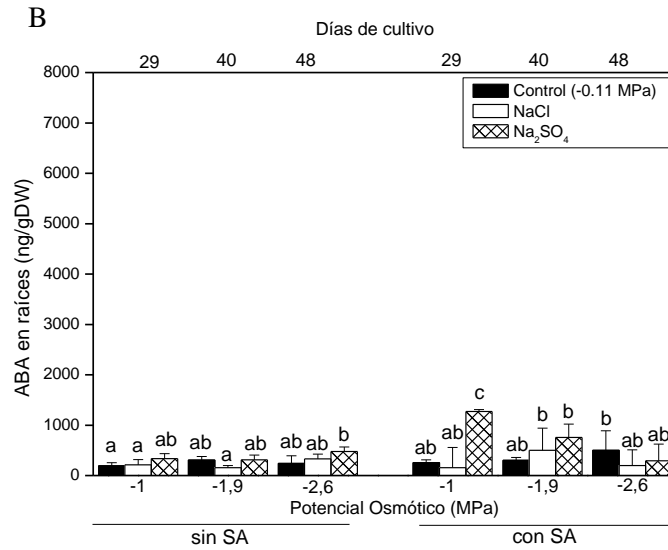


Fig. 35: Niveles de ABA endógeno en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de SA

El efecto de la triple interacción entre tratamiento con SA, tipo de sales y días de cultivo fue significativa sobre la acumulación de ABA endógeno en hojas.

Sin tratamiento con SA, los niveles de ABA en hojas incrementaron significativamente en plantas tratadas con Na₂SO₄ a partir de los 40 días de cultivo, manteniéndose elevados hasta finalizar la experiencia. Por otro lado, en plantas con aplicación exógena de SA y tratadas con Na₂SO₄ se observó un pico máximo de ABA al inicio del tratamiento, disminuyendo significativamente este contenido durante la experiencia.

Frente a NaCl, tanto en plantas que no recibieron aplicación exógena de SA como aquellas que si lo hicieron, los niveles de esta hormona no arrojaron diferencias significativas con respecto a las plantas no tratadas en ningún potencial osmótico evaluado.

El efecto de la triple interacción también fue significativa sobre la acumulación de ABA endógeno en raíces. Cabe destacar que los niveles de esta fitohormona fueron considerablemente mayores en hojas en comparación a los de raíces, para todos los tratamientos evaluados.

Remarcadamente, el SA causó un aumento abrupto en el contenido de ABA en raíces de plantas tratadas con Na₂SO₄ al inicio de la experiencia, disminuyendo a medida que aumentó la concentración de sales en el medio de cultivo. En plantas tratadas con NaCl y

plantas sin salinizar no se observaron diferencias significativas en los diferentes días de cultivo evaluados, manteniéndose constantes a lo largo de toda la experiencia.

3.11 Acumulación de SA endógeno en hojas y raíces de plantas de *P. strombulifera*

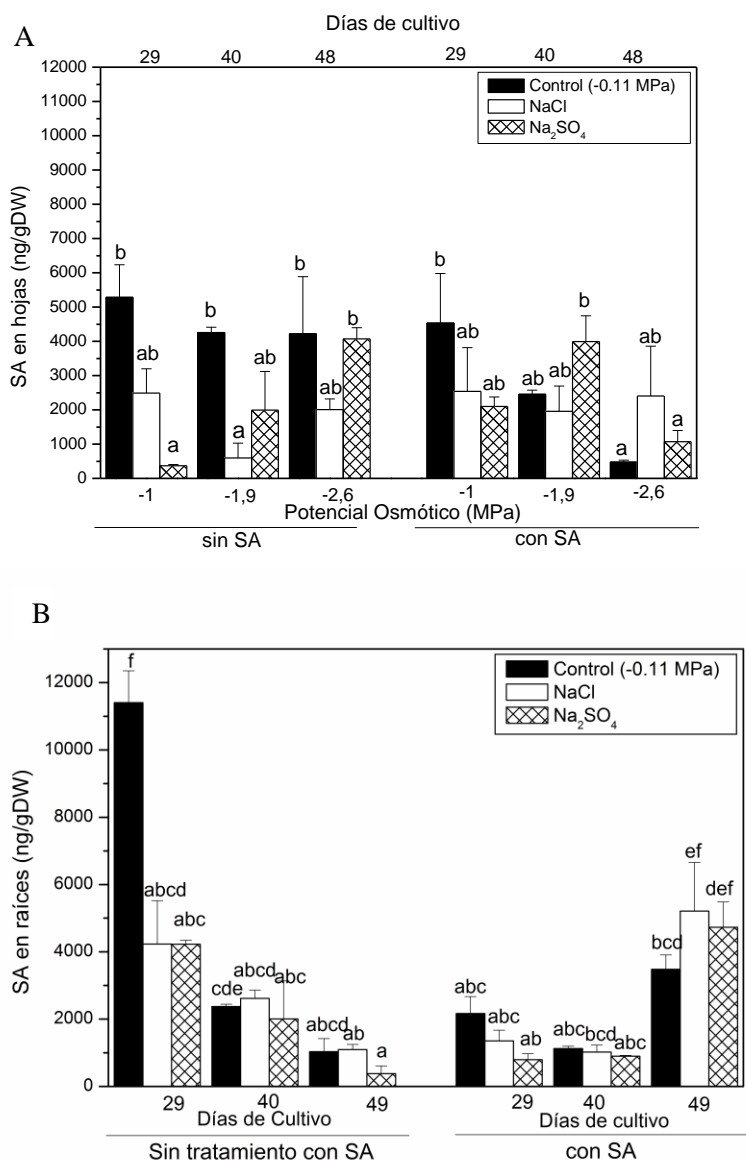


Fig. 36: Niveles de SA endógeno en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de SA

El efecto de la triple interacción no dio estadísticamente significativo en el contenido endógeno de SA en hojas en plantas salinizadas.

Bajo la aplicación exógena de SA, los niveles de esta hormona decrecieron en plantas no salinizadas a lo largo de la experiencia, no variaron en plantas tratadas con NaCl, y se observó una disminución significativa de esta hormona en plantas tratadas con Na₂SO₄ en el menor potencial osmótico evaluado (-2,6 MPa).

En raíces de plantas sin tratamiento exógeno de SA, los niveles de esta hormona disminuyeron a lo largo de toda la experiencia para todos los tratamientos salinos evaluados. Sin embargo, en plantas tratadas exógenamente con SA, el contenido del mismo incrementó significativamente al final de la experiencia en todos los tratamientos.

3.12 Discusión

En lo que respecta al rol del SA sobre el crecimiento vegetal, se ha propuesto que su aplicación exógena alivia el efecto negativo de la salinidad sobre diferentes parámetros de crecimiento, tales como longitud de tallos, longitud de raíces, peso seco y área foliar (Yusulf y col., 2012; Shakirova y col., 2007). Por otro lado, se ha observado que en plantas de poroto no estresadas tratadas exógenamente con SA se indujo una disminución en el peso seco de tallos y raíces y, consecuentemente, del peso seco total de la planta (Palma y col., 2009). Una tendencia similar fue demostrada en plantas de tabaco in vitro (Dat y col., 2000). Los resultados obtenidos en plantas tratadas con Na_2SO_4 , mostraron una inhibición aditiva a la provocada por la sal en sí, causada por la aplicación exógena de SA, que es observable a pesar de que no fue estadísticamente significativa. Esta respuesta se vio acompañada con síntomas de senescencia como clorosis, necrosis y abscisión de hojas. Como se mencionó previamente, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio quedó demostrada la fuerte reducción de los parámetros de crecimiento cuando el anión SO_4^{2-} se encontraba presente en el medio. Estos resultados se correlacionan positivamente con los aquí observados de los niveles endógenos de SA en las distintas sales evaluadas, donde el mayor contenido de esta hormona se encontró en hojas de plantas tratadas con Na_2SO_4 . Por lo tanto, se propone que el SA no ejerce un papel protector en esta especie halófila (Devinar y col. 2013).

Diferentes estudios han propuesto al SA como un importante regulador de la fotosíntesis, relaciones hídricas y diversos aspectos metabólicos de las plantas, afectando la estructura de los cloroplastos (Uzunova y Popova 2000), el cierre estomático (Melotto y col. 2006) y el contenido de clorofilas y carotenoides (Faruddin y col. 2003). Por otro lado, Hao y col. (2011) observaron que una elevada acumulación de SA en plantas transgénicas NahG de *A. thaliana*, agravó el daño inducido por NaCl en procesos fotosintéticos, respuesta que fue revertida en el fenotipo salvaje. Por su parte, Moharekar y col. (2003) observaron que el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofilas *a* y *b*) decreció significativamente en plantas de trigo a medida que incrementó la concentración de SA en el medio. Asimismo, la aplicación foliar de SA causó una disminución del contenido de clorofilas en *Vigna mungo* (Anandhi y Ramanujam 1997). De manera similar, los resultados obtenidos en el presente

estudio demostraron que la aplicación exógena de SA causó una disminución significativa sobre el contenido de clorofila *a* para todos los tratamientos evaluados, sin observarse diferencias significativas sobre el contenido de clorofila *b*. Por lo tanto, esta respuesta confirma el efecto negativo del SA sobre el proceso de fotosíntesis en esta especie.

Los carotenoides actúan como pigmentos accesorios cosechadores de luz, atrapando la energía lumínica y luego transfiriéndola a las moléculas de clorofila. Además, se ha observado que los carotenoides tienen la función de proteger el aparato fotosintético del estrés oxidativo ocasionado por las EROs (Bianneth Peña y Rastrepo, 2013) Por otro lado, se ha propuesto que el SA induce la acumulación de peróxido de hidrógeno a través de la inhibición de las enzimas catalasa y ascorbato peroxidasa (Rao y col. 1997, Luo y col. 2001). En contraste con los resultados obtenidos sobre los niveles de clorofila *a*, la aplicación exógena de SA causó un aumento sobre la acumulación de carotenoides en esta especie, siendo estadísticamente significativo en el menor potencial osmótico evaluado. En el estudio realizado por Moharekar y col. (2003) también observaron un incremento en el contenido de carotenoides a medida que aumentó la concentración de SA en plantas de trigo y poroto. De esta manera, se propone que el mayor contenido de carotenoides encontrado en plantas de *P. strombulifera* podría ser un mecanismo de respuesta frente al estrés oxidativo inducido por SA. Este daño oxidativo se encuentra también reflejado en los niveles de MDA observados, ya que aumentaron significativamente en todos los tratamientos bajo la aplicación exógena con SA, siendo más notorio este aumento en hojas de plantas tratadas con Na₂SO₄.

Por otra parte, se ha comprobado que el SA exógeno ocasionó un aumento en los niveles de prolina en diferentes especies bajo condiciones de salinidad, aliviando de esta forma, los efectos adversos causados por este tipo de estrés (Misra y Saxena 2009; Shakirova y col. 2003). Contrariamente, los niveles de prolina en plantas de *P. strombulifera* tratadas exógenamente con SA fueron significativamente menores en todos los tratamientos evaluados. Sin embargo, no se observaron diferencias entre plantas tratadas con NaCl y con Na₂SO₄. Teniendo en cuenta los resultados previos de nuestro grupo en los cuales la prolina se incrementaba notablemente bajo ambos tratamientos salinos, cabría pensar que el efecto del SA exógeno causó una inhibición en la síntesis de prolina. Esta respuesta, por cierto

inesperada, indica una vez más que SA tiene un efecto deletéreo en nuestra especie en estudio, afectando en este caso la síntesis de un osmoprotector.

Como se mencionó previamente, la homeostasis intracelular de Na^+ y K^+ es crucial para el metabolismo de la célula y es considerada como una estrategia común utilizada por las plantas tolerantes (Chinnusamy y col. 2005). De manera de mantener una relación de Na^+/K^+ óptima en el citosol, las plantas remueven el exceso de los iones Na^+ al exterior y/o son capaces de compartimentalizar estos cationes en vacuolas, manteniendo, a la vez, concentraciones de K^+ fisiológicas en el citoplasma (Olias y col., 2009).

Resulta interesante destacar que la respuesta obtenida para el contenido de Na^+ en hojas de plantas de *P. strombulifera* sin tratamiento exógeno con SA, mostró una tendencia similar a la de plantas tratadas, acentuándose notablemente esta respuesta debido al efecto del SA. De esta manera, se observó una mayor acumulación de Na^+ en las hojas de plantas tratadas con NaCl y SA de *P. strombulifera* a partir de -1,9 MPa, que fue estadísticamente significativa con respecto a plantas que no recibieron el tratamiento exógeno con SA. Se había postulado previamente que esta respuesta podría estar relacionada con la edad de las plantas, es decir, el tiempo durante el cual estuvieron transpirando y enviando Na^+ a la parte aérea. Por lo tanto, estos resultados confirman que las respuestas observadas en relación al contenido de Na^+ se vieron intensificadas por las aplicaciones de SA exógeno.

Las plantas tratadas exógenamente con SA y Na_2SO_4 acumularon grandes cantidades de Na^+ en raíces, siendo estos niveles estadísticamente menores en comparación con las plantas tratadas con NaCl a partir de -1,9 MPa. Asimismo, la mayor acumulación de Na^+ en raíces en comparación con las hojas de plantas tratadas con SA, demuestra que hubo una mayor dificultad para volcar Na^+ al xilema, tal como se había observado en plantas sin tratamiento con SA. Esta respuesta sumada al elevado contenido de MDA bajo el SA exógeno confirma que existe un daño sobre la permeabilidad de las membranas, con menor exclusión de Na^+ . Cabe destacar que los niveles de Na^+ obtenidos en raíces de plantas tratadas con SA y NaCl también fueron estadísticamente mayores que los hallados en plantas sin aplicación exógena, por lo que estas plantas también tuvieron dificultad para exportar iones Na^+ a hojas. Estos resultados también fueron reflejados en las tasas de Na^+/K^+ observadas para todos los tratamientos evaluados.

Notablemente, el contenido de K^+ en hojas de plantas no salinizadas, tratadas exógenamente con SA, aumentó abruptamente a partir de los 40 días de cultivo, dándose este aumento en raíces, desde el inicio de la experiencia. Esta respuesta podría deberse a que estas plantas estarían sensando una señal de estrés debida a la presencia de SA, por lo que aumentarían sus niveles de K^+ como una forma de respuesta adaptativa para realizar un adecuado ajuste osmótico. Asimismo, la aplicación exógena de SA ocasionó un aumento significativo sobre los niveles de K^+ en hojas de plantas tratadas con ambas sales. Sin embargo, estos niveles fueron levemente más bajos en plantas tratadas con Na_2SO_4 , manteniéndose constantes durante todo el ensayo. Esto podría ser el resultado de un aumento en el eflujo de K^+ desde las células por un mecanismo competitivo con el Na^+ como se explicó anteriormente, y/o una disminución en la translocación de K^+ desde la raíz al tallo (Maathuis y col., 1996). De esta manera, nuestros resultados demuestran que el SA causa un efecto negativo sobre los niveles de Na^+ y K^+ y es aditivo al estrés causado por ambas sales presentes en el medio de cultivo.

Por otra parte, el nitrato es reducido a amonio mediante una reacción secuencial de la enzima nitrato reductasa en el citosol, y la nitrito reductasa en el cloroplasto de las células vegetales (Fig. 38). El amonio producido es convertido primero en glutamina y luego en glutamato, dos precursores esenciales para la síntesis de otros aminoácidos importantes para la célula (ej: prolina, alanina, etc.), así como de todos los compuestos nitrogenados (clorofilas, poliaminas, etc). La reducción de nitrato y la asimilación de amonio son procesos altamente implicados en la regulación del crecimiento vegetal en respuesta al estrés salino (Debouba y col., 2006). En hojas de plantas de tomate la actividad enzimática de la nitrato reductasa fue consistentemente inhibida bajo una concentración de 100 mM de NaCl debido a cambios osmóticos en el citoplasma sensados por las plantas (Debouba y col. 2007). La misma sugerencia fue realizada por Viegas y col. (1999) en la especie *Anacardium occidentale L*, con la consiguiente disminución de prolina y aminoácidos libres. Se propone entonces, que la marcada disminución en el contenido de prolina, en el contenido de clorofila *a* así como la elevada tasa Na^+/K^+ observadas bajo el tratamiento con SA exógeno, podría deberse a una alteración en el metabolismo del nitrógeno debido a la inhibición de la nitrato reductasa.

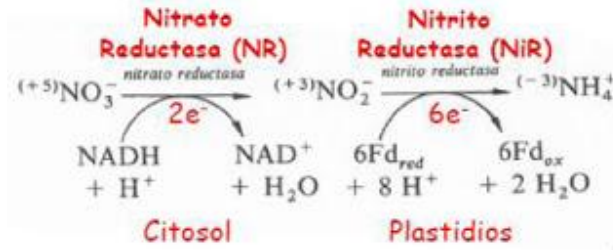


Fig. 37: Reacción de reducción del nitrato a amonio

Como se postuló previamente, los altos niveles de SA endógeno hallados en plantas tratadas con Na_2SO_4 a los 48 días de cultivo están correlacionados con una falla en la compartimentalización de iones, en comparación con plantas tratadas con NaCl (Reginato y col., 2014a; Devinar y col., 2013). Estos resultados concuerdan con lo propuesto por Macri y col. (1986), que demostraron que el SA perturba el potencial electroquímico transmembrana de la mitocondria y el gradiente de protones dependiente de ATP del tonoplasto. Debido a que la actividad de los co-transportadores H^+ /solutos depende de la fuerza protón motriz a través de la membrana plasmática, cualquier modificación inducida por SA del gradiente de pH y/o del ψ_0 podría interferir con la entrada de iones. Asimismo, Bourbouloux y col. (1998) postularon que el SA redujo la actividad acidificante de los tejidos debido a una disminución en los niveles de ATP y de la carga energética de la célula, lo cual puede ser considerado como un indicador de actividad metabólica. De esta manera, se sugiere que el SA tendría un efecto directo sobre la actividad de los transportadores de membrana, lo que se correlaciona con el incremento significativo de la peroxidación lipídica causada por SA.

Bajo la aplicación exógena de SA, las plantas tratadas con Na_2SO_4 mostraron que el pico de SA endógeno se produjo a los 40 días de cultivo, acelerándose la respuesta de estrés, lo que sugiere y confirma lo que había sido propuesto previamente, que el SA actúa como una señal de daño en esta especie. De hecho, las plantas tratadas con NaCl acumularon niveles similares de Na^+ en hojas y raíces que aquellas tratadas con Na_2SO_4 , pero fueron eficientes en la compartimentación de iones y osmorregulación, evidenciándose en su crecimiento, potencial osmótico y bajos niveles de MDA. A su vez, estas plantas tuvieron los menores niveles de SA. Estas respuestas vuelven a confirmar que en *P. strombulifera* la producción de SA no es una señal hormonal de protección, sino que actuaría como señal de daño frente

a situaciones de estrés, en estrecha correlación con la capacidad de compartimentalizar iones.

Por otro lado, el SA exógeno indujo un incremento sobre los niveles de SA endógeno en las raíces de plantas sin salinizar al comienzo del tratamiento que luego disminuye probablemente debido a que estaría siendo convertido a catecol, con acción antioxidante, que sería la forma de contrarrestar los efectos negativos del exceso de SA en este experimento.

En cuanto a los niveles de ABA bajo el tratamiento exógeno con SA, Shakirova y col. (2002) demostraron que en plantas de trigo sometidas a estrés salino, aumentaba el contenido de ABA endógeno, desencadenando mecanismos de adaptación, como la acumulación de prolina. Sin embargo, cabe recordar que en este estudio, sin la aplicación exógena de SA se hallaron altos niveles de ABA en hojas de plantas tratadas con Na_2SO_4 a partir de $-1,9$ MPa y fueron mantenidos hasta finalizar la experiencia, los cuales fueron correlacionados con los síntomas de toxicidad observados en estas plantas. Es decir, la gran toxicidad del anión SO_4^{2-} , si bien gatilla una elevada producción de ABA y prolina (entre otros solutos compatibles), ello no le alcanza para la supervivencia.

Cuando a este tratamiento salino se le añade el agregado exógeno de SA, tanto en raíces como en hojas se observó un pico máximo de ABA al inicio de la experiencia (29 días de cultivo), estadísticamente significativo con respecto a plantas sin tratamiento con SA. Por lo tanto, el SA exógeno estaría induciendo la acumulación de ABA en hojas y raíces de estas plantas, actuando como una señal de estrés. Como se mencionó anteriormente, estas plantas mostraron síntomas de estrés severo como clorosis, resultado que fue confirmado por la baja concentración de clorofilas, inhibición de la síntesis de prolina, elevada acumulación de Na^+ y una gran acumulación de carotenoides, que podría estar relacionada tanto con su conocida función antioxidante de protección del PSII, como su función de precursores de la biosíntesis de ABA. Ya había sido postulado por nuestro grupo que a pesar del incremento en la síntesis de ABA, estas plantas no logran cerrar los estomas y tienen una elevada tasa transpiratoria sugiriendo que el SO_4^{2-} produce un bloqueo en la señalización de ABA (Llanes y col., 2014). Contrariamente, en plantas tratadas con SA y NaCl, hasta una concentración de 500 mM el crecimiento fue óptimo sin visualización de síntomas de toxicidad, por lo que no sería necesaria una elevada acumulación de ABA para

su supervivencia. Por lo tanto, los experimentos realizados con la aplicación exógena de SA reafirman que ABA tendría un rol dual en *P. strombulifera*, actuando como molécula señal del estrés severo para proteger a las plantas de la toxicidad iónica causada por la presencia del anión SO_4^{2-} , como así también como un factor de regulación del crecimiento vegetativo en plantas de *P. strombulifera*. Es decir, el SA aplicado exógenamente estaría estimulando una mayor producción de ABA frente a ambos tratamientos salinos pero con funciones diferentes, acelerando los mecanismos de respuesta frente a una condición de estrés severo (Na_2SO_4), y por otro lado manteniendo el normal funcionamiento de la planta (NaCl).

RESULTADOS

4. Efecto del tratamiento exógeno con 100 μM del dador de óxido nítrico SNP, y 200 μM de su atrapador, c-PTIO sobre *P. strombulifera*

4.1 Evaluación del crecimiento de tallos y raíces de *P. strombulifera*

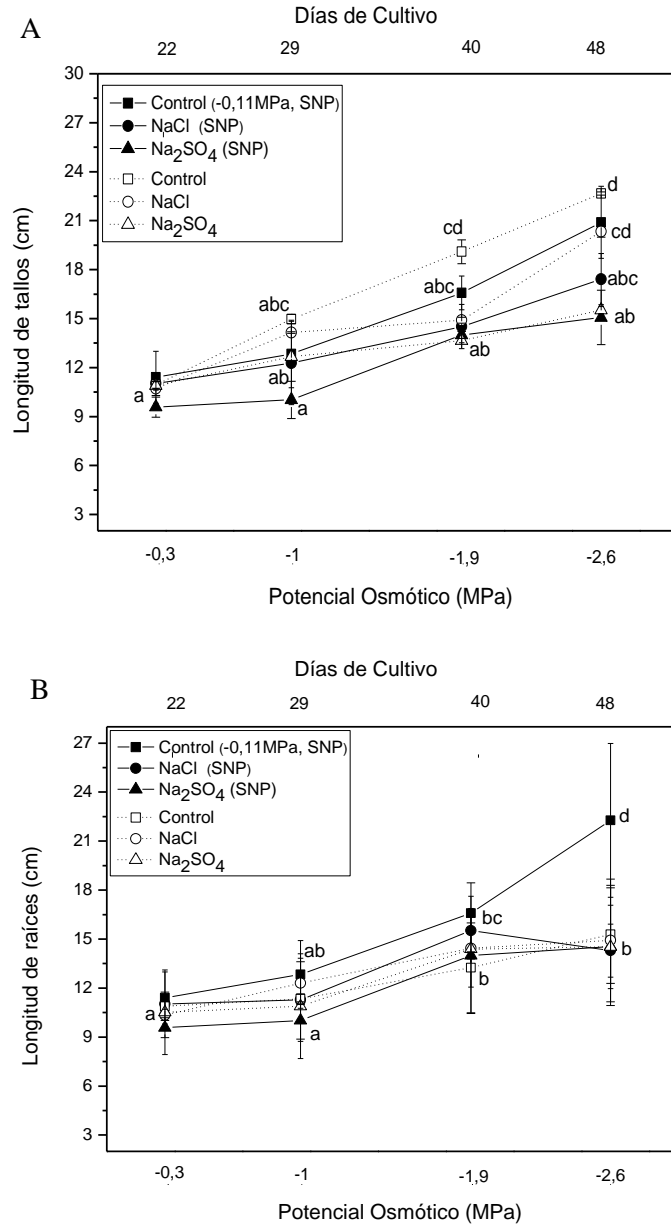


Fig. 38: Longitud de tallos (A) y raíces (B) en *P. strombulifera* con y sin aplicación de SNP

Tanto en plantas tratadas con los distintos tipos de sales como en plantas sin salinizar, el tratamiento exógeno con SNP no arrojó diferencias significativas sobre el crecimiento de tallos a lo largo de toda la experiencia.

Contrariamente, se observa un efecto positivo del SNP sobre la longitud de raíces de plantas sin salinizar a los 48 días de cultivo, siendo este mayor crecimiento estadísticamente significativo con respecto al de plantas salinizadas.

4.2 Evaluación del crecimiento de tallos y raíces bajo la aplicación exógena con SNP, c-PTIO y sin tratamiento a -1,9 y -2,6 MPa

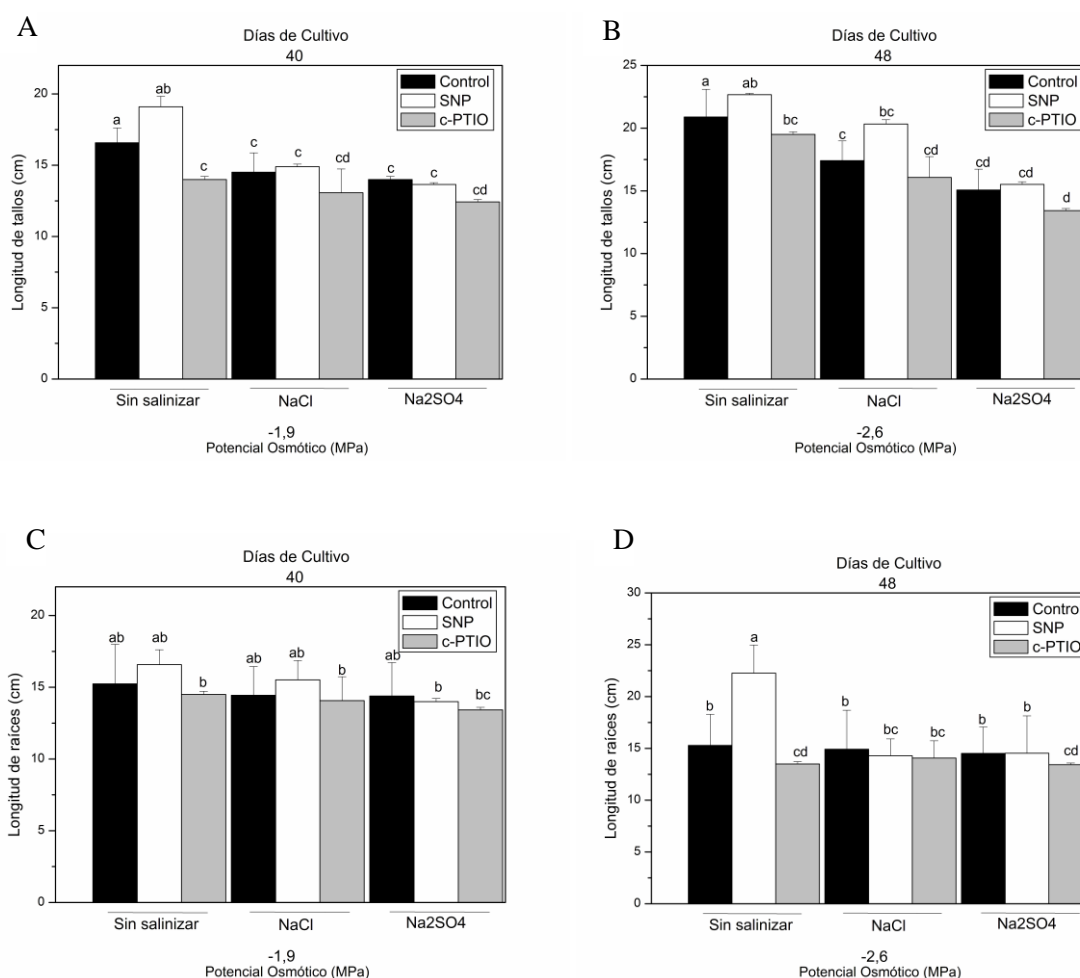


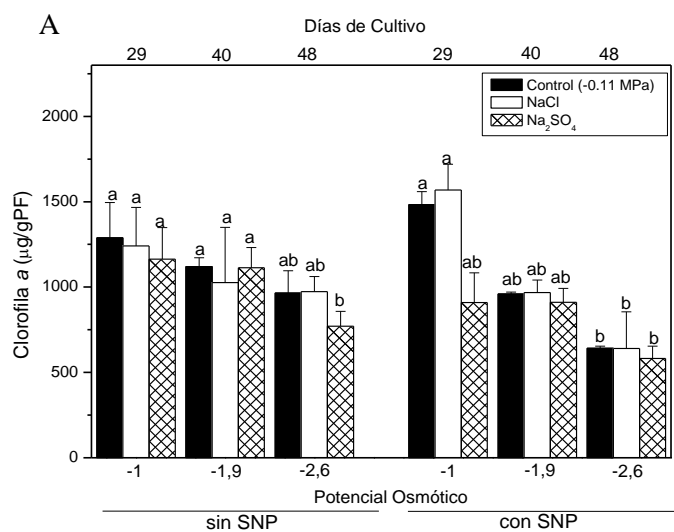
Fig. 39: Longitud de tallos (Ay B) y raíces (C y D) en *P. strombulifera* con y sin aplicación de SNP o de c-PTIO

Tal como se observa en la figura 40, el SNP indujo un leve aumento en la longitud de tallos de todos los tratamientos evaluados, siendo este aumento mas notorio a los 48 días de cultivo, a pesar de que no resultó significativo. Es interesante observar que el efecto del SNP fue más marcado en plantas sin salinizar, en comparación con las plantas tratadas con ambas sales.

De manera similar, el SNP tuvo un efecto positivo sobre las raíces de plantas sin salinizar, observándose una acentuada estimulación del crecimiento a los 48 días de cultivo. Notablemente, el c-PTIO indujo una clara reducción sobre el crecimiento de las raíces de estas plantas, siendo estadísticamente significativa también a los 48 días de cultivo.

Si bien hubo un leve incremento en raíces de plantas salinizadas que fue inducido por el SNP, el mismo no fue estadísticamente significativo. Asimismo, el c-PTIO no produjo una disminución significativa del crecimiento en estas plantas.

4.3 Contenido de clorofilas a y b



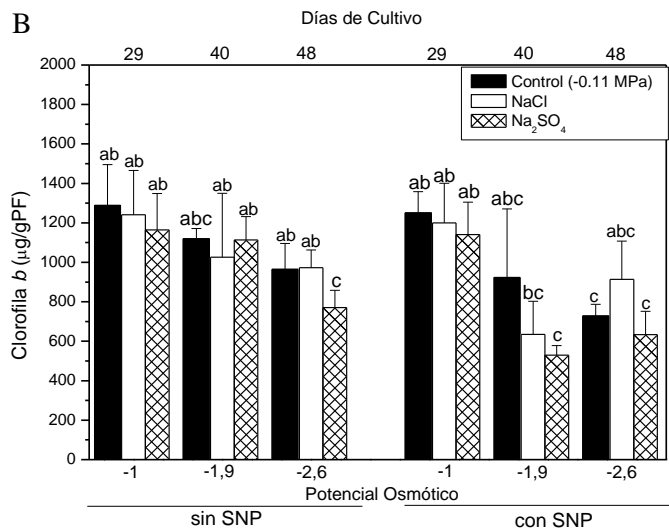


Fig. 40: Contenido de clorofila *a* (A) y *b* (B) en plantas de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de SNP

De manera similar a lo ocurrido en plantas sin tratamiento con SNP, el contenido de clorofila *a* disminuyó a lo largo de los días de cultivo tanto en plantas que no recibieron tratamiento salino como en plantas salinizadas.

Asimismo, el efecto del SNP sobre el contenido de clorofila *b* no fue significativo en plantas de *P. strombulifera*, ya que la respuesta fue similar a la observada para plantas sin aplicación de este dador de NO. De esta manera, el contenido de clorofila *b* disminuyó a lo largo de todo el ensayo.

4.4 Acumulación de carotenoides

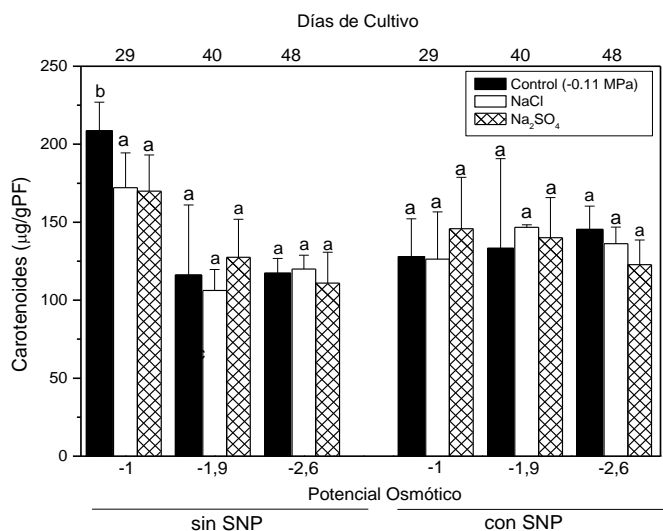


Fig. 41: Contenido de carotenoides en plantas de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de SNP

Bajo la aplicación exógena de SNP, no se hallaron diferencias significativas en el contenido de carotenoides a lo largo de todo el ensayo entre plantas salinizadas y plantas que no recibieron tratamiento salino.

4.5 Potencial osmótico en hojas y raíces de *P. strombulifera*

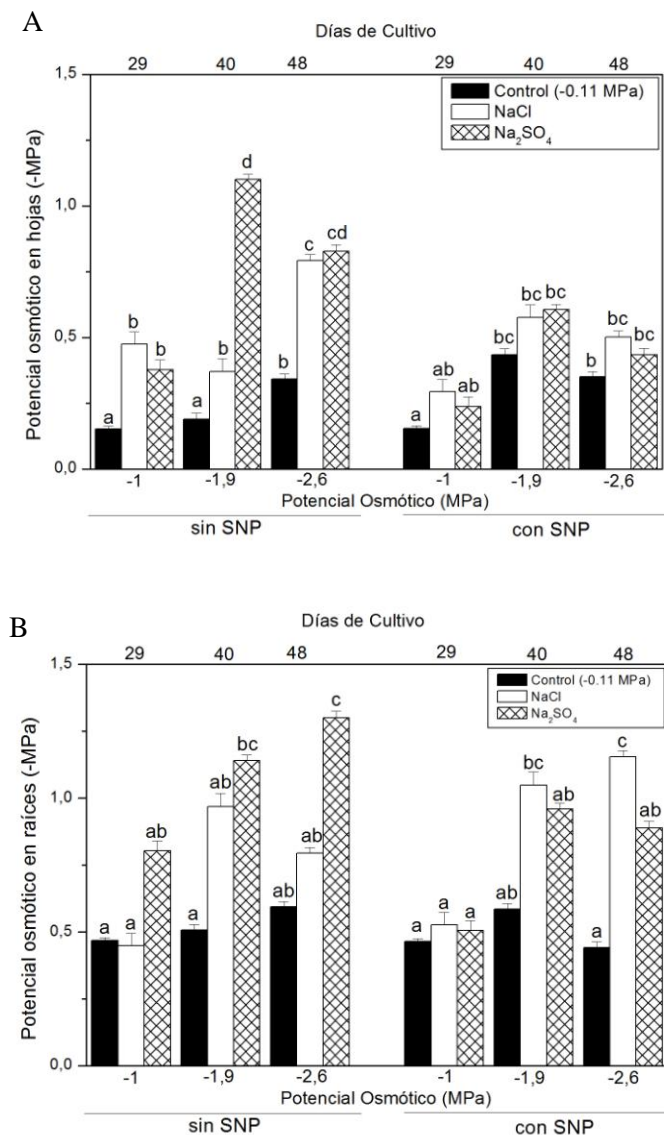


Fig. 42: Potencial osmótico en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de SNP

Notablemente, el tratamiento exógeno con SNP indujo un incremento significativo del potencial osmótico observado en hojas y raíces de plantas salinizadas, siendo este aumento más marcado en las raíces de esta especie halófila. Cabe destacar, que el pico mínimo de potencial osmótico hallado a -1,9 MPa en las raíces de plantas tratadas con Na₂SO₄ sin

tratamiento exógeno con SNP, no fue observado en las raíces de estas mismas plantas que si recibieron la aplicación del dador de NO.

4.6 Relación de Na^+/K^+ en hojas y raíces de *P. strombulifera*

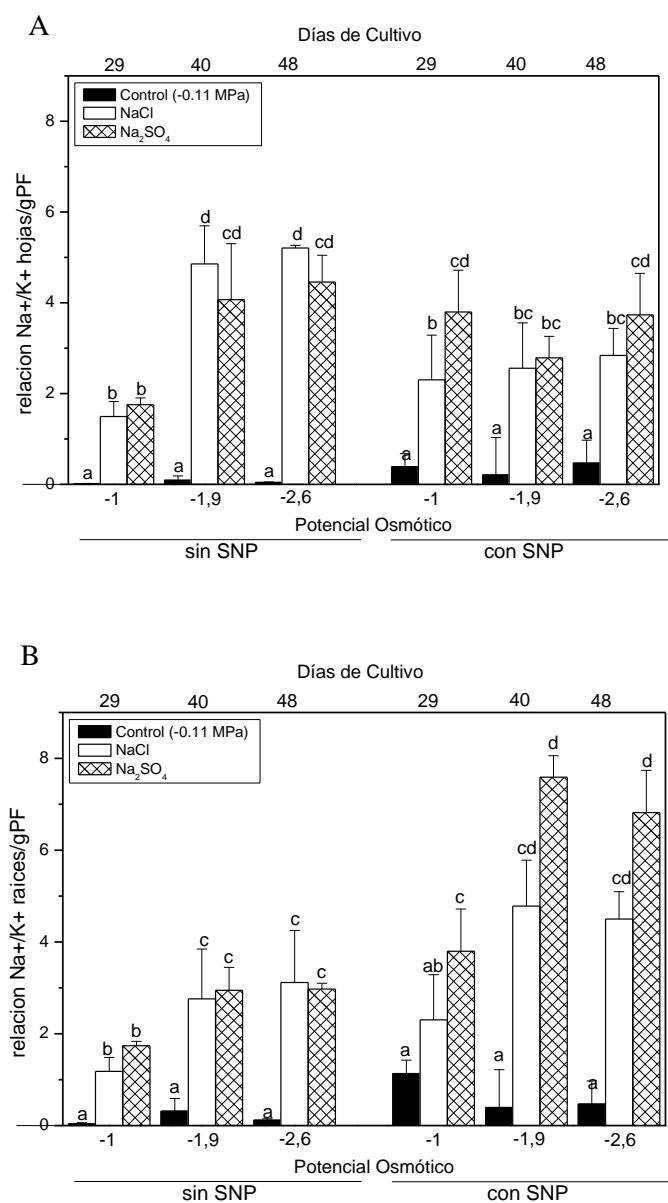
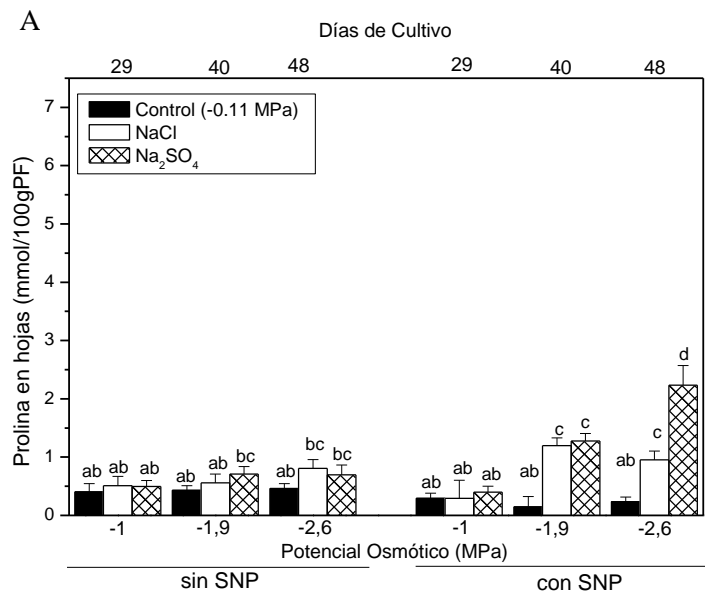


Fig. 43: Tasa de Na^+/K^+ en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de SNP

Si bien se observó una leve disminución sobre la tasa de Na^+/K^+ inducida por el SNP en las hojas, no se obtuvieron diferencias significativas para todos los tratamientos evaluados. En cambio, en raíces de plantas salinizadas, el SNP provocó un marcado incremento a partir de -1,9 MPa, manteniéndose hasta el final del ensayo. Cabe aclarar, que este aumento fue estadísticamente significativo en plantas tratadas con Na_2SO_4 .

4.7 Contenido de Prolina en hojas y raíces de *P. strombulifera*



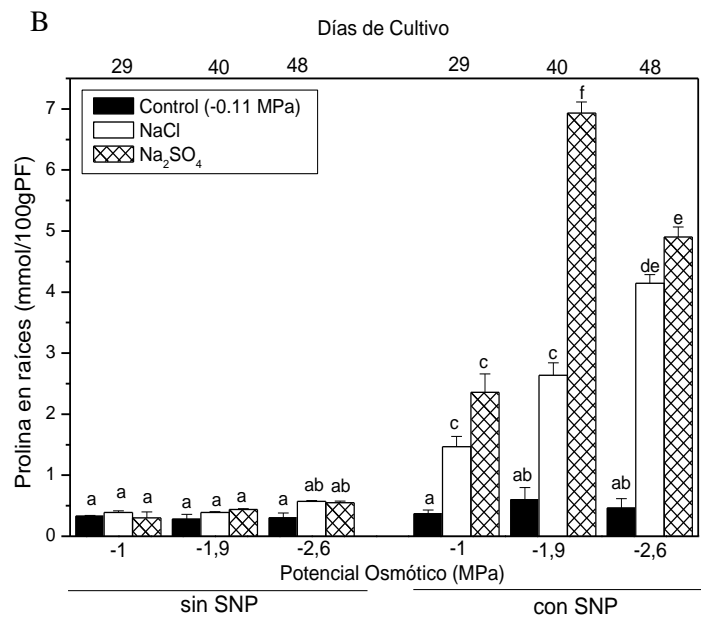


Fig. 44: Contenido de Prolina en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de SNP

Bajo la aplicación exógena de SNP, se observó un marcado aumento del contenido de Prolina en hojas de plantas tratadas con Na_2SO_4 así como también con NaCl, a partir de -1,9 MPa. La misma respuesta pero más contundente fue encontrada en las raíces de plantas salinizadas, observándose un incremento abrupto en el contenido de Prolina para ambos tratamientos salinos desde el inicio de la experiencia.

4.8 Contenido de MDA en hojas y raíces de *P. strombulifera*

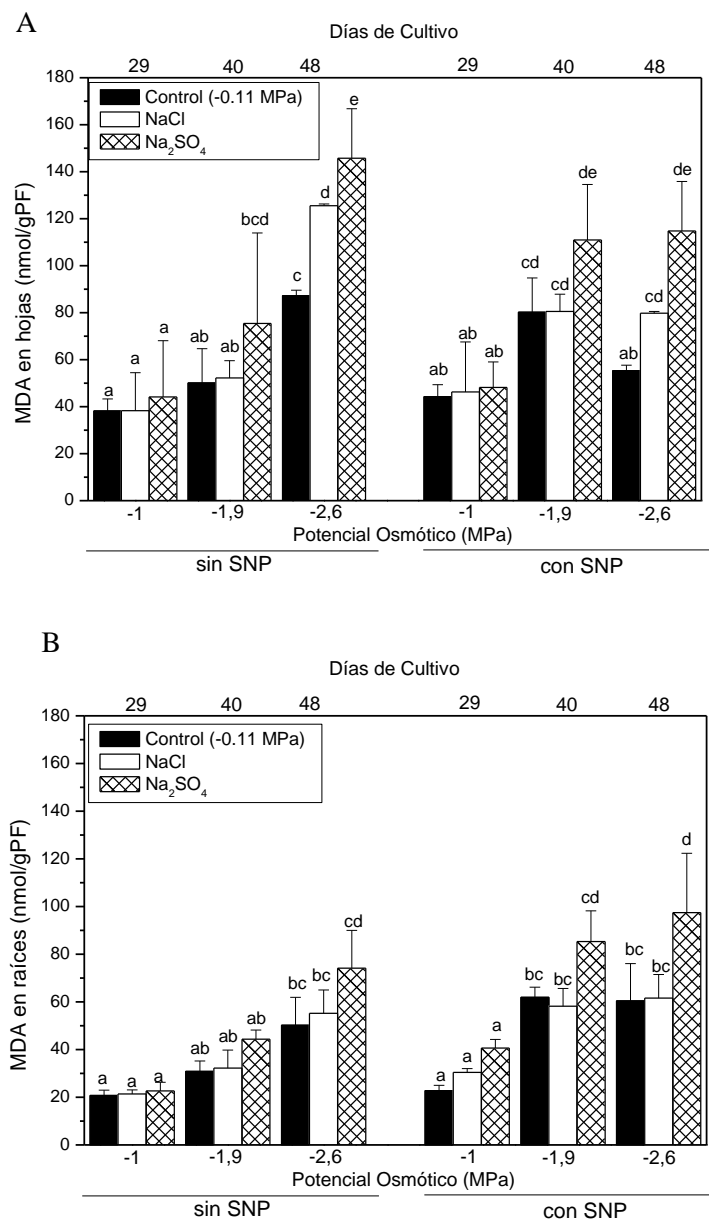


Fig. 45: Contenido de MDA en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de SNP

Si bien se observa una leve disminución del contenido de MDA causada por el NO exógeno, este efecto no fue estadísticamente significativo en hojas tanto de plantas salinizadas como de plantas que no recibieron tratamiento salino. Asimismo, no se

observaron diferencias significativas sobre los niveles de MDA en las raíces de esta halófito a lo largo de los días de cultivo.

4.9 Determinación de fluorescencia de la clorofila frente a la aplicación exógena con SNP, c-PTIO y sin tratamiento a -1,9 y -2,6 MPa

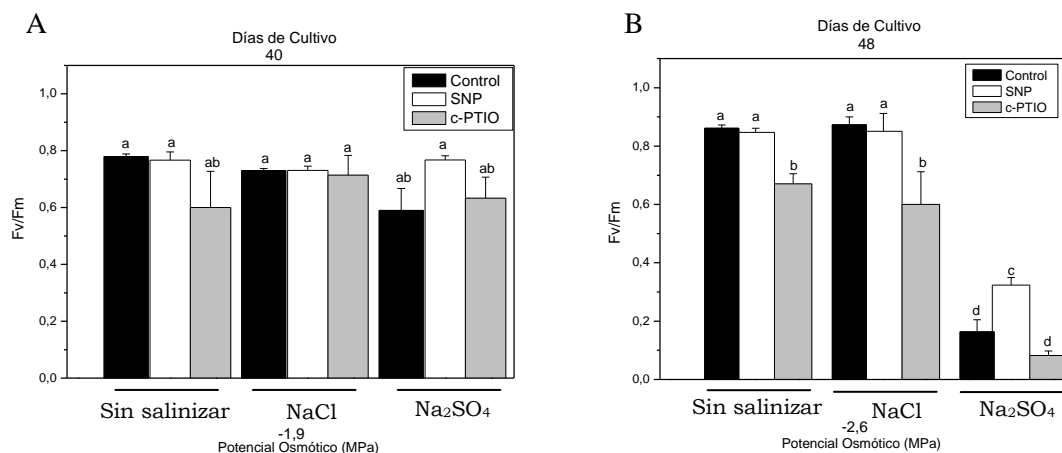


Fig. 46: Fluorescencia de la clorofila a -1,9 MPa (A) y -2,6 MPa (B) en plantas de *P. strombulifera* sin tratamiento exógeno, tratadas con SNP o con c-PTIO

En el potencial osmótico -1,9 MPa, no se observaron diferencias significativas sobre la fluorescencia de la clorofila entre plantas que no recibieron tratamiento exógeno, plantas tratadas con SNP y tratadas con c-PTIO. Sin embargo, en el menor potencial osmótico evaluado (-2,6 MPa), la aplicación exógena con SNP tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la fluorescencia de la clorofila en plantas tratadas con Na₂SO₄, mostrando mayores niveles de Fv/Fm en comparación a plantas que no recibieron tratamiento con SNP. Por otro lado, como era esperable, el tratamiento exógeno con el atrapador de NO causó una marcada disminución de la fluorescencia de la clorofila y esto fue evidenciado en todos los tratamientos evaluados (plantas sin salinizar, tratadas con NaCl y con Na₂SO₄).

4.10 Determinación de rendimiento cuántico del PSII y del flujo fotosintético de electrones de plantas de *P. strombulifera*

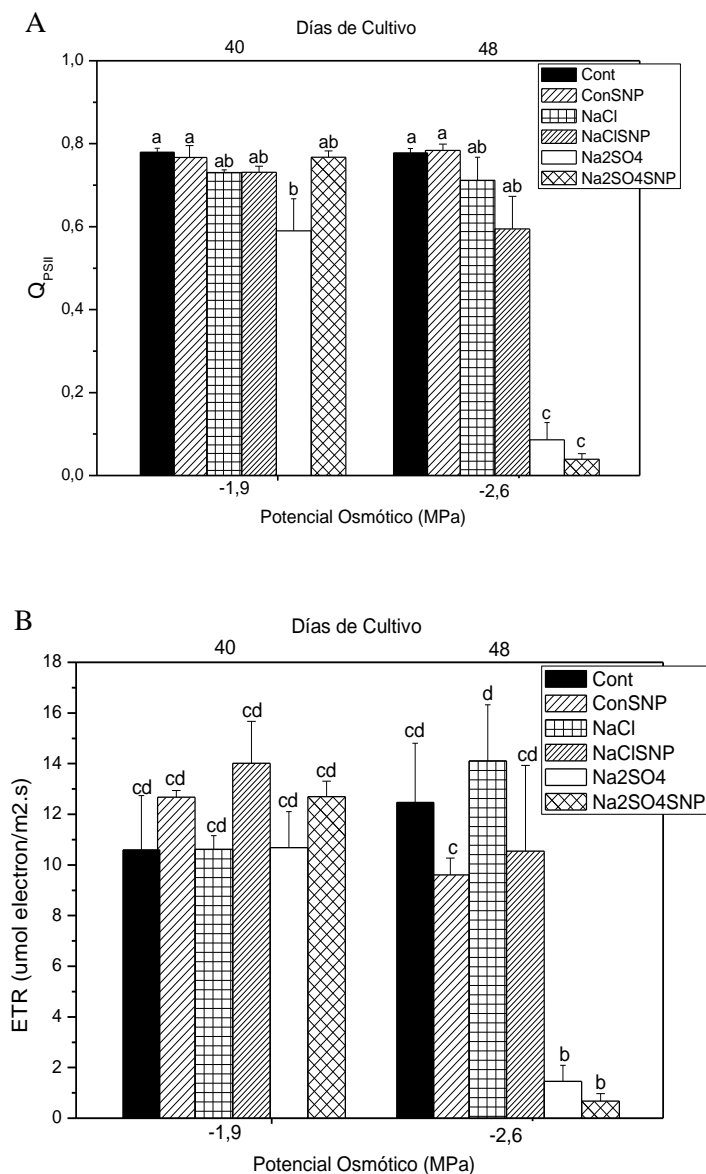


Fig. 47: ϕ_{PSII} (A) y ETR (B) en plantas de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de SNP

La aplicación exógena de SNP no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el ϕ_{PSII} así como tampoco sobre el ETR para ninguno de los tratamientos evaluados. No obstante, se observó una leve estimulación en plantas tratadas con Na₂SO₄ a -1,9 MPa. En

cambio se observó una reducción significativa de este valor en plantas tratadas con Na_2SO_4 al final de la experiencia (-2,6 MPa) tanto en plantas con aplicación exógena de SNP como en plantas sin tratar.

4.11 Respiración en hojas y raíces de *P. strombulifera*

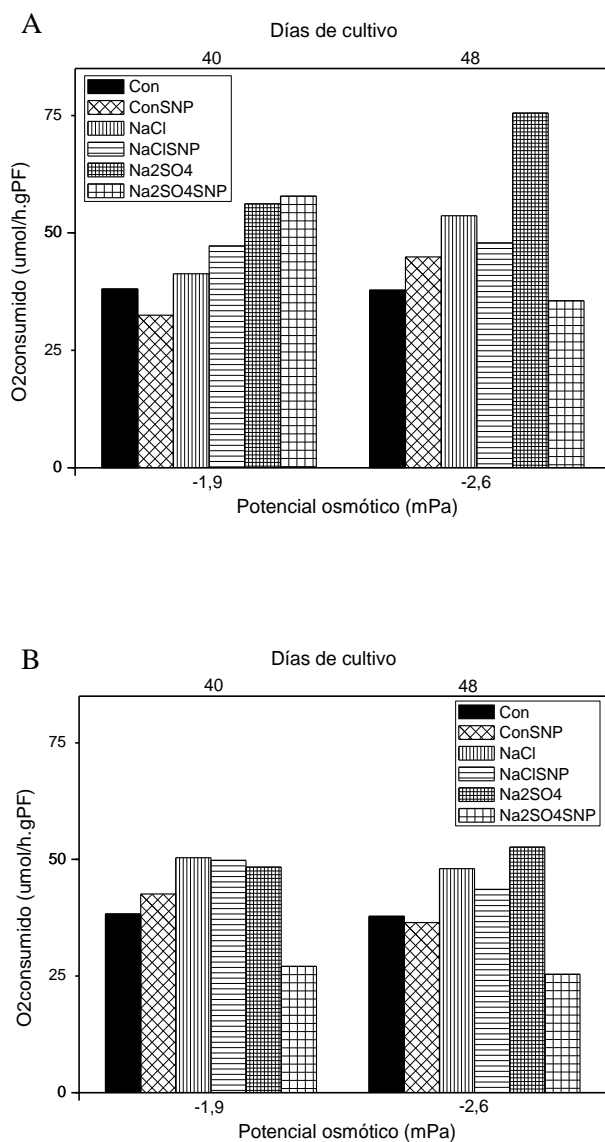


Fig. 48: Oxígeno consumido por respiración en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con aplicación de SNP

Bajo la aplicación exógena de SNP, en hojas de plantas tratadas con Na_2SO_4 se produjo una disminución significativa del O_2 consumido a $-2,6$ MPa, con respecto a plantas sin tratamiento con SNP. No se observaron efectos significativos de la aplicación con SNP en plantas tratadas con NaCl y sin salinizar.

No se registraron diferencias en los niveles de O_2 consumido en raíces de plantas salinizadas y sin salinizar a lo largo de toda la experiencia, excepto en plantas tratadas con Na_2SO_4 y SNP en las cuales se observó una reducción significativa en ambas concentraciones evaluadas.

4.12 Acumulación de Óxido Nítrico a $-1,9$ y $-2,6$ MPa

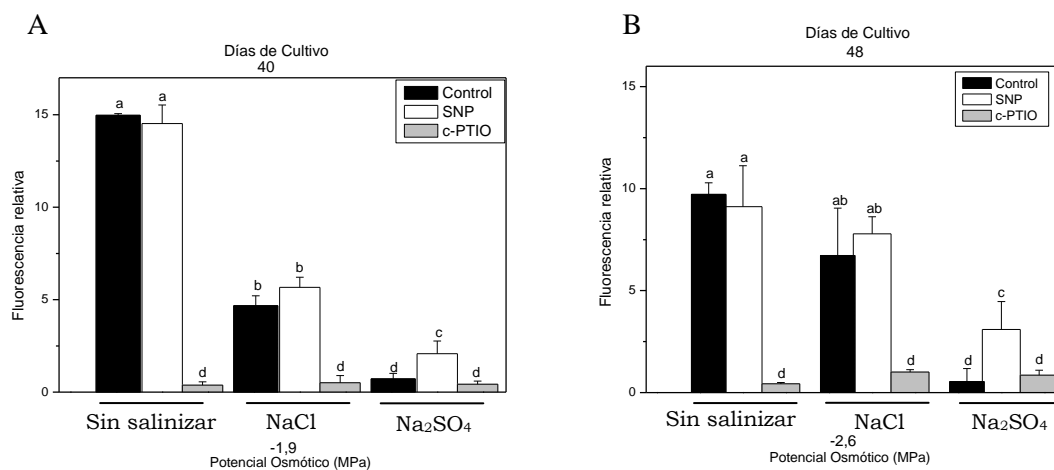


Fig. 49: Niveles de NO en raíces de *P. strombulifera* sin salinizar, tratadas con SNP o con c-PTIO a $-1,9$ MPa (A) y $-2,6$ MPa (B)

Los resultados obtenidos en raíces bajo la aplicación exógena de SNP, muestran un pico máximo estadísticamente significativo de NO en plantas sin salinizar al inicio del experimento, el cual decrece a los 48 días de cultivo. Por otro lado, en raíces tratadas con NaCl no se observaron diferencias significativas a lo largo de toda la experiencia entre plantas con aplicación de SNP y las que no recibieron tratamiento. Es destacable que los menores niveles de NO fueron obtenidos en plantas tratadas con Na_2SO_4 a partir de $-1,9$ MPa, aumentando significativamente esta diferencia cuando las mismas recibieron el tratamiento exógeno con SNP.

4.13 Discusión

El óxido nítrico (NO) es una molécula pequeña, no cargada eléctricamente y escasamente polar, por lo que puede difundir libremente a través de las membranas desde un compartimento hacia otro. Desde el punto de vista químico, es un radical libre con un electrón desapareado, lo cual lo convierte en una molécula paramagnética (Puntarulo y col., 2010). En los sistemas biológicos, el NO se encuentra en baja concentración, la cual es determinada por reacciones de síntesis y catabolismo. En ambientes hidrofóbicos, como las biomembranas, esta molécula reacciona con radicales libres, actuando como antioxidante y rompiendo procesos de peroxidación lipídica (O'Donnell y Freeman, 2001). Las reacciones biológicas más importantes del NO están ligadas a: 1) metales de transición, incluyendo aquellos presentes en metaloproteínas, 2) radicales libres, como el anión superóxido (O_2^-) e intermediarios en la peroxidación lipídica y 3) grupos tioles presentes en proteínas y péptidos (Rubbo y Radi, 2008). La reacción entre el NO y el O_2^- lleva a la formación de un compuesto fuertemente oxidante de vida corta, llamado peroxinitrito $ONOO^-$ (Freschi, 2013). Esta reacción establece una relación entre el metabolismo de las especies reactivas del oxígeno y el de las especies del nitrógeno. En plantas, ambos compuestos cumplen una función sinérgica en respuestas de defensa (Asai y col., 2008), así como también en respuestas frente al estrés abiótico (Tanou y col., 2009). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que el peroxinitrito es una potente molécula citotóxica y, en exceso, es perjudicial para las células (Vandelle y Delledonne, 2011; Leterrier y col., 2012; Begara-Morales y col., 2013). Por otro lado, la nitración, la cual consiste en la adición de un grupo nitro ($-NO_2$) a un residuo de tirosina de una proteína, puede alterar la función de esta proteína. En *Arabidopsis*, se han detectado proteínas nitradas en cloroplastos bajo condiciones de estrés, principalmente en los complejos PSI, PSII, citocromo b6/f y la ATP sintasa (Galetskiy y col., 2011).

Se ha comprobado que el NO juega un papel importante en diversos procesos fisiológicos en plantas, desde la estimulación de la germinación, dormición de semillas y diferenciación celular hasta la mediación de movimientos estomáticos, participando como un intermediario corriente debajo de la señalización de ABA (Gracia Mata y Lamattina, 2007). Además, se ha reportado que este radical libre regula las respuestas de las plantas frente a

diferentes tipos de estrés, como salinidad (Zhang y col., 2006) y sequía (García Mata y Lamattina, 2007). La función dual del NO como potente oxidante o como antioxidante depende de su concentración. Altos niveles de NO producen un daño en el transporte fotosintético de electrones, inhibición del desarrollo del tallo y raíz, daño en el ADN y muerte celular; mientras que bajas concentraciones del mismo promueven el crecimiento y desarrollo vegetal (Beligni y Lamattina, 2001).

El NO puede ser generado de forma no enzimática mediante la descomposición química del donador de NO, llamado nitroprusiato de sodio (SNP). Estudios previos han demostrado que el SNP es un regulador positivo de diferentes parámetros fisiológicos, como el peso seco en plántulas de maíz (Zhang y col., 2006), la elongación del hipocótilo en plantas de lechuga y *Arabidopsis* (Beligni y col., 2000) y el crecimiento de raíces (Gouvea y col., 1997). Por otro lado, es bien sabido que el ácido indol acético (AIA) actúa como promotor del crecimiento de raíces en plantas (Woodward y Bartel, 2004). Pagnussat y col. (2002) propusieron al NO como un inductor de la organogénesis de la raíz de plantas de pepino, sugiriendo que esta molécula participaría en la vía de señalización de auxinas. La misma sugerencia fue propuesta por Gouvea y col. (1997), quienes observaron una mayor elongación de raíces de plantas de maíz inducida por diferentes dadores de NO, entre ellos el SNP. En este mismo estudio, el tratamiento con azul de metileno, un agente secuestrante de NO, revirtió los efectos del SNP. Similarmente, nuestros resultados muestran una clara estimulación del crecimiento de raíces inducida por el SNP en plantas sin salinizar a los 48 días del cultivo; y esta respuesta se confirma con los resultados obtenidos con el inhibidor de NO (c-PTIO), el cual indujo una disminución estadísticamente significativa de la longitud de las raíces de estas plantas. En consecuencia, en nuestra especie, el SNP actuaría como un promotor del crecimiento de raíces y se podría sugerir que el NO liberado participaría como mensajero secundario en la vía de señalización de las auxinas. Cabe destacar, que esta respuesta se correlaciona con el contenido de NO obtenido en raíces de plantas sin salinizar, ya que los mayores niveles fueron hallados en estas plantas a lo largo de todo el ensayo. Asimismo, se observó una abrupta disminución en los niveles de NO bajo el tratamiento con c-PTIO en estas plantas, confirmando su función como inhibidor de esta molécula.

Resulta interesante observar que los niveles endógenos de NO en plantas tratadas con Na_2SO_4 fueron significativamente menores con respecto a plantas tratadas con NaCl y esta respuesta se mantuvo constante durante todo el ensayo. Asimismo, los valores de NO bajo el tratamiento con c-PTIO exógeno, disminuyeron significativamente en estas plantas a lo largo de toda la experiencia. Por lo tanto, estos resultados estarían demostrando el rol protector del NO sobre las plantas tratadas con NaCl, evidenciándose en sus características fenotípicas, su óptimo crecimiento y adecuado ajuste osmótico.

Frente a condiciones de salinidad, se ha sugerido que el SNP es un regulador positivo de diferentes procesos fisiológicos en las plantas, aliviando los síntomas de toxicidad provocados por este tipo de estrés. Kopyra y Gwozdz (2003) demostraron que la aplicación exógena de SNP indujo un aumento significativo de la elongación de la raíz en plantas de *Lupinus luteus* bajo estrés salino. Asimismo, el SNP contrarrestó los efectos negativos de la salinidad, aumentando el área foliar, el peso fresco y peso seco en plantas de soja sometidas a 100 mM de NaCl (Simaei y col., 2011). Estudios previos han sugerido que el rol que cumple el NO en la tolerancia frente a salinidad es ejercido a través del aumento en la actividad de la ATPasa- H^+ de la membrana plasmática, la bomba de protones y el antiporter Na^+/H^+ en el tonoplasto (Zhao y col. 2004; Zhang y col. 2006). Recientemente, se ha postulado que el NO provoca un aumento de las actividades de las principales enzimas antioxidantes, incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR) frente al daño oxidativo ocasionado por salinidad (Manai y col. 2014; Tanou y col. 2009). Debido a los antecedentes previamente citados, se esperaría que la aplicación exógena con SNP en plantas tratadas con Na_2SO_4 en el presente estudio, produzca un incremento en los parámetros de crecimiento debido a los síntomas de toxicidad, ya conocidos, provocados por esta sal. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las distintas sales y los diferentes potenciales osmóticos evaluados sobre la longitud de tallos y raíces. Asimismo, el tratamiento exógeno con c-PTIO no produjo cambios significativos sobre el crecimiento de tallos y raíces de plantas salinizadas. Por lo tanto, el NO no tendría un efecto importante sobre estos parámetros en *P. strombulifera* en condiciones de salinidad.

Por otro lado, en *Glicine max* bajo estrés salino se demostró una reducción en el contenido de clorofila *a* y *b*. Sin embargo, el tratamiento con SNP revirtió esta respuesta, activando de

esta manera la capacidad fotosintética y el crecimiento vegetal en estas plantas (Simaei y col. 2011). Asimismo, la aplicación de SNP en plantas de trigo aumentó el contenido de clorofilas totales y disminuyó la acumulación de MDA y permeabilidad de la membrana plasmática frente a estrés salino (Ruan y col., 2002). Nuestros resultados demuestran que, tanto el contenido de clorofilas *a* y *b* como así también el de carotenoides, no arrojaron diferencias significativas para ninguno de los tratamientos evaluados. De esta forma, el NO exógeno no provocó un efecto significativo sobre los pigmentos fotosintéticos determinados.

Se ha comprobado que la aplicación de SNP en plantas de tomate sometidas a estrés salino atenuó la disminución en diferentes parámetros de la fotosíntesis, como la tasa de fotosíntesis neta (P_N), conductancia estomática, la máxima eficiencia de la clorofila y el flujo fotosintético de electrones (Wu y col., 2010). En nuestro estudio, la fluorescencia de la clorofila (F_v/F_m), el rendimiento cuántico (ψ_{PSII}), el flujo fotosintético de electrones (ETR) así como el O_2 consumido por respiración tanto en hojas como en raíces también fueron evaluados en plantas tratadas exógenamente con SNP. Es muy interesante destacar que este dador de NO alivió los efectos tóxicos ocasionados por Na_2SO_4 , ya que la máxima eficiencia de la clorofila y el ψ_{PSII} mostraron un aumento significativo a una concentración de 530 mM de esta sal, mientras que se observó una disminución en los valores de O_2 consumido por respiración en esta misma concentración. Tal como era esperado, la aplicación exógena con el inhibidor de NO indujo una disminución muy marcada en los valores de F_v/F_m en estas plantas, sin evidenciarse cambios significativos en el ψ_{PSII} y ETR. Cabe destacar, que estos resultados se correlacionan con el contenido de NO endógeno, ya que el SNP indujo un aumento significativo en estas plantas en el menor potencial osmótico evaluado (-2,6 MPa). Sin embargo, el c-PTIO no provocó un efecto significativo en plantas tratadas con Na_2SO_4 , observándose valores de NO similares a los obtenidos para aquellas plantas sin tratamiento exógeno con SNP. Contrariamente, frente a NaCl el SNP no tuvo un efecto significativo, ya que no se observaron diferencias significativas en la máxima eficiencia de la clorofila ni tampoco en el contenido de O_2 consumido por respiración, siendo todos ellos similares a los obtenidos para plantas sin salinizar.

Zhang y col. (2006) observaron que el NaCl estimuló la acumulación de NO luego de 2 horas frente a esta sal. En este estudio postularon que la ATPasa-H⁺ inducida por NO genera un gradiente de protones a través del tonoplasto, produciendo la fuerza necesaria para el intercambio Na⁺/H⁺, el cual contribuye a la homeostasis de K⁺ y Na⁺ en plantas de maíz. De la misma manera, Zhao y col. (2004) postularon que el NO actúa como mensajero secundario en la inducción de la expresión de la ATPasa de la membrana plasmática, que genera el gradiente electroquímico transmembrana necesario para el transporte de iones. La inducción de su expresión mantuvo una alta tasa K⁺/Na⁺, confirmando por lo tanto, una resistencia a salinidad en plantas de caña de azúcar. En el presente estudio, el SNP tuvo un efecto positivo sobre las tasas de Na⁺/K⁺ de las hojas de plantas salinizadas, evidenciándose una disminución de las mismas. Cabe aclarar que esta disminución fue más marcada en las hojas de plantas tratadas con NaCl, en comparación con plantas tratadas con Na₂SO₄. Contrariamente, las raíces de plantas salinizadas y tratadas con SNP, se observó un claro incremento en las tasas Na⁺/K⁺ desde -1,9 MPa, lo cual será explicado posteriormente.

Como se ha mencionado previamente, las EROs generadas por el estrés salino, causan la peroxidación de lípidos de membranas esenciales en el plasmalema u organelas intracelulares. En cebada, se propuso que el NO modificó el estado redox celular, actuando como antioxidante y disminuyendo la muerte celular programada (Beligni y col., 2002). Se ha sugerido que la protección del NO sobre las membranas celulares podría estar relacionada a la señalización de la fosfolipasa D (PLD) y su producto, el ácido fosfatídico, ya que la activación de esta enzima es un importante paso en la respuesta frente al peróxido de hidrógeno (Zhang y col., 2003). Asimismo, un antagonista de la PLD redujo el rol protector del NO sobre la actividad de la ATPasa-H⁺ (Zhang y col., 2006). Numerosas investigaciones demostraron que el NO disminuyó la permeabilidad de membranas, producción de EROs, contenido de MDA y CO₂ intracelular, mediante la inducción de enzimas antioxidantes, como catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa (Kopyra y Gwózdź, 2003; Fan y col., 2007; Shi y col., 2007; Yuqing y col., 2007; López-Carrión y col., 2008; Sheokand y col., 2008). Nuestros resultados coinciden con estos antecedentes, ya que demuestran que el dador de NO produjo una notable disminución en la peroxidación lipídica de membranas, evidenciándose en los valores de

MDA de las hojas de las plantas tratadas tanto con NaCl como con Na₂SO₄ en el menor potencial osmótico evaluado.

Por otro lado, el pretratamiento con SNP contribuyó a un mejor balance entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno, incrementando las proteínas totales y las actividades de las enzimas endopeptidasa y carboxypeptidasa en plantas bajo estrés salino (Zhang y col, 2010). Recientemente se ha reportado que una concentración de 100 μM de SNP indujo la acumulación de prolina en plantas de pepino bajo condiciones de salinidad, lo cual mantuvo una turgencia positiva, protegiendo a estas plantas del estrés causado por NaCl (Fan y Du, 2012). En este trabajo, el NO exógeno indujo un incremento muy marcado en la acumulación de prolina en hojas y raíces de plantas salinizadas, siendo más evidente el aumento en plantas tratadas con Na₂SO₄ a partir de -1,9 MPa. Además de su papel como osmolito en el ajuste osmótico, se ha postulado que la prolina estabiliza estructuras subcelulares, secuestra radicales libres y participa en el balance del potencial redox en condiciones estresantes (Ashraf y Foolad, 2007; Gomes y col., 2010). El contenido de prolina incrementado por la aplicación de SNP está en directa relación con los valores de potencial osmótico, ya que el SNP causó un aumento significativo en el potencial osmótico de plantas tratadas con esta sal. De esta manera, se propone que el NO tiene un efecto positivo en nuestra especie, mejorando la osmorregulación a través de la acumulación de prolina, incrementando por lo tanto, la tolerancia al estrés generado por el Na₂SO₄.

En consecuencia, estos resultados sugieren un papel protector del NO frente a la toxicidad causada por el anión SO₄²⁻ presente en el medio de cultivo, posiblemente detoxificando las EROs generadas durante el estrés oxidativo, y/o a través del aumento de las actividades de diferentes enzimas antioxidantes, y/o estimulando la síntesis de osmolitos como prolina. Si bien podría ser una de las moléculas detoxificantes ante esta situación de estrés, por un lado, no sería suficiente y por otro, queda abierta la pregunta si en condiciones naturales y sin la presencia del dador, esta molécula se sintetizaría.

Sin embargo, si bien el SNP indujo un aumento significativo del contenido de NO endógeno en las raíces de plantas tratadas con Na₂SO₄, su efecto positivo no fue observado, evidenciándose en la alta tasa Na⁺/K⁺ obtenida, así como en los valores de MDA determinados. Esta respuesta puede explicarse a partir de los resultados previos de nuestro grupo de investigación, donde se demostró que la actividad de la enzima SOD, capaz de

catalizar la dismutación del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, se encontraba significativamente aumentada bajo el tratamiento salino con Na_2SO_4 . De esta manera, se podría pensar que si la SOD se encuentra aumentada bajo esta condición de estrés, su sustrato, el anión O_2^- , también lo está. Como se mencionó previamente, el NO es capaz de unirse al O_2^- , formando la molécula altamente oxidante peroxinitrito (ONOO^-). En células animales, una producción excesiva de ONOO^- causa un gran daño oxidativo con el consecuente daño en el ADN, modificación de enzimas e inducción de peroxidación lipídica. En plantas, se ha sugerido que la citotoxicidad del nitrito puede ser atribuída a la producción de las especies reactivas del nitrógeno incluyendo el peroxinitrito, a través de un mecanismo dependiente de la nitrato reductasa (Yamasaki y Sakihama, 2000). Recientemente se ha comprobado que el ONOO^- es capaz de mediar la nitración de la tirosina en las proteínas (Radi, 2013) y es producido bajo distintas situaciones de estrés (Vandelle y Delledonne, 2011; Leterrier y col., 2012; Begara-Morales y col., 2013).

Por otro lado, la interacción entre el NO y las auxinas ha sido ampliamente estudiada (Terrile y col. 2012; Freschi, 2013). Como se muestra en la Fig 50, en plantas de *Arabidopsis* se comprobó que el NO regula positivamente la vía señalización de las auxinas mediante la S-nitrosilación del receptor de auxinas TIR1 en los aminoácidos cisteína-140 y 180, el cual promueve su interacción con las auxinas/acido 3-indol-acético (AUX/IAA). De esta manera, la S-nitrosilación mediada por NO activa la vía señalización de las auxinas con las consiguientes respuestas llevadas a cabo por las mismas. Por último, se produce la degradación del complejo proteico TIR1/AUX a través de una proteólisis mediada por el proteosoma SCF-26S, reprimiendo la transcripción de los genes regulados por las auxinas (Freschi, 2013). Recientemente, se ha demostrado que en mutantes deficientes en la síntesis de NO, llamados *noal*, se observó una reducción de la elongación de la raíz primaria y un incremento en la acumulación de flavonoles, consistente con un aumento de los niveles de EROs; concluyendo entonces que la biosíntesis, transporte y señalización de las auxinas se encuentra perturbado.

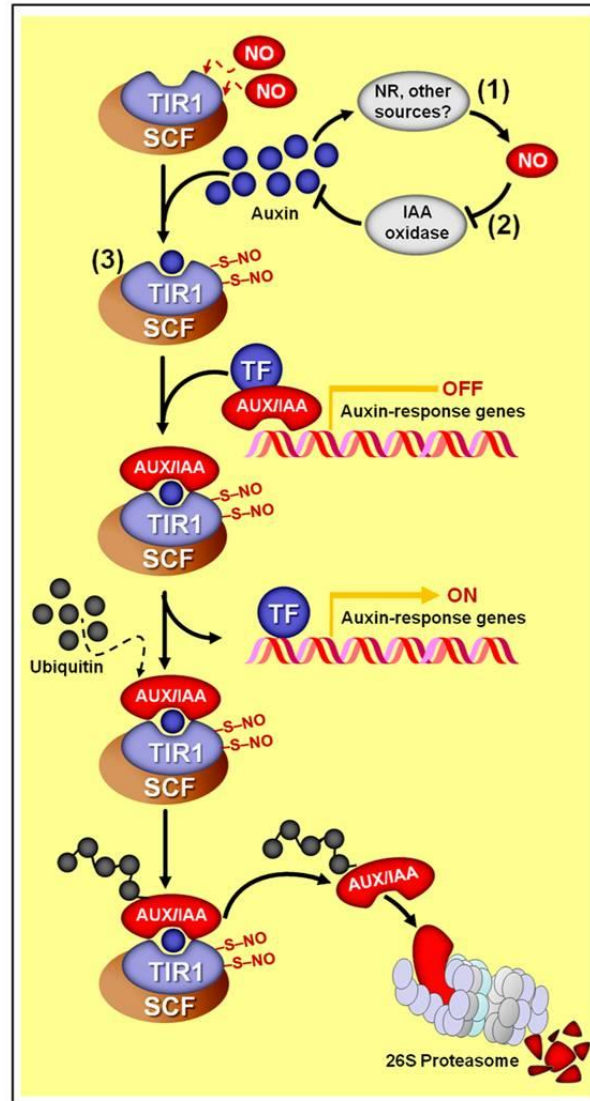


Fig. 50: Regulación de la vía de señalización de auxinas mediada por NO

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en raíces de plantas tratadas con Na_2SO_4 se propone que la actividad aumentada de la SOD estaría indicando una gran concentración de su sustrato, el O_2^- el cual reaccionaría con el NO generando ONOO^- en exceso, causando un gran estrés oxidativo en las células de la raíz. Al estar secuestrado el NO, no habría concentraciones de esta molécula disponibles para realizar la S-nitrosilación del receptor TIR1, inhibiéndose la vía de señalización de las auxinas, inhibiéndose por lo tanto, la elongación de las raíces e induciendo una mayor producción de flavonoles (específicamente flavantrioles), como fue demostrado previamente en nuestro grupo de investigación (Reginato y col., 2014b). A su vez, refuerza la idea de que la biosíntesis, transporte y

señalización de las auxinas se encuentra perturbado, el hecho de haber observado que simultáneamente con la inhibición del crecimiento de la raíz primaria, hubo notable estimulación de la formación de raíces laterales (Reinoso y col., 2005). De esta manera, el NO tendría un efecto negativo en las raíces de nuestra especie, posiblemente al encontrarse en exceso debido a su aplicación exógena.

RESULTADOS

5. Efecto del tratamiento exógeno con el precursor de etileno, ACC sobre *P. strombulifera*

5.1 Evaluación del crecimiento de tallos y raíces de *P. strombulifera*

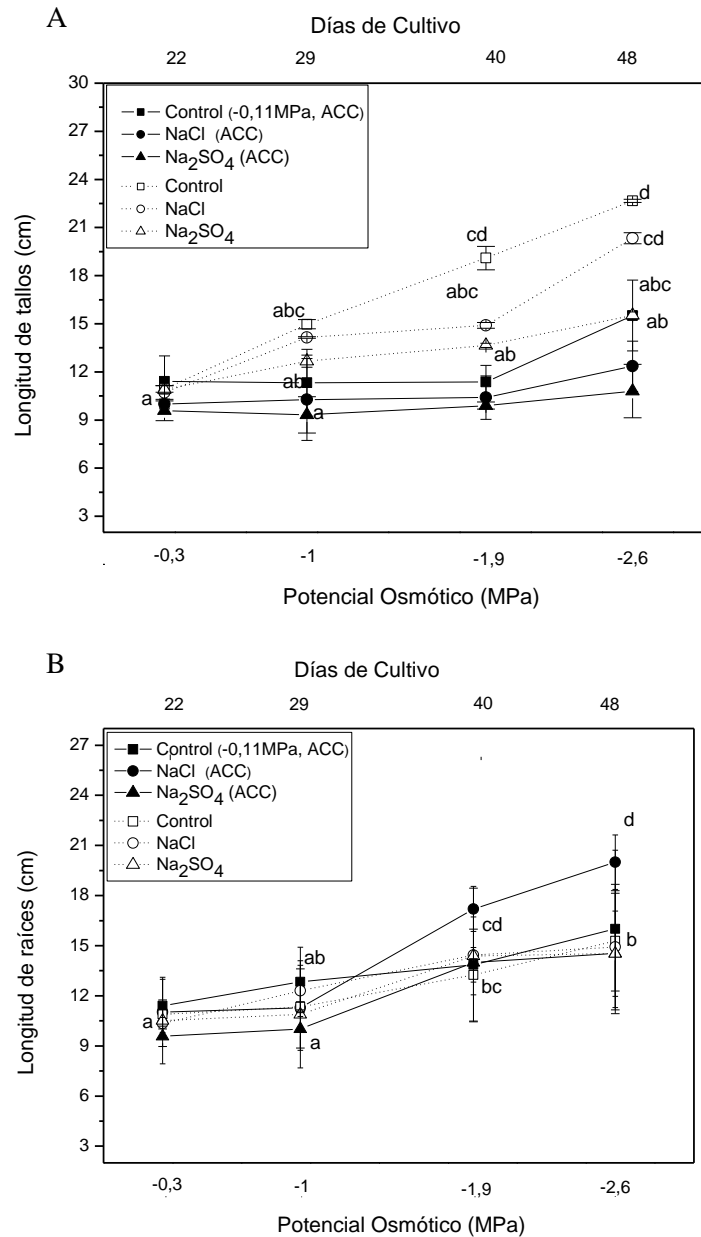
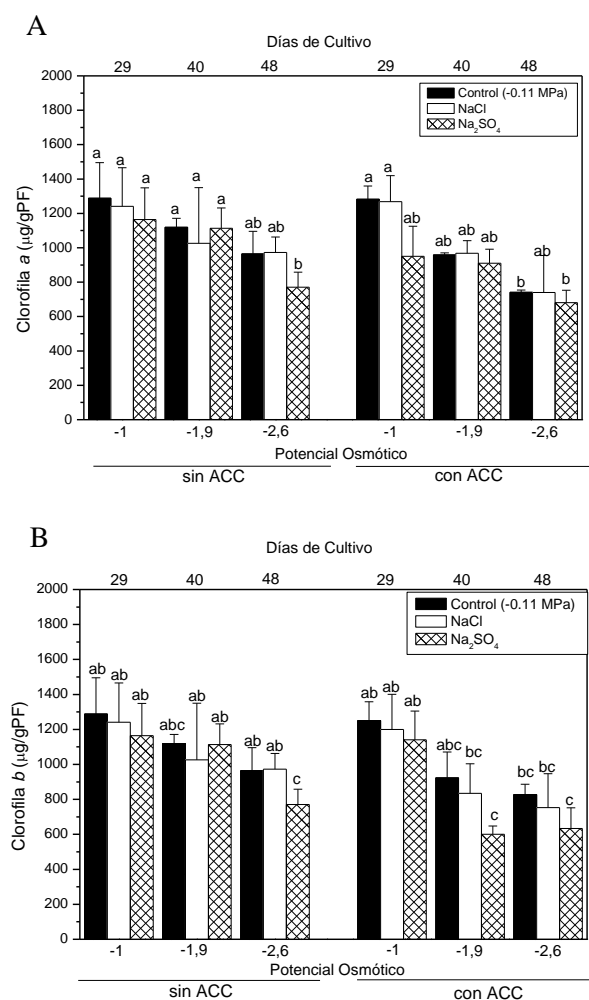


Fig. 51: Longitud de tallos (A) y raíces (B) en *P. strombulifera* con y sin aplicación de ACC

Como se muestra en la Fig. 51, existe una clara inhibición del crecimiento de tallos causada por la aplicación exógena del ACC tanto en plantas salinizadas como en plantas sin salinizar, siendo esta diferencia estadísticamente significativa a partir de los 40 días de cultivo.

Contrariamente, el efecto del tratamiento exógeno con ACC indujo la estimulación del crecimiento de raíces en plantas tratadas con NaCl, siendo estadísticamente significativa a 700 mM de esta sal (-2,6 MPa). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas para los demás tratamientos evaluados entre plantas tratadas con ACC y plantas sin tratamiento.

5.2 Contenido de clorofila a, b y carotenoides en plantas de *P. strombulifera*



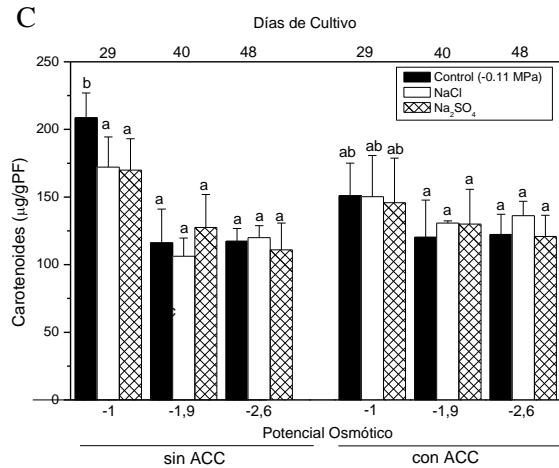


Fig. 52: Contenido de clorofila *a* (A), *b* (B) y carotenoides (C) de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de ACC

El ACC exógeno no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre los niveles de clorofila *a* para las plantas tratadas con los distintos tipos de sales y plantas sin salinizar, a lo largo de toda la experiencia. Sin embargo, el ACC acentuó la respuesta sobre el contenido de clorofila *b* en plantas tratadas con Na₂SO₄, con respecto a las plantas que no recibieron la aplicación exógena con este precursor de etileno, evidenciándose una reducción en estos niveles a partir del potencial osmótico -1,9 MPa. Cabe destacar que para plantas sin salinizar y aquellas tratadas con NaCl no se observaron diferencias significativas durante todo el ensayo. Por otro lado, el contenido de carotenoides tampoco arrojó diferencias estadísticamente significativas en *P. strombulifera* para todos los tratamientos y días de cultivo evaluados.

5.3 Relación de Na^+/K^+ en hojas y raíces de *P. strombulifera*

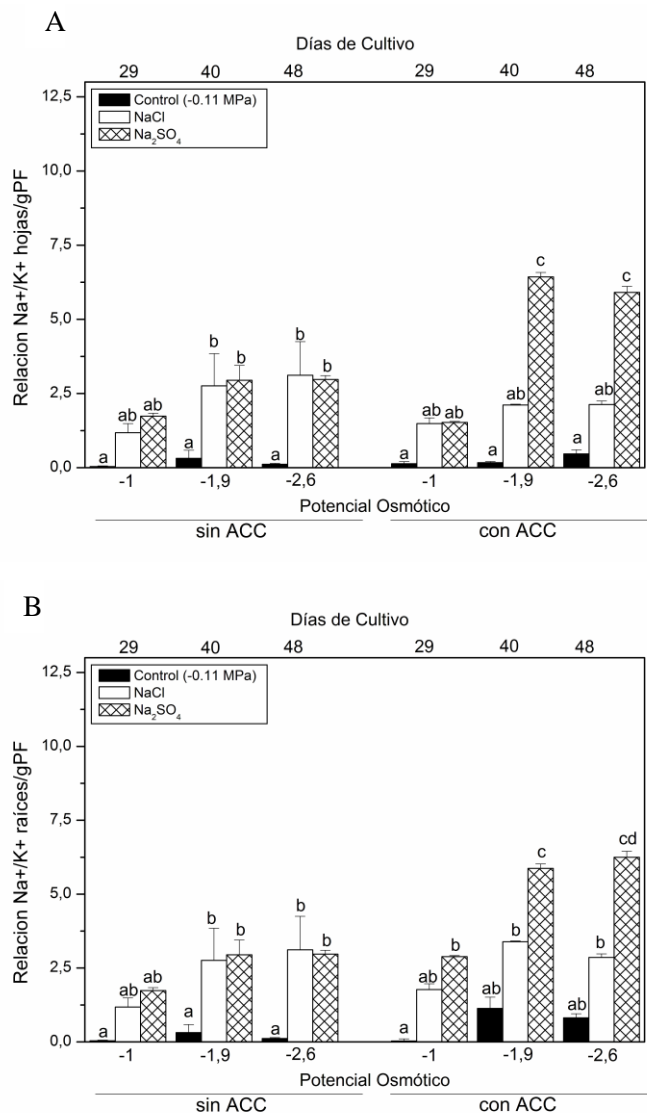


Fig. 53: Tasa de Na^+/K^+ en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de ACC

Notablemente, el ACC indujo un aumento de la tasa Na^+/K^+ tanto en hojas como en raíces de plantas tratadas con Na_2SO_4 , siendo este incremento estadísticamente significativo a partir del potencial -1,9 MPa. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre plantas salinizadas con NaCl y plantas sin salinizar a lo largo de todo el experimento.

5.4 Acumulación de Prolina en hojas y raíces de *P. strombulifera*

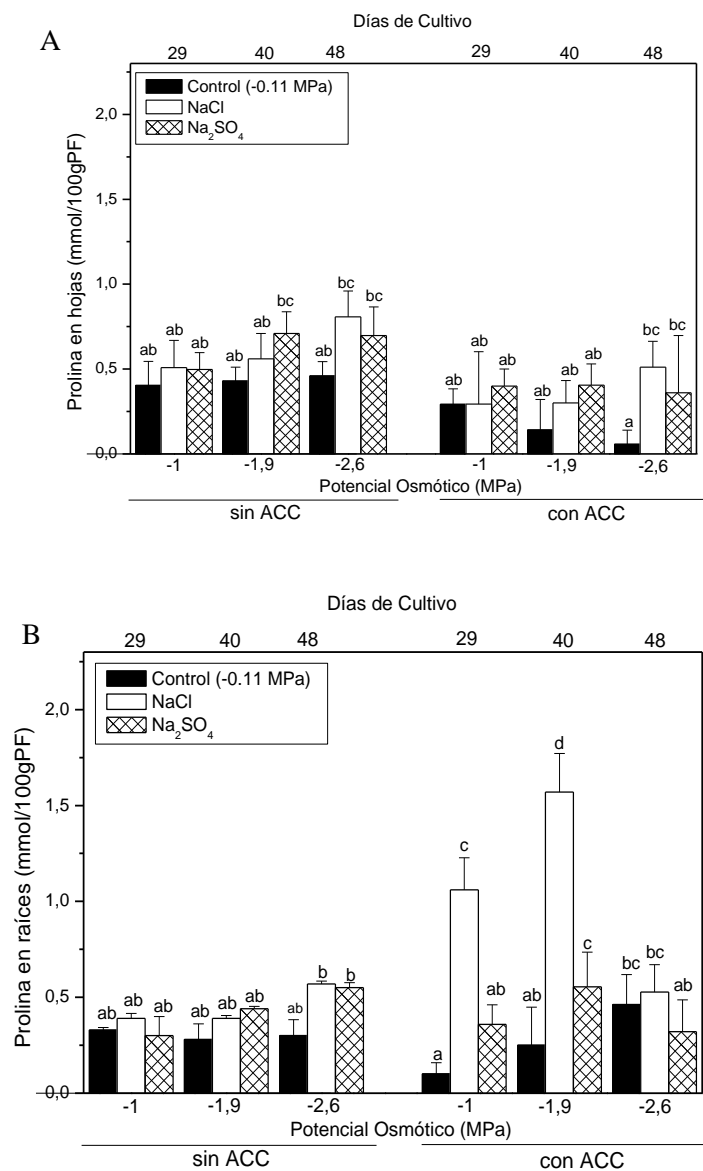
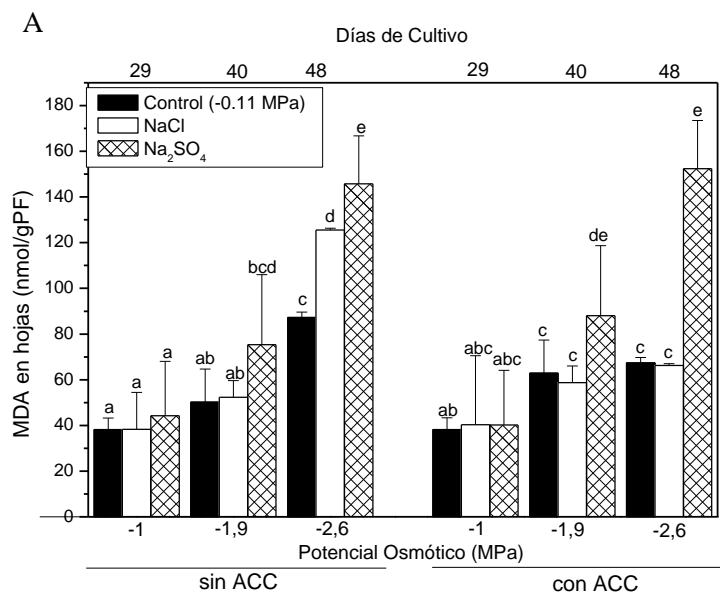


Fig. 54: Contenido de Prolina en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de ACC

Bajo la aplicación con ACC, el contenido de Prolina en hojas fue similar que el hallado para plantas sin tratamiento exógeno, y estos valores se mantuvieron relativamente constantes durante toda la experiencia.

Sin embargo, se observó un marcado incremento en la acumulación de Prolina causado por el ACC en las raíces de plantas tratadas con NaCl desde el inicio del tratamiento, que luego disminuyó en la mayor concentración de esta sal (700 mM). No se observaron diferencias significativas entre plantas tratadas con Na₂SO₄ y plantas sin salinizar a lo largo de toda la experiencia.

5.5 Contenido de MDA en hojas y raíces de *P. strobilifera*



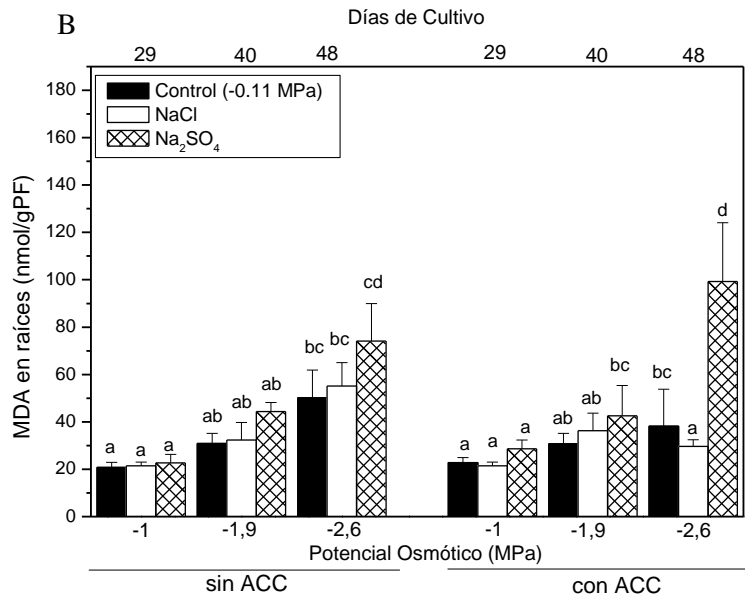


Fig. 55: Contenido de MDA en hojas (A) y raíces (B) de *P. strombulifera* con y sin aplicación exógena de ACC

Notablemente, el contenido de MDA en hojas de plantas tratadas con ACC y NaCl disminuyó marcadamente en el menor potencial osmótico, en comparación a plantas que no recibieron tratamiento con el precursor de etileno. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la producción de MDA para plantas sin salinizar y tratadas con Na₂SO₄, a lo largo de todo el experimento.

De manera similar a lo ocurrido en hojas, en raíces de plantas tratadas con ACC y NaCl se observó una clara reducción del contenido de MDA estadísticamente significativa, con respecto a los demás tratamientos. Sin embargo, el tratamiento exógeno con ACC no tuvo un efecto significativo sobre la producción de MDA en las raíces de plantas tratadas con Na₂SO₄ y de plantas sin salinizar.

5.6 Discusión

El etileno es la hormona más simple que existe en las plantas. Se ha reportado que el 7% de los 6000 genes estudiados de *Arabidopsis thaliana* son regulados por el etileno. Durante el ciclo de vida vegetal, el etileno regula numerosos procesos clave, como el desarrollo de la raíz, floración, madurez de frutos climatéricos, dormición de semillas y germinación (García y col., 2010). Niveles elevados de esta fitohormona son dañinos para el crecimiento y desarrollo vegetal. Consecuentemente, su biosíntesis y percepción están altamente reguladas dentro de las plantas. La síntesis de etileno comienza con la transformación del aminoácido metionina a S-adenosilmetionina (SAM), catalizada por la enzima SAM-sintetasa. El paso limitante de la biosíntesis de etileno es la conversión del SAM a ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) y 5´metil tioadenosina (MTA) por la acción de la ACC sintetasa (ACS). Esta enzima es sintetizada por una familia multigénica, donde todos sus miembros son estrictamente regulados y la abundancia de ACS está directamente relacionada con los niveles de producción de etileno en la mayoría de los tejidos vegetales. Se ha observado que a medida que el estrés incrementa en la zona radical, la forma de transporte del etileno es el ACC, el cual es convertido a etileno en la parte aérea de las plantas. El ACC es componente presente en semillas, raíces y exudados de hojas (Glick y col., 2007). El último paso de la biosíntesis es catalizado por la ACC oxidasa (ACO), donde también se forma ácido cianofórmico, el cual es espontáneamente degradado a cianuro debido a que es tóxico para las células. (Matilla y col. 2014).

La vía de señalización del etileno ha sido ampliamente estudiada en *Arabidopsis* (Yoo y col., 2009). Esta molécula gaseosa es sensada por receptores localizados en el retículo endoplasmático. En *Arabidopsis* se han encontrado 5 receptores (ETR1 y 2, ERS1 y 2, y EIN4), todos ellos con un dominio protein kinasa activo (Yoo y col., 2009). Los receptores operan como sensores negativos en esta vía de señalización e interactúan con distintos factores, produciéndose una compleja cascada de señales que regula la producción de etileno en las plantas.

El etileno ha sido considerado como una hormona del estrés. No solo está involucrado en el crecimiento y desarrollo vegetal, sino también en las respuestas frente a estrés biótico y abiótico, como el ataque contra patógenos, estrés térmico, wounding, ozono y deficiencia

de hierro (Larkindale y Knight 2002; Vahala y col., 2003; Lucena y col., 2006; Waters y col., 2007). Es interesante destacar que durante un proceso de estrés: 1) la acción del etileno es modulada por su propia concentración (Pierik y col., 2006), y 2) ocurre un crosstalk entre todas las fitohormonas que juega un papel esencial en la fisiología de las plantas (Thaler y col., 2012).

Numerosos estudios han asociado al etileno con la tolerancia a estrés salino (Wang y col., 2009). Se ha reportado que la vía de señalización del etileno es requerida para la tolerancia a salinidad, evidenciado en mutantes sin sensibilidad al etileno que fueron mas sensibles al estrés salino (Cao y col., 2007). La respuesta de las plantas frente a salinidad es modulada por cambios en los niveles de expresión del receptor de etileno ETR1 (Zhao y Schaller, 2004). Además, se ha demostrado que el factor NTHK1, un receptor de etileno de tabaco, reguló la respuesta frente a salinidad, ya que afectó la acumulación de iones en plantas transgénicas *NTHK1* (Cao y col. 2006). Aplicaciones exógenas del precursor de etileno ACC, causaron un aumento significativo de los niveles de etileno, aliviando los síntomas de toxicidad inducidos por NaCl, mediante un mantenimiento de la tasa K^+/Na^+ baja y un incremento de la actividad ATPasa- H^+ de la membrana plasmática en callos de *Arabidopsis*, pero no en callos mutantes *etr1-3*, deficientes en este receptor (Wang y col., 2009). Por otro lado, se ha descrito un aumento en la producción de etileno inducido por déficit hídrico en hojas de plantas de tomate, lo cual se correlacionó con una reducción del crecimiento de las hojas en la variedad salvaje, pero no en mutantes ACO1, deficientes en la síntesis de etileno (Sobeih y col., 2004).

La interacción entre ABA y etileno frente a diferentes tipos de estrés ha sido ampliamente estudiada (Dong y col. 2011; Wilkinson y Davies., 2010). Sin embargo, existen grandes contradicciones en esta interacción, ya que por un lado se ha reportado que ambas hormonas tendrían un efecto antagonista (Cheng y col. 2009); y por otro, existiría un efecto cooperativo entre ambas (Zhang y col., 2008). Una relación entre etileno, ABA y la inhibición del crecimiento de tallos fue establecida, utilizando inhibidores de sus biosíntesis así como mutantes deficientes en la señalización. De esta manera, la cuantificación de xantofilas, ABA y sus catabolitos reveló que el etileno inducido por auxinas indujo la biosíntesis de ABA, probablemente mediante un incremento del clivaje de xantofilas (Hansen y Grossman, 2000). De manera similar, la aplicación de ACC en nuestra especie

ocasionó una inhibición de la longitud de tallos en todos los tratamientos evaluados, probablemente debido a la inducción de ABA por parte del ACC exógeno. Por el contrario, en raíces esta inhibición del crecimiento no fue observada, sino que se evidenció una estimulación del crecimiento, siendo estadísticamente significativa a los 48 días de cultivo. Esta respuesta puede ser debida a que la forma de transporte de etileno frente a estrés es el ACC, el cual es convertido en etileno en las hojas de las plantas (Glick y col. 2007); de la misma manera, el ABA es sintetizado en raíces y es exportado a hojas, como fue evidenciado en los niveles de ABA obtenidos en el presente estudio. Por lo tanto, se propone que ambos compuestos ACC y ABA estarían siendo exportados a hojas, ejerciendo su acción en la inhibición del crecimiento de tallos, mientras que en raíces se observa un efecto estimulador del crecimiento poniéndose de manifiesto la diferente sensibilidad de los tejidos y en consecuencia, una acción dual del ABA cuya síntesis fue gatillada por ACC. Adicionalmente, el ACC indujo un incremento estadísticamente significativo en raíces de plantas tratadas con NaCl sobre la acumulación de prolina en los potenciales -1 y -1,9 MPa, disminuyendo este contenido en el menor potencial osmótico evaluado. Estos resultados se correlacionan con los valores de MDA obtenidos bajo este tratamiento salino, evidenciándose una disminución significativa inducida por el ACC exógeno tanto en hojas como en raíces a 700 mM de esta sal. Estas dos respuestas, síntesis de prolina y protección ante el daño oxidativo, son respuestas típicamente inducidas por ABA, lo cual confirmaría la idea de que ACC estaría ejerciendo su acción, al menos en estos experimentos, vía síntesis de etileno y ABA. Cabe aclarar que el efecto positivo del ACC no fue manifestado en las plantas tratadas con Na₂SO₄, ya que las mismas no arrojaron diferencias significativas ni en el contenido de prolina ni tampoco en la peroxidación lipídica, observándose valores similares a los obtenidos en las plantas que no recibieron la aplicación exógena de este compuesto. Además, el ACC ocasionó una reducción significativa en los niveles de clorofila *b*, evidenciándose un efecto negativo del ACC que podría ser causado por ABA, ejerciendo su rol en la senescencia de las plantas. Asimismo, el ACC exógeno provocó un aumento estadísticamente significativo sobre la tasa de Na⁺/K⁺ en las hojas y raíces bajo este tratamiento, indicando que existiría un desbalance osmótico en las células.

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que un incremento en la producción de etileno indujo un incremento en la biosíntesis de ABA, lo cual fue regulado a nivel del clivaje de carotenoides (Chernys y Zeevaart, 2000). Consistentemente, nuestros resultados demuestran un sinergismo entre ABA y etileno. Este último sería producido por la aplicación exógena de ACC, gatillando la síntesis de ABA, el cual, como se postuló previamente, tendría un papel dual en plantas de *P. strombulifera*. Este papel dual de ABA estaría siendo evidenciado en los resultados obtenidos de plantas tratadas con NaCl, donde ABA actuaría como protector del crecimiento y desarrollo vegetativo, mientras que frente a Na_2SO_4 sería una molécula señal del estrés severo causado por el anión SO_4^{2-} .

6. Toxicidad iónica causada por el anión SO_4^{2-}

En nuestro laboratorio hemos demostrado a lo largo de varios años de investigación que la presencia del anión SO_4^{2-} ocasiona gran toxicidad en nuestra especie, *P. strombulifera*. Esta respuesta se ha comprobado mediante diferentes mediciones y determinaciones, como el crecimiento vegetal, contenido relativo de agua (CRA), potencial osmótico, tasa transpiratoria, ajuste osmótico, contenido de cationes y aniones (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , Cl^-), MDA, carbohidratos solubles, ácidos orgánicos, fluorescencia de la clorofila, flujo fotosintético de electrones, tasa respiratoria, flavonoides y fitohormonas (ABA, SA, GAs), entre otras (Llanes y col., 2013, Devinar y col., 2013, Reginato y col., 2014a, Llanes y col., 2014, Reginato y col., 2014b).

Por todo lo expuesto, resulta imprescindible poder explicar el daño oxidativo generado por este anión y así dilucidar los mecanismos de respuesta diferencial frente a salinidad de esta halófito. A continuación se resume el proceso de síntesis y asimilación del SO_4^{2-} y se propone una posible explicación de su gran toxicidad, en base a los resultados obtenidos en este trabajo.

El SO_4^{2-} es absorbido por raíces con una elevada afinidad y su máxima tasa de absorción alcanza niveles de 0,1 mM (Hawkesford 2000; Hawkesford y Wray 2000; Hawkesford y col. 2003). El transporte de este anión hacia la parte aérea de las plantas es estrictamente controlado y posiblemente sea uno de los principales sitios de regulación de la asimilación del azufre. El SO_4^{2-} es activamente transportado a través de la membrana plasmática de las células de raíces, volcado luego en los vasos xilemáticos y transportado hacia los tallos a través del torrente transpiratorio. El transporte a través de la membrana es dependiente de energía y llevado a cabo por un gradiente de protones generado por ATPasas, mediante el co-transporte protón/sulfato (Clarkson y col. 1993). Una vez en el tallo, el SO_4^{2-} es transportado hacia los cloroplastos donde es reducido. El remanente de este anión se encuentra predominantemente en la vacuola, ya que las concentraciones citoplasmáticas del mismo se mantienen siempre constantes.

El S^{2-} es generado durante la asimilación del SO_4^{2-} y toda la secuencia de reacciones desde sulfato a cisteína toma lugar en los cloroplastos. La energía requerida en forma de ATP y ferredoxina es generada por la cadena de transporte de electrones. La enzima sulfito

reductasa cataliza la reducción de sulfito a S^{2-} , utilizando la ferredoxina como donador de electrones. Este S^{2-} generado es capaz de unirse al grupo sirohemo y reducirse a sirohemo- S^{2-} (Murphy y col., 1974), el cual luego es liberado como anión S^{2-} libre. Se ha observado también que el S^{2-} puede reaccionar como un fuerte nucleófilo, reduciendo puentes disulfuro y unirse a los anillos de los grupos hemo (Nicholls, 1975). El compuesto sulfuro de hidrógeno (SH_2) generado es asimilado por la enzima cisteína sintetasa o puede ser liberado al ambiente. Caben destacar diferentes aspectos: 1) Algunas plantas poseen solo un gen que codifica para la enzima sulfito reductasa, lo cual es un paso limitante para la asimilación del SO_4^{2-} ; 2) El S^{2-} formado puede unirse a los citocromos que intervienen en la cadena respiratoria, afectando de esta manera el proceso de respiración como así también puede unirse a otros complejos que posean el grupo hemo; y 3) La constante K_M para la unión del S^{2-} está en el mismo orden que la concentración de cianuro (μM), lo cual sugiere que la planta debe controlar el pool de SH_2 libre, de forma de evitar los efectos tóxicos del mismo. En consecuencia, la incorporación de S^{2-} a la L-cisteína es la forma más eficiente para mantener baja su concentración y evitar los efectos inhibitorios en el metabolismo de la planta (Schmidt, 2005). El S^{2-} es tóxico para los microorganismos y se ha demostrado que el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. coli* es debido a la unión del SH_2 al citocromo a3 para la absorción de oxígeno, inhibiendo parcialmente la formación de ATP (Sohn, 2000). Recientemente, se ha demostrado que el sulfito (SO_3^{2-}), compuesto intermediario en la vía de asimilación del SO_4^{2-} , reprimió la fotosíntesis en un 90% en la cianobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942, la cual es considerada como organismo modelo de los cloroplastos. Estos autores demostraron una inactivación del PSII con el consecuente retardo del crecimiento (Kobayashi y col., 2015). Por lo tanto, debe esperarse que el SH_2 también pudiera unirse a otros grupos hemo formados por hierro, incluyendo el grupo hemo del citocromo b559. Como se describió anteriormente, el citocromo b559 es un componente intrínseco del PSII presente en todos los organismos aerobios fotosintéticos. Es un heterodimero unido a un grupo hemo, compuesto por dos subunidades a y b, las cuales están codificadas por los genes PsbE y PsbF, respectivamente. El grupo hemo se encuentra ligado a través de dos residuos de histidina pertenecientes a ambas subunidades, formando de esta manera, una estructura reticulada (Shinopoulos y Brudvig, 2012).

De esta manera, en nuestra especie se propone que el SH₂ que se encuentra en exceso, ya que la asimilación del SO₄²⁻ no es suficiente debido a la elevada concentración de este anión en el medio de cultivo, se podría estar uniendo al citocromo b559 del PSII bloqueando su funcionamiento parcial o completamente e inhibiendo así, el proceso de fotosíntesis. Esta hipótesis sería al menos uno de los efectos tóxicos del SO₄²⁻ ya que además las plantas tratadas con esta sal muestran un fuerte desbalance hídrico, a causa de la incorporación excesiva de iones lo cual estaría indicando alteraciones en las señales de coordinación de los canales iónicos. Adicionalmente, el metabolismo y partición del carbono se ven seriamente afectados, debiendo desviar los recursos energéticos hacia la síntesis de metabolitos secundarios, como taninos condensados y precursores de ligninas, y polifenoles para enfrentar el gran estrés oxidativo.

7. CONSIDERACIONES FINALES

La salinización es uno de los principales problemas a nivel mundial que enfrenta la agricultura en la actualidad. Los efectos dañinos que causa el estrés salino en las plantas han sido muy estudiados, e incluyen la deshidratación celular, la alteración del balance osmótico, inhibición de actividades enzimáticas y procesos celulares esenciales y la generación de EROs, lo cual ocasiona un importante estrés oxidativo en toda la planta (Parida y Das, 2005; Dajic, 2006; Nawaz y col., 2010). Asimismo, se ha demostrado que el estrés iónico y osmótico causado por la salinidad, afectan la productividad de las plantas por reducción del área fotosintética debido a la inhibición de la división y expansión celular durante el crecimiento de la hoja, como también los programas de desarrollo (Muñiz, 2002). Las plantas activan diferentes mecanismos para contrarrestar las consecuencias de la exposición a elevada salinidad del suelo, mecanismos basados en la homeostasis iónica y el mantenimiento del balance osmótico celular, las síntesis de metabolitos protectores y proteínas, o la activación de sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Hussain y col., 2008; Flowers y Colmer, 2008; Vinocur y Altman, 2005). De esta manera, resulta necesario el estudio de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de plantas capaces de tolerar altas concentraciones de sales, como son las plantas halófitas. La investigación acerca del género *Prosopis*, altamente tolerante a salinidad, es importante para consideraciones teóricas y futuras aplicaciones. La mayoría de los estudios moleculares basados en la tolerancia al estrés salino se han realizado en *Arabidopsis* y mutantes de levadura (Ariga y col., 2013; Obata y col. 2007). Por lo tanto, la identificación y entendimiento de mecanismos de tolerancia a salinidad en *Prosopis*, particularmente la especie altamente tolerante a NaCl *Prosopis strombulifera*, se considera de suma relevancia para transferir conocimientos útiles para las leguminosas de interés agronómico. Este trabajo de tesis implica un considerable avance en este sentido, confirmado mediante estudios fisiológicos y bioquímicos el carácter halofítico de esta especie respecto a NaCl. Sin embargo, también se demuestra una alta sensibilidad frente al Na₂SO₄, confirmándose que la respuesta de esta especie frente a salinidad varía según el anión que se encuentre asociado al Na⁺.

La respuesta halofítica frente a NaCl quedó evidenciada en su crecimiento, ya que se demostró que *P. strombulifera* estaría dentro de los límites máximos de tolerancia informados para plantas halófitas, superando de manera notable a sus congéneres arbóreas. Asimismo, los altos niveles de Na⁺ hallados bajo este tratamiento sugieren que esta especie es capaz de utilizar tanto Na⁺ como K⁺ para ajuste osmótico, sin evidenciarse síntomas de toxicidad. Estos resultados se correlacionan con el contenido de MDA, el cual fue similar al observado en plantas sin salinizar, indicando ausencia de daño en membranas celulares en estas plantas. Adicionalmente, el elevado contenido de prolina cumpliría una función de ajuste osmótico, lo cual se encuentra en directa correlación con los resultados obtenidos de potencial osmótico. Otra respuesta adaptativa observada frente al tratamiento con NaCl fue en relación a los valores de Fv/Fm, ETR y ψ_{PSII} , siendo todos ellos similares a los obtenidos en plantas sin salinizar a lo largo de todo el cultivo. Asimismo, los altos niveles de NO observados en plantas tratadas con NaCl estarían demostrando el rol protector del NO sobre estas plantas, evidenciándose en sus características fenotípicas, su óptimo crecimiento y adecuado ajuste osmótico. Con respecto a los niveles de ABA, no fue necesaria su acumulación y ABA sólo actuaría como mediador de respuestas de protección manteniendo un crecimiento similar al de plantas no salinizadas. De la misma manera, los niveles de SA se mantuvieron bajos durante toda la experiencia, observándose a su vez, un elevado contenido de Na⁺, indicando que su incorporación le permite realizar un adecuado ajuste osmótico.

La baja humedad relativa acentuó los efectos tóxicos de salinidad en el crecimiento vegetativo, en la síntesis de pigmentos, así como también en la síntesis de ABA y SA. Sin embargo, esta respuesta no fue tan marcada con respecto a las plantas tratadas con Na₂SO₄, lo que pone de manifiesto la elevada capacidad adaptativa de esta especie frente al NaCl.

La respuesta observada bajo la aplicación exógena con SA demuestra que esta fitohormona estaría estimulando una mayor producción de ABA frente a ambos tratamientos salinos, pero con la función de mantener el normal funcionamiento de la planta frente a NaCl.

El tratamiento exógeno con SNP no tuvo un efecto significativo en plantas tratadas con NaCl, ya que no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros fisiológicos y bioquímicos evaluados, siendo todos ellos similares a los obtenidos en plantas sin salinizar. En cambio, la aplicación de ACC indujo un incremento significativo

en raíces de plantas tratadas con NaCl sobre la acumulación de prolina, y una disminución en los valores de MDA tanto en hojas como en raíces. Ambas respuestas, síntesis de prolina y protección ante el daño oxidativo, son respuestas típicamente inducidas por ABA, lo cual confirmaría que el ACC estaría ejerciendo su acción, vía síntesis de etileno y ABA.

Por el contrario, en el presente estudio quedó demostrada la elevada toxicidad que causa el Na_2SO_4 en nuestra especie. Esta sal inhibió significativamente su crecimiento, evidenciándose síntomas de senescencia precoz como clorosis, necrosis y abscisión de hojas. Asimismo, se observó que si bien NaCl y Na_2SO_4 no tuvieron efectos muy diferentes sobre la acumulación de Na^+ y K^+ , existiría un efecto aniónico específico del sulfato. Estos resultados se relacionan directamente con el aumento significativo en el contenido de MDA observado en hojas y raíces a lo largo de toda la experiencia. Adicionalmente, estas plantas no realizan un ajuste osmótico eficiente, ya que su potencial osmótico extremadamente negativo a -1,9 MPa, pone de manifiesto un desbalance hídrico y un efecto del SO_4^{2-} sobre la permeabilidad de la membrana que ocasiona toxicidad. Otras respuestas que confirmaron la sensibilidad específica de *P. strombulifera* frente a Na_2SO_4 , fueron los valores de Fv/Fm, el ETR así como también en el ψ_{PSII} , los cuales demuestran una fuerte fotoinhibición sobre el PSII. Además, la disminución observada en los valores de NPQ a medida que transcurren los días del cultivo estaría contribuyendo a los bajos niveles de Fv/Fm observados, correlacionándose con la fuerte inhibición en el ciclo de las xantofilas previamente observada frente a Na_2SO_4 . Asimismo, la mayor tasa respiratoria hallada en las hojas de estas plantas podría estar relacionada al mayor contenido de los ácidos orgánicos y carbohidratos solubles totales previamente observados en nuestro laboratorio, conduciendo a la mayor demanda energética necesaria para la incorporación de iones y para la formación de numerosos compuestos como solutos compatibles, fibras, ligninas, etc. Adicionalmente, el Na_2SO_4 indujo un aumento sobre los niveles de ABA, indicando que esta fitohormona actuaría como molécula señal del estrés severo para proteger a las plantas de la toxicidad iónica causada por la presencia del anión sulfato. Asimismo, estas plantas arrojaron altos niveles de SA, los cuales podrían estar correlacionados con una falla en la compartimentalización de iones. Estas respuestas sugieren que en *P. strombulifera* la producción de SA actuaría como señal de daño frente a situaciones de estrés. De esta

manera, se comprueba nuestra hipótesis en la que proponemos que ABA y SA están involucrados a la tolerancia diferencial a NaCl y Na₂SO₄.

En el presente estudio quedó demostrado el efecto deletéreo sinérgico que ocasiona la combinación de la baja humedad relativa del ambiente junto al tratamiento con Na₂SO₄, observándose una marcada inhibición del crecimiento, una reducción significativa en el contenido de clorofilas *a* y *b*, así como una mayor acumulación de ABA y SA. Por lo tanto, cuando ambas situaciones de estrés, baja HR y Na₂SO₄, son aplicadas simultáneamente, éstas interactúan generando una toxicidad más acentuada a la que se obtiene si cada factor es aplicado por separado.

La aplicación exógena de SA causó una inhibición en los parámetros del crecimiento en plantas tratadas con Na₂SO₄, la cual fue aditiva a la provocada por la sal en sí. Asimismo, se observó un aumento sobre la acumulación de carotenoides, por lo que se propone que podría ser un mecanismo de respuesta frente al estrés oxidativo inducido por SA. Este daño oxidativo se encuentra también reflejado en los niveles de MDA, ya que aumentaron significativamente en las hojas de estas plantas. En relación a los niveles de fitohormonas, el SA indujo una aceleración en la respuesta de estrés, lo cual vuelve a confirmar que el SA actúa como una señal de daño en esta especie frente a situaciones de estrés. Asimismo, el SA exógeno estimuló una mayor producción de ABA, el cual tendría un papel dual en esta especie, acelerando los mecanismos de respuesta frente a una condición de estrés severo, como lo es el Na₂SO₄ y actuando como protector del crecimiento y desarrollo vegetativo frente a NaCl.

Por otro lado, es muy interesante destacar que el SNP alivió los efectos tóxicos ocasionados por el Na₂SO₄, ya que la fluorescencia de la clorofila y el ψ_{PSII} mostraron un aumento significativo a la mayor concentración de sal evaluada, y la tasa respiratoria, una disminución en esta misma concentración. Estos resultados se correlacionan con el contenido de NO endógeno, ya que aumentó significativamente a -2,6 MPa. Asimismo, el efecto positivo del SNP quedó demostrado sobre las tasas de Na⁺/K⁺ de las hojas de estas plantas, induciendo una disminución de las mismas. En consecuencia, estos resultados sugieren un papel protector del NO frente a la toxicidad causada por el anión SO₄²⁻, posiblemente detoxificando las EROs generadas durante el estrés oxidativo, y/o a través del aumento de las actividades de diferentes enzimas antioxidantes, y/o estimulando la síntesis

de osmolitos como prolina. Por lo tanto, se estaría confirmando nuestra hipótesis en la que proponemos que el NO estaría involucrado en la homeostasis iónica y en la tolerancia diferencial frente a ambas sales.

Sin embargo, el efecto positivo no fue observado en raíces de plantas tratadas con Na_2SO_4 , evidenciándose en su alta tasa Na^+/K^+ y su contenido de MDA. Teniendo en cuenta resultados previos de nuestro laboratorio, el NO sería secuestrado por el O^{2-} , por lo que no habría NO disponible en la células para realizar la S-nitrosilación del receptor TIR1, inhibiéndose la vía de señalización de las auxinas, inhibiéndose por lo tanto, la elongación de las raíces e induciendo una mayor producción de flavonoles. De esta manera, el NO tendría un efecto negativo en las raíces de nuestra especie, posiblemente al encontrarse en exceso debido a la aplicación exógena del dador.

La aplicación de ACC causó un efecto negativo en plantas tratadas con Na_2SO_4 , que podría ser mediado por ABA, evidenciándose en la disminución del contenido de clorofila *a* y en el aumento de la tasa de Na^+/K^+ de estas plantas. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran un sinergismo entre ABA y etileno. Este último sería producido por la aplicación exógena de ACC, gatillando la síntesis de ABA, el cual sería una molécula señal del estrés severo causado por el anión SO_4^{2-} . Estos resultados confirman nuestra hipótesis en relación al rol del ABA y etileno en la tolerancia diferencial frente a ambas sales.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, se propone que la asimilación del SO_4^{2-} por la planta está limitada debido a la elevada concentración de este anión en el medio de cultivo, por lo que el SH_2 que queda en exceso, se estaría uniendo al citocromo b559 del PSII bloqueando su funcionamiento parcial o completamente e inhibiendo así, el proceso de fotosíntesis. Esta hipótesis sería al menos uno de los efectos tóxicos del SO_4^{2-} ya que además estas plantas muestran un fuerte desbalance hídrico, debido a problemas en su osmoregulación, así como también el metabolismo y partición del carbono seriamente afectados, por lo que futuras investigaciones a nivel molecular son necesarias para dilucidar los diferentes mecanismos de respuestas llevados a cabo por *P. strombulifera*.

BIBLIOGRAFÍA

- Adem G., Roy S. T., Zhou M., Bowman J., Shabala S. (2014) Evaluating contribution of ionic, osmotic and oxidative stress components towards salinity tolerance in barley BMC Plant Biology, 14:113.
- Albacete, A., Ghanem, M.E., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J., Martínez, V., Lutts, S., Dodd, I.C., Pérez-Alfocea, F. (2008). Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinised tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. Journal of Experimental Botany, 59:4119–4131.
- Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V., Rubio, F. (2011). Root K⁺ acquisition in plants: the *Arabidopsis thaliana* model. Plant Cell Physiol. 52: 1603–1612.
- Allakhverdiev, S.I., Murata, N. (2004) Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage-repair cycle of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803, Biochim. Biophys. Acta 1657: 23–32.
- Almeida Viégas, R., Martins Fausto, M., Queiroz, J., Almeida Rocha, I., Gomez Silveira, J., Almeida Viégas, P. (2004). Growth and total-N content of *Prosopis juliflora* (S.W.) D.C. are stimulated by low NaCl levels. Brazilian Journal of Plant Physiology, 16:65–68.
- Alves A., Setter T. (2004) Abscisic acid accumulation and osmotic adjustment in cassava under water deficit. Environ. Exp Bot. 51: 259-271.
- Anandhi, S., Ramanujam, M.P. (1997). Effect of salicylic acid on black gram (*Vigna mungo*) cultivars. Ind. J. Plant Physiol. 2: 138–141.
- Arfan, M., Athar, H.R., Ashraf, M. (2007) Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress? J. Plant Physiol., 6: 685–694.
- Ariga, H., Katori, T., Yoshihara, R., Hase, Y., Nozawa, S., Narumi, I., et al. (2013). *Arabidopsis* *sos1* mutant in a salt-tolerant accession revealed an importance of salt acclimation ability in plant salt tolerance. Plant Signal. Behav. 8:e24779 10.4161/psb.24779.
- Armengaud, P., Breitling, R., and Amtmann, A. (2004). The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. Plant Physiol. 136, 2556-2576.
- Apse, M.P., Blumwald, E. (2007). Na⁺ transport in plants. FEBS Letters 581, 2247–2254.
- Asai, S., Ohta, K., Yoshioka, H. (2008) MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. Plant Cell 20:1390–1406.

- Ashraf, M., M.R. Foolad. (2007). Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress tolerance. *Environ. Exp. Bot.*, 59: 206-216.
- Atkin, O.K., Macherel, D. (2009) The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Ann. Bot.* 103: 581–597.
- Atkin, O.K., Tjoelker, MG. (2003). Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends in Plant Science* 8: 343–351.
- Azcón Bieto, J., Talon, M. (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Cap. 9 y 10. Mc Graw-Hill/Interamericana de España.
- Babakhani, B., Khavari-Nejad, R.A., Hassan sajadi, R., Fahimi, H., Saadatmand, S. (2011). Biochemical responses of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars subjected to NaCl salinity stress. *African Journal of Biotechnology* 10: 11433-11441.
- Barbagallo, R.P.; Oxborough, K.; Pallet, K.E., Baker N.R. (2003). Rapid, non-invasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiol.* 132:485-493.
- Balderas-Hernández, V. E., Alvarado-Rodríguez, M., Fraire-Velázquez, S. (2013). Conserved versatile master regulators in signaling pathways in response to stress in plants. *AoB Plants* 5:plt033. 10.1093/aobpla/plt033
- Bartels, D., R. Sunkar (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 24: 23-58.
- Bartoli, C.G., Guiamet, J.J., Kiddle, G., Pastori, G., Di Cagno, R., Theodoulou, F.L., Foyer, C.H. (2005). The relationship between L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) and ascorbate content in leaves under optimal and stress conditions. *Plant, Cell and Environment* 28: 1073–1081.
- Bassil, E., Coku, A., Blumwald, E. (2012). Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na⁺/H⁺ antiporters in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 63 5727–5740. 10.1093/jxb/ers250.
- Basu, P.S., Sharma, A., Sukumaran, N.P. (1998). Changes in net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in potato leaves induced by water stress. *Photosynthetica* 35: 13–19.
- Bates, L., Waldren, R.P., Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
- Begara-Morales, J.C., Chaki, M., Sánchez-Calvo, B., et al. (2013). Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence. *Journal of Experimental Botany*, 64:1121-1134.
- Beligni, M.V., Lamattina, L. (2000) Nitric oxide stimulates seed germination, de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants, *Planta* 210: 215–221.
- Beligni, M.V., Lamattina, L. (2001) Nitric Oxide in Plants: The History Is Just Beginning, *Plant Cell Environ.*, 24: 267–278.

- Ben Ahmed, C., Ben Rouina, B., Sensoy, S., Boukhris, M., Ben Abdallah, F. (2009). Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environ. Exp. Bot.* 67: 345–352
- Bjorkman, O., Demmig, B. (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489–504.
- Bianeth Peña, C., Restrepo, L. P. (2013). Phenolics compounds and carotenoids in potatoes. A revision. *Actualización en Nutrición* 14: 25-32.
- Borsani, O., Valpuesta, V., Botella, M.A. (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* 126:1024–1030.
- Bourbouloux, A., Raymond, P., Detrot, S. (1998) Effect of salicylic acid on sugar and amino acids uptake. *J Ex Botany* 49:239–247
- Burchett, M.D. et al. (1989) Growth and respiration in two mangrove species at a range of salinities. *Physiol. Plant.* 75: 299–303.
- Burkart, A. (1976) A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). Catalogue of the recognized species of *Prosopis*. *J of the Arnold Arboretum* 57:450-525.
- Cao, W.H., Liu J., He X., Mu, R.M., Zhou, H., Chen S., Zhang, S. (2007) Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. *Plant Physiology*. DOI:10.1104/pp.106.094292.
- Catalan, L., Balzarim, Z., Lalesnik, E., Sereno, R. and Karlin, U. (1994). Effects of salinity and germination and seedling growth of *Prosopis flexuosa* (D.C.). *Forest Ecology and Management*, 63: 347-357.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S. (2003). Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30:239-264.
- Chen Z., Zheng Z., Huang J., Lai Z., Fan B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 4:493–496.
- Chen, Z., Newman, I., Zhou, M., Mendham, N., Zhang, G., Shabala, S. (2005) Screening plants for salt tolerance by measuring K⁺ flux: a case study for barley. *Plant Cell Environ* 28: 1230–1246.
- Cheng, W. H., Chiang, M. H., Hwang, S. G., Lin, P. C. (2009). Antagonism between abscisic acid and ethylene in *Arabidopsis* acts in parallel with the reciprocal regulation of their metabolism and signaling pathways. *Plant Mol. Biol.* 71: 61–80.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., Zhu, J.K. (2004). Molecular genetics perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J. Exp. Bot.*, 55: 225-236.
- Clarkson, D.T., Hawkesford, M.J., Davidian, J.C. (1993) Membrane and long-distance transport of sulfate. In: De Kok LJ, Stulen I, Rennenberg H, Brunold C, Rauser W (eds) *Sulfur Nutrition and*

Sulfur Assimilation in Higher Plants: Regulatory, Agricultural and Environmental Aspects. SPB Academic Publishing, The Hague, 3-19, ISBN 90-5103-084-3.

Cuin, T.A., Miller, A.J., Laurie, S.A., Leigh, R. (2003) Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *J Exp Bot* 54: 657–661.

Czarny, J.Z., Grichko, V.P., Glick, B.R. (2006) Genetic modulation of ethylene biosynthesis and signaling in plants. *Biotechnol Adv* 24:410–419.

Dajic, Z. (2006). Salt Stress. In *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*, Madhava Rao, K.V.; Raghavendra, A.S.; Janardhan Reddy, K. ed.; Springer: Germany, pp. 41-82.

Datta, K.S., S.K. Varma, R. Angrish, B. Kumar and P. Kumari. (1998). Alleviation of salt stress by plant growth regulators in *Triticum aestivum* L. *Biol. Plant.*, 40: 269-275.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57: 779–795.

Debouba, M., Gouiaa, H., Valadierb, M.-H., Ghorbela, M.H., Suzuki, A. (2006) Salinity-induced tissue-specific diurnal changes in nitrogen assimilatory enzymes in tomato seedlings grown under high or low nitrate medium. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 409–419.

Debouba, M., Maarouhi, H, Suzuki, M. et al. (2007) Changes in Growth and Activity of Enzymes Involved in Nitrate Reduction and Ammonium Assimilation in Tomato Seedlings in Response to NaCl Stress. *Annals of Botany* 99: 1143–1151.

Delseny, M., Charng, Y., Wang, L.C. (2008) Ethylene biology. *Plant Sci* 175:1–196.

Devinar, G., Llanes, A., Masciarelli, O., Luna, V. Different relative humidity conditions combined with chloride and sulfate salinity treatments modify abscisic acid and salicylic acid levels in the halophyte *Prosopis strombulifera* (2013). *Plant Growth Regil* 70: 247:256.

Dong, H., Zhen, Z., Peng, J., Chang, L., Gong, Q., Wang, N. N. (2011). Loss of ACS7 confers abiotic stress tolerance by modulating ABA sensitivity and accumulation in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 62: 4875–4887.

Draper, H.H., Hadley, M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Method Enzymol.* 186: 421–431.

Du, H., Wu, N., Chang, Y., Li, X., Xiao, J., Xiong, L. (2013). Carotenoid deficiency impairs ABA and IAA biosynthesis and differentially affects drought and cold tolerance in rice. *Plant Mol. Biol.* 83: 475–488.

Ehlert, B., Hinch, K. (2008). Chlorophyll fluorescence imaging accurately quantifies

El-baky, A., H. Hanaa, M.A., Hussein M.M. (2003) Influence of salinity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and electrophoretic patterns of protein and isoenzymes in leaves of some onion cultivars. *Asian J. Plant Sci.*, 2: 1220-1227.

- Ellouzi, H., Ben Hamed, K., Cela, J., Munne-Bosch, S. Abdely C. (2011). Early effects of salt stress on the physiological and oxidative status of *Cakile maritima* (halophyte) and *Arabidopsis thaliana* (glycophyte). *Physiologia Plantarum* 142: 128–143.
- Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H., Okamoto, M., Ikegami, K., Koiwai, H., Seo, M., Toyomasu, T., Mitsuhashi, W., Shinozaki, K. (2008) Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiol* 147:1984–1993.
- Fan, H.F., Guo, S.R., Duan, J.J., Du, C.X., Sun, J. (2008). Effects of nitric oxide on the growth and glutathione dependent antioxidant system in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings under NaCl stress. *Acta Ecol. Sin.*, 28(6): 2511–2517.
- FAO (2008) Land and plant nutrition management service. www.fao.org/ag/agl/agll/spush.
- Fariduddin, Q., Hayat, S., Ahmad, A. (2003). Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica* 41: 281-284.
- Felker, P. (2007) Unusual physiological properties of the arid adapted tree legume *Prosopis* and their applications in developing countries, pp. 1–41. In: De la Barrera E. & Smith W. (eds), *Perspectives in Biophysical Plant Ecophysiology: A Tribute to Park Nobel, Mildred E. Mathias* Botanical Garden University of California, Los Angeles.
- Flores, A. (1993). Salinidad un nuevo concepto. Seminario Cuba – México. La Habana, pp. 12
- Flowers, T. J., Colmer, T. D. (2008) Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* 179:945–963.
- Flowers, T. J., Colmer, T. D. (2015) Plant salt tolerance: adaptations in halophytes. *Annals of Botany* 115: 327–331.
- Freschi L. (2013). Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Front. Plant Sci.* 4:398 10.3389/fpls.2013.00398.
- Galatro, A., Puntarulo, S., Guamet, J.J., Simontacchi, M. (2014) Chloroplast functionality has a positive effect on nitric oxide level in soybean cotyledons. *Plant Physiology and Biochemistry* 66: 26-33.
- Galetskiy, D., Lohscheider, J.N., Kononikhin, A.S., Popov, I.A., Nikolaev, E.N., Adamska, I. (2011) Phosphorylation and nitration levels of photosynthetic proteins are conversely regulated by light stress. *Plant Mol Biol* 77:461–473.
- García, I., Castellano, J.M., Vioque, B., Solano, R., Gotor, C., Romero, L.C. (2010) Mitochondrial β -cyanoalanine synthase is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana* W. *Plant Cell* 22:3268–3279.

- Garcia Mata, C., Lamattina, L. (2007) Abscisic Acid (ABA) Inhibits Light Induced Stomatal Opening through Calcium and Nitric Oxide Mediated Signaling Pathways, *Nitric Oxide*, 17: 143–151.
- Gaxiola, R.A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J., Alper, S.L., Fink, G.R. (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 11444–11449.
- Gémes, K., Poór, P., Horváth, E., Kolbert, Z., Szopkó, D., Szepesi, A., Tari, I. (2011). Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity, 42:179-92.
- Glick, Z. Cheng, J. Czarny, J. (2007). Duan Promotion of plant growth by ACC deaminase-containing soil bacteria *Eur J Plant Pathol*, 119: 329–339
- Gong, Z., Lee, H., Xiong, L., Jagendorf, A., Stevenson, B., Zhu, J. (2002). RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11507–11512.
- Gouvea, C.P., Souza, J.F., Magalhaes, A.C.N., Martins, I.S. (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regul.* 21: 183–187.
- Grigore M. N, Toms, C., Zamfirache, M. M., Boscaiu, M., Olteanu, Z., Cojocaru, D. (2012). Ecology anatomy in halophytes with C4 photosynthesis: discussing adaptative features in endangered ecosystems. *Carp J Earth Environm Sci* 7: 13-21.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Guneri, E., Cicek, N. (2007) Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *J of Plant Physiology* 164:728-736.
- Halim, V.A., Eschen-Lippold, L., Altmann, S., Birschwilks, M., Scheel, D. and Rosahl, S. (2007) Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 1346–1352.
- Hamada, A., Shono, M., Xia, T., Ohta, M., Hayashi, Y., Tanaka, A. and Hayakawa, T. (2001). Isolation and characterization of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Molecular Biology* 46: 35–42.
- Hao, L., Zhao, Y., Jin, D., Zhang, L., Bi, X., Chen, H., Xu, Q., Ma, C., Li, G. (2011) Salicylic acid altering *Arabidopsis* mutants response to salt stress. *Plant Soil* 10:11104-011.
- Hare, P., Cress, W. (1997) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell and Environment* 21: 535-553.
- Hartig, K., Beck, E. (2006) Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biology* 8: 389–396.

- Hartung, W., Sauter, A., Hose, E. (2002). Abscisic acid in the xylem: Where does it come from, where does it go to? *J. Exp. Bot.* 53: 27-32.
- Hartzendorf, T., Rolletschek, H. (2001). Effects of NaCl-salinity on amino acid and carbohydrate contents of *Phragmites australis*. *Aquat. Bot.* 69: 198–208.
- Hasegawa, P., Bressan, R., Zhu, J., Bohnert, H. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.
- Hauben, M. et al. (2009) Energy use efficiency is characterized by an epigenetic component that can be directed through artificial selection to increase yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 20109–20114.
- Hawkesford, M.J. (2000) Plant responses to sulfur deficiency and the genetic manipulation of sulfate transporters to improve S-utilization efficiency. *J Exp Bot* 51:131-138.
- Hawkesford, M.J., Buchner, P., Hopkins, L., Howarth, J.R. (2003) The plant sulfate transporter family: Specialized functions, integration with whole plant nutrition. In: Davidian J-C, Grill D, De Kok, L.J., Stulen, I., Hawkesford, M.J., Schnug, E., Rennenberg, H. (eds) *Sulfur Transport and Assimilation in Plants: Regulation, Interaction and Signalling*, Backhuys Publishers, Leiden, p 1-10 ISBN 90-5782-138-9.
- Hawkesford, M.J., Wray, J.L. (2000) Molecular genetics of sulphate assimilation. *Adv Bot Res* 33:159-223.
- Hayashi, S., Ochi O., Ogino, H., Kawasumi, A., Kamei, H., Tamura, T, Yokoyama, T. (2014). Transcriptional regulators in the Hippo signaling pathway control organ growth in *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Developmental Biology*, 396: 31–41.
- Heath, R.L., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, 125:189–198.
- Holbrook, N. M., Putz F. E. (1996) From epiphyte to tree: differences in leaf structure and leaf water relations associated with the transition in growth form in eight species of hemiepiphytes. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1996.tb00398.x
- Hussein, M.M., Balbaa, L.K., Gaballah, M.S. (2007). Salicylic Acid and Salinity Effects on Growth of Maize Plants. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3: 321-328.
- Hwang, Y.H., Morris, J.T. (1994) Whole-plant gas-exchange responses of *Spartina alterniflora* (Poaceae) to a range of constant and transient salinities. *Am. J. Bot.* 81: 659–665.
- ICID (2009) International commission on irrigation and drainage in agriculture. Available from http://www.icid.org/imp_data.pdf.
- Jia-Kang-Zhu (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Scie.* 6: 66-71.

- Jacoby, N. L., Taylor, A., Harvey, M. (2011) The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance Richard P. Trends in Plant Science, 16: 614-623.
- Jarvis, A., Davies, W. (1997). Whole-plant ABA flux and the regulation of water loss in *Cedrella odorata*. Plant Cell Environ. 20: 521–527.
- Kadenbach, B., Ramzan, R., Wen, L., Vogt, S. (2010). New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. Biochim. Biophys. Acta. 1800: 205–212.
- Kalaji, H. M., Govindjee, Bosa K., Koscielniak J., Zuk-Golaszewska K. (2011). Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO₂ assimilation of two Syrian barley landraces. Environ. Exp. Bot. 73: 64–72.
- Kefu, Z., Hai, F., San, Z., Jie, S. (2003). Study on the salt and drought tolerance of Suaeda salsa and Kalanchoe claigremontiana under isoosmotic salt and water stress. Plant Sci. 165: 837-844.
- Knopová, J., Sobotka, R., Tichý, M., Yu, J., Konik, P., Halada, P., Nixon, P., Komenda, J. (2014). Discovery of a Chlorophyll Binding Protein Complex Involved in the Early Steps of Photosystem II Assembly in Synechocystis. The Plant Cell, 26: 1200–1212.
- Kobayashi J, et al. (2015) Crystal structure of the karyopherin Kap121p bound to the extreme C-terminus of the protein phosphatase Cdc14p. *Biochem Biophys Res Commun* 463:309-14.
- Koca, H., M. Bor., F. Ozdemir and I. Turkan. (2007). The effects of stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. Environ. Exp. Bot., 60: 344-351.
- Kohler, B., Blatt, M.R. (2002) Plant J 32: 185–194.
- Kong, J. (2015). Phenylalanine ammonia-lyase, a key component used for phenylpropanoids production by metabolic engineering RSC Adv.5: 62587-62603.
- Kopyra, M., Gwózdz, E. A. (2003) Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus* Plant Physiology and Biochemistry 41: 1011–1017.
- Koyro, H.W. (2006). Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* L. Environmental and Experimental Botany 56: 136–146.
- Koyro, H.W., Hussain, T., Huchzermeyer, B., Khan M.A. (2013). Photosynthetic and growth responses of a perennial halophytic grass *Panicum turgidum* to increasing NaCl concentrations. Environ. Exp. Bot., 91: 22-29.
- Larkindale, J., Knight, M.R. (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. Plant Physiol 128: 682–695.

- Leterrier, M., Airaki, M., Palma, J.M., Chaki, M., Barroso, J.B., Corpas, F.J. (2012). Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*. *Environmental Pollution*, 166:136-143.
- Lee, K. H., Piao, H. L., Kim, H. Y., Choi, S. M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J. M. (2006) Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126:1109–1120.
- Lee, S., Park, C. M. (2010). Modulation of reactive oxygen species by salicylic acid in *Arabidopsis* seed germination under high salinity. *Plant Signal. Behav.* 5 1534–1536.
- Lin, C., Kao, H. (2001). Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regulation* 30: 151–155.
- Llanes, A. (2010) Indicadores fisiológicos y moleculares de la tolerancia a salinidad en *Prosopis strombulifera*. Su correlación con los niveles endógenos de ABA. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Llanes, A., Bertazza, G., Palacio, G., Luna, V. (2013) Different sodium salts cause different solute accumulation in the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Plant Biol.* 15: 118-125.
- Llanes, A., Masciarelli, O., Ordoñez, R., Isla, M.I., Luna, V. (2014). Differential growth responses to sodium salts involve different ABA catabolism and transport in the halophyte *Prosopis strombulifera*” *Biologia Plantarum* 58: 80-88.
- Long, S.P., Humphries, S., Falkowski, P.G. (1994). Photoinhibition of photosynthesis in nature, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 19: 1083-1090.
- Longenberger, P.S., Smith, C.W., Duke, S.E., McMichael, B.L. (2009) Evaluation of chlorophyll fluorescence as a tool for the identification of drought tolerance in upland cotton. *Euphytica* 166: 25-33.
- Lopez-Carrion, A.I., Castellano, R., Rosales, M.A., Ruiz, J.M., Romero, L. (2008). Role of nitric oxide under saline stress: implications on proline metabolism. *Biologia Plantarum* 52: 587–591.
- Lozano-Juste, J., León, J. (2010). Enhanced abscisic acid-mediated responses in *nia1nia2noa1-2* triple mutant impaired in *nia/nr-* and *atnoa1*-dependent nitric oxide biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 152:891-903.
- Lu, C., Vonshakb, C. (2002) Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiol. Plantarum* 114: 405–413.
- Lucena, C., Waters, B.M., Romera, F.J., García, M.J., Morales, M., Alcántara, E., Pérez-Vicente, R. (2006) Ethylene could influence ferric reductase, iron transporter, and H⁺-ATPase gene expression by affecting FER (or FER-like) gene activity. *Journal of Experimental Botany*, 57:4145-4154.

- Maathuis, F.J.M., Amtmann, A. (1999). K^+ nutrition and Na^+ toxicity: the basis of cellular K^+/Na^+ ratios. *Annals of Botany* 84: 123–133.
- Maathuis, F.J.M., Sanders, D. (1996) Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiol Plant* 96: 158-168.
- Macri, F., Vianello, A., Pennazio, S. (1986) Salicylate-collapsed plumbaginifolia (L.) membrane potential in pea stem mitochondria. *Physiol Plant* 67:136–140.
- Mckinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal Biology Chemistry* 140: 315-322.
- Mahi, Z., Dedaldechamp, F., Maurousse, L., Lemoine, R., Belkhodja, M. (2015). Study of Lipid peroxidation (MDA) and antioxidative Activity (POD) In Two halophyte: *Atriplex halimus* L. and *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt under Salt Effect. *Inter. J. of Innovation and Applied Studies*, 10: 450-458.
- Maggio, A., Raimondi, G., Martino, A., De Pascale, S. (2007). Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environ. Exp. Bot.* 59: 276–282.
- Malagoli, P. et al. (2008) Futile Na^+ cycling at the root plasma membrane in rice (*Oryza sativa* L.): kinetics, energetics, and relationship to salinity tolerance. *J. Exp. Bot.* 59: 4109–4117.
- Manai, J., Gouia, H., Corpas, F.J. 2014. Redox and nitric oxide homeostasis is affected in tomato (*Solanum lycopersicum*) roots under salinity-induced oxidative stress. *Journal Plant Physiology*. 171: 1028-1035.
- Manchanda, G., Garg, N. (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiol. Plant*, 30: 595-618.
- Mansour, M.M.F., K.H.A. Salama, F.Z.M. Ali, and A.F.A. Hadid. (2005). Cell and plant responses to NaCl in *Zea mays* L. cultivars differing in salt tolerance. *Gen. Appl. Plant Physiol.*, 31: 29-41.
- Matilla AJ, Matilla-Vázquez MA (2014) Ethylene: Role in Plants Under Environmental Stress. In: *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment*, P. Ahmad and M.R. Wani (eds.). DOI 10.1007/978-1-4614-8600-8_7.
- Matilla AJ, Matilla-Vázquez MA (2008) Involvement of ethylene in seed physiology. *Plant Sci* 175:87–97
- Maxwell, K., Johnson, M. (2000). Chlorophyll fluorescence, a practical guide. *J. Exp. Botany* 51: 659-668.
- Meloni, D., Oliva, M.A, Ruiz, H.A., Martinez, C.A. (2001) Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress, *J. Plant Nutr.* 24: 599–612.
- Melotto, W., Underwood, J., Koczan, K., Nomura, S.Y. (2006) *He Cell*.

- Misra, N., Saxena, P. (2009) Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. *Plant Science* 177: 181–189.
- Misra, N., Gupta, A. (2005) Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram, *Plant Sci.* 169: 331–339.
- Moharekar, S.T., Lokhande, S.D., Hara, T., Tanaka, R., Tanaka, A., Chavan, P.D. (2003). Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings. *Photosynthetica* 41: 315-317.
- Moon, B.Y., Higashi, S.I., Gombos, Z., Murata, N. (1995) Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants, *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 92: 6219–6223.
- Mulholland, B.J., Taylor, I.B., Jackson, A.C., Thompson, A.J. (2003) Can ABA mediate responses of salinity stressed tomato? *Environmental and Experimental Botany* 50: 17-28.
- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239–250.
- Munns, R., Tester M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Ann Rev Plant Biology* 59:651–681.
- Myles B. (2003). Photosystems I and II. <https://www.tamu.edu/faculty/bmiles/lectures/photosystems.pdf>.
- Nawaz, K., Hussain, A. Majeed, F. Khan, S. Afghan and K. Ali. 2010. Fatality of salt stress to plants: morphological, physiological and biochemical aspects. *Afr. J. Biotechnol.*, 9: 5475-5480.
- Neue, H. U., EI-Naggar, M. A., Rashid, M. (1990) Responses and tolerance mechanisms of rice to saline soil conditions. *Transactions Vol IV, 14th International Congress of Soil Science, Kyoto, Japan* pp 50-55.
- Netondo, G. W., Onyango, J. C., Beck, E. (2004). Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. *Crop Sci.* 44: 806–811.
- Nicholls, P. (1975). The effect of sulfide on cytochrome aa3. Isosteric and allosteric shifts of the reduced-peak. *Biochim. Biophys. Acta* 396: 24–35.
- Nieves-Cordones, M., Caballero, F., Martínez, V., Rubio, F. (2012). Disruption of the *Arabidopsis thaliana* inward-rectifier K⁺ channel AKT1 improves plant responses to water stress. *Plant Cell Physiol.* 53,: 423–432.
- Obata, T., Kitamoto, H.K., Nakamura, A., Fukuda, A., Tanaka, Y. (2007) Rice shaker potassium channel OsKAT1 confers tolerance to salinity stress on yeast and rice cells. *Plant Physiol* 144:1978-1985.
- O'Donnell, V.B., Freeman, B.A. (2001) Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circulation Res* 88:12–21.

- Olías, R., Eljakaoui, Z., Li, J., De Morales, P. A., Marín-Manzano, M. C., Pardo, J. M., et al. (2009). The plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na^+ between plant organs. *Plant Cell Environ.* 32: 904–91610.
- Pagnussat, G.C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L. (2002). Nitric oxide is required for root organogenesis, *Plant Physiol.* 129: 954–956.
- Pallas, J.A., Paiva, N.L., Lamb, C., Dixon, R.A. (1996). Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* 10: 281–293.
- Palma, F., Lluch, C., Iribarne, C., Garrido, M.J., Tejera García, N. (2009) Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Growth Regul.* 58:307-16.
- Parida, A. K., Das, A. B., Mohanty, P. (2004) Defense potentials to NaCl in mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. *J Plant Physiol.* 161: 531-42.
- Parvaiz, A., S. Satyawati (2008). Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review. *Plant Soil Environ.* 54: 89–99.
- Pasiecznik, N.M., Felker, P., Harris, P.J.C., Harsh, L.N., Cruz, G., Tewari, J.C., Cadoret, K., Maldonado, L.J. *The Prosopis juliflora–Prosopis pallida complex: a monograph.* Coventry, UK: HDRA.
- Passera, C. B. (2000). Fisiología de *Prosopis* spp. In: Actas de la III Reunión Nacional de la Asociación Argentina de *Prosopis*. Mendoza. Argentina.
- Peleg, Z., Blumwald, E. (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol* 14: 290-295.
- Poor, P., Gemes, K., Horva, F., Szepesi, A., Simon, M. L., Tari, I. (2010) Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with stomatal response, CO_2 fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato, and decreases harmful effects of subsequent salt stress. *Plant Biol.* Doi 10.1111/j.1438-8677.
- Puntarulo, S., Jasid, S., Boveris, A., Simontacchi, M. (2010) Electron paramagnetic resonance as a tool to study nitric oxide generation in plants. In: Hayat S, Mori M, Pitchel J, Ahmad A (eds) *Nitric Oxide in Plant Physiology.* Wiley-Blackwell, New York, 17–29.
- Quiles, M.J., López, N.I. (2004) Photoinhibition of photosystems I and II induced by
- Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P., Watkins, C.B. (1997) Influence of salicylic acid on H_2O_2 production, oxidative stress and H_2O_2 -metabolizing enzymes. *Plant Physiol.* 115:137-149.

- Rasmusson, A.G., Soole, K.L., Elthon, T.E. (2004) Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu Rev Plant Biol* 55: 23–39.
- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A., Grill, E. (2010) ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci* 15:395–401.
- Rejeb, K., Abdely C., Savouré, A. (2014) How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry* 80:278e284.
- Reginato, M., Sosa, L., Llanes, A., Hampp, E., Vettorazzi, N., Reinoso, H., Luna, V. (2014a). Na₂SO₄ and NaCl determine different growth responses and ion accumulation in the halophytic legume *Prosopis strombulifera*. *Plant Biology* (IF: 2.4). DOI 10.1007/s10535-013-0365-6.
- Reginato, M., Castagna, A., Furlan, A., Ranieri, A., Luna, V. (2014b) Physiological responses of a halophytic shrub to salt stress by Na₂SO₄ and NaCl: oxidative damage and the role of polyphenols in antioxidant protection. *Annals of Botany*. doi: 10.1093/aobpla/plu042.
- Reginato, M., Reinoso H., Llanes, A., Luna, V. (2014c). Stomatal abundance and distribution in *P. strombulifera* plants growing under different isoosmotic salt treatments. *American Journal of Plant Sciences*, 4: 80-90.
- Reinoso, H., Sosa, L., Ramirez, L., Luna, V. (2004) Salt-induced changes in the vegetative anatomy of *Prosopis strombulifera* (Leguminosae). *Canadian J. of Botany* 82:618- 628.
- Reinoso, H., Sosa, L., Reginato, M., Luna, V. (2005) Histological alterations induced by sodium sulfate in the vegetative anatomy of *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth. *World J of Agricultural Sci* 2:109-119.
- Rengasamy, P. (2006) World salinization with emphasis on Australia. *J. Exp. Bot.* 57: 1017–1023.
- Reynolds, M.P., Pellegrineschi, A., Skovmand, B. (2005). Sink limitation to yield and biomass: a summary of some investigations in spring wheat. *Ann. Appl. Biol.*, 146: 39-49.
- Rezaei Nejad, A., Van Meeteren, U. (2008) Dynamics of adaptation of stomatal behaviour to moderate or high relative air humidity in *Tradescantia virginiana*. *J Exp Bot* 59:289–301.
- Rhodes, D., Hanson, A. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 357–384.
- Rosenqvist, E., van Kooten, O. (2003). Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature. In: DeEll, J., Toivonen, P. (Eds.), *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Kluwer Academic Publishers, USA, pp. 32–77.
- Ruan, H.H., Shen, W.B., Ye, M.B., Xu, L.L. (2002). Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damages to wheat (*Triticum aestivum*) leaves. *Chin Sci Bull*, 47:677–681.
- Rubbo, H., Radi, R. (2008) Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochim Biophys Acta Gen Sub* 1780:1318–1324.

- Rzedowsky, J. (1988) Análisis de la distribución del complejo *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae) en Norteamérica. *Acta Bot. Mex.* 3: 7-19.
- Sachs, T. (2005) Auxin's role as an example of the mechanisms of shoot/root relations. *Plant and Soil*, 268:13-19.
- Sakhabutdinova, A. R., Fatkhutdinova, D. R., Bezrukova, M. V., Shakirova, F. M. (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science* 164: 317-322.
- Schmidt, A. (2005). Metabolic background of H₂S release from plants. In: *Landbauforschung Völkenrode, Special Issue* 283.
- Schertl, P., Braun, H. P. (2014). Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria. *Front Plant Sci.* 5: 163.
- Schwartz, S.H., Qin, X., Zeevaart, J.A.D. (2003) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiol* 131: 1591-1601.
- Shabala, S., Mackay, A. (2011) Ion transport in Halophytes. *Ad. In Bot Research.* 57: 151-199.
- Shabala, S., Munns, R. (2012) Salinity Stress: Physiological Constrains and Adaptive Mechanisms. In: *Plant Stress Physiology*, 59-93.
- Shaddad, M.A., Hamdia, M.A., Doaa, M. M. (2006) Interaction effect of salinity and GA₃ on growth, K⁺ /Na⁺ ratio, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in two wheat cultivars. *Assiut University J of Botany* 35:251-266.
- Shakirova, F.M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R. A., Fatkhutdinova, D. R. (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science* 164:317-322.
- Sharp, R.E., LeNoble, M.E. (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany* 53: 33–37.
- Shannon, M.C., Grieve, C.M. (1999). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae* 78: 5-38.
- Shi, Q, Ding, F., Wang, X., Wei, M. (2007). Exogenous nitric oxide protects cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 45: 542-550.
- Shinopoulos, K.E., Brudvig, G.W. (2012). Cytochrome b₅₅₉ and cyclic electron transfer within photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 1817:66-75.
- Siegel, R.S., Xue, S., Murata, Y., Yang, Y., Nishimura, N., Wang, A., Schroeder, J.I. (2009) Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K⁺ channels in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J*, 59:207–220.

- Sieger, S.M., Kristensen, B.K., Robson, C.A., Amirsadeghi, S., Abdel-Mesih, A., et al. (2005) The role of alternative oxidase in modulating carbon use efficiency and growth during macronutrient stress in tobacco cells. *J. Exp. Bot.* 56: 1499–1515.
- Simaei, M., Khavarinejad, R.A., Saadatmand, S., Bernard, F., Fahimi, H. (2011). Interactive effects of salicylic acid and nitric oxide on soybean plants under NaCl salinity. *Russ J Plant Physiol.* 58:783–790.
- Silva-Robledo, H., Ortiz-Lizana, M., Acevedo-Hinojosa, E. (2007). Relaciones hídricas y ajuste osmótico en trigo. *Agrociencia* 41:23-34.
- Slama, I., Ben Rejeb, K, Rouached, A., Jdey, A., Rabhi, M, Talbi, O., Debez, A., Savouré, A., Abdelly, C. (2014). Presence of proline in salinized nutrient solution re-enforces the role of this amino acid in osmoregulation and protects lipid membrane peroxidation in *Arabidopsis thaliana*. *AJCS* 8:1367-1372.
- Sohn, H.Y., Murray, D.B., Kuriyama, H. (2000) Ultradian oscillation of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic continuous culture: hydrogen sulphide mediates population synchrony. *Yeast* 16:1185-1190.
- Sosa, L, Llanes, A, Reinoso, H, Reginato, M, Luna, V (2005) Osmotic and Specific Ion Effects on the Germination of *Prosopis strombulifera*. *Annals of Botany* 96: 261-267.
- Spollen, W.G., LeNoble, M.E., Sanmels, T.D., Bernstein, N., and Sharp, R.E. (2000). Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiol.* 122: 967–976.
- Srivastava, M.K., Dwivedi U.N. (2000) Delaying ripening of banana fruits by salicylic acid. *Plant Sci.*, 158: 87-96.
- Szepesi, A., Csiszar, J., Gemes, K., Horvath, E., Horvath, F., Simon, M. L., Tari, I. (2009) Salicylic acid improves acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na⁺ content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *J of Plant Physiol.* 166: 914-925.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2010). *Plant physiology* (4th ed.). Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates Inc.
- Tan, B. C., Joseph, L. M., Deng, W. T., Liu, L. J., Li, Q. B., Cline, K., McCarty, D. R. (2003) Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J* 35:44–56.
- Tanou, G., Job, C., Rajjou, L., Arc, E., Belghazi, M., Diamantidis, G., Molassiotis, A. (2009) Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *Plant J* 60: 795–804.

- Terrile, M.C., París, R., CalderónVillalobos, L.I., Iglesias, M.J., Lamattina, L., Estelle, M.,Casalongué, C.A. (2012) Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the Arabidopsis TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. *Plant J* 70: 492–500.
- Tester M., Davenport R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503–527.
- Tipirdamaz, R., Gagneul, D., Duhazé, C., Aïnouche, A., Monnier, C., Ozkum, D. and Larher, F.R. (2006) Clustering of halophytes from an inland salt marsh in Turkey according to their ability to accumulate sodium and nitrogenous osmolytes. *Environ. Exp. Bot.* 57:139–153.
- Trovato, M., Mattioli, R., Costantino, P. (2008). Multiple Roles of Proline in Plant Stress Tolerance and Development. *Rendiconti Lincei* 19: 325 – 346.
- Turan, M., and Aydin, A. (2005). Effects of different salt sources on growth, inorganic ions and proline accumulation in corn (*Zea Mays* L). *Eur. J. Hortic. Sci.* 70: 149-155.
- Turkan, I., Demiral, T. (2009). Recent developments in understanding salinity tolerance. *Envir. And Exper. Bot.* 67: 2-9.
- Uzunova, A.N., Popova, L.P. (2000). Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Photosynthetica* 38: 243–250.
- Vahala, J., Ruonala, R., Keinänen, M., Tuominen, H., Kangasjärvi, J. (2003). Ethylene insensitivity modulates ozone-induced cell death in birch (*Betula pendula*) *Plant Physiol.*132:185–195.
- Vandelle, E., Delledonne, M. (2011). Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Science*, 181:534-539.
- Van der Merwe, M.J., Osorio, S., Moritz, T., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R. (2009). Decreased mitochondrial activities of malate dehydrogenase and fumarase in tomato lead to altered root growth and architecture via diverse mechanisms. *Plant Physiol.* 149: 653–669.
- Vernon, L.P. (1960). Spectrophotometric determination of chlorophylls and phaeophytins in plant extracts. *Annals Chemistry* 32: 1144-1150.
- Vicente, M. J., Conesa, E., Álvarez-Rogel, J., Franco, J. A., Martínez Sanchez, J. J. (2007). Effects of various salts on the germination of three perennial salt marsh species. *Aquatic Botany*, 87: 167–170.
- Vinocur, B., Altman, A., (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Plant Science* 16: 1–10.
- Vogelmann K. , Drechsel, G., Bergler, J., Subert, C., Philippar, C., Soll, J., Engelmann, J., Engelsdorf, T., Voll, L., Hoth, S. (Early Senescence and Cell Death in Arabidopsis saul1 Mutants Involves the PAD4-Dependent Salicylic Acid Pathway1[W][OA]. *Plant Physiology*, 159: 1477–148.

- Volkov, I., Banavar, J.R., Hubbell, S.P. & Maritan, A. (2003). Neutral theory and relative species abundance in ecology. *Nature*, 424: 1035–1037.
- Vicente, R. (2007) Ethylene involvement in the regulation of the H⁺-ATPase CsHA1 gene and of the new isolated ferric reductase CsFRO1 and iron transporter CsIRT1 genes in cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45:293-301.
- Wang, H., Liang, X., Wan, O., Wang, X., Bi, Y. (2009) Ethylene and nitric oxide are involved in maintaining ion homeostasis in *Arabidopsis* callus under salt stress. *Planta* 230:293–307.
- Waters, B.M., Lucena, C., Romera, F.J., Jester, G.G., Wynn, A.N., Rojas, C.L., Alcántara, E., Pérez-Weisany, W., Sohrabi, Y., Heidari, G., Siosemardeh, A., Golezani, G. (2012). Changes in antioxidant enzymes activity and plant performance by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine max* L.) *POJ* 5: 60-67.
- Wilkinson, S., Davies, W.J. (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant Cell Environ* 33: 510-525.
- Woodward, A.W., Bartel, B. (2004) Auxin: Regulation, Action, and Interaction *Annals of Botany* 95: 707-735.
- Wingler, A., Brownhill, E., Pourtau, N. (2005). Mechanisms of the light-dependent induction of cell death in tobacco plants with delayed senescence. *Journal of Experimental Botany* 56: 2897–2905.
- Wu, X., Ding, H. D., Chen, J. L., Zhang, H. J., Zhu, W. M. (2010). Attenuation of salt-induced changes in photosynthesis by exogenous nitric oxide in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. L.) seedlings. *African Journal of Biotechnology* 9: 7837-7846.
- Xu, X., Tian, S. (2008) Salicylic acid alleviated pathogen-induced oxidative stress in harvested sweet cherry fruit. *Postharvest Biol. and Tech.* 49:379–385.
- Yalpani, N., Leôn, J., Lawton, M.A., and Raskin, I. (1993). Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* 103: 315–321.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett*, 468:89–92.
- Yang, C., Zhong, Wei, Z., Li Wei, X., Jun Bo, D., Jing S, Fei X, Shu Y, Hong Hui, L. (2009) Lack of salicylic acid in *Arabidopsis* protects plants against moderate salt stress, *Biosciences* 64:231-238.
- Yeo, A.R. (1983) Salinity resistance physiologies and prices. *Physiol. Plant.* 58: 214–222.
- Yusuf, M., Hasan, A., Ali, B., Hayat, S, Fariduddin, D., Ahmad, A. (2008) Effect of Salicylic Acid on Salinity-induced Changes in *Brassica juncea*. *J. of Integrative Plant Biology.* 50: 1096–1102.

- Zapata, P.J., M. Serrano, M.T. Pretel, A. Amoros and M. A. Botella. (2004). Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. *Plant Sci.*, 167: 781-788.
- Zhang, J., Jia, W., Yang, J., Ismail, A.M. (2006) Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stress. *Field Crop Res* 97:111-119.
- Zhang, Y.Y., Wang, L.L., Liu, Y.L., Zhang, Q., Wei, Q.P., Zhang, W.H. (2006) Nitric Oxide Enhances Salt Tolerance in Maize Seedlings through Increasing Activities of Proton Pump and Na⁺/H⁺ Antiport in the Tonoplast, *Planta*, 224: 545–555.
- Zhang, H., Han, W., De Smet, I., Talboys, P., Loya, R., Hassan, A., Rong, H., Jürgens, G., Paul Knox, J., Wang, M.H. (2010). ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the *Arabidopsis* primary root meristem. *Plant J.* 64: 764–774.
- Zhao, M.G., Tian, Q.Y., Zhang, W.H. (2007) Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 144:206–217.
- Zhifang, G., Loescher, W.H. (2003) Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer. *Plant Cell Environ.* 26: 275-283.
- Zhou, Y.C., Zheng, R.L. (1991). Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. *Biochem Pharmacol*, 42:1177-9.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 53:247-73.