

# PROYECTO FINAL DE INVESTIGACION

## ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SALINIDAD EN LA GERMINACION Y FLORACIÓN DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

**Pirola, María Julieta – LU 1048463**

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Cámara, María de los Milagros. UADE**

Co-Tutor:

**Rosito, Pablo José. UADE**

**Marzo 19, 2018**



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

*"si les conquêtes utiles à l'humanité touchent votre cœur, si vous restez confondu devant les effets surprenants de la télégraphie électrique, du daguerréotype, de l'anesthésie et de tant d'autres découvertes admirables; si vous êtes jaloux de la part que votre pays peut revendiquer dans l'épanouissement de ces merveilles, prenez intérêt, je vous en conjure, à ces demeures sacrées que l'on désigne du nom expressif de laboratoires. Demandez qu'on les multiplie et qu'on les orne: ce sont les temples de l'avenir, de la richesse et du bien-être. C'est là que l'humanité grandit, se fortifie et devient meilleure. Elle y apprend à lire dans les œuvres de la nature, œuvres de progrès et d'harmonie universelle, tandis que ses œuvres à elle sont trop souvent celles de la barbarie, du fanatisme et de la destruction"*

M. L. PASTEUR. *Le Moniteur Universel*, mois de janvier, 1968.

*LE BUDGET DE LA SCIENCE, 1868, PARIS, GAUTHIER-VILLARS, IMPRIMEUR-LIBRAIRE, Quai des Augustins, 55.*

"Si os conmueven las conquistas útiles a la humanidad, si quedáis maravillados ante los sorprendentes resultados de la telegrafía eléctrica, del daguerrotipo, de la anestesia y de tantos otros inventos admirables, si estáis celosos de la participación de vuestro país en el acrecentamiento de maravillas, interesaos, os lo ruego encarecidamente por las sagradas mansiones designadas con el expresivo nombre de *Laboratorio*. Pedid que sean mas numerosos y estén mejor provistos, pues son los templos del porvenir, de la riqueza y del bienestar. Con sus servicios, la humanidad prospera, mejora y aprende a conocer la naturaleza, cuyas obras armoniosas difieren de las humanas en que no son obras de barbarie, de fanatismo o de destrucción"

<b>Indice.....</b>	<b>3</b>
Lugar de trabajo.....	4
Agradecimientos.....	5
Abreviaturas.....	6
Resumen.....	9
Abstract.....	10
Antecedentes.....	11
Objetivos del trabajo.....	34
Materiales y métodos.....	35
Resultados.....	43
Discusión .....	64
Conclusiones.....	70
Bibliografía.....	71
Anexo.....	85

**Lugar de trabajo:**

El presente Proyecto Final de Investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Argentina de la Empresa (UADE), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina durante el período 2016-2018.

## **Agradecimientos**

A la Dra. María de los Milagros Cámara e Ing. Pablo J. Rosito por la tutoría, dirección, consejos y ayuda en todo el desarrollo del Proyecto Final de Investigación.

A los técnicos Guillermina Zola, José Ignacio Fernández, Pablo Viecenz y Natalia Pereyra por su ayuda con los materiales necesarios para la realización del presente Proyecto Final de Investigación.

A mis compañeros de estudio Franscina Casella, Micaela Canelo, Federico Espinosa y Santiago Iruretagoyena por sus consejos relativos al crecimiento, cuidado y toma de imágenes de las plantas y por los suministros de semillas.

Al Prof. Dr. Carlos Ballaré (IFEVA-Conicet) por la provisión de semillas.

A la Tec. Marcela Alvarez por su ayuda en los cortes histológicos.

## Abreviaturas y Glosario

ABA (ácido abscísico): fitohormona que participa en procesos de crecimiento y desarrollo, como también en la respuesta a estrés biótico y abiótico.

ANOVA: análisis de la varianza.

APX (ascorbato peroxidasa): enzima que cataliza la oxidación de ascorbato dependiente de peróxido de hidrógeno en plantas, algas y ciertas cianobacterias.

$C_2O_4^{2-}$ : anión oxalato.

$H_2C_2O_4$ : ácido oxálico.

C3 (vía de 3 carbonos): vía metabólica para la fijación del carbono en la fotosíntesis en la mayoría de las plantas.

C4 (vía de 4 carbonos): serie de reacciones bioquímicas de fijación del dióxido de carbono atmosférico. Sirve para evitar que RuBisCO fije oxígeno en vez de dióxido de carbono en el proceso de fotorrespiración, el cual desperdicia energía. Esto se logra asegurando que RuBisCO funcione en un ambiente rico en dióxido de carbono y pobre en oxígeno.

CAM (Crassulacean acid metabolism, metabolismo ácido de las crasuláceas): metabolismo especial de diferentes tipos de plantas. Mientras que la mayoría de las plantas absorben y fijan el dióxido de carbono durante el día, en las plantas CAM las dos están separadas en cuanto al tiempo.

$Ca^{2+}$  : catión calcio.

$Cl^-$ : anión cloruro.

$CO_2$ : dióxido de carbono.

CoA: coenzima A.

DDT: días después del trasplante a tierra.

dS/m: deciSiemens por metro.

GR (glutación reductasa): enzima que cataliza la reducción del disulfuro de glutación a glutación en su forma sulfhidrilo.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno.

H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: ácido oxálico.

ha: hectárea.

hs.: horas.

IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato): segundo mensajero de la transducción de señal celular producido por la hidrólisis de PIP2 catalizada por la fosfolipasa C. Su efecto en el entorno celular es la movilización de los depósitos de Ca<sup>2+</sup>.

K<sup>+</sup>: catión potasio.

mM: milimolar.

mmhos: milimhos, nombre alternativo que designa a los miliSiemens.

mEq: miliequivalente

MSA: Murashige-Skoog agarizado (medio de cultivo para plantas).

Na<sup>+</sup>: catión sodio.

nM: nanomolar.

$\text{NO}^{2-}$ : anión nitrito.

NPR1 (non-expresser of pathogenesis-related gene1, no expresor del gen relacionado con patogénesis 1): co-activador transcripcional y regulador central de la resistencia adquirida sistémica y de la activación de genes dependientes de ácido salicílico.

$\text{O}_2$ : oxígeno molecular.

PIP2 (fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato): componente fosfolipídico menor de las membranas celulares, sustrato de proteínas de señalización.

RuBisCO (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa): enzima involucrada en el primer paso de la fijación del carbono, proceso por el cual el  $\text{CO}_2$  es convertido por las plantas en moléculas ricas en energía como la glucosa.

RuBP (ribulosa-1,5-bifosfato): sustrato implicado en la fijación del carbono durante la fotosíntesis cuya carboxilación es catalizada por RuBisCO.

SA (salicylic acid, ácido salicílico): fitohormona que cumple funciones en la fotosíntesis, transpiración, crecimiento, desarrollo, captación y transporte de iones.

SOS (salt overly sensitive, demasiado sensible a la sal): vía que media la homeostasis iónica en *Arabidopsis*.

SOD (superóxido dismutasa): enzima que cataliza la partición del superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) en  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

$\mu\text{M}$ : micromolar.



## Resumen

La salinidad en el suelo, causada tanto naturalmente como por la actividad humana es un problema de importancia creciente alrededor del mundo. Se estudió la germinación de *Arabidopsis thaliana* sometida a diferentes concentraciones de NaCl. Además se evaluó el efecto de la irrigación con NaCl, CaCl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> sobre la floración. Los resultados revelaron que el tratamiento con NaCl produjo una disminución en la mayoría de los parámetros asociados a la germinación a partir de 100 mM. Asimismo se encontró que el riego con solución 150 µM NaCl+ 10 mM H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> hizo aumentar el número de hojas en la roseta respecto al riego con agua destilada y que el tratamiento con 150 µM NaCl+ 20 H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> originó plantas con menos hojas en la roseta que las expuestas a 150 µM NaCl. Adicionalmente se observó que las soluciones de NaCl mM y de 50 mM NaCl+ 10 mM CaCl<sub>2</sub> aceleraron la senescencia. Estos hallazgos contribuyen a la comprensión de la respuesta vegetal al estrés salino y a la búsqueda de posibles soluciones a la salinidad, tanto a nivel de la planta como del suelo. La metodología empleada puede aplicarse a estudios ecofisiológicos o de fenotipificación de ecotipos, variedades seleccionadas o genéticamente modificadas como así también a otras especies de relevancia agrícola.

## Abstract

Soil salinity, both due to natural causes and human activity is a problem of growing importance throughout the world. We studied germination of *Arabidopsis thaliana* subjected to different NaCl concentrations in plate assays and the effects of irrigation with NaCl, CaCl<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> solutions on flowering. Results revealed that NaCl treatment produced a decrease in most parameters associated to germination from 100 mM. Furthermore it was found that watering with 150 μM NaCl + 10 mM H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> elicited an increase in rosette leaf number compared to watering with distilled water and that treatment with 150 μM NaCl + 20 H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> originated plants with less rosette leaves than those exposed to 150 μM NaCl. Additionally it was observed that NaCl mM and 50 mM NaCl + 10 mM CaCl<sub>2</sub> solutions accelerated senescence. These findings contribute to understanding plant response to saline stress and to the search for possible solutions to salinity, both at plant and soil levels. The methodology used can be applied to ecophysiological studies or phenotypification of selected or genetically modified varieties, as well as to other species of agricultural relevance.

## Antecedentes

### El suelo salino

Se entiende por suelo salino a aquel que contiene un exceso de iones de sales solubles tales como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  o  $\text{HCO}_3^-$  que puede tener efectos deletéreos en el crecimiento vegetal. La salinidad se expresa frecuentemente en unidades de concentración de sales (ej: mM) y de conductividad eléctrica del extracto de suelo (dS/m) o de resistividad eléctrica (mmhos/cm). La conductividad eléctrica mide la capacidad de una corriente eléctrica para pasar a través de un material y la resistividad eléctrica cuantifica la fuerza con la que el material se opone al flujo de corriente.

El Laboratorio de Salinidad de los Estados Unidos define suelo salino como aquel cuya conductividad eléctrica (EC) del extracto de saturación (esto es, la solución extraída de un suelo saturado en agua) supera los 4 dS/m (equivalente a cerca de 45 mM NaCl) (Corwin y col., 2003). La clasificación en tres categorías puede observarse en la TABLA I.

**TABLA I: Clasificación de los suelos en base a la salinidad.**

<b>Tipos de Salinidad</b>	<b>Características</b>
Salinos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\text{Na}^+</math> incrementa la presión osmótica.</li> <li>- Iones más comunes: <math>\text{Cl}^-</math>, <math>\text{NO}_3^-</math>, <math>\text{SO}_4^{2-}</math>, <math>\text{HCO}_3^-</math></li> <li>- <math>\text{Na}^+</math> excesivo, &lt; 50 % de cationes solubles.</li> <li>- Sensible a la erosión.</li> </ul>
Salino sódicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta concentración de sales solubles.</li> <li>- Alto porcentaje de <math>\text{Na}^+</math> intercambiable.</li> <li>- Lixiviación (extracción) de las sales por lluvia o agua vertida.</li> </ul>
Sódicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\text{Na}^+</math> en exceso.</li> <li>- <math>\text{Ca}^{2+}</math> y <math>\text{Mg}^{2+}</math> en menor medida.</li> <li>- Tendencia de las partículas de arcilla a separarse.</li> <li>- Bajas tasas de infiltración.</li> <li>- Poca aireación.</li> </ul>

*Tabla I: Clasificación de los suelos en base a la salinidad y características mas relevantes de cada tipo. Fuente: Martínez, 2007; Wiesman, 2009.*

Estas diferencias en la composición y concentración iónica de los tres 3 tipos de suelos se determinan midiendo la conductividad eléctrica de todos los iones disueltos en agua y la cantidad de Sodio adsorbido por las partículas del suelo, denominada el porcentaje de sodio intercambiable (PSI):

$$\text{PSI} = \text{Na}^+ \text{ intercambiable (mEq/100g de suelo)} / \text{CIC (mEq/100g de suelo)}.$$

(cantidad de sodio en relación al número de cationes por peso seco que el suelo puede intercambiar con la solución acuosa) (U.S. Salinity Laboratory Staff, 2006). La capacidad de intercambio iónico (CIC) es el número de cationes por peso seco que el suelo puede intercambiar con la solución acuosa.

Dado que la medición de PSI no siempre es factible, conocida o aplicada, muchos laboratorios utilizan la RAS (relación absorción Sodio) como índice o indicador de la salinidad del suelo:

$$\text{RAS: } \text{Na}^+ / ((\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})/2)^2 \text{ (concentraciones en mEq/l)}.$$

Esta clasificación puede observarse en la TABLA II.

**TABLA II: Clasificación de los suelos según CE, PSI y pH.**

Tipo de suelo	CE (dS/m)	PSI	pH
Salino	> 4	< 15	< 8,5
Salino sódico	> 4	> 15	< 8,5
Sódico	< 4	> 15	> 8,5

*Tabla II: Clasificación de los suelos según parámetros de conductividad y pH. CE: conductividad eléctrica, PSI: porcentaje de sodio intercambiable, pH: logaritmo negativo de la concentración de H<sup>+</sup>. Fuente: Richards, LA, (1954).*

### Efectos de la salinidad

La mayor parte de los vegetales requieren nutrientes minerales para crecer y desarrollarse, pero varían en su capacidad de crecer en medios con alto contenido salino. Es

ampliamente asumido que la salinidad afecta negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas.

La tolerancia a la salinidad suele juzgarse por 3 criterios: a.- la capacidad de supervivencia sobre suelos salinos, b.- las tasas de crecimiento y rendimientos en hábitats salinos y c.- las tasas de crecimiento y rendimientos relativos en comparación con suelos no salinos. Este tercer criterio parece brindar las mejores estimaciones acerca de la tolerancia vegetal a la salinidad (Maas y Grieve; 1987).

De acuerdo a dicha tolerancia las plantas se clasifican en dos grandes grupos: halófitas y glicófitas (Flowers y col.,1977). Las halófitas son tolerantes a grandes proporciones de NaCl, siendo capaces algunas de ellas de soportar hasta el doble de la concentración del agua de mar. Las glicófitas, en cambio, no pueden tolerar medios altamente salinos y presentan estrés abiótico primario (iónico y osmótico) y secundario (oxidativo) como consecuencia de la exposición a altas concentraciones de sal (Zhu, 2001a).

La concentración de  $\text{Na}^+$  extracelular en los mamíferos es de 135-145 mM pero en las plantas glicófitas estas concentraciones son habitualmente tóxicas.

Existen otras clasificaciones (TABLA III) que categorizan a las plantas como tolerantes, moderadamente tolerantes, moderadamente sensibles y sensibles con respecto a su respuesta a la salinidad (Maas y Hoffman,1977). Por ejemplo, la cebada y la remolacha azucarera son consideradas tolerantes por su capacidad de crecer en un rango de salinidad de 6,9 a 8 dS/m (77-88 mM NaCl) sin ninguna pérdida aparente de rendimiento, mientras que la mayor parte de los árboles frutales y la cebolla están dentro del grupo de las sensibles, con umbrales de pérdida de rendimiento de menos de 2 dS/m (22 mM NaCl) (Maas y Hoffman,1977).

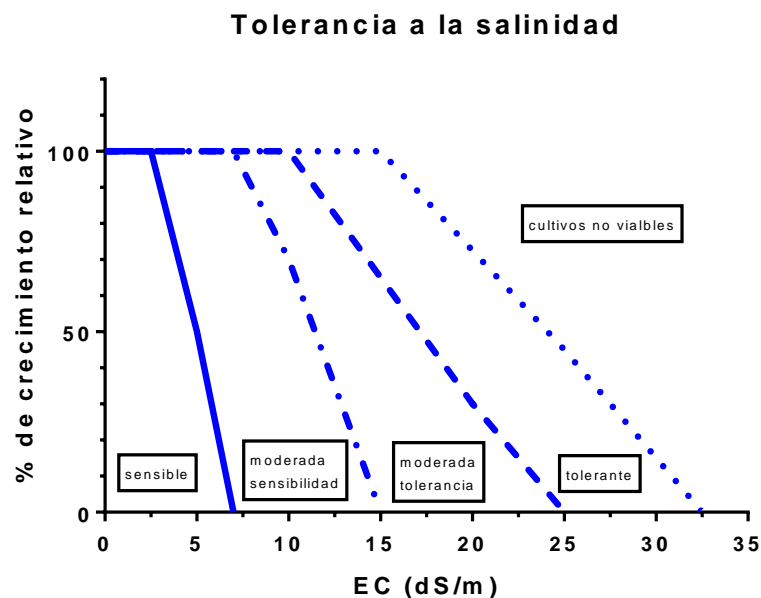
**TABLA III: Clasificación de cultivos comunes según su tolerancia a la salinidad, extractado parcialmente de la cita.**

Tolerante	Moderadamente Tolerante	Moderadamente Sensible	Sensible
Algodón	Brócoli	Alfalfa	Apio
Cebada	Sorgo	Arveja	Damasco
Remolacha	Trigo	Lechuga	Durazno
		Maíz	Limón
		Maní	Manzana
		Pepino	Naranja
		Repollo	Papa
		Soja	Pomelo
			Zanahoria

*Tabla III: Tolerancia de cultivos de importancia económica a la salinidad*

*Fuente: adaptado de Brady, N. (1990).*

En la Figura 1 se puede observar en términos relativos de rendimiento de la producción la influencia que posee la salinidad para varios cultivos.



**Figura 1: Comportamiento de los cultivos en función de la salinidad.**

*Fuente: <http://www.fao.org/docrep/w7224e/w7224e08.htm>. (adaptado).*

Estas diferencias están relacionadas con la evolución de las plantas según su hábitat, a lo largo del tiempo han adquirido o perdido los mecanismos relacionados con la tolerancia a

la salinidad. En términos generales y considerando los extremos, las algas marinas son halófitas y la mayoría de las plantas cultivables son glicófitas. Este último punto es la razón por la cual la salinidad tiene una gran importancia en la agricultura y se requiere el desarrollo de variedades de los principales cultivos que puedan crecer en suelos salinos sin perder su capacidad de producir rendimientos altos. (Attumi, 2007; Athar y Ashraf, 2009).

La tolerancia a la salinidad no solamente varía según la especie sino que también depende de las condiciones de crecimiento del cultivo (Maas, 1986). La temperatura, la composición y concentración de sales, el estadio de crecimiento y el exceso de agua provista durante la irrigación son los principales factores que afectan la tolerancia a la sal de las plantas.

Las plantas expuestas a ambientes salinos encuentran tres desafíos básicos: toxicidad específica de los iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), la necesidad de mantener una presión de turgencia celular (la presión ejercida por el contenido celular contra la pared celular que sostiene a las plantas no leñosas) y la de obtener nutrientes iónicos esenciales ( $\text{K}^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ) pese a la predominancia de otros iones químicamente similares pero potencialmente tóxicos en el medio de crecimiento. (Ayers y Westcot, 1976; Bauder, 2001; Fageria, 1992; Hanson y col., 1999; Rhoades, 1977; USDA, 2002; Western Fertilizer Handbook, 1995).

### **Tolerancia y adaptación a la salinidad**

Con el fin de adaptar la supervivencia a la salinidad y al estrés originado, las plantas han desarrollado evolutivamente una serie de procesos moleculares y bioquímicos ecofisiológicos.

Las halófitas son capaces de eliminar el exceso de sal fisiológicamente, ya sea reemplazando las hojas cargadas de sal por otras nuevas con mayor frecuencia o bien a través de órganos especializados como glándulas o pelos que secreten los excesos salinos (Breckle, 2002). También hay halófitas que poseen hojas o tallos suculentos, cuyas reservas de agua diluyen los iones en exceso. (Tang y col., 2015). A nivel celular las halófitas tienen 3

estrategias principales de adaptación: compartimentalización de iones tóxicos, acumulación de osmolitos y conservación del agua (Bonhert y col., 1995).

La estrategia bioquímica específica para resistir a la salinidad incluye los procesos siguientes:

- Regulación y compartimentalización de iones.
- Biosíntesis inducida de solutos compatibles.
- Inducción de enzimas antioxidantes.
- Inducción de hormonas vegetales.
- Cambios en la ruta fotosintética.

Estas características provienen de ciertos cambios en la expresión genética, mecanismos moleculares y vías de señalización intracelular:

- La vía SOS para la homeostasis iónica.
- La vía kinasa para la señalización del estrés.
- La vía de señalización por fitohormonas bajo alto estrés salino.
- Genes asociados que codifican para proteínas de estrés salino, como genes para enzimas fotosintéticas, síntesis de solutos compatibles, enzimas involucradas en el almacenamiento vacuolar y enzimas removedoras de radicales libres.

### **Solutos compatibles con la salinidad**

Los solutos compatibles son metabolitos acumulados por las plantas como reacción de resistencia a la salinidad. Entre sus funciones están las de incrementar la tolerancia osmótica, mantener un bajo potencial hídrico en las células (Tang y col., 2015) y proteger estructuras celulares (Hasegawa y col., 2000; Parida y Das, 2005). Las altas concentraciones de estos compuestos no perturban la bioquímica intracelular, y su efecto sobre el pH y el balance de cargas en el citosol o el lumen de las organelas es mínimo. (Bohnert y Jensen, 1996). Los solutos compatibles más importantes son la prolina y la glicina betaína. La primera actúa como chaperona molecular para estabilizar la conformación proteica, como tampón del pH citosólico y balanceadora de la condición redox celular. La segunda protege el fotosistema II



(PSII) y la actividad enzimática durante la salinidad, además de mantener la integridad de la membrana.

### **La relación entre el $K^+$ y el $Na^+$**

El  $K^+$  es esencial para la vida vegetal por su rol en la activación de enzimas, el balance de cargas en el citoplasma y la regulación de la presión osmótica (Maathuis y Amtmann, 1999). Debido a su similitud fisicoquímica el  $Na^+$  compite con el  $K^+$  por la unión al sitio activo de las enzimas causando tanto su inactivación como el desorden de la síntesis proteica y del funcionamiento cloroplástico (Plant Stress Physiology; Bose y col., 2017). El  $Na^+$  actúa principalmente a nivel de la lámina de la hoja ya que allí se deposita por medio de la corriente de transpiración. Aunque el  $Cl^-$  es necesario para la regulación de la actividad enzimática y la manutención de gradientes resulta tóxico para las células a altos niveles, pudiendo dañar la clorofila e inhibir el PSII. Por lo tanto resulta fundamental la conservación de una relación  $K^+/Na^+$  alta en el citosol (Jeschke, 1984; Blumwald, 2000). Para ello las plantas pueden excluir el excedente de  $Na^+$  del citosol y acumularlo en vacuolas o impedir la entrada de  $Na^+$  y  $Cl^-$  al captar agua del suelo.

### **Estrés abiótico**

Se define el estrés abiótico como el impacto negativo de factores no vivientes en los organismos que viven en un ambiente específico. El estrés salino es el estrés abiótico más frecuente y es provocado por niveles excesivos de sales, presentando tres componentes:

- a. Estrés osmótico: es una disfunción fisiológica provocada por un cambio repentino en la concentración de solutos alrededor de una célula. En caso de altas concentraciones de soluto en el sobrenadante, el agua sale de la célula por ósmosis lo cual inhibe el transporte de sustratos y otras sustancias esenciales al interior celular. Si las concentraciones de soluto son bajas el agua entra en grandes cantidades a la célula causando su hinchazón y estallido.
- b. Estrés iónico: es la toxicidad causada por una excesiva concentración de ciertos iones, lo cual altera la delicada homeostasis iónica celular. (Tripathi y Müller, 2015). El ion en exceso

puede ingresar por ser esencial para un proceso biológico o debido a la incapacidad de las proteínas transportadoras de discriminar entre iones similares (Millaleo y col., 2010; Pardo y Quintero, 2002). El ingreso excesivo de iones impide la entrada de otros iones o compite con ellos por los sitios activos de enzimas perturbando así los procesos celulares.

c. Estrés oxidativo: consiste en un desequilibrio entre la producción de especies de oxígeno reactivas y antioxidantes (Betteridge, 2000). Las especies de oxígeno reactivas derivan de la modificación del estado de oxidación del oxígeno molecular (Tang y col.; 2015) y son producidas como resultado del metabolismo celular normal y factores ambientales. Como moléculas altamente reactivas pueden oxidar estructuras celulares, dañándolas y alterando sus funciones si se acumulan en forma excesiva. (Birben y col., 2012). En concentraciones bajas a moderadas no afectan los procesos fisiológicos normales porque existen mecanismos de detoxificación.

### **Estrés salino y Sistemas antioxidantes**

Las especies reactivas de oxígeno incluyen al oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ) (Tripathy y Oelmüller, 2012; Birben y col., 2012). Normalmente su producción y eliminación están balanceadas, pero durante el estrés salino falta el agua a causa de los efectos osmóticos de la sal en varias actividades metabólicas (Greenway y Munns, 1980; Cheeseman, 1988). Esto provoca que la velocidad de generación supere a la de desintoxicación y tengan lugar primero el estrés y luego el daño oxidativo. El sistema antioxidante en plantas comprende a las enzimas ascorbato peroxidasa (APX), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT) (Kamiński et al., 2012), así como también a moléculas como ácido ascórbico, glutatión, flavonoides, carotenoides y tocoferoles (Racchi, 2013). APX, SOD y GR contrarrestan el efecto del  $H_2O_2$  en cloroplastos y mitocondrias, y se cree que las otras enzimas son capaces de remover  $H_2O_2$ , neutralizando y contrarrestando los radicales libres. Por su parte, los antioxidantes no enzimáticos ceden electrones o hidrógeno para detoxificar las especies reactivas de oxígeno (Tang y col., 2015).

## **La salinidad y la fotosíntesis**

El estrés inducido por salinidad inhibe la fotosíntesis al reducir el potencial osmótico (Dias de Azevedo Neto y col., 2004). En áreas secas las plantas que usan C3 cierran sus estomas para disminuir la pérdida de agua, pero esto impide el ingreso de CO<sub>2</sub> a las hojas. Esto favorece la fotorrespiración, proceso en el cual la enzima fotosintética RuBisCO oxigena RuBP y causa el desperdicio de parte de la energía producida por la fotosíntesis.

## **El rol del Ca<sup>+2</sup> en la señalización bioquímica**

El estrés osmótico impuesto por NaCl incrementa transitoriamente las concentraciones citosólicas de Ca<sup>+2</sup> e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) además de inducir la biosíntesis de fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP2). Se cree que el aumento de la concentración de IP3 media la movilización de Ca<sup>+2</sup> celular. El Ca<sup>+2</sup> citosólico es traslocado a través de bombas y canales de Ca<sup>+2</sup> en la membrana plasmática, el tonoplasto y el retículo endoplásmico.

## **Las Fitohormonas y el estrés salino**

Las altas concentraciones de sal gatillan un aumento en los niveles de hormonas vegetales, tales como el ácido abscísico (ABA) y salicílico (SA) a través de una cascada de fosforilación dependiente de Ca<sup>+2</sup>.

Se ha encontrado que ABA contrarresta el efecto del NaCl en la fotosíntesis y crecimiento (Popova y col., 1995). También promueve el cierre de los estomas (con la consecuente disminución de la pérdida de agua) mediante la rápida alteración de los flujos iónicos en las células oclusivas bajo condiciones de estrés, modifica la expresión de genes inducidos por la salinidad, induce el sistema antioxidante y regula la aclimatación al estrés salino (Parida y Das; 2004). La fitohormona SA puede atenuar el estrés salino reduciendo la acumulación de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (Javid, 2011), estimulando el metabolismo antioxidante (Nazar y col., 2011) y ayudando a conservar una alta relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> (Jayakannan y col., 2013). La señalización del SA dependiente de NPR1 es esencial para el control de la entrada de Na<sup>+</sup> al tejido de la raíz y su posterior transporte al brote y para la prevención de la pérdida de K<sup>+</sup> a

través de canales rectificantes salientes de  $K^+$  activados por depolarización y de canales no selectivos activados por especies reactivas de oxígeno (Jayakannan y col., 2015).

### **Impacto ambiental y económico**

La salinización del suelo por NaCl es un problema global que afecta la provisión de alimentos.

El Instituto de Agua, Medio Ambiente y Salud de la Universidad de las Naciones Unidas reportó en 2014 que cada día, durante más de 20 años, un promedio de 2000 hectáreas de tierra irrigada de zonas áridas y semiáridas a lo largo de 75 países han sido degradadas por efecto de la salinidad. (Kancheva y col., 2015). En dicho año el área total afectada era de 62 millones de has, representando un 20 % de todas las tierras irrigadas del mundo (310 millones de has), en comparación con las 45 millones de hectáreas a principios de los 90. (Qadir y col., 2014; Ghassemi y col., 1995). Adicionalmente, el área de tierra salinizada está creciendo a una tasa cercana al 10 % anual por varias razones, entre las cuales están las bajas precipitaciones, la alta evaporación superficial, el desgaste de rocas nativas, la irrigación con agua salina y las malas prácticas de cultivos. Se ha estimado que más del 50% de la tierra cultivable se habrá salinizado para el año 2050. (Jamil y col., 2011).

El costo ajustado con la inflación de la degradación de tierras por efecto de la salinidad en 2013 fue estimado en 441 dólares estadounidenses por hectárea, resultando en pérdidas económicas globales de 27,3 mil millones de dólares estadounidenses por año. (Qadir y col., 2014).

En la cuenca indo-gangética de la India por ejemplo, la pérdida de rendimiento de trigo, arroz, caña de azúcar y algodón crecidos en áreas afectadas por la salinidad puede ser de 40 %, 45 %, 48 % y 63 %, respectivamente para cada cultivo. Las pérdidas de empleo pueden ser de 50 a 80 días hombre por hectárea, con un aumento estimado de problemas de salud humana de 20 % a 40 % y de salud animal de 15 % a 50 %. (Tripathi, 2009).

En la cuenca del Indo en Pakistán la pérdida de rendimiento de granos de trigo por el cultivo en áreas afectadas por la salinidad osciló en un rango del 20 % al 43 %, con una pérdida total promedio del 32 %. Para el arroz, las pérdidas de rendimiento de los cultivos en terrenos salinos varió entre el 36 % y el 69 %, siendo la pérdida total promedio del 48 %.(Qadir y col., 2014).

En la cuenca del río Colorado en los Estados Unidos el impacto económico anual de la degradación de los suelos a causa de la salinidad en áreas irrigadas es de 750 millones de dólares estadounidenses. (Qadir y col., 2014). Otras áreas afectadas por la salinidad son las cuencas del mar de Aral (Asia Central), la de los ríos Amarillo (China), Éufrates (Irak y Siria) y Murray (Australia) y el valle de San Joaquín (Estados Unidos).(Qadir y col.,2014).

En la Argentina un 23,5 % de la superficie efectiva regada está salinizada en grado leve, moderado o grave (TABLA IV), siendo Chubut (68,1%), San Juan (56,2 %) y Buenos Aires (40,4 %) las provincias más afectadas. En Chubut y San Juan estos niveles de salinidad estuvieron relacionados con la presencia de un plano freático elevado y fluctuante en lo estacional, mientras que en Buenos Aires estuvieron más vinculados con la calidad del agua aplicada e inundaciones. El 41,3 % de la superficie afectada está asociada principalmente a procesos de sodificación y el 58,7 % a los procesos puros de salinización o sinérgicos de salinización y sodificación. (Sánchez y col., 2015).

**TABLA IV: Area regada salinizada por región en Argentina.**

<b>Región</b>	<b>Regado (miles de ha)</b>	<b>Afectado (miles de ha)</b>	<b>Afectación (%)</b>
Noroeste	494,5	54,8	11,00
Cuyo	500,2	141,9	28,30
Patagonia	125,1	45,1	36,00
Pampeana y Noreste	629,7	170,5	27,00
<b>Total</b>	<b>1749,5</b>	<b>412,3</b>	<b>23,50</b>

*Tabla IV: Por región geográfica en Argentina area regada en miles de ha, área afectada por la salinidad en miles de hs y porcentaje afectado por la salinidad. Fuente: Adaptado de Sánchez y col., 2015.*

## Causas de la salinidad

La salinización de los suelos puede tener dos orígenes:

a.- Primaria: Hace referencia a la formación de suelos salinos cuando esta se produce de manera natural, las sales son producto de la meteorización de la roca madre, esto es, la descomposición de minerales sobre o cerca de la superficie terrestre por acción atmosférica, hidrosférica y biosférica. Las sales suelen proceder de otras zonas, siendo transportadas por el agua (oceánica, superficial, subterránea, lluvias) y por otros medios.. Las soluciones salinas se evaporan continuamente y esto provoca un incremento en la concentración salina en el suelo (Martínez, 2008).

Las sales también pueden proceder de la parte superficial de una fuente de agua subterránea poco profunda, llamada nivel freático. Este nivel freático siempre contiene una mayor o menor proporción de sales disueltas y en regiones áridas sube a través del suelo por capilaridad. El descenso del agua puede verse impedido por una pobre permeabilidad del suelo o por la reducida profundidad de la capa freática en ciertas zonas (Martínez, 2008).

El viento también es otro factor que contribuye considerablemente a la formación de suelos salinos ya que en regiones áridas lleva consigo partículas en suspensión, tales como sales de  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ .

b.- Secundaria: es la salinización de los suelos por acción humana. Las sales en este caso provienen de prácticas agropecuarias y forestales inadecuadas como el riego con agua que contenga sales disueltas, la falta de drenaje artificial en cultivos con riego, la irrigación excesiva (que llevan al ascenso del nivel freático), la sobreexplotación del agua subterránea en zonas cercanas a las costas (se produce una intrusión de agua marina en los acuíferos para reemplazarla), la remoción de especies vegetales con raíces profundas (al utilizar el agua subterránea ayudan a evitar el ascenso de la misma), la falta de rotación de cultivos (que minimiza el tiempo de barbecho, lo cual es importante porque el suelo desnudo favorece la infiltración de agua) y un manejo agrícola inadecuado (que provoca compactación del suelo, drenaje inapropiado y lavado de las sales) (Felisa y col., 2013; Bhattacharyya y col., 2015; Qureshi y col., 2013; Clarke y col., 2002; Martínez, 2008). Otras fuentes de sales son las

enmiendas agrícolas, excremento de animales, fertilizantes químicos y aguas residuales (Tanji, 2002).

La salinización de los suelos se ve favorecida no sólo por la acumulación de sales, sino también por impedimentos en la eliminación de las mismas. Existen dos situaciones importantes:

- Zonas de clima árido: En ellas las precipitaciones son escasas, por lo que el lavado de las sales es insuficiente. Durante los cortos lapsos de humedad las sales se disuelven y movilizan (Martínez, 2008), lo cual provoca el anegamiento de áreas planas o ligeramente deprimidas. Durante los prolongados períodos secos se produce una fuerte evaporación que hace subir el nivel freático y concentra las sales disueltas en éste sobre la superficie. (Taboada y Lavado, 2008; Taboada y col., 2009)
- Suelos con malas condiciones de drenaje: En estos suelos el agua circula con lentitud, disolviendo las sales y transportándolas hacia los niveles superiores, sin que sea posible eliminarlas en grandes cantidades (Martínez, 2008).

### **Estudio de la salinidad**

Hasta hace pocos años. las estrategias para resolver el problema de la salinidad se enfocaban en la remediación de los suelos, pero esta es sumamente costosa e insostenible desde el punto de vista económico por la amplitud de la superficie.

Ancestralmente la tierra se ha cultivado hasta el punto en que la salinidad le quitaba producción y rentabilidad, buscándose a continuación nuevas áreas para la actividad agrícola. Con el advenimiento de la posibilidad de selección de variedades de plantas y de la biotecnología que puede modificar el genoma vegetal, el foco se ha trasladado hacia las plantas (Attumi, 2007).

Los estudios sobre la tolerancia a la sal son esenciales para entender aspectos básicos de la biología vegetal, regulación de genes y cascadas de señalización del transporte iónico, la

osmorregulación y la nutrición mineral. Además dicha tolerancia tiene aspectos en común con las exhibidas frente a otros tipos de estrés abiótico, tales como los provocados por la sequía o el frío (Zhu, 2001b).

Las experiencias realizadas en plantas halófitas han resultado parcialmente esclarecedoras a causa de la complejidad de los mecanismos asociados a la tolerancia salina y a la carencia de un modelo genético bien definido (Xiong y Zhu, 2002).

Las primeras investigaciones vinculadas a la salinidad en plantas se basan en observaciones de la fisiología de la toxicidad y tolerancia a la sal a nivel celular, metabólico y de la planta en conjunto (Bohnert y Sheveleva, 1998; Hasegawa y col., 2000 Flowers y col., 1997; Greenway y Munns, 1980; Yeo, 1998). (Xiong y Zhu, 2002).

Posteriormente se llevaron a cabo estudios acerca de los mecanismos moleculares de transporte de iones a través de la membrana celular y desde una región anatómica de la planta a otra (Blumwald y col, 2000; Schachtman y Liu, 1999) (Xiong y Zhu, 2002., sobre la expresión de los genes reguladores de la tolerancia a la sal (Zhu y col.,1997; Xiong y Zhu, 2001; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Ingram y Bartels, 1996; Bray,1997; Bohnert y col., 1995) y sobre las mutaciones en determinantes genéticos de tolerancia a la salinidad (Zhu, 2000; 2001a, b; Xiong y Zhu, 2001). En base a estos estudios se han desarrollado cultivos seleccionados o genéticamente modificados.

Durante el siglo pasado la selección y el cruzamiento de variedades mostraron ser altamente efectivas en el mejoramiento de cultivos contra el estrés abiótico. Sin embargo la velocidad y el grado de progreso en la mejora de la tolerancia al estrés salino están limitados por los intrincados mecanismos que confieren dicha tolerancia, por la baja magnitud de variación del acervo genético de la mayoría de los cultivos y por el tiempo y dinero consumidos en la selección de plantas tolerantes (Athar y Ashraf, 2009; Turan y col., 2012).

Por estas razones la ingeniería genética proporciona grandes posibilidades como alternativa atractiva a la cruce convencional para incrementar la tolerancia al estrés salino. Los biólogos de plantas han elegido como genes blanco a aquellos que codifican para



proteínas de transporte iónico, los que estén involucrados en la síntesis de antioxidantes y de solutos orgánicos compatibles (Ashraf y Akram, 2009). Si bien se ha logrado éxito en la producción de plantas transgénicas tolerantes a la sal, el mismo es limitado a causa de la diferencia entre las condiciones de laboratorio y las del campo, a la incapacidad de producir altos rendimientos y a la falta de evaluación de la tolerancia a la sal en diferentes estadios del ciclo de crecimiento vegetal.

### **H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> y salinidad**

El H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, el más pequeño de los ácidos dicarboxílicos, está presente como anión en la mayoría de los tejidos vegetales. En muchas especies el C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup> es producido por la descomposición de ascorbato (vitamina C) vía 4-oxalilteonato. Otras fuentes demostradas o propuestas incluyen la oxidación de glicolato o glioxilato por la glicolato oxidasa y la degradación oxidativa del oxaloacetato. En ciertas plantas no es sólo un intermediario en procesos catabólicos, sino que cumple un rol esencial en procesos biológicos tales como la defensa ante herbívoros, el balance iónico, la fijación simbiótica de nitrógeno y la tolerancia a metales. (Foster y col., 2012; Foster y col.; 2016).

Pese a que la capacidad de biosintetizar y acumular C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup> brinda múltiples beneficios, su exceso puede ser perjudicial para la salud de las plantas (Foster y col.; 2016). Se ha observado que la producción desregulada de C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup> causa reducción y retardo de la germinación, así como también la acumulación de cristales de CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Asimismo se ha encontrado que el H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> es tóxico al ser aplicado sobre las hojas como por ejemplo cuando es secretado por hongos patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, asistiéndoles en la colonización del tejido vegetal y promoviendo la muerte celular programada de sus células (Lehner y col., 2008; Hegedus y Rimmer, 2005).

Debido a la posibilidad de estos efectos nocivos es necesaria una cuidadosa coordinación del metabolismo del C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>. La vía catabólica mejor caracterizada es la de la oxidasa, que cataliza la ruptura del C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup> a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se ha detectado la actividad de esta enzima en la pared celular de monocotiledóneas, pero la misma no está presente en dicotiledóneas, dentro de las cuales se halla *Arabidopsis*. Sin embargo, hay evidencias de la

existencia de un mecanismo catabólico alternativo en este tipo de plantas, el cual incluye al oxalil-CoA y al formil-CoA como intermediarios.

Se ha reportado una aparente disminución en el contenido de ácidos orgánicos de brotes y raíces de plantas expuestas a concentraciones de sal relativamente altas, así como también la situación contraria. Se cree que la salinidad estimula la oxidación respiratoria de estos ácidos, ya que se requiere una provisión de energía para la captación de iones y la manutención de las funciones metabólicas (Abo-Ahmed y col., 1989). También se ha observado que la aplicación exógena de  $H_2C_2O_4$  aparentemente compensa la reducción del contenido de azúcares solubles que ocurre en condiciones salinas y el tratamiento foliar con este ácido alivia la disminución del contenido de cationes metálicos en plantas con estrés hídrico inducido por la salinidad. Los ácidos orgánicos provocan un aumento de los niveles de solutos osmorregulatorios y en consecuencia se eleva la tasa de absorción de agua (Gaber, 2003).

Investigaciones anteriores han revelado que el  $H_2C_2O_4$  induce muerte celular programada en células de *Arabidopsis* en altas concentraciones. El  $H_2C_2O_4$  provoca un incremento en la corriente aniónica, el cual es un prerequisite para la síntesis de etileno, hormona involucrada en la inducción de muerte celular programada. Se han llevado a cabo experimentos complementarios en plántulas de *Arabidopsis*, los cuales revelaron que el tratamiento con solución de  $H_2C_2O_4$  3 mM no altera el desarrollo de las plantas pero induce la transcripción de genes relacionados con la defensa que son dependientes de canales aniónicos (Lehner y col. 2008).

### **Ca<sup>2+</sup> y salinidad:**

El Ca<sup>2+</sup> libre citosólico es un segundo mensajero común en la señalización de varios tipos de mecanismos intramoleculares relacionados con varios tipos de estrés abiótico, entre ellos el salino. También es captado por las raíces como nutriente y estimula la exocitosis en el crecimiento. Para que el Ca<sup>2+</sup> pueda ejercer estos roles se requiere una estricta regulación espacio-temporal de su amortiguación (buffering) en el citosol y de su ingreso y egreso a través de la membrana plasmática y desde los compartimentos internos (Wilkins y col., 2016).

En células vegetales la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, en reposo y bajo condiciones normales, se mantiene en el rango de 10-200 nM. Sin embargo, señales específicas como el estrés son capaces de gatillar un aumento repentino en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico hasta el orden milimolar, el cual resulta tóxico si persiste en el citosol por un período prolongado. Como consecuencia de esto las plantas han desarrollado un sistema para captar el  $\text{Ca}^{2+}$  en exceso y almacenarlo en el apoplasto o en el lumen de organelas, como el retículo endoplasmático o la vacuola. Estos depósitos, junto con las paredes celulares, pueden usarse para elevar el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico bajo condiciones de estrés y transducir la señal, activando subsiguientes respuestas de defensa (Kader y Lindberg, 2010).

La vía de señalización SOS (salt overly sensitive) conecta los cambios del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico con la respuesta al estrés salino. Si bien no se conoce la manera en que la célula vegetal sensa el exceso de  $\text{Na}^+$ , éste causa la reducción de la cantidad de agua que llega a los tejidos, la cual puede ser detectada y traducida por las plantas en diferentes acciones (Maathuis, 2013). El primer componente de la vía es la proteína sensora de  $\text{Ca}^{2+}$  SOS3, la cual detecta el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  causado por el exceso de  $\text{Na}^+$  que ha entrado al citoplasma y se une a la serina/treonina kinasa SOS2. El complejo formado fosforila y activa a SOS1, un antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que exporta los iones en exceso y contribuye a la homeostasis del  $\text{Na}^+$  (Tang y col., 2014; Ji y col., 2013).

Existen diversas interacciones entre  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  que afectan al crecimiento, la fotosíntesis, la nutrición vegetal y el transporte de iones y agua en las plantas. Se ha reportado el impacto positivo del  $\text{Ca}^{2+}$  en el crecimiento de plantas afectadas por estrés salino, aunque no siempre es el caso debido a la diversidad genotípica, al nivel de salinidad y a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Asimismo se ha observado una restauración de la tasa fotosintética en *Citrus sinensis* (muy sensible a  $\text{Cl}^-$ ) expuesta a  $\text{NaCl}$ , la cual fue atribuida a una menor concentración de  $\text{Cl}^-$  en las hojas. No obstante, esto no se ha apreciado en *Vaccinium ashei*, otra especie sensible a  $\text{Cl}^-$ .

En ambos casos hubo una alta correlación entre las tasas de fotosíntesis y de crecimiento. Se cree que en ciertas especies las interacciones entre  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  afectan el

crecimiento pero no la fotosíntesis. Se ha encontrado que el  $\text{Ca}^{2+}$  previene la inhibición de la conductancia hidráulica en hojas y de la conductividad hidráulica en raíces de maíz. Tanto el  $\text{Na}^+$  como el  $\text{Ca}^{2+}$  afectan principalmente el transporte entre membranas celulares y en menor importancia que el que tiene lugar en el apoplasto. El  $\text{Ca}^{2+}$  contrarresta parcialmente el efecto negativo del  $\text{Na}^+$  en la biosíntesis de polisacáridos de la pared celular y el desplazamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  asociado a membrana por  $\text{Na}^+$ .

Adicionalmente reduce la salida de  $\text{K}^+$  a través de la membrana plasmática e incrementa el contenido de fosfolípidos en la misma. En cuanto al transporte y contenido iónico, el  $\text{Ca}^{2+}$  reduce la alcalinización de la vacuola en raíces de cebada y sorgo y la extrusión de protones en raíces de *Vigna radiata* (Cramer, 2002).

### ***Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio de la tolerancia a la sal**

*Arabidopsis thaliana* es una planta dicotiledónea que pertenece a la División *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, orden *Brassicales* (brasicáceas o crucíferas), ampliamente empleada como organismo modelo en las investigaciones de fisiología, ecofisiología y genética vegetal.

La utilidad en los estudios de laboratorio se explica por su corto tiempo de generación, su pequeño tamaño, su prolífica producción de semillas mediante autopolinización, su genoma diploide pequeño completamente secuenciado y conocido, su breve ciclo de vida (Figura 2 y Tabla 4) y la facilidad para ser transformada por medio de *Agrobacterium tumefaciens*. (Koornnef y Meinke, 2010; Plant Biology, 2005). Se han identificado numerosos ecotipos de los cuales Columbia (Col) y Landsberg erecta (Ler) son los más utilizados.

Estos atributos permiten la realización de investigaciones con estas plantas en el laboratorio en cámaras de cultivo con condiciones de luz y temperatura controladas, ensayos bioquímicos y moleculares.

Como posee todas las características típicas de las angiospermas a nivel de crecimiento, desarrollo y anatomía, los resultados obtenidos podrían ser extrapolados a otras

especies de dicotiledóneas y especialmente a plantas de cultivos para la alimentación humana directa o indirectos.

El éxito de *Arabidopsis* como modelo genético en estudios hormonales, mutacionales y metabólicos justifica su utilización para investigar los comportamientos asociados al estrés salino. Por su condición y comportamiento como planta glicófita típica, *Arabidopsis* es sensible a las concentraciones de sal, motivo por el cual inicialmente podría pensarse que no es un modelo adecuado para estudios de efectos y tolerancia a este factor. Sin embargo, experiencias realizadas en esta y otras glicófitas han demostrado que estas plantas y sus células son capaces de adaptarse con ciertos límites a concentraciones de sal elevadas que matarían a plantas y células no adaptadas (Xiong y Zhu, 2002). Los ecotipos de *Arabidopsis* exhiben ligeras diferencias en lo que respecta a su tolerancia a la salinidad.

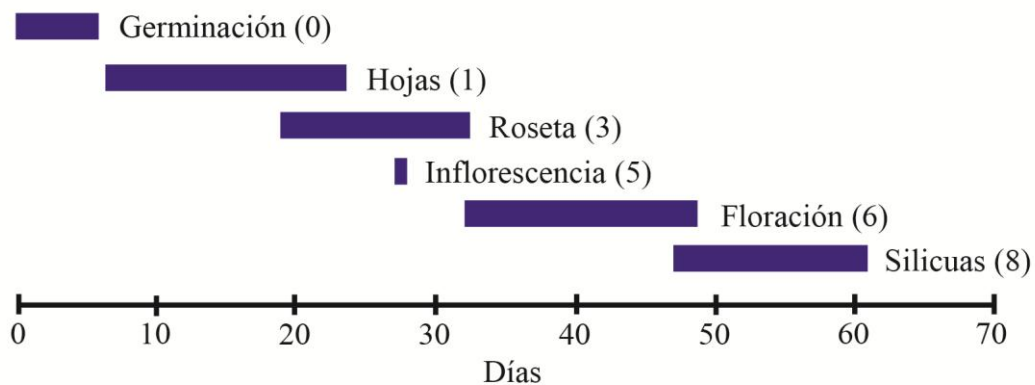
El genoma de *Arabidopsis* ha sido completamente secuenciado (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) y los estudios comparativos respecto a la tolerancia a la sal permitieron localizar potenciales loci genéticos relacionados a dicha adaptación. Se han descrito mutantes RS de *Arabidopsis* (resistentes a la sal) y mutantes rss (reduced sensitivity to salt, "sensibilidad reducida a la sal") (Saleki y col., 1993; Werner y Finkelstein, 1995), en ambos casos recesivos (Hernández et al., 2009; Miura y col., 2011; Quesada y col., 2000; Ruggiero y col., 2004; Tsugane y col., 1999).

Genéticamente se han identificado en primer lugar genes SOS (salt overly sensitive, "demasiado sensible a la sal") que explican los procesos metabólicos y moleculares que favorecen la tolerancia a altas concentraciones de sal (Liu y col., 2000; Shi y col., 2000; Zhou y Wang, 2002; Ariga y col., 2013; Yang y col., 2009) y más tarde los vinculados al ácido abscísico (ABA) (Hong y col., 1997; Barroso y col., 1999; Piao y col., 1999; Jakab y col., 2005; Chen y col., 2012; Rapala-Kozik y col., 2012; Song y col., 2013, Wang y col., 2015). La naturaleza poligénica de la tolerancia salina ha impedido conocer la totalidad de los mecanismos moleculares implicados.

### **Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis* se caracteriza por ser una planta anual (germina, florece y sucumbe en el curso de un año) y por exhibir 2 fases de crecimiento diferentes: vegetativa y reproductiva.

En la Figura 2 se observan la cronología del crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.



**Figura 2. Principales estadios cronológicos en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.**

Los números entre paréntesis refieren a la denominación de la etapa estandarizada BBCH (BASF, Bayer, Ciba y Hoescht). Fuente: Adaptado de Boyes, 2001.

Como muchas otras angiospermas posee un ciclo de vida haplo-diplonte, es decir, hay generaciones alternadas de individuos haploides multicelulares (gametófitos) y diploides multicelulares (esporófitos). Solamente la fase diplonte multicelular es observable a simple vista, ya que el gametófito femenino (que da la gameta femenina) está encerrado dentro del óvulo (que más tarde se convertirá en semilla) y el masculino (que da la gameta masculina) está encerrado dentro del grano de polen.

En el momento en que se abren las flores (conocido como antesis) los granos de polen de la antera en la flor se depositan en el estigma y se forma el tubo polínico que atraviesa el estilo y la pared ovárica hasta llegar al óvulo. Los gametos se fusionan para formar un cigoto y luego un embrión diploide, que junto con el tejido materno y el endospermo extraembrionario dará lugar a la semilla. La silicua es el nombre que recibe el fruto seco dehiscente, más precisamente una cápsula dehiscente paraplacentaria) Las vainas de semillas se vuelven pardas previo a su rotura.

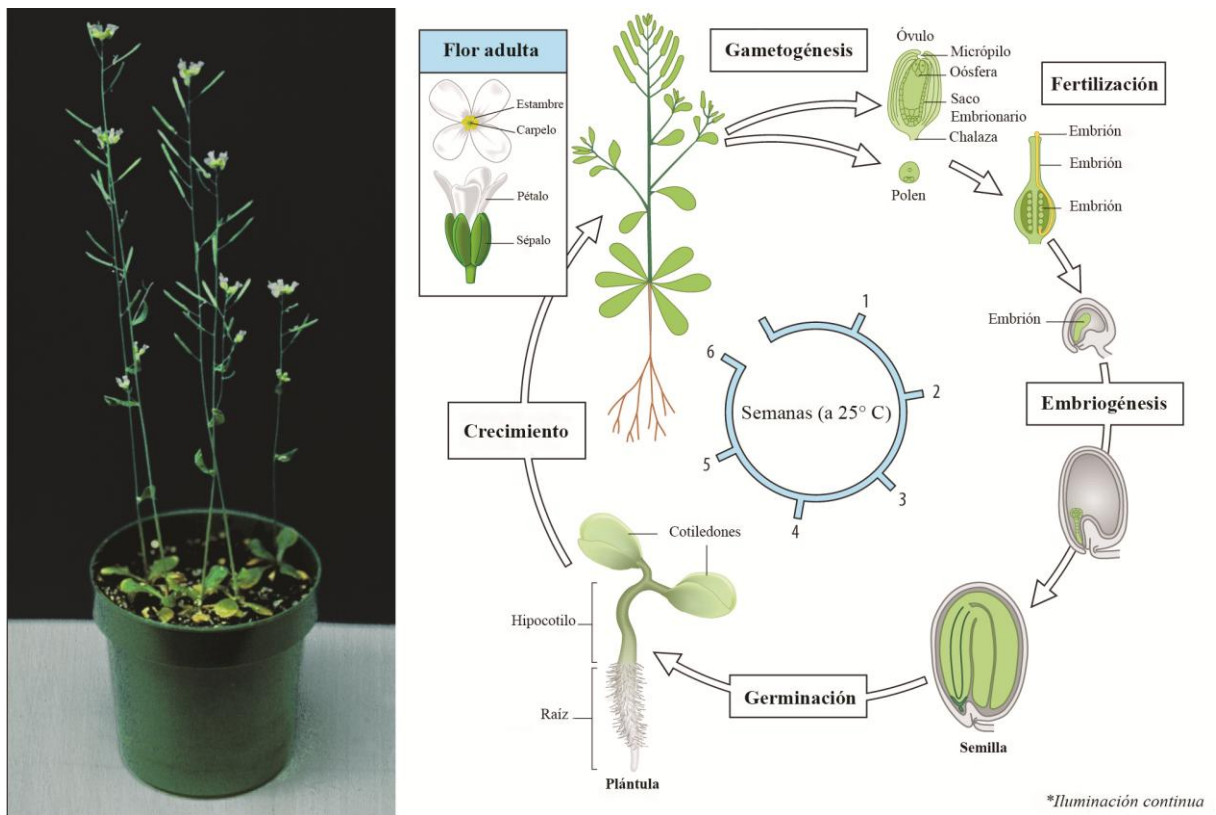
El embrión maduro tiene un plano corporal rudimentario, compuesto por los cotiledones y los meristemas apical y radicular.

La plántula luego de la germinación consta de la radícula, el hipocotilo y los cotiledones y a partir de este momento empieza la fase vegetativa. Ésta última se divide en una etapa temprana durante la cual surgen 2 pares de hojas enfrentadas y otra tardía, caracterizada por la aparición de hojas dispuestas en espiral (Ripoll Samper, 2004) llamada roseta.

En la mayor parte de los ecotipos usados en el laboratorio los meristemas florales surgen en los costados del meristema apical del brote alrededor de la segunda semana después de la germinación. Los capullos florales se desarrollan a partir de estos meristemas, haciéndose visibles en el centro de la roseta luego de una semana. Posteriormente se produce la elongación del brote principal y surge una inflorescencia. Aparecen también las hojas caulinas (las que salen directamente desde el tallo) en la parte inferior del brote de la inflorescencia. Al igual que con las hojas, las flores se forman en un patrón espiralado, con aproximadamente 2 flores que se abren cada día.

El desarrollo del polen ocurre dentro de las anteras, cada flor puede producir hasta 1000 granos de polen. Una célula microspórica madre sufre la meiosis y da lugar a una tetra de micrósporas (esporas masculinas), dos divisiones mitóticas posteriores resultan en granos de polen maduros que contienen un núcleo vegetativo y 2 células espermáticas. Los 2 carpelos dentro de cada flor producen entre 50 y 60 óvulos. La meiosis tiene lugar en el megasporocito, la célula madre del saco embrionario del ovario, y uno de los productos sobrevive para formar la megáspora (espora femenina). El gametocito femenino se origina tras 3 divisiones mitóticas. En la mayoría de las flores que se dejan autopolinizar cada óvulo es fertilizado, completándose así el ciclo (Weigel y Glazebrook, 2002). El resumen de esta secuencia puede observarse en la Figura 3 y TABLA V.





**Figura 3: Ciclo de desarrollo de *Arabidopsis thaliana* y descripción de sus partes anatómicas.** Fuente: Adaptado de

[http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB\\_06/fig6\\_1.jpg](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_06/fig6_1.jpg). Dr. Brian E. Staveley  
Department of Biology Memorial University of Newfoundland. Canadá

**TABLA V: Etapas en el ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*.**

Estadio	Descripción	Tiempo (días)
<b>0</b>	<b>Germinación de la semilla</b>	
0-1	Imbibición de la semilla	3.0 (sobre placa)
0-5	La radícula emerge desde la cubierta de la semilla	4.3 (sobre placa)
0-7	El hipocotil y el cotiledón emergen desde la semilla.	5.5 (sobre placa)
<b>1</b>	<b>Producción de hojas</b>	
1-0	Apertura plena de los cotiledones	6.0 (sobre placa)



1-02	2 hojas de la roseta tienen longitudes > 1 mm	10.3 (sobre placa)
1-04	4 hojas de la roseta tienen longitudes > 1 mm	14.4 (sobre placa)
<b>3</b>	<b>Crecimiento de la roseta</b>	
3.90	Crecimiento de la roseta completado	29.3
<b>5</b>	<b>Emergencia de inflorescencia</b>	
5,1	Los primeros capullos son visibles	26.0
<b>6</b>	<b>Producción de flores</b>	
6-0	Se abre la primera flor	31.8
6,9	Floración completada, no se producen más flores	49.4
<b>8</b>	<b>Madurez de las silicuas.</b>	
8-0	La primera silicua se rompe	48.0
<b>9</b>	<b>Senescencia</b>	
9-7	Senescencia completa	

*Tabla V: Clasificación resumida de los estadios del ciclo de vida de Arabidopsis thaliana. según BBHC. Fuente: Adaptado de Boyes, 2001..*

## Objetivos

### Generales:

El presente trabajo tiene por objeto estudiar el efecto de la salinidad en la germinación y floración de *Arabidopsis thaliana*.

### Específicos:

- 1.- estandarizar un modelo para evaluar cómo afecta la salinidad la germinación in vitro y la floración de *Arabidopsis thaliana* en condiciones experimentales de laboratorio.
- 2.- determinar los parámetros observables y fenotípicos en la germinación y floración que permitan evaluar cuantitativamente y cualitativamente la influencia de la salinidad y por extensión otros factores abióticos.
- 3.- evaluar el efecto potencialmente protector del  $\text{Ca}^{2+}$  y el efecto negativo del  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  (inductor de la apoptosis) en el ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana* cuando estos son incorporados durante el riego en ausencia y presencia de salinidad.

## **Materiales y métodos:**

### **Infraestructura para incubación de semillas y plantas**

El laboratorio cuenta con una incubadora cerrada para las etapas de germinación y estantes de incubación ubicados en una sala de incubación para la etapa de crecimiento aéreo en tierra.

La incubadora posee cuatro tubos fluorescentes, habiéndose programado un fotoperíodo de 16 hs. de luz y 8 hs. de oscuridad. Los 4 tubos fluorescentes de 36-40 w proporcionan 2700-2900 lumens/tubo. La temperatura del laboratorio se fijó en 22°C y el porcentaje de humedad se fijó en 29 %.

Los estantes de incubación cuentan con tres tubos fluorescentes de igual potencia lumínica que los anteriores y se fijó un fotoperíodo de 15 hs. de luz y 9 hs de oscuridad en iguales condiciones de temperatura y humedad que la incubadora.

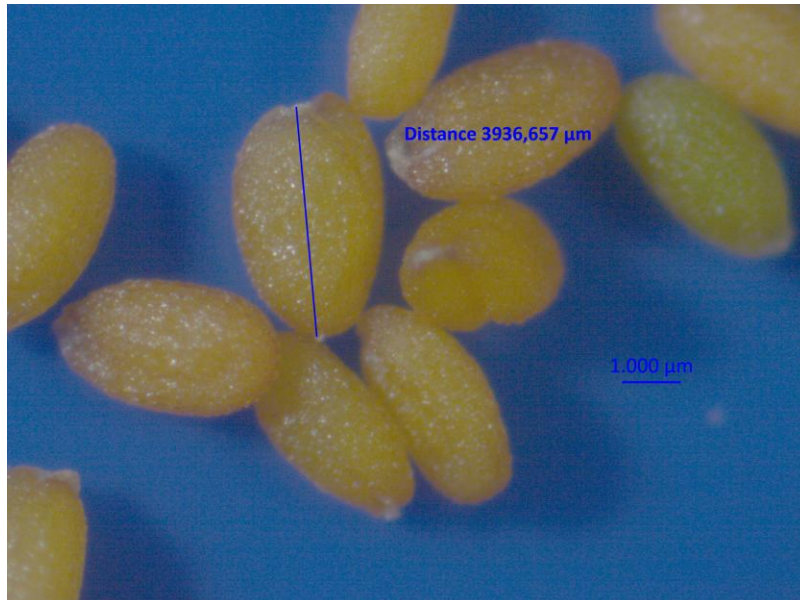
### **Semillas**

En las experiencias de germinación y crecimiento se utilizaron semillas del ecotipo Columbia (Col-0), el tipo silvestre más usado de *Arabidopsis thaliana* en experiencias de laboratorio. Fueron provistas por el Laboratorio de Genómica Comparativa del Desarrollo Vegetal, Fundación Instituto Leloir (Buenos Aires. Argentina). Las semillas se cultivaron en tierra por el método descrito en Ensayos de Floración en tierra a los fines de obtener suficiente cantidad de semillas para las experiencias programadas. Se almacenaron a 4° C para conservar viabilidad.

En la División de Plantas Experimentales del Centro de Biorecursos Riken (Japón) se encuentran identificadas 100 líneas celulares clasificadas genéticamente a partir de más de 400 ecotipos reportados de esta especie.

El ecotipo Col-0 presenta las siguientes características (Passardi y col.,2006):

- Semillas de color pardo medio, ligeramente redondeadas
- Gradiente de longitud de los pelos de la raíz, que aumenta desde la punta de la raíz hasta el hipocotilo.
- Roseta grande, formada por 10 hojas a los 30 días.
- 73 tricomas (finos apéndices en forma de pelos) en promedio presentes en el segundo par de hojas, cada uno de ellos con 3 ramificaciones.
- Inflorescencias con pétalos medianamente compactos.
- Silicuas de largo y grosor intermedios.



**Figura 4 : Semilla de *Arabidopsis thaliana***

La medición digital se realizó con el software ZEN 2012.

### **Medio de cultivo**

Se empleó el medio de cultivo basal Murashige-Skoog con vitaminas (PhytoTechnology Laboratories, TM), cuya formulación se detalla en el anexo A suplementado con agar bacteriológico tipo A (Biokar Diagnostics) (MSA). La concentración de Na en el medio base agarizado es aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ . La composición del medio se describe en el Anexo A.

## **Esterilización de las semillas**

Las semillas de *Arabidopsis* se esterilizaron con vapores de  $\text{Cl}_2$  por 4 hs en cámara cerrada de 27 litros para prevenir la interferencia del crecimiento de las bacterias presentes naturalmente en la superficie de las semillas. Para ello se colocaron las semillas en microtubos de 1,5 ml sobre la tapa invertida de la cámara de esterilización.

Los vapores de  $\text{Cl}_2$  se generaron por mezcla de 10 ml de HCl 36,5-38% (Cicarelli Laboratorios, catálogo 918110) y de 100 ml de NaClO (lavandina 60 g Cl/l) de uso para laboratorio. En las condiciones indicadas se obtiene la concentración recomendada mínima esterilizante de entre 1.7 -2.1 % (V/V) de  $\text{Cl}_2$ . (Lindsey III y col., 2017).

Luego del inicio de la generación de vapores se tapó rápidamente la cámara durante el tiempo de esterilización .

Finalizado el tiempo de esterilización se taparon los microtubos que permanecieron cerrados hasta el momento de la siembra y conservados a temperatura ambiente de laboratorio.

Las condiciones estandarizadas descriptas aseguran un porcentaje de germinación de entre el 75 al 90 %. (Lindsey III y col., 2017). La eficacia de la esterilización fue verificada a lo largo de todas las experiencias en donde se no produjo contaminación.

## **Ensayos:**

### **1. Ensayo de germinación en placa**

Se utilizó un ensayo no destructivo de germinación en placa previamente descripto. (Liu y Zhu, 1197) (Shelden y col, 2013). Bajo flujo laminar se colocaron en tubos plásticos de 50 ml Falcon la cantidad calculada de solución de NaCl concentrada necesaria para obtener las siguientes concentraciones finales de NaCl adicionado: 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM y 300 mM, en medio MSA.

Las placas de Petri plásticas descartables se llenaron con 12 ml de medio de cultivo adicionado con las concentraciones de NaCl mencionadas. En las placas identificadas como “control” se colocó medio de cultivo sin ningún agregado de NaCl.

Tras la solidificación del medio en las placas, se abrió un microtubo de 1.5 ml con semillas estériles y se colocaron sobre un papel de filtro tipo Whatman previamente esterilizado en autoclave. Se sembraron 4 semillas por placa con la ayuda de una aguja desinfectada con etanol al 70%. Se envolvieron las placas con papel aluminio o colocándolas dentro de un envase plástico opaco para protegerlas de la exposición a la luz y se las dejó por 72 hs en heladera a 4°C para sincronizar su crecimiento, disminuir la latencia y aumentar la velocidad de germinación.

Pasado este tiempo se quitó el envoltorio, se sellaron las placas con film plástico adherente y se incubaron a 22°C en la incubadora de placas para germinación con luz ubicándolas en posición vertical y orientadas para que las semillas reciban de frente la luz. La longitud de las raíces e hipocotilos se midió a partir de imágenes digitales obtenidas bajo lupa y procesadas con el programa ZEN 2012 Blue Edition (Zeiss) (Stanislas et al.,2015) previa calibración.

Se evaluaron los parámetros: longitud de la raíz, longitud del hipocotilo, número de raíces secundarias, número de cotiledones y número de horas en la plántula.

## **2. Ensayo de floración en tierra**

Se vertió medio MSA en 10 placas de Petri para posteriormente sembrar 6 semillas de *Arabidopsis* en cada una, sincronizándolas por 72 hs. a 4°C. Al cabo de este período se llevaron las placas a una incubadora con luz, a 22°C y se dejaron crecer las semillas por 4 días, luego de los cuales se realizó el trasplante a tierra de las semillas germinadas. El mismo consistió en colocar 4 semillas o plántulas en vasos con tierra (Grow Mix Sustrato Multipro, Terrafértil SA, Moreno, Prov de de Buenos Aires) previamente perforados en el fondo, y colocados cada uno en una bandeja. Al empezar a formarse la roseta las plántulas fueron

transplantadas cada una a un vaso independiente con el fin de aportar más espacio disponible para su crecimiento. El riego se efectuó según necesidad llenando cada bandeja con el mismo volumen de una solución salina diferente y permitiendo la irrigación por ascenso.

En todos los ensayos siguientes la siembra, la sincronización y el trasplante se efectuaron del mismo modo siendo el factor diferencia las condiciones de riego a partir de la implantación en tierra.



**Figura 5: Diferentes estadios de las plantas en tierra**

*a.- Cuatro plántulas a 1 DDT (días despues del trasplante a tierra, todavía se observan los cotiledones y no se observan aún hojas; b.- Cuatro plántulas en las que se observan dos cotiledones y dos hojas a los 8 DDT; c.- Tres plántulas con rosetas en formación a los 15 DDT; d.- Tres plantas con rosetas pequeñas a los 22 DDT; e.- Roseta perteneciente a una*



*planta a los 39 DDT; f.- Roseta con tallo aún sin florecer perteneciente a una planta a los 43 DDT.*

Se realizaron experiencias para evaluar la floración por cultivo en tierra de semillas previamente germinadas en medio MSA con 4 días de vida:

a.- crecimiento con concentraciones crecientes de NaCl, en diferentes rangos, orden micromolar, como micronutriente y en concentraciones propias de suelos salinos (orden milimolar).

b.- crecimiento con concentraciones crecientes de NaCl (orden micromolar y milimolar) y concentraciones crecientes de  $H_2C_2O_4$ .

c.- crecimiento con concentraciones crecientes de NaCl (orden micromolar y milimolar) y concentraciones crecientes de  $CaCl_2$ .

Las experiencias realizadas pueden agruparse según el siguiente orden:

### **2. 1. Crecimiento con concentraciones crecientes de NaCl (orden micromolar)**

Las soluciones salinas utilizadas para el riego durante toda la experiencia fueron las siguientes:

- 0  $\mu M$  NaCl (agua destilada), 50  $\mu M$  NaCl, 100  $\mu M$  NaCl, 150  $\mu M$  NaCl, 200  $\mu M$  NaCl y 300  $\mu M$  NaCl.

El parámetro evaluado fue el número de hojas en la roseta al momento de la floración.

### **2.2. Crecimiento con concentraciones crecientes de NaCl (orden micromolar) y $CaCl_2$ :**

Las soluciones salinas utilizadas para el riego durante toda la experiencia fueron las siguientes:



**TABLA VI. Concentraciones de NaCl y CaCl<sub>2</sub>**

		CaCl <sub>2</sub> (mM)				
		0	5	10	20	30
NaCl (μM)	0	x	x	x	x	x
	100	x	x	x	x	x
	150	x	x	x	x	x

*Tabla VI: Las cruces indican las concentraciones de ambas sales en la soluciones de riego individuales o combinadas.*

### 2.3 Crecimiento con concentraciones crecientes de NaCl (orden micromolar) y H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

Las soluciones salinas utilizadas para el riego durante toda la experiencia fueron las siguientes:

**TABLA VII. Concentraciones de NaCl y H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>**

		H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (mM)			
		0	5	10	20
NaCl (μM)	0	x	x	x	x
	100	x	x	x	x
	150	x	x	x	x

*Tabla VII: Las cruces indican las concentraciones de ambas sales en la soluciones de riego individuales o combinadas.*

### 2.4. Crecimiento con concentraciones crecientes de NaCl (orden milimolar).

Se utilizaron las siguientes soluciones salinas para el riego durante toda la duración de la experiencia:

- 0 μM NaCl (agua destilada), 50 mM NaCl, 75 mM NaCl y 100 mM NaCl.

### 2.5. Crecimiento con concentraciones crecientes de NaCl (orden milimolar) y H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> y CaCl<sub>2</sub>

Se utilizaron las siguientes soluciones salinas para el riego durante toda la duración de la experiencia:

**TABLA VIII. Concentraciones de NaCl, CaCl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>**

		CaCl <sub>2</sub> (mM)		H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (mM)	
		0	5	0	10
NaCl (mM)	0	x		x	
	50	x	x	x	x

*Tabla VII: Las cruces indican las concentraciones de ambas sales en la soluciones de riego individuales o combinadas.*

#### **Análisis estadístico:**

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa InfoStat versión 2016 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>).

Los resultados obtenidos en las mediciones fueron analizados mediante análisis de la varianza en un diseño completamente aleatorizado con réplicas. La comprobación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad se llevó a cabo mediante las pruebas de Shapiro-Wilks y de Levene respectivamente. Las comparaciones de los resultados provenientes de las diferentes condiciones se realizaron utilizando la prueba de LSD Fisher tanto en los ensayos en medio MSA como en los de tierra.

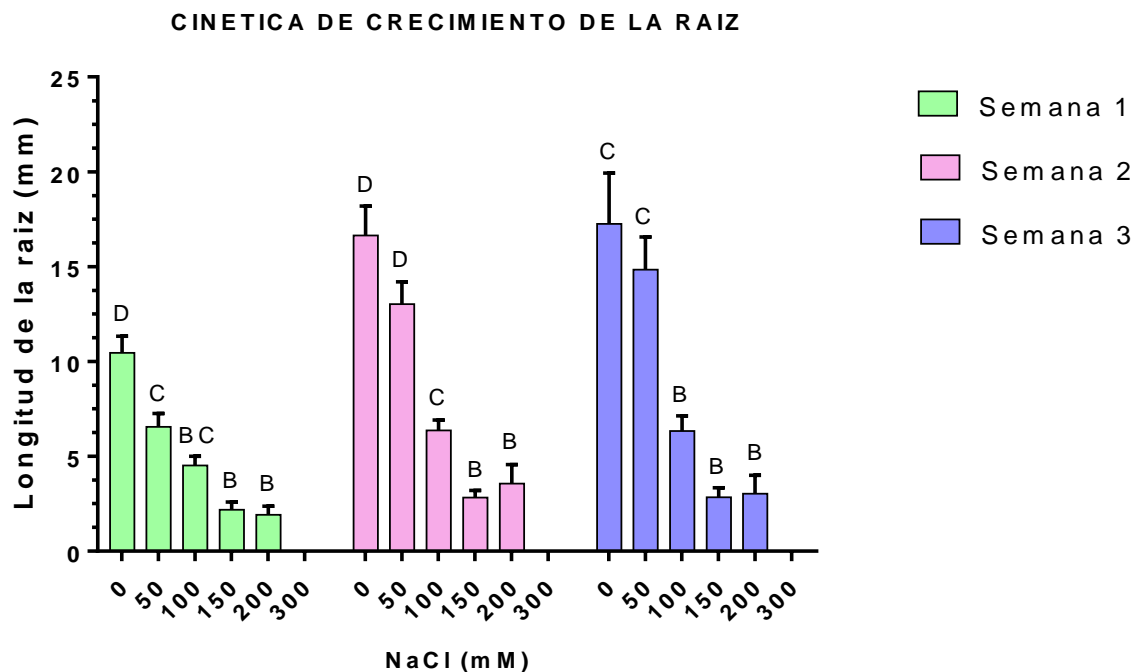
Los resultados de las variables que no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron analizados mediante análisis de la varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis), comparándose los tratamientos por medio de esa misma prueba. En todas las variables se consideraron significativas aquellas pruebas con  $p < 0,05$ .

## Resultados

### 1. Experiencias en placa con medio MSA (cultivo in vitro).

#### 1.1.- Cinética de germinación:

La cinética de germinación de las semillas se determinó efectuando observaciones secuenciales a diferentes tiempos midiendo la longitud de la raíz principal. Adicionalmente para determinar los tiempos óptimos de diferenciación entre condiciones variables de salinidad en el rango de micronutrientes se efectuaron experiencias de crecimiento utilizando medio MSA con concentraciones crecientes de NaCl adicionado (50, 100, 150, 200 y 300  $\mu$ M de NaCl) y se utilizó como control medio sin agregado de NaCl (Figura 4). No se obtuvo germinación para las plantas expuestas a 300 mM NaCl.



**Figura 6: Longitud promedio de la raíz registrada por semana para cada concentración de NaCl. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) en la comparación de a pares utilizando el análisis estadístico de Kruskal-Wallis.**

A continuación se muestra la significación estadística de los datos correspondientes a cada semana:

### **1.1.1 Longitud de la raíz (semana 1):**

La longitud promedio de la raíz fue para 0 mM (control, sin NaCl adicionado) de 10.46 mm, y para las concentraciones crecientes de NaCl 50, 100, 150 y 200 de 6,55, 4,52, 2,18 y 1,92 mm respectivamente. Para 300 mM no se observó germinación.

Para el análisis estadístico de las distintas condiciones de salinidad se empleó la prueba de Kruskal-Wallis, dado que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad requerido para efectuar un ANOVA.

El resultado del análisis de la varianza no paramétrico mostró que la concentración de NaCl afecta significativamente a la longitud promedio de la raíz ( $p < 0,0001$ ) respecto al control de 0 mM. (H: 65.42). En la comparación de a pares se obtuvo la siguiente agrupación en categorías según el tratamiento: 0 mM (D), 50 mM (C), 100 mM (BC), 150 mM (B), 200 mM (B) y 300 mM (A). Las medias con una letra común no son significativamente diferentes, ( $p > 0.05$ ).

La longitud promedio de la raíz en las plántulas tratadas con 50 mM es significativamente menor que la de los controles no tratados con NaCl (0 mM) pero mayor que 150 mM, 200 mM y 300 mM. Si bien se obtuvieron longitudes decrecientes, no fueron estadísticamente significativas entre 100, 150 y 200 mM. La disminución observada en la concentración de 100 mM de NaCl respecto a 50 mM tampoco fue estadísticamente significativa.

### **1.1.2 Longitud de la raíz (semana 2):**

La longitud promedio de la raíz fue para 0 mM (control, sin NaCl adicionado) de 16.65 mm, y para las concentraciones crecientes de NaCl 50, 100, 150 y 200 de 13,02, 6,36, 2,82 y 3,57 mm respectivamente. Para 300 mM siguió sin observarse germinación.

Utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, (dado que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad requerido para efectuar un ANOVA) el análisis de la varianza no paramétrico mostró que la concentración de NaCl afecta significativamente a la longitud promedio de la raíz ( $p < 0,0001$ ) a la semana 2 (H:88,52). En la comparación de a pares se obtuvo la siguiente agrupación en categorías según el tratamiento: 0 mM (D), 50 mM (D), 100 mM (C), 150 mM (B), 200 mM (B) y 300 mM (A).

Se hallaron evidencias de que la longitud promedio de la raíz en las plántulas expuestas a 100 mM superó significativamente a 200 mM, 150 mM y 300 mM, y esta última condición también se vio superada significativamente por 0 mM, 50 mM, 200 mM y 150 mM. Al igual que 200 mM y 150 mM, 100 mM fue significativamente menor en relación a 50 mM y a 0 mM. La raíz de 150 mM resultó ser más corta que la de 200 mM aunque no de manera significativa. Otra disminución no significativa se observó en 50 mM respecto a 0 mM.

### 1.1.3 Longitud de la raíz (semana 3):

La longitud promedio de la raíz fue para 0 mM (control, sin NaCl adicionado) de 17,25 mm, y para las concentraciones crecientes de NaCl 50, 100, 150 y 200 de 14,84, 6,33, 2,84 y 3,03 mm respectivamente. Para 300 mM siguió sin observarse germinación.

Utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, (dado que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad requerido para efectuar un ANOVA) el análisis de la varianza no paramétrico mostró que la concentración de NaCl afecta significativamente a la longitud promedio de la raíz ( $p < 0,0001$ ) a la semana 3 (H: 60,38). En la comparación de a pares se obtuvo la siguiente agrupación en categorías según el tratamiento: 0 mM (C), 50 mM (C), 100 mM (B), 150 mM (B), 200 mM (B) y 300 mM (A).

Hay pruebas de que la longitud promedio de la raíz en las plántulas de las condiciones 0 mM y 50 mM fue significativamente mayor a la de 100 mM, 150 mM, 200 mM y 300 mM. Adicionalmente se observó una disminución no significativa de la raíz de 50 mM respecto a la de 0 mM. La condición 100 mM mostró una raíz más larga que la de 150 mM, que a su vez superó en longitud a la de 200 mM, pero estos incrementos tampoco resultaron significativos.

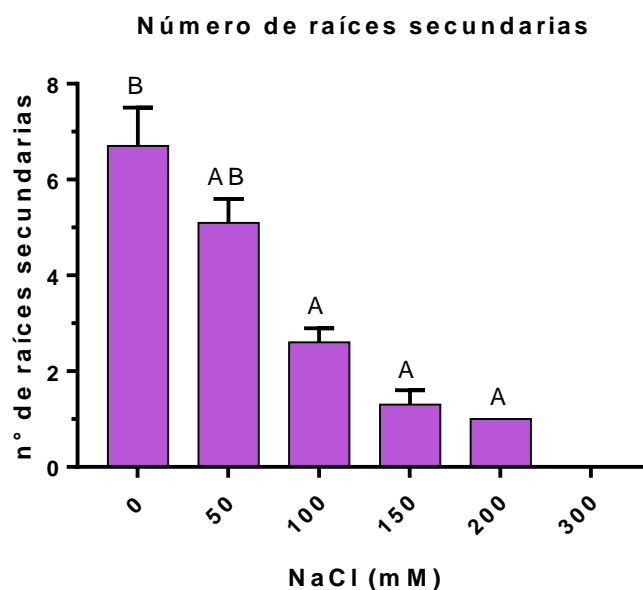
## 1.2 Otros parámetros de crecimiento de la raíz.

Además de la medición de la longitud de la raíz se determinaron otras características fenotípicas relacionadas con la germinación y el efecto de la salinidad.

Se efectuaron mediciones de: cantidad de raíces secundarias en la raíz a la semana 2, longitud del hipocotilo al día 20 de incubación, número de cotiledones y número de hojas al día 20 (incluyen las que en el futuro formarían la roseta).

En los siguientes apartados se presentan los resultados obtenidos de dichos parámetros (Figuras 5, 6, 7 y 8) y sus análisis estadísticos correspondientes.

### 1.2.1 Cantidad de raíces secundarias.



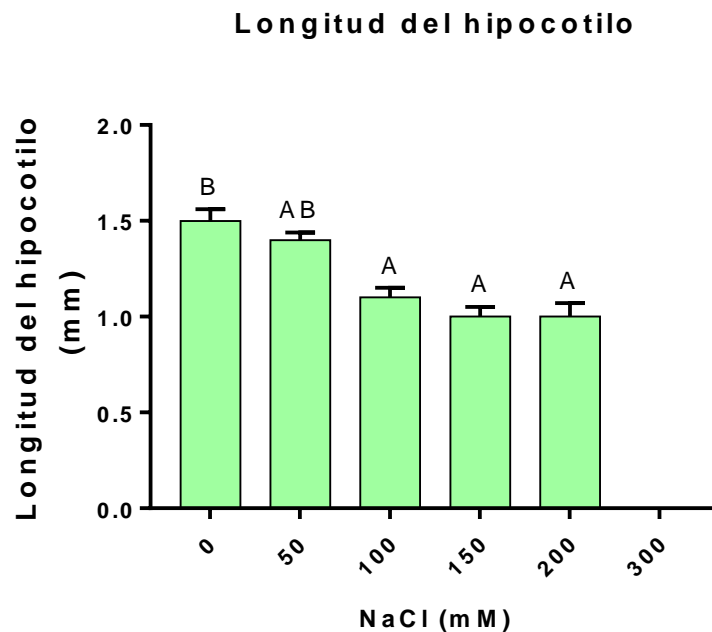
**Figura 7: Número de raíces secundarias observadas a la semana 2 para cada tratamiento de NaCl.** Las barras verticales en la parte superior de cada columna representan el SE (error estándar) de los datos de cada concentración. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) en la comparación de a pares utilizando el análisis estadístico de Kruskal-Wallis.

El número de raíces secundarias promedio en cada condición fue para 0 mM (control, sin NaCl adicionado) de 6,68 y para las concentraciones crecientes de NaCl 50, 100, 150 y 200 de 5,11, 2,63, 1,29 y 1,00 respectivamente. Para 300 mM siguió no se obtuvieron datos por la falta de germinación.

Utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, (dado que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad requerido para efectuar un ANOVA) el análisis de la varianza no paramétrico mostró que la concentración de NaCl afecta significativamente al número de raíces secundarias ( $p < 0,0001$ ) a la semana 2 de germinación (H:31,69). En la comparación de a pares se obtuvo la siguiente agrupación en categorías según el tratamiento: 0 mM (B), 50 mM (AB), 100 mM (A), 150 mM (A), 200 mM (A) y 300 mM (A).

Hay evidencias entonces de que el número de raíces secundarias en las plántulas de 0 mM fue mayor al de las condiciones 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM y 300 mM. El número de raíces secundarias fue descendiendo a mayor concentración de NaCl, aunque la disminución desde 50 mM hasta 300 mM no fue estadísticamente significativa. El número de raíces secundarias en la condición 50 mM (categoría AB) fue el único de todos los tratamientos con NaCl no resultó significativa con respecto al control de 0 mM de NaCl (categoría B).

### **1.2.2 Longitud del hipocotilo.**



**Figura 8: Longitud del hipocotilo al día 20 para cada tratamiento de NaCl.** Las barras verticales en la parte superior de cada columna representan el SE (error estándar) de los datos de cada concentración. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) en la comparación de a pares utilizando el análisis estadístico de Kruskal-Wallis.

La longitud promedio del hipocotilo en cada condición fue para 0 mM (control, sin NaCl adicionado) de 1.54 mm y para las concentraciones crecientes de NaCl 50, 100, 150 y 200 de 1,35, 1,12, 1,04 y 0,97 respectivamente. Para 300 mM no se obtuvo germinación.

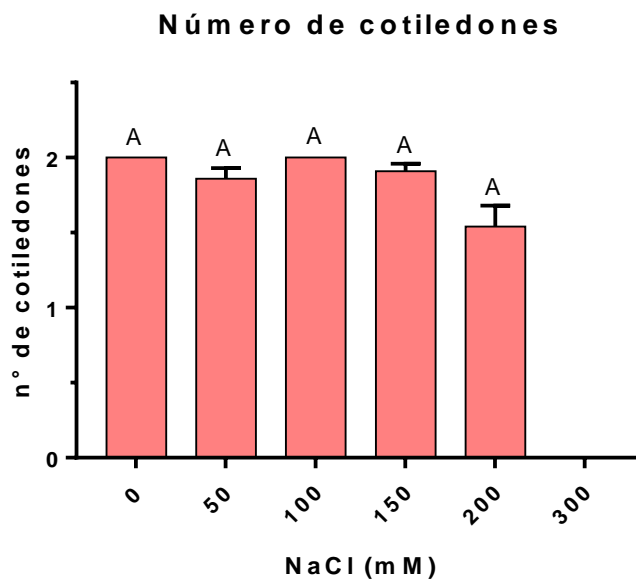
Utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, (dado que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad requerido para efectuar un ANOVA) el análisis de la varianza no paramétrico mostró que la concentración de NaCl afecta significativamente la longitud del hipocotilo ( $p < 0,0001$ ) al día 20 de la germinación (H: 45,72). En la comparación de a pares se obtuvo la siguiente agrupación en categorías según el tratamiento: 0 mM (B), 50 mM (AB), 100 mM (A), 150 mM (A), 200 mM (A) y 300 mM (A).

Se encontraron evidencias de que la longitud promedio del hipocotilo en las plántulas del grupo 0 mM fue significativamente mayor a la de 100 mM, 150 mM, 200 mM y 300 mM. También el hipocotilo de 50 mM mostró una disminución no significativa respecto a la de 0 mM. La longitud del hipocotilo fue disminuyendo de manera no significativa a mayor



concentración de NaCl. A la concentración de 300 mM se observó una inhibición total de la germinación, no apareciendo ni raíz ni hipocotilo.

### 1.2.3 Número de cotiledones.

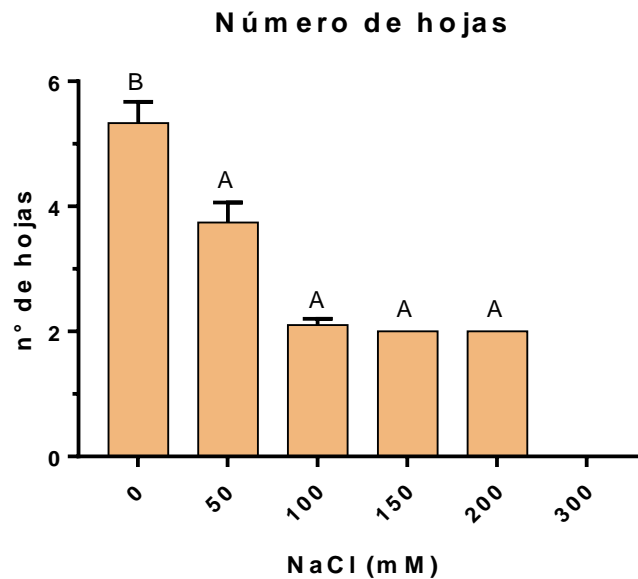


**Figura 9: Número de cotiledones contados a la semana 2 según tratamiento con NaCl.** Las barras verticales representan el SE de los datos de cada concentración por separado. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) en la comparación de a pares utilizando el análisis estadístico de Kruskal-Wallis.

El número promedio de cotiledones en cada condición fue para 0 mM (control, sin NaCl adicionado) de 2 (máximo observable para una dicotiledónea) y para las concentraciones crecientes de NaCl 50, 100, 150 y 200 de 1,86, 2,00, 1,91 y 1,54 respectivamente. Para 300 mM no se obtuvo germinación.

Utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, (dado que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad requerido para efectuar un ANOVA) el análisis de la varianza no paramétrico mostró que la concentración de NaCl no afecta significativamente la longitud del hipocotilo ( $p < 0,0001$ ) al día 20 de la germinación (H: 8,82).

### 1.2.4 Número de hojas en la plántula



**Figura 10: Número de hojas contadas al día 20 para cada tratamiento de NaCl.** Las barras verticales representan el SE de los datos de cada concentración por separado. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) en la comparación de a pares utilizando el análisis estadístico de Kruskal-Wallis.

El número promedio de hojas en cada condición fue para 0 mM (control, sin NaCl adicionado) de 5,33 y para las concentraciones crecientes de NaCl 50, 100, 150 y 200 de 3,74, 2,10, 2,00 y 2,00 respectivamente. Para 300 mM siguió no se obtuvieron datos por la falta de germinación.

Utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, (dado que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad requerido para efectuar un ANOVA) el análisis de la varianza no paramétrico mostró que la concentración de NaCl afecta significativamente el número de hojas ( $p < 0,0001$ ) al día 20 germinación (H:34,51). En la comparación de a pares se obtuvo la siguiente agrupación en categorías según el tratamiento: 0 mM (B), 50 mM (A), 100 mM (A), 150 mM (A), 200 mM (A) y 300 mM (A).

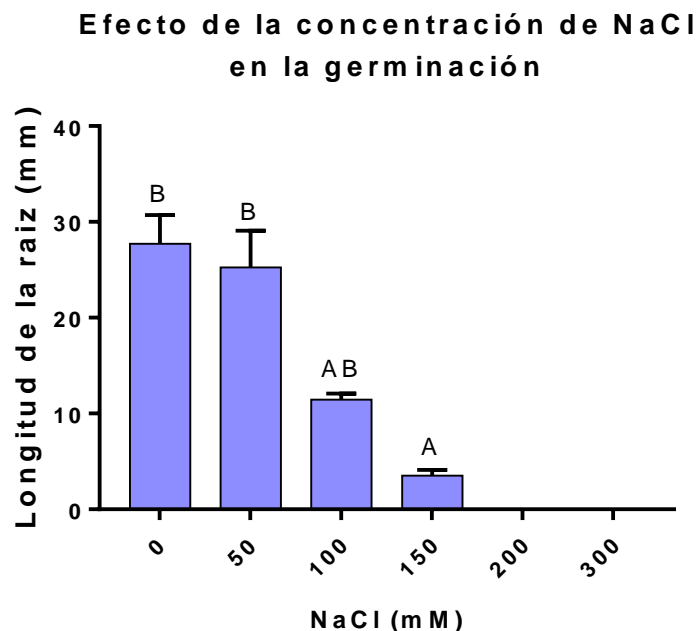
Hay pruebas para afirmar que el número de hojas en las plántulas del grupo 0 mM fue significativamente mayor al de las plántulas del resto de los tratamientos estudiados. Se pudo observar una disminución del número de hojas a mayores concentraciones de NaCl, pero las

diferencias entre las condiciones 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM y 300 mM no fueron significativas.

### 1.3.- Efecto de la concentración de NaCl (orden milimolar).

En base a los resultados obtenidos de la experiencia anterior se determinó el efecto de concentraciones crecientes de NaCl en las semillas utilizando la medida de la longitud de la raíz a las 2 semanas  $\pm 1$  día, utilizando un cantidad de semillas mayor y registro digital a fin de obtener mayor exactitud y precisión en la medición. El tiempo de medición fue seleccionado en base a experiencias previas de otros autores y los resultados obtenidos en las experiencias iniciales de cinética de la germinación previamente descriptas donde el H (estadístico de Kruskal-Wallis) fue mayor en la semana 2 respecto a las semanas 1 y 3.

#### 1.3.1 Longitud de la raíz (medición digital)

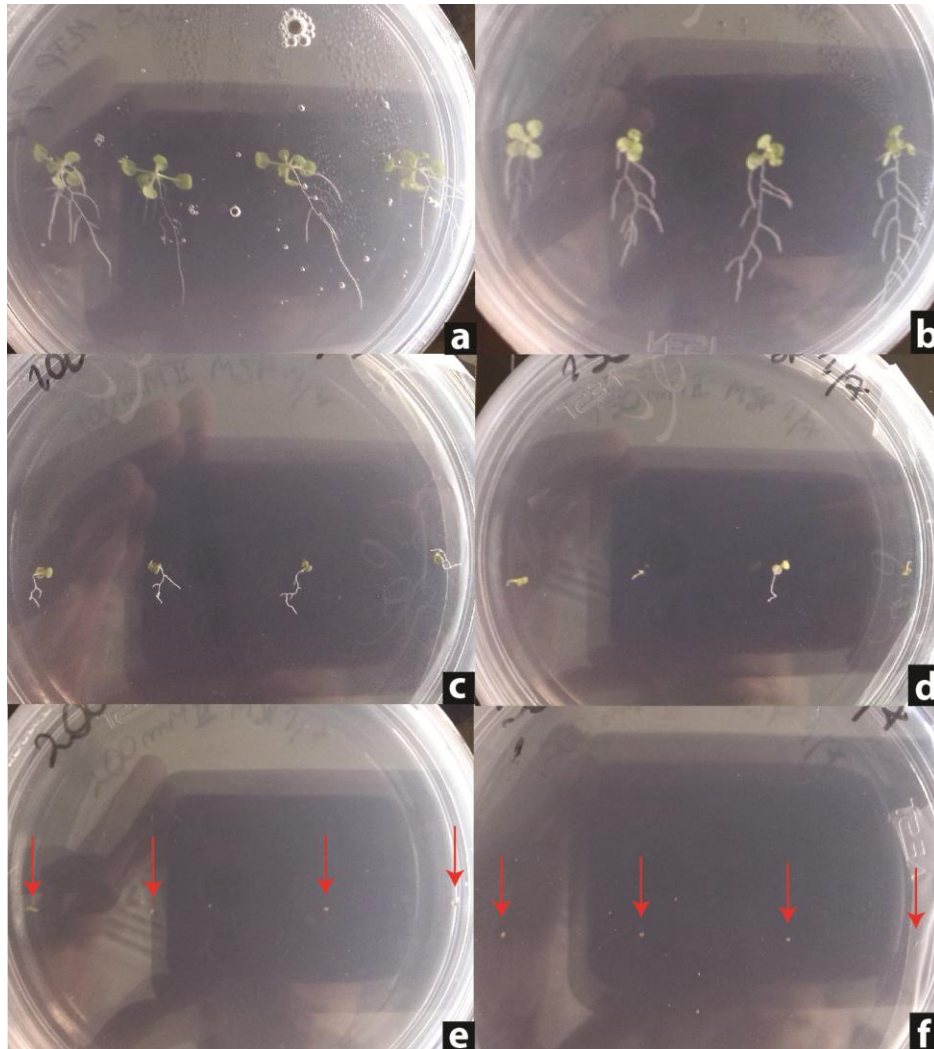


**Figura 11: Longitud de la raíz medida digitalmente al día 14 para cada tratamiento de NaCl.** Las barras verticales representan el SE de los datos de cada concentración por separado. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) en la comparación de a pares utilizando el análisis estadístico de Kruskal-Wallis.

La longitud promedio de la raíz fue para 0 mM (control, sin NaCl adicionado) de 27,73 mm, y para las concentraciones crecientes de NaCl 50, 100, 150 de 25.5, 11.44, 3.50 mm respectivamente. Para 200 y 300 mM no se observó germinación.

Utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, (dado que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad requerido para efectuar un ANOVA) el análisis de la varianza no paramétrico mostró que la concentración de NaCl afecta significativamente a la longitud promedio de la raíz ( $p=0,0003$ ) a la semana 2 (H:22,99). En la comparación de a pares se obtuvo la siguiente agrupación en categorías según el tratamiento: 0 mM (B), 50 mM (B), 100 mM (AB), 150 mM (A), 200 mM (A) y 300 mM (A).

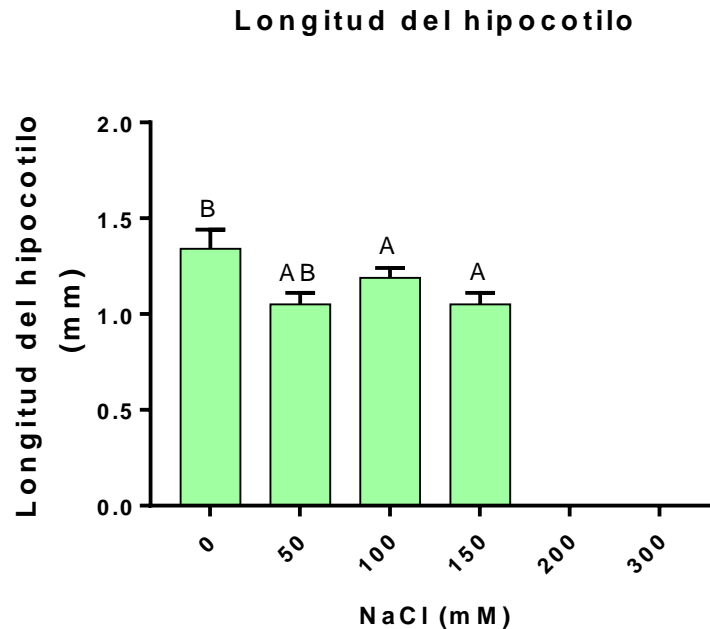
Al igual que en las experiencias de cinética la longitud promedio de la raíz medida digitalmente en las plántulas tratadas con 0 mM y 50 mM fue significativamente mayor a la de las expuestas a 150 mM, Se observó una disminución del largo de la raíz desde 0 a 100 mM pero la misma no resultó significativa entre ellas. En forma similar se registró una disminución del largo de la raíz desde 100 mM hasta 150 mM, pero la misma tampoco resultó significativa entre sí.



**Figura 12 : Semillas sembradas sobre placas con medio MSA según tratamiento salino al cabo de 16 días de incubación**

*a.- 0 mM NaCl, b.- 50 mM NaCl, c.- 100 mM NaCl, d.- 150 mM NaCl, e.- 200 mM NaCl y f.- 300 mM NaCl. Se observan cotiledones, hojas y raíces primarias y secundarias salvo para 200 mM y 300 mM donde las semillas (señaladas con flechas) no lograron germinar.*

### 1.3.2 Longitud del hipocotilo (medición digital)



**Figura 13: Longitud del hipocotilo medida digitalmente al día 14 para cada tratamiento de NaCl.** Las barras verticales representan el SE de los datos de cada concentración por separado. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) en la comparación de a pares utilizando el análisis estadístico de Kruskal-Wallis.

La longitud promedio del hipocotilo en cada condición fue para 0 mM (control, sin NaCl adicionado) de 1,34 mm y para las concentraciones crecientes de NaCl 50, 100, 150 de 1,05, 1,19, 1,05 respectivamente. Para 200 y 300 mM no se obtuvo germinación.

Utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, (dado que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad requerido para efectuar un ANOVA) el análisis de la varianza no paramétrico mostró que la concentración de NaCl afecta significativamente la longitud del hipocotilo ( $p < 0,0356$ ) al día 14 de la germinación (H: 11,92). En la comparación de a pares se obtuvo la siguiente agrupación en categorías según el tratamiento: 0 mM (B), 50 mM (A), 100 mM (AB), 150 mM (A).

Existen evidencias de que el hipocotilo en las plantas del grupo 0 mM es en promedio más largo que en el resto de las condiciones estudiadas. Esta diferencia es significativa

respecto a 50 y 150 mM pero no a 100 mM. Las concentraciones de 50 y 100 mM presentan valores no esperados según los resultados obtenidos previamente durante los estudios de cinética, esto puede deberse al menor porcentaje de semillas germinadas.



**Figura 14: Medición digital de diferentes parámetros asociados a la germinación**

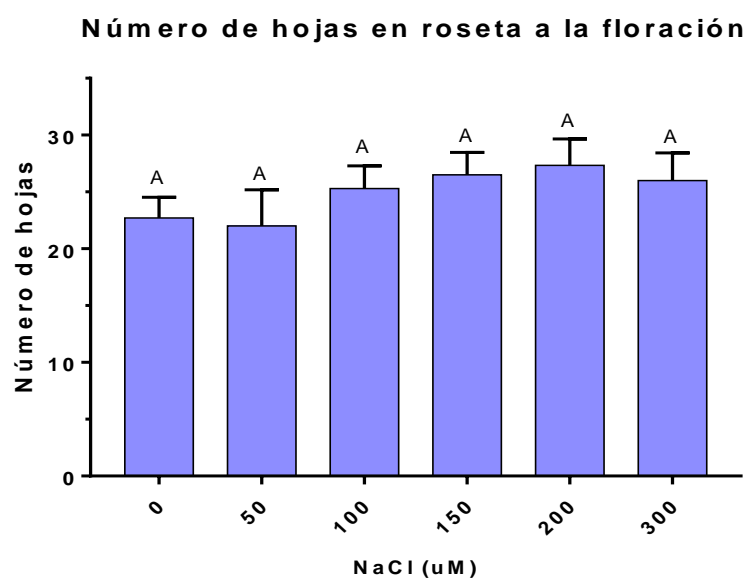
*La medición digital de diferentes parámetros asociados a la germinación en los ensayos en placa se efectuó mediante el software ZEN 2012: a.- Longitud de la raíz principal de una plántula tratada con 50 mM NaCl, 3819,6 µm.; b.- Longitud del hipocotilo de una plántula tratada con 50 mM NaCl, 1221,4 µm; c.- Número de hojas en una planta del grupo 0 mM NaCl, las flechas señalan las dos hojas visualizadas, en las cuales se observan tricomas; d.- Número de raíces secundarias en una planta del grupo 0 mM NaCl, las flechas señalan las dos raíces secundarias visualizadas. Todas las mediciones se efectuaron a los 14 días de incubación.*

En forma general en base a las experiencias en medio MS es posible inferir que la longitud de la raíz y del hipocotilo se ven afectados por los tratamientos salinos ensayados. Los valores de dichos parámetros para concentraciones superiores a 100 mM NaCl son significativamente menores a los medidos para el grupo control, y en el caso de la longitud de la raíz este efecto puede apreciarse a partir de la semana 2. El número de cotiledones no se ve alterado significativamente por la presencia de NaCl en concentraciones mM durante la germinación.

## 2. Experiencias en tierra

En esta parte se muestran los resultados para las experiencias en las que se evalúa el efecto de soluciones de NaCl en concentraciones micromolares y milimolares, CaCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> y combinadas en el ciclo de crecimiento. El parámetro seleccionado es el número de hojas en la roseta al momento de la floración.

### 2.1- Concentraciones micromolares de NaCl



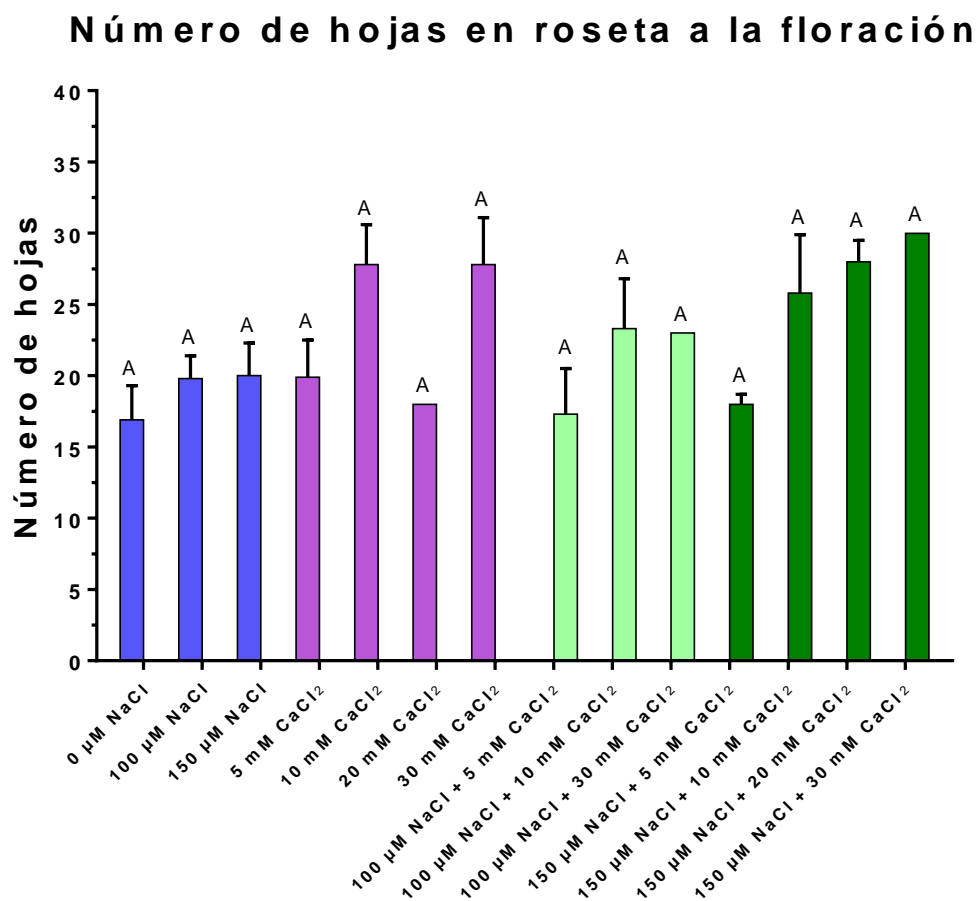
**Figura 15: Número promedio de hojas en la roseta al momento de la floración según tratamiento salino para el ensayo con NaCl micromolar. Las barras verticales representan**



el SE de los datos de cada concentración por separado. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) en la comparación de a pares por LSD Fisher utilizando el análisis estadístico de ANOVA.

El resultado del análisis de la varianza paramétrico mostró que el número promedio de hojas en la roseta al momento de la floración no se ve afectado por el tratamiento ( $p=0,57$ ) y arrojó un valor de  $F=0,77$ .

## 2.2. Concentraciones NaCl micromolares y CaCl<sub>2</sub>:



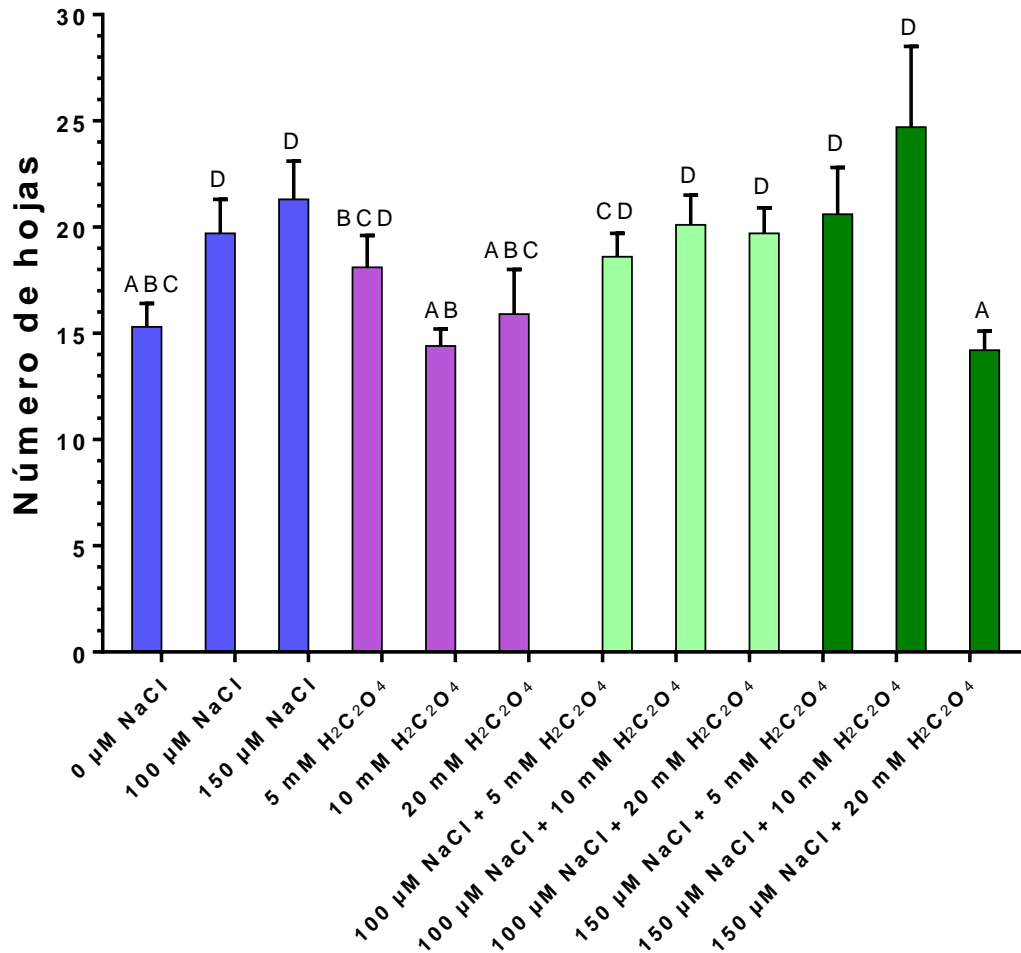
**Figura 16: Número promedio de hojas en la roseta a la floración según tratamiento salino para el ensayo con NaCl + CaCl<sub>2</sub>.** Las barras verticales representan el SE de los datos de cada concentración por separado. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) en la comparación de a pares por LSD Fisher utilizando el análisis estadístico de ANOVA.

Los valores medios obtenidos para concentración fueron (los valores entre parentesis son el número de hojas): 0  $\mu\text{M}$  NaCl (16,88), 100  $\mu\text{M}$  NaCl (19,83), 150  $\mu\text{M}$  NaCl (20,00), 5 mM  $\text{CaCl}_2$  (19,86), 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (27,80), 20 mM  $\text{CaCl}_2$  (18,00), 30 mM  $\text{CaCl}_2$  (27,75), 100  $\mu\text{M}$  NaCl + 5 mM  $\text{CaCl}_2$  (17,33), 100  $\mu\text{M}$  NaCl + 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (23,33), 100  $\mu\text{M}$  NaCl + 30 mM  $\text{CaCl}_2$  (23,00), 150  $\mu\text{M}$  NaCl + 5 mM  $\text{CaCl}_2$  (18,00), 150  $\mu\text{M}$  NaCl + 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (25,83), 150  $\mu\text{M}$  NaCl + 20 mM  $\text{CaCl}_2$  (28,00), 150  $\mu\text{M}$  NaCl + 30 mM  $\text{CaCl}_2$  (30,00).

El resultado del análisis de la varianza paramétrico de todos los tratamientos combinados mostró que el número promedio de hojas en la roseta al momento de la floración se ve afectado por las concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  y  $\mu\text{M}$  NaCl +  $\text{CaCl}_2$  pero estas diferencias no son estadísticamente significativas, ( $F=1.74$  y  $p=0,08$ ).

### **2.3 Concentraciones NaCl micromolares y $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ :**

### Número de hojas en roseta a la floración



**Figura 17: Número promedio de hojas en la roseta al momento de la floración según tratamiento salino para el ensayo con NaCl +  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ .** Las barras verticales representan el SE de los datos de cada concentración por separado. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) en la comparación de a pares utilizando el análisis estadístico de Kruskal-Wallis.

Los valores medios obtenidos para cada concentración se muestran entre paréntesis: 0  $\mu\text{M}$  NaCl (15,32), 100  $\mu\text{M}$  NaCl (19,73), 150  $\mu\text{M}$  NaCl (21,31), 5 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (18,06), 10 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (14,42), 20 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (15,93), 100  $\mu\text{M}$  NaCl + 5 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (18,55), 100  $\mu\text{M}$  NaCl + 10 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (20,12), 100  $\mu\text{M}$  NaCl + 20 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (19,71), 150  $\mu\text{M}$  NaCl + 5 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (20,64), 150  $\mu\text{M}$  NaCl + 10 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (24,67), 150  $\mu\text{M}$  NaCl + 20 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (14,24).

Utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, (dado que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad requerido para efectuar un ANOVA) el análisis de la varianza no paramétrico mostró que la concentración de  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  o  $\text{NaCl} + \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  afecta significativamente a la longitud promedio de la raíz ( $p=0,0001$ ) (H:39,91).

En la comparación de a pares se obtuvo la siguiente agrupación en categorías según el tratamiento: 0  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl}$  (ABC), 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl}$  (D), 150  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl}$  (D), 5 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (BCD), 10 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (AB), 20 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (ABC), 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl} + 5$  mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (CD), 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl} + 10$  mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (D), 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl} + 20$  mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (D), 150  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl} + 5$  mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (D), 150  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl} + 10$  mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (D), 150  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl} + 20$  mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (A).

Cuando consideramos las soluciones de 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl}$  y 150  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl}$  se observa que presentaron aumento significativo en el número de hojas con respecto al control de 0  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl}$ .

El agregado de  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  a la solución de riego aumenta poco significativamente el número de hojas de la roseta respecto a los controles cuando está presente a bajas concentraciones solo (5 mM). Todas las concentraciones de  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  producen un aumento de la cantidad de hojas siendo estadísticamente significativos para las combinaciones: 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl} + 10$  mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ; 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl} + 20$  mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ; 150  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl} + 5$  mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  y 150  $\mu\text{M}$   $\text{NaCl} + 10$  mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ .

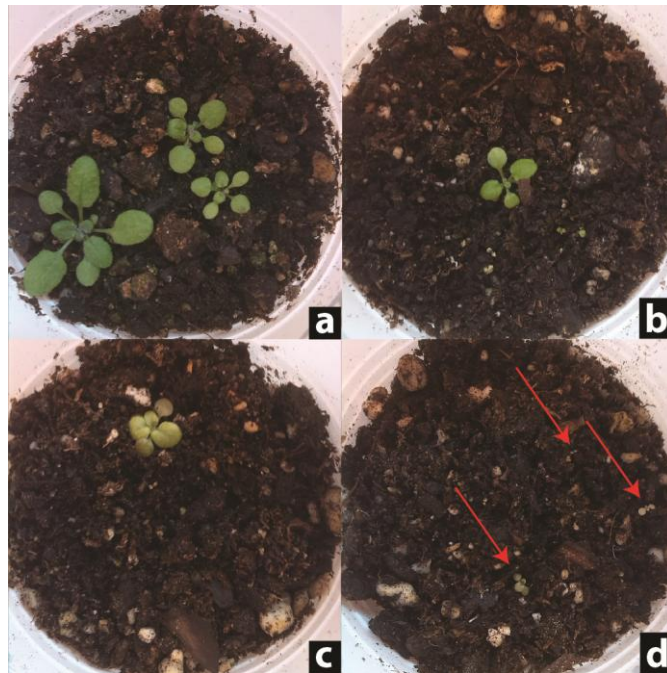
## **2.4. Crecimiento con concentraciones crecientes de $\text{NaCl}$ (orden milimolar).**

### **2.4.1 Floración**

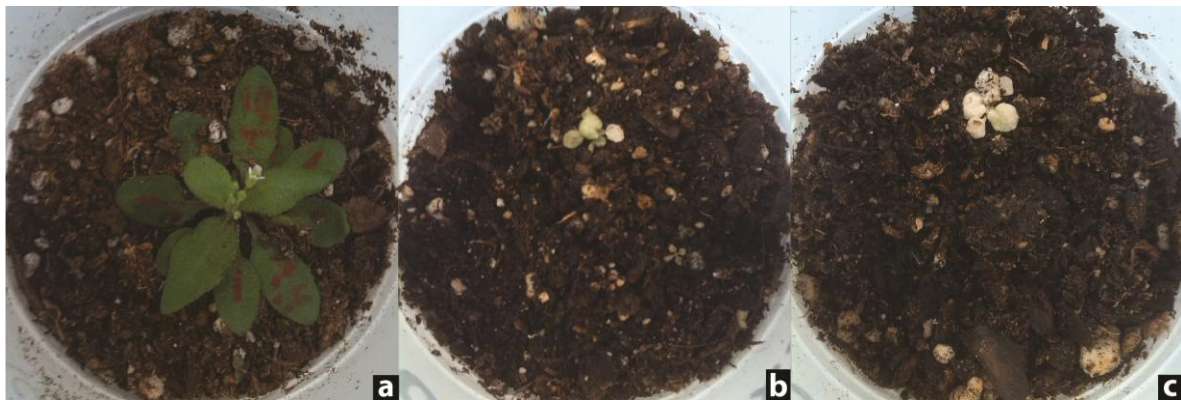
Se evaluó la influencia sobre la floración de concentraciones crecientes de  $\text{NaCl}$  (0 mM, 50 mM  $\text{NaCl}$ , 75 mM  $\text{NaCl}$  y 100 mM  $\text{NaCl}$ ) aplicadas durante el riego.

En este ensayo las únicas plantas que florecieron fueron las pertenecientes al grupo 0 mM. Al haber muerto el resto de las plantas antes de la floración no fue posible comparar el número de hojas en la roseta entre las plantas de las diferentes condiciones como se hizo en

las experiencias anteriores, por lo que se registró el tiempo promedio de floración del grupo control (0 mM), el cual resultó ser de 50,83 días, SE: 6,41 días. El número promedio de hojas en la roseta a la floración fue de 25,67 hojas, SE: 4,65.



**Figura 18: Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* en etapa temprana.** Plántulas regadas con diferentes concentraciones del orden mM de NaCl: (a) 0 mM, control (b) 50 mM (c) 75 mM (d) 100 mM. Las flechas indican plántulas de tamaño muy reducido. Todas las fotos fueron tomadas a los 21 DDT.



**Figura 19: Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* en etapa de floración.** Plántulas regadas con diferentes concentraciones del orden mM de NaCl: a.- 0

*mM, control a los 48 DDT, momento de la floración; b.- 50 mM a los 28 DDT; (c) 75 mM a los 28 DDT. Sólo en a.- se observa floración; en b.- y c.- ya se ha iniciado la senescencia.*

#### **2.4.2. Crecimiento con concentraciones crecientes de NaCl (orden milimolar) y H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> y CaCl<sub>2</sub>**

En esta experiencias se evaluó si el agregado de H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> y CaCl<sub>2</sub> protege o mejora la resistencia a la salinidad cuando se utiliza durante el riego.

Se ensayaron las concentraciones que se observan en la TABLA VIII: 0 mM NaCl, 50 mM NaCl, 75 mM NaCl, 100 mM NaCl, 50 mM NaCl+ 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl + 5 mM H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

En este ensayo las únicas plantas que florecieron fueron las pertenecientes al grupo 0 mM. No fue posible observar la floración para el resto de las condiciones de riego pues estas originaron la muerte prematura de la planta antes de la floración. El tiempo de floración del grupo control (0 mM), el cual resultó ser de 47,00 días, SE: 3,21 días. El número promedio de hojas en la roseta a la floración fue de 24,67 hojas, SE: 3,84.

El efecto de las condiciones de riego ensayadas sobre el ciclo de vida de la planta se evaluó con la senescencia o tiempo de vida de la planta, obteniéndose los siguientes valores expresados en días (entre paréntesis): 0 mM (floración) (49,5), 50 mM NaCl (24,5), 75 mM NaCl (20,5), 100 mM NaCl (24,5), 50 mM NaCl + 10 mM CaCl<sub>2</sub> (28,8) y 50 mM NaCl + 5 mM H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (37,3).

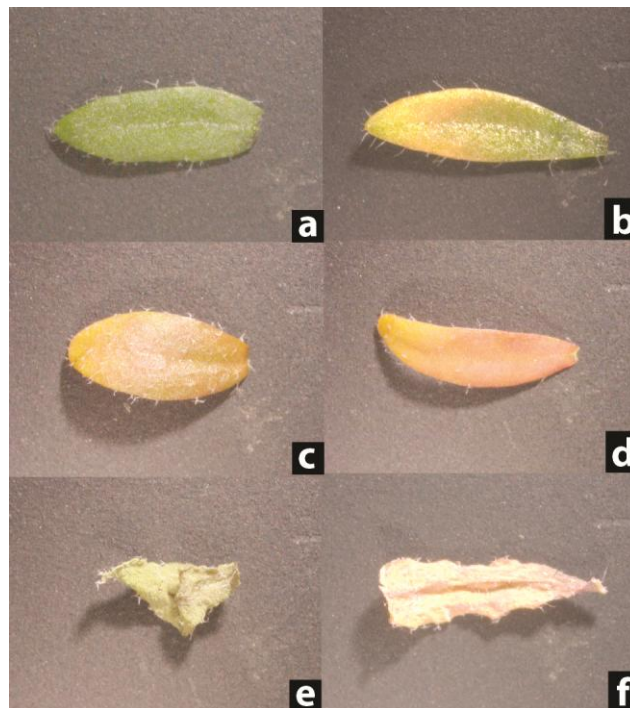
La influencia de las condiciones de riego ensayadas en la senescencia fue analizada por el método de Kruskal-Wallis porque no se cumplieron los supuestos para efectuar un análisis de la varianza paramétrico (H: 19,35; p= 0,0014. En la comparación de a pares se obtuvo la siguiente agrupación en categorías según el tratamiento: 0 mM (floración) (C), 50 mM NaCl (A), 75 mM NaCl (A), 100 mM NaCl (AB), 50 mM NaCl+ 10 mM CaCl<sub>2</sub> (AB) y 50 mM NaCl + 5 mM H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (BC).



Al momento de la floración de los controles, todas la concentraciones ensayadas presentaron una senescencia anticipada.

A su vez, las plantas tratadas con 50 mM NaCl + 5 mM H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> tardaron en promedio significativamente más en morir que las regadas con 50 mM NaCl y con 75 mM NaCl lo que mostraría un cierto efecto protector o benéfico para afrontar la tolerancia salina. También 50 mM NaCl + 5 mM H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> superó en tiempo promedio de vida a 50 mM NaCl + 10 mM CaCl<sub>2</sub> y a 100 mM NaCl, aunque de manera no significativa.

Las condiciones 50 mM NaCl + 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 50 mM NaCl y 75 mM NaCl se presentan en orden decreciente de acuerdo a su tiempo de vida, siendo las variaciones entre ellas no significativas.



**Figura 20: Hojas caulinas (del tallo) en diferentes estadios hasta llegar a la senescencia.**  
*a.- Hoja verde; b.- Hoja verde y amarillenta; c.- Hoja amarillenta con antocianinas; d.- Hoja amarillenta con mayor proporción de antocianinas; e.- Hoja seca con clorofila residual y f.- Hoja seca, descolorida, sin clorofila y con antocianinas.*

## Discusión

La salinidad es uno de los tipos de estrés abiótico más frecuentes y posee un claro efecto negativo en el ciclo de vida de la planta desde la germinación hasta la floración y la senescencia. Las plantas glicófitas han desarrollado mecanismos de tolerancia utilizando regulaciones fisiológicas, moleculares y genéticas para compensar la toxicidad propia del  $\text{Na}^+$  y el estrés osmótico y oxidativo originado. Estos mecanismos han sido parcialmente comprendidos y resulta evidente que la tolerancia a la salinidad es un proceso multifactorial.

En el presente trabajo se describen la respuesta de *Arabidopsis thaliana* a la salinidad en diferentes condiciones de cultivo y en dos estadios claves del ciclo de vida vegetal, la germinación y la floración.

La inducción de la floración es un evento central en el sitio de vida de las plantas y cuando ocurre en el momento correcto permite asegurar el éxito reproductivo y por lo tanto tiene valor adaptativo y económico. Por su importancia la floración está bajo el control de una red compleja de productos génicos que integran señales endógenas (hormonas, metabolitos) con señales ambientales (temperatura, luz).

El estudio de la germinación ha sido realizado por cultivo in vitro en placas en tanto la influencia sobre la floración se ha estudiado en cultivos en tierra en condiciones estandarizadas.

En ambos grupos de experiencias se han estudiado varios parámetros para caracterizar y cuantificar la influencia de la salinidad sobre las etapas estudiadas.

Los resultados obtenidos en las experiencias en placa donde se estudió la germinación permitieron comprobar el efecto del NaCl durante esta etapa en concentraciones similares a las existentes en suelos salinos, ya que se aprecia una disminución significativa del largo de la raíz principal en relación al grupo control. El seguimiento de las plántulas en las primeras semanas mostró que a partir de la concentración 100 mM y de la segunda semana el efecto negativo del NaCl sobre la longitud de la raíz se vuelve más notorio.



También la longitud del hipocotilo, el número de raíces secundarias y el de hojas resultaron ser significativamente afectados por el NaCl presente. El número de cotiledones fue el único parámetro que no fue modificado por la salinidad, por lo que en promedio los cotiledones aparecieron al mismo tiempo en las plántulas expuestas a NaCl que en las pertenecientes al grupo control (sin NaCl adicionado).

Estas conclusiones son válidas para el ecotipo Col-0 estudiado. Se han encontrado que otros ecotipos, por ejemplo NOK2, N1380 y N1438 son mucho más sensibles a la salinidad que Col-0. (Nasri y col., 2016).

Jhaj y col (2014) han reportado que concentraciones crecientes de NaCl no sólo disminuyen la longitud de la raíz sino que a concentraciones superiores a 130 mM también el porcentaje de germinación se ve claramente afectado. Resultados similares se obtuvieron en el presente trabajo, ya que en promedio para la semana 3 el 100% de las semillas del grupo 0 mM logró germinar, mientras que en 150 mM sólo pudo hacerlo el 67,9 %.

El método utilizado ha demostrado que puede detectar en etapas tempranas la influencia del estrés salino en las etapas iniciales del ciclo de vida y predecir el desarrollo de etapas posteriores cuando se produce un daño letal.

Las comparaciones de a pares de los resultados de las experiencias en placa demostraron que la longitud de la raíz es el parámetro de mayor utilidad en la evaluación de la respuesta a la salinidad, ya que posee la mayor variabilidad y que la raíz principal aparece tempranamente en el desarrollo de la planta. El número de raíces secundarias también sería de utilidad, aunque las mismas son de aparición más tardía y de medición más difícil, sobre todo si se estudia el crecimiento pasada la segunda semana. La longitud del hipocotilo y el número de hojas tienen grados de variación similares, aunque éstos son menores que los de la longitud de la raíz y del número de raíces secundarias.

La variabilidad biológica de estos parámetros puede ser diferente entre los ecotipos. Boyes y col (2001) reportaron, por ejemplo, coeficientes de variación (CV) de alrededor del 10 % para la longitud de la raíz a la semana 2 en tanto el ecotipo utilizado en este estudio

presentó CV considerablemente mayores (28-29 %) en varias experiencias preliminares. Independientemente de la magnitud de esta variación en la longitud de la raíz en las réplicas, ésta ha sido observada por numerosos autores (Jhaj y col, 2014), por lo que no puede ser atribuible totalmente a errores experimentales.

El  $\text{Na}^+$  es un catión indispensable para el crecimiento de las plantas. Concentraciones en el orden de  $\mu\text{M}$  actúan como micronutrientes cuando se aplican al riego y esto ha sido estudiado para numerosas plantas incluyendo entre tantas *Zea mays* (maíz) y *Solanum lycopersicum* (tomate) (Kronzucker y col, 2013). En el caso del maíz y del tomate concentraciones de NaCl de 0.1 mM y 1 mM producen un aumento del crecimiento o de la materia seca. Sin embargo existen pocos estudios respecto a *Arabidopsis thaliana*.

En las primeras experiencias realizadas, al aplicarse al riego concentraciones de NaCl entre 100 y 300  $\mu\text{M}$  se aprecia un aumento en el número de hojas de la roseta (con cierta correlación con el área foliar y materia seca) respecto al riego con agua destilada y con solución 50  $\mu\text{M}$  NaCl, pero es estadísticamente poco significativo. No se observan diferencias significativas cuando se analiza el número de hojas en la roseta para concentraciones intermedias en el rango de 100 a 300  $\mu\text{M}$ . En replicas de esta experiencia realizadas cuando se evaluaron soluciones de  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , sí se encontró que las concentraciones 100 y 150  $\mu\text{M}$  originan un mayor número de hojas en la roseta estadísticamente significativas. Esta variación de resultados puede explicarse por las condiciones experimentales y la frecuencia y volumen de agua de riego.

Se conoce que *Arabidopsis thaliana*, al igual que la mayoría de las glicófitas, es sensible a concentraciones superiores a 40 mM de NaCl y también se ha descrito que posee cierta capacidad de adaptación o tolerancia a concentraciones ligeramente mayores. Ecotipos que sobreexpresan el gen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter pueden llegar a tolerar hasta 200 mM en etapas posteriores a la germinación (Kronzucker y col, 2013).

En términos generales se acepta que *Arabidopsis thaliana* puede desarrollar cierta tolerancia a la salinidad cuando se inducen mecanismos bioquímicos apropiados. En la

mayoría de estos casos participan mecanismos de secuestro de  $\text{Na}^+$  dentro de vacuolas intracitoplasmáticas (Kronzucker, 2013)

En las experiencias para evaluar los estadios aéreos de desarrollo las concentraciones de 50 mM y mayores han inhibido totalmente la floración y originado una senescencia precoz que puede ser ligeramente mejorada con el agregado de  $\text{CaCl}_2$  y de  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ .

El  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  son sustancias presentes abundantemente en el reino vegetal. El primero está presente especialmente en las hojas cumpliendo un papel no totalmente conocido aunque existen certezas sobre varias vías metabólicas, en tanto el  $\text{Ca}^{2+}$  representa un catión fundamental en la regulación de los mecanismos intracelulares y en procesos bioquímicos.

Trabajos previos han reportado el efecto neutro del  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  sobre el crecimiento a bajas concentraciones y un efecto negativo a altas concentraciones (20 mM) sobre el crecimiento de las plantas por la inducción en genes relacionados con la muerte celular programada. El tratamiento con bajas dosis por el contrario no alteraría el desarrollo de la planta pero induciría genes relacionados con los canales de aniones que serían beneficiosos en la protección contra el estrés biótico originado por hongos (*Sclerotium rolfsii*) (Lehner y col, 2008).

Este efecto se ha reproducido en forma parcial en el presente trabajo. La exposición a 5 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  dio lugar a plantas con mayor número de hojas en la roseta al momento de la floración (media 18,1 hojas, media del control 15,3 hojas), poco significativo estadísticamente y la concentración de 20 mM (15,9 hojas) no produjo un efecto significativo negativo sobre el desarrollo cuando se compara con el riego con agua destilada (control media 15,3 hojas). Si el NaCl está presente en la solución de riego (150  $\mu\text{M}$ ), la adición de 10 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  produce un aumento significativo en el número de hojas (24,7 hojas) en tanto que la de 20 mM  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (media 14,24 hojas) produce un efecto negativo significativo respecto al grupo control de 150  $\mu\text{M}$  (21,3). Este efecto requiere mayor estudio desde el punto de vista bioquímico.

El  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  no fue capaz de contrarrestar la toxicidad salina causada por 50 mM NaCl respecto a la floración. Sin embargo, el riego con soluciones combinadas de NaCl y  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$

(50 mM NaCl + 5 mM H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) puede prolongar la vida de la planta de forma significativa respecto a la solución con 50 mM NaCl.

El CaCl<sub>2</sub> en solución ha demostrado tener un efecto limitado sobre el ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. En todas las concentraciones ensayadas esta sal sola o combinada con NaCl no produce modificaciones significativas en el número de hojas de la roseta.

Si se considera el efecto sobre la tolerancia a la salinidad (50 mM NaCl), el CaCl<sub>2</sub> a una concentración de 10 mM no contrarrestó el impacto de la salinidad sobre la floración y mejoró la senescencia de manera poco significativa respecto a las plantas cultivadas en salinidad.

En este sentido *Arabidopsis thaliana* se ha comportado como una glicófita típica y el efecto de la salinidad es más pronunciado sobre el crecimiento aéreo que sobre la germinación (Álvarez-Aragón y col, 2016). Según numerosos autores, sobre las primeras etapas (germinación) predomina el efecto de la toxicidad osmótica del Na<sup>+</sup>, inhibitorio del crecimiento de las hojas jóvenes, y más tarde el efecto principal es el de la toxicidad iónica, la cual acelera la senescencia de las hojas maduras (Attumi, 2007; Munns y Tester, 2008; Gupta y Huang, 2014; Negrão y col, 2017).

Los resultados en las diversas experiencias realizadas, tanto en placa como en tierra evidencian la utilidad de los parámetros de crecimiento estudiados en la caracterización de la respuesta a las condiciones de cultivo tanto para aquellas que mostraron un efecto como para aquellas que permanecieron sin modificaciones para este ecotipo. Bajo iguales parámetros podrían evaluarse otras condiciones de estrés (hídrico, metales pesados, térmico) y el efecto de mutaciones puntuales en determinados genes relacionados con la sensibilidad o tolerancia al estrés salino y otro carácter deseado. Por ejemplo, hay ciertos cultivos de interés económico para los cuales la floración tardía es deseable (*Saccharum officinarum*).

En el desarrollo del presente estudio se ha puesto énfasis en el estudio de parámetros cuantitativos que permitan caracterizar el efecto del estrés salino en dos etapas del ciclo de crecimiento, germinación y floración. Adicionalmente existen otras características fenotípicas

cualitativas no cuantificables que podrían incluirse en el análisis de la respuesta al estrés salino como por ejemplo observaciones histomorfológicas de las hojas o anatomomorfológicas (características de la raíz, tallos y hojas), conocidas en conjunto como morfometría.

## Conclusiones

En el presente estudio se demostró el impacto negativo significativo del NaCl sobre la mayoría de los parámetros relacionados con la germinación (longitud de la raíz, número de raíces secundarias, número de hojas y longitud del hipocotilo) y el porcentaje de germinación a partir de 100 mM, siendo la longitud de la raíz el parámetro más afectado.

En la floración no se encontró efecto significativo del NaCl uM (concentraciones en que actúa como micronutriente), tanto solo como combinado con CaCl<sub>2</sub>. El H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> tuvo una influencia variable dependiendo de la concentración de NaCl presente.

El riego con concentraciones de 50 mM de NaCl y mayores produjo la senescencia temprana de la planta respecto a los controles y en consecuencia inhibió la floración. El agregado de 5 mM H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> contrarrestó parcialmente el efecto negativo de 50 mM NaCl sobre la senescencia pero no sobre la floración.

El método usado permitió evaluar la influencia de la salinidad durante el ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana* y podría ser aplicable a la evaluación de otros ecotipos, variedades con mutaciones genómicas o manipuladas biotecnológicamente y posiblemente especies relacionadas en el contexto de estudios de fenómica.

## Bibliografía:

ABO-HAMED, S. A., et al. Plant growth, metabolism and adaptation in relation to stress conditions. IX. Endogenous levels of hormones, minerals and organic solutes in *Pisum sativum* plants as affected by salinity. *Phyton*, 1990, vol. 30, p. 187-193.

ARIGA, Hirotaka, et al. *Arabidopsis* *sos1* mutant in a salt-tolerant accession revealed an importance of salt acclimation ability in plant salt tolerance. *Plant signaling & behavior*, 2013, vol. 8, no 7, p. e24779.

ASHRAF, Muhammad; AKRAM, Nudrat Aisha. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison. *Biotechnology advances*, 2009, vol. 27, no 6, p. 744-752.

ATHAR, H. R.; ASHRAF, M. Strategies for crop improvement against salinity and drought stress: An overview. En *Salinity and water stress*. Springer Netherlands, 2009. p. 1-16.

ATTUMI, Alarbe. *A study of salt tolerance in Arabidopsis thaliana and Hordeum vulgare*. 2007. Tesis Doctoral. University of Glasgow.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. Water quality for agriculture. *FAO Irrigation and Drainage Paper (FAO)*, 1985.

BARROSO, Consuelo, et al. Salt-specific regulation of the cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase gene from *Arabidopsis thaliana* is dependent on abscisic acid. *Plant molecular biology*, 1999, vol. 40, no 4, p. 729-736

BAUDER, J. W. Interpretation of chemical analysis of irrigation water and water considered for land spreading. *Personal communication. Montana State University, Bozeman, Montana*, 2001.

BETTERIDGE, D. John. What is oxidative stress?. *Metabolism*, 2000, vol. 49, no 2, p. 3-8.

BHATTACHARYYA, Ranjan, et al. Soil degradation in India: Challenges and potential solutions. *Sustainability*, 2015, vol. 7, no 4, p. 3528-3570.

BIRBEN, Esra, et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 2012, vol. 5, no 1, p. 9.

BLUMWALD, Eduardo. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current opinion in cell biology*, 2000, vol. 12, no 4, p. 431-434.

BOHNERT, Hans J.; NELSON, Donald E.; JENSEN, Richard G. Adaptations to environmental stresses. *The plant cell*, 1995, vol. 7, no 7, p. 1099.

BOHNERT, Hans J.; SHEVELEVA, Elena. Plant stress adaptations—making metabolism move. *Current opinion in plant biology*, 1998, vol. 1, no 3, p. 267-274.

BOSE, Jayakumar, et al. Chloroplast function and ion regulation in plants growing on saline soils: lessons from halophytes. *Journal of Experimental Botany*, 2017.

BOUDSOCQ, Marie; BARBIER-BRYGOO, H el ene; LAURI ERE, Christiane. Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279, no 40, p. 41758-41766

BOYES, Douglas C., et al. Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell*, 2001, vol. 13, no 7, p. 1499-1510.

BRADY, Nyle C.; WEIL, Ray R. The Nature And Properties Of Soils. 10\* Edition. 1990.



BRAY, Elizabeth A. Plant responses to water deficit. *Trends in plant science*, 1997, vol. 2, no 2, p. 48-54.

BRECKLE, Siegmund-W. Salinity, halophytes and salt affected natural ecosystems. En *Salinity: environment-plants-molecules*. Springer Netherlands, 2002. p. 53-77.

BROUWER, C, et al. Irrigation Water Management: Training Manual No. 1-Introduction to Irrigation. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy*, 1985, p. 102-103. *Chapter 4 - Drainage water re-use* [online]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/w7224e/w7224e08.htm>

CHEESEMAN, John M. Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant physiology*, 1988, vol. 87, no 3, p. 547-550.

CHEN, Rong, et al. The *Arabidopsis* mediator subunit MED25 differentially regulates jasmonate and abscisic acid signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors. *The Plant Cell*, 2012, vol. 24, no 7, p. 2898-2916

CHU, Chun, et al. Induction of Crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* by abscisic acid. *Plant Physiology*, 1990, vol. 93, no 3, p. 1253-1260.

CLARKE, C. J., et al. Dryland salinity in south-western Australia: its origins, remedies, and future research directions. *Soil Research*, 2002, vol. 40, no 1, p. 93-113.

CORWIN, D. L., et al. Assessment and field-scale mapping of soil quality properties of a saline-sodic soil. *Geoderma*, 2003, vol. 114, no 3, p. 231-259.

CRAMER, Grant R. Sodium-calcium interactions under salinity stress. En *Salinity: Environment-plants-molecules*. Springer Netherlands, 2002. p. 205-227.

DE AZEVEDO NETO, André Dias, et al. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, vol. 56, no 1, p. 87-94.

ERRAKHI, Rafik, et al. Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. *Journal of Experimental Botany*, 2008, vol. 59, no 11, p. 3121-3129.

FAGERIA, Nand Kumar. *Maximizing crop yields*. CRC Press, 1992, p 189-193.

FELISA, Giada, et al. Saltwater Intrusion in Coastal Aquifers: A Primary Case Study along the Adriatic Coast Investigated within a Probabilistic Framework. *Water*, 2013, vol. 5, no 4, p. 1830-1847.

FLOWERS, T. J.; TROKE, P. F.; YEO, A. R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual review of plant physiology*, 1977, vol. 28, no 1, p. 89-121.

FLOWERS, Timothy John, et al. Breeding for salt tolerance in crop plants—the role of molecular biology. *Acta Physiologiae Plantarum*, 1997, vol. 19, no 4, p. 427-433.

FOSTER, Justin, et al. A previously unknown oxalyl-CoA synthetase is important for oxalate catabolism in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 2012, vol. 24, no 3, p. 1217-1229

FOSTER, Justin; LUO, Bin; NAKATA, Paul A. An oxalyl-CoA dependent pathway of oxalate catabolism plays a role in regulating calcium oxalate crystal accumulation and defending against oxalate-secreting phytopathogens in *Medicago truncatula*. *PLoS one*, 2016, vol. 11, no 2, p. e0149850.

GABER, A. M. Response of water stressed *Vigna sinensis* plants to application of IAA and/or oxalic acid. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2003, vol. 6, no 5, p. 514-524.

GHASSEMI, Fereidoun, et al. *Salinisation of land and water resources: human causes, extent, management and case studies*. CAB international, 1995.

GREENWAY, H.; MUNNS, Rana. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual review of plant physiology*, 1980, vol. 31, no 1, p. 149-190.

GUPTA, Bhaskar; HUANG, Bingru. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International journal of genomics*, 2014, vol. 2014.

HANDBOOK, Western Fertilizer. Produced by the soil improvement committee of the California fertilizer association. 1995.

HANSON, Blaine, et al. *Agricultural salinity and drainage*. University of California Irrigation Program, University of California, Davis, 1999.

HASEGAWA, Paul M., et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biology*, 2000, vol. 51, no 1, p. 463-499.

HEGEDUS, Dwayne D.; RIMMER, S. Roger. Sclerotinia sclerotiorum: when “to be or not to be” a pathogen?. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, vol. 251, no 2, p. 177-184.

HERNÁNDEZ, Agustín, et al. Mutants of the *Arabidopsis thaliana* Cation/H<sup>+</sup> antiporter AtNHX1 conferring increased salt tolerance in Yeast the endosome/prevacuolar compartment is a target for salt toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, vol. 284, no 21, p. 14276-14285.

HONG, Suk Whan, et al. Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology*, 1997, vol. 113, no 4, p. 1203-1212.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant biology*, 1996, vol. 47, no 1, p. 377-403.

JAKAB, Gabor, et al. Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiology*, 2005, vol. 139, no 1, p. 267-274.

JAMIL, A., et al. Gene expression profiling of plants under salt stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2011, vol. 30, no 5, p. 435-458.

JAVID, Majid Ghorbani, et al. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. *Australian Journal of Crop Science*, 2011, vol. 5, no 6, p. 726.

JAYAKANNAN, Maheswari, et al. Salicylic acid improves salinity tolerance in *Arabidopsis* by restoring membrane potential and preventing salt-induced K<sup>+</sup> loss via a GORK channel. *Journal of Experimental Botany*, 2013, vol. 64, no 8, p. 2255-2268.

JAYAKANNAN, Maheswari, et al. Salicylic acid in plant salinity stress signalling and tolerance. *Plant Growth Regulation*, 2015, vol. 76, no 1, p. 25-40.

JESCHKE, W. D. K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance. 1984.

JHAJ, Sunjum K., et al. The effect of salinity on hypocotyl and radicle length of *Arabidopsis thaliana*. *The Expedition*, 2014, vol. 3.

JI, Hongtao, et al. The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Molecular plant*, 2013, vol. 6, no 2, p. 275-286.

KADER, Md Abdul; LINDBERG, Sylvia. Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant signaling & behavior*, 2010, vol. 5, no 3, p. 233-238.

KAMIŃSKI, Piotr, et al. Enzymatic antioxidant responses of plants in saline anthropogenic environments. En *Plant Science*. InTech, 2012.

KANCHEVA, Rumiana; GEORGIEV, Georgi; BORISOVA, Denitsa. Optical remote sensing of salt-affected soils, 2015.

KOORNNEEF, Maarten; MEINKE, David. The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal*, 2010, vol. 61, no 6, p. 909-921.

KRONZUCKER, Herbert J., et al. Sodium as nutrient and toxicant. *Plant and soil*, 2013, vol. 369, no 1-2, p. 1-23.

KULIK, Anna, et al. SnRK2 protein kinases—key regulators of plant response to abiotic stresses. *OmicS: a journal of integrative biology*, 2011, vol. 15, no 12, p. 859-872.

LACK, Andrew J.; EVANS, David E. *Plant biology*. Garland Science, 2005, p.5.

LANG, Karl, et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2005, vol. 15, no 5, p. 195-202.

LEHNER, Arnaud, et al. Toxic and signalling effects of oxalic acid: Oxalic acid—Natural born killer or natural born protector?. *Plant signaling & behavior*, 2008, vol. 3, no 9, p. 746-748.

LIU, Jiping, et al. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, vol. 97, no 7, p. 3730-3734.

LIU, Jian - Xiang, et al. Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *The Plant Journal*, 2007, vol. 51, no 5, p. 897-909.

LOU, He Qiang, et al. An oxalyl-CoA synthetase is involved in oxalate degradation and aluminum tolerance. *Plant physiology*, 2016, vol. 172, no 3, p. 1679-1690.

MAAS, E. V.; GRIEVE, C. M. Sodium - induced calcium deficiency in salt - stressed corn. *Plant, Cell & Environment*, 1987, vol. 10, no 7, p. 559-564.

MAAS, Eugene V.; HOFFMAN, Glenn J. Crop salt tolerance—current assessment. *Journal of the irrigation and drainage division*, 1977, vol. 103, no 2, p. 115-134.

MAATHUIS, Frans JM. Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of Experimental Botany*, 2013, vol. 65, no 3, p. 849-858.

MARTINEZ, Santiago Alejandro. *Identificación de mutantes de Arabidopsis thaliana resistentes a norespermidina. Clonación y caracterización de una sulfidril oxidasa*. 2008. Tesis Doctoral.

MILLALEO, R., et al. Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *Journal of soil science and plant nutrition*, 2010, vol. 10, no 4, p. 470-481.

MIZOGUCHI, Tsuyoshi, et al. Identification of a possible MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two - hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants. *FEBS letters*, 1998, vol. 437, no 1-2, p. 56-60.

MIURA, Kenji, et al. Increased tolerance to salt stress in the phosphate-accumulating *Arabidopsis* mutants siz1 and pho2. *Planta*, 2011, vol. 234, no 6, p. 1191-1199.

Molecular & Developmental Biology (BIOL3530). *Memorial University of Newfoundland* [online].

Available from: [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO\\_07/ch07f01.jpg](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_07/ch07f01.jpg)

MUNNS, Rana; TESTER, Mark. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2008, vol. 59, p. 651-681.

NAKATA, Paul A. An assessment of engineered calcium oxalate crystal formation on plant growth and development as a step toward evaluating its use to enhance plant defense. *PLoS one*, 2015, vol. 10, no 10, p. e0141982.

NASRI, Nawel, et al. Effect of salinity on *Arabidopsis thaliana* seed germination and acid phosphatase activity. *Archives of Biological Sciences*, 2016, vol. 68, no 1, p. 17-23.

NAZAR, Rahat, et al. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. *Journal of Plant Physiology*, 2011, vol. 168, no 8, p. 807-815.

NEGRÃO, Sónia, et al. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of botany*, 2017, vol. 119, no 1, p. 1-11.

PARDO, Jose M.; QUINTERO, Francisco J. Plants and sodium ions: keeping company with the enemy. *Genome Biology*, 2002, vol. 3, no 6, p. reviews1017. 1.

PARIDA, Asish Kumar; DAS, Anath Bandhu. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2005, vol. 60, no 3, p. 324-349.

PARK, Hee Jin, et al. A new insight of salt stress signaling in plant. *Molecules and cells*, 2016, vol. 39, no 6, p. 447.

PASSARDI, Filippo, et al. Morphological and physiological traits of three major *Arabidopsis thaliana* accessions. *Journal of plant physiology*, 2007, vol. 164, no 8, p. 980-992.

PIAO, Hai Lan, et al. An *Arabidopsis* GSK3/shaggy-like gene that complements yeast salt stress-sensitive mutants is induced by NaCl and abscisic acid. *Plant Physiology*, 1999, vol. 119, no 4, p. 1527-1534.

POPOVA, Losanka P., et al. Involvement of abscisic acid in photosynthetic process in *Hordeum vulgare* L. during salinity stress. *Journal of plant growth regulation*, 1995, vol. 14, no 4, p. 211.

QADIR, Manzoor, et al. Economics of salt - induced land degradation and restoration. En *Natural Resources Forum*. 2014. p. 282-295.

QUESADA, Víctor, et al. Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 2000, vol. 154, no 1, p. 421-436.

QURESHI, Asad Sarwar; AHMAD, Waqas; AHMAD, Al - Falahi A. Optimum groundwater table depth and irrigation schedules for controlling soil salinity in central Iraq. *Irrigation and Drainage*, 2013, vol. 62, no 4, p. 414-424.

RACCHI, Milvia Luisa. Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus* spp. *Antioxidants*, 2013, vol. 2, no 4, p. 340-369

RAHMAN, M. M., et al. Effect of salinity stress on dry matter yield and oxalate content in napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach). *Asian-Aust. J. Anim. Sci*, 2008, vol. 21, no 11, p. 1599-1603.

RAPALA-KOZIK, Maria, et al. The upregulation of thiamine (vitamin B 1) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings under salt and osmotic stress conditions is mediated by abscisic acid at the early stages of this stress response. *BMC plant biology*, 2012, vol. 12, no 1, p. 2.



RHOADES, J. D. Potential for using saline agricultural drainage waters for irrigation [of salt tolerant crops]. En *ASCE Irrigation and Drainage Division Specialty Conference on Water Management for Irrigation and Drainage. Reno, Nevada (USA). 20-22 Jul 1977*. 1977.

RIPOLL SAMPER, Juan José. 2004. *Análisis genético y molecular de PEP1, un gen implicado en la morfogénesis del fruto de Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral.

RUGGIERO, Bruno, et al. Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto1/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 2004, vol. 136, no 2, p. 3134-3147.

RYU, Hojin; CHO, Yong-Gu. Plant hormones in salt stress tolerance. *Journal of Plant Biology*, 2015, vol. 58, no 3, p. 147-155.

SALEKI, Reza, et al. Mutants of *Arabidopsis thaliana* capable of germination under saline conditions. *Plant Physiology*, 1993, vol. 101, no 3, p. 839-845.

SÁNCHEZ, Ramón Mauricio; DUNEL GUERRA, Luciana; SCHERGER, Maira. Evaluación de las áreas bajo riego afectadas por salinidad y/o sodicidad en Argentina. 2015.

SCHACHTMAN, Daniel; LIU, Weihong. Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends in plant science*, 1999, vol. 4, no 7, p. 281-287.

SHABALA, Sergey (ed.). *Plant stress physiology*. Cabi, 2017, p. 62.

SHI, Huazhong, et al. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, vol. 97, no 12, p. 6896-6901.

SHINOZAKI, Kazuo; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant physiology*, 1997, vol. 115, no 2, p. 327.

SONG, Jian Bo, et al. miR394 and LCR are involved in *Arabidopsis* salt and drought stress responses in an abscisic acid-dependent manner. *BMC plant biology*, 2013, vol. 13, no 1, p. 210.

STANISLAS, Thomas, et al. *Arabidopsis* D6PK is a lipid domain-dependent mediator of root epidermal planar polarity. *Nature plants*, 2015, vol. 1, no 11, p. 15162.

TABOADA, Miguel A., et al. Inundaciones en la región pampeana. Consecuencias sobre los suelos. *Alteraciones de la fertilidad de los suelos: el halomorfismo, la acidez, el hidromorfismo y las inundaciones*. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 2009, p. 103-127.

TABOADA, Miguel A.; LAVADO, R. S. Funcionamiento de los suelos salinos y sódicos. En *Actas XVI Congreso de Aapresid*, pag. 2008. p. 339-348.

TANG, X., et al. Global plant-responding mechanisms to salt stress: physiological and molecular levels and implications in biotechnology. *Critical reviews in biotechnology*, 2015, vol. 35, no 4, p. 425.

TANJI, Kenneth K. Salinity in the soil environment. En *Salinity: Environment-plants-molecules*. Springer, Dordrecht, 2002. p. 21-51.

TRIPATHI, Bhumi Nath; MÜLLER, Maria (ed.). *Stress responses in plants: Mechanisms of toxicity and tolerance*. Springer, 2015, p. 81.

TRIPATHI, R. S. *Alkali land reclamation*. Mittal Publications, 2009, p 19.

TRIPATHY, Baishnab Charan; OELMÜLLER, Ralf. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, vol. 7, no 12, p. 1621.

TSUGANE, Kazuo, et al. A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell*, 1999, vol. 11, no 7, p. 1195-1206.

TURAN, Satpal, et al. Salinity tolerance in plants: breeding and genetic engineering. *Australian Journal of Crop Science*, 2012, vol. 6, no 9, p. 1337.

TUTEJA, Narendra. Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant signaling & behavior*, 2007, vol. 2, no 3, p. 135-138.

USDA, N. R. C. S. Salinity Management Guide - Salt Management. Soil Conservationists, 2002.

WANG, Xiaoping, et al. The small ethylene response factor ERF96 is involved in the regulation of the abscisic acid response in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 2015, vol. 6.

WEIGEL, Detlef; GLAZEBROOK, Jane. *Arabidopsis: a laboratory manual*. CSHL Press, 2002.

WERNER, Joanna E.; FINKELSTEIN, Ruth R. *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiologia Plantarum*, 1995, vol. 93, no 4, p. 659-666.

WIESMAN, Zeev. *Desert olive oil cultivation: advanced bio technologies*. Academic Press, 2009, p. 87-133

WILKINS, Katie A., et al. Calcium-mediated abiotic stress signaling in roots. *Frontiers in plant science*, 2016, vol. 7.

WILKINSON, Sally; DAVIES, William J. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, cell & environment*, 2010, vol. 33, no 4, p. 510-525.

XIONG, Liming; ZHU, Jian - Kang. Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiologia plantarum*, 2001, vol. 112, no 2, p. 152-166.

XIONG, Liming; ZHU, Jian-Kang. Salt tolerance. *The Arabidopsis book*, 2002, p. e0048.

XU, Chongzhi, et al. Salinity tolerance mechanism of economic halophytes from physiological to molecular hierarchy for improving food quality. *Current genomics*, 2016, vol. 17, no 3, p. 207-214.

YANG, Qing, et al. Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 2009, vol. 2, no 1, p. 22-31.

YEO, Anthony. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, 1998, vol. 49, no 323, p. 915-929.

ZHU, Jian-Kang. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2000, vol. 124, no 3, p. 941-948.

ZHU, Jian-Kang. Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, 2001, vol. 6, no 2, p. 66-71.(a)

ZHU, Jian-Kang. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current opinion in plant biology*, 2001, vol. 4, no 5, p. 401-406. (b)

ZHU, Jian-Kang. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 2002, vol. 53, no 1, p. 247-273.

## ANEXO 1

*Medio de cultivo:* Se empleó el medio de cultivo basal Murashige-Skoog con vitaminas (PhytoTechnology Laboratories, TM), cuya formulación se detalla en la siguiente tabla:

Componente	Concentración (mg/l)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
CaCl <sub>2</sub> , anhidro	332,2
CoCl <sub>2</sub> •6 H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> •2 H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O	37,26
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	27,8
MgSO <sub>4</sub> , anhidro	180,7
MgSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	16,9
Ácido molíbdico (sal de sodio)•2H <sub>2</sub> O	0,25
KI	0,83
KNO <sub>3</sub>	1900
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , monobásico	170
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	8,6
Glicina (base libre)	2
Mio-inositol	100
Ácido nicotínico (ácido libre)	0,5
Piridoxina HCl	0,5
Tiamina HCl	0,1