



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2  
como sistema modelo en el estudio  
de la adaptación al estrés salino**

JESÚS GARCÍA DE LA GARMA GARCÍA

2013



D. **Enrique Manuel Olmos Aranda**, Investigador Científico, y Dña. **Nieves Fernández García**, Investigadora Contratada del Programa Ramón y Cajal, del Grupo de Estrés Abiótico, Producción y Calidad del Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC)

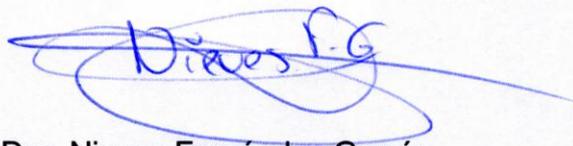
AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2 como sistema modelo en el estudio de la adaptación al estrés salino**”, realizada por **D. Jesús García de la Garma García** bajo nuestra inmediata dirección y supervisión para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, a 31 de mayo de 2013



Fdo.: Dr. Enrique Manuel Olmos Aranda



Fdo.: Dra. Nieves Fernández García





D. **Manuel Acosta Echeverría**, Catedrático de Universidad del Área de Fisiología Vegetal en el Departamento de Biología Vegetal

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2 como sistema modelo en el estudio de la adaptación al estrés salino**”, realizada por **D. Jesús García de la Garma García** en el Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), bajo la dirección de D. Enrique Manuel Olmos Aranda y Dña. Maria Nieves Fernández García.

Para que así conste a los efectos oportunos, como tutor de la Tesis anteriormente citada, doy mi aprobación para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 31 de mayo de 2013

Fdo.: Manuel Acosta Echeverría



## *AGRADECIMIENTOS*

*Quisiera mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado en la realización de esta Tesis Doctoral:*

*Al Dr. Enrique Manuel Olmos Aranda y la Dra. María Nieves Fernández García, codirectores de este trabajo, por la confianza que depositaron en mí y la oportunidad que me brindaron de iniciarme en el mundo de la investigación. Gracias por todo vuestro esfuerzo, apoyo y dedicación, que han posibilitado la elaboración del presente manuscrito.*

*A los Drs. Peter Heden y Stephen Thomas del Plant Biology and Crop Science-Rothamsted Research Institute por sus valiosas aportaciones en los estudios relacionados con las giberelinas.*

*Al Dr. Roque Bru Martínez del Grupo de Proteómica y Genómica Funcional de Plantas de la Universidad de Alicante por su colaboración en los estudios de proteómica.*

*Al personal de la Sección Universitaria de Microscopía de la Universidad de Murcia (Maruja, Manolí, Jose Joaquín y Paco) por su colaboración en los trabajos de microscopía.*

*Al personal de la Sección de Biología Molecular de la Universidad de Murcia (César, Alejandro y María José) por su colaboración en los trabajos de biología molecular.*

*A mis compañeros de laboratorio, el Dr. José Salvador Rubio Asensio, Enas Abdalla Bardisi y Beatriz Pallol Igeño, por todo lo que me habéis enseñado dentro y fuera del ámbito científico y por vuestro apoyo incondicional.*

*A la Dra. Carmen López Berenguer, por ofrecerme su amistad. Espero que tengas la mejor de las suertes.*

*Al Dr. Carlos García Almodóvar, por acogerme con los brazos abiertos al llegar al CEBAS-CSIC y por estar siempre cuando lo necesitaba.*

*Al Dr. José Antonio Hernández Cortés y su grupo (José Ramón, Pedro, Gregorio y María José), así como a los Drs. Lorenzo Burgos Ortiz y Abel Piqueras Castillo, por hacer el día a día mucho más ameno, por vuestra generosidad y calidad humana.*

*A toda la gente que a lo largo de esta etapa compartieron conmigo inquietudes, penas y alegrías (Elenilla, Wang Hong, César, Lydia, Sandra, Ana, Irene, Lauri, Pepa, José Ramón, Félix, Luna, Nuria, Blanca, Mari Carmen, Cristina y Jorge). Os echaré de menos.*

*A mis padres, Jesús y Margarita, por su dedicación, esfuerzo y sacrificio. Muchas gracias por todo lo que me habéis dado a cambio de nada. Siempre os tengo en la mente. A mi abuela Lola, mi hermana Raquel. Os quiero.*

*A Almudena Botas Cutillas, por estar siempre a mi lado. Gracias por tu apoyo, confianza, cariño y comprensión. Te AMNIQUE.*

*Y en general, a todas aquellas personas que en algún momento, durante estos últimos cuatro años, se interesaron por mi trabajo. Gracias a todos de corazón.*

*A mis padres,  
Jesús y Margarita.*



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ABREVIATURAS	XV
RESUMEN	XIX

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Salinidad</b> .....	<b>1</b>
1.1. Estrés en plantas.....	1
1.2. Salinidad y agricultura .....	2
1.3. Efecto de la salinidad sobre las plantas.....	3
1.4. Tolerancia a la salinidad en plantas.....	5
1.4.1. Respuesta fisiológica al estrés osmótico inducido por salinidad.....	8
1.4.1.1. Papel de la prolina en el estrés salino. ....	9
1.4.2. Respuesta fisiológica al estrés iónico y nutricional inducido por salinidad .....	10
1.4.2.1. Exclusión de Na <sup>+</sup> .....	11
1.4.2.2. Regulación celular de Na <sup>+</sup> y su compartimentación vacuolar .....	11
1.4.2.3. Excreción de sales .....	15
1.4.2.4. Suculencia.....	15
1.4.3. Respuesta fisiológica al estrés oxidativo inducido por salinidad.....	15
1.4.3.1. Formación de ROS.....	16
1.4.3.2. Papel fisiológico de las ROS en los sistemas vegetales .....	17
1.4.3.3. Sistemas antioxidantes.....	17
1.4.3.4. Señalización celular mediada por ROS .....	18
1.5. Muerte celular programada y estrés salino .....	19
1.6. Las ómicas y su importancia en el estudio de la salinidad.....	21
1.7. Cultivos celulares como herramienta en investigación.....	22
1.7.1. Perspectiva histórica.....	22

1.7.2. Establecimiento de un cultivo celular vegetal .....	25
<b>2. Giberelinas .....</b>	<b>28</b>
2.1. Estructura.....	28
2.2. Actividad biológica.....	29
2.3. Biosíntesis.....	30
2.4. Desactivación .....	33
2.5. Regulación de la ruta de biosíntesis .....	34
2.6. Ruta de señalización .....	35
2.7. Inhibidores de la síntesis .....	38
2.8. Efectos fisiológicos producidos por las giberelinas. ....	43
2.9. Implicación de las GAs en la respuesta al estrés salino .....	45
2.10. Relación entre las proteínas DELLA, ácido abscísico y etileno en la respuesta al estrés salino.....	47
<b>3. Pared celular vegetal .....</b>	<b>48</b>
3.1. Arquitectura de la pared celular vegetal primaria.....	48
3.2. Proteínas ricas en arabinogalactanos (AGPs) .....	52
3.2.1. Estructura y función .....	52
3.2.2. Herramientas para su estudio .....	54
3.2.3. AGPs y salinidad.....	56
3.3. Extensinas (EXTs).....	57
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
<b>1. Material vegetal .....</b>	<b>63</b>
<b>2. Parámetros de crecimiento .....</b>	<b>65</b>
2.1. Curvas de crecimiento.....	65
2.2. Viabilidad celular .....	66
2.3. Índice mitótico .....	66
2.4. Volumen celular.....	66
<b>3. Determinación del contenido mineral.....</b>	<b>67</b>
3.1. Cationes.....	67
3.2. Aniones .....	67
<b>4. Determinación de solutos orgánicos.....</b>	<b>68</b>

---

4.1. Azúcares solubles .....	68
4.2. Aminoácidos.....	69
<b>5. Determinación de proteínas .....</b>	<b>69</b>
<b>6. Determinación de compuestos relacionados con el estrés oxidativo... ..</b>	<b>70</b>
6.1. Peroxidación lipídica (formación de malondialdehído) .....	70
6.2. Determinación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	70
<b>7. Técnicas de microscopía.....</b>	<b>71</b>
7.1. Microscopía de láser confocal .....	71
7.2. Microscopía electrónica de transmisión .....	73
7.2.1. Inclusión de muestras en resina SPURR .....	73
7.2.2. Inclusión de muestras en resina LR White .....	74
7.3. Microscopía óptica (MO) .....	74
<b>8. Muerte celular programada (PCD). Ensayos TUNEL y caspasas .....</b>	<b>75</b>
<b>9. Ensayos inmunocitoquímicos.....</b>	<b>75</b>
9.1. Inmunolocalización de AGPs y extensinas .....	76
9.2. Inmunolocalización de ácido abscísico .....	76
9.3. Inmunolocalización de glutatión.....	77
9.4. Inmuno-dot AGPs.....	77
<b>10. Tratamientos con reactivo β-D-glucosil Yariv .....</b>	<b>78</b>
<b>11. Tratamientos con giberelinas (GA<sub>9</sub>, GA<sub>20</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>1</sub>) y prohexadiona- calcio (Phd).....</b>	<b>78</b>
<b>12. Cuantificación de giberelinas.....</b>	<b>78</b>
12.1. Extracción .....	78
12.2. Condiciones del GC-MS/MS.....	80
<b>13. Identificación de proteínas DELLA por western-blot .....</b>	<b>81</b>
13.1. Extracción de proteínas .....	81
13.2. Electroforesis de las muestras.....	81
13.3. Western-blot.....	82
<b>14. Análisis proteómico .....</b>	<b>83</b>
14.1. Extracción de proteínas .....	83
14.2. Marcaje de proteínas.....	84

14.3. Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE).....	84
14.4. Digitalización y análisis de imágenes .....	85
14.5. Digestión enzimática con tripsina .....	85
14.6. Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC-MS/MS) ..	85
<b>15. Análisis de expresión génica por RT-PCR .....</b>	<b>86</b>
15.1. Extracción y purificación de ARN.....	86
15.2. Transcripción inversa .....	86
15.3. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	86
<b>16. Análisis de la expresión génica por microarray .....</b>	<b>88</b>
16.1. Extracción y purificación de ARN.....	88
16.2. Análisis de las muestras .....	88
16.3. Análisis estadístico .....	88
16.4. Análisis ontológico de los genes.....	89
16.5. Depósito de datos .....	89
<b>17. Análisis estadístico .....</b>	<b>89</b>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>91</b>
<b>1. Mecanismos fisiológicos de adaptación a salinidad .....</b>	<b>91</b>
1.1. Parámetros de crecimiento.....	91
1.1.1. Curvas de crecimiento .....	91
1.1.2. Viabilidad celular.....	92
1.1.3. Índice mitótico.....	94
1.1.4. Volumen celular .....	96
1.2. Contenido iónico.....	98
1.3. Contenido en azúcares solubles.....	99
1.4. Contenido en aminoácidos .....	103
1.5. Análisis proteómico .....	105
1.6. Análisis transcriptómico.....	111
1.7. Niveles de expresión de diferentes genes identificados en el microarray .....	131
1.8. Localización subcelular in vivo de Na+ .....	132
1.9. ROS .....	136
1.9.1. Niveles de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y malondialdehído.....	136
1.9.2. Localización subcelular in vivo de ROS .....	137
1.9.3. Colocalización in vivo de ROS y mitocondrias .....	138
1.10. Estructura celular .....	138

1.10.1. Localización subcelular in vivo de vacuolas y mitocondrias.....	138
1.10.2. Localización subcelular in vivo del retículo endoplasmático .....	141
1.10.3. Morfología celular .....	145
1.10.4. Ultraestructura celular .....	146
1.10.4.1. Células control.....	146
1.10.4.2. Células adaptadas.....	150
1.11. Marcadores de muerte celular .....	158
1.11.1. TUNEL.....	158
1.11.2. Actividad caspasa .....	158
1.12. Inmunolocalización de ABA y glutatión .....	158
1.13. Recuperación del fenotipo original en condiciones control .....	163
<b>2. Giberelinas.....</b>	<b>164</b>
2.1. Efecto de la aplicación de Phd y GAs sobre el crecimiento y la viabilidad celular .....	164
2.2. Cuantificación de GAs .....	169
2.3. Niveles de expresión de genes relacionados con la síntesis y degradación de GAs.....	170
2.4. Western-blot.....	172
<b>3. Pared celular .....</b>	<b>173</b>
3.1. Inmuno-dot AGPs y EXTs .....	173
3.2. Cuantificación de AGPs.....	176
3.3. Cuantificación de EXTs .....	179
3.4. Efecto del tratamiento con $\beta$ -D-glucosil Yariv .....	181
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>189</b>
<b>1. Mecanismos celulares de adaptación al estrés salino en cultivos celulares de tabaco BY-2.....</b>	<b>189</b>
<b>2. Papel de las giberelinas en la adaptación al estrés salino en cultivos celulares de tabaco BY-2.....</b>	<b>211</b>
<b>3. Papel de las AGPs y EXTs en la adaptación a altas concentraciones salinas en cultivos celulares de tabaco BY-2.....</b>	<b>218</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>225</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>229</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Efecto del estrés salino sobre la tasa de crecimiento en plantas	<b>5</b>
<b>Figura 2</b>	Diversidad en la tolerancia a salinidad de diferentes especies de plantas	<b>6</b>
<b>Figura 3</b>	Representación esquemática de la complejidad en la respuesta de las plantas al estrés salino	<b>7</b>
<b>Figura 4</b>	Regulación de la homeostasis iónica por la ruta de señalización SOS (Salt Overly Sensitive) durante el proceso de adaptación a estrés salino	<b>13</b>
<b>Figura 5</b>	Etapas de la reducción completa del oxígeno molecular (O <sub>2</sub> ) hasta agua	<b>16</b>
<b>Figura 6</b>	Eliminación de las ROS por parte de los principales sistemas enzimáticos antioxidantes presentes en plantas	<b>18</b>
<b>Figura 7</b>	Señalización retrógrada y anterógrada mediada por ROS	<b>19</b>
<b>Figura 8</b>	Modelo propuesto para la ruta de señalización iónica durante la PCD en plantas	<b>20</b>
<b>Figura 9</b>	Curva de crecimiento modelo de un cultivo celular vegetal referida a diferentes parámetros de crecimiento en función del tiempo transcurrido tras el inicio del cultivo	<b>26</b>
<b>Figura 10</b>	Estructura química del ent-giberelano	<b>28</b>
<b>Figura 11</b>	Estructura química de las GAs bioactivas mayoritarias en plantas superiores.	<b>30</b>
<b>Figura 12</b>	Vías principales del metabolismo de GAs en plantas superiores	<b>31</b>
<b>Figura 13</b>	Mecanismos enzimáticos de desactivación de GAs bioactivas o de conversión de sus precursores a formas inactivas	<b>34</b>
<b>Figura 14</b>	Modelo representativo de la regulación de la ruta de biosíntesis de GAs	<b>35</b>
<b>Figura 15</b>	Representación de la estructura de las proteínas DELLA	<b>37</b>
<b>Figura 16</b>	Modelo para la ruta de señalización de GAs en arroz	<b>38</b>
<b>Figura 17</b>	Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de GAs y nivel al que actúan cada uno de los cuatro grupos de inhibidores	<b>39</b>
<b>Figura 18</b>	Estructura química de los representantes del grupo de los compuestos tipo “onion”	<b>40</b>
<b>Figura 19</b>	Estructura química de los representantes del grupo de los	<b>41</b>

	compuestos con un heterociclo nitrogenado en su estructura	
<b>Figura 20</b>	Estructura química de los representantes del grupo de los análogos estructurales al 2-oxoglutarato	<b>42</b>
<b>Figura 21</b>	Estructura química de las 16,17-dihidro-GAs	<b>42</b>
<b>Figura 22</b>	Efecto en el fenotipo de la flor debido a la deficiencia de GAs en el mutante <i>ga1-3</i> comparado con el silvestre	<b>44</b>
<b>Figura 23</b>	Modelo de respuesta adaptativa a elevadas concentraciones salinas en plantas	<b>46</b>
<b>Figura 24</b>	Esquema de los principales componentes estructurales de la pared celular primaria y su posible ordenamiento	<b>49</b>
<b>Figura 25</b>	Modelo estructural de una microfibrilla de celulosa	<b>50</b>
<b>Figura 26</b>	Estructura del xiloglucano	<b>51</b>
<b>Figura 27</b>	Modelo hipotético de la estructura de una molécula de AGP	<b>53</b>
<b>Figura 28</b>	Representación de la estructura química del reactivo $\beta$ -D-galactosil de Yariv	<b>55</b>
<b>Figura 29</b>	Modelo de acción de las extensinas	<b>58</b>
<b>Figura 30</b>	Proceso de adaptación <i>in vitro</i> a salinidad	<b>64</b>
<b>Figura 31</b>	Curvas de crecimiento	<b>92</b>
<b>Figura 32</b>	Viabilidad celular	<b>93</b>
<b>Figura 33</b>	Índice mitótico	<b>95</b>
<b>Figura 34</b>	Volumen celular	<b>97</b>
<b>Figura 35</b>	Elementos minerales en la masa celular	<b>100</b>
<b>Figura 36</b>	Elementos minerales en el medio de cultivo	<b>101</b>
<b>Figura 37</b>	Azúcares solubles en la masa celular	<b>102</b>
<b>Figura 38</b>	2D-DIGE obtenido a partir de muestras de las líneas celulares control y adaptada en fase de crecimiento exponencial	<b>106</b>
<b>Figura 39</b>	Análisis estadísticos complementarios al 2D-DIGE para las proteínas que mostraron una expresión diferencial por encima de 3,5	<b>107</b>
<b>Figura 40</b>	Clasificación funcional de las proteínas identificadas según Duby y col. (2010)	<b>109</b>
<b>Figura 41</b>	Clasificación funcional de las proteínas identificadas en función de los términos GO	<b>111</b>
<b>Figura 42</b>	Clasificación funcional de los genes identificados en base a los términos GO	<b>127</b>
<b>Figura 43</b>	Expresión diferencial de las familias de factores de transcripción	<b>129</b>

<b>Figura 44</b>	Visualización, mediante el software Mapman, de los cambios en los niveles de transcritos asociados con el metabolismo	<b>130</b>
<b>Figura 45</b>	Niveles de expresión de diferentes genes identificados en el microarray e implicados en los procesos de adaptación a salinidad	<b>131</b>
<b>Figura 46</b>	Localización subcelular de Na <sup>+</sup> <i>in vivo</i> con CoroNa-Green	<b>133</b>
<b>Figura 47</b>	Localización subcelular de Na <sup>+</sup> <i>in vivo</i> con Asante Natrium Green-1	<b>134</b>
<b>Figura 48</b>	Cuantificación de los valores de intensidad del fluoróforo CoroNa-Green en células adaptadas	<b>135</b>
<b>Figura 49</b>	Colocalización <i>in vivo</i> de las señales de emisión de los fluoróforos Asante Natrium Green-1 y FM4-64 en células adaptadas	<b>135</b>
<b>Figura 50</b>	Niveles de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y peroxidación lipídica	<b>136</b>
<b>Figura 51</b>	Localización subcelular <i>in vivo</i> de ROS	<b>137</b>
<b>Figura 52</b>	Colocalización <i>in vivo</i> de ROS y mitocondrias	<b>139</b>
<b>Figura 53</b>	Localización subcelular <i>in vivo</i> de vacuolas y mitocondrias	<b>140</b>
<b>Figura 54</b>	Localización subcelular <i>in vivo</i> de vacuolas y mitocondrias	<b>141</b>
<b>Figura 55</b>	Localización subcelular <i>in vivo</i> del retículo endoplasmático en células de la línea silvestre	<b>142</b>
<b>Figura 56</b>	Localización subcelular <i>in vivo</i> del retículo endoplasmático en células de la línea transformada con GFP	<b>143</b>
<b>Figura 57</b>	Localización subcelular <i>in vivo</i> del retículo endoplasmático en células adaptadas de la línea transformada con GFP	<b>144</b>
<b>Figura 58</b>	Secciones semifinas de células control y adaptadas	<b>146</b>
<b>Figura 59</b>	Ultraestructura de células de la línea control	<b>147</b>
<b>Figura 60</b>	Ultraestructura de núcleos en células de la línea control	<b>148</b>
<b>Figura 61</b>	Ultraestructura de mitocondrias, amiloplastos y aparato de Golgi en células de la línea control	<b>149</b>
<b>Figura 62</b>	Esquema representativo de la evolución celular en condiciones salinas	<b>150</b>
<b>Figura 63</b>	Ultraestructura de células de la línea adaptada	<b>151</b>
<b>Figura 64</b>	Ultraestructura de núcleos en células de la línea adaptada	<b>152</b>
<b>Figura 65</b>	Ultraestructura del aparato de Golgi en células de la línea adaptada	<b>153</b>
<b>Figura 66</b>	Ultraestructura del retículo endoplasmático en células de la línea	<b>154</b>

	adaptada	
<b>Figura 67</b>	Ultraestructura de mitocondrias en células de la línea adaptada	<b>155</b>
<b>Figura 68</b>	Ultraestructura de la pared celular en células de la línea adaptada	<b>156</b>
<b>Figura 69</b>	Ultraestructura de vesículas en células de la línea adaptada	<b>157</b>
<b>Figura 70</b>	Detección de muerte celular programada	<b>159</b>
<b>Figura 71</b>	Detección de la actividad caspasa	<b>160</b>
<b>Figura 72</b>	Inmunolocalización de ABA	<b>161</b>
<b>Figura 73</b>	Inmunolocalización de glutatión	<b>162</b>
<b>Figura 74</b>	Recuperación del fenotipo original en condiciones control	<b>163</b>
<b>Figura 75</b>	Peso fresco en fase estacionaria tras el tratamiento con diferentes GAs, Phd o en combinación	<b>165</b>
<b>Figura 76</b>	Viabilidad celular en fase estacionaria tras el tratamiento con GA <sub>20</sub> , Phd o en combinación	<b>166</b>
<b>Figura 77</b>	Evolución del volumen celular a lo largo del ciclo de cultivo tras el tratamiento con GA <sub>3</sub> , Phd o en combinación	<b>167</b>
<b>Figura 78</b>	Secciones semifinas de células adaptadas tratadas de forma combinada con Phd y GAs	<b>168</b>
<b>Figura 79</b>	Niveles de expresión de genes implicados en la ruta metabólica de GAs	<b>171</b>
<b>Figura 80</b>	Análisis por <i>western-blot</i> de las proteínas DELLA	<b>172</b>
<b>Figura 81</b>	Inmuno-dot de AGPs para las líneas celulares control y adaptada en cada una de las fases del ciclo de cultivo	<b>173</b>
<b>Figura 82</b>	Inmuno-dot de AGPs para diferentes concentraciones salinas en cada una de las fases del ciclo de cultivo	<b>174</b>
<b>Figura 83</b>	AGPs liberadas al medio de cultivo en 24 horas	<b>175</b>
<b>Figura 84</b>	Inmunolocalización de AGPs con el anticuerpo monoclonal JIM13	<b>176</b>
<b>Figura 85</b>	Inmunolocalización de AGPs en endomembranas con el anticuerpo monoclonal JIM13	<b>177</b>
<b>Figura 86</b>	Inmunolocalización de AGPs con el anticuerpo monoclonal JIM15	<b>178</b>
<b>Figura 87</b>	Inmunolocalización de extensinas con el anticuerpo monoclonal JIM11	<b>180</b>
<b>Figura 88</b>	Inmunolocalización de extensinas con el anticuerpo monoclonal JIM12	<b>182</b>
<b>Figura 89</b>	Alteraciones en la morfología celular tras el tratamiento con $\beta$ -D-glucosil Yariv	<b>183</b>

---

<b>Figura 90</b>	Alteraciones en la membrana plasmática de células control tratadas con $\beta$ -D-glucosil Yariv	<b>184</b>
<b>Figura 91</b>	Ultraestructura de las células adaptadas tras el tratamiento con $\beta$ -D-glucosil Yariv	<b>185</b>
<b>Figura 92</b>	Ultraestructura de las células control tras el tratamiento con $\beta$ -D-glucosil Yariv	<b>186</b>
<b>Figura 93</b>	Inmunolocalización de AGPs con los anticuerpos monoclonales JIM13 y LM2	<b>187</b>
<b>Figura 94</b>	Evolución comparativa del ciclo celular y la inducción de muerte celular en las células control y adaptadas de tabaco BY-2	<b>190</b>
<b>Figura 95</b>	Modelo de actuación de diferentes chaperonas en las células BY-2 adaptadas a salinidad	<b>193</b>
<b>Figura 96</b>	Metabolismo del ABA en células BY-2 adaptadas a salinidad	<b>200</b>
<b>Figura 97</b>	Metabolismo y ciclo de la prolina en células BY-2 adaptadas a salinidad	<b>202</b>
<b>Figura 98</b>	Implicación de la PLD $\alpha$ 1 como regulador positivo en la síntesis de prolina en células BY-2 adaptadas a salinidad	<b>203</b>
<b>Figura 99</b>	Modelo celular de adaptación a salinidad en células BY-2	<b>210</b>
<b>Figura 100</b>	Modelo propuesto para la implicación de las GAs en el proceso de adaptación a salinidad en células BY-2	<b>215</b>
<b>Figura 101</b>	Modelo representativo de la interacción entre las rutas de síntesis de GAs y ABA	<b>217</b>
<b>Figura 102</b>	Modelo de actuación del reactivo de Yariv sobre AGPs de membrana plasmática	<b>223</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Anticuerpos monoclonales para AGPs	<b>56</b>
<b>Tabla 2</b>	Composición (macro y micronutrientes) del medio de cultivo Murashige y Skoog	<b>65</b>
<b>Tabla 3</b>	Fluoróforos utilizados en los estudios realizados con microscopía de láser confocal	<b>72</b>
<b>Tabla 4</b>	Concentración de estándares internos marcados con deuterio [ <sup>2</sup> H] y tritio [ <sup>3</sup> H]	<b>80</b>
<b>Tabla 5</b>	Cebadores utilizados para la amplificación mediante PCR y RT-qPCR	<b>87</b>
<b>Tabla 6</b>	Concentración de aminoácidos en la masa celular	<b>104</b>
<b>Tabla 7</b>	Número de proteínas expresadas de forma diferencial en la línea celular adaptada respecto al control	<b>105</b>
<b>Tabla 8</b>	Proteínas identificadas que mostraron incrementos diferenciales en su expresión por encima de 3,5 en células de la línea adaptada en fase de crecimiento exponencial	<b>108</b>
<b>Tabla 9</b>	Número de genes expresados de forma diferencial en la línea celular adaptada respecto al control	<b>112</b>
<b>Tabla 10</b>	Expresión diferencial de genes seleccionados del microarray en células de la línea adaptada en fase de crecimiento exponencial	<b>114</b>
<b>Tabla 11</b>	Clasificación funcional en base a los términos BIN más representados	<b>128</b>
<b>Tabla 12</b>	Cuantificación de GAs	<b>170</b>
<b>Tabla 13</b>	Análisis cuantitativo del marcaje con JIM13 y JIM15	<b>179</b>
<b>Tabla 14</b>	Análisis cuantitativo del marcaje con JIM11 y JIM12	<b>181</b>
<b>Tabla 15</b>	Viabilidad celular tras el tratamiento con 100 μM de β-D-glucosil Yariv	<b>181</b>



## ABREVIATURAS

<b>µg</b>	microgramo
<b>µL</b>	microlitro
<b>µm</b>	micrometro
<b>2D</b>	bidimensional
<b>2D-DIGE</b>	electroforesis bidimensional diferencial en gel
<b>3D</b>	tridimensional
<b>A</b>	área
<b>ABA</b>	ácido abcísico
<b>ACN</b>	acetonitrilo
<b>AGPs</b>	proteínas ricas en arabinogalactanos
<b>AIA</b>	Ácido indol-3-acético
<b>ANOVA</b>	análisis de varianza
<b>APX</b>	ascorbato peroxidasa
<b>ASC</b>	ascorbato
<b>BSA</b>	albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumin)
<b>BY-2</b>	bright yellow 2
<b>CAT</b>	catalasa
<b>CBB</b>	azul brillante de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue)
<b>CDP</b>	ent-copalil difosfato
<b>CEBAS</b>	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura
<b>CHAPS</b>	ácido 3[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-propanosulfónico
<b>CID</b>	contraste interferencial diferencial
<b>cm</b>	centímetro
<b>COR</b>	proteínas reguladas por frío (Cold Regulated Proteins)
<b>CPS</b>	ent-copalildifosfato sintasa
<b>CR</b>	crecimiento relativo
<b>CSIC</b>	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DCFH-DA</b>	2'-7'-diclorofluoresceindiacetato
<b>DHAR</b>	dehidroascorbato reductasa
<b>DIGE</b>	electroforesis diferencial en gel
<b>dNTP</b>	desoxiribonucleótido trifosfato
<b>DTT</b>	ditiotreitól

<b>EDTA</b>	ácido etilendinitrilotetraacético sal disódica dihidrato
<b>EXTs</b>	extensinas
<b>FDR</b>	tasa de falsos positivos (False Discovery Rate)
<b>FM4-64</b>	N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)-phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide
<b>g</b>	gramo
<b>GA13ox</b>	GA 13-hidroxilasa
<b>GA20ox</b>	GA 20-oxidasas
<b>GA2ox</b>	GA 2-oxidasa
<b>GA3ox</b>	GA 3-oxidasa
<b>GAMTs</b>	GA metiltransferasas
<b>GAs</b>	giberelinas
<b>GFP</b>	proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)
<b>GC-MS/MS</b>	Espectrómetro de masas
<b>GGDP</b>	geranilgeranildifosfato
<b>GO</b>	ontología génica (Gene Ontology)
<b>GPI</b>	glicosilfosfatidilinositol
<b>GR</b>	glutación reductasa
<b>GRPs</b>	proteínas ricas en glicina
<b>GSH</b>	glutación
<b>H2O2</b>	peróxido de hidrógeno
<b>H2SO4</b>	ácido sulfúrico
<b>HEPES</b>	ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico
<b>HNO3</b>	ácido nítrico
<b>HPLC</b>	cromatografía líquida de alta resolución
<b>HPLC/MS</b>	cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas
<b>HRGPs</b>	proteínas ricas en hidroxiprolina
<b>HRP</b>	peroxidasa de rábano picante (Horseradish Peroxidase)
<b>HSL</b>	Lipasas sensibles a hormonas (Hormone Sensitive Lipase)
<b>ICP-OES</b>	espectrometría de plasma acoplado inductiva- espectrofotómetro de emisión óptico
<b>IEF</b>	isoelectroenfoque (Isoelectric Focusing)
<b>IPG</b>	gradiente inmovilizado de pH (Immobilized pH Gradient)
<b>KAO</b>	ent-kaurenoico oxidasa
<b>KCN</b>	cianuro de potasio
<b>KO</b>	ent-kaureno oxidasa
<b>KOR</b>	canal activado por la despolarización de la membrana plasmática

<b>KS</b>	ent-kaureno sintasa
<b>L</b>	litro
<b>LC-MS/MS</b>	cromatografía líquida-espectrometría de masas
<b>LEA</b>	proteínas abundantes en embriogénesis tardía (Late Embryogenesis Abundant proteins)
<b>M</b>	molar
<b>MDA</b>	malondialdehído
<b>MDHAR</b>	monodehidroascorbato reductasa
<b>MES</b>	ácido 4-morfolinoetanosulfónico monohidrato
<b>MET</b>	microscopía electrónica de transmisión
<b>mg</b>	miligramo
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>MO</b>	microscopía óptica
<b>MP</b>	milk protein (nonfat dry milk)
<b>MS</b>	Murashige y Skoog
<b>MS</b>	espectrometría de masas
<b>MSTFA</b>	N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamida
<b>N</b>	normal
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>nm</b>	nanometro
<b>NSCC</b>	canal de cationes no selectivo (Non Selective Cation Channel)
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	anión superóxido
<b>°C</b>	grado centígrado
<b>OFX</b>	oxidación ferrosa en xilenol naranja
<b>p</b>	peso
<b>P</b>	perímetro
<b>PBS</b>	TPK 10 mM pH 7.4 + 150 mM NaCl
<b>PCD</b>	muerte celular programada (Programmed Cell Death)
<b>Phd</b>	prohexadiona-calcio
<b>pg</b>	picogramo
<b>pmol</b>	picomol
<b>PMSF</b>	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>POX</b>	peroxidasa
<b>PRPs</b>	proteínas ricas en prolina

<b>PVP</b>	polivinil pirrolidona
<b>PVPP</b>	polivinil polipirrolidona
<b>qRT-PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<b>RE</b>	retículo endoplasmático
<b>ref</b>	referencia
<b>RID</b>	detector de índice de refracción
<b>RNS</b>	especies reactivas del nitrógeno (Reactive Nitrogen Species)
<b>ROS</b>	especies reactivas del oxígeno (Reactive Oxygen Species)
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SAM</b>	S-adenosin-1-metionina
<b>SDS</b>	dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>SOD</b>	superóxido dismutasa
<b>TBA</b>	ácido tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	ácido tricloroacético
<b>TMS</b>	trimethylsilyl
<b>TPK</b>	tampón fosfato potásico
<b>TPNa</b>	tampón fosfato sódico
<b>v</b>	volumen
<b>WT</b>	wild type
<b><math>\lambda</math></b>	longitud de onda

## RESUMEN

En esta tesis se han pretendido ampliar los conocimientos sobre los mecanismos que permiten la adaptación de los cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* BY-2 al estrés abiótico, concretamente estrés salino. En dichas condiciones, la adaptación a nivel subcelular implica modificaciones ultraestructurales que permiten a las células crecer. Para la identificación de los factores que influyen en la adaptación celular al estrés salino y las modificaciones que se producen en la célula, se han utilizado técnicas de microcopía electrónica y óptica. Por otra parte, se han estudiado nuevos mecanismos de captación y acumulación subcelular de sodio mediante el análisis del tráfico de membranas (endocitosis). Para este estudio se han utilizado técnicas *in vivo* mediante microscopía de laser confocal. Estos estudios han sido completados con la utilización de técnicas de transcriptómica, proteómica e ionómica, que nos permiten identificar qué factores moleculares son los que pueden estar regulando la adaptación a altas concentraciones salinas. Así mismo, debido a que las giberelinas están implicadas en el proceso de elongación y crecimiento celular, y estudios recientes han relacionado el papel de las mismas con la tolerancia de plantas a salinidad, hemos estudiado la influencia de estas hormonas en la adaptación de las células vegetales a dicho estrés. Con este fin, se ha realizado un estudio sobre la alteración en el metabolismo de las GAs en condiciones salinas y cómo afecta esta alteración a la adaptación de dichas células a estas condiciones de estrés. Por otra parte, hemos fijado nuestra atención en los cambios producidos en la estructura de la pared celular en el proceso de adaptación a salinidad. En este estudio se han analizado principalmente las extensinas y proteínas ricas en arabinogalactanos (AGPs) mediante su identificación y distribución a nivel subcelular, utilizando anticuerpos específicos contra epítomos de estos compuestos.

El desarrollo de estos objetivos se ha llevado a cabo mediante técnicas bioquímicas, celulares y de biología molecular que nos han permitido obtener una visión más integrada de los mecanismos implicados en la adaptación de las células al estrés salino mediante la regulación hormonal de los cambios en la estructura y composición de la pared celular.



## SUMMARY

The aim of this thesis is to enhance our knowledge about the mechanisms of the cell line *Nicotiana tabacum* BY-2 to the stress conditions, in particular, to high salinity stress. Under these conditions, the adaptation at the subcellular level implies ultrastructural modifications that allow the cells to grow. To identify the factors that may affect this adaptation process to the salinity stress and the possible modifications that may take place in the cell, electronic and light microscopy has been implemented. Additionally, potential new mechanisms for subcellular uptake and accumulation of sodium have been investigated by analysing membranes vesicle trafficking (endocytosis). In this work, laser confocal in vivo techniques have been applied. Transcriptomic, proteomic and ionomic tools have been successfully used to complement these studies. Since gibberellins (GAs) are involved in the growth and elongation of plant cells, and recent studies show evidence of the association between GAs and plant tolerance to salinity conditions, the influence of GAs on the plant cells adaptation to salinity stress has also been investigated. This study has also examined, the putative changes in the GAs metabolism under the salinity stress conditions and how these changes may affect the plant cells adaptation. We are also look at the structural changes that may occur in the cell wall during the adaptation process to the salinity conditions, since this may play a major role in the control of the cell size. For this purpose, we have analyzed extensins and arabinogalactan-proteins (AGPs) by identifying their presence and distribution at the subcellular level using specific antibodies raised against epitopes of these molecules.

To carry out all these objectives, several biochemical, cellular and molecular tools have been implemented to obtain an integrated view of the possible mechanisms that underlie the structural and compositional changes that occur during the adaptation process of plant cells to salinity stress and, of the regulation and effects of hormones on those changes.



# I. INTRODUCCIÓN



## **I. INTRODUCCIÓN.**

### **1. Salinidad.**

#### **1.1. Estrés en plantas.**

El término “estrés” quedó perfectamente definido en el ámbito de la Física por la Teoría de la Elasticidad como la fuerza ejercida por unidad de área (Cauchy, 1821). Sin embargo, en el campo de la Biología diferentes autores han aportado numerosas definiciones con el objeto de aplicar esta terminología a los sistemas biológicos (Kranner, 2010). En este sentido, el concepto original de estrés en organismos vivos fue introducido por el endocrinólogo Hans Selye (1936, 1956), quien afirmó que “todos los agentes pueden actuar como estresantes” y que “existen tanto respuestas específicas como inespecíficas para cada tipo de agente estresante”. Más recientemente, Levitt (1980) definió el término como “cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para el desarrollo de un organismo vivo” y posteriormente, el ecofisiólogo vegetal Larcher (1987) describió el estrés en sistemas vegetales como “un estado en el que las crecientes demandas hechas a una planta conducen a una desestabilización de funciones, seguida por la normalización y por una resistencia mejorada” al tiempo que indicaba que “si los límites de la tolerancia son excedidos y se sobrepasa la capacidad adaptativa, el resultado puede ser el daño permanente o incluso la muerte”. Lichtenthaler (1996, 1998) indicó que el estrés en los vegetales es “cualquier condición desfavorable para su crecimiento y desarrollo”, subrayando que en la mayor parte de los casos “las plantas pueden recuperarse cuando desaparecen los agentes estresantes”. Con todo, se puede considerar que una planta se encuentra bajo estrés cuando está sometida a unas condiciones diferentes de las óptimas para la vida, lo que provoca una serie de cambios y respuestas a todos los niveles funcionales. La sensibilidad a un estrés concreto está determinada por el umbral de tolerancia de la planta al mismo. Este umbral depende tanto de la especie vegetal y su estado de desarrollo, como del tipo de agente estresante y la dosis aplicada (Lichtenthaler, 1996).

En general, podemos clasificar los tipos de estrés como bióticos y abióticos (Azcón-Bieto y Talón, 2008), aunque también resulta común su clasificación en naturales y antropogénicos (Lichtenthaler, 1996). Los estreses bióticos son causados por la acción de organismos vivos como animales, plantas (fenómenos de

competencia y alelopatía), microorganismos (bacterias, hongos y elulares) y otros agentes fitopatógenos (virus y viroides). En cuanto a los estreses abióticos, éstos pueden dividirse en físicos y químicos. Entre los factores físicos se pueden mencionar el estrés hídrico (déficit o exceso de agua), el térmico (calor, frío, congelación), la salinidad (en su componente osmótico) y la radiación (altas intensidades de luz visible y UV). Entre los factores químicos destacan los metales pesados, los plaguicidas, la salinidad (en su componente iónico) y la deficiencia de elementos minerales. Cabe destacar que el estrés abiótico constituye la principal causa de daños a cultivos, siendo la salinidad el tipo más extendido (Mahajan y Tujeta, 2005; Parida y Das, 2005). Cabe destacar que los factores estresantes raramente se dan en la naturaleza de forma aislada, sino que suele ser una combinación de varios los que actúan sobre la planta, por ejemplo en el caso de la combinación de estrés por elevadas temperaturas, falta de agua y alta irradiación que se produce en periodos secos, soleados y calurosos durante el verano (Lichtenthaler, 1996).

## **1.2. Salinidad y agricultura.**

Las sales constituyen un elemento común del suelo, resultando muchas de ellas nutrientes esenciales para las plantas (Carillo y col., 2011). Sin embargo, elevadas concentraciones salinas en el suelo causan en las plantas importantes alteraciones a nivel fisiológico y bioquímico afectando a su desarrollo. Estas modificaciones se traducen en una importante disminución del rendimiento en la mayoría de los cultivos, que se ve reflejado en una menor producción de fruto. Por lo expuesto anteriormente, la salinidad está considerada en la actualidad como uno de los principales factores limitantes de la producción vegetal.

Gran parte de las áreas afectadas por salinidad se han originado por causas naturales. La salinización natural o primaria suele darse en zonas áridas o semiáridas donde, por factores naturales a lo largo del tiempo, se han acumulado sales solubles en suelos y aguas subterráneas. Esta salinización conlleva una falta de fertilidad del suelo y, por tanto, una menor productividad del mismo (Dajic, 2006). Sin embargo, existe otro tipo de salinización provocada por la actividad humana que se conoce como salinización secundaria. La salinización secundaria es propia de zonas de regadío y deriva principalmente de un uso inadecuado de las aguas de riego y de su mala calidad, lo que conduce a un incremento paulatino en la concentración de iones salinos en el suelo que acaba afectando a la agricultura (Bressler y Hoffman, 1986; Serrano, 1996; Tujeta, 2007). Este proceso conduce cada año al deterioro de

aproximadamente 2 millones de hectáreas de suelos (Tujeta, 2007) y se agudiza especialmente en franjas costeras, donde la sobreexplotación de acuíferos produce una salinización paulatina del suelo por intrusión de agua de mar. A parte de las citadas anteriormente, otras actividades humanas que contribuyen a incrementar la salinización secundaria son la deforestación de zonas semiáridas y el uso inadecuado de fertilizantes (Pessaraki y Szabolcs, 1994; Dajic, 2006).

Cabe destacar que alrededor de 800 millones de hectáreas de suelos en todo el mundo se encuentran afectadas por salinidad, lo que representa aproximadamente el 6% de la superficie del planeta (Munns, 2005; Munns y Tester, 2008). Así mismo, se estima que la superficie destinada a agricultura que se encuentra bajo riego representa solamente el 17% del total pero tiene una productividad al menos dos veces mayor y genera un tercio de los alimentos que se consumen a nivel mundial (Hillel, 2000). Si tenemos en cuenta que de los actuales 230 millones de hectáreas de la superficie bajo riego 45 millones de hectáreas (20%) están afectadas por la salinidad (Cuartero y col., 2008; Pitman y Läuchli, 2002), que la mayoría de las especies cultivadas son glicófitas y, por tanto, incapaces de desarrollarse a concentraciones de 50 mM de NaCl o superiores (Tujeta, 2007) y que se prevé una población mundial de 9300 millones de habitantes en 2050 que hará necesario un incremento de la producción global de alimentos en torno al 50% en los próximos 40 años (Flowers, 2004), el aumento de la tolerancia a la salinidad de los cultivos resulta un objetivo prioritario si se quiere asegurar el suministro de alimentos en las próximas décadas. Por otra parte, estos hechos implicarían no solamente sobreexplotar las tierras ya cultivadas sino buscar nuevas áreas donde llevar a cabo la actividad agrícola, teniendo que dirigir nuestra mirada hacia las zonas áridas y semiáridas en las que es frecuente una alta salinidad de los suelos y en las que los factores climáticos determinan la necesidad de irrigación. En este sentido, un mayor conocimiento de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que median en los procesos de adaptación a salinidad en plantas permitirá desarrollar estrategias de resistencia en aquellas variedades de especial interés agronómico con el objetivo de mejorar su productividad y hacer frente a las necesidades alimenticias de la población mundial.

### **1.3. Efecto de la salinidad sobre las plantas.**

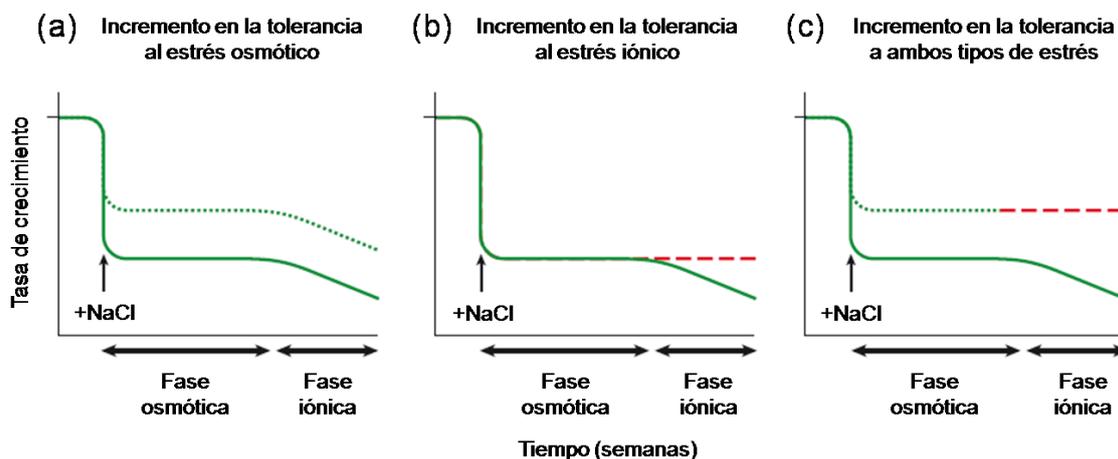
La salinidad puede ocasionar en las plantas una amplia variedad de efectos entre los que cabe destacar reducción del turgor, deficiencia nutricional, desorganización de membranas, alteración de determinadas actividades enzimáticas, producción de

radicales libres y disminución de la tasas fotosintética y de división celular (Hasegawa y col., 2000; Munns, 2002; Zhu, 2007). La consecuencia general es la reducción en el crecimiento y desarrollo de la planta como resultado de la acción combinada de varios factores (Greenway y Munns, 1980; Serrano, 1996; Hasegawa y col., 2000; Munns, 2002; Zhu, 2002; Tester y Davenport, 2003; Munns, 2005; Tujeta, 2007; Munns y Tester, 2008; Shabala y Cuin, 2008):

1. La salinidad produce un **efecto osmótico** que causa disminución en la capacidad de la planta para absorber agua. Esto se traduce en un cambio en las necesidades energéticas de la planta, que se ve en la necesidad de realizar un ajuste osmótico con el fin de poder obtener el agua necesaria para sobrevivir.
2. La salinidad puede generar **toxicidad iónica**, asociada normalmente a la absorción excesiva de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , produciéndose daños a nivel subcelular.
3. El exceso de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  conduce a una menor absorción de nutrientes minerales y a una alteración en la distribución de iones esenciales como el  $\text{K}^+$  o el  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que deriva en **desequilibrio nutricional**.
4. Por último, la salinidad conlleva procesos de **estrés oxidativo** derivados de la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS).

Para comprender cómo las plantas se ven afectadas por la salinidad y cómo son capaces de tolerarla es necesario saber si su crecimiento está siendo limitado por el efecto osmótico de la sal en el suelo o por el efecto tóxico de la sal dentro de la planta. Un análisis sencillo de la respuesta de una planta frente al estrés salino refleja que existen dos fases claramente diferenciadas: una respuesta rápida al incremento en la presión osmótica del medio externo (fase osmótica) y una respuesta lenta debida a la acumulación de  $\text{Na}^+$  en las hojas (fase iónica) (Figura 1) (Munns y Tester, 2008). En la fase osmótica, que comienza inmediatamente después de que la concentración de iones salinos alrededor de las raíces aumente hasta un nivel umbral, se reduce la capacidad de la planta para absorber agua y la tasa de crecimiento vegetal cae significativamente provocando, a largo plazo, una reducción del crecimiento de la parte aérea y, en menor medida, de las raíces (Munns, 2002; Zhu, 2002; Tester y Davenport, 2003; Tujeta, 2007). La segunda fase, iónica, resulta del efecto tóxico provocado por la acumulación de iones, particularmente  $\text{Na}^+$ , en la hojas adultas (Munns, 2002). Esta situación conduce a una senescencia prematura resultando finalmente en la muerte de las hojas. El daño se produce como consecuencia de las elevadas concentraciones de sales acumuladas en el citoplasma celular, con la subsiguiente inactivación de enzimas (Amtmann y Sanders, 1999; Mahajan y Tujeta,

2005), o en las paredes celulares, lo que deriva finalmente en deshidratación celular (Flowers y col., 1991). A bajas concentraciones de NaCl, el componente osmótico del estrés salino ejerce un efecto sobre la tasa de crecimiento mayor que el provocado por el estrés iónico. Sin embargo, a elevadas concentraciones de NaCl el efecto iónico domina sobre el osmótico (Munns y Tester, 2008).



**Figura 1. Efecto del estrés salino sobre la tasa de crecimiento en plantas.** Pueden darse dos tipos de respuesta: una rápida debida al incremento en la presión osmótica externa (fase osmótica) y otra lenta como consecuencia de la acumulación de  $\text{Na}^+$  en las hojas (fase iónica). La línea sólida verde representa el cambio en la tasa de crecimiento tras la adición de NaCl. (a) La línea discontinua verde representa la respuesta hipotética de una planta con incremento en la tolerancia al componente osmótico del estrés salino. (b) La línea discontinua roja representa la respuesta de una planta con incremento en la tolerancia al componente iónico del estrés salino. (c) La línea discontinua verde y roja representa la respuesta de una planta con incremento en la tolerancia a ambos componentes del estrés salino (Munns y Tester, 2008).

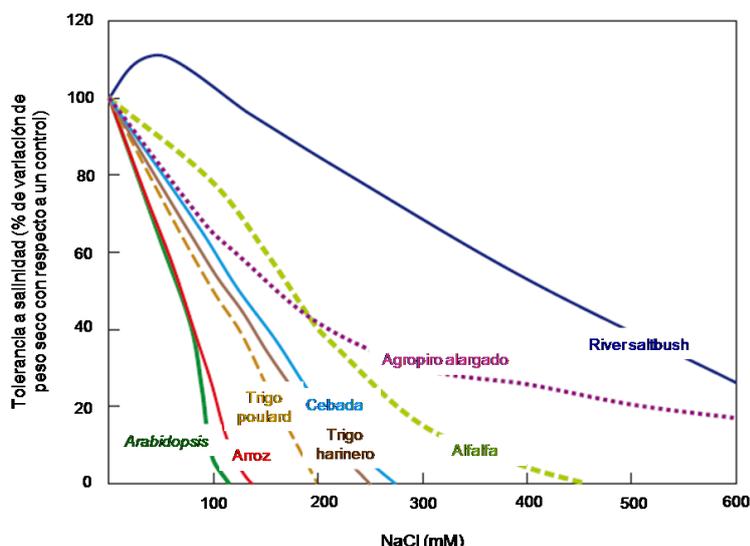
#### 1.4. Tolerancia a la salinidad en plantas.

La tolerancia a la salinidad puede definirse como la capacidad de las plantas para crecer y completar su ciclo de vida desarrollándose en un sustrato que contiene elevadas concentraciones de sales solubles (Parida, 2005). Tradicionalmente, las plantas han sido clasificadas en tres grandes grupos en base a su tolerancia a la salinidad (Greenway y Munns, 1980):

1. "Halófitas". Son plantas muy tolerantes a la salinidad, capaces de completar su ciclo de vida en ambientes con elevadas concentraciones salinas en el suelo (200-500 mM de NaCl).

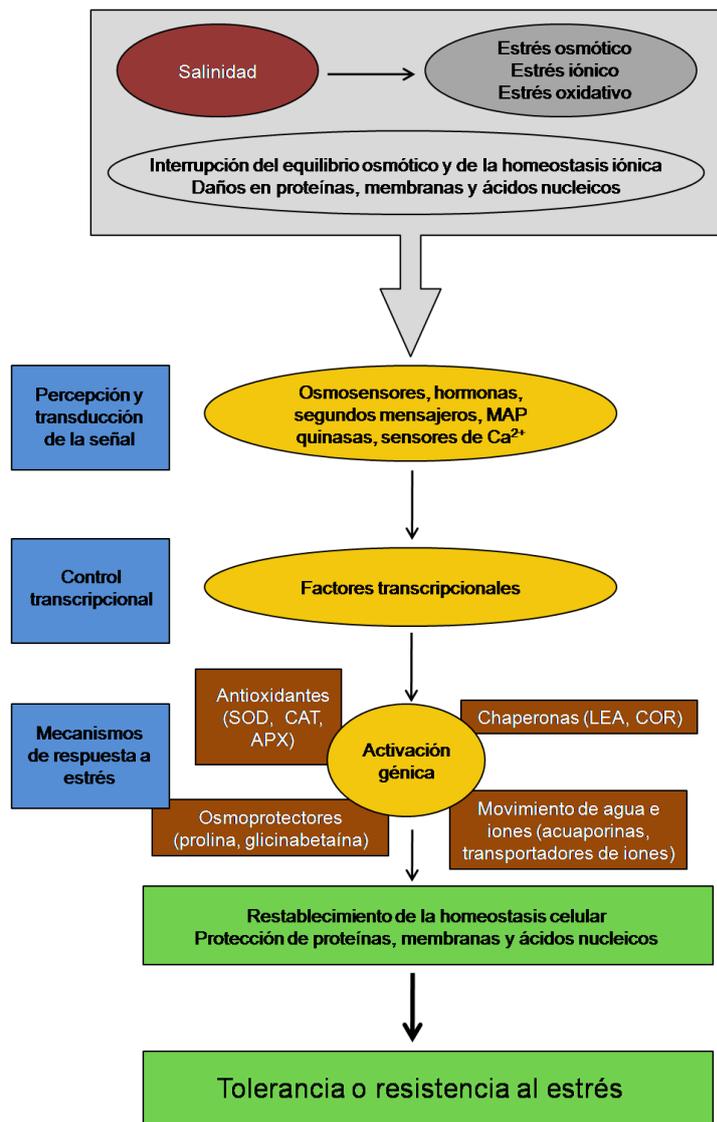
2. “Halófitas-glicófitas”. Este grupo lo forman plantas halófitas menos tolerantes que las incluidas en el apartado anterior (100-200 mM de NaCl) y glicófitas tolerantes capaces de desarrollar su ciclo de vida en suelos con concentraciones salinas cercanas a 100 mM de NaCl.
3. “Glicófitas”. Se trata de plantas muy sensibles, fuertemente afectadas a niveles de 50 mM de NaCl.

Este amplio rango de tolerancia a la salinidad puede darse tanto entre grupos de plantas taxonómicamente distintos como entre especies estrechamente relacionadas (Tester y Davenport, 2003). En este sentido, la Figura 2 muestra las respuestas de crecimiento de distintas especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas frente a diferentes concentraciones salinas (Munns y Tester, 2008). Entre los cereales (monocotiledóneas), el arroz es considerada la especie más sensible, mientras que el agropiro resulta el más tolerante. Entre las dicotiledóneas, *Arabidopsis thaliana* resulta más sensible que el arroz pero el saltbush es muy tolerante. Estos datos ponen de manifiesto que la variación en la tolerancia a la salinidad en especies de dicotiledóneas resulta más amplia que en monocotiledóneas.



**Figura 2. Diversidad en la tolerancia a salinidad de diferentes especies de plantas.** La diversidad en la tolerancia a salinidad se muestra como el porcentaje de variación en peso seco tras ser cultivadas durante tres semanas en presencia de diferentes concentraciones de NaCl y relativa al crecimiento en ausencia de NaCl. Los datos corresponden a arroz (*Oryza sativa*), trigo poulard o australiano (*Triticum turgidum ssp durum*), trigo harinero (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordeum vulgare*), agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), alfalfa (*Medicago sativa*) y river saltbush (*Atriplex amnicola*) (Munns y Tester, 2008).

Las estrategias adaptativas desarrolladas por las plantas para hacer frente a las elevadas concentraciones salinas deben ir encaminadas tanto a restaurar y mantener el equilibrio osmótico e iónico como a hacer frente al estrés oxidativo. Ello requiere de un sistema apropiado de percepción y transducción de la señal en el que una serie de moléculas deben regular la actividad de las proteínas efectoras implicadas en la respuesta (Vinocur y Altman, 2005) (Figura 3).



**Figura 3. Representación esquemática de la complejidad en la respuesta de las plantas al estrés salino.** La salinidad induce estrés osmótico, iónico y oxidativo que afectan al crecimiento y desarrollo de la planta. Estos tres tipos de estrés son detectados por sistemas de percepción desencadenándose un proceso de señalización aguas abajo que activa los mecanismos de respuesta a estrés mediante inducción de determinados genes. Esta respuesta conduce finalmente al restablecimiento de la homeostasis celular, y en consecuencia, a la tolerancia al estrés (modificado de Vinocur y Altman, 2005).

#### 1.4.1. Respuesta fisiológica al estrés osmótico inducido por salinidad.

El primer efecto provocado por la salinidad es la disminución del potencial hídrico de la solución del suelo (efecto osmótico). Este efecto comienza en el momento en que la concentración de sales en torno a las raíces de la planta aumenta hasta un nivel umbral que para la mayor parte de las plantas es de 40 mM de NaCl, pudiendo ser incluso menor en el caso de plantas muy sensibles a salinidad como el arroz y *Arabidopsis* (Munns, 2002; Zhu, 2002; Tester y Davenport, 2003; Tujeta, 2007). En esta situación, la capacidad de absorción de agua y nutrientes minerales por parte de las raíces de la planta se ve seriamente afectada, produciéndose un efecto similar al ocasionado por el estrés hídrico y provocando una reducción de la expansión foliar y pérdida de turgencia. Bajo estas condiciones, la planta se ve en la necesidad de disminuir su potencial hídrico haciendo que sea inferior al reinante en la rizosfera para mantener el volumen celular y la turgencia, proceso que recibe el nombre de osmorregulación o ajuste osmótico. El ajuste osmótico implica, por una parte, la absorción y acumulación de iones salinos procedentes del sustrato y, por otra, la biosíntesis de solutos orgánicos (Alarcón y col., 1993). La ventaja de estos últimos es que, incluso a elevadas concentraciones, no resultan perjudiciales para el metabolismo celular, razón por la que se les ha denominado osmolitos o solutos compatibles (Hasegawa y col., 2000; Huang y col., 2000).

Los solutos compatibles comprenden una amplia gama de compuestos entre los que destacan los ácidos orgánicos y los monosacáridos, principalmente fructosa y glucosa, aunque existen otros muchos a los que a bajas concentraciones también se les ha asignado el papel de osmolitos: alcoholes (glicerol e inosítoles metilados), azúcares complejos (trehalosa, rafinosa y fructanos), polioles, aminoácidos (prolina) y compuestos de amonio cuaternario (glicinabetaína y alaninabetaína) (Nuccio y col., 1999). En la mayoría de las glicófitas, los azúcares son los principales solutos compatibles que intervienen en el ajuste osmótico (Greenway y Munns, 1980) y aunque su síntesis permite a la planta sobrevivir, al requerir energía ésta se produce a expensas del crecimiento de la misma. Si bien estos compuestos intervienen en el mantenimiento de la presión de turgor, también podrían actuar como osmoprotectores, razón por la que se les han asignado funciones tanto en la protección de la integridad de membranas como frente a los daños derivados del estrés oxidativo (Mansour, 1998; Rhodes y col., 2002). Así, plantas de tabaco transgénicas que sobreexpresaron el gen *TPS1* (trehalosa-6-fosfato sintasa) de levaduras mostraron un menor daño oxidativo en condiciones de estrés salino (Romero y col., 2002).

#### **1.4.1.1. Papel de la prolina en el estrés salino.**

Posiblemente, el compuesto osmótico más estudiado en la bibliografía relacionada con el estrés salino sea la prolina, aminoácido esencial que forma parte de la respuesta a diversos tipos de estrés biótico y abiótico (Szabados y col., 2011). En plantas superiores, la prolina es sintetizada principalmente a partir de glutamato, el cual se reduce a glutamato semialdehído (GSA) por acción de la enzima pirrolin-5-carboxilato sintetasa (P5CS). Posteriormente, el GSA se convierte, de forma espontánea, en pirrolin-5-carboxilato (P5C) que vuelve a ser reducido por la enzima P5C reductasa generando prolina. En cuanto al catabolismo de la prolina, éste tiene lugar a nivel mitocondrial. La prolina es transformada en P5C vía la enzima prolina deshidrogenasa o prolina oxidasa y, posteriormente, el P5C es convertido en glutamato mediante la enzima P5C deshidrogenasa (Szabados y Savouré, 2010).

Se han descrito múltiples funciones protectoras para la prolina bajo diversas condiciones de estrés. Durante muchos años se ha pensado que la prolina podría actuar como un osmolito neutro, protegiendo las estructuras celulares y estabilizando a los enzimas (Delauney y Verma, 1993; Sharma y Dubey, 2005). Así mismo, se ha propuesto que desarrollaría un papel importante como antioxidante, como molécula señalizadora e incluso como fuente de energía en el proceso de recuperación posterior al estrés (Szabados y col., 2011). Por otra parte, en los últimos años, se ha descrito la presencia del “ciclo de la prolina” en plantas, identificado anteriormente en levaduras y mamíferos. Este ciclo consiste en que el P5C producido por la actividad de la prolina deshidrogenasa mitocondrial puede seguir la vía catabólica, o bien, puede ser transportado de nuevo al citosol para sintetizar prolina. La prolina deshidrogenasa es una enzima de la membrana mitocondrial interna que tiene un grupo FAD capaz de oxidarse o reducirse y, por tanto, de transferir electrones a la cadena de transporte electrónico mitocondrial. La intensificación de este ciclo puede dar lugar a un incremento del flujo de electrones generando ROS al usar el O<sub>2</sub> como aceptor electrónico final (Miller y col., 2009). Este ciclo, que en principio pudiera parecer fútil, puede ser utilizado en humanos para inducir muerte celular programada en células cancerosas mediante un sistema de señalización celular que da lugar a apoptosis (Liu y col., 2006).

#### 1.4.2. Respuesta fisiológica al estrés iónico y nutricional inducido por salinidad.

Según Munns (2002), el  $\text{Na}^+$  comienza a inhibir la mayoría de los enzimas a una concentración superior a 100 mM. Esta inhibición tiene lugar tanto de forma directa al enlazarse el  $\text{Na}^+$  a los sitios de inhibición como, de forma indirecta, por desplazar al  $\text{K}^+$  de los lugares de activación enzimáticos (Serrano, 1996). En ambos casos, la competitividad entre  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  parece ser crítica y, por consiguiente, la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  citosólica resulta un factor más determinante para evaluar la toxicidad del  $\text{Na}^+$  que su propia concentración citosólica *per se* (Amtmann y Sanders, 1999; Glenn y col., 1999; Cuin y col., 2003). En este sentido, los recientes progresos en genética molecular y electrofisiología de plantas sugieren que la homeostasis del  $\text{K}^+$  y el  $\text{Na}^+$  resulta un mecanismo clave en la tolerancia al estrés salino y constituye un proceso complejo y coordinado que conlleva al mantenimiento en el citoplasma de una alta relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  (Tester y Davenport, 2003; Apse y Blumwald, 2007; Shabala y Cuin, 2008).

Por tanto, la acumulación de iones salinos ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) en el citosol provoca un estrés iónico en la planta, alterando la homeostasis no solamente de estos iones sino también de  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}$  (Hasegawa y col., 2000; Rodríguez-Navarro, 2000) y generando, en última instancia, desequilibrio nutricional (Silberbush y Ben-Asher, 2001). Es por esto, que la supervivencia y desarrollo de la planta dependerán de su capacidad para restablecer la homeostasis iónica después de la imposición del estrés, lo que implica adaptar el metabolismo con el fin de mantener las condiciones homeostáticas que le permitan reanudar el crecimiento y completar el ciclo vegetativo (Munns y Tester, 2008). Los mecanismos mediante los que la planta trata de hacer frente a la toxicidad iónica generada por los iones salinos son:

1. *Exclusión*. Tiene lugar mayoritariamente a nivel radicular y consiste en reducir la absorción de los iones salinos y en su eflujo desde el citoplasma al medio externo.
2. *Compartimentación*. Este mecanismo está basado en la acumulación de los iones salinos en determinados compartimentos celulares, mayoritariamente vacuolas, evitando su toxicidad en el citoplasma. Además, contribuye de forma significativa al ajuste osmótico.
3. *Excreción*. Radica en la eliminación de iones salinos a través de glándulas especializadas.
4. *Suculencia*. Consiste en evitar la toxicidad de los iones salinos mediante su dilución.

La importancia de cada uno de los mecanismos expuestos anteriormente dependerá de diversos factores entre los que podemos destacar la especie vegetal, el tiempo de exposición a la situación de estrés, la concentración salina y las condiciones ambientales.

#### **1.4.2.1. Exclusión de Na<sup>+</sup>.**

Se trata de un mecanismo muy eficiente para prevenir la translocación y acumulación de sales en las partes superiores de la planta. Está basado en la baja permeabilidad a los iones salinos en la raíz, aún en presencia de elevadas concentraciones de NaCl (Munns y col., 1983), y en el eflujo de Na<sup>+</sup> del citoplasma al medio externo vía membrana plasmática por un antiporte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> impulsado por una H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana (Sze y col., 1999; Horie y Schroeder, 2004).

#### **1.4.2.2. Regulación celular de Na<sup>+</sup> y su compartimentación vacuolar.**

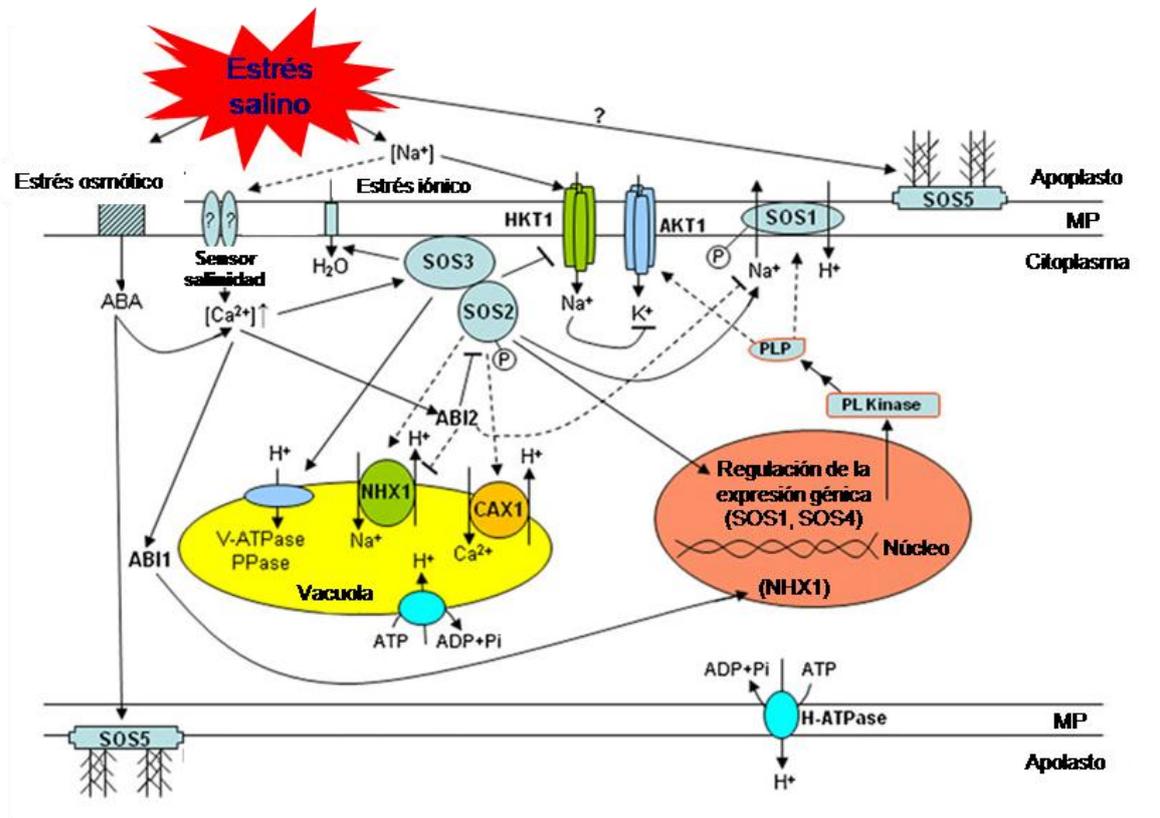
Según Blumwald y col. (2000a), existe una correlación importante entre la compartimentación iónica y la tolerancia a salinidad en las plantas halófitas y las glicofitas tolerantes. Así pues, en condiciones salinas la compartimentación vacuolar de Na<sup>+</sup> permite tanto un ajuste osmótico eficaz como la retirada de iones tóxicos del citosol. Se trata de un proceso dependiente de energía y requiere de la actividad de transportadores específicos, localizados en el tonoplasto, que desempeñan un papel relevante en la regulación de la homeostasis iónica (Apse y col., 1999; Dietz y col., 2001; Apse y Blumwald, 2002; Zhu, 2003).

Resultan numerosos los estudios llevados a cabo con el objeto de identificar los transportadores y canales iónicos que regulan el movimiento neto de Na<sup>+</sup> a través de las membranas celulares (Amtmann y Sanders, 1999; Schachtman y Liu, 1999; Blumwald, 2000b; Serrano, 2002). Wu y col. (1996) identificaron varios mutantes de *Arabidopsis thaliana* hipersensibles a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> e incapaces de crecer a bajas concentraciones de K<sup>+</sup> a los que denominaron SOS (Salt Overlay Sensitive). Dichos autores indicaron que estos mutantes definen tres loci SOS: SOS1, SOS2 y SOS3.

1. SOS1. La proteína que codifica SOS1 está localizada principalmente en la membrana plasmática (Shi y col., 2002) y se corresponde con un antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Brett y col., 2005). Pertenece a la subfamilia NhaP, dentro de la familia de proteínas CPA1 (Pardo y col., 2006), y desempeña el papel más relevante en la

- tolerancia a salinidad en el reino vegetal. En comparación con plantas mutantes SOS2 y SOS3, los mutantes SOS1 son aún más sensibles a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup>.
2. SOS2. Este gen codifica una proteína quinasa serina/treonina (Halfter y col., 2000) implicada en la regulación de proteínas de transporte iónico como SOS1. SOS2 interacciona físicamente con SOS3 formando parte de la misma ruta reguladora (Liu y col., 2000). Por otra parte, se ha encontrado relación tanto entre el gen SOS2 y la señalización mediada por ROS como entre el mismo gen y la respuesta al ABA (Ohta y col., 2003). Así mismo, también se ha identificado el papel importante que SOS2 desempeña en procesos de desarrollo y floración.
  3. SOS3. El gen SOS3 codifica una proteína de unión a Ca<sup>2+</sup> que pertenece a la familia de proteínas de tipo EF-hand. En *Arabidopsis*, la expresión de SOS3 es específica de raíces, no mostrando variaciones tras la aplicación de un estrés salino (Quan y col., 2007). Sin embargo, en tomate, donde también se ha descrito su expresión en raíces, muestra una disminución en presencia de elevadas concentraciones salinas (Huertas, 2011).

Según el modelo propuesto en la ruta de señalización SOS (Salt Overly Sensitive) (Figura 4) para la regulación de la homeostasis iónica, en condiciones de estrés salino los iones Na<sup>+</sup> entrarían a la célula a través del transportador de membrana plasmática HKT1, pudiendo ser translocados fuera de la misma o a la vacuola por la acción del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de membrana plasmática SOS1 o de los antiportadores vacuolares NHX1 y NHX2, que además parecen contribuir a secuestrar K<sup>+</sup> en la vacuola (Pardo y col., 2006). Este antiporte estaría impulsado por un gradiente electroquímico de H<sup>+</sup> generado por las bombas de membrana plasmática (H<sup>+</sup>-ATPasa) y de tonoplasto (H<sup>+</sup>-ATPasa y H<sup>+</sup>-pirofosfatasa). Parece ser que el Ca<sup>2+</sup> desempeña un papel clave en la regulación de la homeostasis iónica aumentando su concentración citosólica inmediatamente después de la imposición del estrés, proceso mediado por el ácido abscísico (ABA) (Knight y col., 1997). En este sentido, un aporte exógeno de Ca<sup>2+</sup> reduce el efecto tóxico del NaCl, presumiblemente facilitando una mayor relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> (Liu y Zhu, 1997) y potenciando la señal de transducción del estrés, lo que conduce a una adaptación a la salinidad (Sanders y col., 1999).



**Figura 4. Regulación de la homeostasis iónica por la ruta de señalización SOS (Salt Overly Sensitive) durante el proceso de adaptación a estrés salino.** El transportador de membrana plasmática HKT1 y los antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de membrana plasmática SOS1 y vacuolar NHX1 desempeñan un papel clave en la respuesta al estrés iónico regulando la homeostasis celular. (Türkan y Demiral, 2009).

A pesar de lo descrito con anterioridad, recientemente se ha cuestionado el papel real de los antiportadores NHX en la acumulación de Na<sup>+</sup> en la vacuola. Leidi y col. (2010) y más recientemente Barragán y col. (2012) han demostrado en *Arabidopsis thaliana* que tanto AtNHX1 como AtNHX2 están implicados en la acumulación de K<sup>+</sup>, regulando de esta forma el turgor celular, pero no en el aumento de la capacidad de acumulación de Na<sup>+</sup> en la vacuola. En vista de estos resultados, se abre de nuevo la cuestión acerca de cuáles son los principales mecanismos de transporte de Na<sup>+</sup> a la vacuola. Otros candidatos posibles propuestos como transportadores de Na<sup>+</sup> vacuolares son las proteínas CHX y KEA, sin embargo, su capacidad transportadora no ha sido demostrada (Pardo y col., 2006). Otro grupo importante de transportadores de membrana implicados en procesos de estrés abiótico, principalmente estrés salino, son los canales no selectivos de cationes (NSCCs). La característica general de estos transportadores es que catalizan el flujo pasivo de cationes a través de la membrana

plasmática (Demidchik y Tester, 2002; Demidchik y Maathuis, 2007). En los últimos años se ha observado que participan en un amplio número de respuestas al estrés tales como crecimiento y desarrollo, absorción de nutrientes y señalización. En el caso del estrés salino, se induce un sistema concertado de NSCCs. Así, a nivel radicular, durante los primeros momentos en que se produce el estrés salino tiene lugar una rápida entrada de  $\text{Na}^+$  mediada por canales no selectivos de cationes independientes de voltaje (VI-NSCC). Al mismo tiempo, se genera un incremento en los niveles celulares de 3', 5'-guanosina monofosfato cíclica (cGMP), posiblemente vía un sensor de turgor de membrana, que es un receptor quinasa que activaría a la guanil ciclasa. Este cGMP producido tendría doble función, por un lado inhibiría los canales VI-NSCCs reduciendo la entrada de  $\text{Na}^+$  y, por otro, activaría los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGC) introduciendo  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma y desencadenando la ruta de señalización mediada por este catión que, entre otras funciones, induciría la producción de ROS por acción de las NADPH oxidasas de membrana plasmática (Demidchik y Maathuis, 2007).

Así mismo, en los últimos años diferentes autores han propuesto que los procesos de endocitosis también podrían participar en la tolerancia al estrés salino (Mimura y col., 2003; Mazel y col., 2004; Leshem y col., 2006; Hamaji y col., 2009). Mazel y col. (2004) obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis* tolerantes a estrés salino que sobreexpresaban el gen *AtRab7*. Estas plantas mostraron un incremento en el tráfico de vesículas desde la membrana plasmática hacia las vacuolas, que se correlacionó con un aumento en la concentración de  $\text{Na}^+$  en las mismas. Además, Leshem y col. (2006) observaron que la expresión de las proteínas de la familia VAMP7C, perteneciente al grupo de proteínas v-SNARE que participan en el último paso de fusión de la vesícula endocítica con el tonoplasto, estaba fuertemente regulada en raíces de plantas de *Arabidopsis* sometidas a condiciones de estrés salino.

Por otra parte, parece ser que no solamente las vacuolas actúan como acumuladoras de  $\text{Na}^+$ . En este sentido, Kanai y col. (2007) han propuesto un posible papel de los gránulos de almidón como lugar de almacenamiento de este ion. Según estos autores, los gránulos de almidón competirían con la vacuola al secuestrar  $\text{Na}^+$ , reduciendo de esta forma los niveles del mismo en el citoplasma y atenuando su efecto tóxico para el metabolismo celular.

#### 1.4.2.3. Excreción de sales.

Se trata de un mecanismo asociado al desarrollo de estructuras especiales denominadas “glándulas de la sal” que se encuentran distribuidas en la epidermis de las hojas (Pennewiss y col., 1997). Estas glándulas resultan comunes a muchas plantas halófitas de distintos géneros y secretan sales de forma activa a la superficie de la hoja a través de la cutícula, donde pueden ser arrastradas por el agua de lluvia. Dschida y col. (1992) describieron en *Avicennia germinans* la excreción de sales por las glándulas como un proceso dependiente de la energía generada por la actividad de la bomba  $H^+$ -ATPasa de membrana plasmática.

Los productos de secreción de las glándulas salinas contienen gran cantidad de elementos minerales entre los que destacan los cationes  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  y los aniones  $Cl^-$ ,  $SO_4^{-2}$ ,  $PO_4^{-3}$  y  $CO_3^{-2}$  (Ziegler y Lüttge, 1967; Hogarth, 1999). En algunos casos aparecen compuestos orgánicos como azúcares, aminoácidos y aminos, lo que indica la posibilidad de que se produzcan pérdidas de compuestos procedentes del protoplasma como consecuencia de una alteración de las membranas celulares durante el proceso de excreción (Ziegler y Lüttge, 1967).

#### 1.4.2.4. Suculencia.

La suculencia es característica de muchas plantas halófitas (Crawford, 1989) y representa una forma eficaz de mitigar los efectos osmóticos y tóxicos de los iones mediante dilución. Las principales alteraciones morfo-anatómicas que se producen en plantas suculentas son: aumento del volumen celular (principalmente en células del parénquima esponjoso), aumento del grosor de las hojas y disminución de la densidad estomática (Rilke y Reimann, 1996; Smekens y Vantienderen, 2001).

#### 1.4.3. Respuesta fisiológica al estrés oxidativo inducido por salinidad.

La generación de ROS constituye un proceso natural y continuo derivado del metabolismo energético en organismos aerobios basado en reacciones de oxidación-reducción (Mano, 2002). En las plantas, las ROS son productos habituales de las reacciones de fotosíntesis, fotorespiración,  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y del transporte electrónico mitocondrial. No obstante, a pesar del importante papel fisiológico que desempeñan, las ROS pueden resultar especies químicas altamente reactivas y con elevado poder oxidante capaces de provocar daños severos sobre

macromoléculas esenciales de las células ocasionando peroxidación lipídica, desnaturalización proteica y diversos tipos de alteraciones en los ácidos nucleicos (Halliwell y Gutteridge, 1989). Es por esto que los organismos aerobios, necesitados del oxígeno para vivir, se han visto obligados a desarrollar defensas antioxidantes (Halliwell, 1999).

Cuando las plantas se encuentran sometidas a condiciones de estrés puede producirse un desequilibrio entre la producción de ROS y la actividad de los sistemas antioxidantes como consecuencia de la alteración de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, resultando finalmente en estrés oxidativo (Parida, 2005). En estas circunstancias, plantas con elevados niveles de antioxidantes presentan mayor resistencia al daño oxidativo (Wise y Naylor, 1987; Szychalla y Desborough, 1990), existiendo una correlación entre los niveles de antioxidantes y la tolerancia a salinidad (Olmos y col., 1994; Hernández y col., 1995; Hernández y col., 2000; Benavides y col., 2000; Lee y col., 2001b; Mittova y col., 2002; Mittova y col., 2003). De entre los diversos marcadores que indican el grado de daño oxidativo sufrido por las plantas destaca el malondialdehído (MDA), subproducto de la peroxidación lipídica en las membranas biológicas (Wong y col., 1987), resultando el aumento en su concentración indicativo de estrés oxidativo (Hossain y col., 2009).

#### 1.4.3.1. Formación de ROS.

En condiciones normales, las ROS (radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical libre hidroxilo ( $\cdot OH$ )) se producen como resultado del metabolismo celular durante el proceso completo de reducción del oxígeno molecular ( $O_2$ ) hasta agua (Figura 5). Es por esto que la toxicidad del oxígeno, para los organismos aerobios, es debida principalmente a su forma excitada (el oxígeno singlete,  $^1O_2$ ) y a los productos de su reducción (Fridovich, 1986).

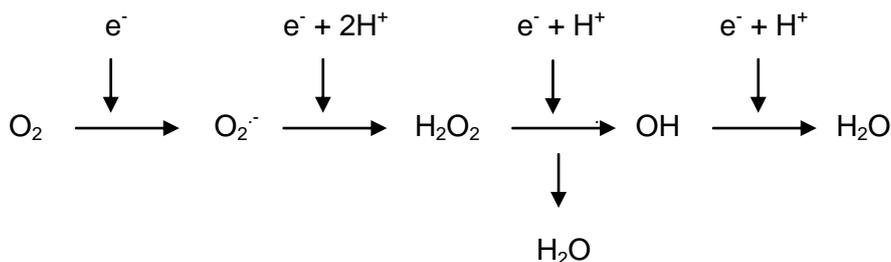


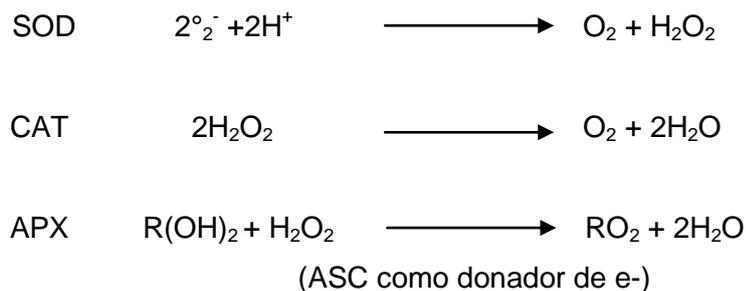
Figura 5. Etapas de la reducción completa del oxígeno molecular ( $O_2$ ) hasta agua.

#### **1.4.3.2. Papel fisiológico de las ROS en los sistemas vegetales.**

Las ROS no deben ser consideradas solamente como agentes tóxicos producidos por el metabolismo aerobio. Numerosos trabajos ponen de manifiesto su importancia como agentes reguladores y de señalización (Apel y Hirt, 2004; Mittler y col., 2004; Foyer y Noctor, 2005). En este sentido, las ROS están implicadas en la regulación de las respuestas de defensa y muerte celular (Desikan y col., 1998), gravitropismo (Joo y col., 2001), apertura estomática (Kwak y col., 2003; McAinsh y col., 1996; Murata y col., 2001; Pei y col., 2000; Zhang y col., 2001a; Zhang y col., 2001b; Zhang y col., 2001c), crecimiento polar y expansión celular (Coelho y col., 2002; Foreman y col., 2003; Gapper y Dolan, 2006) y crecimiento de los pelos radiculares (Foreman y col., 2003). Así mismo, en condiciones de estrés abiótico las ROS regulan la expresión de genes (Pei y col., 2000; Pastori y Foyer, 2002; Mittler y col., 2004; Shin y Schachtman, 2004) y la actividad de canales iónicos (Foreman y col., 2003). Del mismo modo, participan en respuestas defensivas frente a la infección por patógenos en plantas como el melocotonero y albaricoquero (Díaz-Vivancos y col., 2006), el guisante (Srivastava y Dwivedi, 1998; Díaz-Vivancos y col., 2008) o el rosal y la judía verde (Bolwell y col., 1998).

#### **1.4.3.3. Sistemas antioxidantes.**

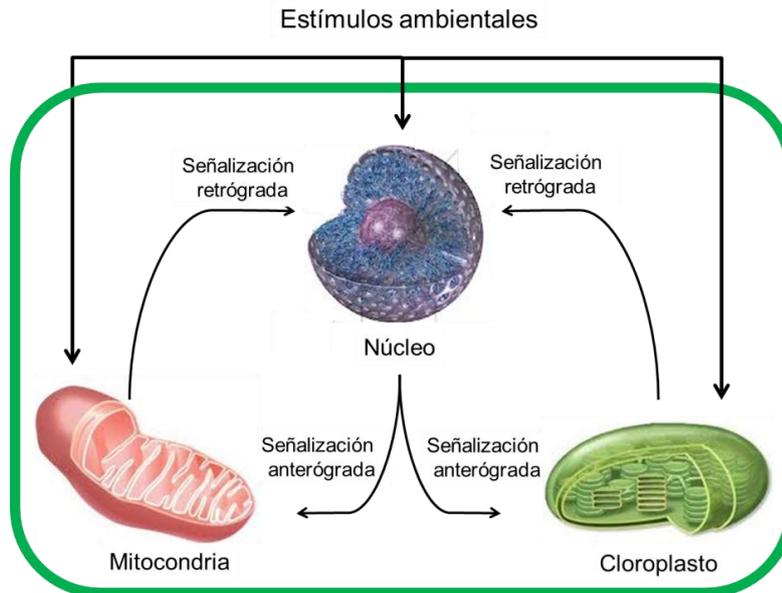
Para protegerse de los efectos tóxicos que producen las ROS, las células deben desarrollar mecanismos que permitan mantenerlas en unos niveles que resulten compatibles con el metabolismo celular incrementando la actividad y/o la expresión de los sistemas enzimáticos antioxidantes así como la síntesis y regeneración de sus metabolitos redox (De Gara y col., 2003; Torres y col., 2006; Torres, 2010). Los principales sistemas enzimáticos antioxidantes presentes en plantas son catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POX), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), mientras que el glutatión (GSH), el ascorbato (ASC), el  $\alpha$ -tocoferol y el  $\beta$ -caroteno constituyen sus metabolitos redox. Las SODs son componentes esenciales de los sistemas de protección oxidativa de la mayor parte de las plantas y catalizan la dismutación de dos radicales superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno generado puede ser eliminado posteriormente por las CATs y las APXs (Figura 6).



**Figura 6. Eliminación de las ROS por parte de los principales sistemas enzimáticos antioxidantes presentes en plantas.**

#### 1.4.3.4. Señalización celular mediada por ROS.

Tradicionalmente se ha denominado como “estrés oxidativo” a la situación originada por el desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad de un sistema biológico para eliminarlas y reparar los daños producidos. Este término, con ciertas connotaciones negativas, implica un proceso perjudicial cuando en realidad numerosos trabajos ponen de manifiesto que el incremento en los niveles de ROS, principalmente  $\text{O}_2^{\cdot -}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , parece ser un componente esencial en el repertorio de señales que utilizan las plantas para realizar ajustes en la expresión génica y la estructura celular en respuesta a señales ambientales y del desarrollo (Foyer y Noctor, 2005). En este sentido, desviaciones en el estado redox normal en los cloroplastos y las mitocondrias pueden ser detectadas y transmitidas al núcleo a través de cascadas de señalización retrógrada (Suzuki y col., 2012). Dado que el aumento en los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la mitocondria y los cloroplastos se relaciona con cambios en el transcriptoma nuclear (Pesaresi y col., 2006), se ha sugerido que las ROS constituirían las moléculas señal entre organelas y núcleo (Apel y Hirt, 2004). Los mecanismos de señalización retrógrada permiten la comunicación del estado funcional y de desarrollo desde las organelas al núcleo, haciendo que este último module las señales anterógradas y regule el metabolismo celular de forma acorde a las necesidades puntuales. Estas señales permiten la expresión coordinada de los genomas nuclear, cloroplástico y mitocondrial dirigiendo cambios adaptativos en respuesta a fluctuaciones o variaciones drásticas en las condiciones ambientales que provocan situaciones de estrés celular (Woodson y Chory, 2008) (Figura 7).



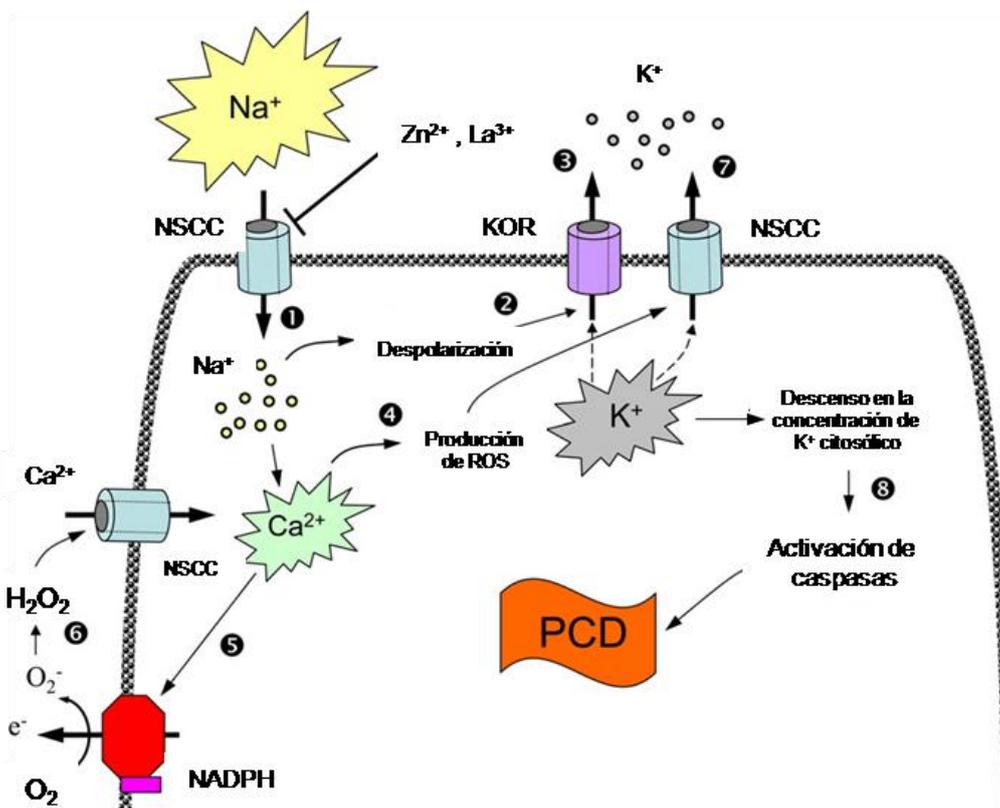
**Figura 7. Señalización retrograda y anterógrada mediada por ROS.** Los estímulos ambientales afectan a la expresión de genes nucleares codificantes para proteínas de organelas. Este proceso afecta, a su vez, la función y expresión de genes cloroplásticos y mitocondriales a través de las vías de señalización anterógrada. Cloroplastos y mitocondrias son capaces de detectar desviaciones en su estado redox normal, comunicando al núcleo, mediante las vías de señalización retrograda, su estatus funcional y determinando la expresión y regulación de genes nucleares (Adaptado de Woodson y Chory, 2008).

### 1.5. Muerte celular programada y estrés salino.

La muerte celular programada (PCD) es un proceso celular fundamental conservado evolutivamente en células eucariotas de diferente origen que constituye una parte integral del desarrollo vegetal y de las respuestas tanto a patógenos como a diferentes tipos de estrés abiótico, incluyendo el salino (Affenzeller y col., 2009; Shabala, 2009; van Doorn y col., 2011). Así mismo, está implicada, entre otros, en procesos tales como la diferenciación del floema, la formación de los elementos traqueales y del aerénquima y la senescencia foliar (Huh y col., 2002). Las características típicas de la PCD incluyen la fragmentación del DNA en secciones discretas de entorno a 180 pares de bases (laddering DNA), condensación y contracción del citoplasma, liberación de citocromo c de las mitocondrias, incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y aumento en la actividad de las enzimas degradadoras de la familia de las caspasas (Danon y col., 2000; Krishnamurthy y col.,

2000; Wood, 2001; Hoerberichts y Woltering, 2002). La clasificación de la PCD en plantas está basada en criterios morfológicos de forma que se pueden establecer dos clases de PCD: muerte celular vacuolar y necrosis (van Doorn y col., 2011).

Según el modelo propuesto por Shabala y col., 2006, bajo condiciones de estrés salino se produce una fuerte despolarización de la membrana plasmática como consecuencia de la entrada de  $\text{Na}^+$ , lo que favorece la salida de  $\text{K}^+$ . Si asumimos que en tejidos vegetales las proteasas de la familia de las caspasas están reguladas de igual manera que en tejidos animales, donde su actividad se incrementa por bajas concentraciones citosólicas de  $\text{K}^+$  (Hughes y Cidlowski, 1999), la entrada de  $\text{Na}^+$  al citosol activaría estas proteasas desencadenando la muerte celular (Figura 8).



**Figura 8. Modelo propuesto para la ruta de señalización iónica durante la PCD en plantas.** NSCC: canal de cationes no selectivo; KOR: canal activado por la despolarización de la membrana plasmática; PCD: muerte celular programada; ROS: especies reactivas del oxígeno (Shabala, 2009).

## **1.6. Las ómicas y su importancia en el estudio de la salinidad.**

Los avances logrados tanto en el campo de la biología como en el de la bioinformática han permitido dar un nuevo enfoque, desde un punto de vista global, al estudio del conjunto de procesos biológicos que tienen lugar en plantas sometidas a condiciones de estrés salino. Este concepto de globalización se ve reflejado en el desarrollo de lo que se ha denominado como “ciencias ómicas”. El concepto de ciencias ómicas recoge aquellas disciplinas como la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica que se basan en el análisis de un gran volumen de datos, por lo que hacen uso de la bioinformática en la interpretación de los mismos.

Actualmente, tanto la transcriptómica como la proteómica pueden considerarse como herramientas indispensables en el estudio de la salinidad, habiendo proporcionado una información muy valiosa, pues permiten tener una visión global e integrada de la respuesta celular al estrés. Sin embargo, uno de los problemas que pueden surgir al intentar integrar los resultados de transcriptómica y proteómica es que los niveles de expresión de ARNm de ciertos genes no se correspondan con los de las proteínas correspondientes. Esto es debido, principalmente, a las modificaciones post-transcripcionales y post-transduccionales que tienen lugar desde el momento en que se activa un gen hasta que se sintetiza la proteína funcional para la que codifica (Gygi y col., 2000; Sobhanian y col., 2011; Zhang y col., 2012). Por tanto, resulta esencial estudiar la respuesta a salinidad a nivel proteico. En este sentido, el análisis del proteoma, definido como el conjunto de proteínas producido por un genoma en particular (van Wijk, 2001), está considerado como la aproximación más directa para definir la función de los genes en un organismo (Sha Valli Khan y col., 2007).

Numerosos trabajos basados en el análisis masivo del nivel de expresión de miles de genes por microarrays ponen de manifiesto cambios producidos en el transcriptoma de plantas tras someterlas a tratamientos salinos (Kawasaki y col., 2001; Kreps y col., 2002; Ozturk y col., 2002; Seki y col., 2002; Sreenivasulu y col., 2004; Taji y col., 2004; Chao y col., 2005; Walia y col., 2005; Sreenivasulu y col., 2007). Una lista detallada de los genes identificados por análisis de microarrays de ADNc inducidos por elevadas concentraciones salinas se encuentra disponible en <http://pfgweb.gsc.riken.go.jp>. Los productos de estos genes de respuesta a estrés salino se clasifican en dos grandes categorías (Sha Valli Khan y col., 2007). El primer grupo incluye proteínas funcionales entre las que podemos destacar proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins (HSPs)), proteínas LEA (Late Embriogenesis

Abundant) implicadas en la reparación y protección de daños, transportadores de membrana, proteínas relacionadas con la síntesis de osmoprotectores, con la síntesis de hormonas como ABA y etileno, con la senescencia, con el metabolismo de carbohidratos y proteínas de unión a ARN. El segundo grupo está formado por proteínas reguladoras, principalmente factores implicados en la regulación de la señal de transducción y la expresión génica, entre las que se encuentran diversas quinasas y fosfatasa, fosfolipasas C y D y proteínas de unión a calmodulina y  $Ca^{2+}$ .

## **1.7. Cultivos celulares como herramienta en investigación.**

### **1.7.1. Perspectiva histórica.**

El cultivo aséptico *in vitro* de tejidos y células vegetales bajo parámetros físicos y químicos definidos constituye una herramienta muy útil tanto en investigación básica como aplicada llegando a convertirse, hoy en día, en el dogma central de la Biotecnología Vegetal. Sin embargo, mientras que durante los últimos 20 años los progresos en tecnología de cultivos de tejidos y células vegetales han sido numerosos, los orígenes de las técnicas que posibilitaron su establecimiento se remontan al siglo XIX.

Gottlieb Haberlandt fue, probablemente, la primera persona que tomó la iniciativa en este campo al intentar obtener, en 1865, evidencias experimentales de la totipotencia celular cultivando tejidos y células de diferentes especies vegetales en soluciones nutritivas con la esperanza de regenerar plantas completas (Haberlandt, 1902; Krikorian y Berquam, 1969; Fowler, 1985; Vasil, 2008). A pesar de no obtener éxito, los resultados de sus experimentos aportaron indicios acerca de la potencialidad que la célula vegetal posee, introduciendo el concepto de "totipotencia vegetal" (implícito en la Teoría Celular propuesta por Schleiden (1838) y Schwann (1858)) e indicando que la técnica de cultivo de tejidos y células vegetales en soluciones nutritivas aportaba un novedoso enfoque experimental que permitiría abordar cuestiones básicas en Fisiología Vegetal. En la década de 1930 dos grandes descubrimientos repercutieron de manera fundamental sobre el desarrollo de la técnica de cultivo de tejidos y células vegetales al posibilitar una mejora sustancial de los medios nutritivos: la identificación del ácido indol-3-acético (AIA), auxina mayoritaria en la naturaleza, y la de ciertas vitaminas del complejo B, entre ellas la tiamina, como reguladores naturales del crecimiento vegetal (Vasil, 2008). En este sentido, las aportaciones de Philip White, Roger Gautheret y Pierre Nobécourt

resultaron cruciales al demostrar con sus experimentos la posibilidad de cultivar células vegetales in vitro de forma indefinida, por lo que estos tres investigadores son considerados como los pioneros de las técnicas de cultivo de tejidos y células vegetales (Street, 1977; Bhojwani y Razdan, 1983). La década de 1960 estuvo marcada por dos hechos clave en el desarrollo de la Biotecnología Vegetal. El primero, la formulación de una nueva solución nutritiva químicamente definida por Toshio Murashige y Folke Skoog en 1962, el medio MS, que posibilitaba un crecimiento vigoroso de los tejidos y células vegetales en cultivo. Hoy día, este medio se ha convertido en el más utilizado para el cultivo de tejidos y células vegetales resultando la publicación que lo describe (Murashige y Skoog, 1962) una de las más citadas en Biología Vegetal. El segundo, ya predicho por Haberlandt, la posibilidad de regenerar plantas completas a partir de cultivos celulares y tejidos. En este sentido, Vasil y Hildebrandt (1965<sup>a</sup>, 1965b, 1967) fueron capaces de regenerar una planta completa de tabaco a partir una única célula demostrando la totipotencia de las células vegetales: cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella y, por tanto, tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Feri y Paul, 2000).

Llegados a este punto, los investigadores disponían de una base de conocimiento bien afianzada y de las herramientas necesarias que posibilitaban el establecimiento de cultivos celulares procedentes de fragmentos de tejidos u órganos de plantas superiores de forma relativamente sencilla. A pesar de que muchas de las líneas celulares establecidas no resultaron de interés, una tomó relevancia desde sus inicios dadas las características únicas que mostraba (elevada tasa de crecimiento, gran homogeneidad en el cultivo y altos niveles de sincronización (Geelen e Inzé, 2001; Nagata y col., 2004<sup>a</sup>; Nagata y col., 2004b; Kumagai-Sano y col., 2006)) y que hacían de ella la candidata perfecta para profundizar en el conocimiento básico de la biología celular y molecular de las células vegetales: la línea celular celular BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2). Esta línea celular se estableció en 1972 gracias al trabajo del Profesor Kato (Kato y col., 1972) a partir de callos inducidos en plántulas de *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 en el Central Research Institute of the Japan Tobacco and Salt Public Corporation de Japón. Desde entonces, tanto el número de laboratorios en los que se trabaja con estas células como el de publicaciones en las que se han utilizado ha aumentado de forma progresiva (Nagata y col., 2004b), habiendo sido consideradas como las células HeLa de los sistemas vegetales (Nagata y col., 1992).

Los cultivos celulares BY-2 constituyen, hoy día, un sistema modelo en investigación básica de células vegetales habiendo relegado a un segundo plano, por ejemplo, a los de *Arabidopsis* en estudios relacionados con el crecimiento, la estructura y el ciclo celular (Geelen e Inzé, 2001; Nagata y col., 2004<sup>a</sup>). Así mismo, han sido utilizados tanto para estudios de estrés por metales pesados y contaminantes como el cadmio, níquel y cobre (Piqueras y col., 1999; Olmos y col., 2003; Raeymaekers y col., 2003; Garnier y col., 2006; Gratao y col., 2008) como para el estudio de la respuesta de las células vegetales frente a la salinidad (Bueno y col., 1998; Lampion y col., 2006; Hoque y col., 2007<sup>a</sup>; Hoque y col., 2007<sup>b</sup>; Banu y col., 2009). En la década de los 90, los primeros trabajos de selección de líneas celulares tolerantes a salinidad se realizaron con cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38 (Binzel y col., 1985; Binzel y col., 1987; Binzel y col., 1988; Singh y col., 1985; Zhu y col., 1993; McCann y col., 1994). A diferencia de los cultivos celulares BY-2, estas líneas muestran un crecimiento más lento (aproximadamente 5 semanas entre cada subcultivo) y tienen bajos niveles de sincronización celular. Estos trabajos pusieron de manifiesto que las principales modificaciones que tienen lugar en células adaptadas a altas concentraciones salinas son disminución de la expansión celular, compartimentación vacuolar de Na<sup>+</sup>, incremento en los niveles celulares de azúcares solubles y aminoácidos libres (principalmente prolina), alteraciones en la arquitectura de la pared celular con modificación en la localización de pectinas, pérdida de proteínas ricas en arabinogalactanos (AGPs) de la membrana plasmática y aumento en el nivel de expresión de determinadas proteínas. Posteriormente, en nuestro grupo de investigación se han realizado estudios de adaptación a elevadas concentraciones salinas utilizando tanto líneas celulares de *Pisum sativum* como callos de *Citrus elul.* Estos trabajos confirmaron la reducción del tamaño celular, la disminución del ratio volumen vacuolar/volumen citoplasmático y la alteración de los orgánulos tanto en morfología como en número como efectos derivados del tratamiento salino (Piqueras y col., 1994; Olmos y Hellín, 1996<sup>a</sup>; Olmos y Hellín, 1996<sup>b</sup>; Olmos y Hellín, 1997). Recientemente, Ferreira y col. (2008) observaron resultados similares en callos de *Citrus sp.* Igualmente, con estas líneas celulares de guisante y limonero se demostró la importancia de los sistemas antioxidantes en el proceso de adaptación a elevadas concentraciones salinas (Olmos y col., 1994; Piqueras y col., 1996). Así mismo, Wang y col. (2010) trabajando con cultivos celulares de *Thellungiella halophila* sometidos a 300 mM de NaCl evidenciaron cambios ultraestructurales tanto en mitocondrias como en el aparato de Golgi junto a retracción de la membrana plasmática, condensación nuclear y liberación de citocromo c, lo que según estos autores resultó en muerte celular programada (PCD).

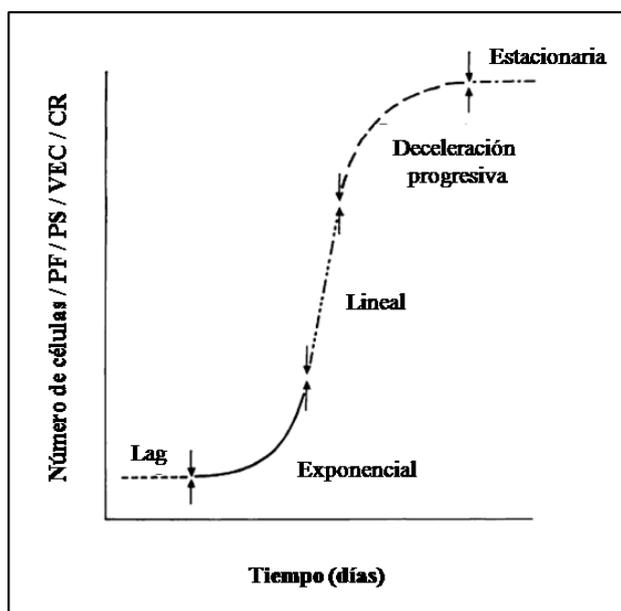
Con todo, los cultivos celulares, y más concretamente los BY-2, se muestran como una herramienta muy útil para profundizar en el conocimiento de los mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en los procesos de adaptación a salinidad.

### **1.7.2. Establecimiento de un cultivo celular vegetal.**

El procedimiento general para establecer un cultivo celular vegetal consiste en inocular un medio de cultivo gelificado con un fragmento de tejido u órgano vegetal, denominado explanto. De esta forma, el explanto se incuba bajo condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad controladas que junto con las nutricionales conducen su desarrollo hacia la formación de una masa amorfa de células en continua división, denominada callo, perdiendo la estructura y organización tisular que mantenían en el tejido original durante el proceso conocido como desdiferenciación celular (Wagley y col., 1987). Los callos obtenidos mediante este procedimiento pueden subcultivarse en medio fresco para su mantenimiento y propagación, inducir su diferenciación para formar órganos (organogénesis) y embriones (embriogénesis) o bien pasarse a medio de cultivo líquido con el objeto de obtener células en suspensión que formarán un cultivo celular. Debemos resaltar la importancia que tienen en los cultivos de callos los niveles de sustancias reguladoras del crecimiento, principalmente auxinas y citoquininas, adicionados al medio de cultivo. Un ratio auxinas/citoquininas alto promueve el desarrollo de raíces adventicias mientras que ratios bajos posibilitan el desarrollo de la parte aérea. Ratios intermedios resultan adecuados para mantener un crecimiento continuo del callo sin que tenga lugar diferenciación.

En términos generales, los callos pertenecen a una de estas dos categorías: compactos o friables. En los callos compactos las células se encuentran densamente agregadas mientras que en los friables permanecen débilmente asociadas pudiendo disgregarse fácilmente. Los callos friables son los idóneos para formar suspensiones celulares ya que al inocular un fragmento en un matraz con medio de cultivo líquido se liberan células aisladas. Estas suspensiones celulares deben permanecer en agitación orbital para garantizar un aporte equitativo de los nutrientes y del oxígeno a todas las células en suspensión, pudiendo mantenerse de forma relativamente sencilla en matraces cónicos al subcultivarlas periódicamente en medio fresco.

Al representar cualquiera de los parámetros de crecimiento con los que se trabaja habitualmente en cultivos celulares (número de células, peso fresco, peso seco, volumen de empaquetamiento celular o crecimiento relativo) frente al tiempo transcurrido tras el inicio de un subcultivo se obtiene un gráfico similar al que aparece en la Figura 9. Cabe destacar la existencia de cinco fases de crecimiento claramente diferenciadas que en su conjunto constituyen un “ciclo de cultivo”. La primera de ellas recibe el nombre de “fase lag” o de “latencia” y se caracteriza por constituir una fase de adaptación de las células al nuevo medio fresco. A continuación tiene lugar un rápido incremento de la masa celular que incluye una “fase de crecimiento exponencial” seguida de una “fase de crecimiento lineal”. A medida que los nutrientes del medio se agotan y aumenta la concentración de metabolitos tóxicos liberados por las propias células, éstas dejan de dividirse y el cultivo entra en una “fase de deceleración progresiva” hasta que la masa celular permanece prácticamente invariable, dando lugar a la “fase estacionaria”. Generalmente y para simplificar, los autores consideran tres fases: latencia, exponencial (que incluye las fases exponencial, lineal y de deceleración progresiva) y estacionaria.



**Figura 9. Curva de crecimiento modelo de un cultivo celular vegetal referida a diferentes parámetros de crecimiento en función del tiempo transcurrido tras el inicio del cultivo.** Las distintas fases de crecimiento a lo largo del ciclo de cultivo aparecen representadas. PF: peso fresco; PS: peso seco; VEC: volumen de empaquetamiento celular; CR: crecimiento relativo (modificado de Street, 1977).

Tanto la duración de cada una de estas fases como la masa celular alcanzada al final del ciclo de cultivo son función de cada línea celular y de las condiciones de cultivo en el laboratorio. Del mismo modo, el número de células que forman el inóculo inicial del subcultivo puede afectar de forma evidente a la duración de cada una de las fases. En este sentido, un grado de dilución excesivamente elevado tendrá como resultado una fase lag más dilatada y un desplazamiento en el tiempo del ciclo de cultivo. Por el contrario, un inóculo inicial con un número excesivo de células implicaría una reducción en el tiempo que tarda el cultivo en alcanzar la fase estacionaria. Por tanto, el volumen de inóculo en cada subcultivo debe ser determinado de forma empírica para cada línea celular y en cada laboratorio con el fin de obtener ciclos de cultivo estables. La metodología general para mantener los cultivos celulares se basa en realizar el subcultivo a medio fresco cuando éstos se encuentran en fase estacionaria. Sin embargo, en función del tipo de cultivo y del tratamiento a que se encuentre sometido, dicha fase puede dilatarse más o menos en el tiempo, pudiendo resultar la viabilidad celular seriamente comprometida. De esta forma, un control exhaustivo de la viabilidad celular utilizando un colorante vital como Evans Blue (Banu y col., 2009) resulta crucial para asegurar un correcto mantenimiento de la línea celular objeto de estudio.

## 2. Giberelinas.

Las hormonas giberelinas (GAs) actúan como reguladores endógenos en multitud de procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas como germinación de semillas, floración y elongación de tallo. La identificación de mutantes deficientes en su síntesis, que presentan fenotipo enano, floración tardía y germinación defectuosa, ha permitido caracterizar, en los últimos años, la casi totalidad de genes implicados en su señalización.

### 2.1. Estructura.

Las GAs constituyen un amplio grupo de ácidos diterpenos tetracíclicos naturales cuya estructura básica está constituida por un anillo de *ent*-giberelano (Fig. 10). Se encuentran presentes mayoritariamente en plantas superiores, aunque también pueden encontrarse en ciertas especies de bacterias endofíticas, hongos y algunas plantas inferiores, resultando su función incierta en estos organismos (Hedden, 2012; Hedden y Thomas, 2012). Actualmente, se han identificado 136 GAs diferentes a las que se les ha asignado un número (GA<sub>1</sub>, 2, 3, ...n) según el orden cronológico de su descubrimiento (<http://www.plant-hormones.info/gibberellins.htm>) (MacMillan y Takahashi, 1968; Hedden, 2012; Hedden y Thomas, 2012).

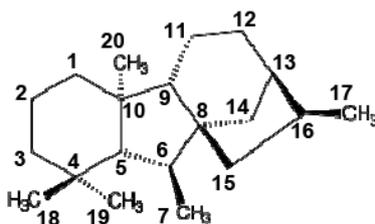


Figura 10. Estructura química del *ent*-giberelano.

Las GAs fueron identificadas por primera vez en 1935 en el hongo *Gibberella fujikuroi*, actualmente reclasificado como *Fusarium fujikuroi*, cuando fitopatólogos japoneses estudiaban una enfermedad del arroz (*Oryza sativa*) conocida como “bakanae” (planta tonta o loca) que causa crecimiento excesivo en los tallos y brotes. Sin embargo, no fue hasta mediados de los años 50, tras la aplicación de extractos purificados de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) a mutantes enanos de maíz y guisante que

hicieron recuperar el fenotipo *wild type*, cuando se propuso a las GAs como reguladores del crecimiento vegetal al promover la expansión y división celular. Su presencia en las plantas se confirmó, posteriormente, en 1958 tras la identificación de GA<sub>1</sub> en semillas en desarrollo de frijol corredor (*Phaseolus coccineus*) (Hedden, 2012).

## 2.2. Actividad biológica.

De todas las giberelinas descritas actualmente, solamente unas pocas tienen actividad biológica *per se* en plantas superiores, mientras que las GAs restantes son compuestos precursores o de degradación de las GAs activas y normalmente se encuentran presentes a concentraciones superiores que las propias formas activas (Kobayashi y col., 2000, Hedden y Thomas, 2012). Las concentraciones de GAs activas en plantas superiores oscilan entre valores de ng g<sup>-1</sup> a µg g<sup>-1</sup> de peso fresco (Hedden, 2012).

Las GAs se clasifican en dos grupos en base al número de átomos de carbono presentes en el esqueleto de *ent*-giberelano: las GAs con 19 átomos de carbono (GAs C<sub>19</sub>) y las GAs con 20 átomos de carbono (GAs C<sub>20</sub>). Las GAs C<sub>19</sub> son las más activas cuando se aplican de forma exógena, tal es el caso de GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>3</sub>, y GA<sub>7</sub> (Figura 11). GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub> son las giberelinas activas que se encuentran en la mayoría de especies de plantas superiores, aunque en función de la especie, una resulta mayoritaria sobre la otra. En *Arabidopsis thaliana* y algunos miembros de la familia Cucurbitaceae GA<sub>4</sub> es mayoritaria (Yamaguchi, 2008) mientras que GA<sub>1</sub> es predominante en tabaco (Jordan y col., 1995; Vidal y col., 2001) y guisante (Ross y col., 1992). GA<sub>3</sub> y GA<sub>7</sub> se han encontrado en un número reducido de plantas por lo que su función como hormona vegetal endógena no puede generalizarse a todos los vegetales. Respecto a las GAs C<sub>20</sub>, éstas no poseen actividad biológica *per se* a menos que sean metabolizadas a GAs C<sub>19</sub> 3β-hidroxiadas. La β-hidroxiación en la posición C-3 del *ent*-giberelano de las GAs C<sub>19</sub> determina la existencia de actividad biológica mientras que la β-hidroxiación en el C-2 provoca la pérdida de actividad biológica (Talón, 2000). Este sistema constituye, por tanto, una pieza clave en la regulación del metabolismo de GAs activas en las plantas (Ross y col., 1995).

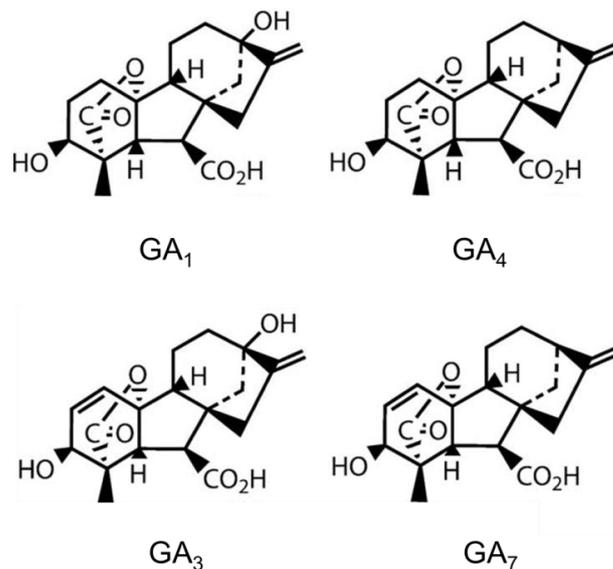


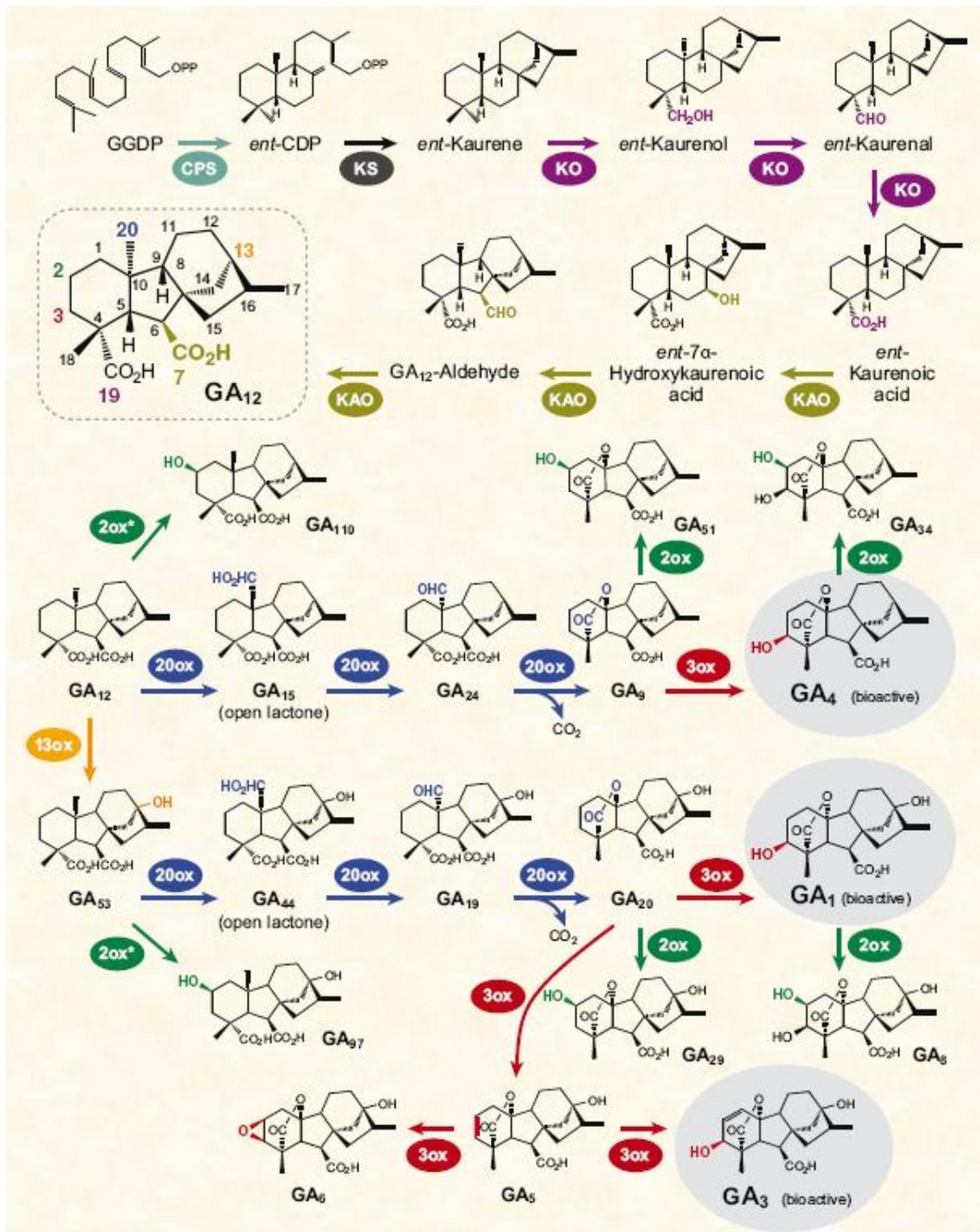
Figura 11. Estructura química de las GAs bioactivas mayoritarias en plantas superiores.

### 2.3. Biosíntesis.

El descubrimiento de la ruta biosintética de las GAs no fue posible hasta que se desarrollaron métodos de detección extremadamente sensibles. Esta ruta ha sido determinada en semillas y tejidos de varias especies de plantas superiores y se divide en las siguientes etapas (Figura 12):

#### Síntesis de *ent*-kaureno a partir de geranilgeranildifosfato en los plastos.

La primera etapa en la biosíntesis de GAs son reacciones de ciclación que convierten el geranilgeranildifosfato (GGPP) en *ent*-kaureno. Estas reacciones están catalizadas por ciclasas que se localizan en los plastos. La síntesis se inicia con la ciclación del GGDP, proceso que tiene lugar en dos pasos. El primer paso consiste en la formación de *ent*-copalil difosfato (CDP), proceso catalizado por la enzima *ent*-copalil difosfato sintasa (CPS), y en el segundo paso se obtiene como producto final *ent*-kaureno por la acción de la enzima *ent*-kaureno sintasa (KS). En *Arabidopsis*, tanto CPS como KS están codificadas por un único gen cuya pérdida de función resulta en fenotipos caracterizados por enanismo, infertilidad y semillas no viables (Koornneef y van der Veen, 1980).



**Figura 12.** Vías principales del metabolismo de GAs en plantas superiores. Los grupos funcionales introducidos o modificados en cada etapa se muestran sobre la estructura química de la GA correspondiente del mismo color en que se representa la enzima que cataliza dicha reacción. Las enzimas implicadas en las reacciones son: *ent*-copalildifosfato sintasa (CPS), *ent*-kaureno sintasa (KS), *ent*-kaureno oxidasa (KO), *ent*-kaurenóico oxidasa (KAO), GA 3-oxidasa (GA3ox), GA 20-oxidasas (GA20ox), GA 13-hidroxilasa (GA13ox) y GA 2-oxidasa (GA2ox) (Yamaguchi, 2008).

### **Conversión de ent-kaureno a GA<sub>12</sub>-aldehído en el retículo endoplasmático.**

La segunda etapa está catalizada por monooxigenasas del tipo citocromo P450 (ent-kaurenoico oxidasa (KAO) y ent-kaureno oxidasa (KO)) y se desarrolla en el retículo endoplasmático. El *ent*-kaureno obtenido en la etapa anterior es oxidado por las dos enzimas citadas anteriormente, dando lugar a la formación de GA<sub>12</sub>, considerada como el precursor común a todas las giberelinas en plantas. KAO está codificada en arroz por un único gen (Sakamoto y col., 2004) y *Arabidopsis* tiene dos copias redundantes (Helliwell y col., 2001). Mutaciones en *KAO* muestran ser la causa de fenotipos enanos severos (Helliwell y col., 2001; Davidson y col., 2003; Sakamoto y col., 2004; Fambrini y col., 2011). En el caso de *KO*, en *Arabidopsis* está codificada por un único gen mientras que en arroz hay cinco (Sakamoto y col., 2004). Mutaciones en uno de los cinco genes que codifican *KO* en arroz, concretamente *OsKO2*, causan deficiencias severas en GAs y un fenotipo enano (Sakamoto y col., 2004).

### **Síntesis de GAs de 19 y 20 átomos de carbono a partir de GA<sub>12</sub> en el citoplasma celular.**

Por último, la tercera etapa está catalizada, en su mayor parte, por dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe<sup>2+</sup> (GA 20-oxidasas (GA20ox) y GA 3-oxidasas (GA3ox)) que sintetizan GAs C<sub>20</sub> y C<sub>19</sub> a partir de GA<sub>12</sub>. A diferencia de lo que sucede con los enzimas de las etapas anteriores, las dioxigenasas están codificadas por familias multigénicas en todas las especies vegetales estudiadas. En *Arabidopsis* hay cinco enzimas GA20ox y cuatro en arroz, además estas especies presentan cuatro y dos genes *GA3ox* respectivamente (Plackett y col., 2012). Los miembros de estas familias génicas varían considerablemente en sus patrones de expresión, lo que podría estar relacionado con el hecho de que la ruta de biosíntesis de GAs esté regulada mayoritariamente por la actividad de las dioxigenasas (Hedden y Thomas, 2012).

La ruta metabólica posterior a la GA<sub>12</sub> puede variar según la especie, e incluso puede ser diferente entre tejidos de una misma planta. Las dos rutas principales son:

**Ruta de la hidroxilación temprana en el C-13.** La GA<sub>12</sub> es oxidada en su C-13 por acción de la enzima GA 13-hidroxilasa (GA13ox, una monooxigenasa P450) transformándose en GA<sub>53</sub>, el primer miembro de la ruta de síntesis de la 13-hidroxilación, ruta predominante en la mayoría de especies. Posteriormente, el C-20

de la GA<sub>53</sub> sufre dos oxidaciones consecutivas catalizadas por GA20ox generando GA<sub>44</sub> y GA<sub>19</sub> sucesivamente. A continuación se elimina el C-20 de GA<sub>19</sub> sintetizándose GA<sub>20</sub>, que es la primera GA C<sub>19</sub> de esta ruta. La incorporación de un grupo hidroxilo en la posición 3β de GA<sub>20</sub> produce finalmente GA<sub>1</sub>, compuesto con actividad biológica. Este último paso es catalizado por el enzima GA3ox. Una vía alternativa de esta ruta de síntesis puede dar lugar a otra GA con actividad biológica, la GA<sub>3</sub>, formada a partir de GA<sub>20</sub> vía el intermediario GA<sub>5</sub> por acción de GA3ox (Gallego Giraldo, 2008; Spray y col., 1996; Appleford y col., 2006).

**Ruta de la no hidroxilación temprana en el C-13.** El C-20 de GA<sub>12</sub> se oxida dos veces dando origen a GA<sub>15</sub> y GA<sub>24</sub>. La posterior descarboxilación o eliminación del C-20 de GA<sub>24</sub> da origen a GA<sub>9</sub>, considerada como la primera GA C<sub>19</sub> de esta ruta. Estos dos pasos están catalizados por el enzima GA20ox. Posteriormente, la incorporación de un grupo hidroxilo en la posición 3β de GA<sub>9</sub> por acción de la enzima GA3ox produce GA<sub>4</sub>, compuesto con actividad biológica (Gallego Giraldo, 2008).

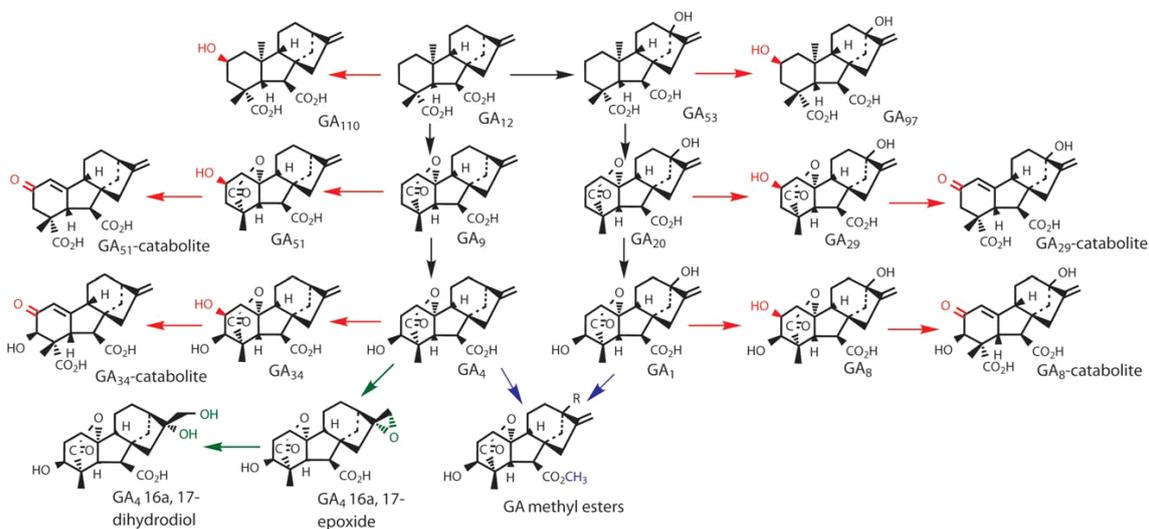
#### 2.4. Desactivación.

Para una planta resulta esencial el ser capaz de regular con precisión su contenido en GAs y, a su vez, poder modificarlo rápidamente en respuesta a cambios producidos en su entorno. Al igual que otras hormonas vegetales, las GAs pueden ser desactivadas, lo que permite a la planta regular su homeostasis facilitando una rápida reducción en su concentración cuando es necesario (Hedden y Thomas, 2012).

De entre todos los mecanismos de desactivación identificados, la 2β-hidroxilación, catalizada por las GA 2oxidases (GA2oxs), resulta el más común (Figura 13). Las GA2oxs pueden actuar bien sobre las GAs C<sub>19</sub> bioactivas o bien sobre sus precursores inmediatos inactivos, las GAs C<sub>20</sub>, perdiendo su actividad biológica de forma irreversible. Este proceso de desactivación tanto de GAs activas como de precursores constituye un mecanismo relevante en la regulación de los niveles de GAs en plantas (Ross y col., 1995). De esta forma, GA<sub>9</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>20</sub> y GA<sub>1</sub> pueden transformarse en los productos inactivos GA<sub>51</sub>, GA<sub>34</sub>, GA<sub>29</sub> y GA<sub>8</sub> respectivamente (Figura 20). Las GAs 2β-hidroxiladas pueden ser oxidadas nuevamente para formar los catabolitos GA<sub>51</sub>, GA<sub>34</sub>, GA<sub>29</sub> y GA<sub>8</sub> (Talón, 2000). Otro mecanismo de desactivación existente, mediado también por GA2oxs, es el capaz de catalizar la 2β-hidroxilación en las GAs C<sub>20</sub> GA<sub>12</sub> y GA<sub>53</sub>, originándose los productos inactivos GA<sub>110</sub> y GA<sub>97</sub> respectivamente. La

desactivación de estos precursores también puede reducir el flujo de biosíntesis de GAs activas (Schömburg y col., 2003).

Existen otros dos mecanismos enzimáticos para la desactivación de GAs, la epoxidación y la formación de metil ésteres. En este sentido, tanto las GAs epoxidadas, que catalizan la 16 $\alpha$ ,17-epoxidación, como las GAs metiltransferasas (GAMTs), que catalizan la metilación del grupo carboxilo C-7 generando ésteres metilados de GAs, pueden realizar una función catabólica dentro de la homeostasis de GAs durante el desarrollo de las plantas (Yamaguchi, 2008; Hedden, 2012).

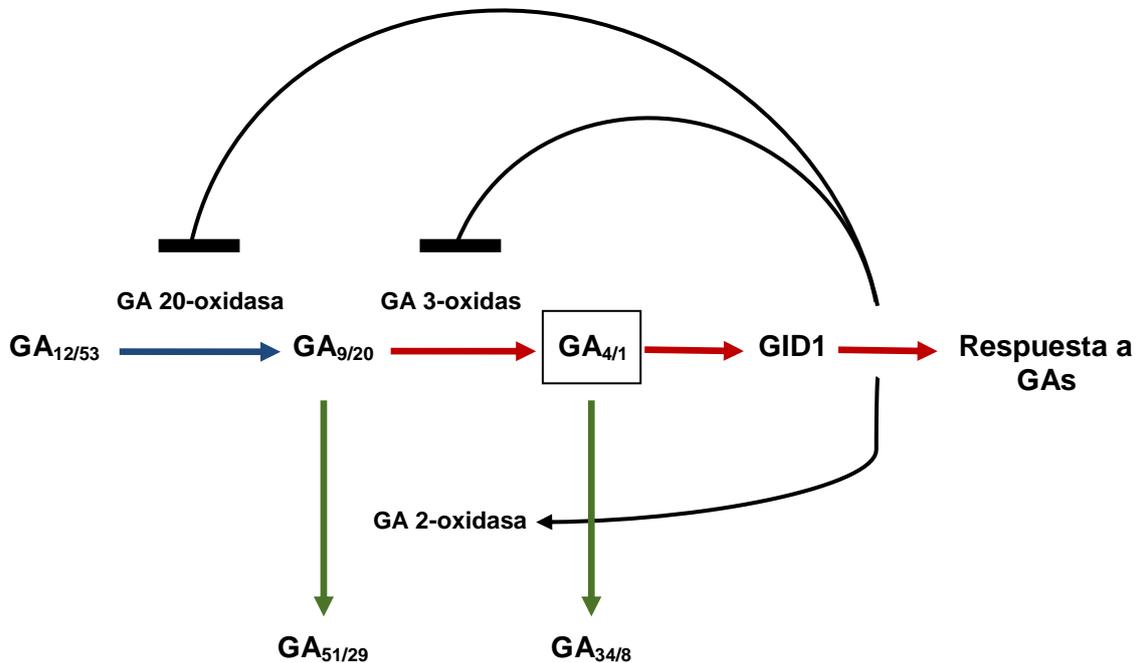


**Figura 13. Mecanismos enzimáticos de desactivación de GAs bioactivas o de conversión de sus precursores a formas inactivas.** Los mecanismos representados son la 2 $\beta$ -hidroxilación y posterior oxidación a GA-catabolitos (flechas rojas), la epoxidación (flechas verdes) y la formación de ésteres metilados de GAs (flechas azules) (Hedden, 2012).

## 2.5. Regulación de la ruta de biosíntesis.

Los niveles de GAs activas en plantas superiores están regulados por las propias GAs mediante mecanismos de retroalimentación positiva, en el caso de los genes catabólicos (*GA 2-oxidasa*), y negativa, en el caso de los genes de biosíntesis (*GA 20-oxidasa* y *GA 3-oxidasa*), de forma que la homeostasis se mantiene a través de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (*GA20ox*, *GA3ox* y *GA2ox*) (Figura 14) (Yamaguchi, 2008). En este sentido, la expresión de los genes *GA20ox1* y *GA3ox1* en mutantes deficientes en GAs de plantas de *Arabidopsis* se encuentra fuertemente

activada, mientras que tras la aplicación de GAs exógenas estos genes se inhiben, activándose *GA2ox1* y *GA2ox2* (Phillips y col., 1995; Thomas y col., 1999).



**Figura 14. Modelo representativo de la regulación de la ruta de biosíntesis de GAs.** La regulación tiene lugar por retroalimentación negativa de los genes de biosíntesis (*GA 20-oxidasa* y *GA 3-oxidasa*) y por retroalimentación positiva de los genes que regulan el catabolismo (*GA 2-oxidasa*) de GAs (Adaptado de Yamaguchi y Kamiya, 2000).

## 2.6. Ruta de señalización.

Si bien la ruta de síntesis de GAs resulta ampliamente conocida, no sucede lo mismo con la ruta de señalización. Sin embargo, la reciente identificación del receptor soluble de GAs ha permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la percepción y transducción de la señal.

### **Receptor de GAs: receptor soluble *GID1*.**

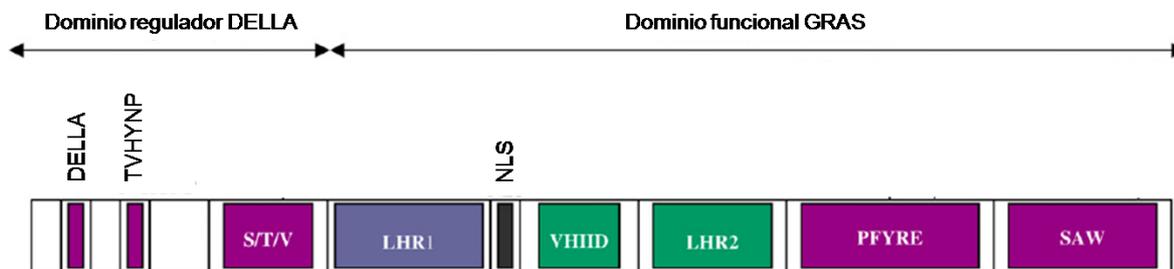
El receptor de GAs se identificó por la mutación *gid1* (*gibberellin-insensitive dwarf1*) encontrada en el análisis de un mutante de arroz que le confería a la planta un fenotipo enano insensible a GAs. Esta mutación fue considerada como una proteína soluble a la que se denominó *GID1* (Ueguchi-Tanaka y col., 2005). *GID1* presenta

similitudes con las proteínas que pertenecen a la familia de las lipasas sensibles a hormonas (Hormone-Sensitive Lipase, HSL), incluyendo los motivos HSL conservados HGG y GX SXG (Osterlund, 2001). A diferencia de lo que sucede con los mutantes enanos deficientes en GAs, el fenotipo del mutante *gid1* no puede revertirse por aplicación exógena de las mismas. Arroz y otras monocotiledóneas presentan un único gen *GID1*, mientras que en *Arabidopsis* y diversas dicotiledóneas la proteína *GID1* está codificada por tres genes con funciones parcialmente redundantes. Estudios *in vitro* muestran que la proteína *GID1* se une con gran afinidad a GAs bioactivas pero no lo hace con las formas precursoras de estas hormonas (Fleet, 2011).

### **Proteínas DELLA.**

Las proteínas DELLA actúan como represores en la ruta de señalización de GAs. Estas proteínas se acumulan en el núcleo, donde bloquean la expresión de los genes regulados por GAs y son desestabilizadas por las mismas (Pysh y col., 1999; Silverstone y col., 2001; Zentella y col., 2007; Hou y col., 2008). Su estructura presenta dos dominios, el dominio funcional del extremo C-terminal denominado GRAS y el dominio regulador del extremo N-terminal denominado DELLA por la secuencia de aminoácidos conservados Asp-Glu-Leu-Leu-Ala (Peng y col., 1997; Silverstone y col., 1998; Pysh y col., 1999; Itoh y col., 2002; Thomas y col., 2005; Amber y col., 2012) (Figura 15). Se han encontrado genes homólogos en otras especies vegetales como trigo, tomate y maíz. En todas estas especies, la proteína tiene un elevado grado de conservación, lo que podría indicar que posee una función y regulación común en todas ellas. Mutantes nulos de estos genes (*slr1*, *rga-24*, *gai*) presentan características propias de plantas tratadas con GAs en exceso, es decir, un fenotipo alargado y floración temprana. En *Arabidopsis*, la familia DELLA está compuesta por cinco miembros (*GAI*, *RGA*, *RGL1*, *RGL2* y *RGL3*) con funciones solapantes pero distintas, mientras que en arroz ha sido identificado solamente uno (*SLR1*). La identidad molecular de los genes que codifican para proteínas DELLA se identificó a través de la caracterización del mutante *gai-1* de *Arabidopsis*. La proteína codificada por este mutante presenta una delección de 17 aminoácidos en el dominio DELLA implicado en la unión al receptor *GID1*, lo que genera un fenotipo enano idéntico al de los mutantes deficientes en GAs, produciéndose una acumulación de la proteína DELLA mutante y resultando los niveles endógenos de GAs superiores a los presentes en plantas silvestres (Peng y col., 1997; Dill y col., 2001; Richards y col., 2001; Itoh y col., 2002; Silverstone y col., 2007; Asano y col., 2009). Fenotipos similares han sido detectados

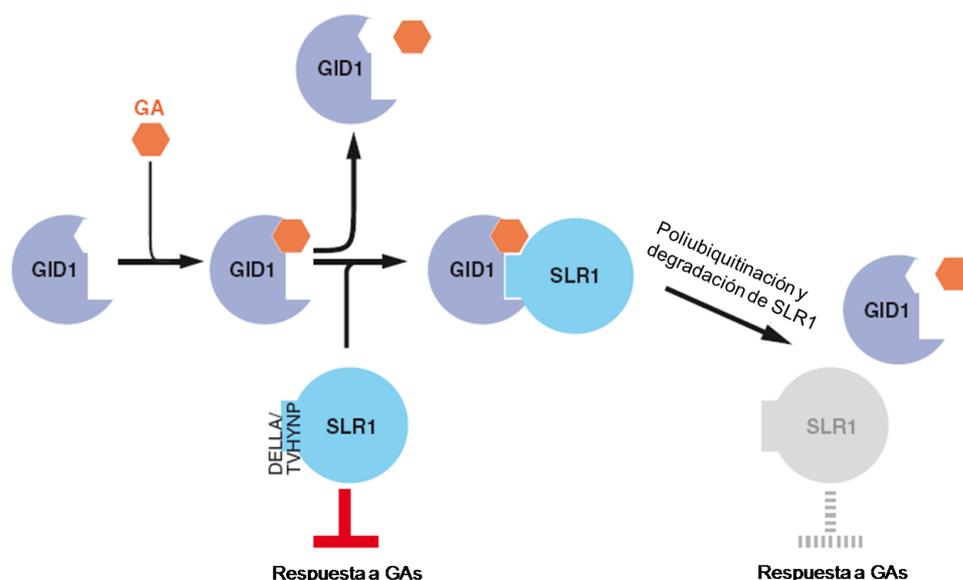
tras mutaciones en las regions PFYRE y SAW del dominio funcional que forma interacciones secundarias con GID1 (Hirano y col., 2010).



**Figura 15. Representación de la estructura de las proteínas DELLA.** En la imagen se ilustran los dominios y subdominios implicados en la unión a GID1 (púrpura), la diana de unión (azul), la localización nuclear (gris) y la unión a SLY1/GID2 (verde) (Amber y col., 2012).

#### **Modelo de interacción entre GAs, receptor y proteínas DELLA.**

El modelo propuesto actualmente para la ruta de señalización de GAs implica que en ausencia de GAs, las proteínas DELLA actúan como reguladores negativos de la transcripción de los genes de respuesta a GAs, inhibiendo el crecimiento y desarrollo de la planta (Figura 16). En presencia de GAs, la función de las proteínas DELLA es inhibida. Por tanto, podemos decir que las GAs inhiben al inhibidor transcripcional DELLA. Este modelo está basado originalmente en la recuperación del fenotipo enano en plantas deficientes en GAs, tras la adición de GAs exógenas, que está asociada con la desaparición de las proteínas DELLA (Silverstone y col., 2001; Itoh y col., 2002). En arroz, el receptor de GAs, GID1, se une a la molécula de GA activa formando un complejo que interacciona de forma específica con la proteína DELLA, SLR1. El dominio regulador DELLA de SLR1 y la región conservada HSL de GID1 resultan esenciales para la interacción entre ambos. El complejo formado por GID1-GA-SLR1 resulta diana del complejo enzimático SCF-E3 ubiquitin ligasa, facilitándose la degradación de SLR1 por el proteosoma 26S (Davière y col., 2008; Murase y col., 2008; Shimada y col., 2008; Lumba y col., 2010; Ariizumi y col., 2011). Una vez degradada la proteína DELLA SLR1, se activa la transcripción de los genes de respuesta a GAs involucrados en diferentes procesos del desarrollo de la planta. En *Arabidopsis*, las proteínas DELLA son degradadas vía un complejo de ubiquitinación SCF<sup>SLY1</sup> cuya proteína F-box está codificada por el gen *SLY1* (McGinnis y col., 2003).

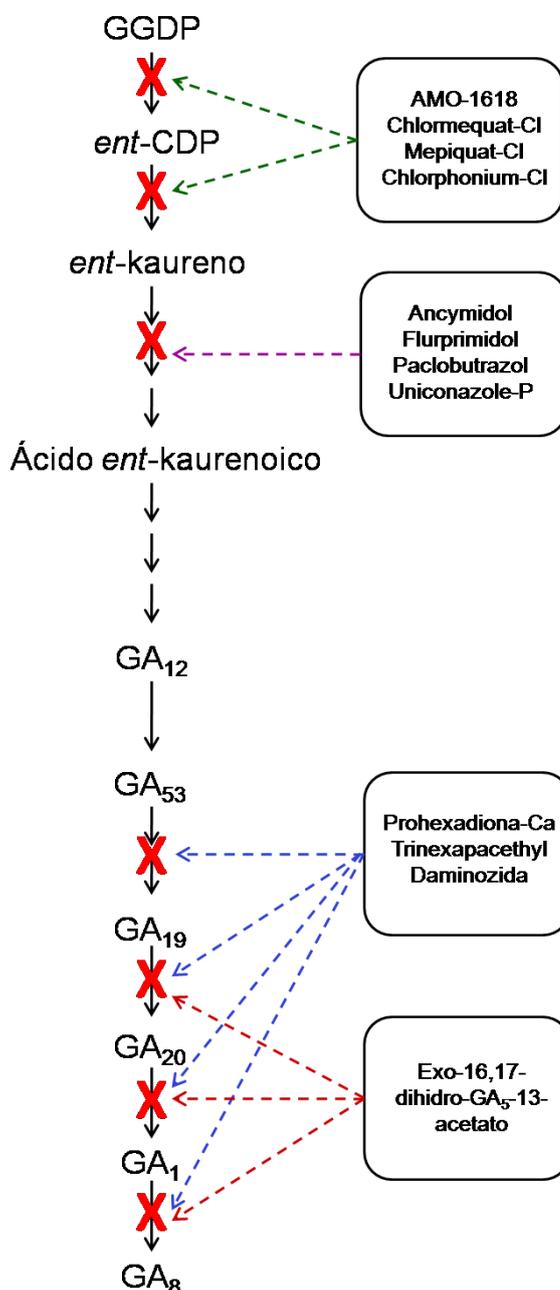


**Figura 16. Modelo para la ruta de señalización de GAs en arroz.** A bajas concentraciones de GAs endógenas SLR1 (DELLA) reprime la respuesta a GAs. Elevadas concentraciones de GAs posibilitan la unión entre el receptor soluble GID1 y GAs. Sin embargo, esta unión resulta inestable y ambos elementos pueden disociarse fácilmente a no ser que el complejo GID1-GA interaccione específicamente con SLR1 (DELLA) a través de la región conservada HSL de GID1 y los subdominios DELLA y TVHYNP del dominio regulador DELLA de SLR1. Este complejo formado por GID1-GA-SLR1 resulta altamente estable, constituyendo la diana del complejo enzimático SCF<sup>GID2</sup> ubiquitin ligasa que poliubiquitina SLR1, facilitando su degradación vía proteosoma 26S y permitiendo la expresión de los genes de respuesta a GAs (Ueguchi-Tanaka y col., 2007).

## 2.7. Inhibidores de la síntesis.

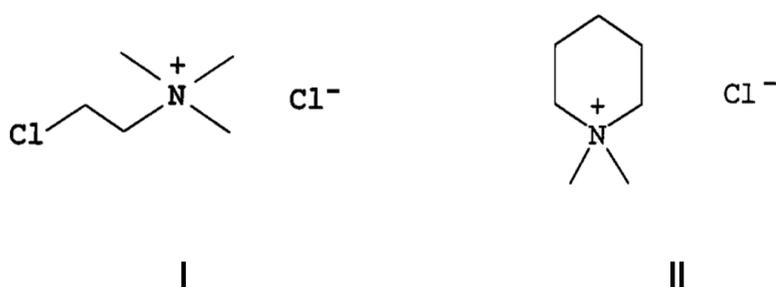
Actualmente se conocen cuatro grupos de inhibidores de la síntesis de GAs: (1) compuestos tipo “onion”, (2) compuestos con un heterociclo nitrogenado en su estructura, (3) análogos estructurales al 2-oxoglutarato y (4) 16,17-dihidro-GAs (Rademacher, 2000). Los componentes de cada uno de estos grupos inhiben la síntesis de GAs en diferentes etapas de su ruta metabólica (Figura 17). Estos inhibidores han sido ampliamente utilizados tanto en laboratorios, para manipular los contenidos endógenos de GAs e investigar acerca de su función, como en agricultura, donde son utilizados para (1) acortar la longitud de los brotes y la altura de la planta con objeto de reducir el desarrollo vegetativo favoreciendo, de esta forma, el

reproductivo, (2) disminuir las labores de poda y (3) mejorar el aspecto de plantas ornamentales (Rodríguez y Nicolás, 2004).



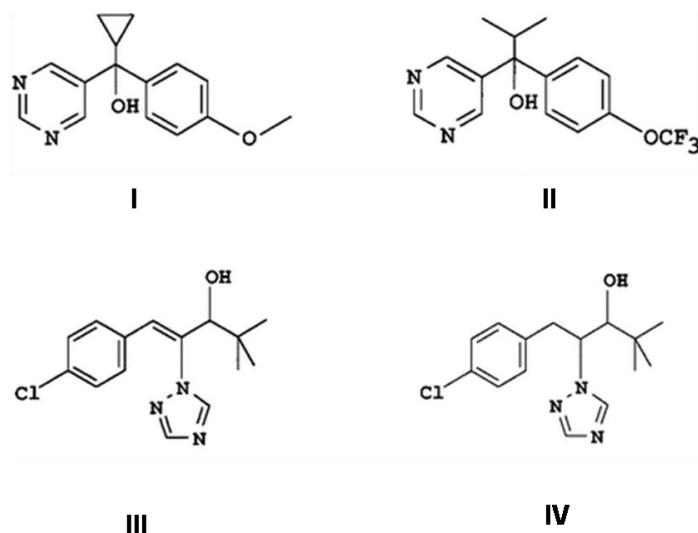
**Figura 17. Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de GAs y nivel al que actúan cada uno de los cuatro grupos de inhibidores.** A) Compuestos tipo onio (Amo-1618, Chlormequat-Cl, Mepiquat-Cl y Chlorphonium-Cl); b) Compuestos con un heterociclo nitrogenado en su estructura (Ancymidol, Flurprimidol, Paclobutrazol y Uniconazole-P); c) Análogos estructurales al 2-oxoglutarato (Prohexadiona-Ca, Trinexapacethyl y Daminozida); d) 16,17-dihidro-GAs (Exo-16,17-dihidro-GA<sub>5</sub>-13-acetato) (Rademacher, 2000).

**Compuestos tipo “onio”.** Se trata de compuestos que presentan en su estructura un grupo amonio, fosfonio o sulfonio cargado positivamente (Figura 18). Estos compuestos bloquean la síntesis de GAs en pasos previos a la formación de *ent*-kaureno, inhibiendo a los enzimas CPS y KS. A pesar de su baja eficiencia, son utilizados por su bajo coste y alta solubilidad en agua. Entre los más representativos, con un grupo amonio cuaternario en su estructura, destacan AMO-1618, chlormequat-Cl y mepiquat-Cl. Otros representantes de este grupo como chlorphonium-Cl o BTS 44584 presentan en su estructura un grupo fosfonio y sulfonio respectivamente.



**Figura 18. Estructura química de los representantes del grupo de los compuestos tipo “onio”.** I. Chlormequat-Cl ((2-chloroethyl)-trimethyl-ammonium chloride); II. Mepiquat-Cl (1,1-dimethylpiperidinium chloride) (Rademacher, 2000).

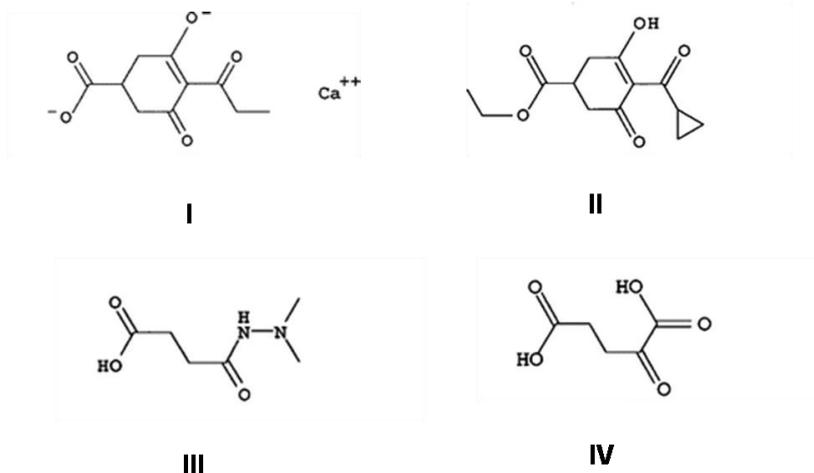
**Compuestos con un heterociclo nitrogenado en su estructura.** A este grupo pertenecen compuestos con importante interés comercial en agricultura como las pirimidinas ancymidol y flurprimidol, paclobutrazol, y uniconazole-P (Figura 19). Actúan como inhibidores de la monooxigenasa KO, que cataliza las diferentes etapas oxidativas que transforman *ent*-kaureno en ácido *ent*-kaurenoico.



**Figura 19. Estructura química de los representantes del grupo de los compuestos con un heterociclo nitrogenado en su estructura.** I. Ancyimidol ( $\alpha$ -cyclopropil-(p-methoxyphenyl)-5-pyrimidinemethanol); II. Flurprimidol ( $\alpha$ -(1-methylethyl)-[p-4-(trifluoromethoxy)phenyl]-5-pyrimidinemethanol); III. Uniconazole-P ( $\epsilon$ -(RS)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pent-1-en-3-ol); IV. Paclobutrazol ((2RS, 3RS)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pentan-3-ol) (Rademacher, 2000).

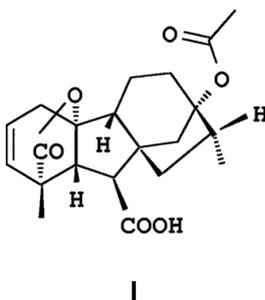
**Análogos estructurales al 2-oxoglutarato.** Este amplio grupo de inhibidores comprende a las acilciclohexanodionas, entre las que destacan prohexadiona-calcio (Phd) y trinexapacethyl. Phd ha mostrado ser un regulador del crecimiento muy útil en el cultivo de árboles frutales dada su nula toxicidad para la salud humana y los efectos provocados tras su aplicación a los cultivos (Winkler, 1997; Evans y Regusci., 1999; Basek y Rademacher, 2000). En este sentido, Phd reduce el crecimiento longitudinal de los brotes, induce la formación de yemas florales, favorece el cuajado del fruto y disminuye la posibilidad de infección por *Erwinia amylovora* y otros patógenos relacionados (Bangerth, 1997; Unrath, 1999; Costa y col., 2001; Bazzi y col., 2003; Roemmelt y col., 2003). Otro compuesto que pertenece a este grupo de inhibidores es daminozida, aunque se encuentra en desuso en agricultura debido a su toxicidad (Figura 20). La aplicación de este tipo de inhibidores muestra una reducción en el crecimiento de las plantas tratadas, que generalmente va acompañada por bajos niveles de  $GA_1$  pero elevadas concentraciones de  $GA_{20}$  y otros precursores. Así mismo, la inhibición del crecimiento puede revertirse únicamente por aplicación exógena de GAs activas *per se*. Estas observaciones ponen de manifiesto que las acilciclohexanodionas bloquean las últimas etapas de la ruta de síntesis de GAs

evitando la transformación de los precursores inmediatos en GAs bioactivas debido a su similitud estructural con el 2-oxoglutarato, coenzima de las dioxigenasas GA3ox y GA2ox.



**Figura 20. Estructura química de los representantes del grupo de los análogos estructurales al 2-oxoglutarato.** I. Prohexadiona-Ca (Calcium 3-oxido-4-propionyl-5-oxo-3-ciclohexenecarboxylate); II. Trinexapacethyl (Ethyl-(3-oxido-4-ciclopropionyl-5-oxo)); III. Daminozida (Succinic acid 2,2-dimethyl hydrazide); IV. Ácido 2-oxoglutarico (Rademacher, 2000).

**16,17-dihidro-GAs.** Representan el grupo de inhibidores de la ruta de síntesis de GAs descubierto más recientemente. Estos compuestos, la mayor parte derivados de GA<sub>5</sub>, inhiben la hidroxilación en posición 3β, por lo que su modo de acción resulta similar al de las acilciclohexanodionas (Figura 21).



**Figura 21. Estructura química de las 16,17-dihidro-GAs.** I. Exo-16,17-dihidro-GA<sub>5</sub>-13-acetato (Rademacher, 2000).

## **2.8. Efectos fisiológicos producidos por las giberelinas.**

Las GAs endógenas producen una gran variedad de respuestas durante el desarrollo de la planta. Estas respuestas afectan tanto a la regulación del crecimiento vegetativo como al desarrollo reproductivo. Las GAs resultan determinantes en el control de la elongación del tallo, expansión de las hojas, crecimiento de la raíz, formación de tricomas y desarrollo de flores y frutos. Además, sustituyen los requerimientos de luz o frío que precisan muchas semillas para germinar y, en los cereales, regulan la hidrólisis de las sustancias de reserva en las semillas (Azcón-Bieto y Talón, 2000; Sponsel y Hedden, 2004; Thomas y col., 2005).

### ***Las GAs controlan el crecimiento y la elongación del tallo.***

Los mutantes que presentan modificaciones en la síntesis de GAs o que son sensibles a la acción de las mismas muestran alteraciones evidentes en la altura normal de la especie. En la mayoría de los mutantes encontrados, los niveles elevados de GAs suelen estar asociados con plantas altas, mientras que niveles bajos corresponden a plantas enanas comparadas con su genotipo silvestre (Gallego Giraldo, 2008). En principio, estas mutaciones pueden afectar a la síntesis de GAs activas, al proceso de desactivación o al mecanismo de transducción de señales (Azcón-Bieto y Talón, 2000). Los mutantes deficientes en GAs presentan un fenotipo enano, recuperando su altura normal al adicionarles GAs de forma exógena.

Las GAs inducen la elongación del tallo mediante la división y la expansión celular (de Lucas y col., 2008). En este sentido, las GAs provocan la división celular al acortar las diferentes fases del ciclo celular e inducir la síntesis de ADN a las células que se encuentran en fase G1, entrando de esta forma en la fase S. Así mismo, promueven la elongación celular al incrementar la plasticidad de la pared y aumentar el contenido de glucosa y fructosa. La acumulación de estas hexosas provoca una disminución del potencial hídrico celular haciendo que el agua entre en la célula a una mayor velocidad y produciendo su expansión (Phillips y Huttly, 1994).

### ***Las GAs están implicadas en la germinación de semillas.***

La germinación de semillas es un proceso regulado hormonalmente habiéndose demostrado, en numerosas especies, que la presencia de GAs es necesaria para que tenga lugar. En este sentido, existen mutantes de *Arabidopsis* y tomate deficientes en

GAs que no germinan a menos que sean tratados con GAs de forma exógena (Koorneef y van der Veen, 1980). En cereales, la movilización de reservas de las semillas está mediada por GAs producidas en el embrión. Esta movilización mantiene el crecimiento de la plántula hasta que es fotosintéticamente activa (Finkelstein y col., 2008).

### **Las GAs están implicadas en el crecimiento de la raíz.**

Las raíces de mutantes que tienen afectada la síntesis de GAs presentan modificaciones en su estructura y longitud. Mutantes deficientes en GAs presentan raíces más cortas, como en el caso del mutante *ga1-3* de *Arabidopsis* en el que la longitud de la raíz recupera su fenotipo normal al ser tratado con GAs de forma exógena (Fu y Harbedrd, 2003). Ubeda-Tomás y col. (2008) demostraron, en mutantes de *Arabidopsis*, que la respuesta a GAs mediada por las proteínas DELLA controla el crecimiento de la raíz regulando la elongación de las células de la endodermis.

### **Efecto de las GAs en la formación de flores y frutos.**

Las GAs pueden sustituir las condiciones necesarias de días fríos o largos para que se induzca la floración en numerosas especies. Por tanto, podemos indicar que las GAs constituyen un componente importante en la inducción de la floración en algunas especies pero no en todas. Sin embargo, las GAs sí son necesarias para el desarrollo normal de las flores en todas las plantas superiores. Mutantes deficientes en GAs como *ga1-3*, muestran un fenotipo defectuoso de la flor presentando estambres y pétalos cortos, lo que impide la formación del fruto (Figura 22) (Plackett y col., 2011).



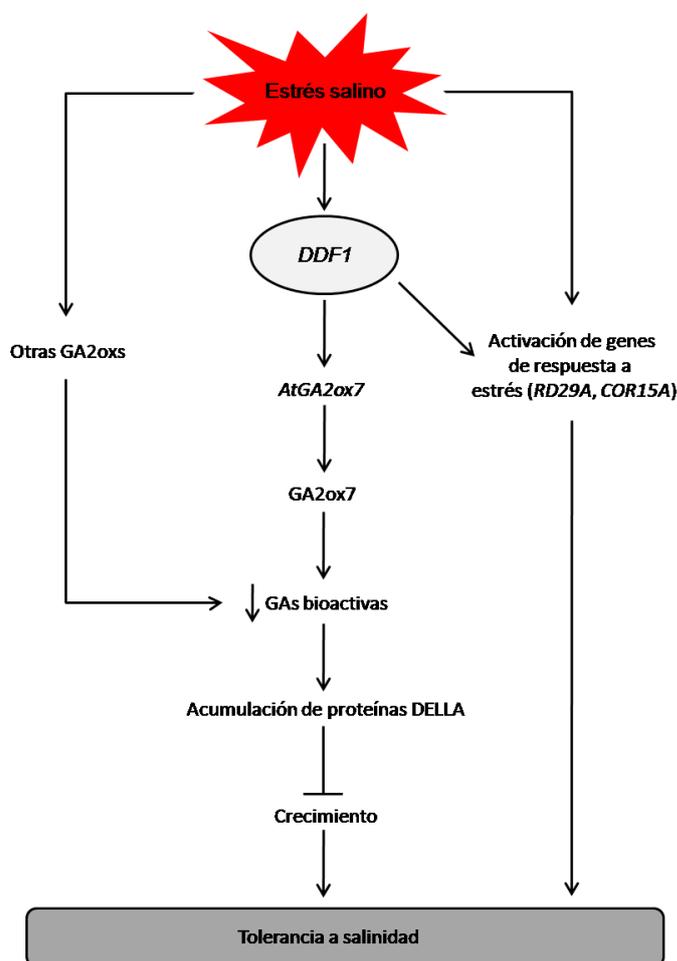
**Figura 22. Efecto en el fenotipo de la flor debido a la deficiencia de GAs en el mutante *ga1-3* comparado con el silvestre (Plackett y col., 2011).**

## 2.9. Implicación de las GAs en la respuesta al estrés salino.

A nivel fisiológico, una de las respuestas de las plantas frente a la exposición a elevadas concentraciones salinas es la reducción en la tasa de crecimiento (Yamaguchi, 2008). Dado que las GAs participan en diversos procesos relacionados con el desarrollo vegetal, resulta interesante estudiar su implicación en la respuesta al estrés salino. Trabajos recientes ponen de manifiesto el papel de las GAs en relación a la tolerancia de las plantas sometidas a elevadas concentraciones salinas. Magome y col. (2004) observaron que plantas transgénicas de *Arabidopsis* en las que se sobreexpresaba el gen *DDF1* (*Dwarf and Delayed Flowering 1*), mutantes enanos con bajos niveles de  $GA_4$  (*ddf1*), mostraron mayores tasas de supervivencia en condiciones de estrés salino. Además, la aplicación exógena de GAs hacía reducir su tolerancia a salinidad. Según estos autores y a la vista de los resultados, niveles reducidos de GAs contribuyen a favorecer la tolerancia a salinidad. En este sentido, Achard y col. 2006 mostraron que plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés salino presentaron niveles inferiores de GAs bioactivas, aportando la idea de que la salinidad hace disminuir la tasa de crecimiento de las plantas al modular el metabolismo de GAs mediante las proteínas DELLA. Estos autores indicaron en su trabajo que la disminución en la tasa de crecimiento promovida por las proteínas DELLA resulta ventajosa en situaciones de estrés salino ya que permite redireccionar los recursos de que disponen las plantas para favorecer aquellos mecanismos que permiten su supervivencia en tales condiciones, dotando a la planta de una respuesta de crecimiento flexible en función de la variabilidad ambiental.

Recientemente, Magome y col. (2008) indicaron que en plantas de *Arabidopsis* el gen *AtGA2ox7*, quien codifica para una GA2ox que desactiva específicamente GAs  $C_{20}$ , resulta ser una diana del producto génico de *DDF1*, un factor de transcripción AP2, sugiriendo que la salinidad hace disminuir los niveles de GAs bioactivas en la planta al promover la desactivación de las mismas. Estos autores proponen un modelo de respuesta adaptativa a salinidad en plantas de *Arabidopsis* según el cual cuando las plantas se exponen a elevadas concentraciones salinas se induce fuertemente la expresión del gen *DDF1* a través de una cascada de señalización (Figura 23). Bajo estas condiciones, el producto génico de *DDF1* promueve la transcripción de *AtGA2ox7* sintetizándose GA2ox7 que junto a otras GA2oxs contribuyen a reducir los niveles de GAs endógenas en la planta, resultando en acumulación de proteínas DELLA e inhibiendo el crecimiento vegetal, lo que a su vez promueve la tolerancia al estrés salino. Por otra parte, *DDF1* también regula de forma directa la sobreexpresión

de numerosos genes de respuesta a estrés, entre los que destacan *RD29A* y *COR15A*, cuyos productos génicos contribuyen a aumentar la tolerancia a salinidad. La expresión del gen *NtGA2ox* también se encuentra inducida en plantas de tabaco bajo condiciones de elevada salinidad (Cong y col., 2008), lo que sugiere que la regulación de los genes de las GA2oxs en condiciones de estrés salino parece ser un mecanismo extendido entre numerosas especies vegetales (Magome y col., 2008). Por otra parte, análisis de microarrays de ADN de plantas de *Arabidopsis* sometidas a radiación UV-B mostraron sobreexpresión de los genes que codifican para GA2ox2 y GA2ox8 (Ulm y col., 2004). Estos resultados indican que la regulación negativa de GAs mediada por la actividad de GA2oxs desempeña un papel importante durante los procesos de adaptación a diferentes tipos de estrés abiótico en plantas.



**Figura 23. Modelo de respuesta adaptativa a elevadas concentraciones salinas en plantas.** Tras la imposición de un estrés salino se induce fuertemente la expresión del gen *DDF1*, cuyo producto génico, un factor de transcripción AP2, promueve la transcripción del gen *AtGA2ox7* que codifica para GA2ox7. Esta enzima cataboliza las GAs bioactivas con lo que se produce una acumulación de las proteínas DELLA, promoviendo un retardo en el crecimiento vegetativo (Magome y col., 2008).

## 2.10. Relación entre las proteínas DELLA, ácido abscísico y etileno en la respuesta al estrés salino.

El estrés salino induce dos rutas de señalización adicionales a la de GAs, la del ácido abscísico (ABA) y la del etileno, convergiendo ambas a nivel de las proteínas DELLA (Achard y col., 2006). Según los resultados de estos autores, la proteína de fusión GFP-RGA se acumula en plantas tratadas con ABA, sin embargo, no sucede lo mismo en los mutantes *abi1-1* (insensibles a ABA). Así mismo, en estos mutantes no se inhibe el crecimiento en respuesta a sal, lo que indica que la ruta de señalización de ABA dependiente de ABI1 es necesaria para que tenga lugar esta respuesta. Por otra parte, los mutantes DELLA son relativamente resistentes al efecto inhibitorio causado por ABA. Estos datos indican que la inhibición del crecimiento en condiciones de alta salinidad está mediada, al menos en parte, por una ruta dependiente de ABA que potencia el efecto inhibitorio de las DELLA estabilizando dichas proteínas (Achard y col., 2006; Achard y Genschik, 2009).

La salinidad también activa tanto la síntesis de etileno como la expresión de genes regulados por esta hormona. La expresión de estos genes no está alterada en los mutantes *ga1-3* (mutantes deficientes en GAs) y *gai* (mutante DELLA relativamente resistente a los efectos de GAs) al tiempo que las plantas tratadas con etileno son más tolerantes a la sal. Los mutantes *ctr1*, con una respuesta constitutiva a etileno, son mucho más resistentes a condiciones de estrés salino y la mutación de los genes RGA y GAI suprime este fenotipo, lo que demostraría que el etileno promueve una mayor tolerancia a salinidad al incrementar la función de las proteínas DELLA (Achard y col., 2006).

Estos resultados indican que tanto la ruta de señalización de ABA como la de etileno inhiben el crecimiento de la planta modulando la actividad de los represores DELLA. Dado que estas rutas también están implicadas en la respuesta a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, es probable que la inhibición por las proteínas DELLA constituya un mecanismo general utilizado por las plantas para adecuar su crecimiento a las condiciones ambientales.

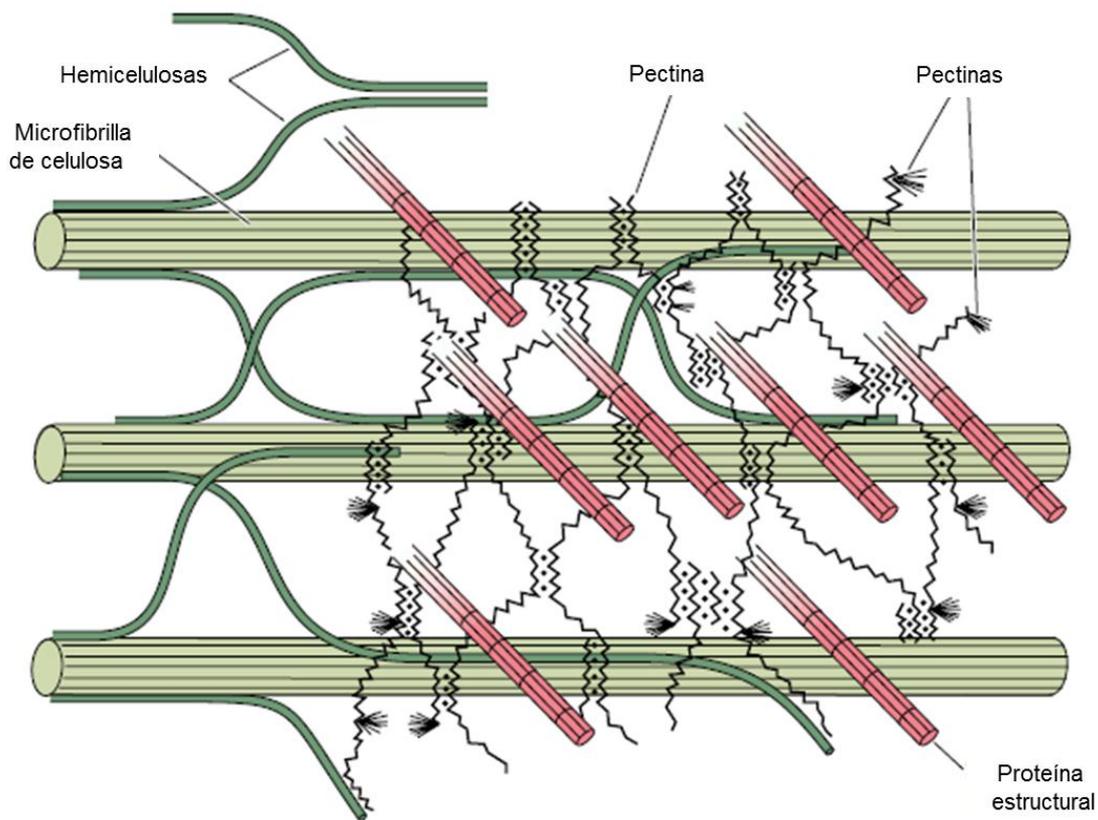
### **3. Pared celular vegetal.**

Una de las características más notables de las células vegetales es la presencia externa a la membrana plasmática de una estructura rígida, compleja y fibrosa denominada pared celular o matriz extracelular, cuyas propiedades resultan fundamentales para determinar la forma y el volumen celular. La pared celular, además de posibilitar el desarrollo de una alta presión de turgencia, participa en numerosos procesos celulares entre los que podemos destacar la adhesión, señalización, reconocimiento, crecimiento, diferenciación, defensa frente a patógenos, transporte intercelular y almacenamiento de reservas (Cosgrove, 1997; Nagata y col., 2004a).

Las paredes celulares se clasifican en dos tipos: primarias y secundarias. Las paredes primarias las forman células en crecimiento y se considera que se encuentran poco especializadas en cuanto a su estructura y composición. Los cultivos celulares BY-2 constituyen una herramienta muy útil para su estudio ya que estas células en suspensión solamente desarrollan pared celular primaria (Nagata y col., 2004<sup>a</sup>). En relación a las paredes secundarias, éstas se sintetizan, junto a la membrana plasmática, una vez ha cesado el crecimiento celular y se relacionan con células altamente especializadas como los elementos de los vasos, las traqueidas (componentes del xilema) y las esclereidas (componentes del esclerénquima). Normalmente, las paredes celulares suelen estar atravesadas por pequeños canales, denominados plasmodesmos, que conectan células vecinas facilitando el transporte intercelular de moléculas de diferente naturaleza. Así mismo, las paredes de células adyacentes se encuentran unidas por una estructura intercelular amorfa de naturaleza diferente a la pared celular que recibe el nombre de lámina media.

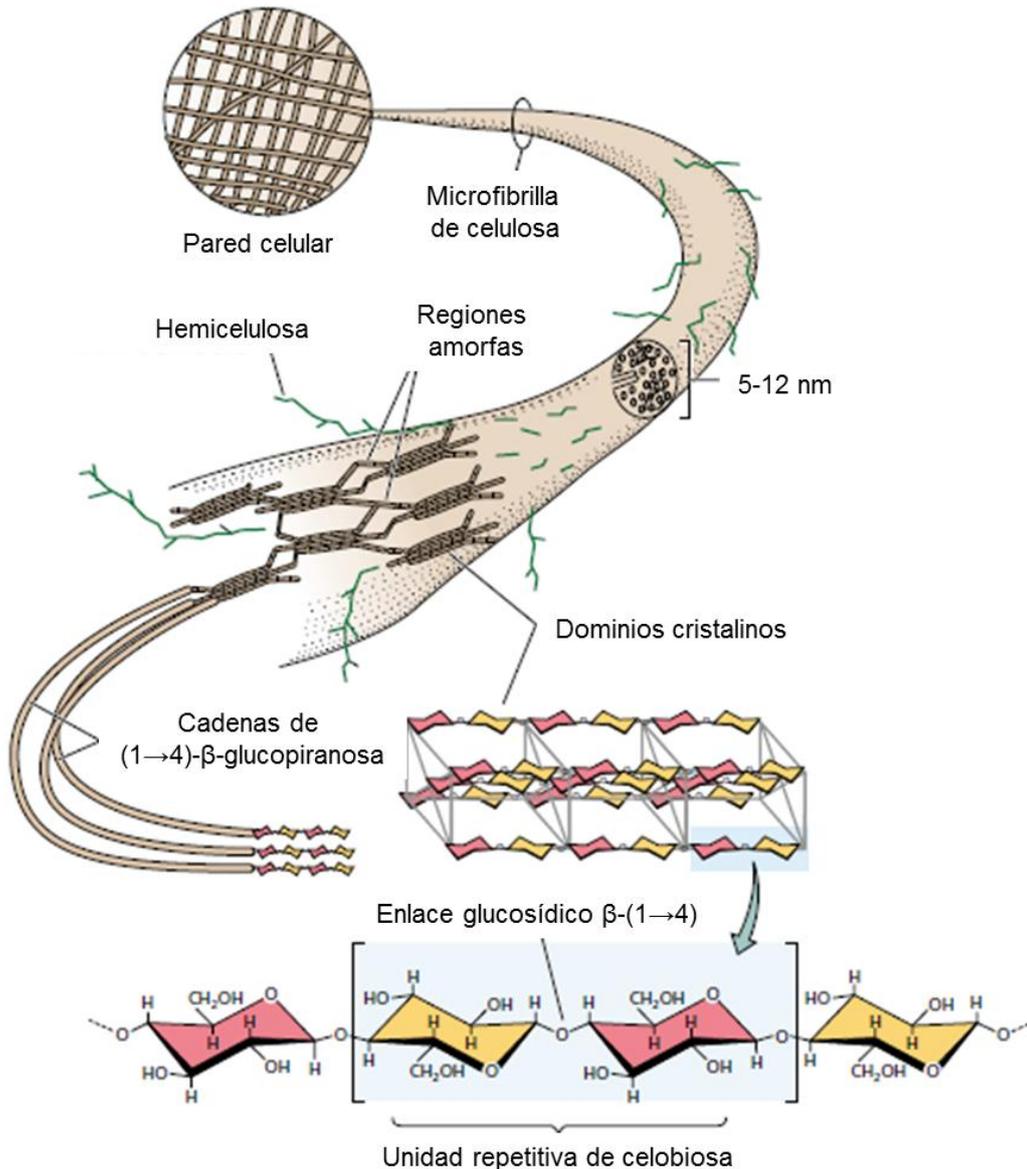
#### **3.1. Arquitectura de la pared celular vegetal primaria.**

Las paredes celulares vegetales muestran una amplia variedad en composición tanto entre diferentes especies como entre tipos celulares e incluso en un mismo tipo celular a lo largo de su diferenciación (Derbyshire y col., 2007; Freshour y col., 1996; Pelletier y col., 2010; Roppolo y col., 2011). A pesar de esta diversidad, todas las paredes celulares vegetales primarias muestran una arquitectura común basada en la rigidez de las microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de hemicelulosa, pectina y proteínas estructurales (Cosgrove, 2005) (Figura 24).



**Figura 24. Esquema de los principales componentes estructurales de la pared celular primaria y su posible ordenamiento.** Las microfibrillas de celulosa están cubiertas por hemicelulosas que se entrecruzan para mantenerlas unidas entre sí. Las pectinas forman un gel que actúa a modo de matriz de interconexión, interaccionando probablemente con las proteínas estructurales (Brett y Waldron, 1996).

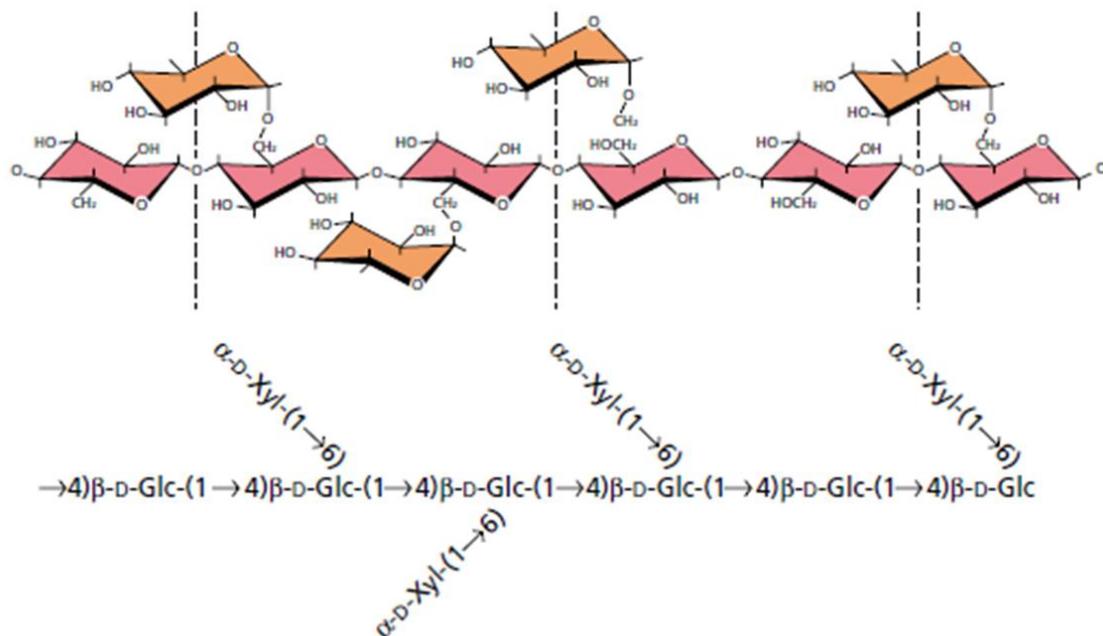
La celulosa está formada por cadenas lineales de (1→4)-β-D-glucopiranososa. Debido a la configuración espacial alternante de los enlaces glucosídicos que unen los residuos de glucopiranososa adyacentes, se considera que la unidad de repetición en la celulosa es la celobiosa, un disacárido (1→4)-β-D-glucopiranososa. Estas cadenas pueden asociarse entre sí a través de uniones no covalentes, como puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, dando lugar a la formación de microfibrillas. En relación a la organización de las microfibrillas, los modelos actuales sugieren que tienen una estructura formada por dominios altamente cristalinos unidos a regiones menos organizadas denominadas amorfas (Figura 25). Las microfibrillas de celulosa poseen una alta resistencia a los esfuerzos de tensión, son insolubles, químicamente estables y relativamente resistentes al ataque enzimático (Cosgrove, 1997).



**Figura 25. Modelo estructural de una microfibrilla de celulosa.** La microfibrilla presenta dominios altamente cristalinos entremezclados con otros menos organizados denominados amorfos. (Taiz y Zeiger, 2006).

Las hemicelulosas comprenden un grupo heterogéneo de polisacáridos flexibles que se unen a la superficie de las microfibrillas de celulosa, a través de puentes de hidrógeno, formando entramados que las mantienen juntas en una red cohesiva. La hemicelulosa más abundante en la pared celular primaria de las dicotiledóneas es el xiloglucano, constituido por un polímero lineal de (1→4)-β-D-glucopiranososa con cadenas laterales cortas que contienen xilosa y, frecuentemente, galactosa y una fucosa terminal (Mc Neil y col., 1984; Fry, 1989) (Figura 26). Los xiloglucanos no

solamente se unen a la superficie de las microfibrillas de celulosa sino que también pueden quedar atrapados dentro de las mismas, bien durante su síntesis o bien a través de un enlace covalente mediado por una reacción de transglucosilación (Pauly y col., 1999; Hrmova y col., 2007).



**Figura 26. Estructura del xiloglucano.** Los xiloglucanos están formados por un esqueleto de (1→4)-β-D-glucopiranosas (Glc) con ramificaciones de β-D-xilosa unida en (1→6) (Carpita y McCann, 2000).

En cuanto a las pectinas, éstas forman una fase gelatinosa en la que se encuentra embebida la red celulosa-hemicelulosa, evitando su agregación y colapso. Al igual que las hemicelulosas, constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos ramificados y altamente hidratados que contienen numerosos residuos de ácido D-galacturónico. Los polisacáridos de las pectinas se clasifican en tres clases: ácido homogalacturónico (HGA), ramnogalacturonano I (RGI) y ramnogalacturonano II (RGII) (Carpita y McCann, 2000). McCann y col. (1994) utilizando cultivos celulares de tabaco adaptados a 428 mM de NaCl observaron una importante modificación en el contenido de pectinas de la pared celular. El análisis mediante anticuerpos monoclonales contra diferentes epítomos de pectinas (JIM5 y JIM7) mostró alteraciones en la distribución de las mismas en las células adaptadas a NaCl.

En relación a las proteínas estructurales de la pared celular, éstas se clasifican de acuerdo a su composición predominante de aminoácidos. Así, por ejemplo, podemos destacar las proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) y las proteínas ricas en glicina (GRPs). Dentro de la categoría formada por las HRGPs se pueden diferenciar las proteínas ricas en prolina (PRPs), las proteínas ricas en arabinogalactanos (AGPs) y las extensinas (EXTs) (Showalter, 1993; Ellis y col., 2010; Tan y col., 2012). En esta memoria nos centraremos en el estudio de las AGPs y las EXTs.

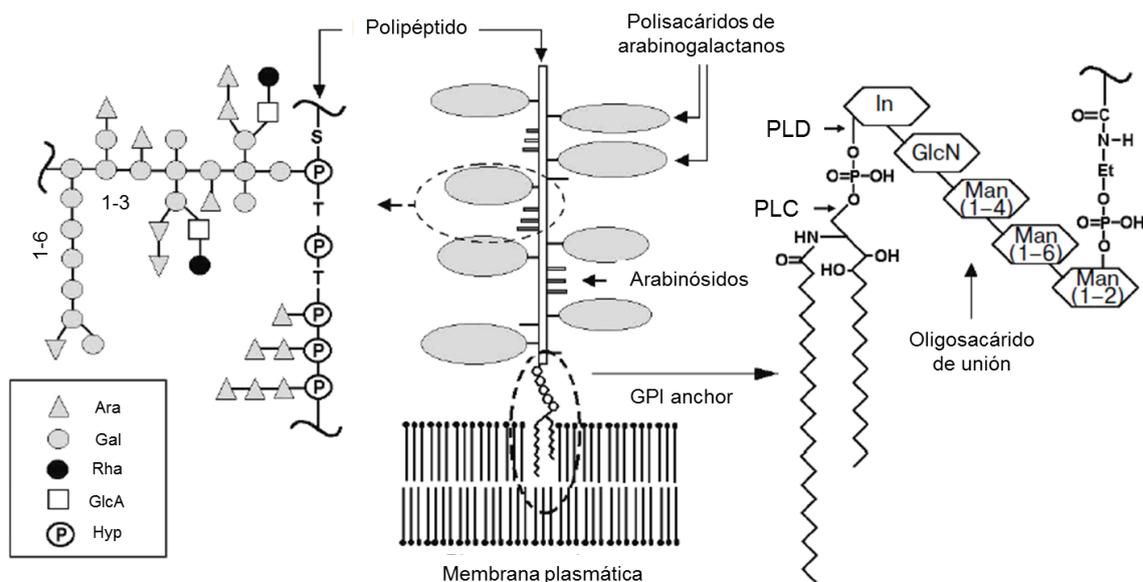
### **3.2. Proteínas ricas en arabinogalactanos (AGPs).**

Las AGPs constituyen una familia de macromoléculas ampliamente distribuida tanto en plantas terrestres como acuáticas (e incluso algas) con una complejidad estructural solamente superada por los polifenoles y las pectinas (Ellis y col., 2010). Estas proteínas parecen desempeñar un rol esencial en numerosos procesos de crecimiento y desarrollo vegetal entre los que podemos destacar la expansión y división celular, el desarrollo reproductivo, la embriogénesis somática, la diferenciación del xilema, respuestas a estrés abiótico y la participación en rutas de señalización hormonal (McCabe y col., 1997; Seifert y Roberts, 2007; Ellis y col., 2010; Tan y col., 2012). Las AGPs se han localizado en la pared celular, en la cara externa de la membrana plasmática, en las vacuolas, en espacios intercelulares y en el medio de cultivo de suspensiones celulares, donde son secretadas de forma activa (Rumyantseva, 2005; Lampion y col., 2006; Ellis y col., 2010).

#### **3.2.1. Estructura y función.**

Las AGPs normalmente presentan pesos moleculares que oscilan entre 60 y 300 kD (Nothnagel, 1997). Están constituidas por un núcleo central de naturaleza proteica (1-10% del peso molecular) del que parten cadenas laterales de polisacáridos (arabinogalactanos Tipo II) y oligosacáridos (residuos de arabinosa) (90-99% del peso molecular) (Rumyantseva, 2005). En función del tipo de aminoácidos que formen la parte proteica, las AGPs se clasifican en clásicas y no clásicas (Nothnagel, 1997). El dominio proteico de las AGPs clásicas contiene como aminoácidos mayoritarios Hyp/Pro, Ala, Ser, Thr y Gly. La composición de aminoácidos de las AGPs no clásicas varía considerablemente, habiendo sido descritas AGPs pobres en Hyp, pobres en Ala, ricas en His y ricas en Asp (Rumyantseva, 2005). Las AGPs clásicas se encuentran unidas, por el extremo C-terminal del dominio proteico, a una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que constituye un dominio transmembrana hidrofóbico

que mantiene unida la AGP a la cara externa de la membrana plasmática (Rumyantseva, 2005; Tan y col., 2012). Este anclaje GPI consiste en un oligosacárido formado por acetilglucosamina y residuos de manosa (pudiendo ser sustituida por  $\beta$ -galactosa) unidos vía etanolamina fosfato al extremo C-terminal de la proteína (Rumyantseva, 2005). La molécula de acetilglucosamina se une a través de inositol con una fosfoceramida, formada por fitoesfingosina y ácido tetracosanoico (Rumyantseva, 2005) (Figura 27). En las AGPs no clásicas resulta poco probable, en base a estudios de secuencias de ADN, que presenten un anclaje tipo GPI a la membrana plasmática (Rumyantseva, 2005). Los polisacáridos y oligosacáridos se encuentran unidos al dominio proteico a través del oxígeno de los residuos de Hyp mediante enlaces O-glicosídicos. En aquellas AGPs no clásicas que carecen de Hyp, parecen ser los residuos de Ser y Thr los que se encuentran glicosilados (Rumyantseva, 2005).



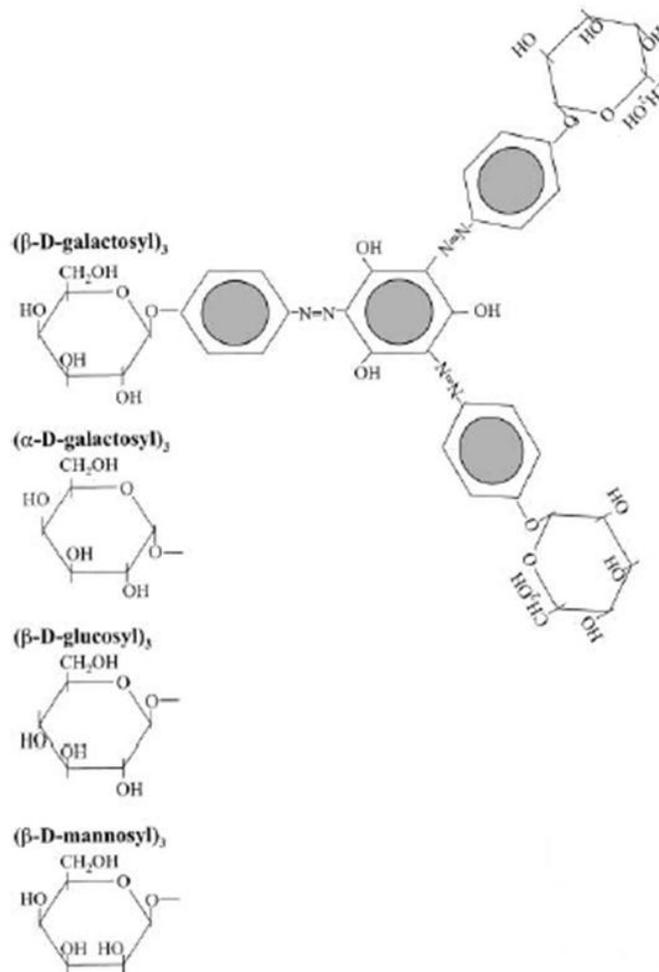
**Figura 27. Modelo hipotético de la estructura de una molécula de AGP.** Las unidades de polisacárido (arabinogalactanos Tipo II) y los arabinooligosacáridos se encuentran unidos al dominio proteico a través del oxígeno de los residuos de Hyp. El extremo carboxilo terminal del dominio proteico del AGP está modificado por la unión al anclaje GPI, formado por etanolamina, un oligosacárido de unión y un lípido que se inserta en la membrana plasmática. Se muestran en el esquema los lugares específicos de acción de fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa D (PLD) (Rumyantseva, 2005).

Los estudios de la función biológica de las AGPs han demostrado su implicación en la expansión celular, el crecimiento, la diferenciación y la secreción. Así mismo, dada su naturaleza molecular de tipo anfifílica, resultan un candidato idóneo como mediadores entre la pared celular, la membrana plasmática y el citoplasma, pudiendo actuar como señales solubles o bien como moduladores y co-receptores de morfógenos (Seifert y Roberts, 2007). Sardar y col. (2006) propusieron un modelo según el cual las AGPs interactúan con el citoesqueleto mediante un grupo de proteínas de membrana que ligarían los microtúbulos y filamentos de actina a las moléculas GPI de las AGPs. De esta forma, la alteración de la distribución de AGPs en la membrana plasmática mediante la aplicación de reactivos  $\beta$ -Yariv da lugar a la desorganización de los microtúbulos corticales e induce la muerte celular (Gao y Showalter, 1999; Nguema-Ona y col., 2007).

### 3.2.2. Herramientas para su estudio.

Las dos herramientas más utilizadas en el estudio de las AGPs han sido los reactivos de Yariv y los anticuerpos monoclonales.

**Reactivos de Yariv.** Una característica distintiva de las AGPs es su capacidad para reaccionar con fenilglucósidos sintetizados químicamente, conocidos como reactivos de Yariv. Los compuestos denominados reactivos de Yariv presentan la estructura química genérica 1,3,5-tri-(glycosyloxyphenylazo)-2,4,5-trihydroxybenzeno (Yariv, 1962) (Figura 28). Estos reactivos pueden usarse tanto para teñir AGPs de un color pardo-rojizo como para unirlos y precipitarlos con el objeto de purificar o cuantificar. Los tres azúcares terminales de estos compuestos resultan críticos para la unión al AGP. La presencia de azúcares como ( $\beta$ -D-galactosil)<sub>3</sub> y ( $\beta$ -D-glucosil)<sub>3</sub> permiten la unión entre el reactivo de Yariv y moléculas de AGPs. Sin embargo, ( $\alpha$ -D-galactosil)<sub>3</sub>, ( $\alpha$ -D-glucosil)<sub>3</sub> y ( $\beta$ -D-manosil)<sub>3</sub> no unen AGPs, por lo que estas formas son utilizadas como controles negativos.



**Figura 28. Representación de la estructura química del reactivo  $\beta$ -D-galactosil de Yariv.** Otras formas químicas del reactivo de Yariv son  $\alpha$ -D-galactosil,  $\beta$ -D-glucosil,  $\beta$ -D-manosil y  $\alpha$ -D-glucosil (Showalter, 2001).

El mecanismo de interacción entre las moléculas de AGPs y los reactivos  $\beta$ -Yariv no está claro. No existe consenso en si es el carbohidrato o la parte proteica del AGP quien interacciona con el reactivo de  $\beta$ -Yariv, pero se piensa que el AGP no se une a  $\beta$ -glicósidos individuales sino más bien a agregados del reactivo  $\beta$ -Yariv (Nothnagel, 1997; Seifert y Roberts, 2007).

**Anticuerpos monoclonales.** Se ha desarrollado un gran número de anticuerpos monoclonales contra diferentes epítopos de AGPs que han servido como herramienta tanto para su localización subcelular como para su cuantificación e identificación (Samaj y col., 1999; Samaj y col., 2000). La Tabla 1 muestra algunos de los más utilizados y los epítopos que reconocen (Showalter, 2001).

**Tabla 1. Anticuerpos monoclonales para AGPs.** GlcA, ácido glucurónico; GalA, ácido galacturónico.

Anticuerpo	Epítipo
LM2	$\beta$ -D-GlcA
JIM4	$\beta$ -D-GlcA-(1→3)- $\alpha$ -D-GalA-(1→2)-L-Rha
JIM8	Carbohidratos
JIM13	$\beta$ -D-GlcA-(1→3)- $\alpha$ -D-GalA-(1→2)-L-Rha
JIM14	Carbohidratos
JIM15	$\beta$ -D-GlcA
CCRC-M7	arabinósido (1→6)- $\beta$ -D-galactano

### 3.2.3. AGPs y salinidad.

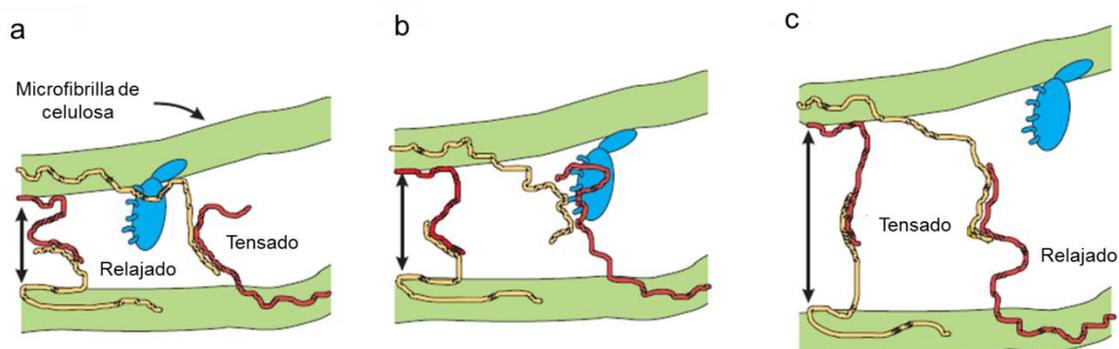
El primer trabajo en que se estudió el posible papel desempeñado por las AGPs en la tolerancia a salinidad en plantas se realizó con cultivos celulares de tabaco W-38 (Zhu y col., 1993). En este estudio se observó que la salinidad hizo disminuir drásticamente el contenido de AGPs en la membrana plasmática así como en el medio de cultivo. Lamport y col. (2006), utilizando cultivos celulares BY-2 adaptados a salinidad, obtuvieron resultados similares para la membrana plasmática, sin embargo, encontraron un incremento de hasta 6 veces en los niveles de AGPs del medio de cultivo, resultados que confirmaron en suspensiones celulares de tomate y *Arabidopsis thaliana*. Estos autores propusieron que las AGPs clásicas podrían actuar modificando las propiedades plásticas de las pectinas, lo que explicaría el hecho observado de que los reactivos  $\beta$ -Yariv inhiben la expansión celular mediante el entrecruzamiento de monómeros de AGPs. Así mismo, Immerzeel y col. (2006) observaron en cultivos celulares de zanahoria interconexiones de naturaleza covalente entre AGPs y pectinas, resultados que confirman una clara interacción entre ambos tipos de proteínas en la regulación de las propiedades físicas y químicas de las paredes celulares. Recientemente, Ouyang y col. (2007) demostraron mediante la utilización de técnicas de microarray e hibridación substractiva en plantas de tomate sometidas a estrés salino que varios genes de AGPs se encontraban fuertemente

regulados. Por otra parte, entre los mutantes SOS aislados sensibles a sal (Wu y col., 1996), SOS5 ha sido identificado como perteneciente a una subclase de AGPs denominada fasciclinas similares a AGPs (FLAs) (Shi y col., 2003). La función biológica de esta familia es muy variada, pero en este caso parecen estar implicadas en la regulación de la expansión celular.

### **3.3. Extensinas (EXTs).**

Las EXTs constituyen un elemento minoritario de la pared celular vegetal (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995). Han sido identificadas en monocotiledóneas, dicotiledóneas, helechos y musgos (Lee y col., 2001a), habiendo sido relacionadas con procesos de desarrollo en los que ocurre un relajamiento de la pared celular tales como la maduración de frutos, la formación del xilema, la germinación de semillas y la penetración del tubo polínico a través del estigma (Cosgrove, 2000; Rayle y Cleland, 1992). En la actualidad, el concepto de las EXTs como reguladores endógenos clave en los procesos de expansión celular está claramente establecido por cuatro líneas de investigación (Cosgrove, 2000). En primer lugar, las EXTs inducen relajación de la tensión en la pared celular de una forma dependiente del pH, proceso que se denomina crecimiento ácido, no habiéndose encontrado otras proteínas con actividad similar. En segundo lugar, la aplicación de EXTs a células vivas promueve su elongación. En tercer lugar, los genes que codifican para EXTs se expresan en el momento oportuno y en el lugar adecuado para regular el control del crecimiento. Por último, la inhibición de la expresión de los genes que codifican para EXTs hace inhibir el crecimiento celular. Estas proteínas presentan una masa molecular promedio de 25 a 28 kDa (McQueen-Mason y col., 1992), estando organizadas en una estructura modular de dos dominios, catalítico y de unión, y un péptido señal de aproximadamente 20 aminoácidos en la región amino terminal (Cosgrove, 2000). Su secuencia de aminoácidos resulta altamente repetitiva, conteniendo el motivo Ser-Pro-Pro-Pro-Pro (Yoshida y col., 2001). Las EXTs no tienen actividad hidrolítica (glucosidasa), por lo que es probable que los enlaces que rompen sean no covalentes (Cho y Kende, 1997). De hecho, se ha sugerido que las EXTs rompen los puentes de hidrógeno que se encuentran entre los filamentos de celulosa o entre la celulosa y otros polisacáridos mediante un mecanismo no enzimático representado en la Figura 29 (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995; Cosgrove, 2000; Wei y col., 2010; Wolf y col., 2012). Según esta hipótesis, el movimiento de la EXTs estaría restringido a una difusión lateral a lo largo de la superficie de las microfibrillas de celulosa lo que

posibilitaría debilitar localmente su fijación a la matriz facilitando la relajación de la tensión.



**Figura 29. Modelo de acción de las extensinas.** Las extensinas (representadas en color azul) pueden debilitar la unión entre las microfibrillas de celulosa al interferir entre éstas y las hemicelulosas (representadas en color rojo y amarillo) (a) o bien entre las propias hemicelulosas (b). La acción de las extensinas resulta en un desplazamiento de los polímeros (c), estableciéndose nuevos puntos de unión con la consiguiente relajación de la pared celular (Cosgrove, 2000).

En relación al papel que desempeñan las EXTs en los procesos de adaptación a diferentes tipos de estrés, y concretamente al estrés salino, la bibliografía resulta muy escasa. Sabba y col. (1999) utilizaron cultivos celulares BY-2 crecidos en presencia de un inhibidor de la síntesis de celulosa para caracterizar, desde el punto de vista estructural e inmunológico, los cambios producidos en la pared celular. Estos autores determinaron que fueron complejos formados por pectinas-extensinas los que suplieron a las microfibrillas de celulosa para conservar la integridad de la pared celular. Por otra parte, Yoshida y col. (2001) sometieron plantas de *Arabidopsis thaliana* a diferentes tipos de estrés, entre ellos hídrico (aplicando tratamientos de deshidratación-rehidratación) y salino (cultivo hidropónico a 250 mM de NaCl), determinando posteriormente la expresión diferencial de cuatro genes que codificaban para extensinas (*AtExt2*, 3, 4 y 5) mediante análisis por Northern blot. La deshidratación de las plantas indujo la inhibición de los genes objeto de estudio, sin embargo, su posterior rehidratación se tradujo en un incremento de sus transcritos. En el caso de la aplicación del tratamiento salino, solamente uno de los genes inhibió su expresión (*AtExt2*). Según estos autores, los resultados indican que las extensinas codificadas por los cuatro genes estudiados desempeñan un papel relevante en la

regulación del crecimiento celular inmediatamente después de que desaparezcan las condiciones estresantes a las que se encuentra sometida una planta. Así mismo, las extensinas deben estar implicadas en algún mecanismo de remodelación celular destinado a minimizar los efectos nocivos provocados por elevadas concentraciones salinas.



## II. OBJETIVOS



## II. OBJETIVOS.

A la vista de lo expuesto en la introducción, el objetivo general de esta memoria es profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en los procesos de adaptación celular a condiciones de estrés salino. Para ello, hemos utilizado como sistema modelo cultivos celulares de tabaco BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2), estableciendo como objetivos específicos los siguientes:

### 1. Estudiar diferentes mecanismos fisiológicos, bioquímicos y celulares de adaptación al estrés salino.

- 1.1. Establecer una línea celular BY-2 viable, crecida en medio de cultivo líquido con 258 mM de NaCl a partir de una línea BY-2 control.
- 1.2. Determinar las curvas de crecimiento de ambas líneas celulares y caracterizar diferentes parámetros (viabilidad celular, volumen celular e índice mitótico).
- 1.3. Localizar el Na<sup>+</sup> a nivel subcelular en la línea adaptada a salinidad mediante técnicas de microscopía de láser confocal.
- 1.4. Estudiar la ultraestructura celular en ambas líneas mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión.
- 1.5. Analizar el contenido mineral y los solutos orgánicos en ambas líneas celulares.
- 1.6. Estudiar las modificaciones producidas en el proteoma y transcriptoma como consecuencia del proceso de adaptación a elevadas concentraciones salinas.
- 1.7. Estudiar la interacción entre el metabolismo de la prolina y el ABA en las células adaptadas a salinidad.
- 1.8. Estudiar la función desempeñada por la mitocondria y las ROS en el proceso de adaptación a salinidad.
- 1.9. Estudiar las modificaciones producidas en el sistema de endomembranas, retículo endoplasmático y aparato de Golgi durante el proceso de adaptación a salinidad.

### 2. Estudiar el papel que desempeñan las giberelinas (GAs) en el proceso de adaptación a salinidad.

- 2.1. Analizar el patrón de GAs presentes en ambas líneas celulares por espectrometría de masas.

- 2.2. Estudiar tanto el comportamiento de los cultivos celulares al ser tratados con diferentes concentraciones de GAs y un inhibidor de su ruta biosintética como las modificaciones estructurales a las que pudieran dar origen.
- 2.3. Analizar la expresión de los genes de síntesis y degradación de GAs y comprobar si se encuentra regulada de forma diferencial en las células adaptadas a salinidad respecto al control.
- 2.4. Estudiar el papel de las proteínas DELLA en el proceso de adaptación a salinidad.

**3. Estudiar la implicación de las proteínas ricas en arabinogalactanos (AGPs) y extensinas (EXTs) en el proceso de adaptación a salinidad.**

- 3.1. Localizar y cuantificar a nivel subcelular diferentes epítomos de AGPs y EXTs en ambas líneas celulares utilizando técnicas de inmunolocalización mediante el uso de anticuerpos monoclonales.
- 3.2. Estudiar el efecto producido por el reactivo de Yariv tras ser aplicado a los cultivos celulares.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS







### III. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 1. Material vegetal.

Para el desarrollo de los experimentos se utilizaron dos líneas de cultivos celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum* L., 1753) cv. Bright Yellow 2 (BY-2): una línea celular silvestre y otra transformada con la proteína GFP unida a la señal de retención en el retículo endoplasmático HDEL. La línea celular transformada con GFP fue obtenida en el laboratorio de la doctora Ikuko Hara-Nishimura (Mitsubishi y col., 2000) y se utilizó exclusivamente para estudios *in vivo* de la estructura del retículo endoplasmático mediante microscopía de láser confocal. Ambas líneas celulares se cultivaron tanto en ausencia (líneas celulares control) como en presencia de 258 mM de NaCl (líneas celulares adaptadas). Los cultivos celulares adaptados a 258 mM de NaCl se obtuvieron por adaptación progresiva a diferentes concentraciones salinas en el medio de cultivo (86,2 mM (5 g/L), 172,4 mM (10 g/L) y finalmente 258 mM (15 g/L) de NaCl) dado que al someter directamente un cultivo celular BY-2 a una concentración de 258 mM de NaCl la viabilidad celular cae drásticamente hasta valores próximos a cero tras 24 horas (Figura 30a). Por tanto, el proceso de adaptación a elevadas concentraciones salinas representado en la Figura 30b resulta necesario para conseguir una línea celular estable. Este proceso de adaptación, que se prolongó durante 5-6 meses, permitió obtener suspensiones celulares que describían ciclos de cultivo estables y en las que no se formaban agregados celulares.

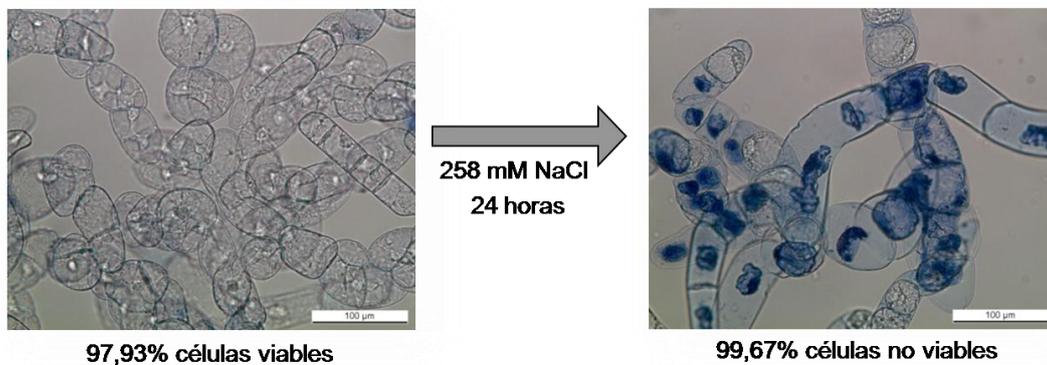
Las condiciones de cultivo fueron las descritas por Nagata y Kumagai (1999). Se utilizó medio de cultivo MS (Murashige y Skogg, 1962) (Duchefa Biochemie) según la composición detallada en la Tabla 2 a una concentración de 4,4 g L<sup>-1</sup> suplementado con 0,2 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 0,2 g L<sup>-1</sup> de MES y 0,1 g L<sup>-1</sup> de mio-inositol. El pH se ajustó, previo a la esterilización en autoclave (121°C durante 20 minutos), a 5,8 con KOH 1M.

La periodicidad de cada subcultivo así como el volumen de suspensión celular transferido fueron diferentes en función de la línea celular:

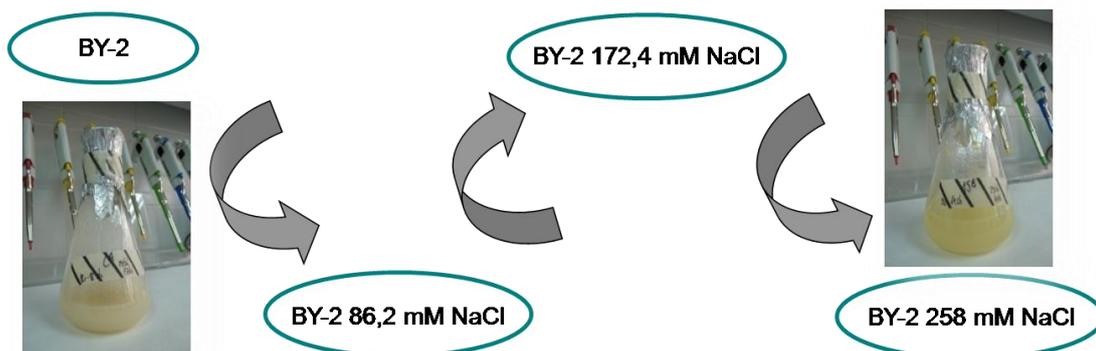
- Los cultivos celulares crecidos en condiciones control y 86,2 mM de NaCl se subcultivaron cada 7 días. El volumen transferido fue de 6 mL a 100 mL de medio fresco.
- Los cultivos celulares crecidos en 172,4 y 258 mM de NaCl se subcultivaron cada 14 días. El volumen transferido fue de 12 mL a 100 mL de medio fresco.

En todos los casos, los cultivos celulares se crecieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL y permanecieron en incubadores con agitación orbital (120 rpm) a 26°C en oscuridad.

(a)



(b)



**Figura 30. Proceso de adaptación *in vitro* a salinidad.** (a) Cultivo directo de células control a medio con elevadas concentraciones salinas. Las barras de escala representan 100 μm. (b) Proceso de adaptación progresiva a 258 mM de NaCl.

**Tabla 2. Composición (macro y micronutrientes) del medio de cultivo Murashige y Skoog.**

<b>Compuesto</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00
CaCl <sub>2</sub>	332,02
MgSO <sub>4</sub>	180,54
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00
KNO <sub>3</sub>	1900,00
<b>Micronutrientes</b>	
FeNaEDTA	36,70
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16,90
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,60
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
KI	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025

## 2. Parámetros de crecimiento.

### 2.1. Curvas de crecimiento.

La curva de crecimiento de la línea celular control se elaboró cuantificando el peso fresco, a intervalos diarios durante un periodo de 9 días, de las células contenidas en 25 mL de medio de cultivo de un total de tres réplicas. Para ello, las muestras se filtraron a través de papel Whatman N°1 en un sistema de vacío formado por un matraz Kitasato acoplado a un embudo Büchner. Estos datos permitieron determinar el crecimiento relativo (CR) como:

$$CR = ((\text{peso fresco}_{\text{día } n} - \text{peso fresco}_{\text{día } 0}) / \text{peso fresco}_{\text{día } 0})$$

La metodología empleada para realizar la curva de crecimiento de la línea celular adaptada fue la descrita anteriormente con la salvedad de que las muestras se tomaron cada 2 días durante un periodo de 16 días.

## 2.2. Viabilidad celular.

La viabilidad celular se calculó como el porcentaje de células viables de un total de 900 (Ricardo y Phelan, 2008). Para ello, las células se tiñeron *in vivo* durante 5 minutos a temperatura ambiente con el colorante Evans Blue a una concentración de 0,5 mg/mL y posteriormente se realizaron tres lavados con medio de cultivo fresco para retirar su exceso. El colorante Evans Blue (Sigma-Aldrich) se caracteriza por ser un colorante vital que no es capaz de penetrar a través de membranas semipermeables intactas, por lo que solamente tiñe las células muertas. La cuantificación de la viabilidad se llevó a cabo en un microscopio Leica LMR en campo claro y las imágenes fueron captadas con una cámara digital Leica DC 500 con la versión 1.20 del software Leica IM 1000 Image Manager.

## 2.3. Índice mitótico.

El índice mitótico se calculó como el porcentaje de células que se encontraban en cualquiera de las fases de mitosis (profase, metafase, anafase o telofase) de un total de 900 (Kumagai-Sano y col., 2006). Las células se tiñeron *in vivo* durante 5 minutos a temperatura ambiente con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich), colorante fluorescente utilizado para la tinción nuclear, a una concentración de 5 µg/mL previa aplicación de tritón X-100 1% (v/v). Para la observación se utilizó un microscopio Leica DMRB equipado con una lámpara de fluorescencia ebq 100 y una cámara digital Leica DC 500 con la versión 1.20 del software Leica IM 1000 Image Manager.

## 2.4. Volumen celular.

El volumen celular se calculó utilizando la metodología propuesta por Binzel y col., (1988) a partir de una ecuación que relaciona el área y el perímetro celular:  $v=8.5A^{2.5}P^{-2}$ . Para ello se calcularon, a partir de imágenes obtenidas con un microscopio Leica DMRB utilizando una óptica Normaski (contraste interferencial diferencial (CID)), los perímetros y las áreas de un total de 100 células utilizando el software SigmaScan Pro 5. En las imágenes tomadas con CID se observa la muestra en relieve, lo que permite tomar medidas precisas sin necesidad de preparación alguna.

### 3. Determinación del contenido mineral.

El análisis del contenido mineral se realizó tanto en el material vegetal como en el medio de cultivo.

#### 3.1. Cationes.

Las suspensiones celulares se filtraron en un sistema de vacío tal y como se describe en la sección 2.1. Una vez separado el medio de cultivo de la masa celular se procedió al lavado de las células en 100 mL de agua bidestilada utilizando el mismo sistema de vacío. Posteriormente, se colocó el material vegetal en una estufa a 60°C durante un mínimo de 48 horas. La determinación de cationes en el material vegetal se realizó a partir de 100 mg de material seco y molido, posteriormente digerido en una mezcla de HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4:1 v/v) en un Ultraclave-Microondas Millestone a 220°C durante 20 minutos y finalmente pasado por filtros de 0,45 µm (Sartorius Stedim Minisart RC15). La determinación de cationes en el medio de cultivo se realizó directamente a partir del medio obtenido al recoger las células con el sistema de vacío, que posteriormente se pasó por filtros de 0,45 µm. La determinación final del contenido en Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> se llevó a cabo, a partir de los filtrados, en el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, Iris Intrepid II, Termo Electrón Corporation, EE.UU.) (Hernández y col., 2010).

#### 3.2. Aniones.

La determinación de aniones en el material vegetal se realizó a partir de 50 mg de muestra seca y molida obtenida tal y como se describe en la sección 3.1. A los 50 mg de muestra se le añadieron 12 mL de agua bidestilada y se mantuvo en agitación durante 24 horas. Posteriormente, se centrifugó a 27.000 x g durante 20 minutos y el sobrenadante se pasó por filtros de 0,45 µm. La determinación de aniones en el medio de cultivo se realizó directamente a partir del medio obtenido al recoger las células con el sistema de vacío, que posteriormente se pasó por filtros de 0,45 µm. La concentración de Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se determinó, a partir de los filtrados obtenidos, en el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC mediante cromatografía iónica (850 Professional IC, Metrohm, Herisau, Suiza) (Hernández y col., 2010).

#### 4. Determinación de solutos orgánicos.

##### 4.1. Azúcares solubles.

La determinación del contenido en glucosa, fructosa, sacarosa y mio-inositol en el material vegetal se realizó mediante un equipo de cromatografía líquida de alta resolución HPLC 10A (Shimadzu, Japón) equipado con una bomba, un inyector automático, un horno y un detector de índice de refracción. Un gramo de peso fresco de material vegetal, previamente lavado con agua bidestilada, se homogeneizó a 4°C en 1 mL de agua bidestilada utilizando un Ika T25 ULTRA TURRAX Digital a máxima velocidad durante 30 segundos. El homogenado se centrifugó a 3.000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 8.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Por último, el nuevo sobrenadante se pasó, de forma consecutiva, por dos tipos de filtros: (1) Whatman Syringe Filters PVDF de 0.22 µm y (2) Mini Speed SPE Octadecyl C18/18%. El extracto obtenido fue el utilizado en la determinación de azúcares totales. Como patrones se utilizaron concentraciones conocidas de glucosa, fructosa, sacarosa y mio-inositol (2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 y 15 mM). Los distintos azúcares solubles se separaron en una columna de intercambio iónico ICE Coregel 87H3 (Transgenomic) utilizando como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N. El área de los cromatogramas se integró y cuantificó utilizando el software de análisis DataAnalysis LC/MSD Trap Version 3.2 (Bruker Daltonik, GmbH, Alemania). Las condiciones de trabajo del HPLC fueron las siguientes:

---

Fase móvil	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 N
Flujo (mL min <sup>-1</sup> )	0,4
Presión de la bomba (psi)	0,745
Temperatura de la columna (°C)	37
Volumen de inyección (µl)	20
Tiempo del cromatograma (min)	30

---

## 4.2. Aminoácidos.

Para la determinación de aminoácidos se homogeneizó en frío 1 g de peso fresco de material vegetal, previamente lavado con agua bidestilada, en 5 mL de etanol al 80% utilizando un Ika T25 ULTRA TURRAX Digital a velocidad máxima durante 30 segundos. El extracto se mantuvo en agitación a 4°C durante 12 horas y posteriormente se centrifugó a 11.000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se evaporó a sequedad en baño a 30°C y se resuspendió en 200 µL de agua bidestilada. Por último, se pasó la muestra por filtros Millex-GP (Millipore) de 0,22 µm y se centrifugó a 23.000 x g durante 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución/espectrometría de masas en un equipo Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.) equipado con un muestreador automático termostaticado con una bomba capilar conectada a una trampa iónica Agilent Ion Trap XCT Plus Mass Spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.) utilizando un sistema de electrospray (ESI). Como patrones se utilizaron concentraciones conocidas de cada aminoácido (10, 25, 50, 75 y 100 µM).

## 5. Determinación de proteínas.

El material vegetal se homogeneizó en un mortero a 4°C con un tampón de extracción que contenía 0,5% PVP (p/v), 0,1 mM PMSF, 0,1 mM EDTA, 0,2% tritón X-100 (v/v) y tampón fosfato potásico (TPK) 50 mM pH 7,8 (ajustando el pH del fosfato de potasio dibásico ( $K_2HPO_4$ ) con el monobásico ( $KH_2PO_4$ )), en una relación 1/2 (p/v). El homogenado se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se purificó en columnas Sephadex NAP G-25 (GE Healthcare) equilibradas con el tampón de extracción.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) mediante una curva de calibrado utilizando diluciones seriadas de albúmina de suero bovino (BSA) junto con el reactivo Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EE.UU.) diluido 1/5 en agua bidestilada, en una proporción 1/100 (v/v). Transcurridos 10 minutos en oscuridad, se midió la densidad óptica a 595 nm frente a un blanco de reactivo diluido y se elaboró una recta de calibración representando los valores de absorbancia a 595 nm en ordenadas y la concentración de proteínas ( $mg mL^{-1}$ ) en abcisas. La concentración de proteínas de las

muestras se calculó por extrapolación de su valor de absorbancia a 595 nm en dicha recta patrón.

## **6. Determinación de compuestos relacionados con el estrés oxidativo.**

### **6.1. Peroxidación lipídica (formación de malondialdehído).**

La peroxidación de lípidos se estimó según Cakmak y Horst (1991) determinando la concentración de malondialdehído (MDA). El MDA es un subproducto de la peroxidación lipídica que en condiciones de bajo pH y alta temperatura reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando lugar al producto MDA-TBA que es detectable por espectrofotometría.

Para la obtención de los diferentes extractos celulares, el material vegetal se homogenizó en frío con ayuda de un mortero en ácido tricloroacético (TCA) al 0,1% en una relación 1/5 (p/v). El extracto resultante se centrifugó a 10.000 x *g* durante 5 minutos. Posteriormente, a 1 mL del sobrenadante se le añadió la mezcla de reacción (ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% en TCA al 20%) y se incubó a 90°C durante 20 minutos. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo colocando los tubos en un baño de hielo. Se centrifugó a 10.000 x *g* durante 5 minutos y se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 532 y 600 nm. La cantidad de MDA-TBA se calculó a partir del valor de absorbancia dado por la diferencia entre los valores obtenidos a 532 y 600 nm y el coeficiente de extinción molar 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### **6.2. Determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se determinó mediante el método de oxidación ferrosa en naranja de xilenol (OFX) (Cheeseman, 2006). El material vegetal se homogeneizó en frío con ayuda de un mortero en tampón de extracción (TPK 0,1 M pH 6,4 con KCN 5 mM) a una proporción 1/1 (p/v) en el caso de las muestras de la línea celular control y 1/2 (p/v) para las muestras de la línea celular adaptada. Para la elaboración de la recta de calibrado se prepararon diluciones de concentraciones conocidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 μM). Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 10.000 x *g* durante 10 minutos, se tomaron 75 μL del sobrenadante y de cada una de las diluciones de la curva patrón y se mezclaron con 925 μL del reactivo de reacción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 mM + 1% etanol, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 250 μM, xilenol orange 100 μM y sorbitol 100 μM en agua bidestilada) incubando a temperatura ambiente y en

oscuridad durante 45 minutos. A continuación, se midió la densidad óptica a 560 nm y se elaboró la curva patrón representando los valores de absorbancia a 560 nm en ordenadas y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en abcisas. La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las muestras problema se calculó por extrapolación de su valor de absorbancia en dicha curva patrón.

## **7. Técnicas de microscopía.**

### **7.1. Microscopía de láser confocal.**

La Tabla 3 recoge el listado de fluoróforos utilizados con indicaciones precisas de su afinidad, longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{Exc}$ ) y emisión ( $\lambda_{Em}$ ), concentraciones de ensayo y tiempos de incubación. Todas las muestras celulares se tomaron en fase de crecimiento exponencial y se incubaron, en agitación orbital (120 rpm) a 26°C y oscuridad, con el fluoróforo adecuado en función del objeto de estudio. Posteriormente, las muestras se montaron sobre portaobjetos sellados. Para su observación se utilizó el objetivo 63x de aceite de inmersión de un microscopio de láser confocal Leica TCS SP2. Las reconstrucciones tridimensionales se realizaron a partir de secciones de 0,1  $\mu$ m en el eje Z utilizando el software propio del microscopio de láser confocal.

**Tabla 3. Fluoróforos utilizados en los estudios realizados con microscopía de láser confocal.** Tipos de láser empleados en la excitación de los fluoróforos: UV (405 nm), Argón (488 nm) y Helio-Neón (633 nm).

Fluoróforo	Afinidad	$\lambda_{Exc}/\lambda_{Em}$ (nm)	Concentración de ensayo	Tiempo de incubación (min)	Casa comercial
<b>FM4-64</b>	Membranas biológicas	488/625-665	16 $\mu$ M	En función del ensayo	Invitrogen
<b>ER-Tracker Blue-White DPX</b>	Retículo endoplasmático	405/440-460	2 $\mu$ M	20	Invitrogen
<b>CoroNa-Green</b>	Na <sup>+</sup>	488/520	10 $\mu$ M	45	Invitrogen
<b>Asante Natrium Green-1</b>	Na <sup>+</sup>	488/540	10 $\mu$ M	45	TEFLabs
<b>DCFH-DA</b>	ROS	488/510-530	25 $\mu$ M	30	Sigma-Aldrich
<b>Mito Tracker Deep Red 633</b>	Mitocondrias	633/655-675	0,5 $\mu$ M	30	Invitrogen
<b>Monocloro bimane</b>	Glutación / vacuolas	405/505-530	100 $\mu$ M	30	Fluka
<b>Dehidroetidio</b>	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	488/515-535	10 $\mu$ M	30	Sigma-Aldrich
<b>TUNEL</b>	Indicador de PCD	488/515-565	Seguir las instrucciones del fabricante	60	Roche
<b>DAPI</b>	Núcleo	340/488	14 $\mu$ M	10	Sigma-Aldrich
<b>TO-PRO-3 iodide</b>	Núcleo	633/650-670	1 $\mu$ M	20	Invitrogen
<b>CaspACE FITC-VAD-FMK</b>	Caspasas	633/650-670	10 $\mu$ M	30	Invitrogen

## 7.2. Microscopía electrónica de transmisión.

### 7.2.1. Inclusión de muestras en resina SPURR.

Las muestras se embebieron en agarosa de baja temperatura de gelificación (Sigma-Aldrich) al 2% (v/v). Una vez gelificada la agarosa, se cortaron pequeñas secciones y se procesaron según el siguiente protocolo:

- Fijación. Las muestras se fijaron en una solución de glutaraldehído 2% y paraformaldehído 2% en tampón fosfato sódico (TPNa) 0,1 M pH 7,2 (ajustando el pH del fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) con el monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )) durante 2 horas y media a 4°C.
- Lavados. Tras la fijación química, se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno en TPNa 0,1 M pH 7,2.
- Postfijación. La postfijación se realizó en tetróxido de osmio al 1% en TPNa 0,1 M pH 7,2 durante 2 horas a 4°C en oscuridad.
- Lavados. Se retiró la solución de tetróxido de osmio realizando otros 3 lavados con TPNa 0,1 M pH 7,2 donde permanecieron las muestras durante 12 horas para su posterior deshidratación.
- Deshidratación. La deshidratación se realizó utilizando concentraciones crecientes de etanol (15%, 35%, 50%, 70%, 96% y 100%), permaneciendo las muestras en cada una de ellas durante 30 minutos.
- Inclusión. Para incluir las muestras se aplicó el siguiente procedimiento a 4°C:
  - Se aplicó óxido de propileno 100% en dos etapas de 30 minutos cada una.
  - Posteriormente se sustituyó el óxido de propileno por resina Spurr (Spurr, 1969) de forma gradual (75:25, 50:50 y 25:75) en pasos de 30 minutos.
  - A continuación, las muestras permanecieron durante 12 horas en resina Spurr 100%.
- Solidificación. Las muestras se colocaron en cápsulas de gelatina a las que se adicionó resina Spurr 100% y se colocaron en estufa a 70°C durante 24 horas hasta la polimerización total de la resina.

Una vez obtenidos los bloques, se tallaron y se realizaron cortes ultrafinos (70-80 nm) con un ultramicrotomo Leica Ultracut UCT que se montaron sobre rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Para la observación se utilizó un microscopio electrónico Philips Tecnai 12 y las imágenes se capturaron con

una cámara CCD SIS Mega View III. Los estudios morfométricos se realizaron utilizando el software Visualización Philips Mega View III.

### **7.2.2. Inclusión de muestras en resina LR White.**

Las muestras se embebieron en agarosa tal y como se detalla en la sección 7.2.1. Una vez gelificada la agarosa, se cortaron pequeñas secciones que se procesaron según el siguiente protocolo:

- Fijación. Las muestras se fijaron en una solución con glutaraldehído 0,5% y paraformaldehído 2% en TPNa 0,1 M pH 7,2 durante 3 horas y media a 4°C.
- Lavados. Tras la fijación química, se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno en TPNa 0,1 M pH 7,2.
- Deshidratación. Se realizó utilizando concentraciones crecientes de etanol (15%, 35%, 50%, 70%, 96% y 100%), permaneciendo las muestras en cada una de ellas durante 30 minutos.
- Inclusión. Para incluir las muestras se aplicó el siguiente procedimiento a 4°C:
  - 25% resina:75% etanol durante 60 minutos.
  - 50% resina:50% etanol durante 60 minutos.
  - 75% resina:25% etanol durante 60 minutos.
  - 100% resina durante 12 horas.
- Solidificación. Las muestras se colocaron en cápsulas de gelatina a las que se adicionó nuevamente resina 100% y se mantuvieron en estufa a 52°C durante 24 horas en ausencia de oxígeno hasta la correcta polimerización de la resina.

Sobre los bloques, una vez solidificados, se cortaron secciones ultrafinas (70-80 nm) con un ultramicrotomo Leica Ultracut UCT y se montaron en rejillas de níquel cubiertas con formvar. Para los estudios de inmunolocalización e inmunomarcaje se utilizaron rejillas no contrastadas con el fin de poder observar nítidamente las partículas de oro durante la cuantificación en un microscopio electrónico Philips Tecnai 12. Ciertas rejillas se tiñeron, procediendo tal y como se describe en la sección 7.2.1, para la captación de imágenes con una cámara CCD SIS Mega View III.

### **7.3. Microscopía óptica (MO).**

Sobre los bloques de resina citados en la sección 7.2.1. se realizaron cortes semifinos (0.5  $\mu\text{m}$ ) utilizando un ultramicrotomo Leica Ultracut UCT. Estos cortes se

montaron sobre portaobjetos, se tiñeron con una disolución de azul de toluidina al 0,5% y se tomaron imágenes con un microscopio Leica LMR en campo claro equipado con una cámara digital Leica DC 500.

## **8. Muerte celular programada (PCD). Ensayos TUNEL y caspasas.**

La presencia o no de PCD en las líneas celulares se determinó utilizando el kit comercial TUNEL (*In Situ* Cell Death Detection Kit, Roche) para marcar posibles fragmentos de ADN generados durante el proceso de muerte celular y el fluoróforo CaspACE FITC-VAD-FMK *In situ* Marker (Promega) como marcador de la actividad caspasa. Tras los tratamientos de las muestras, las observaciones se realizaron con un microscopio de láser confocal Leica TCS SP2 tal y como se refleja en la sección 7.1.

Para aplicar el kit TUNEL se procedió de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras se fijaron con 2% paraformaldehído en PBS durante 60 minutos a 15°C, se permeabilizaron con 1% tritón X-100 y finalmente se incubaron en la mezcla de reacción TUNEL (formada por una solución enzimática (transferasa terminal de deoxinucleótidos (TdT)) 10x y una solución marcadora (coctel de nucleótidos marcados con fluoresceína) 1x durante 60 minutos a 37°C en oscuridad. Paralelamente se prepararon un control positivo y un control negativo. Para el control positivo se trataron las muestras previamente con DNasa I (Roche) mientras que para el control negativo no se incorporó a la mezcla de reacción la solución enzimática. Por último, se realizó una tinción nuclear con 0,1% TO-PRO-3 iodide.

## **9. Ensayos inmunocitoquímicos.**

Las observaciones de los ensayos descritos en las secciones 9.1., 9.2. y 9.3. se realizaron con un microscopio electrónico Philips Tecnai 12 y las imágenes se capturaron con una cámara CCD SIS Mega View III. Tanto las medidas morfométricas como la cuantificación de las partículas de oro se realizaron utilizando el software Visualización Philips Mega View III. Para la cuantificación se contaron las partículas de oro de un mínimo de treinta campos diferentes que comprendían al menos diez células representativas.

### 9.1. Inmunolocalización de AGPs y extensinas.

Para la inmunolocalización de AGPs y extensinas se aplicó, sobre las rejillas de níquel citadas en la sección 7.2.2., el siguiente protocolo donde todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente:

- Bloqueo. Para bloquear los posibles sitios de unión inespecíficos del anticuerpo primario las rejillas se incubaron en PBS (TPK 10 mM pH 7,4 + 150 mM NaCl) + 5% BSA durante 30 minutos.
- Anticuerpo monoclonal primario. Los anticuerpos utilizados para AGPs fueron JIM4, JIM13, JIM15 y LM2 mientras que para extensinas se emplearon JIM11, JIM12, JIM19 y JIM20. Las rejillas se incubaron con el anticuerpo primario deseado diluido 1:10 (v/v) (JIM15) o 1:5 (v/v) (LM2, JIM4, JIM11, JIM12, JIM13, JIM19 y JIM20) en PBS + 5% BSA durante 3 horas. Se utilizó un control negativo en el que se omitió el anticuerpo primario.
- Lavado. Las rejillas se lavaron en PBS 3 veces durante 5 minutos cada lavado.
- Anticuerpo secundario. Las rejillas se incubaron con el anticuerpo secundario (Goat anti-Rat marcado con partículas de oro de 15 nm (British BioCell International)) diluido 1:25 (v/v) en PBS + 1% BSA durante 3 horas.
- Lavado. Las rejillas se lavaron con PBS en 2 ocasiones y con agua bidestilada 5 veces durante 5 minutos cada una y se dejaron secar a temperatura ambiente.

### 9.2. Inmunolocalización de ácido abscísico.

La inmunolocalización de ácido abscísico (ABA) se realizó aplicando el protocolo descrito en la sección 9.1. con ligeras modificaciones:

- Anticuerpo monoclonal primario. Se utilizó anti-ABA a una dilución 1:50 (v/v) en PBS + 5% BSA durante 3 horas.
- Anticuerpo secundario. Las rejillas se incubaron con el anticuerpo Goat anti-Rabbit marcado con partículas de oro de 10 nm (British BioCell International) diluido 1:50 (v/v) en PBS + 1% BSA durante 3 horas.

### 9.3. Inmunolocalización de glutatión.

Para la inmunolocalización de glutatión el protocolo aplicado fue el descrito en la sección 9.1. con ligeras modificaciones:

- Anticuerpo monoclonal primario. Se utilizó anti-glutatión a una dilución 1:50 (v/v) en PBS + 1% BSA + 1% Goat Serum durante 2 horas.
- Anticuerpo secundario. Se utilizó Goat anti-Rabbit marcado con partículas de oro de 10 nm (British BioCell International) diluido 1:50 (v/v) en PBS + 1% BSA durante 1 hora y media.

### 9.4. Inmuno-dot AGPs.

Para estos ensayos se tomaron muestras del medio de cultivo en cada una de las fases de crecimiento. Las muestras se pasaron por filtros Millex-GP (Millipore) de 0,22  $\mu\text{m}$  y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó una membrana de nitrocelulosa Protran Membrane 0,45  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich) sobre la que se marcaron cuadrículas de 0,5 x 0,5 cm y se recortó al tamaño adecuado según las necesidades de cada ensayo. En cada cuadrícula de la membrana se cargó un volumen de 1  $\mu\text{L}$ , siendo el volumen de muestra en ese  $\mu\text{L}$  proporcional al peso fresco de la masa celular para cada línea y cada fase crecimiento, y se dejó secar durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se bloquearon todos los posibles sitios de unión inespecíficos del anticuerpo primario incubando las membranas en PBS con leche en polvo desnatada (Millipore) al 3% (MP/PBS) durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, las membranas se incubaron con el anticuerpo monoclonal primario deseado para cada ensayo diluido 1:10 (v/v) en MP/PBS durante 1 hora y media. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se lavaron las membranas en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-rat IgG conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), Sigma-Aldrich) diluido 1:1000 en MP/PBS durante 1 hora y media. Se lavaron las membranas en PBS y por último se determinó la unión del anticuerpo primario a la membrana de nitrocelulosa mediante la incubación con un sustrato enzimático (Tris-acetato 50 mM pH 5,0 + diaminobenzidina (1:1) (v/p) + 6%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durante 10 segundos. La reacción enzimática se paró lavando las membranas en agua bidestilada.

## 10. Tratamientos con reactivo $\beta$ -D-glucosil Yariv.

Los cultivos celulares permanecieron en agitación orbital (120 rpm) a 26°C en oscuridad con 100  $\mu$ M del reactivo  $\beta$ -D-glucosil Yariv (Biosupplies, Australia) durante 24 horas. Pasado este tiempo, se tomaron muestras de 1 mL que se lavaron tres veces con medio de cultivo fresco para retirar el reactivo y proceder a su observación. Para realizar estudios de ultraestructura e inmunolocalización las muestras se trataron tal y como se detalla en las secciones 7.2.1., 7.2.2. y 9.1.

## 11. Tratamientos con giberelinas ( $GA_9$ , $GA_{20}$ , $GA_4$ , $GA_1$ ) y prohexadiona-calcio (Phd).

Los cultivos celulares se trataron con 1  $\mu$ M  $GA_9$ , 1  $\mu$ M  $GA_{20}$ , 0.1  $\mu$ M  $GA_4$ , 0.1  $\mu$ M  $GA_1$  (Olchemin Ltd.) y 50  $\mu$ M prohexadiona (Phd) (Sigma-Aldrich) durante todo el ciclo de cultivo. Transcurridos 7 y 14 días para la línea celular control y adaptada respectivamente, se procedió a tomar el peso fresco de la masa celular y se capturaron imágenes con un microscopio Leica LMR en campo claro equipado con una cámara digital Leica DC 500 con la versión 1.20 del software Leica IM 1000 Image Manager.

## 12. Cuantificación de giberelinas.

Se tomaron muestras de ambas líneas celulares en fase de crecimiento exponencial utilizando el sistema de vacío descrito en la sección 2.1., se conservaron a -80°C y posteriormente fueron liofilizadas. Se analizó el patrón de GAs presentes en ambas líneas celulares por espectrometría de gases-masas.

### 12.1. Extracción.

El protocolo utilizado para la extracción de GAs fue el descrito por Croker y col. (1994) con modificaciones. Mediante este protocolo las GAs son separadas en diferentes fracciones por HPLC y cuantificadas mediante la técnica de gases masas, tal y como se describe a continuación.

- 0,5 g de células liofilizadas se resuspendieron en 100 mL de metanol 80% con un Ika T25 ULTRA TURRAX Digital a velocidad máxima durante 30 segundos.

- A los homogenados se adicionaron estándares internos (GAs marcadas con  $^2\text{H}_2$  y  $^3\text{H}_2$ ) a las concentraciones que se detallan en la Tabla 4 y se mantuvieron en agitación a  $4^\circ\text{C}$  y oscuridad durante 12 horas.
- Las muestras se filtraron con vacío, añadiendo  $\text{CH}_3\text{OH}$  100% en exceso para arrastrar la máxima cantidad posible de GAs que pudieran quedar retenidas en el filtro. El filtrado se recogió en un matraz y se evaporó en un rotavapor a  $40^\circ\text{C}$ .
- Una vez evaporado el metanol, se adicionaron 5 mL de agua MilliQ pH 8,0 arrastrando la máxima cantidad posible de muestra y posteriormente se ajustó el pH entre 7,8-8,0 con KOH.
- Las muestras se cargaron en columnas QAE Sephadex A-25 (Farmacia) de intercambio aniónico previamente lavadas con agua MilliQ pH 8,0. y se colocaron sobre Sep-Pak C18 (Waters) previamente activados, arrastrando la muestra desde la columna al Sep-Pak mediante ácido fórmico 0,2 M.
- Una vez que contenidas las muestras en el Sep-Pak y previo a eluir las, se limpiaron los restos de ácido fórmico mediante agua pH 3,0.
- Para eluir las GAs se añadieron 2X2,5 mL de metanol 100%. El volumen recogido se transfirió a un tubo y se evaporó utilizando una centrifuga de vacío.
- Para comprobar si se habían producido pérdidas durante el proceso de extracción, se midió con un contador de centelleo la concentración de  $^3\text{H}$ -GAs (los 4 $\mu\text{l}$  de muestra necesarios fueron tomados del volumen resuspendido del paso siguiente).  
 $4\mu\text{l muestra}^{*3} + 500 \mu\text{l CH}_3\text{OH 100\%} + 2,5 \text{ ml Ultima Gold}$
- A continuación se metilaron las muestras. Para ello, se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de metanol 100%, se añadieron 10 gotas del derivatizante “ethereal diazomethane” y se secaron con  $\text{N}_2$ . Este proceso se repitió en una segunda ocasión para asegurar una correcta metilación de todas las muestras.
- Una vez metiladas, las muestras se adicionó 1 mL de acetato de etilo (EtOAc) agitando el tubo hasta que las muestras estuvieron bien resuspendidas. Posteriormente se adicionó 1 mL de agua bidestilada y se agitó fuertemente. Tras formarse dos fases claramente diferenciadas se procedió a recuperar la fase no acuosa que se depositó en otro tubo. Al tubo en que se encontraba la fase acuosa se adicionó de nuevo 1 mL de EtOAc, se agitó y se recuperó la fase no acuosa. Este proceso se repitió en una tercera ocasión.
- Las fases no acuosas recuperadas se pasaron por una columna de intercambio iónico Varian Bond Elut NH2 SP-NH $_2$  previamente activadas con EtOAc 100% y el filtrado se llevó a sequedad en una centrifuga de vacío.

- Las muestras se resuspendieron en una mezcla de 50  $\mu\text{L}$  de metanol 100% con 250  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada y se inyectaron en un HPLC con una columna C18 de fase reversa (4,9 mm x 250 mm). Posteriormente, se eluyeron empleando un gradiente lineal con incrementos (19% a 100%  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) durante 40 minutos y un flujo de 1  $\text{mL min}^{-1}$ .
- Las fracciones se recogieron, con un colector automático, en tubos en volúmenes de 1 mL y se agruparon en función de los tiempos de retención en que aparecen las diferentes GAs. Posteriormente, se llevaron a sequedad en un rotavapor a 40°C.
- Las muestras se resuspendieron en 50  $\mu\text{l}$  de metanol 100%, se agitaron y traspasaron a viales de cristal de 2 mL. Este paso se repitió dos veces para asegurarse de la recuperación total de las muestras. Posteriormente, las muestras se llevaron a sequedad.
- Una vez evaporadas las muestras, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de MSTFA (para transformarlas en TMSI) y se dejaron durante 30 minutos a 90°C.
- Por último, y justo antes de inyectar la muestra en el GC-MS/MS, se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de EtOAc seco.

**Tabla 4. Concentración de estándares internos marcados con deuterio [ $^2\text{H}$ ] y tritio [ $^3\text{H}$ ].**

<b>Estándar interno</b>	<b>GAs marcadas</b>	<b>Concentración</b>
<b>[<math>^2\text{H}_2</math>] GAs</b>	GA <sub>1</sub> , GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> , GA <sub>8</sub> , GA <sub>9</sub> , GA <sub>12</sub> , GA <sub>15</sub> , GA <sub>19</sub> , GA <sub>20</sub> , GA <sub>24</sub> , GA <sub>29</sub> , GA <sub>34</sub> , GA <sub>44</sub> , GA <sub>53</sub>	400 pg
<b>[<math>^3\text{H}_2</math>]GAs</b>	GA <sub>1</sub> , GA <sub>4</sub> , GA <sub>19</sub> , GA <sub>20</sub>	50000 dpm

## 12.2. Condiciones del GC-MS/MS.

Una vez purificadas las muestras por el protocolo descrito anteriormente, las GAs se cuantificaron por triplicado mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) utilizando un cromatógrafo de gases Trace GC junto con un espectrómetro de masas MAT95XP (ThermoElectron,

<http://www.thermo.com>). La temperatura del inyector del cromatógrafo de gases se fijó a 250°C. Las muestras se inyectaron en una columna capilar (30 cm x 0,25 mm x 0,25 µm, Thermo Electron Corporation) mantenida a 50°C. La válvula de purga-separación se abrió 2 minutos después y la temperatura se incrementó hasta 200°C a una velocidad de 20°C min<sup>-1</sup> y a continuación a 4°C min<sup>-1</sup> hasta 300°C. El efluente de la columna se inyectó de manera acoplada al espectrómetro de masas mediante una fuente de tipo impacto electrónico (EI) que operaba a una temperatura de 220°C y a una energía de 70 eV. Los espectros de masas se adquirieron a una velocidad de un espectro por segundo en modo SIM (Selective Ion Monitoring), expresando el resultado en relación m/z en el rango 41-650 m/z y en el intervalo de tiempo de 0-37.50 minutos. La concentración de GAs en las muestras se determinó mediante la cuantificación del área de los picos de los iones correspondientes a las mismas GAs. Estas GAs se detectaron con referencia a las áreas de los picos de los iones de las diferentes GAs marcadas con deuterio, que se utilizaron para las curvas de calibración y fueron introducidas en las muestras como estándares internos al comienzo de la extracción.

### **13. Identificación de proteínas DELLA por *western-blot*.**

#### **13.1. Extracción de proteínas.**

Las muestras se homogeneizaron a 4°C en un mortero con tampón de extracción que contenía 4% SDS, 25 mM Tris pH 8,8 y 2,5% glicina en una proporción 1/2 (p/v). El homogenado se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se dejó 5 minutos a 95°C y se enfrió en hielo para desnaturalizar las proteínas. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) según el protocolo descrito en la sección 5.

#### **13.2. Electroforesis de las muestras.**

La electroforesis para muestras con proteínas en condiciones desnaturalizantes se realizó en una fuente eléctrica XCell SureLock® Mini-Cell (Invitrogen, EE.UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante y a temperatura ambiente. Las muestras se cargaron en geles comerciales NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris 10 mm (Invitrogen, EE.UU.). El tampón de electroforesis utilizado fue 1XNuPage SDS running buffer (Invitrogen, EE.UU.). Las muestras fueron diluidas en una relación 1:4 con el tampón de carga y, una vez cargadas en el gel, se sometieron a una diferencia de potencial eléctrico de

200 V durante unos 30 minutos, comprobando siempre que el frente del colorante había alcanzado el extremo inferior del gel. Como patrón de masa molecular se utilizó Precision Plus Protein™ WesternC Standards (Bio-Rad, California) con los siguientes pesos moleculares: 10 KDa, 15 KDa, 20 KDa, 25 KDa, 37 KDa, 50 KDa, 75 KDa, 100 KDa, 150 KDa y 250 KDa.

### **13.3. Western-blot.**

La transferencia a la membrana se llevó a cabo mediante el sistema de transferencia iBlot dry Blotting System (Invitrogen, EE.UU.). Las proteínas, previamente separadas mediante electroforesis, fueron transferidas a la membrana de nitrocelulosa mediante el kit iBlot gel transfer stacks nitrocellulose-regular (Invitrogen, EE.UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez realizada la transferencia, la membrana se introdujo en una solución de bloqueo (5% (p/v) leche en polvo desnatada + 0,1% Tween 20 en solución de lavado PBS (10XPBS: 0,1 M tampón fosfato pH 7,4, 1,5 M NaCl, 30 mM KCl)). La membrana se mantuvo en esta solución de bloqueo durante 1 hora y en agitación, cambiando dicha solución cada 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con tampón PBS + 0,05% Tween 20 y en agitación.

Tras retirar la solución de bloqueo, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave con el anticuerpo primario Dur18 (anti Rat, dilución 1/5000 en PBS + 0,05% Tween 20). Una vez retirado el anticuerpo, la membrana se lavó de nuevo con tampón PBS, realizando 3 lavados de 15 minutos cada uno y en agitación.

Por último, la membrana se incubó a temperatura ambiente y agitación suave con el anticuerpo secundario (HRP-antirat IgG, dilución 1/5000 en PBS) durante 1 hora. Tras retirar la solución con el anticuerpo secundario, la membrana se lavó tal y como se indica en el párrafo anterior.

Para la visualización de la proteína se utilizó el kit SuperSignal West Dura Extend duration (Thermo Scientific). La solución del sustrato quimioluminiscente se repartió de forma uniforme sobre la membrana y se incubó durante 5 minutos, envuelta en un film de plástico. Transcurrido este tiempo, la membrana se reveló en una cámara oscura mediante autoradiografía (Kodak). El film que contenía la membrana se puso en contacto con la autoradiografía durante 30-60 segundos dentro del cassette y, pasado

este tiempo, se reveló con el líquido revelador y fijador de Kodak. Las proteínas unidas a los anticuerpos mencionados anteriormente quedaron marcadas en este proceso de revelado.

#### **14. Análisis proteómico.**

El análisis proteómico se realizó siguiendo los protocolos descritos previamente en nuestro laboratorio (Fernández-García y col., 2011) y en colaboración con el Grupo de Proteómica y Genómica Funcional de Plantas de la Universidad de Alicante.

##### **14.1. Extracción de proteínas.**

Las muestras se homogeneizaron a 4°C en un potter con tampón de extracción (250 mM sacarosa, 50 mM HEPES, 10 mM EDTA, 10 mM Na<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>, 10 mM ácido ascórbico, 100 mM PMSF, 5% glicerol (v/v), 1% PVPP (p/v) y 10x de un coctel inhibidor de proteasas Complete Mini (Roche)) pH 7,5 en una proporción 1:2 (p/v). El homogenado se centrifugó a 30.000 x g durante 90 minutos a 4°C. Se separaron los precipitados de los sobrenadantes y a éstos últimos se les añadió el mismo volumen de fenol saturado con Tris-HCl pH 7,5 y se incubaron en hielo con agitación suave durante 30 minutos. A continuación, se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C y se eliminó la fase acuosa. A la fase fenólica se añadió el mismo volumen de buffer de lavado de fenol (100 mM Tris, 20 mM KCl, 10 mM EDTA y 0,4% mercaptoetanol (v/v)) pH 8,0 y se centrifugó en 4 ocasiones a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C eliminando la fase acuosa en cada uno de los lavados. Posteriormente, se precipitaron las proteínas adicionando acetato de amonio 0,1 M en metanol. Estas mezclas se almacenaron a -20°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se realizó otro lavado con acetato de amonio 0,1M en metanol. Se adicionó acetona al 80% (v/v) previamente enfriada, se disgregó el precipitado y se incubó a -20°C durante 15 minutos. Se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante dejando secar el exceso de acetona en el precipitado. Por último, se resuspendieron los precipitados de proteína en 200 µL de tampón de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 30 mM Tris-HCl y 4% CHAPS (p/v)) pH 9,0. Las impurezas que podrían interferir con la electroforesis bidimensional (2D) se eliminaron utilizando el kit 2D Clean Up (GE Healthcare) y la concentración de proteína se determinó mediante el kit RC DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, California, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.

#### 14.2. Marcaje de proteínas.

Las muestras se marcaron con tres tipos de fluorocromos derivados de la cianina con diferentes espectros de excitación y emisión (Cy2 (488/520 nm), Cy3 (532/580 nm) y Cy5 (633/670 nm) (CyDye™ DIGE Dyes, GE Healthcare)) según las instrucciones del fabricante en condiciones de marcaje mínimo (400 pmol de fluorocromo por cada 50 µg de proteína). La reacción tuvo lugar durante 30 minutos en oscuridad y se paró adicionando 1 µL de 10 mM lisina. El marcaje con Cy2 se realizó como patrón interno a una mezcla de proteínas a partes iguales de cada muestra.

#### 14.3. Electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE).

Para realizar la 2D-DIGE se mezclaron 20 µL de muestra (150 µg de proteína) marcada con los fluorocromos Cy2, Cy3 y Cy5 con 60 µL de tampón (7 M Urea, 2 M Thiourea, 30 mM Tris-HCl, 100 mM DTT y 1% IPG buffer (v/v)) y se incubó durante 10 minutos en hielo.

En la primera dimensión, las proteínas se separaron mediante isoelectroenfoque (IEF) en función de su carga eléctrica. Para ello, las muestras se ajustaron a un volumen de 340 µL con un nuevo tampón (7 M urea, 2 M thiourea, 30 mM Tris-HCl, 2% CHAPS (p/v), 50 mM DTT, 0,5% IPG buffer (v/v) y 0,005% azul de bromofenol (p/v)) y se aplicaron a tiras de isoelectroenfoque con gradiente lineal inmovilizado (IPG) de 4,0-7,0 (180 x 3 x 0,5 mm) (GE Healthcare). El IEF se realizó a 20°C en una unidad IPGphor (GE Healthcare) sometiendo a las proteínas a una serie de voltajes diferentes (300 V durante 3 horas, gradiente desde 300 hasta 1000 V en 6 horas, gradiente desde 1000 hasta 8000 V en 3 horas y 8000 V durante 5 horas hasta alcanzar una tensión acumulada de 50 kVh) para favorecer la migración hasta alcanzar su punto isoeléctrico. Posteriormente, las tiras se equilibraron durante 30 minutos en tampón de equilibrado (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M urea, 30% glicerol (v/v), 2% SDS (p/v) y 1% DTT (p/v)) y se mantuvieron otros 30 minutos en el mismo tampón suplementado con 1,25% de yodoacetamida (p/v).

En la segunda dimensión, las proteínas se separaron en función de su masa molecular en un gel SDS-PAGE al 12,5% de acrilamida (p/v) mediante una electroforesis vertical en una cubeta Ettan Dalt Six (GE Healthcare). La separación se realizó en una primera etapa a 80 V, 10 mA/gel y 1 W/gel durante 1 hora, una segunda etapa a 150 V, 18 mA/gel y 3 W/gel durante 12 horas y una tercera etapa a 500 V, 38

mA/gel y 13 W/gel hasta que el frente de electroforesis alcanzó el extremo inferior del gel.

#### **14.4. Digitalización y análisis de imágenes.**

Los geles marcados con los fluorocromos Cy2, Cy3 y Cy5 fueron escaneados con un equipo Typhoon 9410 (GE Healthcare). Las imágenes generadas se analizaron utilizando el software Progenesis SameSpots v4.0 (Non-linear Dynamics, Newcastle, Reino Unido).

#### **14.5. Digestión enzimática con tripsina.**

Para la identificación de proteínas con diferente expresión se procedió, en primer lugar, a la tinción de los geles con CBB coloidal (Neuhoff y col., 1988). La recuperación de los puntos de interés se realizó de forma individualizada mediante un selector manual (Gel Company, Tübingen, Alemania) de 1.5 mm de diámetro y se lavaron con 25 mM de bicarbonato de amonio y agua para eliminar las impurezas del colorante y del detergente SDS. A continuación, se procedió a su reducción con 60 mM DTT y a su alquilación con 100 mM de yodoacetamida. La digestión, en presencia de tripsina porcina modificada (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.), se realizó en placa de 96 pocillos a 37°C durante 6 horas en un robot digestor ProGest (Genomic Solutions, Cambridgeshire, UK) de acuerdo a las instrucciones del fabricante para muestras teñidas con CBB con ligeras modificaciones (Martínez-Esteso y col., 2011). Tras la digestión, los péptidos resultantes se recuperaron en bicarbonato de amonio, se trataron con 70% acetonitrilo y, en última instancia, con 1% de ácido fórmico. Por último, se secaron en una centrifuga de mesa a vacío Speed-Vac y se resuspendieron en 10 µL de 0,1% de ácido fórmico. A partir de estos péptidos se procedió al análisis por LC-MS/MS.

#### **14.6. Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC-MS/MS).**

Los análisis se realizaron con un equipo Agilent 1100 Series nanoHPLC en línea con un espectrómetro de trampa de iones XCT plus (Agilent) equipado con una fuente nano-ESI. Tras desalar y concentrar la muestra en una columna de enriquecimiento Zorbax 300A-C18, la separación de los péptidos se realizó utilizando un gradiente lineal de 5-60% ACN en 0,1% de ácido fórmico (v/v). Los espectros de masas se adquirieron en modo standard (26.000 m/z por segundo) y los espectros MS/MS en

modo ultrascan (8.100 m/z por segundo). Una vez obtenidos los espectros de masas, se utilizó el software Spectrum Mill Proteomics Workbench para identificar las proteínas de interés haciendo uso de una base de datos no redundante (National Center for Biotechnology Information, NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## **15. Análisis de expresión génica por RT-PCR.**

### **15.1. Extracción y purificación de ARN.**

La extracción y purificación de ARN se realizó a partir 100 mg de material vegetal congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C utilizando los Kits RNeasy Plant Mini y RNase-Free DNase Set (QIAGEN, Hilden, Alemania) procediendo de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. La cuantificación del ARN se realizó con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, EE.UU.).

### **15.2. Transcripción inversa.**

La transcripción inversa se realizó a partir de 1 µg de ARN total utilizando el Kit Quantitect Reverse Transcription (QIAGEN, Hilden, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la síntesis del ADNc, el ARN se incubó a 42°C durante 15 minutos con el coctel de reacción de retrotranscripción que contenía tampón 5x, una mezcla de dNTPs, Mg<sup>2+</sup> y retrotranscriptasa. Pasado este tiempo, se inactivó la retrotranscriptasa incubando a 95°C durante 3 minutos.

### **15.3. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).**

Se analizaron, mediante RT-qPCR, los niveles de expresión de los genes representados en la Tabla 5. Como gen de referencia se utilizó el gen de la actina.

Las reacciones RT-qPCR se realizaron por triplicado en un equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, California, EE.UU.) en placas de 96 pocillos a partir de volúmenes de 25 µL (10 µL del primer (concentración final 100 nM), 12,5 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, EE.UU.) y 2,5 µL de ADNc (100 ng)).

Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación mediante PCR y RT-qPCR.

Gen	Número de acceso	Secuencias de los cebadores
<i>20ox1</i>	AB109762.1	F GCCCATCGTTACATGGACATG R TCCTCTGAGCCTTTTGCTTTTC
<i>3ox1</i>	AB032198.1	F GCCCAAAGGAGAATCCAAAG R TGCCGGGTAAGAATTCAGTTG
<i>2ox1</i>	AB125232.1	F AATTCGGGCTGCAGTAAATG R GGGACAAGGGGGATAGTGAT
<i>2ox2</i>	AB125233.1	F CCGACCCTTTTGGCTATGG R CGACCCAACCGGAATCG
<i>DELLA</i>	SGN-U423273	F AATCCGCAAGACCCTTTTTTC R TTGAATCGTTTGCTCTGTGG
<i>Actina</i>	GQ339768.1	F TACAACGAGCTTCGTGTTGC R ACAAGGAAAGGACAGCCTGA
<i>KCO6</i>	SGN-U433395	F GAGAGGATTGGGTGGTTTGA R CCAATCCCTTTGCTTTTCA
<i>VAMP7C</i>	SGN-U437387	F CATCACCTTCTTCCCTCCCCA R AGATCCCCTCGCTACCAATG
<i>DAD2</i>	SGN-U431797	F ACCGCTGTAATTCAGGTTGG R TCTGCATAAGCACGTTCTGG
<i>CYD3;1</i>	SGN-U426470	F CCTTCTGCTATGGCTTCTGC R GTCCCAAACCTTGCCTTTGTT
<i>ATBI-1</i>	gi 14719275 gb AF390556.1	F GATGGCAGCTGCACTGTTTA R AAGTACTCTCTGCGCCTTGC
<i>ACS2</i>	gi 297804 emb X65982.1	F ATTCCAATTCCTTGCGACAG R TGTTGGTTGGTGAAGGTCAA
<i>AOX1A</i>	SGN-U450830	F GCGTCTTCTTCAACGCCTAC R AGGAGCAGGAACGTTCTCAA
<i>P5CS2</i>	SGN-U447290	F TCCTGTTCTTGGTCATGCTG R TTAAGACCTCCGTTTGCAC
<i>SOS2</i>	SGN-U441685	F CCAATTTGCTGTTGTGATGG R TGACATGCCATCCTGTGATT
<i>PLD<math>\alpha</math>1</i>	SGN-U445520	F TGCGGTTTGTGTTGGAATAA R TCGCATTTCAAACACGAAC

El protocolo utilizado para la amplificación consistía en una fase inicial a 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos constituidos por tres fases cada uno (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 30 segundos) y una fase de elongación final de 2 minutos a 72°C. Para verificar la ausencia de contaminación se

realizaron controles que solamente contenían la mezcla de reacción y los cebadores, cuya especificidad se comprobó mediante curvas de disociación. Además, con el fin de evaluar la eficiencia de los cebadores, se ensayaron diluciones seriadas de ADNc.

Los productos de amplificación fueron purificados con el kit MinElute PCR Purification (QUIAGEN, Hilden, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y posteriormente secuenciados por Secugen S.L. (Sequencing and Molecular Diagnostics). La identificación de las secuencias de nucleótidos se realizó utilizando el programa NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Los niveles de expresión relativa de cada gen objeto de estudio se calcularon mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001) utilizando como gen de referencia la actina.

## **16. Análisis de la expresión génica por microarray.**

Para analizar la expresión génica se utilizó un chip de Affymetrix diseñado por Edwards y col., (2010) en *Nicotiana tabacum* (Affymetrix tobacco expression microarray (ATCToba)) depositado en el Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, ref. N782243).

### **16.1. Extracción y purificación de ARN.**

La extracción y purificación de ARN se realizó tal y como se indica en la sección 15.1. a partir de ocho muestras biológicas independientes, cuatro de la línea celular control y otras cuatro de la adaptada, todas ellas tomadas en fase de crecimiento exponencial.

### **16.2. Análisis de las muestras.**

El ARN purificado se envió al NASC donde se realizó el análisis por microarray previa síntesis del ARNc, hibridación, lavado, teñido y escaneado de las muestras.

### **16.3. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se realizó, en primera instancia, utilizando el test paramétrico de la *t* de Student (p-value). Posteriormente, se aplicó el análisis de Benjamini-

Hochberg mediante el software Partek Express para reducir la tasa de falsos positivos (FDR) por debajo de 0,01. Solamente se tuvieron en consideración aquellos genes que mostraron un incremento diferencial de su expresión superior a 2 veces y que pasaron la FDR.

#### **16.4. Análisis ontológico de los genes.**

El análisis ontológico de los genes (Gene Ontology, términos GO) expresado de forma diferencial se realizó, mediante el software Blast2GO, eligiendo una categorización basada en su función biológica y su localización celular. La elección del software Blast2GO es debida al hecho de trabajar con un microarray por encargo, por lo que la base de términos GO de tabaco no se encuentra disponible en Affymetrix y no se puede realizar el análisis directamente con el software Parted Express. Es por esto que se procedió a anotar de nuevo todas las secuencias con Blast2GO y posteriormente se realizó el análisis ontológico.

Así mismo, el estudio ontológico se realizó, utilizando el software online Mapman (<http://mapman.mpimp-golm.mpg.de/general/ora/ora.shtml>) y la base de datos TAIR 9.0, mediante el análisis con códigos BIN anotados para *Arabidopsis*. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el test Benjamini-Hochberg para reducir FDR por debajo de 0,05.

#### **16.5. Depósito de datos.**

Tanto los datos del microarray como los resultados obtenidos fueron depositados en las bases de datos Gene Expression Omnibus (GEO) (ref. GSE42562) y NASCArrays (ref. NASCARRAYS-675).

#### **17. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se llevó a cabo aplicando los métodos estandarizados que ofrece el software IBM SPSS Statistics 19 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.) utilizando el análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey ( $P < 0,05$ ).



## IV. RESULTADOS



## **IV. RESULTADOS.**

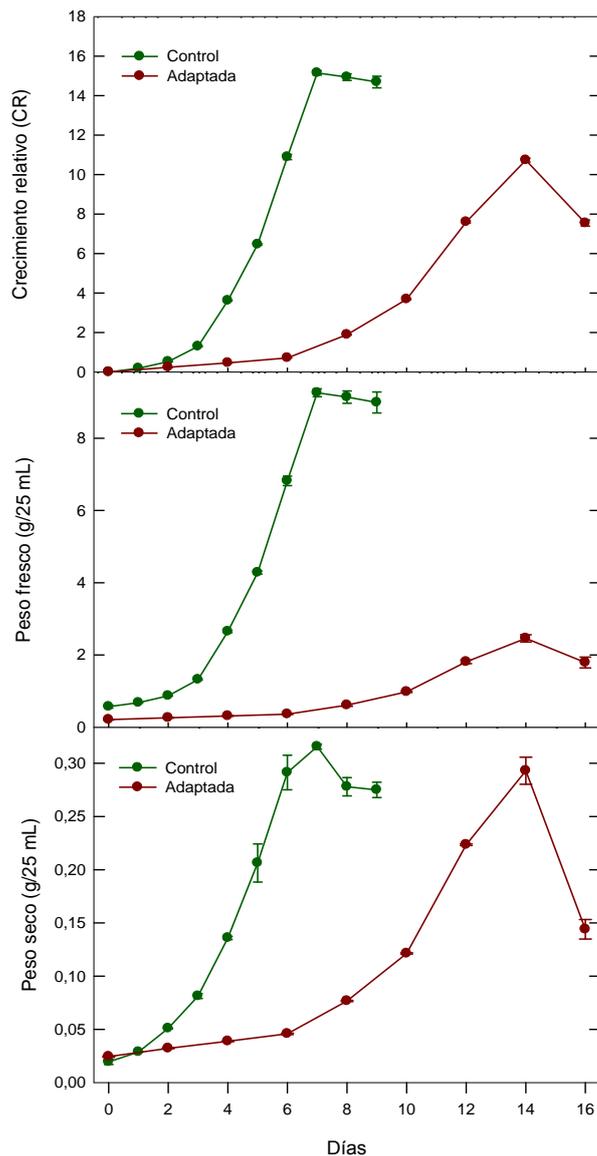
### **1. Mecanismos fisiológicos de adaptación a salinidad.**

#### **1.1. Parámetros de crecimiento.**

##### **1.1.1. Curvas de crecimiento.**

La Figura 31 muestra las curvas de crecimiento en base al crecimiento relativo, al peso fresco y al peso seco de las dos líneas celulares objeto de estudio. Debemos destacar, en primer lugar, el marcado efecto inhibitor provocado por la salinidad sobre el peso fresco, reduciéndose éste entorno a un 73% al final del ciclo de cultivo en la línea celular adaptada respecto al control. Este efecto inhibitor, sin embargo, no tiene lugar sobre el peso seco, alcanzando ambas líneas celulares valores similares para este parámetro en su punto máximo de crecimiento.

Para la línea celular control, el ciclo de cultivo se completa en 7 días reflejando el crecimiento relativo una típica curva sigmoidea con tres fases de crecimiento claramente diferenciadas: (1) una fase de latencia que corresponde a los dos primeros días tras el inicio del cultivo, (2) una fase de crecimiento exponencial entre los días tercero y séptimo y, por último, (3) una fase estacionaria en la que no se producen variaciones significativas de peso fresco pero sí de peso seco. Atendiendo a la curva de crecimiento relativo de la línea celular adaptada con respecto al control, podemos observar que se desplaza en el tiempo, completando el ciclo de cultivo al decimocuarto día y diferenciándose: (1) una fase de latencia más prolongada que comprende los seis primeros días de cultivo, (2) una fase de crecimiento exponencial, entre el sexto y el decimocuarto día de cultivo, no tan marcada como en la línea control y (3) una fase estacionaria inexistente dada la rápida caída en los valores tanto de peso fresco como de peso seco.

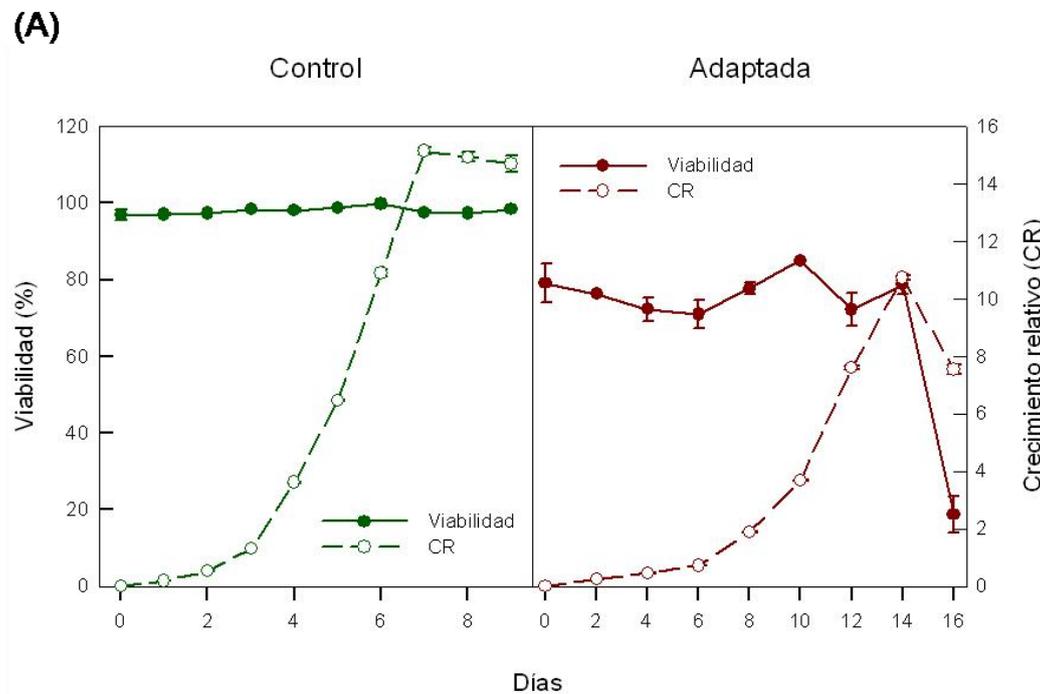


**Figura 31. Curvas de crecimiento.** Los gráficos muestran las curvas de crecimiento en base al crecimiento relativo, el peso fresco y el peso seco de las líneas celulares control y adaptada. Los datos representan los valores medios  $\pm$  error estándar,  $n=5$ .

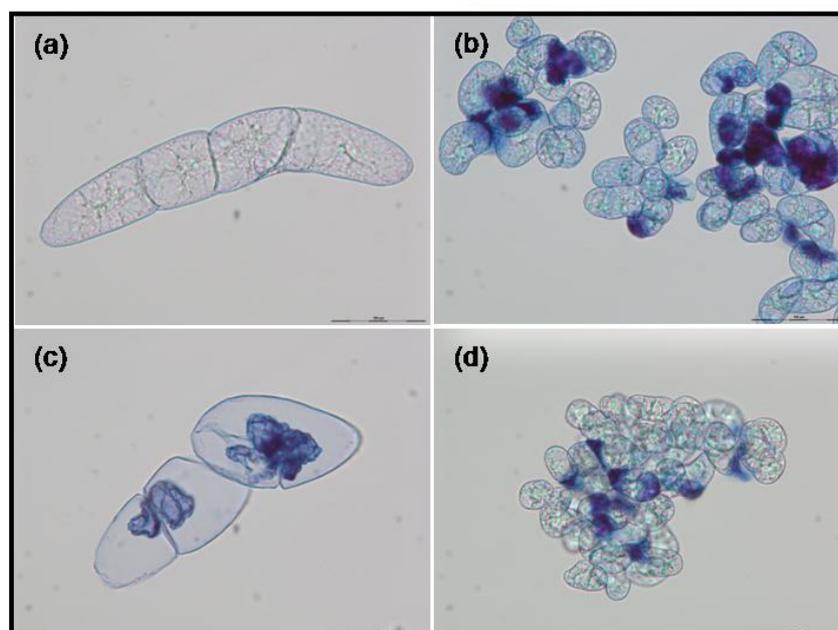
### 1.1.2. Viabilidad celular.

La viabilidad celular muestra un comportamiento diferente para ambas líneas a lo largo del ciclo de cultivo (Figura 32a). Mientras que para la línea celular control la viabilidad se mantiene estable con valores próximos al 100% durante todo el ciclo de cultivo, para la línea celular adaptada los valores oscilan entre el 70 y el 85% produciéndose una caída drástica una vez finalizada la fase de crecimiento exponencial. Este hecho explicaría la inexistencia de una fase estacionaria claramente diferenciada en la línea celular adaptada, al contrario de lo que sucede en la línea

control. La figura 32b muestra imágenes de células de ambas líneas teñidas con Evans Blue en las que se puede observar células viables y no viables (aquellas en las que no ha penetrado y sí ha penetrado el colorante respectivamente).



**(B)**

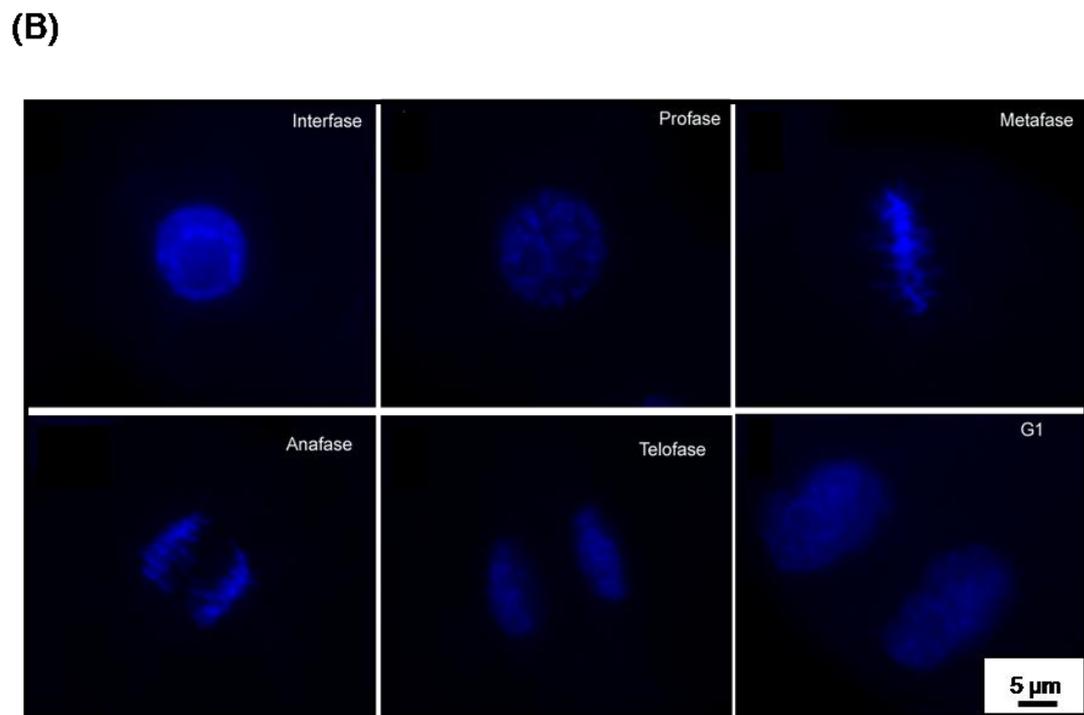
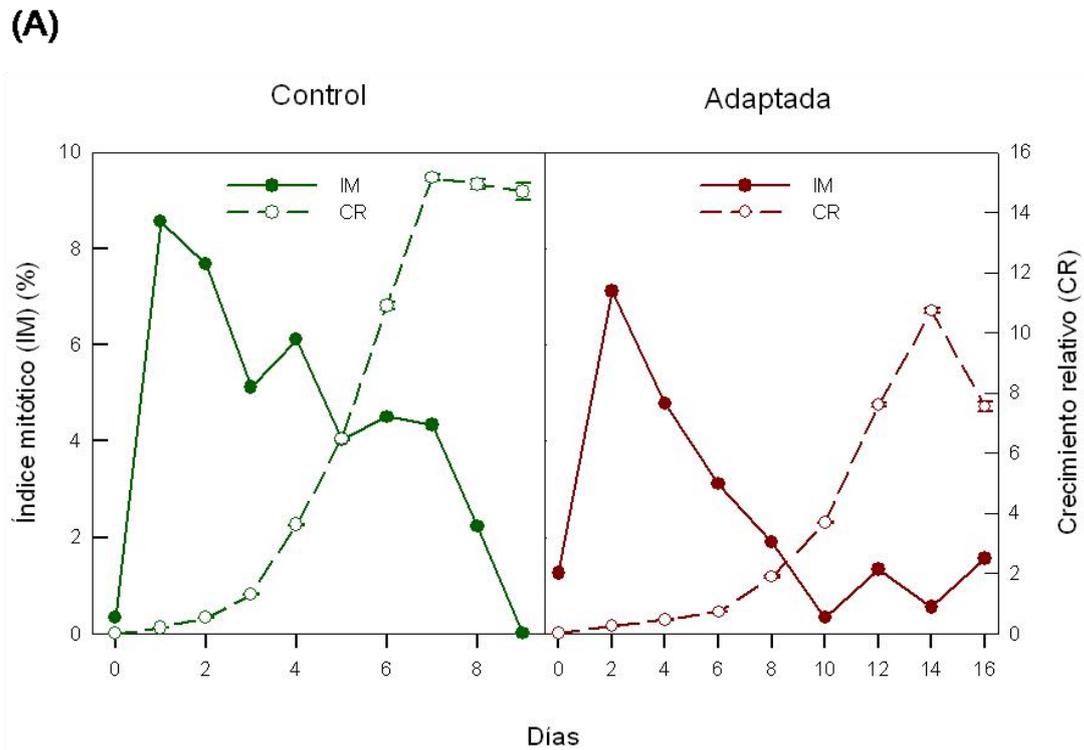


**Figura 32. Viabilidad celular.** (a) Evolución de la viabilidad celular a lo largo del ciclo de cultivo para las líneas control y adaptada. Los valores representan la media de 900 células diferentes. (b) Imágenes de microscopía óptica de campo claro mostrando células de ambas líneas teñidas con Evans Blue.

### 1.1.3. Índice mitótico.

La tinción nuclear con DAPI posibilita la observación de las distintas fases de mitosis (profase, metafase, anafase y telofase) y la cuantificación del índice mitótico (Figura 33). Las células en interfase se reconocen por presentar el ADN disperso y un nucléolo patente (en ocasiones las células BY-2 pueden presentar más de un nucléolo). Por el contrario, las células que se encuentran en fase de mitosis presentan los cromosomas condensados. En las células que se encuentran en profase la membrana nuclear desaparece y los cromosomas comienzan a condensarse. En metafase, los cromosomas se disponen en el eje ecuatorial celular. Durante la anafase el material genético se separa desplazándose a los polos opuestos de la célula. En telofase el ADN comienza a dispersarse y se organiza la membrana nuclear. Finalmente las dos células hermanas entran en fase G1 organizándose el nucléolo y produciéndose la citocinesis (Figura 33b).

En relación al seguimiento del índice mitótico (IM) a lo largo del ciclo de cultivo, la Figura 33a pone de manifiesto la existencia de una tendencia común en el comportamiento de este parámetro de crecimiento para las dos líneas celulares objeto de estudio. Al inicio del ciclo de cultivo se produce un rápido incremento en el IM hasta tomar valores máximos entorno al 8%. Este rápido incremento es seguido de un descenso gradual durante la fase de crecimiento exponencial hasta alcanzar los valores iniciales al final del ciclo de cultivo. Sin embargo, y a pesar de esta tendencia común, cabe destacar que durante la fase de crecimiento exponencial los valores del IM son mayores para la línea celular control respecto a la adaptada. Tomando como referencia los días 4 y 11 de ambas líneas celulares respectivamente, momento en que se encuentran en plena fase de crecimiento exponencial, los valores del IM para la línea celular control respecto a la adaptada resultaron muy superiores (6% frente a un 1,5%).



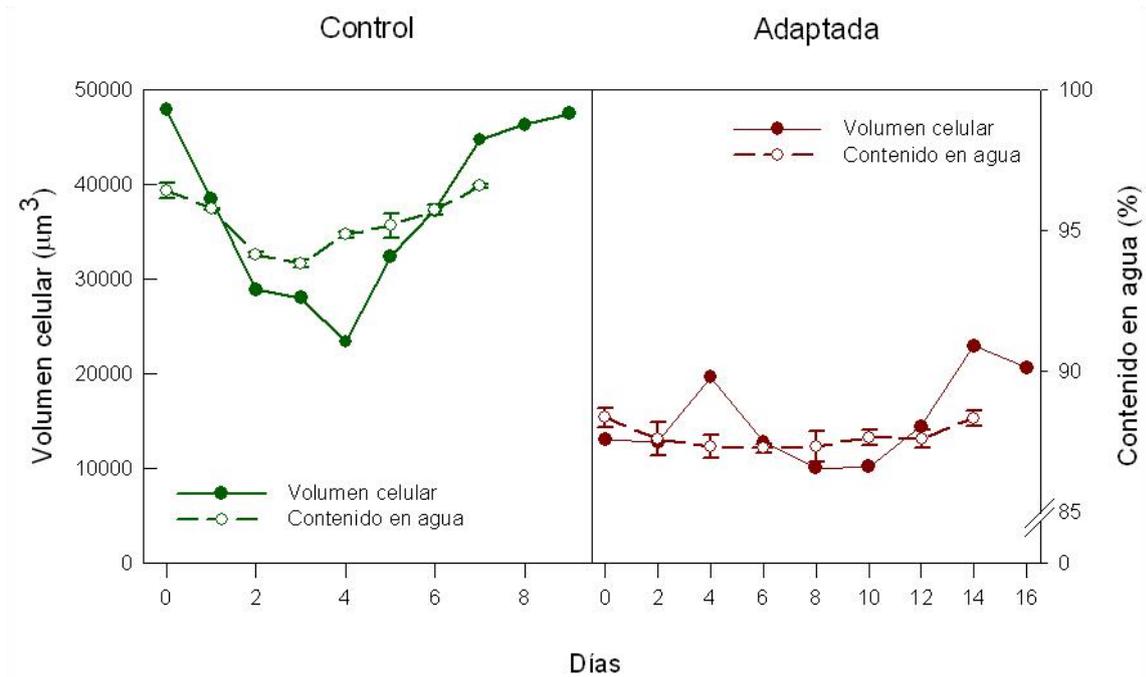
**Figura 33. Índice mitótico.** (a) Evolución del índice mitótico a lo largo del ciclo de cultivo para las líneas celulares control y adaptada. Los valores representan la media de 900 células diferentes. (b) Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando las diferentes fases de mitosis en células de las líneas objeto de estudio.

#### 1.1.4. Volumen celular.

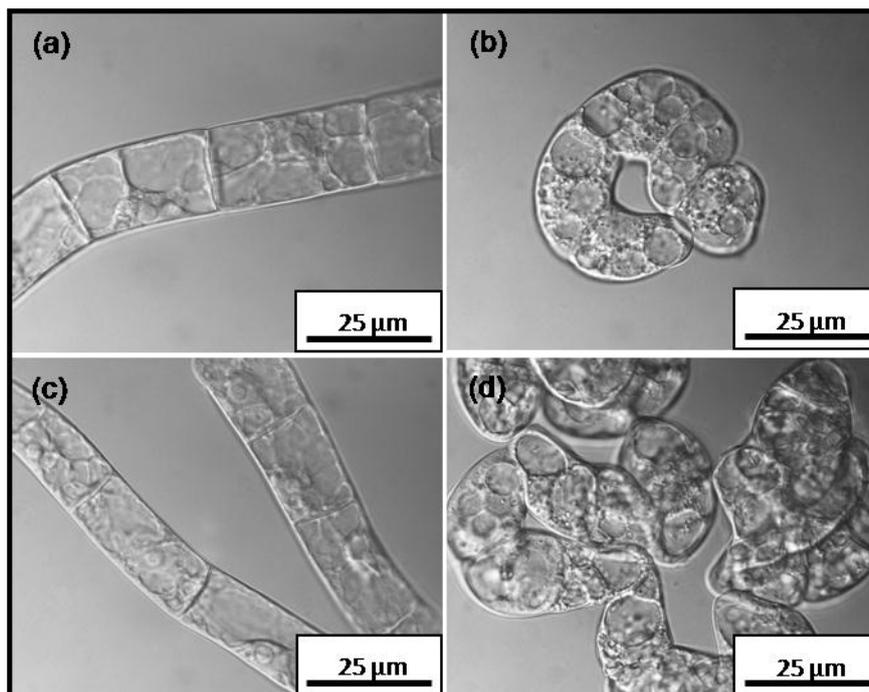
La Figura 34 muestra las diferencias en volumen celular y contenido en agua entre las líneas control y adaptada a lo largo del ciclo de cultivo. Estos resultados ponen de manifiesto que la disminución en el volumen celular resulta un factor determinante en el proceso de adaptación a salinidad en cultivos celulares BY-2. En este sentido, el volumen medio durante el ciclo de cultivo de las células control es de  $35117,25 \pm 8502,99 \mu\text{m}^3$  frente a las  $14480,25 \pm 4541,66 \mu\text{m}^3$  de las adaptadas a salinidad. Por otra parte, cabe destacar que el valor mínimo para el volumen celular en la línea control es de  $23374,00 \mu\text{m}^3$ , mientras que para la línea adaptada el valor máximo es de  $22951,00 \mu\text{m}^3$ . En cuanto al comportamiento de este parámetro de crecimiento a lo largo del ciclo de cultivo, cabe destacar que no resulta común para ambas líneas celulares. En el caso de la línea control, existe una tendencia muy marcada hacia la disminución del volumen celular durante la fase de latencia, cuando las células se encuentran más activas mitóticamente, para aumentar posteriormente de forma progresiva durante la fase de crecimiento exponencial hasta alcanzar los valores iniciales al final del ciclo de cultivo. En cuanto a la evolución del volumen celular en la línea adaptada, cabe destacar que resulta similar al control, dándose los menores valores a mitad de la fase de crecimiento exponencial.

Respecto al contenido en agua de la masa celular en ambas líneas, cabe señalar que si bien no experimenta grandes variaciones a lo largo del ciclo de cultivo los valores son ligeramente superiores en la línea control que en la línea adaptada. Por otra parte, el contenido en agua describe, en la línea control, un comportamiento paralelo al del volumen celular. En fase de latencia, con las células dividiéndose activamente y el volumen celular reduciéndose, el contenido en agua cae progresivamente hasta tomar los valores menores a mitad de la fase de crecimiento exponencial, momento a partir del cual comienza a aumentar al tiempo que lo hace el volumen celular. En el caso de la línea adaptada, el contenido en agua parece permanecer estable a lo largo de todo el ciclo de cultivo.

(A)



(B)



**Figura 34. Volumen celular.** (a) Evolución del volumen celular y el contenido en agua a lo largo del ciclo de cultivo para las líneas control y adaptada. Los valores representan la media de 900 células diferentes. (b) Imágenes de microscopía óptica CID mostrando células de ambas líneas en fase de crecimiento exponencial. (a) y (c) muestran células control, (b) y (d) células adaptadas.

## 1.2. Contenido iónico.

Las figuras 35 y 36 muestran la concentración de elementos minerales en la masa celular y en el medio de cultivo ( $\text{mg g}_{\text{ps}}^{-1}$  y  $\text{mg L}^{-1}$  respectivamente) de las líneas objeto de estudio. En la masa celular de la línea adaptada las concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  experimentan incrementos significativos en las diferentes fases del ciclo de cultivo con respecto al control, sin embargo, en el caso de  $\text{K}^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , sus concentraciones caen de forma significativa. Estas variaciones en la concentración de los elementos minerales no siempre se corresponden con la evolución de los mismos en el medio de cultivo correspondiente. A continuación, trataremos de forma individualizada el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que resultan los más relevantes para restablecer el equilibrio iónico en condiciones de estrés salino.

En relación al  $\text{Na}^+$ , para las células control se trata de un ion cuyas concentraciones permanecen estables a lo largo del ciclo de cultivo, sin embargo, en las células adaptadas se puede observar claramente su acumulación a medida que aumenta la masa celular. La determinación de  $\text{Na}^+$  en el medio de cultivo muestra la ausencia de este elemento mineral en el medio control mientras que en el medio salino los valores en la fase de latencia se corresponden aproximadamente a 15g/L de NaCl y aumentan de forma leve, aunque significativamente, en fase exponencial y estacionaria.

En cuanto al  $\text{Cl}^-$ , su concentración experimenta diferencias significativas entre la masa celular de ambas líneas en cada una de las diferentes fases de crecimiento. En fase de latencia los valores en la línea adaptada disminuyen con respecto al control, sin embargo, en fase estacionaria y principalmente en fase exponencial su concentración aumenta considerablemente. En el medio de cultivo control las concentraciones de este catión permanecen estables, con valores muy bajos durante todo el ciclo de cultivo. Los valores para el medio de cultivo salino se corresponden aproximadamente a 15 g/L de NaCl y sus ligeras variaciones en cada una de las fases de crecimiento parecen no correlacionarse con las de la masa celular.

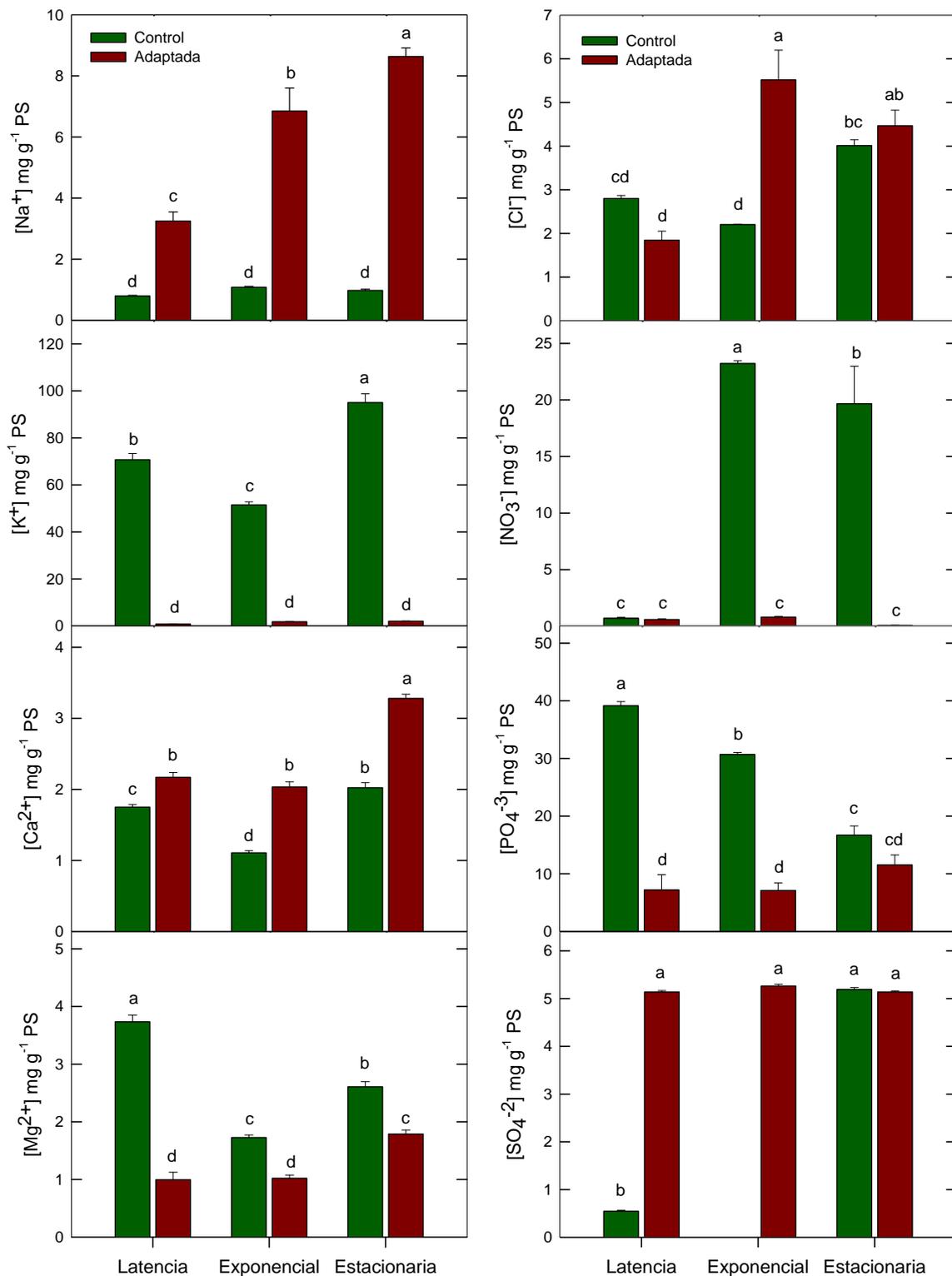
En el caso del  $\text{K}^+$ , la tendencia en la masa celular de la línea control es la acumulación a lo largo del ciclo de cultivo, lo que se correlaciona con su disminución progresiva en el medio de cultivo. Si atendemos a la línea celular adaptada, resultan llamativos los valores tan bajos que se dan en la masa celular en cada una de las tres fases de crecimiento, lo que hace que la concentración de este elemento mineral en el

medio de cultivo salino permanezca estable durante el ciclo con ligeras modificaciones significativas en la fase exponencial.

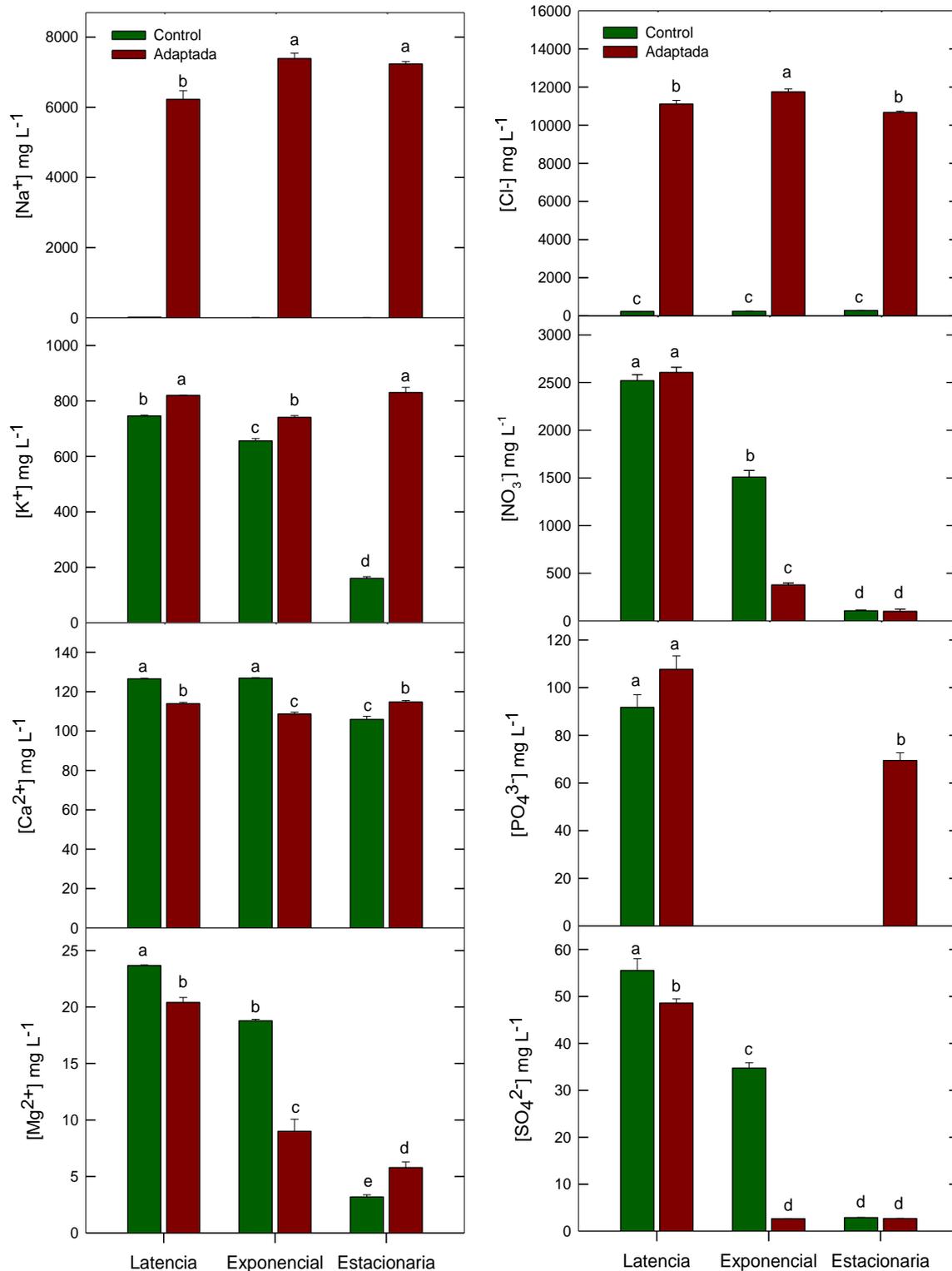
El  $\text{Ca}^{2+}$  es otro de los elementos minerales cuya concentración en la masa celular de ambas líneas muestra un incremento a lo largo del ciclo de cultivo, con valores significativamente superiores en la línea adaptada respecto al control en cada una de las fases de crecimiento. Esta observación se correlaciona con la disminución en su concentración en el medio de cultivo control en la fase de latencia, no sucediendo lo mismo en el medio salino.

### **1.3. Contenido en azúcares solubles.**

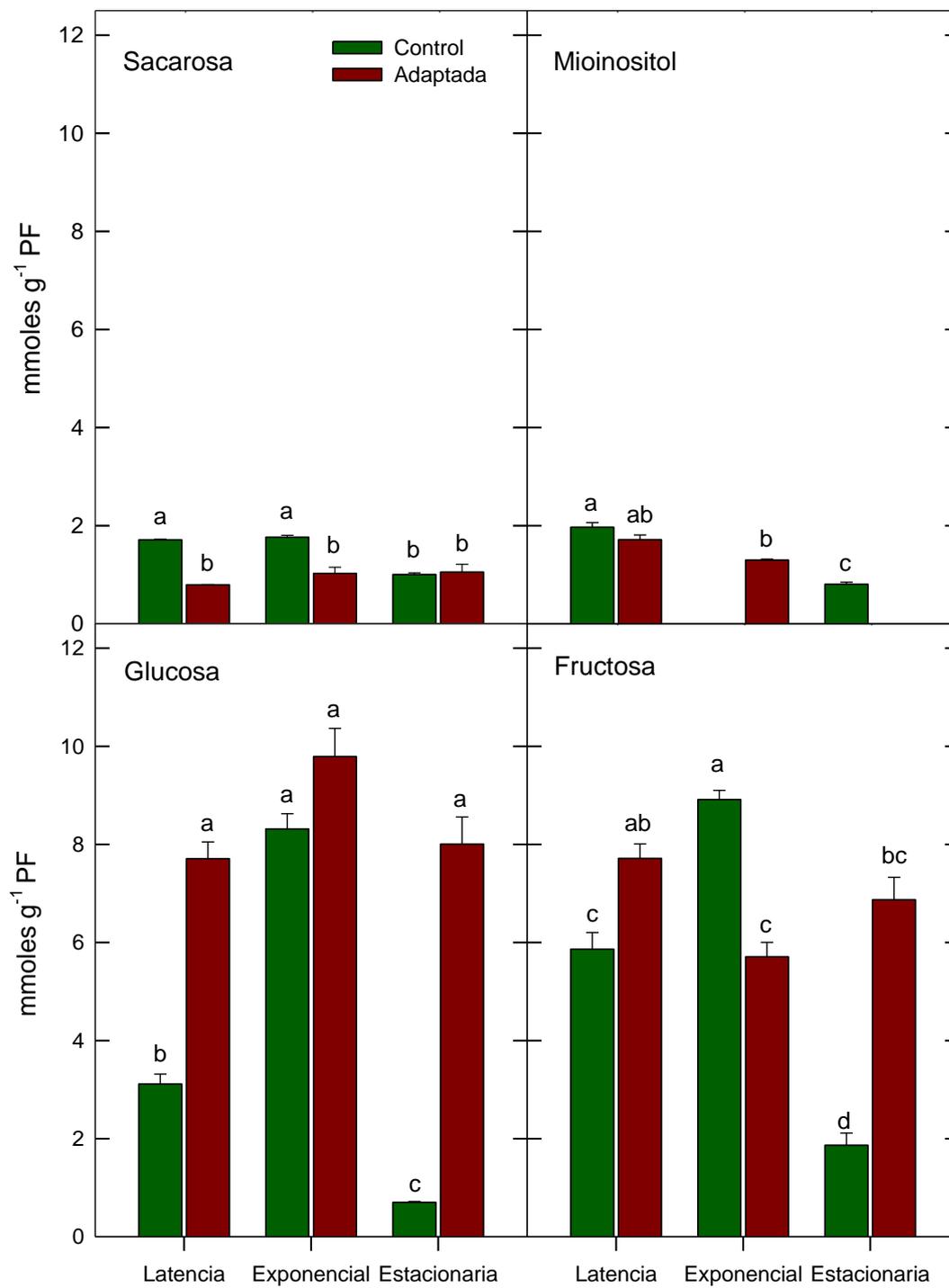
La Figura 37 muestra las concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y mioinositol ( $\text{mmoles g}_{\text{pf}}^{-1}$ ) para las líneas celulares control y adaptada en cada una de las fases del ciclo de cultivo. De estos cuatro azúcares, los mayoritarios en ambas líneas celulares son glucosa y fructosa. Las concentraciones de estos últimos en ambas líneas describen un comportamiento similar, con picos máximos en la fase exponencial, salvo en el caso de la fructosa para la línea adaptada. Sacarosa y mioinositol resultan minoritarios, mostrando concentraciones bajas, que en el caso del mioinositol resultan incluso no detectadas en la fase exponencial para la línea control y en la fase estacionaria para la línea adaptada con la metodología empleada. Si atendemos a las variaciones en la concentración de azúcares entre ambas líneas celulares, resulta evidente que tanto glucosa como fructosa parecen ser los que contribuyen en mayor medida al ajuste osmótico en condiciones de salinidad en cultivos celulares BY-2. En el caso de la glucosa, su concentración aumenta de forma significativa en las fases de latencia y exponencial, con lo que la concentración de este azúcar a lo largo del ciclo de cultivo permanece prácticamente estable con niveles muy superiores respecto a los que se dan en la línea control. En cuanto a la fructosa, el aumento en fase de latencia y estacionaria también resulta significativo, pero sin embargo, su concentración cae en fase exponencial. Por otra parte, tanto las concentraciones de sacarosa como las de mioinositol parecen caer, de forma significativa, en la línea adaptada con respecto al control, salvo en los casos de la fase estacionaria para la sacarosa y la fase exponencial para el mioinositol.



**Figura 35. Elementos minerales en la masa celular.** Los gráficos muestran la concentración de elementos minerales ( $\text{mg g}_{\text{ps}}^{-1}$ ) en la masa celular de las líneas celulares control y adaptada en las diferentes fases del ciclo de cultivo. Los datos representan los valores medios  $\pm$  error estándar,  $n=5$ . Letras diferentes representan diferencias significativas según el Test de Tukey ( $p<0,05$ ).



**Figura 36. Elementos minerales en el medio de cultivo.** Los gráficos muestran la concentración de elementos minerales ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en el medio de cultivo de las líneas celulares control y adaptada en las diferentes fases del ciclo de cultivo. Los datos representan los valores medios  $\pm$  error estándar,  $n=5$ . Letras diferentes representan diferencias significativas según el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 37. Azúcares solubles en la masa celular.** Los gráficos muestran la concentración de azúcares solubles (mmoles g<sub>pf</sub><sup>-1</sup>) en la masa celular de las líneas control y adaptada en las diferentes fases del ciclo de cultivo. Los datos representan los valores medios ± error estándar, n=5. Letras diferentes representan diferencias significativas según el Test de Tukey (p<0,05).

#### 1.4. Contenido en aminoácidos.

La Tabla 6 muestra las concentraciones de aminoácidos ( $\mu\text{mol g}_{\text{pf}}^{-1}$ ) en las líneas celulares control y adaptada en las diferentes fases del ciclo de cultivo. Los aminoácidos que experimentan incrementos estadísticamente significativos en su concentración en cada una de las fases del ciclo de cultivo en condiciones de salinidad son: Pro, Asn, Asp, Lys/Gln, Arg y Trp. De entre todos ellos, Pro y Asn son los que experimentan mayores incrementos, seguidos por Arg y Trp. Resulta llamativo que en el caso de Pro y Trp sus concentraciones no fueran detectadas en ninguna de las fases del ciclo de cultivo en la línea celular control para pasar posteriormente, en condiciones de estrés salino, a tomar valores tan elevados en la línea adaptada, principalmente Pro. No en vano, la bibliografía apunta a la prolina como uno de los principales osmolitos compatibles sintetizados por las plantas para hacer frente al estrés osmótico ocasionado por las elevadas concentraciones salinas. Los aminoácidos cuya concentración disminuye de forma significativa en las distintas fases de crecimiento tras el tratamiento salino son Gly, Ala y Ser. Otros aminoácidos, como Cys, Glu y Cistina, no experimentan variaciones significativas en su concentración.

**Tabla 6. Concentración de aminoácidos en la masa celular.** La tabla muestra la concentración de aminoácidos ( $\mu\text{mol g}_{\text{pf}}^{-1}$ ) en la masa celular de las líneas control y adaptada en las diferentes fases del ciclo de cultivo. Los datos representan los valores medios  $\pm$  error estándar,  $n=5$ . Las medias dentro de cada fila con letras diferentes representan diferencias significativas según el Test de Tukey ( $p<0,05$ ). Determinados aminoácidos fueron detectados pero no se pudieron cuantificar (n.c.) debido a que su concentración se encontraba por debajo de los límites de la curva establecida.

	Control			Adaptada		
	Latencia	Exponencial	Estacionaria	Latencia	Exponencial	Estacionaria
<b>Aminoácidos</b>						
Gly	19,82 $\pm$ 1,11b	33,69 $\pm$ 3,04a	14,99 $\pm$ 0,44bc	6,64 $\pm$ 0,37d	11,22 $\pm$ 0,94cd	6,24 $\pm$ 0,39d
Ala	n.c.	139,37 $\pm$ 18,03a	138,25 $\pm$ 21,97a	n.c.	80,14 $\pm$ 11,65b	76,83 $\pm$ 3,58b
Ser	3,17 $\pm$ 0,26b	2,71 $\pm$ 0,80b	10,84 $\pm$ 0,15a	2,94 $\pm$ 0,25b	n.c.	n.c.
Pro	n.c.	n.c.	n.c.	65,74 $\pm$ 0,82c	100,63 $\pm$ 1,43b	107,58 $\pm$ 1,86a
Val	61,95 $\pm$ 1,50d	144,33 $\pm$ 7,22ab	130,73 $\pm$ 3,02b	85,66 $\pm$ 2,23c	151,01 $\pm$ 3,87a	130,73 $\pm$ 3,02b
Thr	1,41 $\pm$ 0,22c	7,02 $\pm$ 0,37b	10,80 $\pm$ 0,69a	11,47 $\pm$ 0,45a	6,44 $\pm$ 0,51b	n.c.
Cys	206,01 $\pm$ 4,64a	111,94 $\pm$ 6,22b	34,03 $\pm$ 1,50c	213,24 $\pm$ 1,80a	115,69 $\pm$ 5,81b	44,26 $\pm$ 1,93c
Ile/Leu	125,33 $\pm$ 2,88d	302,30 $\pm$ 4,89b	396,89 $\pm$ 18,78a	369,01 $\pm$ 15,44 <sup>a</sup>	289,14 $\pm$ 5,17b	209,82 $\pm$ 8,33c
Asn	96,46 $\pm$ 4,13c	74,04 $\pm$ 1,96d	25,93 $\pm$ 1,48f	179,98 $\pm$ 2,89a	120,34 $\pm$ 1,06b	42,69 $\pm$ 1,73e
Asp	7,36 $\pm$ 0,41b	4,15 $\pm$ 0,11c	n.c.	17,87 $\pm$ 1,00a	9,49 $\pm$ 0,41b	2,53 $\pm$ 0,01cd
Lys/Gln	10,59 $\pm$ 0,27cd	6,05 $\pm$ 0,26d	18,02 $\pm$ 0,76b	27,75 $\pm$ 1,13a	20,06 $\pm$ 1,49b	11,78 $\pm$ 1,29c
Glu	n.c.	n.c.	n.c.	1,04 $\pm$ 0,20a	n.c.	n.c.
Met	2,74 $\pm$ 0,18c	3,63 $\pm$ 0,36bc	5,37 $\pm$ 0,55a	3,31 $\pm$ 0,21c	6,22 $\pm$ 0,38a	5,17 $\pm$ 0,45ab
His	n.c.	n.c.	n.c.	0,82 $\pm$ 0,17a	0,75 $\pm$ 0,25a	n.c.
Phe	n.c.	n.c.	n.c.	5,92 $\pm$ 0,35a	2,01 $\pm$ 0,33b	n.c.
Arg	11,23 $\pm$ 0,48e	18,47 $\pm$ 1,23de	21,54 $\pm$ 1,22d	69,13 $\pm$ 2,09c	83,84 $\pm$ 2,88b	95,32 $\pm$ 3,12a
Tyr	n.c.	n.c.	n.c.	2,02 $\pm$ 0,32a	n.c.	n.c.
Trp	n.c.	n.c.	n.c.	38,87 $\pm$ 1,19a	28,27 $\pm$ 1,29b	21,77 $\pm$ 1,95c
Cistina	90,42 $\pm$ 6,24a	96,09 $\pm$ 3,45a	96,67 $\pm$ 7,40a	59,00 $\pm$ 3,04b	85,25 $\pm$ 2,69a	86,99 $\pm$ 3,85a

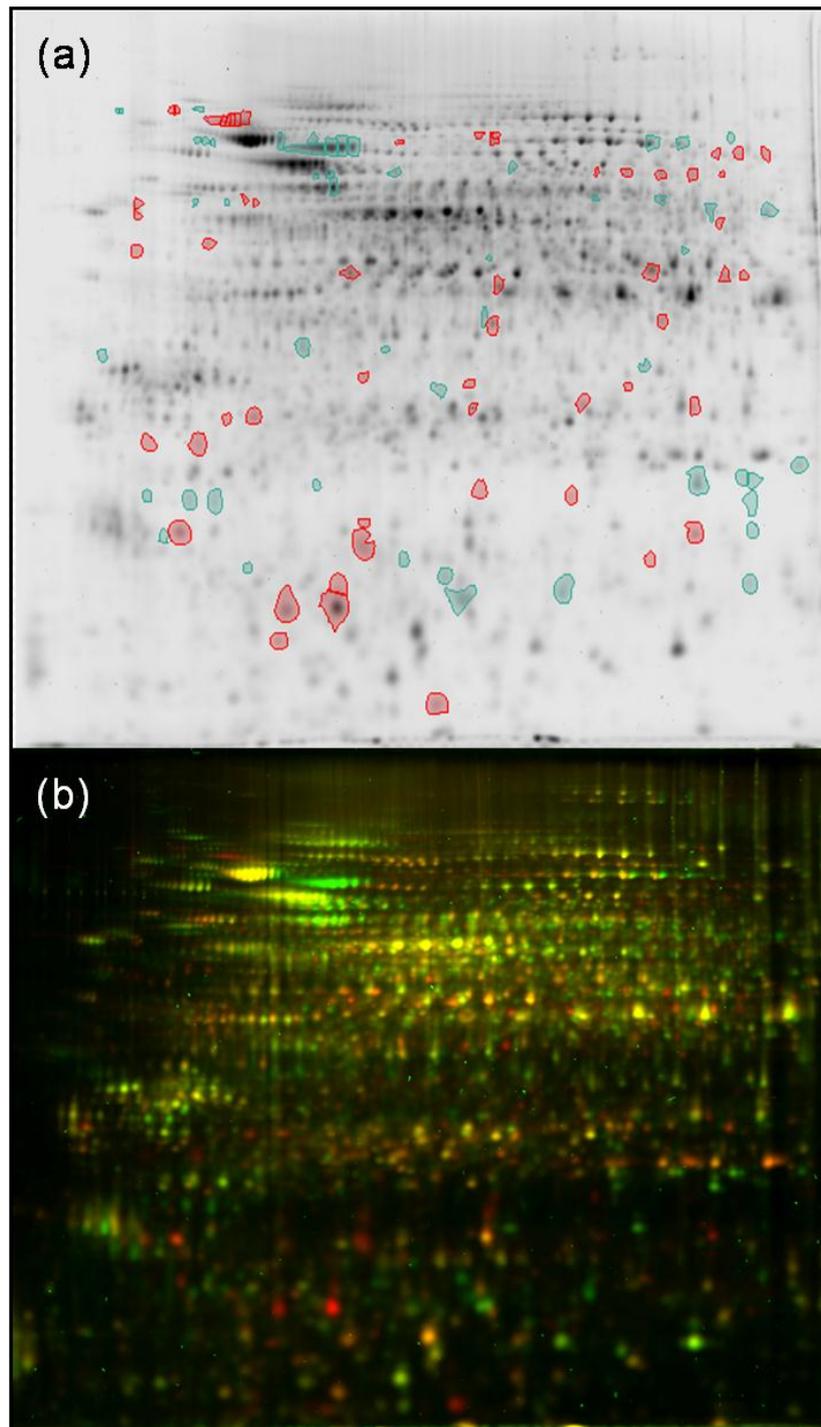
### 1.5. Análisis proteómico.

El análisis proteómico de muestras de ambas líneas celulares en fase de crecimiento exponencial, mediante electroforesis bidimensional diferencial en gel (2D-DIGE), permitió detectar un total de 1931 spots. La Tabla 7 refleja el número de proteínas que mostraron incrementos diferenciales en su expresión por encima de 2, 3,5, 5 y 8 veces.

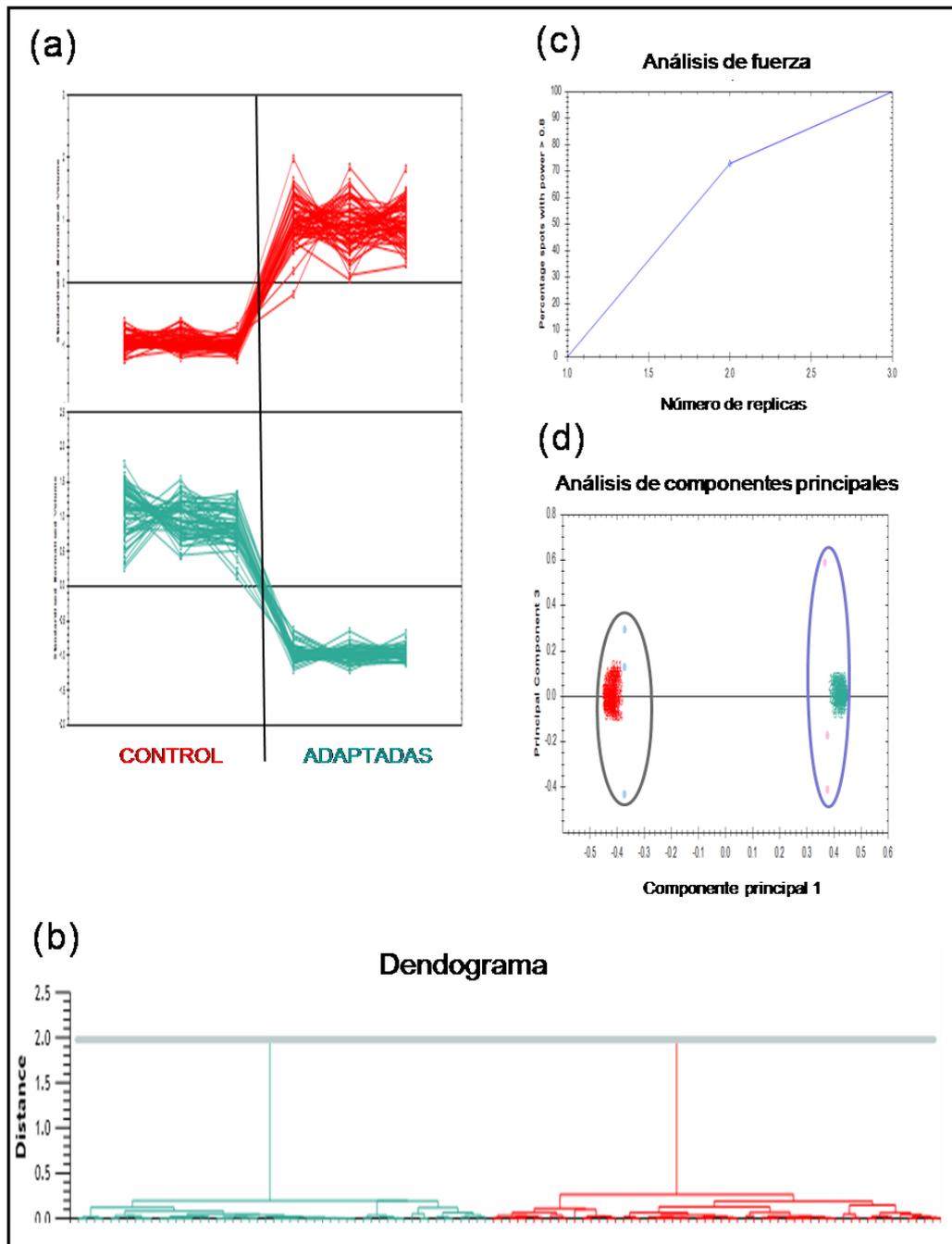
**Tabla 7. Número de proteínas expresadas de forma diferencial en la línea celular adaptada respecto al control.** En todos los casos FDR < 0,01.

Cambio	Número de proteínas	Nº de proteínas sobreexpresadas	Nº de proteínas inhibidas
≥2	351	183	168
≥3,5	107	56	51
≥5	54	31	23
≥8	16	9	7

Se seleccionaron aquellas proteínas de la línea celular adaptada con incrementos diferenciales en su expresión superiores a 3,5. La selección de los spots se muestra en la Figura 38 y los análisis estadísticos complementarios en la Figura 39. De entre las proteínas seleccionadas, 9 spots no pudieron ser analizados por su baja concentración y 51 spots no mostraron homologías con las bases de datos utilizadas. Finalmente, 47 proteínas fueron identificadas por las bases de datos (Tabla 8). La chaperona HSP90-3 (GI:260100692) se encontró en 4 spots diferentes, la chaperona HSP90-1 (GI:350535174) en 3 spots, el factor de homeostasis de cobre en 2 spots (GI:13605758) y la fosfoglucomutasa citosólica (GI:40233152) se localizó en otros 2 spots diferentes. Así mismo, la enzima metionina sintasa también fue localizada en 3 spots diferentes (GI:8439545, GI:257676155, GI:115361539), aunque en este caso parecen corresponder a distintas isoformas.



**Figura 38. 2D-DIGE obtenido a partir de muestras de las líneas celulares control y adaptada en fase de crecimiento exponencial.** (a) Gel en el que se muestran los puntos identificados, un total de 1931. Los seleccionados corresponden a proteínas que mostraron expresión diferencial por encima de 3,5, un total de 107 (el color rojo corresponde a proteínas de la línea celular control; el color verde corresponde a proteínas de la línea celular adaptada). (b) Ejemplo de imagen de fluorescencia del gel teñido con los fluorocromos Cy2, Cy3 y Cy5 utilizando un equipo Typhoon 9410.



**Figura 39. Análisis estadísticos complementarios al 2D-DIGE para las proteínas que mostraron una expresión diferencial por encima de 3,5.** (a) Perfiles de expresión estandarizados agrupados en dos clusters. (b) Dendrograma elaborado con Progenesis SameSpots v4.0 mostrando el agrupamiento jerárquico de los puntos. (c) Análisis de fuerza. Indica el número de repeticiones necesarias para lograr una fuerza del 80%, lo que representa el umbral para aceptar el cambio significativo en la expresión de las proteínas.  $FDR < 0,00632$  (0-1 puntos). (d) Análisis de componentes principales (ACP) de los diferentes grupos experimentales. El componente principal 1 explica por sí mismo el 95,26% de la variabilidad de los puntos seleccionados. Los componentes 2 y 3 explican el 1,71% y el 1,27% respectivamente.

**Tabla 8. Proteínas identificadas que mostraron incrementos diferenciales en su expresión por encima de 3,5 en células de la línea adaptada en fase de crecimiento exponencial. Las proteínas aparecen clasificadas de acuerdo a su función biológica.**

Punto	Cambio	ANOVA (pValue)	Similitud proteica	Número de acceso GI	pl	Organismo correspondiente	Resultados	Número de péptidos emparejados	Clasificación funcional
593	8,5	1,64E-05	Chaperona molecular HSP90-3	260100692	4,80	<i>N. benthamiana</i>	128,3	9	Grupo 6
594	7,9	0,0003423	Heat shock protein 81-2	332009329	4,81	<i>A. thaliana</i>	30,2	2	Grupo 6
697	3,7	0,0073694	Delta-1-pirrolin-5-carboxilato sintetasa	302701824	5,72	<i>N. tabacum</i>	33,5	2	Grupo 1
718	-4,6	0,0041518	Proteína 14-3-3 c-2	219911726	4,67	<i>N. tabacum</i>	38,8	2	Grupo 10
738	4,1	0,0029963	Transcetoalasa plastidial	194396261	5,78	<i>N. tabacum</i>	48,4	2	Grupo 2
752	-3,9	2,65E-05	Metionina sintasa	8439545	6,36	<i>N. suaveolens</i>	237,3	13	Grupo 1
753	-5,9	0,0007190	Metionina sintasa	257676155	6,48	<i>S. tuberosum</i>	49,4	3	Grupo 1
766	-6,8	6,04E-05	Chaperona molecular HSP90-3	260100692	5,25	<i>N. benthamiana</i>	53	4	Grupo 6
767	-21,8	4,11E-05	Chaperona molecular HSP90-3	260100692	5,17	<i>N. benthamiana</i>	119,2	8	Grupo 6
768	-14,4	1,56E-05	Chaperona molecular HSP90-3	260100692	5,21	<i>N. benthamiana</i>	98,3	8	Grupo 6
801	6,4	0,0001213	Chaperona molecular HSP90-1	350535174	6,62	<i>S. lycopersicum</i>	54,2	3	Grupo 6
809	4,2	0,0024432	Metionina sintasa	115361539	6,70	<i>N. suaveolens</i>	155	6	Grupo 1
904	3,8	0,0016822	2-hidroxiacil-CoA liasa	356500972	6,17	<i>G. max</i>	31,4	2	Grupo 1
915	5,6	0,0001455	Fosfoglucomutasa citosólica	40233152	6,52	<i>P. tomentosa</i>	58,8	4	Grupo 2
923	-5,3	0,0002777	Heat shock protein 90	371940442	5,15	<i>U. pertusa</i>	28,9	2	Grupo 6
924	5,8	0,0092721	Fosfoglucomutasa citosólica	40233152	6,41	<i>P. tomentosa</i>	62,4	4	Grupo 2
1048	-3,6	0,0012147	6-fosfofructokinasa	222855504	6,16	<i>P. trichocarpa</i>	62,8	4	Grupo 2
1073	-4,4	0,0059769	Cadena de tubulina $\beta$ -1	356528292	4,78	<i>G. max</i>	21,8	2	Grupo 9
1123	-6,3	1,79E-05	Alcohol deshidrogenasa 2	113379	6,58	<i>S. tuberosum</i>	111,6	7	Grupo 2
1322	-5,0	1,82E-05	Supuesta ATP sulfurilasa 2	118487298	6,49	<i>P. trichocarpa</i>	22,4	2	Grupo 1
1419	4,2	0,0033124	Glutamato deshidrogenasa B	15222633	6,72	<i>N. plumbaginifolia</i>	63	4	Grupo 1
1458	4,9	0,0006273	$\alpha$ -1,4-glucano sintasa 1	300162942	5,80	<i>S. moellendorffii</i>	84	5	Grupo 9
1680	11,1	0,00035236	Supuesta dihidropicolinato reductasa	224117678	5,37	<i>P. trichocarpa</i>	126	3	Grupo 1
1822	-4,3	0,0003375	Supuesta 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa	255642211	5,58	<i>G. max</i>	56,6	3	Grupo 1
1869	6,3	0,00517745	GTP-proteína de union nuclear Ran-B1	1172836	6,53	<i>N. tabacum</i>	64	3	Grupo 8
2041	-6,4	0,0001580	Dehidroascorbato reductasa	28192427	6,93	<i>N. tabacum</i>	150,8	8	Grupo 11
2103	-6,7	0,0008928	Proteína ribosomal 40S SA	356559157	4,47	<i>G. max</i>	29,4	2	Grupo 5
2105	14,0	2,03E-05	Heat shock protein citosólica Clase II 17.5	255630889	6,07	<i>G. max</i>	21,1	1	Grupo 6
2179	5,2	0,0003148	Factor de homeostasis de cobre	13605758	4,60	<i>A. thaliana</i>	60,4	2	Grupo 11
2182	8,1	0,0001172	BTF3	121551087	6,54	<i>C. annuum</i>	51	3	Grupo 4
2236	-5,4	0,0001722	Heat shock protein citosólica Clase I 3A	300827454	5,44	<i>N. tabacum</i>	32,5	2	Grupo 6
2240	6,3	0,0039961	Ribonucleasa UK114-like	356567350	6,37	<i>G. max</i>	25,7	2	Grupo 10
2269	-4,5	0,0005352	Proteína ribosomal 40S S12	224032317	5,60	<i>Z. mays</i>	21,8	2	Grupo 5
2286	-6,9	5,79E-05	Supuesta ACD_SchSP26	255630889	6,74	<i>G. max</i>	22,6	1	Grupo 6
2306	-7,4	1,46E-05	Heat shock protein 1 Clase II	259123935	6,04	<i>Prunus salicina</i>	34,5	2	Grupo 6
2387	4,9	7,29E-05	Proteína de union a ARN rica en glicina	187373099	4,97	<i>N. tabacum</i>	42,3	3	Grupo 4
2596	-4,5	0,0057432	Chaperona molecular HSP90-1	350535174	4,38	<i>S. lycopersicum</i>	59,2	4	Grupo 6
2610	9,3	0,0002671	Heat shock protein	355519208	4,79	<i>Medicago truncatula</i>	97,6	6	Grupo 6
2612	5,5	0,0005767	Chaperona molecular HSP90-1	350535174	4,77	<i>N. benthamiana</i>	52,5	3	Grupo 6
2631	-6,2	0,0002099	Supuesta Heat shock protein	307108390	4,97	<i>Chlorella variabilis</i>	28	2	Grupo 6
2638	-14,9	2,19E-07	Heat shock protein	355519208	5,14	<i>Medicago truncatula</i>	71	5	Grupo 6
2642	-4,8	0,0025194	Heat shock protein 90-2	81074298	5,09	<i>Solanum tuberosum</i>	75,5	5	Grupo 6
2739	-5,0	0,0027350	Proteína de unión a GTP	7643796	6,81	<i>C. annuum</i>	173,5	11	Grupo 12
3061	-4,1	0,0009086	Cisteína sintasa	295421001	5,74	<i>N. tabacum</i>	89,2	6	Grupo 1
3127	-4,0	0,0014351	Factor de homeostasis de cobre	13605758	4,53	<i>A. thaliana</i>	36,4	2	Grupo 11
3133	5,6	0,0001609	Supuesta Proteína de Ensamblaje de Nucleosoma (NAP)	326503006	4,33	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	26	2	Grupo 3
3152	7,9	0,000837	Supuesta chaperonina tipo GroEL	222837676	5,16	<i>P. trichocarpa</i>	30,2	2	Grupo 6

Una vez identificadas, las proteínas se clasificaron en diferentes grupos funcionales siguiendo la clasificación propuesta por Duby y col. (2010) para el proteoma de las células de tabaco BY2. En este sentido, la Figura 40 muestra las diferentes categorías de la clasificación funcional con indicación del porcentaje de proteínas identificadas que corresponden a cada grupo. El más abundante fue el Grupo 6 (Almacenamiento y direccionamiento de proteínas), representando el 38,30% del total de las proteínas identificadas. Dentro de este grupo se encuentran las chaperonas, implicadas en el plegamiento de otras proteínas, a las que pertenecieron todas las proteínas identificadas. El siguiente grupo en abundancia fue el Grupo 1 (Metabolismo de aminoácidos, azufre y lípidos), con un 21,28% del total. Finalmente, el tercer grupo más representado fue el Grupo 2 (Mecanismos energéticos celulares), con un 10,64% del total.

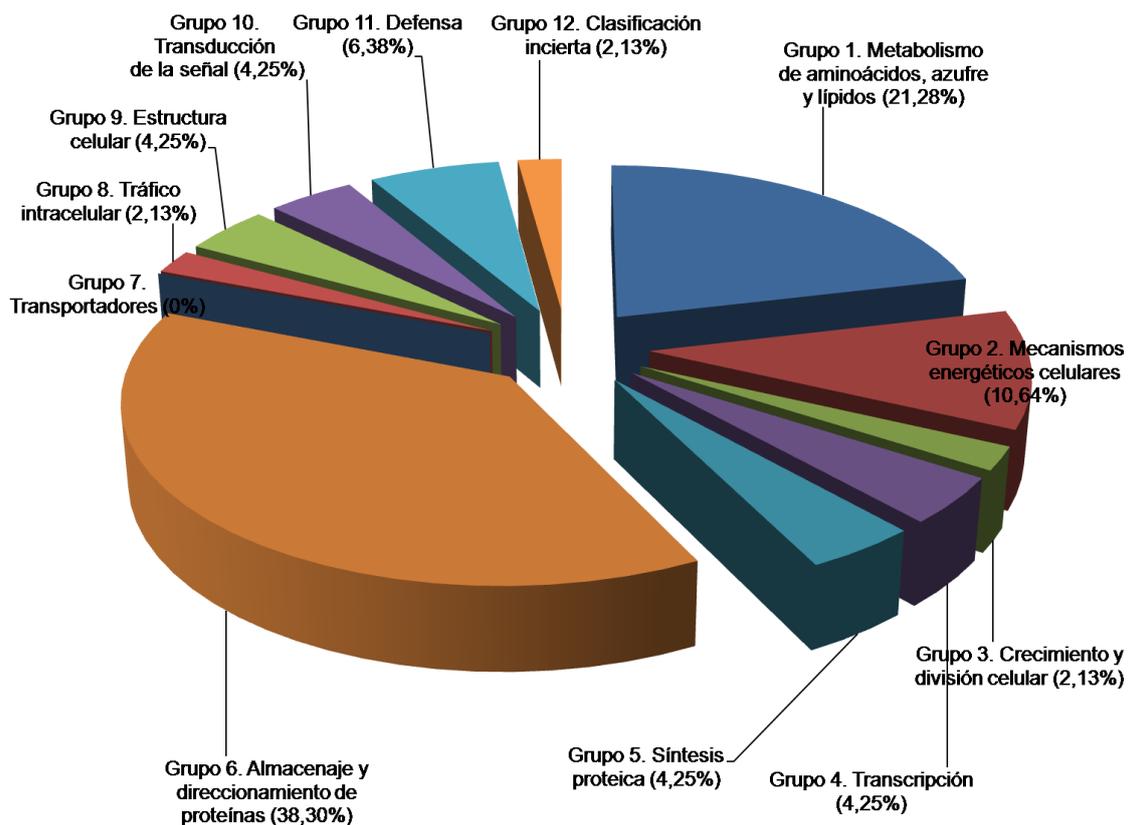
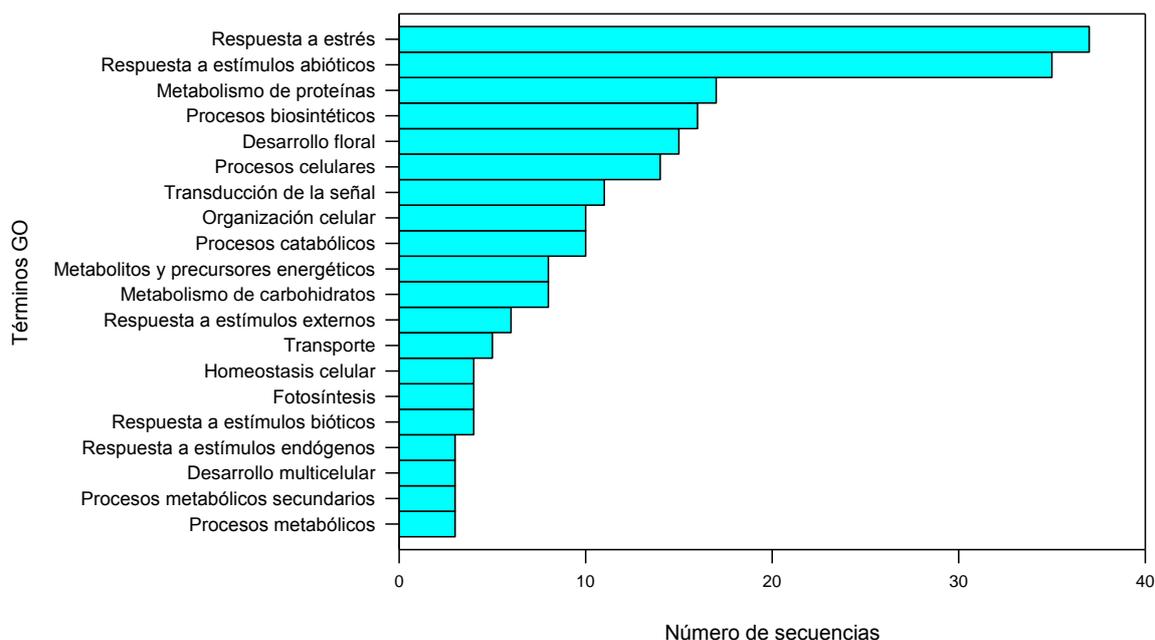


Figura 40. Clasificación funcional de las proteínas identificadas según Duby y col. (2010).

En cuanto a los niveles de expresión, la chaperona HSP90-3 fue la que presentó una mayor inhibición (-21,8 veces). Sin embargo, tal y como se ha comentado anteriormente, esta proteína estaba presente en 4 spots, mostrando inhibición en 3 de ellos y estando inducida (8,5 veces) en el restante. Estas variaciones pueden ser debidas a modificaciones post-transduccionales que modifican la estructura de la proteína. El spot correspondiente a HSP90-3 que muestra una inducción positiva (spot 593) presenta una variación aproximada en el gel 2D-DIGE de 0,4 unidades en el pI con respecto a los otros 3 spots restantes (spots 766, 767, 768), hecho que podría ser explicado por las alteraciones post-transduccionales citadas con anterioridad. La proteína que mostró mayor inducción (14 veces) fue otra chaperona de bajo peso molecular, la HSP citosólica CII 17,5 (spot 2105). Así mismo, la proteína NAP1 (spot 3133) se encontraba inducida (5,6 veces) y aunque en la Tabla 8 está clasificada dentro del Grupo 3, recientemente se ha comprobado que actúa como una chaperona de histonas regulando el plegamiento del nucleosoma. Otra proteína inducida de forma significativa (3,7 veces) fue la Delta-1-pirrolin-5-carboxilato sintetasa, enzima clave en la síntesis de prolina.

Por último, se analizaron los grupos según su función biológica mediante su clasificación por términos GO utilizando el software Blast2GO. En la Figura 41 se muestra la diferente abundancia de los términos GO. En este análisis, no se ha diferenciado entre proteínas sobreexpresadas o inhibidas, sino que se ha analizado su variación absoluta. Tal y como muestra el gráfico, el grupo más abundante se corresponde con el de respuesta a estrés, donde se encuentran incluidas las chaperonas. Así mismo, el segundo grupo en abundancia corresponde a proteínas de respuesta a estímulos abióticos, como el estrés salino. Los siguientes grupos más abundantes corresponden a procesos metabólicos y de biosíntesis.



**Figura 41. Clasificación funcional de las proteínas identificadas en base a los términos GO.**

### 1.6. Análisis transcriptómico.

El análisis transcriptómico ha permitido conocer los cambios inducidos por el estrés salino en la expresión de genes. En este sentido, la Tabla 9 refleja el número de genes de la línea celular adaptada en fase de crecimiento exponencial que mostraron variaciones significativas en su expresión por encima de 2, 4, 6, 8 y 10 veces con respecto al control. Así mismo, la Tabla 10 muestra una selección de genes expresados de forma diferencial en la fase de crecimiento citada anteriormente y agrupados según una clasificación funcional en la que se diferencian las siguientes categorías: metabolismo de prolina, transporte de  $\text{Na}^+$ , transporte de  $\text{K}^+$ , metabolismo y señalización de ABA, retículo endoplasmático y endocitosis, proteínas nucleares y división celular, chaperonas, transporte electrónico mitocondrial, enzimas antioxidantes, proteínas de transferencia de lípidos, metabolismo del etileno, metabolismo de giberelinas, síntesis de tocoferol, ribosomas y síntesis de proteínas, proteosoma, proteasas, proteínas ricas en prolina, modificación de la pared celular, ruta de las pentosas fosfato, glicolisis y otros. Debido al gran número de genes que mostraron una variación significativa en su expresión, se ha incluido un archivo Excel adicional (ver CD adjunto) con todos los que experimentaron un cambio superior a 2 veces con  $\text{FDR} < 0,01$  y  $p < 0,05$ .

**Tabla 9. Número de genes expresados de forma diferencial en la línea celular adaptada respecto al control.** En todos los casos  $FDR < 0,01$  y  $p < 0,05$ .

Cambio	Número de genes	Nº de genes sobreexpresados	Nº de genes inhibidos
≥2	7182	3688	3494
≥4	2285	1209	1076
≥6	1422	754	668
≥8	1056	567	489
≥10	843	451	392

Dado que Affymetrix no dispone comercialmente de este microarray, las anotaciones de los genes han sido realizadas por los autores del mismo (Edwards y col., 2010). Sin embargo, estas anotaciones no se encuentran disponibles en un formato compatible con los programas utilizados habitualmente para el análisis bioinformático de microarrays. Por ello, para realizar un estudio comprensivo de los resultados obtenidos, los datos fueron analizados siguiendo dos aproximaciones diferentes.

En primer lugar, se utilizó el software Blast2GO (Ashburner y col., 2000), volviendo a anotar las 7182 secuencias que correspondían a genes que experimentaron variaciones significativas superiores a 2 veces y obteniendo los términos GO más abundantes para estas anotaciones. De estas 7182 secuencias se pudieron anotar un total de 3538. En la Figura 42 se muestran los 20 términos GO más abundantes presentes en el total, suma de los genes inducidos e inhibidos. En este análisis, el grupo más abundante en todos los casos fue el de los genes implicados en procesos de óxido-reducción, tal es el caso de los que codifican para proteínas de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Así mismo, los genes pertenecientes al grupo de respuesta al estrés salino se encuentran entre los más numerosos en todos los casos, resultando este grupo ligeramente superior en la familia de genes inducidos. Por otra parte, abundan los términos GO correspondientes a respuesta a otros tipos de estrés como el provocado por frío o calor, el hídrico y el oxidativo. Entre los términos GO también fueron abundantes las secuencias que codifican para proteínas implicadas en el plegamiento proteico, caso de las chaperonas. Entre las familias de genes que mostraron una mayor variación entre inducción e inhibición se encuentra el grupo de

respuesta al ABA. Así, el número de genes de este grupo en los que se indujo su expresión fue de 42 frente a los 24 en que se inhibió.

En segundo lugar, se utilizó el software Mapman, en el que la ontología génica es jerárquica y se basa en agrupaciones denominadas "BIN". Cada BIN engloba los términos que hacen referencia a funciones biológicas similares pudiéndose dividir en subBINs, que corresponden a subcategorías funcionales, permitiendo visualizar la expresión génica en un contexto biológico. En comparación con la ontología génica GO, con la organización funcional agrupada en BINs se minimiza la redundancia entre categorías funcionales. Dado que en este software no se encuentran disponibles las anotaciones para tabaco, se utilizaron las asignadas para *Arabidopsis thaliana* y posteriormente se compararon con las de tabaco. En la Tabla 11 se muestran los términos BIN más abundantes con significación estadística del total, tanto inducidos como inhibidos. Cabe destacar entre los diferentes grupos establecidos las familias de genes implicados en el transporte electrónico mitocondrial, en la respuesta al estrés, en la síntesis de proteínas y aminoácidos y en el ciclo celular.

Además, el software Mapman permite la ilustración de los resultados obtenidos en el análisis de microarrays mediante diagramas y rutas metabólicas que facilitan la detección de cambios en los niveles transcripcionales de los genes. En este sentido, en la Figura 43A están representadas las diferentes familias de factores de transcripción y su expresión diferencial. Así mismo, el gráfico de la Figura 43B, obtenido utilizando los datos disponibles en Edwards y col. (2010), muestra el número de genes expresados de forma diferencial en cada familia de factores de transcripción con respecto al total identificados en el microarray. En este análisis se han incluido 27 familias de factores de transcripción presentes en el microarray, representando un total de 495 posibles factores de transcripción. De entre ellos, 94 mostraron una expresión diferencial (>2 veces), lo que representa aproximadamente un 19% del total. Así mismo, 8 familias mostraron una expresión diferencial superior al doble de la media total de los genes (16.4%). De entre ellas cabe destacar la familia WRKY (33.3%), que mayoritariamente mostraba una inducción positiva, la familia AUX-IAA (43.5%) y la familia GRAS (36.4%). Por otra parte, la Figura 44 muestra los cambios producidos en los niveles de transcritos asociados con el metabolismo.

**Tabla 10. Expresión diferencial de genes seleccionados del microarray en células de la línea adaptada en fase de crecimiento exponencial.** Todos los genes mostrados, excepto los marcados en rojo, mostraron diferencias con significación estadística utilizando el test de Benjamini y Hochberg (1995) con un FDR<0,01.

Clasificación funcional	Id. Array	Ref. <i>A. thaliana</i>	Blast2GO	Ref. SGN	Gen	p-value	Cambio
<b>Metabolismo de prolina</b>							
	C3817_at	AT3G55610	gamma-glutamyl phosphate reductase	SGN-U447290	P5CS2 (DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 2)	1,26E-08	8,07892
	EB440509_at	AT2G39800	pyrroline-5-carboxylate synthetase	SGN-U447290	P5CS1 (DELTA1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 1)	0,00048475	1,86578
	C11383_at	AT5G14800	pyrroline-5-carboxylate reductase	SGN-U422436	P5CR (PYRROLINE-5- CARBOXYLATE (P5C) REDUCTASE)	9,28E-07	5,37668
	C4952_at	AT3G30775	proline dehydrogenase	SGN-U449552	ERD5 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 5)	0,00450591	2,69325
	C8100_at	AT5G62530	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	SGN-U433904	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	5,83E-07	1,90897
<b>Transporte de Na<sup>+</sup></b>							
	EB682772_at	AT2G01980	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter	SGN-U499822	SOS1 (SALT OVERLY SENSITIVE 1)	0,0005669	-1,47057
	C2677_at	AT5G35410	serine-threonine kinase	SGN-U441685	SOS2 (SALT OVERLY SENSITIVE 2)	1,98E-06	-5,72734
	C4738_at	AT5G24270	calcineurin b	SGN-U434427	SOS3 (SALT OVERLY SENSITIVE 3)	0,00021688	-2,41498
	C8278_at	AT5G37850	pyridoxal kinase	SGN-U438097	SOS4 (SALT OVERLY SENSITIVE 4)	0,00089988	-1,65721
	C3678_at	AT5G17170	enh1 (enhancer of sos3-1) metal ion binding	SGN-U437049	ENH1 (ENHANCER OF SOS3-1)	2,52E-05	1,98079
	DW000549_at	AT5G27150	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter	SGN-U491387	NHX1 (NA <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> EXCHANGER)	0,0705848	-1,18556
	C7843_at	AT3G05030	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter	SGN-U441002	NHX2 (sodium proton exchanger 2)	0,471581	1,05396
	BP129124_at	AT3G06370	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter	SGN-U441003	NHX4 (sodium proton exchanger 4)	0,101167	-1,08431

---

**Transporte de K<sup>+</sup>**

C9232_at	AT3G02850	cation channel family protein	SGN-U434766	SKOR (stelar K+ outward rectifier) (NtORK1)	2,44E-06	4,6096
C4029_at	AT4G18160	outward rectifying potassium channel	SGN-U433395	KCO6 (CA2+ ACTIVATED OUTWARD RECTIFYING K+ CHANNEL 6)	5,24E-08	-11,717
C4741_at	AT4G13420	high-affinity potassium transporter	SGN-U435135	HAK5 (High affinity K+ transporter 5)	8,46E-07	-3,40999
C2376_s_at	AT5G15410	dnd1	SGN-U427910	DND1 (DEFENSE NO DEATH 1) (CNGC2)	3,09E-06	-3,49313

**Metabolismo y señalización de ABA**

C2333_at	AT5G67030	zeaxanthin epoxidase	SGN-U441280	ABA1 (ABA DEFICIENT 1)	0,00022904	-2,31032
C6658_at	AT1G67080	protein	SGN-U428291	ABA4 (ABSCISIC ACID (ABA)-DEFICIENT 4)	3,90E-07	-7,17323
EB426342_at	AT3G14440	carotenoid oxygenase	SGN-U441491	NCED3 (NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE3)	0,0015794	2,09994
TT07_E08_at	AT4G19170	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	SGN-U427346	NCED4 (NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 4)	6,10E-05	2,11568
EB441275_at	AT4G19230	cytochrome p450	SGN-U425886	CYP707A1 (cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 1)	0,00238478	4,83665
TT39_L01_s_at	AT5G45340	cytochrome p450	SGN-U425886	CYP707A3 (cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 3)	0,00844215	3,59833
C9060_at	AT3G19270	cytochrome p450	SGN-U434198	CYP707A4 (cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 4)	0,0004086	4,58296
DV158832_at	AT3G24650	protein	SGN-U478733	ABI3 (ABA INSENSITIVE 3)	0,00087443	3,90467
C4593_at	AT3G15730	phospholipase d	SGN-U445520	PLD $\alpha$ 1 (PHOSPHOLIPASE D ALPHA 1)	4,21E-09	205,338
DW004558_s_at	AT3G11410	protein phosphatase 2c	SGN-U426170	AHG3/ATPP2CA ( <i>Arabidopsis thaliana</i> PROTEIN PHOSPHATASE 2CA) PP2CA	6,28E-06	3,39144
C4006_s_at	AT2G04240	XERICO; protein binding / zinc ion binding	SGN-U423950	Encodes a small protein with an N-terminal trans-membrane domain and a RING-H2 z	3,58E-07	5,53441

---

---

**Retículo endoplasmático y endocitosis**

C10939_at	AT2G35520	defender against cell death 1	SGN-U431797	DAD2 (DEFENDER AGAINST CELL DEATH 2)	7,49E-09	40,6699
C9316_at	AT5G47120	bax inhibitor	SGN-U471655	ATBI-1 ( <i>Arabidopsis</i> BAX INHIBITOR 1)	3,65E-06	-9,03195
C1856_at	AT3G43810	calmodulin	SGN-U448766	CAM7 (CALMODULIN 7)	2,93E-08	-16,6266
C2497_at	AT5G61790	calreticulin	SGN-U437621	calnexin 1 (CNX1)	7,33E-09	84,7566
C9076_at	AT5G28540	heat shock protein 70	SGN-U429298	BIP1	1,60E-07	-15,9348
C2399_at	AT4G32150	synaptobrevin-like protein	SGN-U437387	VAMP7C (VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN 7C) family VAMP711	1,07E-09	109,4
C6769_at	AT1G73030	chromatin modifying protein 1b	SGN-U430603	VPS46.2	4,01E-10	35,3203
TT33_G02_at	AT3G07100	sec24-like copii protein	SGN-U437019	Sec24a	1,08E-07	-3,39634

**Proteínas nucleares y división celular**

C1587_at	AT4G04770	assembly protein	SGN-U434596	NAP1 (NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN 1)	2,21E-05	5,81606
C11485_s_at	AT3G25150	nuclear transport factor 2family protein rna recognition motif- containing protein	SGN-U382290	NTF2(nuclear transport factor 2 family protein rna recognition motif-containing protein)	3,11E-07	37,0646
C3191_x_at	AT1G27970	nuclear transport factor 2	SGN-U426595	NTF2B (NUCLEAR TRANSPORT FACTOR 2B)	1,10E-08	5,45008
C8992_x_at	AT5G67260	d-type cyclin	SGN-U450437	CYCD3;2 (CYCLIN D3;2)	8,69E-07	-8,82476
EB441629_s_at	AT4G34160	d-type cyclin	SGN-U426470	CYCD3;1 (CYCLIN D3;1)	1,41E-08	-25,9861
EB443147_at	AT2G31270		SGN-U435375	CDT1A ( <i>Arabidopsis</i> HOMOLOG OF YEAST CDT1 A)	8,33E-12	-12,5986
C8084_at	AT1G52740	histone h2a	SGN-U436544	HTA9	2,00E-10	132,191
C875_at	AT1G06760	histone h1	SGN-U427196	histone H1, putative	5,38E-11	106,945

**Chaperonas**

C5958_at	AT1G55490	chaperonin	SGN-U422529	CPN60B(CHAPERONIN 60 BETA)	7,54E-10	50,1489
----------	-----------	------------	-------------	----------------------------	----------	---------

---

C4018_at	AT1G79930	heat shock protein	SGN-U447184	HSP91 (Heat shock protein 91)	1,37E-08	75,8052
C5950_at	AT3G46230		SGN-U426339	HSP17.4 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> heat shock protein 17.4)	9,54E-05	43,4424
C5973_s_at	AT1G53540		SGN-U426340	HSP17.6C-CI(17.6 kDa class I small heat shock protein)	0,0001992	11,1955
C529_at	AT1G07400	heat shock protein	SGN-U439469	HSP17.8-CI 17.8 kDa class I heat shock protein)	0,0004745	2,69173
C5962_at	AT4G10250	heat shock protein	SGN-U426955	HSP22.0 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> heat shock protein 22.0)	0,00824173	2,9914
C9391_at	AT1G74310	atp-dependent-binding subunit	SGN-U428526	HSP101 (HEAT SHOCK PROTEIN 101)	0,00012284	-2,20104
C5967_at	AT4G10250		SGN-U424245	HSP22.0 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> heat shock protein 22.0)	0,00034252	-3,50558
C2074_at	AT4G27670	chloroplast small heat shock protein	SGN-U425782	HSP21 (HEAT SHOCK PROTEIN 21)	0,00035691	-4,91037
EB430306_s_at	AT5G52640	heat shock protein 90	SGN-U433517	HSP81-1 (HEAT SHOCK PROTEIN 81-1)	4,13E-06	-7,93316
C5985_at	AT5G12020	heat shock protein	SGN-U443581	HSP17.6II (17.6 KDA CLASS II HEAT SHOCK PROTEIN)	7,96E-07	-36,4258
C5590_at	AT5G52640	heat shock protein 90	SGN-U433516	HSP81-1 (HEAT SHOCK PROTEIN 81-1)	4,70E-08	-50,709

#### Transporte electrónico mitocondrial

C5203_at	AT3G22370	alternative oxidase	SGN-U450832	AOX1A (alternative oxidase 1A)	2,43E-07	65,1819
TT33_O11_at	AT3G54110	protein	SGN-U429759	PUMP1	1,16E-06	3,96719
EB425384_at	AT3G54110	uncoupling protein 2	SGN-U426641	PUMP1	1,45E-05	2,6096
C8049_at	AT5G08690	atp synthase beta subunit	SGN-U435383	ATP synthase $\beta$ 2	5,46E-09	-118,651
C3462_at	ATMG01080		SGN-U463946	subunit 9 of mitochondrial F0-ATPase	0,00017676	-3,13998
EB680679_s_at	ATMG00480	atpase subunit 8	SGN-U444239	Encodes subunit 8 of the mitochondrial F(O) ATP synthase complex.	0,00017676	-3,13998
DV999552_s_at	AT5G13440	ubiquinol-cytochrome c iron-sulfur subunit	SGN-U471849	ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit	9,80E-07	-2,97169
C10949_x_at	AT4G29480	mitochondrial atp synthase g subunit family protein	SGN-U445669	mitochondrial ATP synthase g subunit family protein	7,56E-07	-2,64332

C11679_at	ATMG00665	nadh dehydrogenase subunit 5	SGN-U429692	Mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5	0,00243824	-2,5957
EB677735_s_at	AT5G13430	ubiquinol-cytochrome c iron-sulfur subunit	SGN-U424683	ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit	7,97E-07	-2,46825
EB443828_at	AT1G51650	epsilon subunit of mitochondrial f1-atpase	SGN-U441090	ATP synthase epsilon chain	3,45E-08	-2,41485
C626_at	AT2G33040	atp synthase gamma subunit	SGN-U441024	ATP synthase gamma chain	1,98E-07	-2,40031
C7030_at	AT1G15120	ubiquinol-cytochrome c reductase complex	SGN-U446632	ubiquinol-cytochrome C reductase complex 7.8 kDa protein	4,70E-08	-2,37567
TT34_M22_at	AT5G47030	atp synthase delta mitochondrial precursor	SGN-U464993	ATP synthase delta' chain	2,17E-06	2,04
BP532810_at	AT5G11770	nadh dehydrogenase subunit b	SGN-U447201	NADH-ubiquinone oxidoreductase 20 kDa	3,18E-09	32,5989
C10932_at	AT4G29480	mitochondrial atp synthase g subunit family protein	SGN-U434390	mitochondrial ATP synthase g subunit family protein	1,36E-10	85,4994
EB441447_at	AT1G51650	epsilon subunit of mitochondrial f1-atpase	SGN-U441092	ATP synthase epsilon chain	2,98E-09	240,628
<b>Enzimas antioxidantes</b>						
C5583_x_at	AT1G07890	ascorbate peroxidase	SGN-U444420	APX1 (ASCORBATE PEROXIDASE 1)	1,82E-07	11,9405
C10948_at	AT3G09640	ascorbate peroxidase	SGN-U448855	APX2 (ASCORBATE PEROXIDASE 2)	0,0001898	-4,48645
C4216_at	AT5G16710	stringent starvation protein a	SGN-U450320	DHAR3 (DEHYDROASCORBATE REDUCTASE 1)	3,99E-07	3,4268
BP134085_s_at	AT2G28190	ole e 5 olive pollen allergen	SGN-U424966	CSD2 (COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 2)	0,0200494	-3,50593
C4286_x_at	AT4G25100	superoxide dismutase	SGN-U450943	FSD1 (FE SUPEROXIDE DISMUTASE 1)	1,10E-06	5,28791
C3130_at	AT3G10920	superoxide dismutase	SGN-U434928	MSD1 (MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE 1)	2,38E-09	2,11764
X76293_at	AT3G54660	glutathione reductase	SGN-U455693	GR (GLUTATHIONE REDUCTASE)	1,79E-06	4,08528
C4787_s_at	AT4G11600	glutathione peroxidase	SGN-U430528	GPX6 (GLUTATHIONE PEROXIDASE 6)	8,78E-08	5,57447
C2104_at	AT3G63080	glutathione peroxidase	SGN-U423253	GPX5 (GLUTATHIONE PEROXIDASE 5)	6,88E-08	5,4105

C10021_at	AT5G64120	peroxidase	SGN-U448876	peroxidase, encodes a cell wall bound peroxidase that is induced by hypo-osmolarity	1,67E-09	18,2753
DV157630_at	AT4G25980	peroxidase	SGN-U450505	cationic peroxidase	2,40E-06	-6,21559
EB446486_at	AT2G18980	peroxidase	SGN-U437861	peroxidase, putative	3,91E-08	-17,6759
C5990_at	AT2G29420		SGN-U439372	GSTU7 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 25)	1,48E-08	-7,04214
C4440_at	AT3G09270	glutathione s-transferase	SGN-U445393	GSTU8 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> Glutathione S-transferase (class tau 8))	9,96E-10	19,6127
BQ843105_s_at	AT1G78380	glutathione s-transferase	SGN-U465596	GSTU19 (GLUTATHIONE TRANSFERASE 8)	3,85E-09	40,6717
C8921_at	AT1G78340	glutathione s-transferase	SGN-U426103	GSTU22 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> Glutathione S-transferase (class tau) 22)	1,53E-06	23,1847
M29274_at	AT1G17180	glutathione s-transferase	SGN-U426103	GSTU25 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> Glutathione S-transferase (class tau) 25)	1,54E-07	52,3907
C2821_at	AT1G74590	glutathione s-transferase	SGN-U424265	GSTU10 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> Glutathione S-transferase (class tau) 10)	1,70E-06	-6,50216
C1802_at	AT3G51030	thioredoxin	SGN-U442431	TRX1 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> thioredoxin H-type 1)	2,69E-08	3,89524
C5988_at	AT5G06290	thioredoxin peroxidase	SGN-U435356	2-cys peroxiredoxin , chloroplast, putative	1,20E-10	-60,2872
C7504_at	AT1G55020	lipoxygenase	SGN-U422305	LOX1 (Lipoxygenase 1)	2,16E-08	6,1245
<b>Proteínas de transferencia de lípidos</b>						
C768_at	AT2G38540	lipid transfer protein	SGN-U434638	LP1 (nonspecific lipid transfer protein 1) (NtLPT1)	3,00E-09	54,1205
CV020004_s_at	AT3G18280	lipid transfer protein	SGN-U421492	lipid transfer protein (LTP) family protein (NtLPT2)	5,78E-08	-16,8105
C6500_at	AT2G38540	lipid transfer protein	SGN-U434642	LP1 (nonspecific lipid transfer protein 1) (NtLPT3)	3,60E-09	175,264
C3786_s_at	AT5G59320	lipid transfer protein	SGN-U430728	LTP3 (LIPID TRANSFER PROTEIN 3) (NtLPT4)	2,11E-07	41,9011
<b>Metabolismo de etileno</b>						
X65982_at	AT1G01480	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	SGN-U504335	ACS2 (1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 2)	7,58E-06	33,0984

AF393206_x_at	AT4G11280	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	SGN-U429900	ACS6 (1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) SYNTHASE 6)	6,61E-05	-2,1007
C6045_x_at	AT1G05010	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	SGN-U444970	EFE (ETHYLENE FORMING ENZYME)	2,44E-05	3,05101
C6412_s_at	AT1G05010	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	SGN-U447674	EFE (ETHYLENE FORMING ENZYME)	1,15E-05	2,75775
D63331_at	AT5G22300	nitrilase	SGN-U430193	NIT4 (NITRILASE 4)	2,24E-09	40,5163
AF022727_at	AT1G66340	ethylene receptor	SGN-U429893	ETR1 (ETHYLENE RESPONSE 1)	0,00600346	1,40449
C10404_at	AT5G03280	ethylene signaling protein	SGN-U451654	EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2)	1,69E-05	-1,53408
C9283_at	AT3G20770	ethylene-insensitive3	SGN-U422008	EIN3 (ETHYLENE-INSENSITIVE3) (eil4)	1,32E-06	6,03442
C9284_x_at	AT3G20770	ethylene-insensitive3	SGN-U453944	EIN3(ETHYLENE-INSENSITIVE3) (eil2)	1,70E-07	-3,93399
C7316_at	AT3G04580	ethylene receptor	SGN-U437095	EIN4 (ETHYLENE INSENSITIVE 4)	1,18E-05	-2,13921
<b>Metabolismo de GAs</b>						
AB170036_at	AT1G05160	dwarf3	SGN-U482443	KAO1 (ENT-KAURENOIC ACID HYDROXYLASE 1) CYP88A3	1,13E-06	-3,41018
BP129423_at	AT2G32440	ent-kaurenoic acid oxidase	SGN-U452890	KAO2 (ENT-KAURENOIC ACID HYDROXYLASE 2)	0,00061473	-2,36107
AB170034_at	AT4G02780	ent-copalyl diphosphate synthase	SGN-U437478	GA1 (GA REQUIRING 1)	0,0593484	-1,11126
AB170035_at	AT1G79460	ent-kaurene synthase 1	SGN-U496834	GA2 (GA REQUIRING 2)	0,0360941	1,15367
C3556_at	AT2G01570	gai-like protein 1	SGN-U423273	RGA1 (REPRESSOR OF GA1-3 1)	3,29E-06	-3,99256
EB439761_at	AT3G05120	gid1-like gibberellin receptor	SGN-U445954	GID1A (GA INSENSITIVE DWARF1A)	3,45E-06	-5,89863
<b>Síntesis de tocoferol</b>						
EB428150_at	AT1G06570	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	SGN-U457735	PDS1 (PHYTOENE DESATURATION 1)	4,24E-05	2,81205
C5734_at	AT3G63410	msbq methyltransferase 2	SGN-U421828	APG1 (ALBINO OR PALE GREEN MUTANT 1)	6,78E-08	3,0307

C2955_at	AT1G64970	gamma-tocopherol methyltransferase	SGN-U445233	G-TMT (GAMMA-TOCOPHEROL METHYLTRANSFERASE)	8,39E-07	5,35833
<b>Ribosomas y síntesis de proteínas</b>						
C8649_at	AT5G56670	40s ribosomal protein s30	SGN-U428918	40S ribosomal protein S30 (RPS30C)	4,61E-10	441,825
C6232_at	AT5G09510	ribosomal protein s15	SGN-U432323	40S ribosomal protein S15 (RPS15D)	3,49E-09	199,553
C2926_at	AT3G53870	ribosomal protein s3	SGN-U445202	40S ribosomal protein S3 (RPS3B)	7,76E-08	125,59
C8310_at	AT2G09990	40s ribosomal protein	SGN-U447692	40S ribosomal protein S16 (RPS16A)	9,71E-09	-206,342
C8688_s_at	AT3G11510	40s ribosomal protein s14	SGN-U446469	40S ribosomal protein S14 (RPS14B)	4,85E-12	-376,779
C2790_at	AT3G13580	60s ribosomal protein l7	SGN-U446255	60S ribosomal protein L7 (RPL7D)	4,27E-12	835,436
C1031_at	AT5G39740	ribosomal protein l5	SGN-U446255	60S ribosomal protein L5 (RPL5B)	1,34E-09	646,049
C2790_x_at	AT3G13580	60s ribosomal protein l7	SGN-U449672	60S ribosomal protein L7 (RPL7D)	1,49E-08	595,358
C1471_at	AT3G10950	60s ribosomal protein l37a	SGN-U449148	60S ribosomal protein L37a (RPL37aB)	3,03E-12	-172,78
C8513_at	AT3G05560	ribosomal protein l22	SGN-U448537	60S ribosomal protein L22-2 (RPL22B)	2,28E-09	-295,935
C8363_at	AT4G31985	ribosomal protein l39	SGN-U440093	60S ribosomal protein L39 (RPL39C)	3,45E-09	-406,559
C6440_at	AT4G39280	phenylalanyl-trnaalpha subunit	SGN-U426087	phenylalanyl-tRNA synthetase, putative	3,06E-06	28,1792
EB450494_at	AT5G11900	density-regulated protein	SGN-U466152	eukaryotic translation initiation factor SU11	2,99E-09	48,4046
DW001898_at	AT1G13950	eukaryotic translation initiation factor 5a	SGN-U466399	EIF-5A (eukaryotic translation initiation factor 5A-1)	1,81E-06	-6,14592
EB678030_at	AT3G13882	structural constituent of ribosome	SGN-U438604	structural constituent of ribosome	1,13E-07	27,8287
<b>Proteosoma</b>						
C4757_at	AT4G27960	ubiquitin-conjugating enzyme	SGN-U444954	UBC9 (UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 9)	8,56E-07	-32,4291
C2861_at	AT1G64230	ubiquitin-conjugating enzyme	SGN-U446566	UBC28	8,81E-09	31,4973
DW000495_at	AT3G57870	ubiquitin-conjugating enzyme	SGN-U422935	AHUS5 (SUMO CONJUGATION ENZYME 1)	3,61E-07	-42,1489

C9815_at	AT3G52560	ubiquitin-conjugating enzyme e2 variant 2	SGN-U447767	UEV1D-4 (MMS ZWEI HOMOLOGE 4, UBIQUITIN E2 VARIANT 1D-4)	4,27E-09	12,4766
C4117_x_at	AT4G02890	polyubiquitin	SGN-U446041	UBQ14 (ubiquitin 14)	1,89E-10	-144,647
DW000068_at	AT5G14420	protein	SGN-U421646	RGLG2 (RING DOMAIN LIGASE2)	1,29E-08	36,8705
EB683455_at	AT1G57820	transcription factor	SGN-U433536	ORTH2 (VARIANT IN METHYLATION 1)	1,11E-08	-17,8741
DV161261_at	AT5G02920		SGN-U460315	ubiquitin-protein ligase	3,68E-07	5,81873
C2786_s_at	AT1G53750	protein	SGN-U421159	RPT1A (regulatory particle triple-A 1A)	1,35E-08	113,41
EB434846_at	AT5G20000	proteasome-activating nucleotidase	SGN-U426872	RPT-A 6A (REGULATORY PARTICLE TRIPLE-A 6A)	3,27E-10	-219,658
C4526_at	AT4G29040	proteasome26s1	SGN-U421750	RPT2A (REGULATORY PARTICLE AAA-ATPASE 2A)	1,12E-12	202,975
<b>Proteasas</b>						
EB446669_at	AT4G34980	subtilisin-like protease	SGN-U437292	SLP2 (subtilisin-like serine protease 2)	1,38E-07	32,06
C8113_s_at	AT1G17860	kunitz trypsin inhibitor	SGN-U442065	trypsin and protease inhibitor family protein	9,38E-06	27,5021
C7408_at	AT1G02560	atp-dependent clp protease proteolytic subunit	SGN-U425428	CLPP5 (NUCLEAR ENCODED CLP PROTEASE 1)	2,62E-08	24,7125
DV158352_at	AT1G25510	aspartyl protease	SGN-U437829	aspartyl protease family protein	1,72E-05	6,67454
TT34_B01_at	AT5G04250		SGN-U444093	OTU-like cysteine protease family protein	3,46E-06	3,17651
C5490_at	AT1G02305	cathepsin b	SGN-U440550	cathepsin B-like cysteine protease	6,19E-05	-3,13354
C10762_at	AT5G47550	cysteine proteinase inhibitor		cysteine protease inhibitor, putative	9,27E-08	-4,7367
C3431_at	AT5G67360	subtilase family protein	SGN-U424947	ARA12	4,44E-08	-12,0064
C5463_at	AT1G02305	cathepsin b	SGN-U440550	cathepsin B-like cysteine protease, putative	1,89E-07	-12,1032
C61_at	AT1G17860	kunitz trypsin inhibitor	SGN-U428923	trypsin and protease inhibitor family protein	1,20E-07	-13,8195
<b>Proteínas ricas en prolina</b>						
C3546_s_at	AT4G12730	pollen surface protein	SGN-U451793	FLA2	5,52E-07	-8,0373

C5736_s_at	AT5G06390		SGN-U444640	FLA17 (FASCICLIN-LIKE ARABINOGALACTAN PROTEIN 17 PRECURSOR)	1,84E-06	-2,81563
C6841_at	AT3G61640	agp20 (arabinogalactan protein 20)	SGN-U450698	AGP20 (ARABINOGALACTAN PROTEIN 20)	3,89E-06	-2,80927
EB445395_at	AT2G39050	stress responsive protein	SGN-U441868	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	7,64E-07	4,70168
C3844_at	AT2G18910		SGN-U438881	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	1,72E-07	-3,19148
C2154_s_at	AT5G07020		SGN-U428474	proline-rich family protein	8,31E-07	-3,26474
C3094_at	AT2G34700	120 kda pistil extensin-like protein	SGN-U431892	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	9,49E-10	10,8728
EB425239_at	AT5G54855	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	SGN-U431274	pollen ole e 1 allergen and extensin family	8,96E-06	-2,08263
AF154654_at	AT1G21310	ATEXT3 (EXTENSIN 3)	SGN-U449143	extensin precursor	3,21E-06	-5,75513
<b>Modificación de la pared celular</b>						
AB052557_at	AT3G21760	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	SGN-U445853	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	2,80E-10	243,925
C9357_at	AT2G43840	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	SGN-U425123	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	9,12E-09	36,5728
BP535220_x_at	AT1G05680	glycosyltransferase	SGN-U425121	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	1,01E-05	26,4809
BP136388_at	AT1G11545		SGN-U504098	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative	9,57E-06	6,69301
BP527930_at	AT2G36870	xyloglucan endo-transglycosylase	SGN-U437822	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative	2,15E-08	-39,4245
C3034_at	AT5G13870	protein	SGN-U436435	EXGT-A4 (ENDOXYLOGLUCAN TRANSFERASE A4)	3,46E-10	-15,8348
C3209_s_at	AT1G68560	protein	SGN-U450224	ATXYL1/XYL1 (ALPHA-XYLOSIDASE 1)	3,01E-10	86,7753
TT03_A03_at	AT3G13750	beta-galactosidase	SGN-U470055	BGAL1 (BETA GALACTOSIDASE 1)	7,36E-09	10,4114
AJ250431_at	AT2G16730	beta-galactosidase	SGN-U450527	BGAL13 (beta-galactosidase 13)	2,20E-07	-10,6734
EB448478_at	AT3G53190	pectate lyase	SGN-U422606	pectate lyase family protein	3,95E-09	-23,6911
C3442_at	AT1G11580	pectinesterase	SGN-U449827	ATPMEPCRA	2,16E-06	10,8297

DW000176_at	AT3G49220	pectinesterase	SGN-U422804	pectinesterase family protein	3,11E-07	8,5913
C4785_s_at	AT4G12390	pectinesterase inhibitor	SGN-U443364	PME1	0,00010233	-2,0586
AW351426_at	AT1G11580	pectinesterase	SGN-U442095	ATPMEPCRA	0,00076732	-2,90383
EB433828_at	AT3G49220	pectinesterase	SGN-U422803	pectinesterase family protein	1,82E-05	-4,83089
C5190_at	AT4G25810	protein	SGN-U445147	XTR6 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 6)	1,26E-05	3,30924
EB447049_at	AT1G32170	protein	SGN-U446982	XTR4 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 4)	0,00010573	-5,82658
C4435_at	AT4G14130	protein	SGN-U436433	XTR7 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 7)	1,46E-05	-5,94457
DV158222_at	AT5G66460	(1-4)-beta-mannan endohydrolase	SGN-U451574	(1-4)-beta-mannan endohydrolase, putative	1,31E-08	9,09605
DV157927_at	AT5G66460	protein	SGN-U491613	(1-4)-beta-mannan endohydrolase, putative	7,97E-06	-8,3505
<b>Ruta de las pentosas fosfato</b>						
C10394_at	AT1G17650	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	SGN-U430971	phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating)	1,24E-07	4,435
EB427996_at	AT1G13700	6-phosphogluconolactonase	SGN-U440966	glucosamine/galactosamine-6-phosphate isomerase family protein	3,46E-07	4,2131
C6558_at	AT5G35790	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	SGN-U433249	G6PD1 (GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 1)	1,94E-08	3,73666
<b>Glicolisis</b>						
BP530355_at	AT5G20830	sucrose synthase	SGN-U447896	SUS1 (SUCROSE SYNTHASE 1)	3,61E-05	5,26195
AY553220_s_at	AT1G50460	hexokinase	SGN-U430721	hexokinase, putative	1,21E-07	3,38023
AY553215_at	AT1G47840	hexokinase	SGN-U446274	hexokinase, putative	2,19E-08	7,72573
BP534874_at	AT5G22510	beta-fructofuranosidase	SGN-U427289	beta-fructofuranosidase, putative	1,01E-07	3,02618
C2678_at	AT1G23190	phosphoglucomutase	SGN-U422676	phosphoglucomutase, cytoplasmic, putative	1,56E-07	5,89651
C2941_at	AT2G36460	fructose-bisphosphate aldolase	SGN-U421409	fructose-bisphosphate aldolase, putative	5,20E-10	-271,522

C3879_at	AT3G14940	phosphoenolpyruvate carboxylase	SGN-U430297	ATPPC3 (PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE 3)	2,13E-06	-2,85473
C8839_at	AT5G08570	pyruvate kinase	SGN-U446332	pyruvate kinase, putative	1,27E-07	-2,26779
C6923_at	AT5G17380	acetolactate synthase	SGN-U422974	pyruvate decarboxylase family protein	6,10E-09	-3,59408
AY219426_at	AT5G54960	pyruvate decarboxylase	SGN-U448814	PDC2 (PYRUVATE DECARBOXYLASE-2)	3,47E-06	-3,29451
C9150_at	AT1G77120	alcohol dehydrogenase	SGN-U449302	ADH1 (ALCOHOL DEHYDROGENASE 1)	1,27E-07	-9,21134
EB445883_at	AT4G17260	L-lactate dehydrogenase	SGN-U423294	L-lactate dehydrogenase, putative	4,25E-05	2,84367
C6252_s_at	AT3G48000	aldehyde dehydrogenase	SGN-U449123	ALDH2B4 (ALDEHYDE DEHYDROGENASE 2)	6,49E-08	42,8729
DW002824_s_at	AT1G74920	aldehyde dehydrogenase	SGN-U454657	ALDH10A8 (Aldehyde dehydrogenase 10A8)	3,23E-11	-3,81159
C6407_s_at	AT1G54100	aldehyde dehydrogenase	SGN-U421784	ALDH7B4 (ALDEHYDE DEHYDROGENASE 7B4)	6,18E-07	2,99833
DW001613_s_at	AT1G23800	aldehyde dehydrogenase	SGN-U446111	ALDH2B7 (Aldehyde dehydrogenase 2B7)	1,50E-07	4,00209
C6223_at	AT4G17090	beta-amylase	SGN-U445085	CT-BMY (BETA-AMYLASE 3, BETA-AMYLASE 8)	6,91E-05	3,87561
C4692_at	AT3G46970	glycogen phosphorylase	SGN-U425485	ATPHS2/PHS2 (ALPHA-GLUCAN PHOSPHORYLASE 2)	8,39E-10	8,77254
DV159051_at	AT5G17530	phosphoglucomutase	SGN-U478418	phosphoglucoamine mutase family protein	1,11E-06	2,09124
EB680476_at	AT4G04040	diphosphate--fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase	SGN-U422884	MEE51 (maternal effect embryo arrest 51)	0,00105803	2,03869
C2345_at	AT2G21330	fructose-bisphosphate aldolase	SGN-U446105	fructose-bisphosphate aldolase, putative	1,34E-06	5,85819
C2671_s_at	AT2G01140	fructose-bisphosphate aldolase	SGN-U447573	fructose-bisphosphate aldolase, putative	3,90E-08	4,75113
C6551_at	AT1G16300	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	SGN-U446007	GAPCP-2	1,08E-07	5,25469
EB439644_s_at	AT1G79530	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	SGN-U444311	GAPCP-1	0,00015604	6,04278
TT27_L19_at	AT5G52920	pyruvate kinase	SGN-U449380	PKP-BETA1/PKP1/PKP2 (PLASTIDIC PYRUVATE KINASE 1)	3,16E-09	-66,688
EB678890_at	AT5G36880	acetyl-coenzyme a synthetase	SGN-U423723	acetyl-CoA synthetase, putative	5,41E-07	-2,45721

---

**Otros**

C3961_at	AT3G03780	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	SGN-U445262	AtMS2 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> methionine synthase 2)	1,13E-08	-110,505
C5170_at	AT5G18170	glutamate dehydrogenase	SGN-U451581	GDH1 (GLUTAMATE DEHYDROGENASE 1)	3,83E-07	2,1905
C9247_at	AT5G07440	glutamate dehydrogenase	SGN-U451585	GDH2 (GLUTAMATE DEHYDROGENASE 2)	7,13E-07	4,1054
C4732_s_at	AT3G61440	cysteine synthase a	SGN-U450771	ATCYSC1 (BETA-SUBSTITUTED ALA SYNTHASE 3;1)	6,83E-08	-2,47494
C11286_at	AT1G72330	alanine aminotransferase		ALAAT2 (ALANINE AMINOTRANSFERASE 2)	1,06E-09	35,0747
C168_at	AT5G50200	component of high affinity nitrate transporter	SGN-U425923	WR3 (WOUND-RESPONSIVE 3)	1,96E-05	7,10149
C5662_at	AT5G04140	ferredoxin-dependent glutamate synthase	SGN-U434801	GLS1/GLU1/GLUS (FERREDOXIN-DEPENDENT GLUTAMATE SYNTHASE 1)	1,01E-06	-4,26074
C2365_at	AT5G10170	inositol-3-phosphate synthase	SGN-U450050	inositol-3-phosphate synthase, putative	9,71E-09	2,59
C2266_s_at	AT1G15950	Cinnamoyl reductase	SGN-U442695	CCR1 (CINNAMOYL COA REDUCTASE 1)	1,05E-06	3,06
EB445574_at	AT4G36220	flavonoid 3-hydroxylase	SGN-U505555	FAH1 (FERULATE-5-HYDROXYLASE 1)	0,00018913	7,75289
C5616_s_at	AT4G26850	protein	SGN-U423163	VTC2 (VITAMIN C DEFECTIVE 2)	6,36E-07	2,70547
C9330_at	AT1G76490	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase	SGN-U448376	HMG1 (3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL COA REDUCTASE)	9,67E-08	33,5484

---

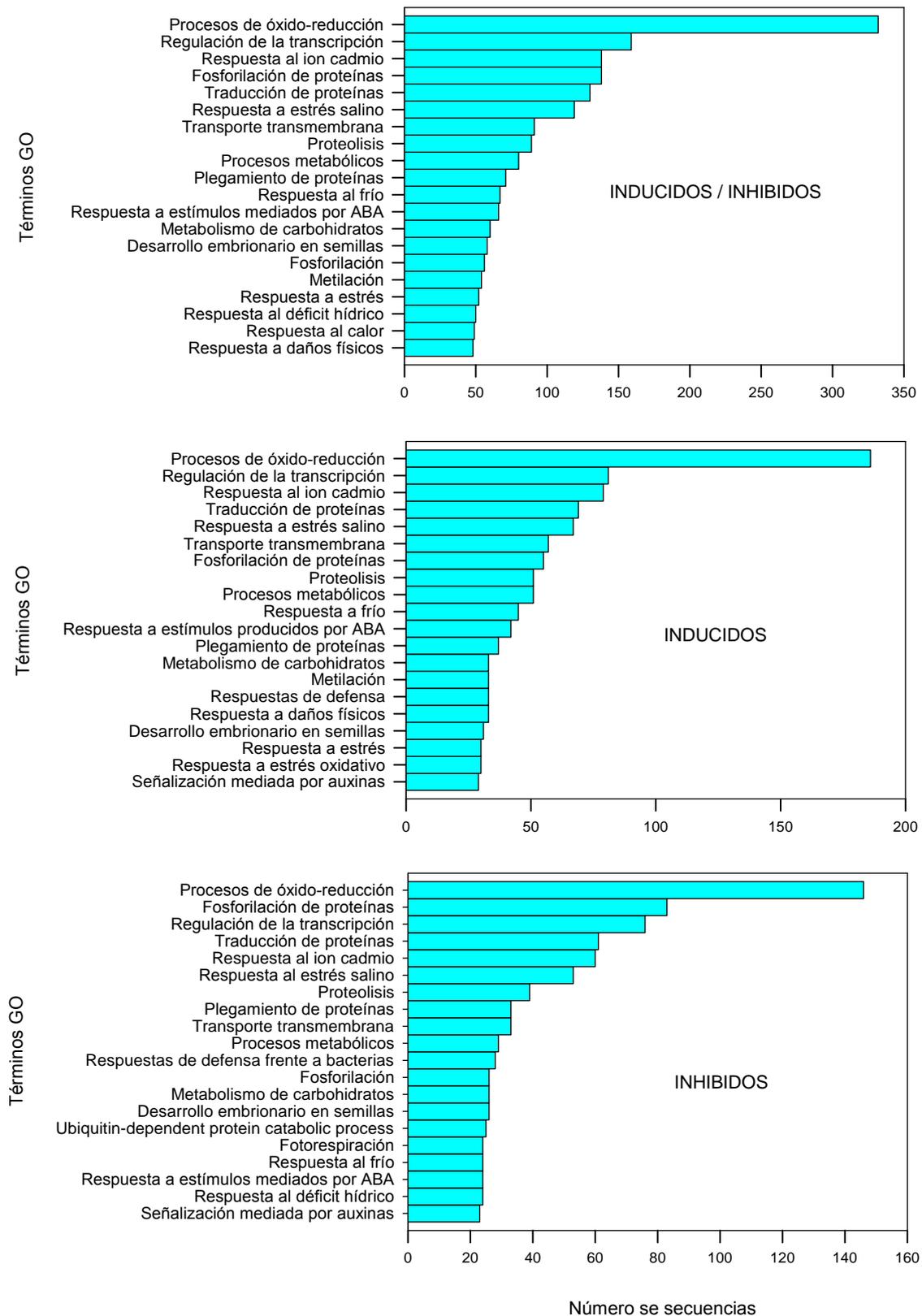
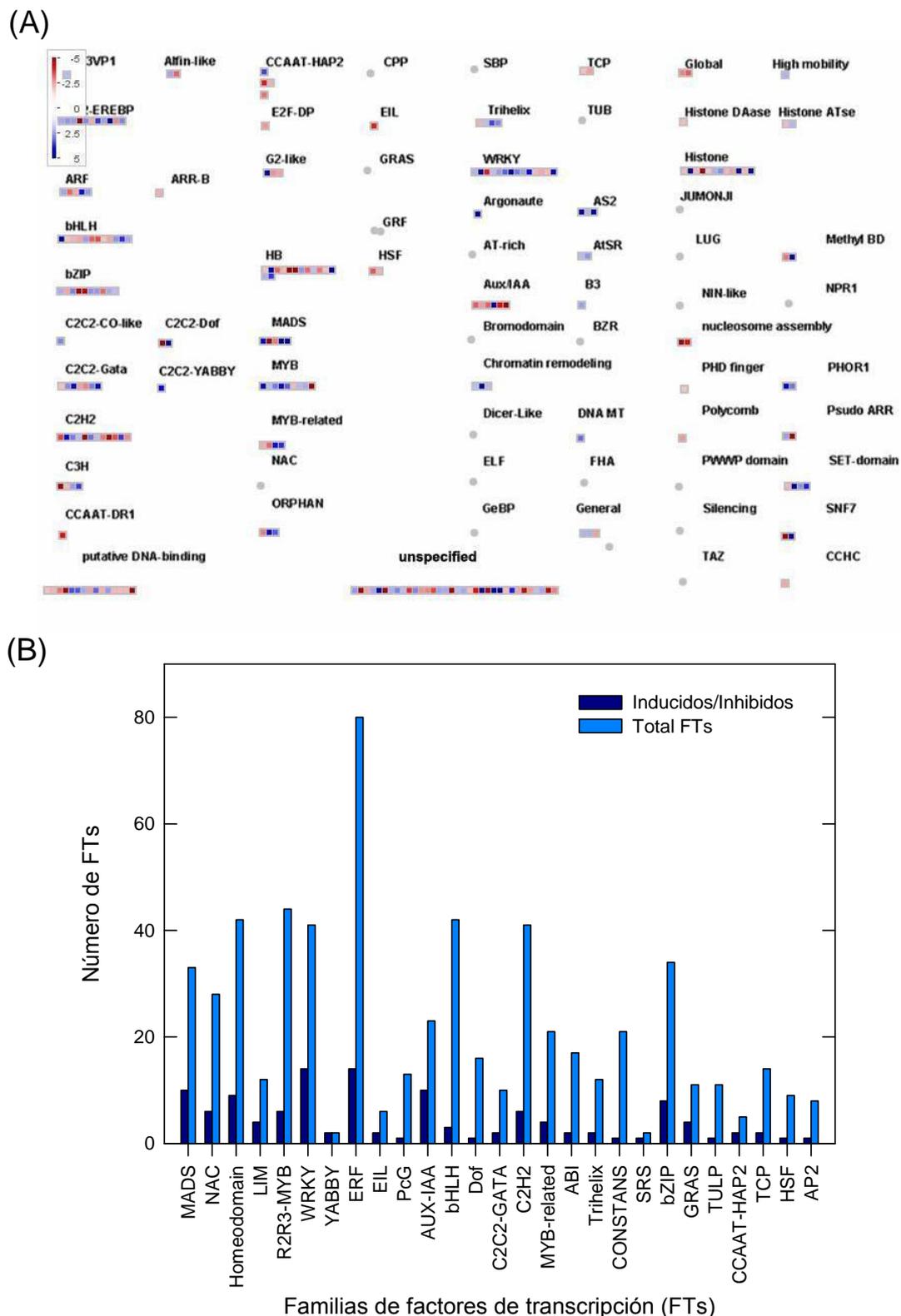


Figura 42. Clasificación funcional de los genes identificados en base a los términos GO.

Tabla 11. Clasificación funcional de los genes identificados en base a los términos BIN más representados. FDR<0,05.

BIN	Clasificación BIN	Found genes	Background	Not found genes	p-value
5	Fermentation	10	12	3147	2,13E-05
9	Mitochondrial electron transport / ATP synthesis	42	78	3115	7,71E-09
9.5	Mitochondrial electron transport / ATP synthesis. Cytochrome c reductase	7	7	3150	4,01E-05
9.9	Mitochondrial electron transport / ATP synthesis. F1-ATPase	9	12	3148	0,000239394
10	Cell wall	71	194	3086	3,81E-05
10.1	Cell wall. Precursor synthesis	15	30	3142	0,001751744
10.7	Cell wall. Modification	15	31	3142	0,002425198
11	Lipid metabolism	79	213	3078	9,08E-06
11.1	Lipid metabolism. FA synthesis and FA elongation	22	51	3135	0,002376376
11.6	Lipid metabolism. Lipid transfer proteins	7	9	3150	0,000910727
13	Amino acid metabolism	66	169	3091	6,18E-06
13.1	Amino acid metabolism. Synthesis	41	110	3116	0,001415996
13.1.3	Amino acid metabolism. Synthesis. Aspartate family	16	29	3141	0,000236598
13.1.3.4	Amino acid metabolism. Synthesis. Aspartate family. Methionine	9	14	3148	0,001361316
13.2	Amino acid metabolism. Degradation	23	54	3134	0,001939085
16	Secondary metabolism	60	169	3097	0,000477832
16.2	Secondary metabolism. Phenylpropanoids	19	39	3138	0,000886926
16.2.1	Secondary metabolism. Phenylpropanoids. Lignin biosynthesis	14	24	3143	0,000266533
17.3.1.1	Hormone metabolism. Brassinosteroid. Synthesis-degradation. BRs	6	7	3151	0,000951803
20	Stress	109	334	3048	0,000142628
20.2	Stress. Abiotic	74	212	3083	0,00016265
20.2.1	Stress. Abiotic. Heat	38	102	3119	0,002097742
26	Misc	190	544	2967	9,25E-10
26.1	Misc. Cytochrome P450	34	71	3123	7,55E-06
26.9	Misc. Glutathione S transferases	12	19	3145	0,0002644
27	RNA	308	1101	2849	0,000423455
27.3	RNA. Regulation of transcription	229	796	2928	0,000478364
28.1.3	DNA. Synthesis/chromatin structure. Histone	13	22	3144	0,000372615
29	Protein	508	1604	2649	2,22E-15
29.2	Protein. Synthesis	126	326	3031	7,75E-10
29.2.1	Protein. Synthesis. Ribosomal protein	95	233	3062	4,77E-09
29.2.1.2	Protein. Synthesis. Ribosomal protein. Eukaryotic	61	142	3096	3,93E-07
29.2.1.2.1	Protein. Synthesis. Ribosomal Protein. Eukaryotic. 40S subunit	21	47	3136	0,001526095
29.2.1.2.2	Protein. Synthesis. Ribosomal Protein. Eukaryotic. 60S subunit	40	95	3117	7,63E-05
29.4	Protein. Postranslational modification	114	306	3043	5,56E-08
29.4.1	Protein. Postranslational modification. Kinase	26	55	3131	0,000158694
29.5	Protein. Degradation	194	677	2963	0,001819006
31.3	Cell. Cycle	26	63	3131	0,001633339
31.3.1	Cell. Cycle. Peptidylprolyl isomerase	12	22	3145	0,001649436
34	Transport	147	455	3010	1,43E-05
35	Not assigned	867	2952	2290	1,36E-16
35.2	Not assigned. Unknown	596	1948	2561	1,08E-14



**Figura 43. Expresión diferencial de las familias de factores de transcripción.** (A) Visualización mediante el software Mapman. En color azul se encuentran representados los genes inducidos y en color rojo los inhibidos (a mayor valor de inducción/inhibición más intenso es el color). (B) Número de genes expresados de forma diferencial en cada familia con respecto al total identificados en el microarray.

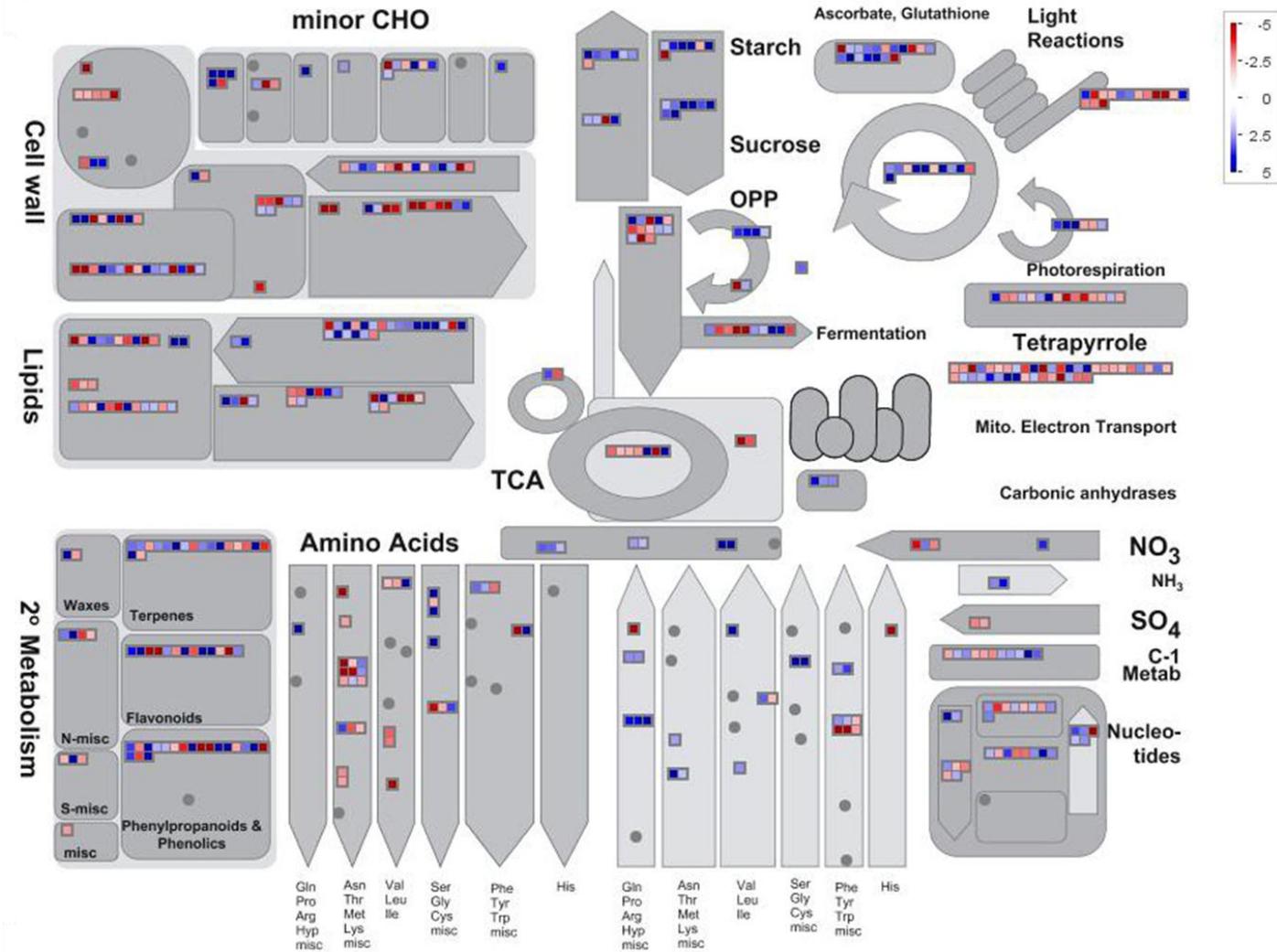


Figura 44. Visualización, mediante el software Mapman, de los cambios en los niveles de transcritos asociados con el metabolismo. Todos los genes que mostraron cambios significativos aparecen representados en el esquema. En color azul se encuentran representados los genes inducidos y en color rojo los inhibidos (a mayor valor de inducción/inhibición más intenso es el color).

### 1.7. Niveles de expresión de diferentes genes identificados en el microarray.

Dada la importancia en los procesos de adaptación a salinidad de algunos de los genes identificados en el microarray, se estudiaron sus niveles de expresión mediante RT-PCR (Figura 45). El análisis reveló la sobreexpresión en las células adaptadas de los genes *VAMP7C*, *DAD2*, *ACS2*, *AOX1A*, *P5CS2* y *PLD $\alpha$ 1*. De entre los genes estudiados, tres de ellos mostraron inhibición en condiciones de estrés salino: *KCO6*, *CYD3;1* y *SOS2*. Cabe destacar que a excepción de un único gen, *ATBI-1*, el resto mostraron el mismo comportamiento en su expresión al analizarlos tanto por microarray como por RT-PCR.

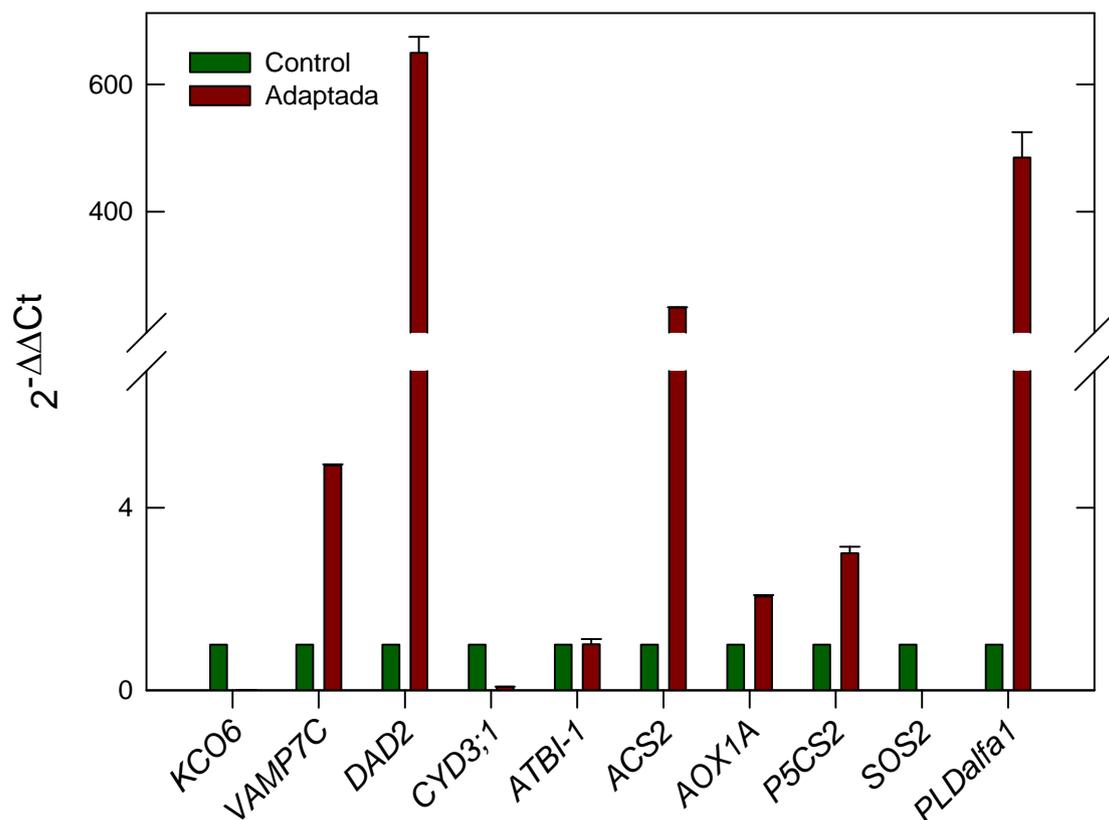


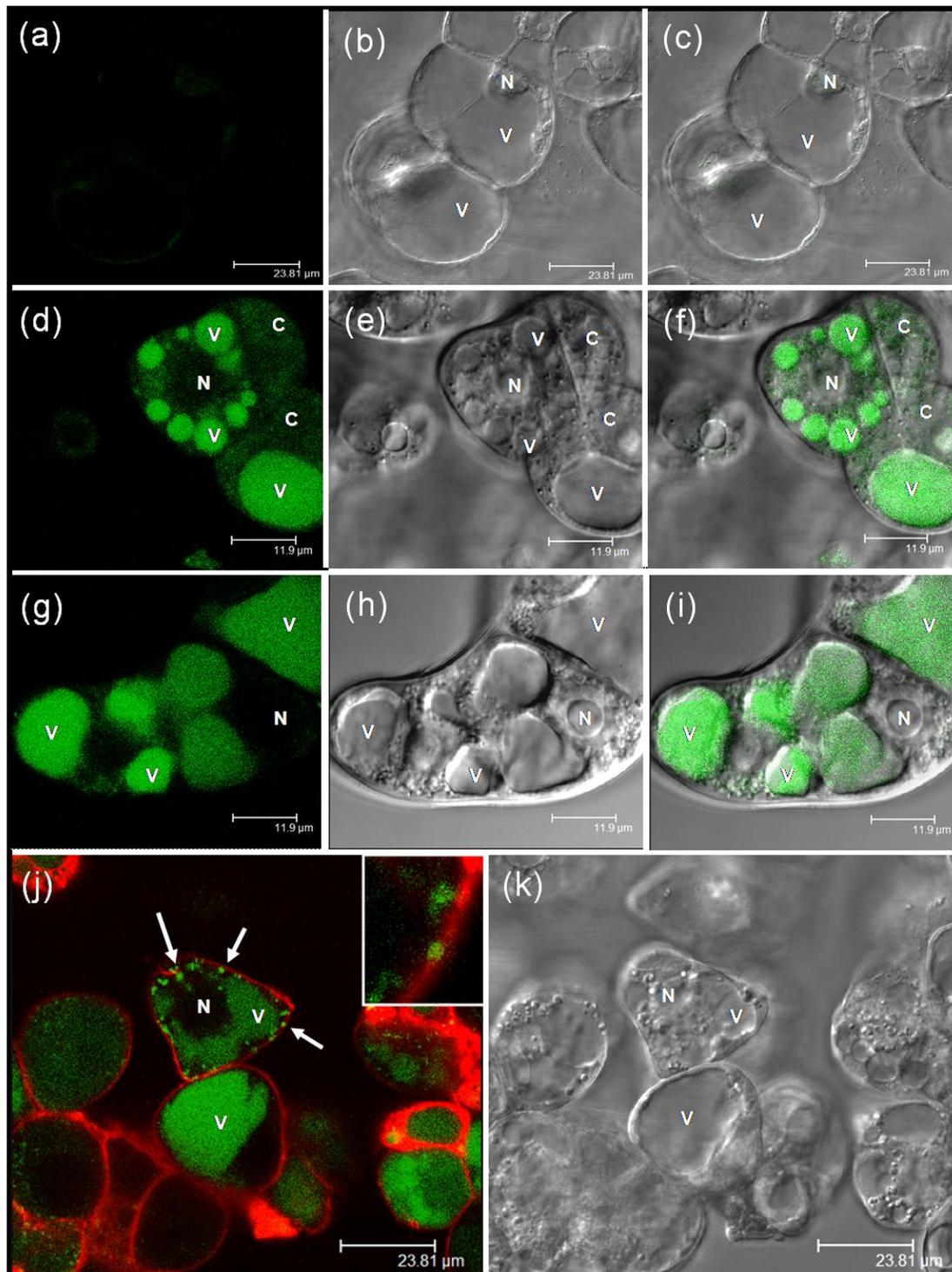
Figura 45. Niveles de expresión de diferentes genes identificados en el microarray e implicados en los procesos de adaptación a salinidad.

### 1.8. Localización subcelular in vivo de Na<sup>+</sup>.

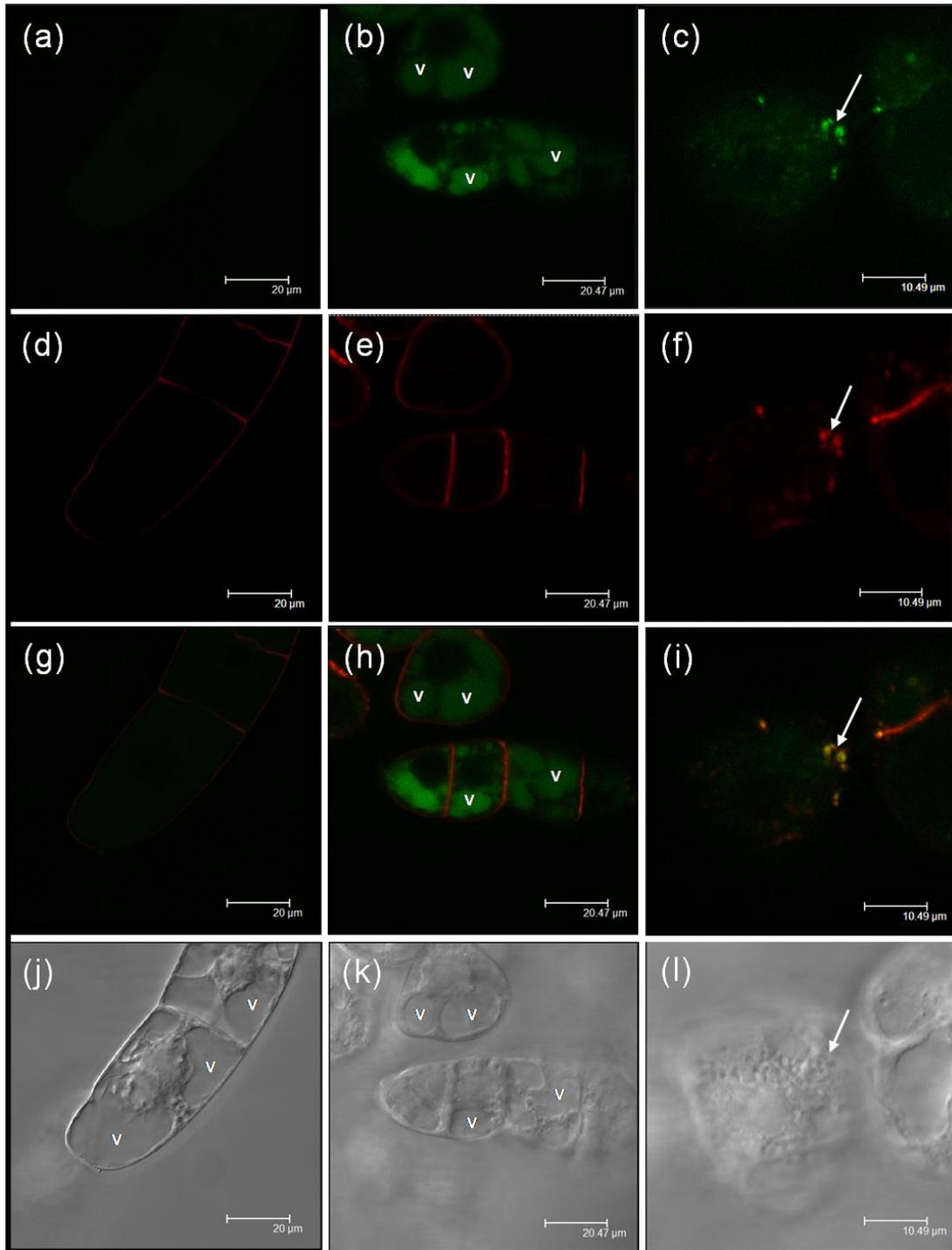
Para la localización subcelular de Na<sup>+</sup> se utilizaron los fluoróforos CoroNa-Green y Asante Natrium Green-1. En estos ensayos también se utilizó FM4-64 como marcador de endocitosis, incubando las muestras con el fluoróforo en pulsos cortos de 5 minutos. Por otro lado, solamente se tomaron como válidas las observaciones realizadas en aquellas células en las que FM4-64 marcaba única y exclusivamente la membrana plasmática, desestimando los resultados observados en células completamente teñidas por el fluoróforo, indicativo de alteraciones graves en la permeabilidad de la membrana plasmática por lo que estas células fueron consideradas como no viables.

Los resultados mostrados en las Figuras 46 y 47 ponen de manifiesto la gran acumulación de Na<sup>+</sup> en las vacuolas de las células adaptadas, reflejada como valores de intensidad de emisión de los fluoróforos CoroNa-Green y Natrium Green-1, respecto a las células control, en las que prácticamente no se recoge señal. Por tanto, podemos afirmar que la compartimentalización de Na<sup>+</sup> en las vacuolas de las células BY-2 constituye un mecanismo relevante durante los procesos de adaptación a salinidad. Para cuantificar los valores de intensidad en la señal de emisión del fluoróforo CoroNa-Green tanto en citoplasma como en vacuola se utilizó una herramienta facilitada por el software propio del microscopio de láser confocal que permite al usuario seleccionar diferentes regiones de interés (ROI). Así, en la figura 48 se muestra una célula adaptada sobre la que se seleccionaron 8 ROI (4 en el citoplasma y 4 en las vacuolas) para cuantificar los valores de intensidad. Estos resultados muestran, de forma evidente, los elevados valores de intensidad alcanzados en las vacuolas con respecto al citoplasma.

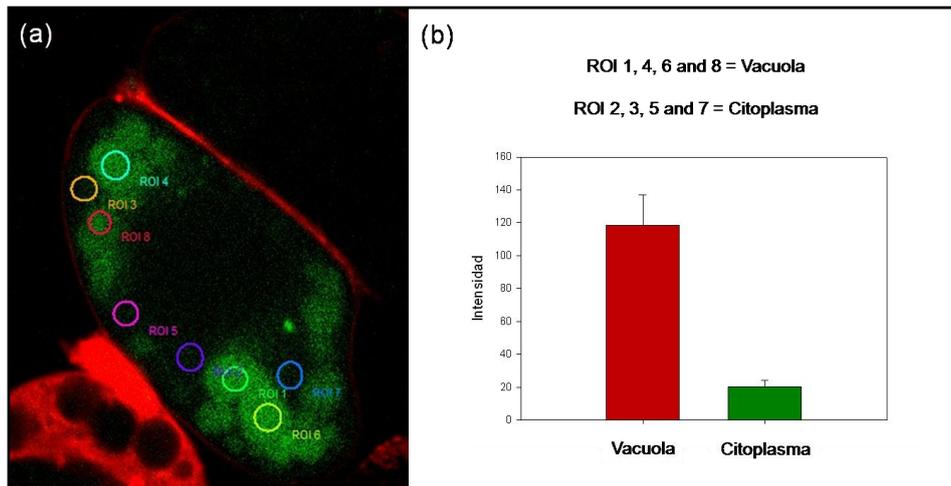
Así mismo, resulta de especial interés la colocación en la señal de emisión tanto de CoroNa-Green como de Asante Natrium Green-1 con FM4-64 en lo que parecen ser vesículas de endocitosis próximas a la membrana plasmática (Figura 46j, Figura 47i y Figura 49). Estos resultados podrían estar confirmando la participación de los mecanismos de endocitosis en la tolerancia al estrés salino.



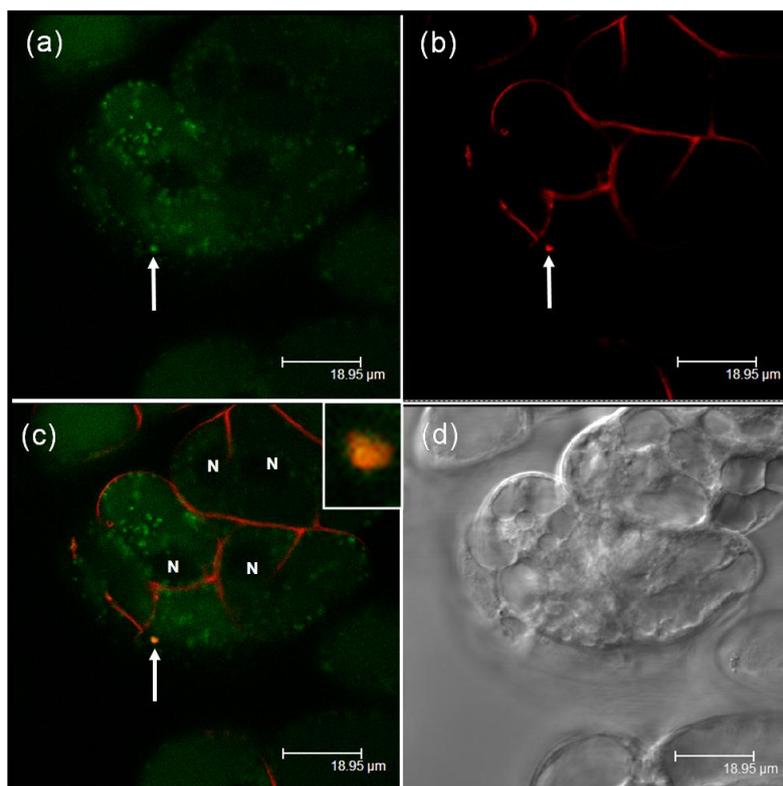
**Figura 46. Localización subcelular de  $\text{Na}^+$  *in vivo* con CoroNa-Green.** Las imágenes (a-c) muestran células control, (d-k) corresponden a células adaptadas. Todas las muestras se tomaron en fase de crecimiento exponencial y se incubaron con CoroNa-Green (verde-imágenes a, d y g) y FM4-64 (rojo-imagen j). Las imágenes (b, e, h y k) corresponden a las mismas células observadas con la técnica Normansky. En (j) se muestra un detalle de la colocalización en la señal de emisión entre CoroNa-Green y FM4-64. Las flechas marcan posibles vesículas de  $\text{Na}^+$ . C: citoplasma; N: núcleo; V: vacuola.



**Figura 47. Localización subcelular de  $\text{Na}^+$  *in vivo* con Asante Natrium Green-1.** Las imágenes (a, d, g y j) muestran células control, (b, c, e, f, h, i, k y l) corresponden a células adaptadas. Las imágenes (j, k y l) corresponden a las mismas células observadas con la técnica Normansky. Todas las muestras se tomaron en fase de crecimiento exponencial y se incubaron con Asante Natrium Green-1 (verde-imágenes a, b y c) y FM4-64 (rojo-imágenes d, e y f). Las imágenes (g, h e i) corresponden a la superposición de ambos fluoróforos. En (i) se muestra un detalle de la colocalización en la señal de emisión entre Asante Natrium Green-1 y FM4-64. V: vacuola.



**Figura 48.** Cuantificación de los valores de intensidad del fluoróforo CoroNa-Green en células adaptadas. La cuantificación se realizó seleccionando 8 regiones de interés (ROI) tanto en vacuola como en citoplasma.

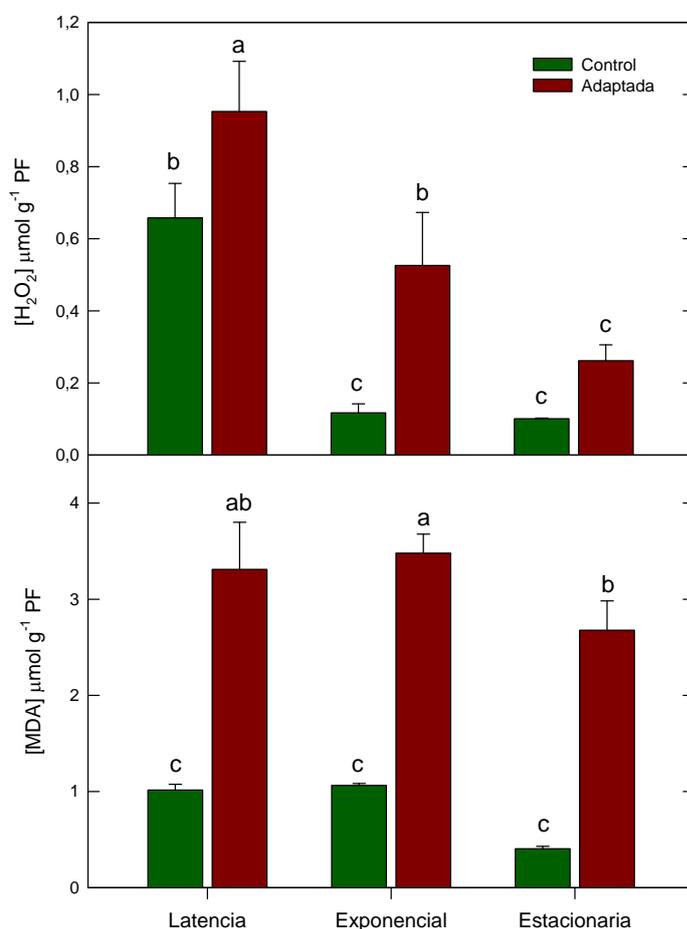


**Figura 49.** Colocalización *in vivo* de las señales de emisión de los fluoróforos Asante Natrium Green-1 y FM4-64 en células adaptadas. Las muestras se tomaron en fase de crecimiento exponencial y se incubaron con Asante Natrium Green-1 (verde-imagen a) y FM4-64 (rojo-imagen b). En (c) se muestra la superposición de ambos fluoróforos. La imagen (d) muestra las mismas células observadas con la técnica de Normansky. En (b) se muestra un detalle de la colocalización en la señal de emisión entre Asante Natrium Green-1 y FM4-64 (flecha). N: núcleo.

## 1.9. ROS.

1.9.1. Niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y malondialdehído.

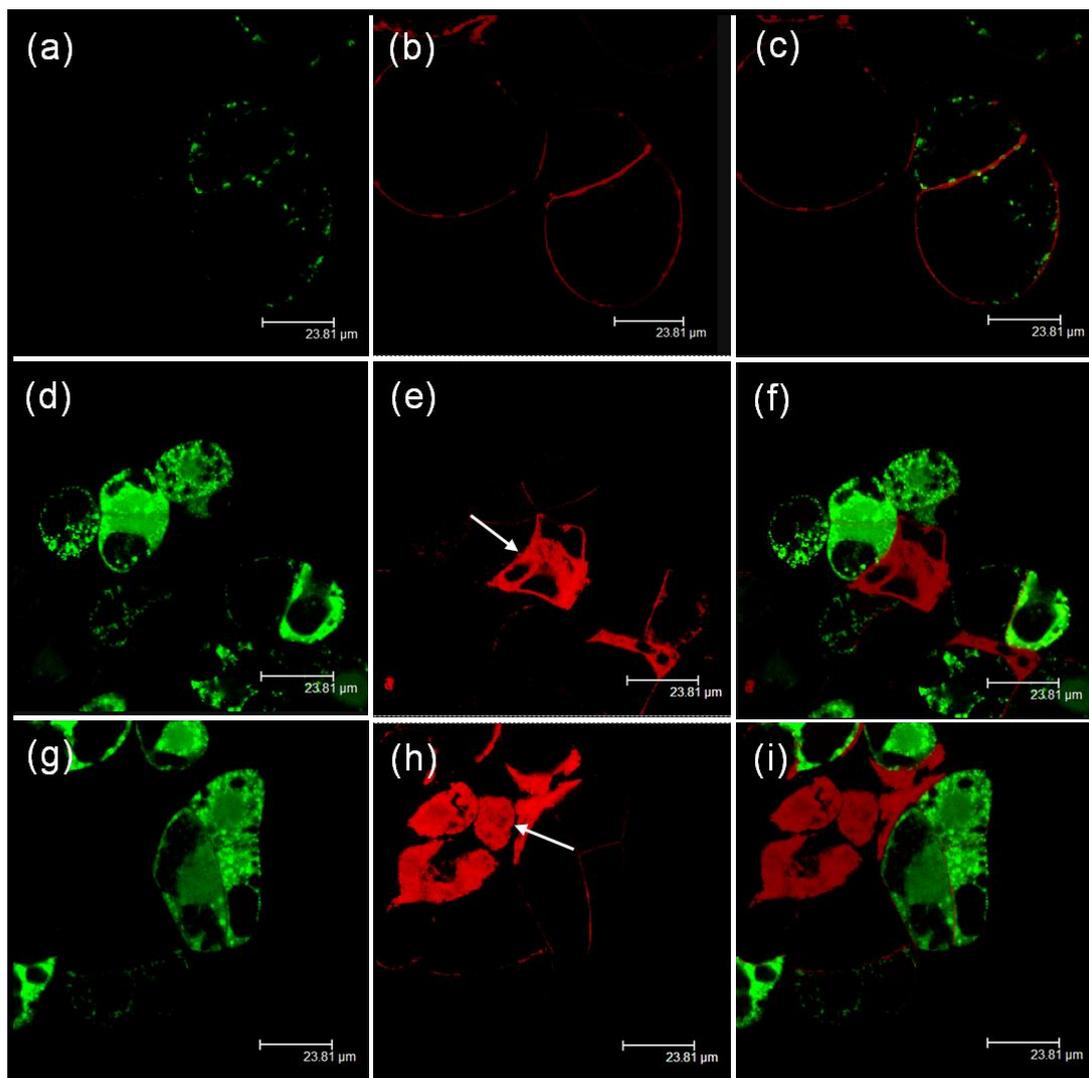
Tanto los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como los de peroxidación lipídica, medida como el contenido en MDA, resultan superiores en la línea celular adaptada respecto a la control, estableciéndose diferencias significativas en cada una de las fases de crecimiento salvo en el caso de la fase estacionaria para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 50). Por otra parte, mientras que para la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se produce, en ambas líneas celulares, un máximo al inicio del cultivo cayendo posteriormente de forma gradual, en el caso de la peroxidación lipídica los valores permanecen estables, con ligeras modificaciones, a lo largo de todo el ciclo de cultivo.



**Figura 50. Niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peroxidación lipídica.** Los gráficos muestran los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (μmol g<sup>-1</sup> PF) y peroxidación lipídica, medida como el contenido en MDA (μmol g<sup>-1</sup> PF), en las líneas celulares control y adaptada en las diferentes fases del ciclo de cultivo. Los datos representan los valores medios ± error estándar, n=5. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Tukey (p<0,05).

### 1.9.2. Localización subcelular *in vivo* de ROS.

La localización subcelular de ROS se realizó utilizando el fluoróforo DCFH-DA. Así mismo, el uso de FM4-64 a tiempos cortos (5 minutos) resulto de gran utilidad como indicador de la viabilidad celular. La Figura 51 muestra la clara diferencia que se establece entre la intensidad de señal del fluoróforo DCFH-DA en las células control respecto a las células adaptadas. Estas ROS tienen localización citoplasmática en ambas líneas celulares siendo mucho mayor el marcaje en las células adaptadas.



**Figura 51. Localización subcelular *in vivo* de ROS.** Las imágenes (a-c) corresponden a células control, (d-i) muestran células adaptadas. Todas las muestras se tomaron en fase de crecimiento exponencial y se incubaron con DCFH-DA (verde-imágenes a, b y g) y FM4-64 (rojo-imágenes b, d y e). Las imágenes (c, f e i) corresponden a la superposición de ambos fluoróforos. En (e y h) las flechas indican células no viables teñidas completamente con FM4-64.

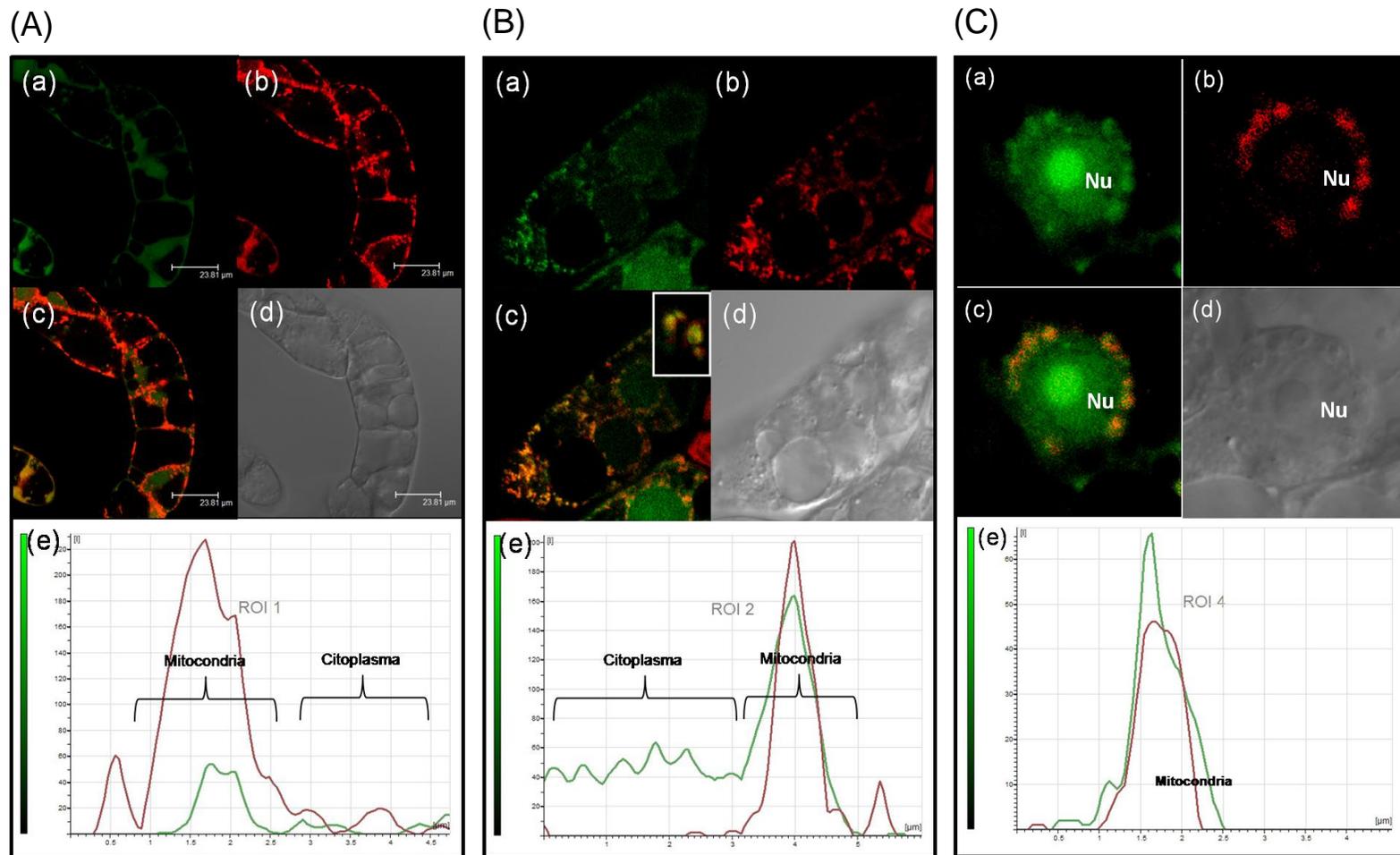
### 1.9.3. Colocalización in vivo de ROS y mitocondrias.

Para determinar si las mitocondrias estaban participando de forma activa en la producción de ROS se incubaron muestras de ambas líneas celulares en fase de crecimiento exponencial con DCFH-DA y Mito Tracker Deep Red 633. En la Figura 52 se muestran imágenes de células control (A) y adaptadas ((B) y (C)) teñidas con DCFH-DA (a) y Mito Tracker Deep Red 633 (b), así como las imágenes superpuestas de ambos fluoróforos (c) y la imagen en CID (c). Adjunto a cada grupo de imágenes aparece un gráfico que muestra la cuantificación de los valores de intensidad para ambos fluoróforos a lo largo de un segmento lineal trazado a una célula de la muestra. La línea verde representa los valores de intensidad para el fluoróforo DCFH-DA. La línea roja indica los valores de intensidad del fluoróforo Mito Tracker Deep Red 633, por tanto, la presencia de una mitocondria se muestra como un pico. En este sentido, resulta evidente la elevada producción de ROS en las células adaptadas respecto al control, presentando la línea base para la intensidad de DCFH-DA, en la zona que corresponde al citoplasma, valores muy superiores respecto al control. Así mismo, destaca la gran producción de ROS en las mitocondrias de las células adaptadas.

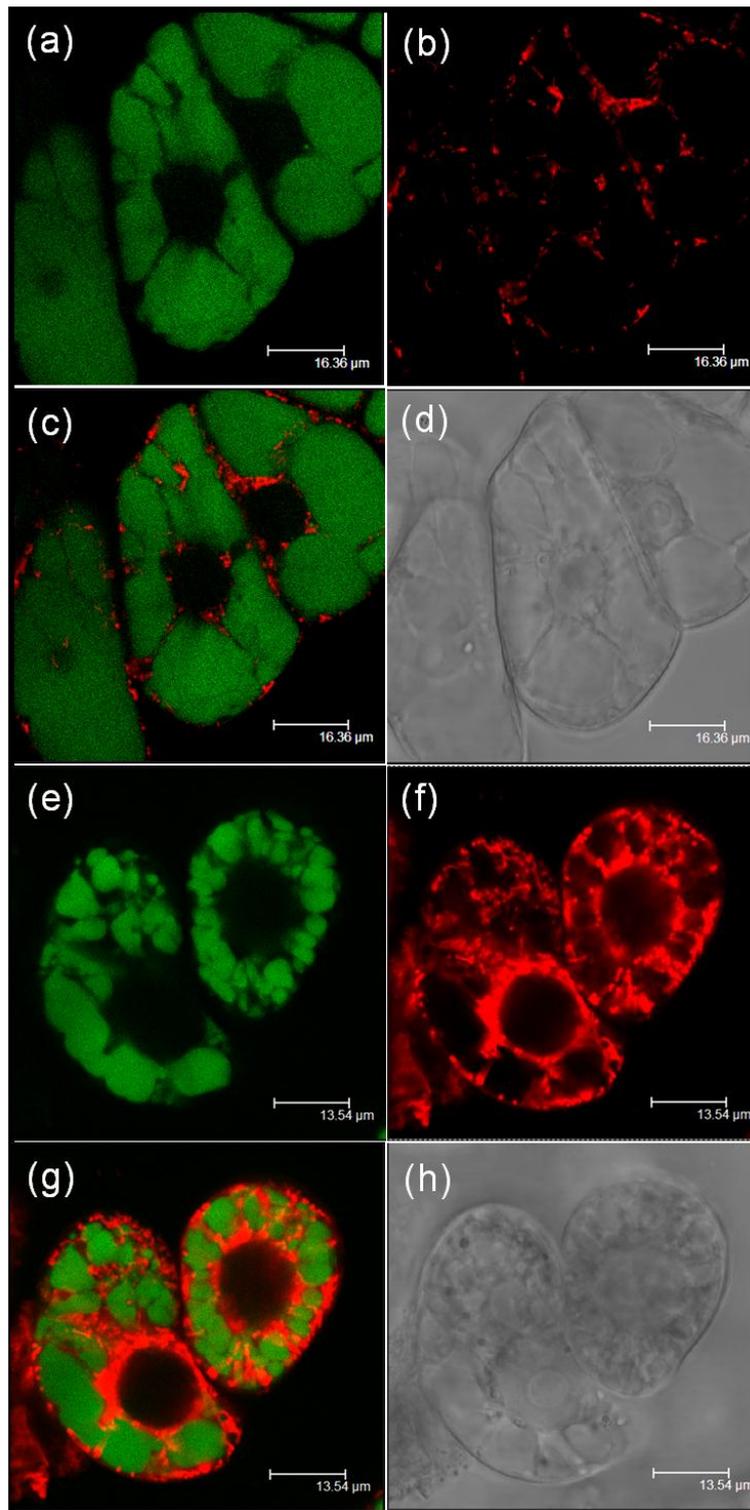
### 1.10. Estructura celular.

#### 1.10.1. Localización subcelular in vivo de vacuolas y mitocondrias.

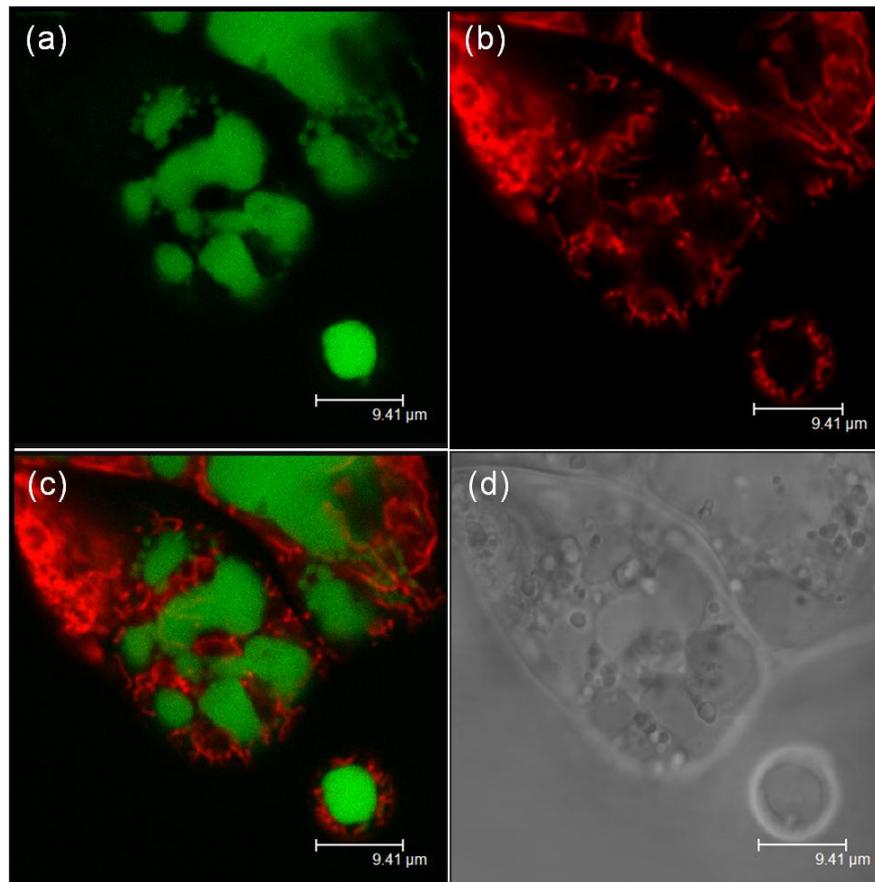
La localización subcelular *in vivo* de vacuolas y mitocondrias se realizó utilizando los fluoróforos monoclorobimane y Mito Tracker Deep Red 633 respectivamente. Las muestras de ambas líneas celulares, en fase de crecimiento exponencial, se incubaron simultáneamente con ambos compuestos. Las Figuras 53 y 54 muestran imágenes de microscopía confocal en las que podemos observar la gran abundancia de mitocondrias en las células adaptadas respecto al control, resultando interesante su gran acumulación entorno al núcleo. Así mismo, se aprecia una alteración en el sistema vacuolar tras el proceso de adaptación a salinidad, de forma que en las células adaptadas las vacuolas son más pequeñas y numerosas que en las control, donde ocupan prácticamente la totalidad del volumen celular.



**Figura 52. Colocalización *in vivo* de ROS y mitocondrias.** Las imágenes muestran células BY-2 control (A) y adaptadas ((B) y (C)) en fase de crecimiento exponencial incubadas con DCFH-DA (verde-imágenes a) y Mito Tracker Deep Red 633 (rojo-imágenes b). Las imágenes (c) corresponden a la superposición de ambos fluoróforos. En (d) se muestran las mismas células observadas con la técnica Normansky. Los gráficos adjuntos a cada imagen muestran los valores de intensidad de ambos fluoróforos en mitocondria y citoplasma de las muestras.



**Figura 53. Localización subcelular *in vivo* de vacuolas y mitocondrias.** Las imágenes (a-d) corresponden a células control, (e-h) muestran células adaptadas. Todas las muestras se tomaron en fase de crecimiento exponencial y se incubaron con monoclorobimane (verde-imágenes a y e) y Mito Tracker Deep Red 633 (rojo-imágenes b y f). Las imágenes (c y g) corresponden a la superposición de ambos fluoróforos. En (d y h) se muestran las mismas células observadas con la técnica de Normansky.

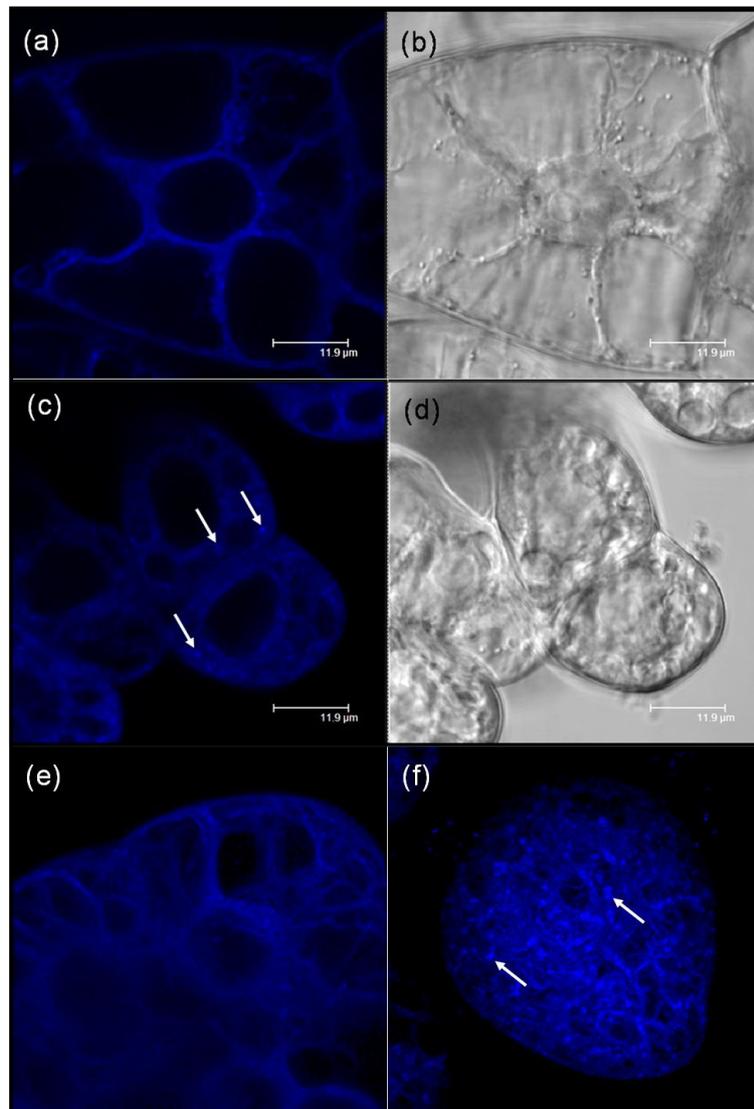


**Figura 54. Localización subcelular *in vivo* de vacuolas y mitocondrias.** Las imágenes corresponden a células adaptadas. Las muestras se tomaron en fase de crecimiento exponencial y se incubaron con monoclorobimane (verde-imagen a) y Mito Tracker Deep Red 633 (rojo-imagen b). La imagen (c) corresponde a la superposición de ambos fluoróforos. En (d) se muestran las mismas células observadas con la técnica de Normansky.

### 1.10.2. Localización subcelular *in vivo* del retículo endoplasmático.

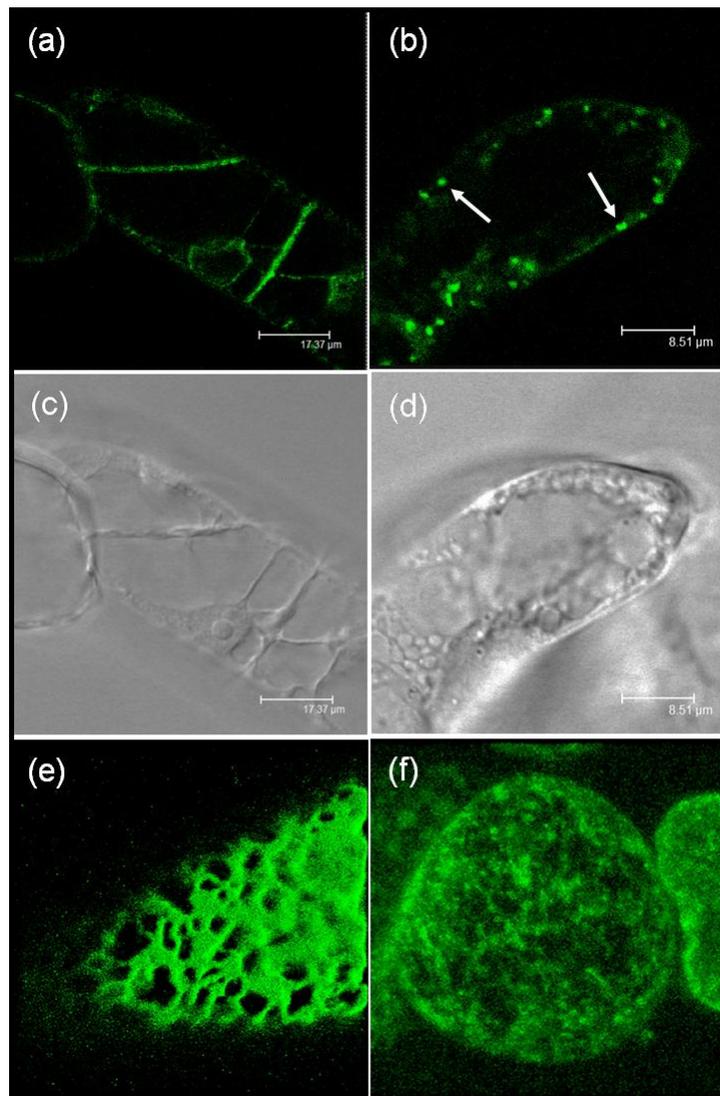
Para el estudio de las alteraciones producidas en la estructura del retículo endoplasmático (RE) como consecuencia del proceso de adaptación a salinidad se utilizaron tanto la línea celular silvestre como la transformada con GFP. En ambos casos se recurrió a la microscopía de láser confocal. Las muestras de la línea celular silvestre se incubaron con ER-Tracker Blue-White DPX. La Figura 55 muestra células control y adaptadas de la línea celular silvestre en la que podemos observar cómo el complejo entramado de membranas formado por el RE se encuentra mucho más desarrollado en las células adaptadas respecto al control. Dado que el software del microscopio de láser confocal facilita una herramienta para realizar reconstrucciones

tridimensionales, se hizo uso de la misma para crear imágenes volumétricas de la red formada por el RE en células de ambas líneas. Las imágenes 55e y 55f muestran reconstrucciones 3D de células control y adaptadas respectivamente. Estas imágenes confirman los resultados previos, mostrando el RE de las células adaptadas una estructura formada por sáculos individuales de forma más o menos esférica.



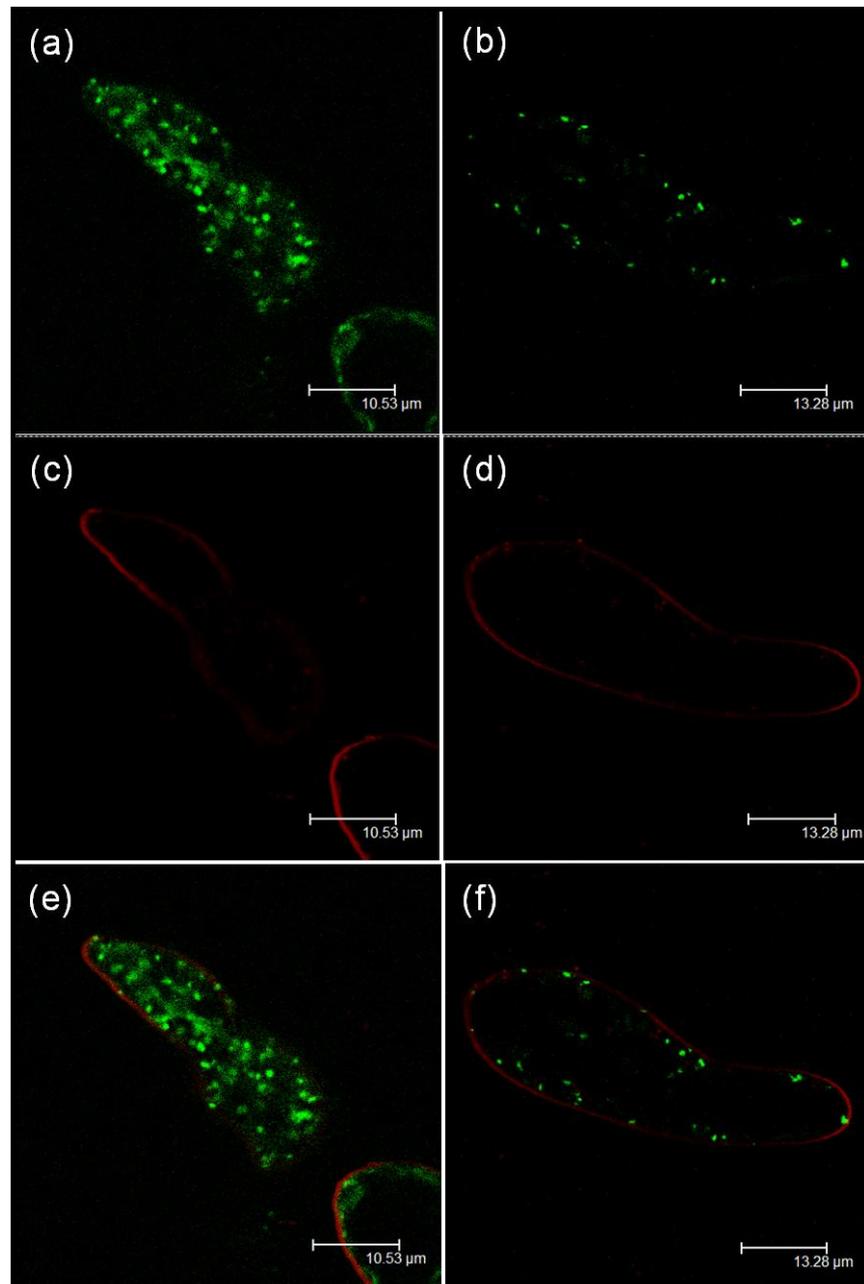
**Figura 55. Localización subcelular *in vivo* del retículo endoplasmático en células de la línea silvestre.** Las imágenes (a), (b) y (e) muestran células control, (c), (d) y (f) células adaptadas. Las muestras se tomaron en fase de crecimiento exponencial y se incubaron con ER-Tracker Blue-White DPX (azul-imágenes a, c, e y f). Las imágenes (b y d) corresponden a las mismas células observadas con la técnica de Normansky. En (e y f) se muestran reconstrucciones tridimensionales del retículo endoplasmático de células control y adaptadas respectivamente.

Para obtener información adicional al respecto, se procedió a la observación de la línea celular transformada con GFP. En este sentido, Las células control mostraron una distribución típica del RE. En sección transversal se puede observar la fluorescencia de la GFP en el citoplasma periférico, en los filamentos citoplasmáticos y en la envoltura nuclear (Figura 56a). Sin embargo, en las células adaptadas se observó la fluorescencia en el citoplasma en forma de estructuras discretas circulares (Figura 56b). Así mismo, también se realizaron reconstrucciones tridimensionales de la red formada por el retículo endoplasmático (Figura 56e, f y vídeos en el CD adjunto).



**Figura 56. Localización subcelular *in vivo* del retículo endoplasmático en células de la línea transformada con GFP.** Las imágenes (a), (c) y (e) muestran células control, (b), (d) y (f) células adaptadas. En (a y b) se muestra la emisión de GFP. Las imágenes (c y d) corresponden a las células observadas con la técnica de Normansky. Las imágenes (e y f) corresponden a reconstrucciones 3D del retículo endoplasmático de células control y adaptadas respectivamente. Las muestras se tomaron en fase de crecimiento exponencial.

Adicionalmente, y para confirmar la viabilidad de estas células en las que se apreciaban alteraciones en la estructura del RE, se realizaron observaciones en muestras teñidas con FM4-64. Estos ensayos confirmaron los resultados anteriores (Figura 57).



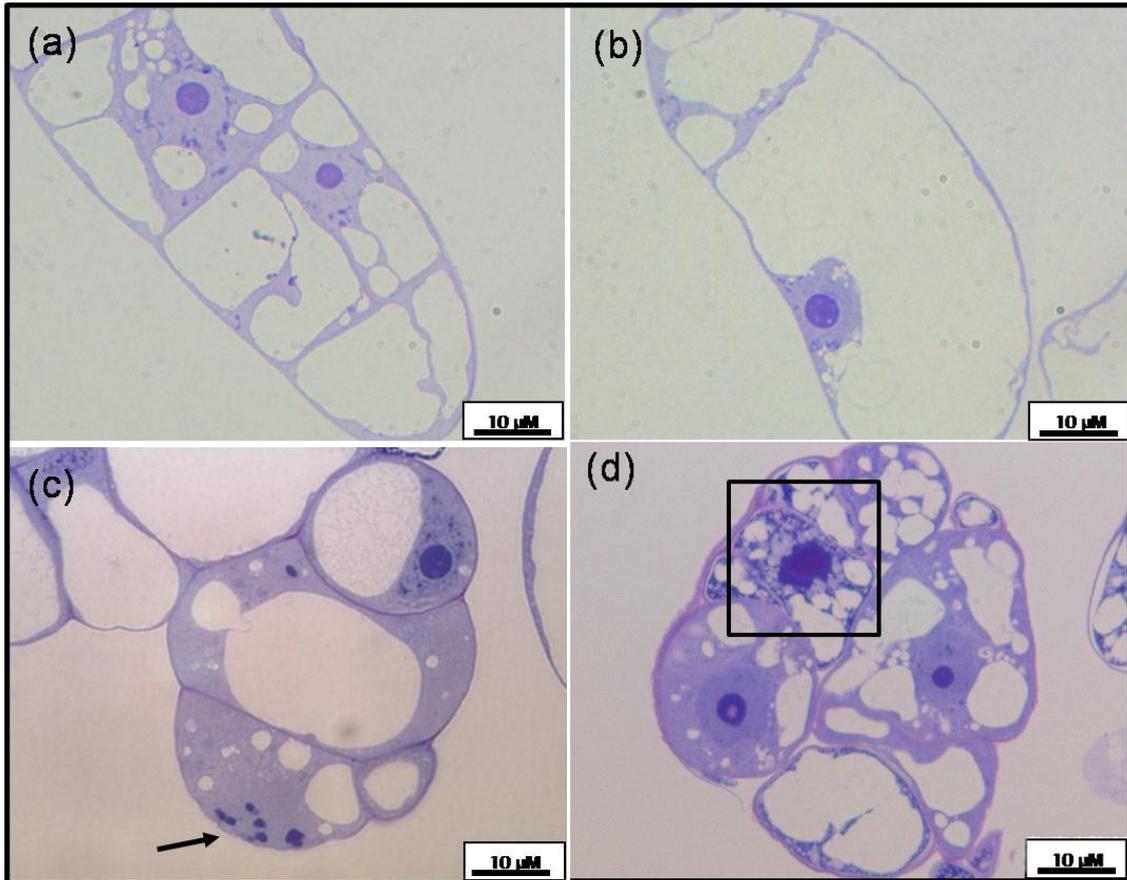
**Figura 57. Localización subcelular *in vivo* del retículo endoplasmático en células adaptadas de la línea transformada con GFP.** Las imágenes (a, c y e) y (b, d y f) corresponden a dos células adaptadas diferentes. Las muestras se tomaron en fase de crecimiento exponencial y se incubaron con FM4-64 (rojo-imágenes c y d). Las imágenes (a y b) corresponden a la emisión de GFP. En (e y f) se muestra la superposición de GFP y FM4-64.

### 1.10.3. Morfología celular.

Para estudiar la morfología celular se analizaron secciones semifinas de muestras tomadas en cada uno de los puntos de la curva de crecimiento de ambas líneas celulares. Las únicas diferencias apreciables entre las diferentes fases de cultivo de cada línea celular fue la mayor o menor presencia de células en división y, por consiguiente, las variaciones en volumen celular. En este sentido, en las fases de latencia y exponencial abundarán las células activas mientras que en la fase de latencia resultarán mayoritarias las células quiescentes. En la Figura 58 se muestran imágenes de secciones semifinas correspondientes a células control (a y b) y adaptadas (c y d).

Las células control se caracterizan, en las primeras fases del ciclo de cultivo, por presentar una intensa actividad mitótica, formando rosarios de células a medida que se suceden las divisiones (Figura 58a), Estas células se caracterizan por la presencia de vacuolas grandes y un núcleo en posición central rodeado de citoplasma. Una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial, las células evolucionan hacia formas quiescentes, adoptando una forma alargada y desarrollándose una gran vacuola que desplaza al núcleo y al citoplasma hacia la periferia celular (Figura 58b).

Respecto a las células adaptadas, éstas se agrupan formando clusters a medida que se producen las divisiones mitóticas. Los clusters pueden estar formados por células jóvenes en desarrollo, de forma esférica y abundante citoplasma (Figura 58c), o bien por células que van evolucionando de forma progresiva hacia diferentes estadios, mostrando morfología irregular, alteraciones en el sistema vacuolar e indicios de muerte celular en el estado más avanzado (Figura 58d). Conviene destacar la presencia de diferentes estadios celulares en los cultivos adaptados a salinidad, ya que resultará de gran ayuda al analizar las imágenes de microscopía electrónica.

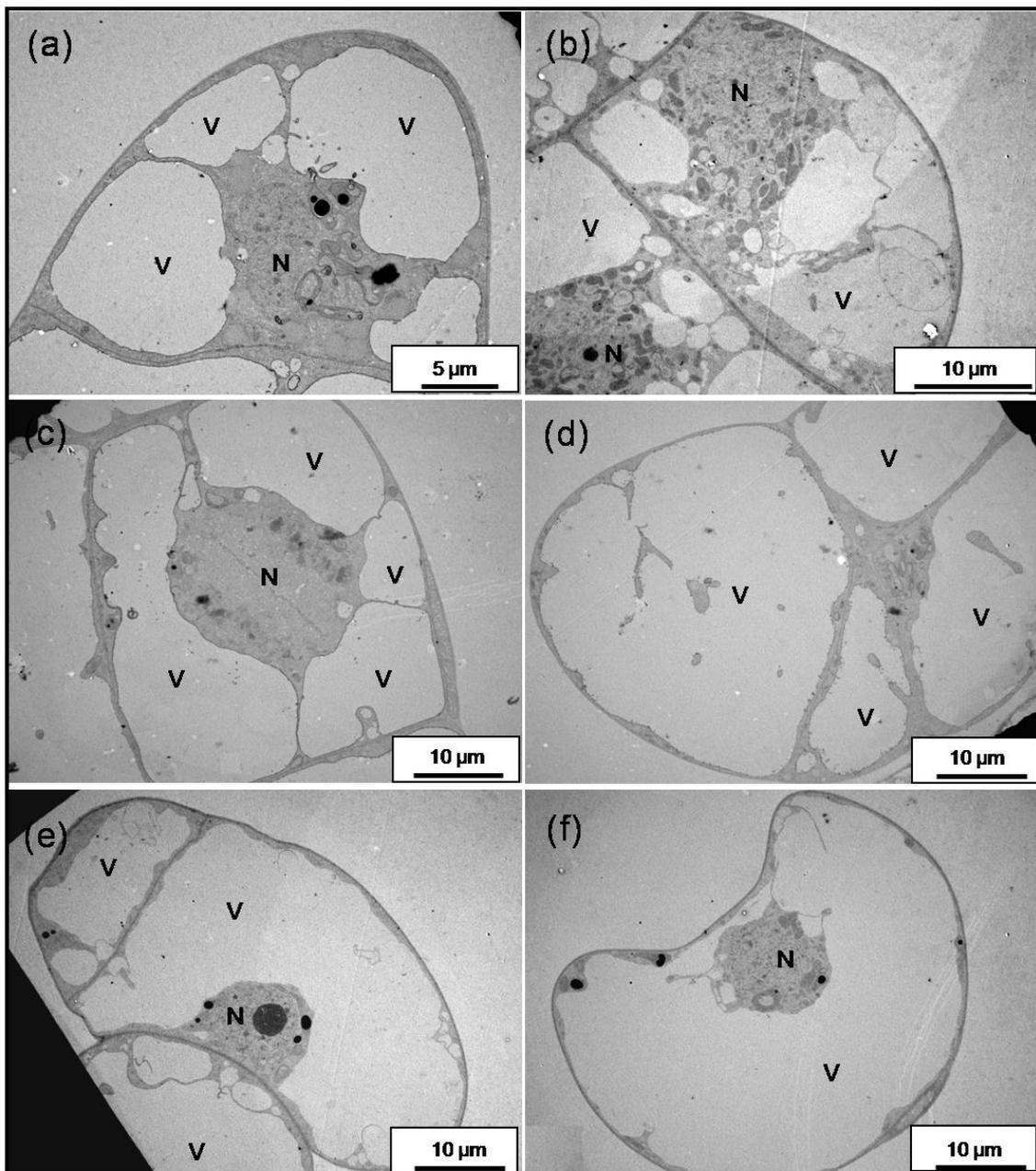


**Figura 58. Secciones semifinas de células control y adaptadas.** Las imágenes (a) y (b) muestran células control en fase de crecimiento exponencial y estacionaria respectivamente, (c) y (d) corresponden a células adaptadas en fase de crecimiento exponencial. La flecha en (b) indica un núcleo en división mitótica. En (d) se marca una célula que muestra signos evidentes de muerte celular.

#### 1.10.4. Ultraestructura celular.

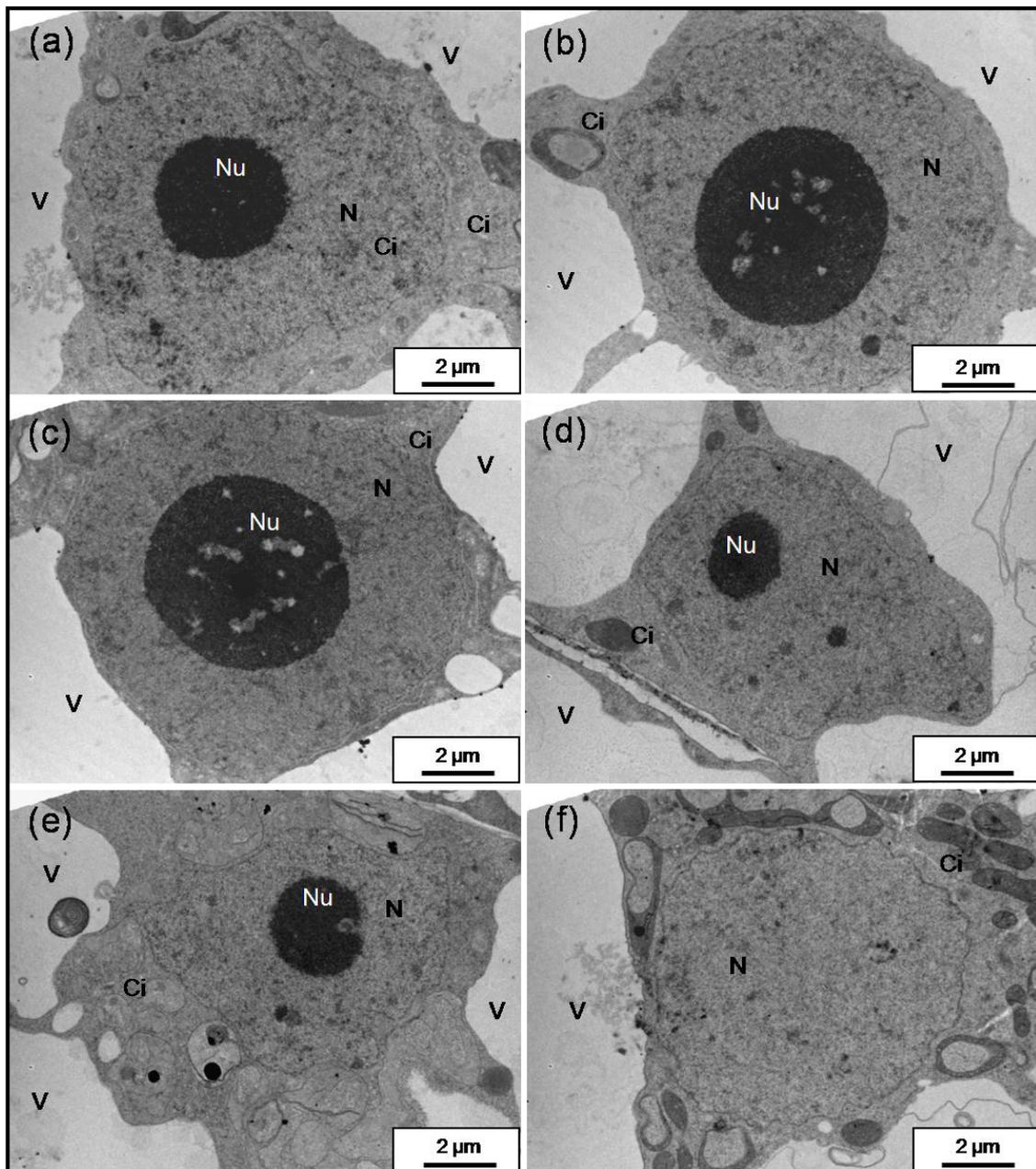
##### 1.10.4.1. Células control.

La ultraestructura general de las células de la línea control (Figura 59) refleja la presencia de citoplasma periférico y abundante entorno a un núcleo eucromatínico que puede presentar 1 o 2 nucleolos, raramente 3. Así mismo, tal y como se comentó anteriormente, las vacuolas aumentan progresivamente de tamaño a medida que el cultivo celular entra en fase estacionaria. En este sentido, las imágenes (a) y (b) representan células activas, en fase de crecimiento exponencial, que podrán derivar a células quiescentes como las mostradas en las imágenes (e) y (f).



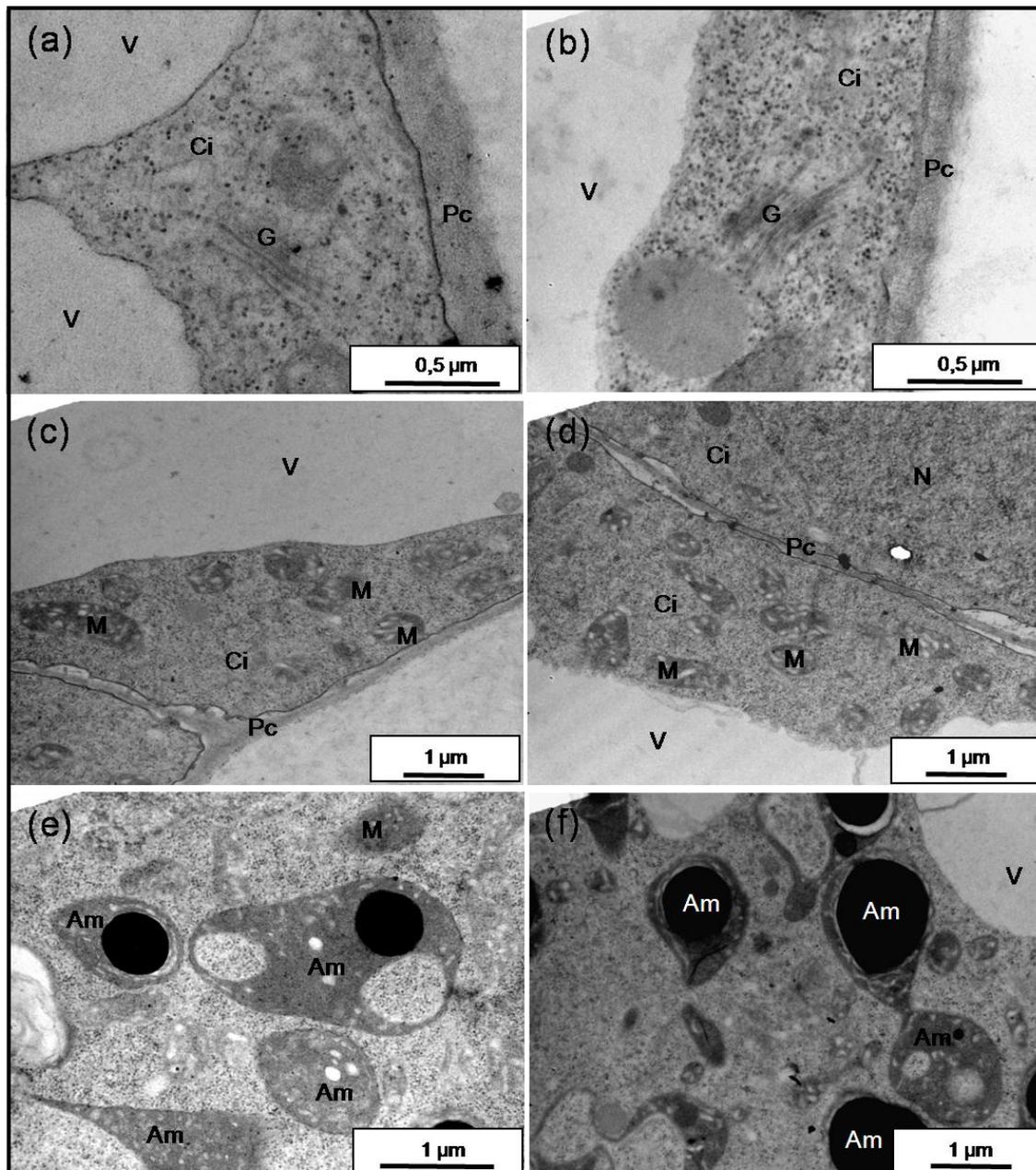
**Figura 59. Ultraestructura de células de la línea control.** Las imágenes (a), (b) y (c) representan células activas, En (c) puede observarse un núcleo en división mitótica. (d) muestra una célula que van derivando a forma quiescente. Las células de las imágenes (e) y (f) corresponden a formas completamente quiescentes. Obsérvese el progresivo aumento de volumen vacuolar. N: núcleo; V: vacuola.

En relación a la morfología nuclear, la Figura 60 muestra que se trata de núcleos eucromatínicos, regulares, rodeados por abundante citoplasma y con un nucléolo esférico en el que pueden distinguirse vacuolas nucleolares (Figuras 60b y c).



**Figura 60. Ultraestructura de núcleos en células de la línea control.** En las imágenes (b) y (c) pueden observarse vacuolas nucleolares. Ci: citoplasma; N: núcleo; Nu: nucléolo; V: vacuola. En

En el citoplasma resultan abundantes tanto las mitocondrias, pequeñas y con diámetros que no superan las 0,5  $\mu\text{m}$  (Figuras 61c y d), como los amiloplastos, generalmente con 1 o 2 gránulos de almidón (Figuras 61e y f). El aparato de Golgi, por el contrario, no resulta tan fácilmente observable, estando formado por el apilamiento de 4 a 5 cisternas (Figuras 61c y d). Así mismo, pudo observarse un perfil típico de la red de retículo endoplasmático .



**Figura 61. Ultraestructura de mitocondrias, amiloplastos y aparato de Golgi en células de la línea control.** Am: amiloplasto; Ci: citoplasma; G: aparato de Golgi; M: mitocondria; N: núcleo; Pc: pared celular; V: vacuola.

#### 1.10.4.2. Células adaptadas.

El análisis de la ultraestructura de las células adaptadas reflejó la presencia de distintos tipos celulares. Esto nos llevó a proponer que lo observado corresponde a diferentes fases por las que pasan las células adaptadas a salinidad. De esta forma, se han establecido 3 fases celulares en función de las diferencias ultraestructurales (Fases I, II y III), considerando que lo observado es una evolución desde la Fase I hasta el colapso y muerte celular (Figura 62).

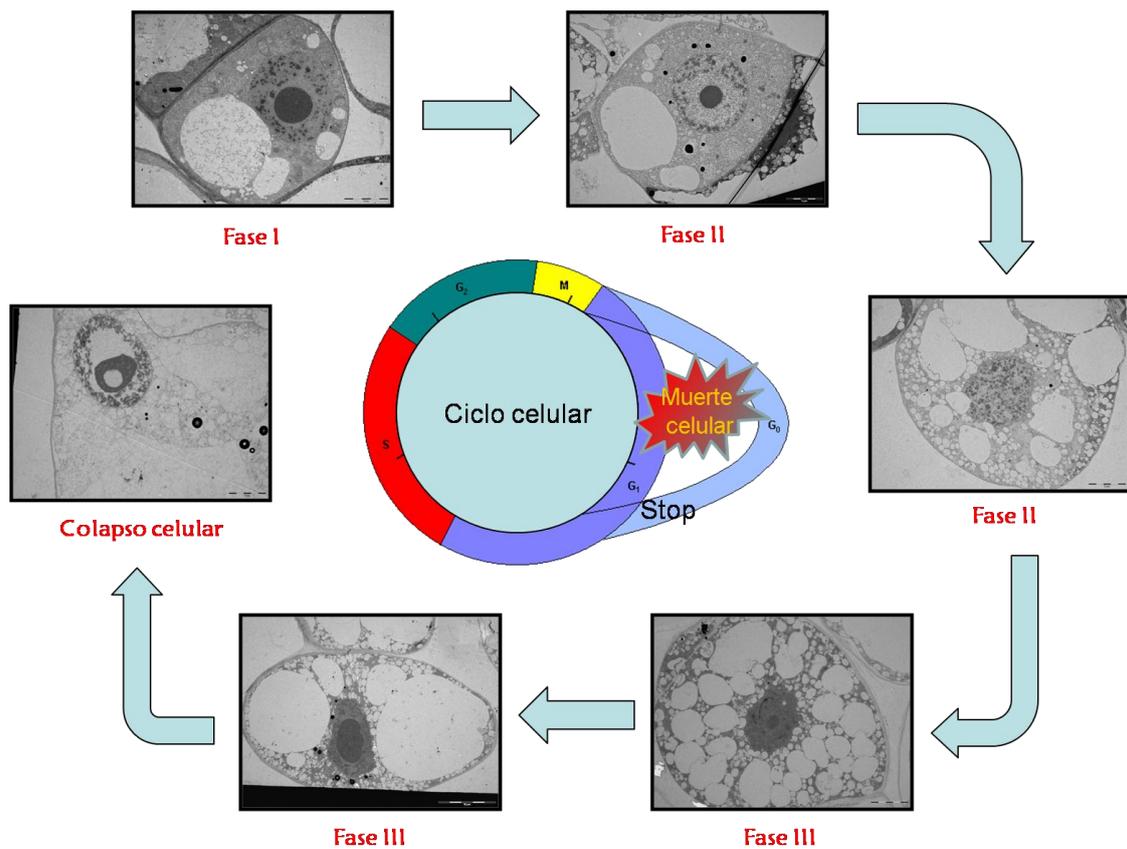
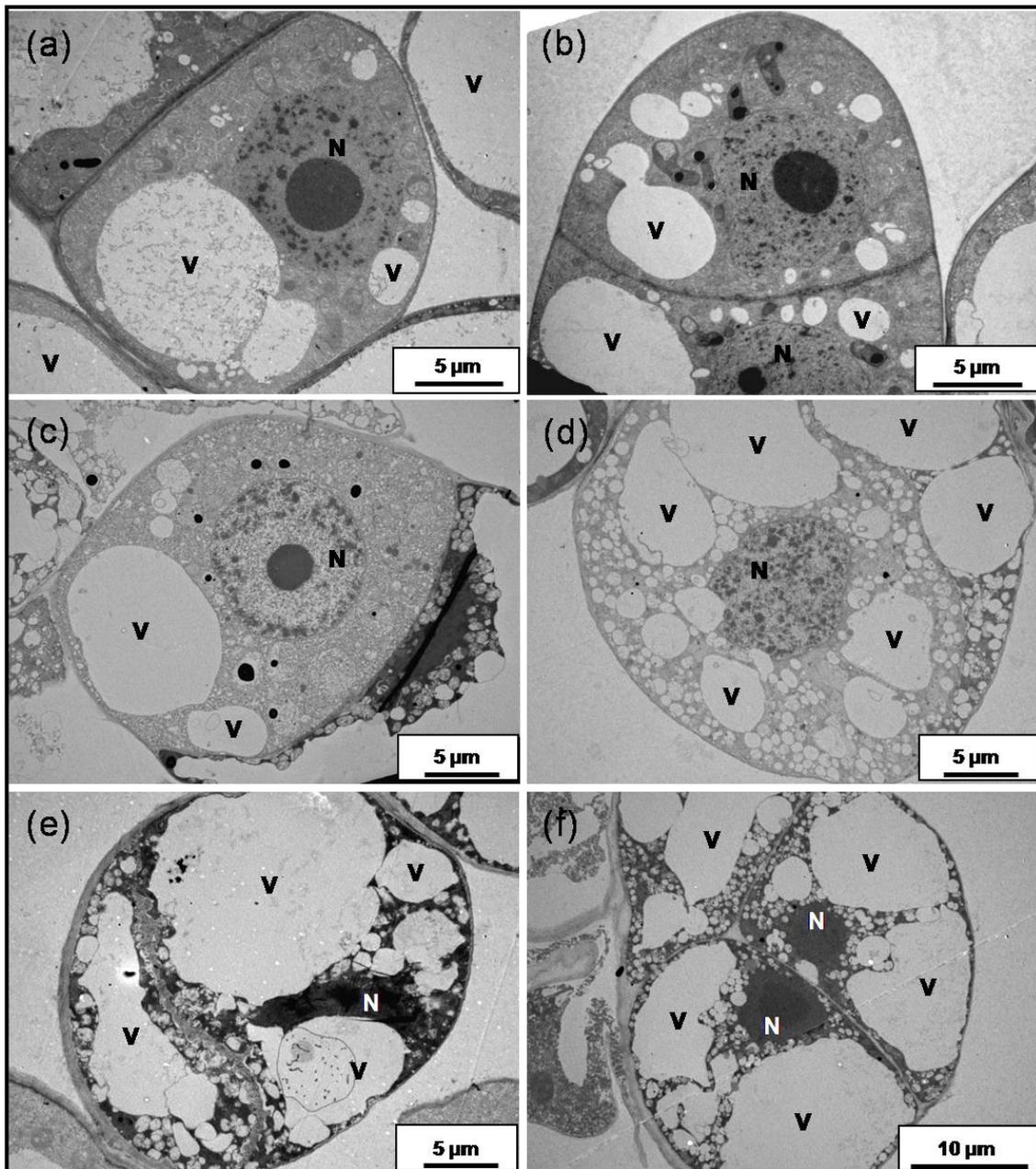


Figura 62. Esquema representativo de la evolución celular en condiciones salinas.

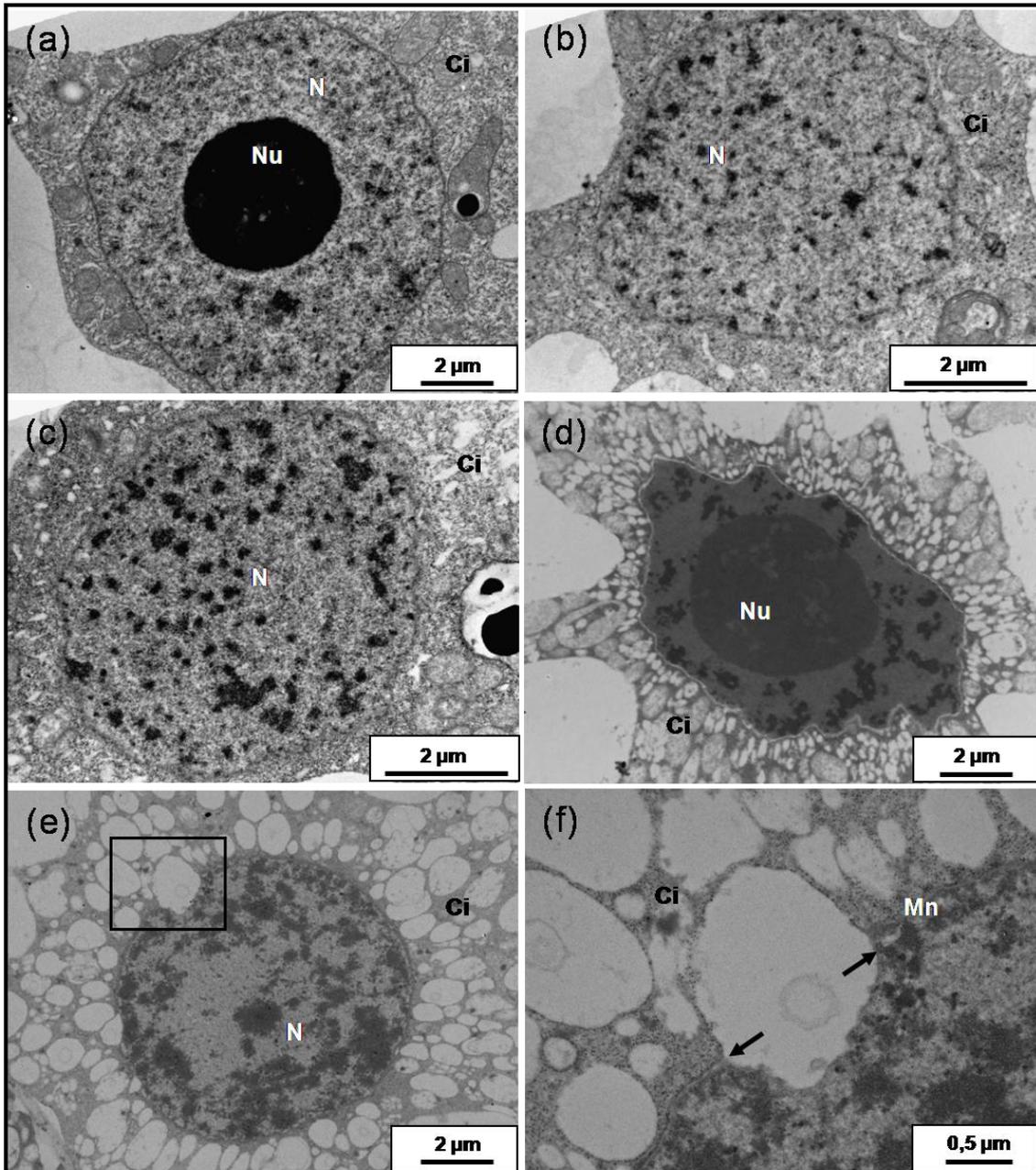
Cabe destacar que la ultraestructura general de las células adaptadas, en relación al control, refleja células más pequeñas y con abundante citoplasma. En Fase I (Figura 63a y b) las células se caracterizan por presentar una ultraestructura similar al control salvo por el mayor desarrollo del citoplasma y la el aumento del número de vacuolas.

Las células que se encuentran en Fase II (Figura 63c y d) muestran un núcleo ligeramente heterocromatínico y un gran desarrollo de vesículas en el citoplasma. En Fase III (Figura 63e y f) las vacuolas aumentan considerablemente de tamaño, los núcleos se hacen totalmente heterocromatínicos e irregulares, se incrementa el número de vesículas en el citoplasma y la pared celular se hace más gruesa e irregular.



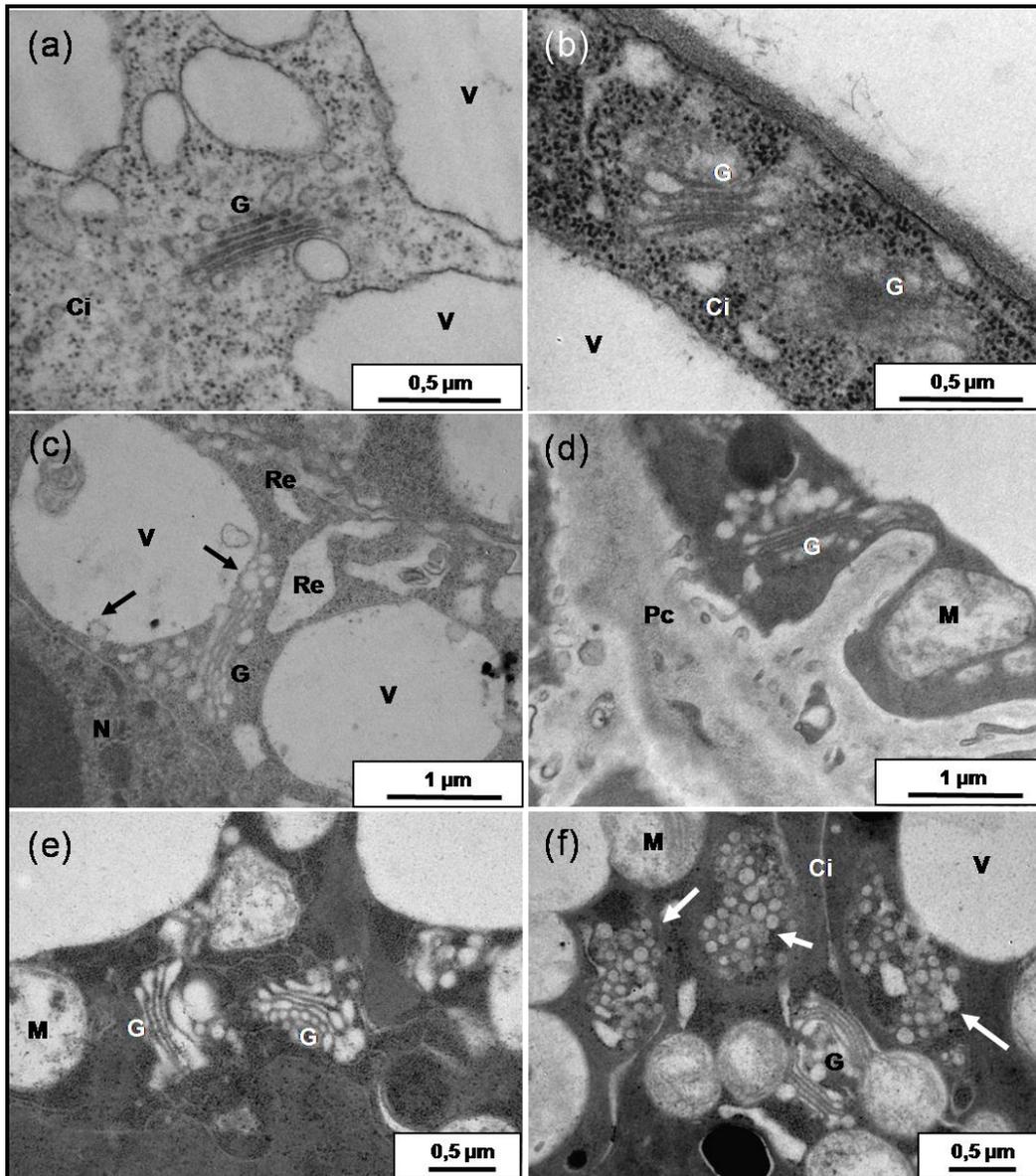
**Figura 63. Ultraestructura de células de la línea adaptada.** Las imágenes muestran la evolución celular a lo largo de las tres fases definidas (Fase I: a y b; Fase II: c y d; Fase III: e y f). N: núcleo; V: vacuola.

En cuanto a la morfología nuclear, tal y como se citó anteriormente, las células en Fase I muestran un núcleo regular, eucromatínico, con un único nucléolo en el que no se aprecian vacuolas nucleolares y rodeado por abundante citoplasma (Figura 64a). En el núcleo en Fase II comienza a aumentar la heterocromatina (Figura 64b y c). En Fase III el núcleo es totalmente heterocromatínico e irregular, resultando de especial interés las dilataciones observadas en la membrana nuclear (Figuras 64d, e y f).



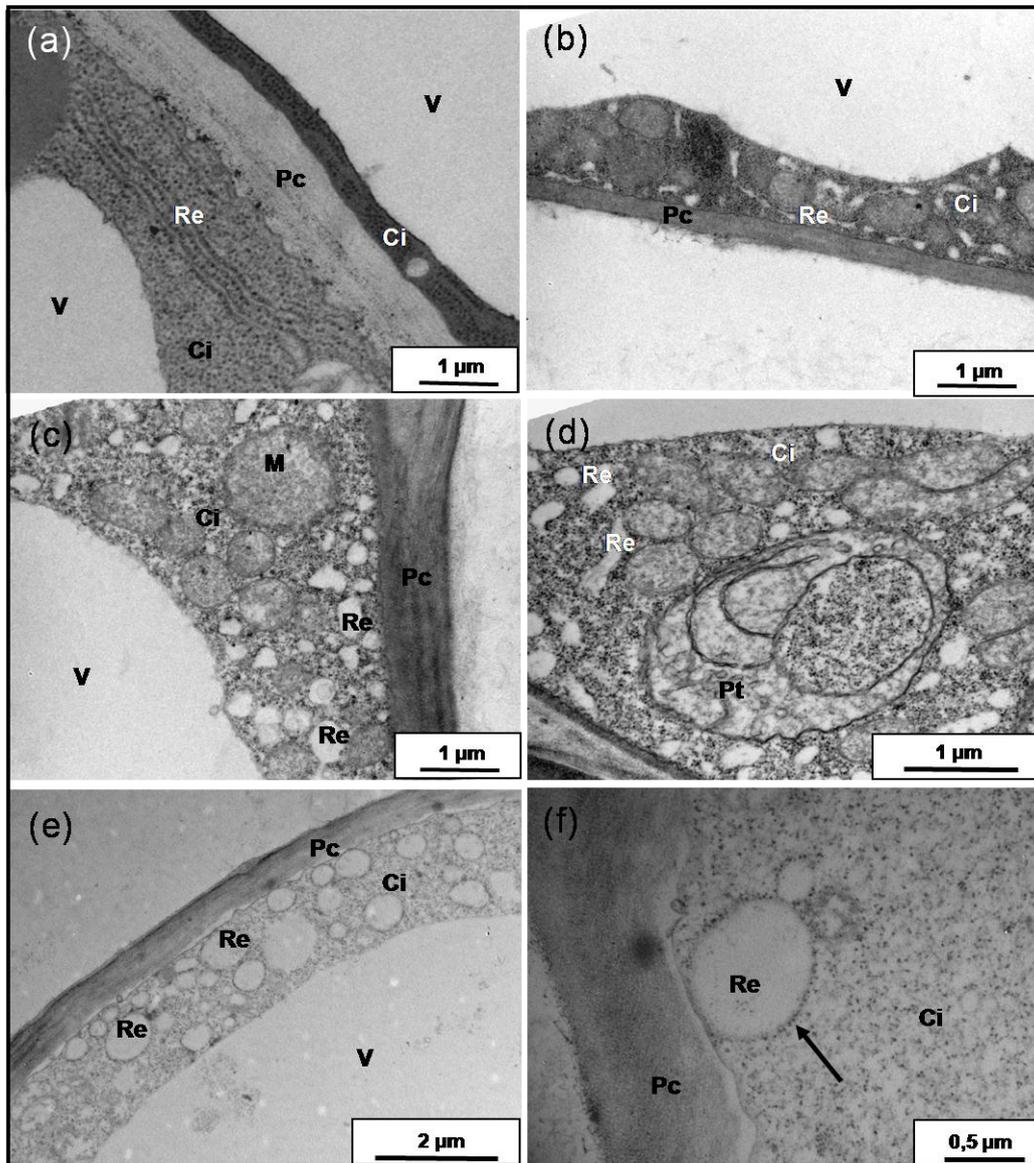
**Figura 64. Ultraestructura de núcleos en células de la línea adaptada.** En las imágenes se muestra la evolución del núcleo a lo largo de las tres fases definidas (Fase I: a; Fase II: b y c; Fase III: d, e y f). Ci: citoplasma; Mn: membrana nuclear; N: núcleo; Nu: nucléolo.

El aparato de Golgi es uno de los orgánulos que experimentaron mayores alteraciones en las células adaptadas. En este sentido, la Figura 65 muestra la evolución de este orgánulo a lo largo de los tres estadios celulares. En Fase I el aparato de Golgi muestra idéntica ultraestructura que en las células control (Figura 65a). En Fase II comienzan a dilatarse los extremos de las cisternas (Figura 65b, c y d), proceso que se acentúa en Fase III al tiempo que tiene lugar una mayor producción de vesículas (Figura 65e y f)



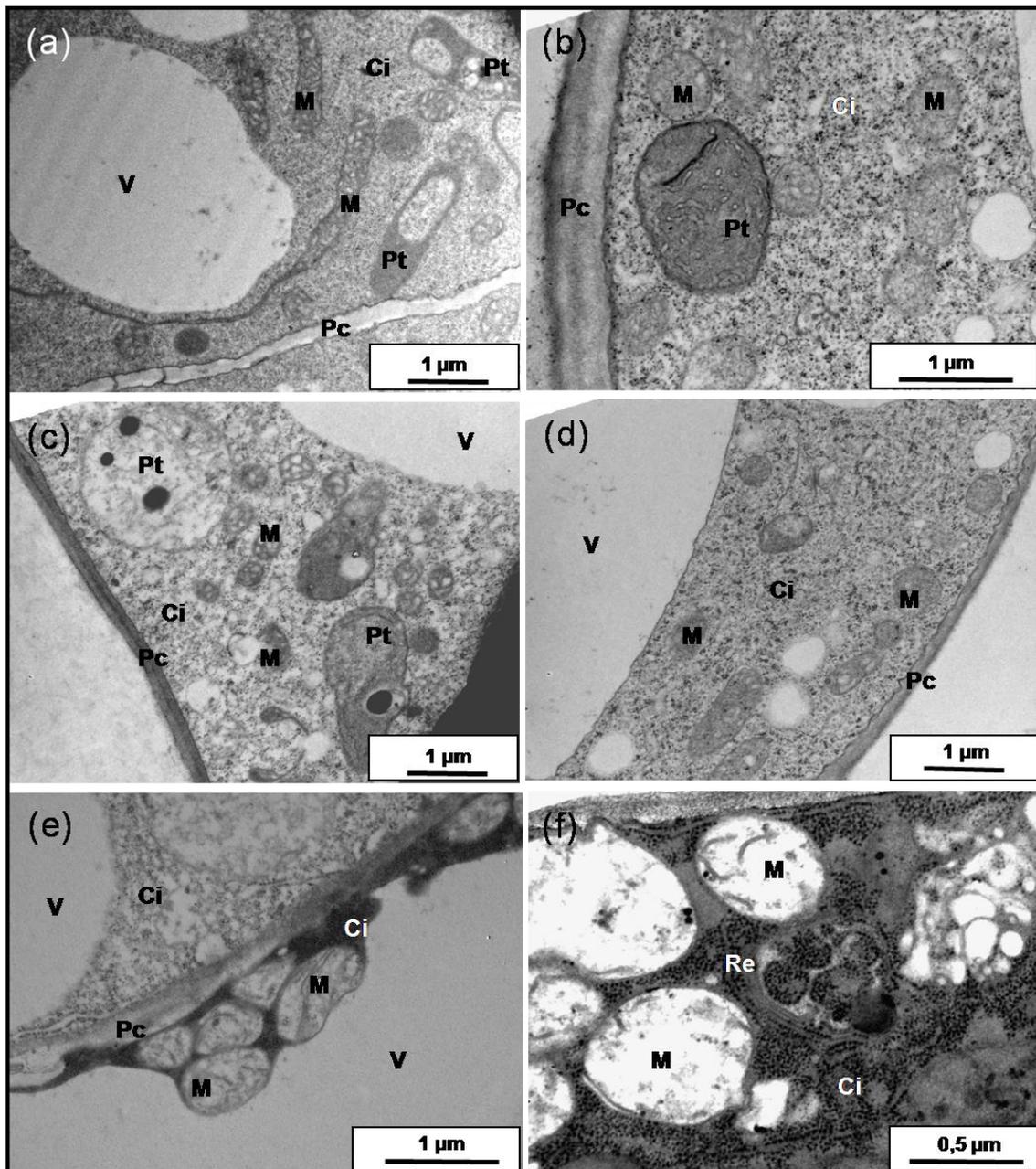
**Figura 65. Ultraestructura del aparato de Golgi en células de la línea adaptada.** En las imágenes se muestra la evolución del aparato de Golgi a lo largo de las tres fases definidas (Fase I: a; Fase II: b, c y d; Fase III: e y f). En (f) pueden observarse dos aparatos de Golgi enfrentados con una gran acumulación de vesículas. Ci: citoplasma; G: aparato de Golgi; M: mitocondria; N: núcleo; Pc: pared celular; Re: retículo endoplasmático; V: vacuola.

La Figura 66 muestra las modificaciones ultraestructurales experimentadas por el retículo endoplasmático en las células adaptadas en las diferentes fases establecidas. Así, en la Figura 66a pueden observarse alineaciones paralelas de retículo endoplasmático con ribosomas sin alteraciones aparentes, lo que correspondería a una célula adaptada en Fase I. En Fase II (Figura 66b, c y d) y III (Figura 66e y f) se produce una gran dilatación de este orgánulo celular pudiendo diferenciarse por la presencia de ribosomas en su membrana.



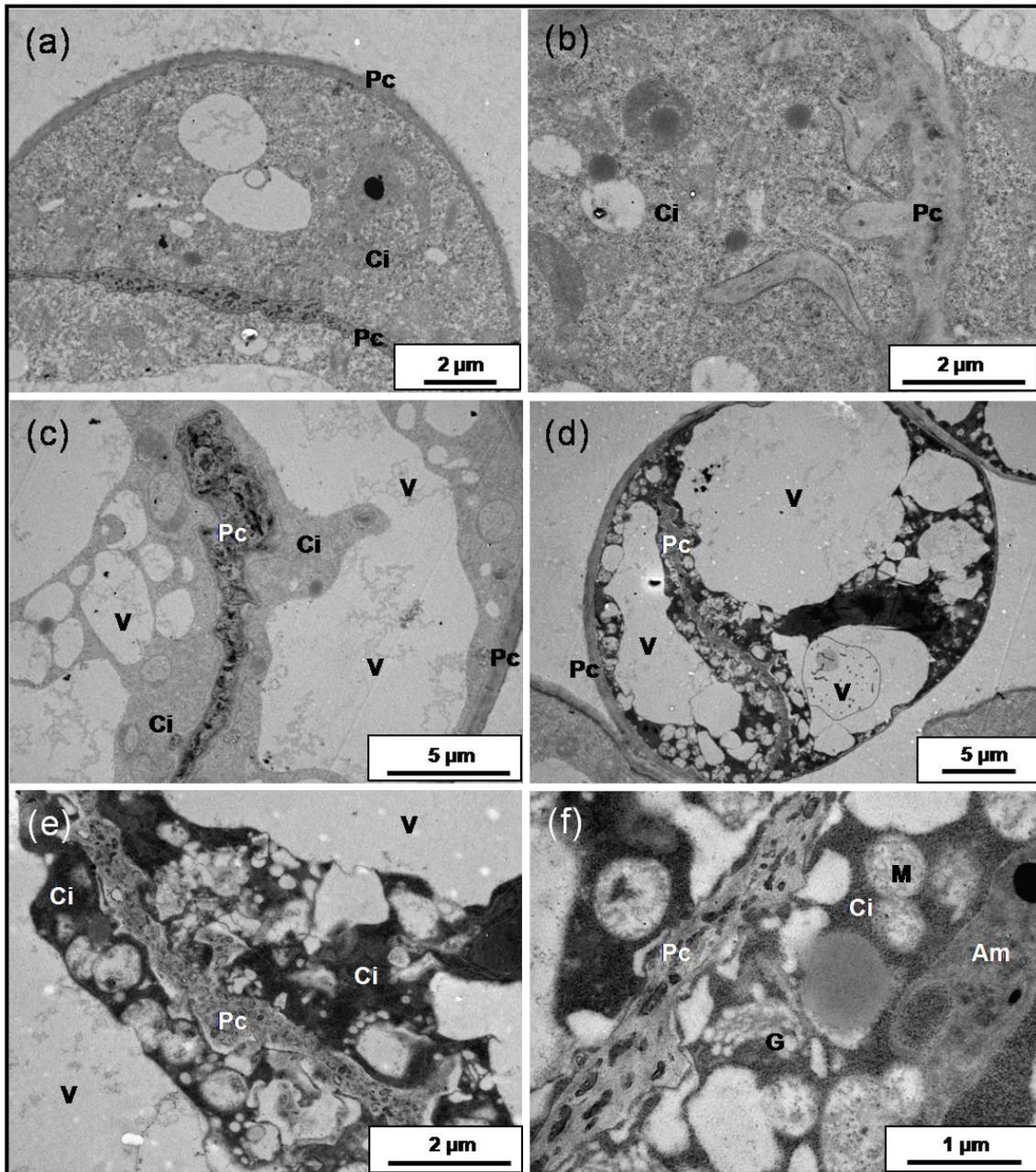
**Figura 66. Ultraestructura del retículo endoplasmático en células de la línea adaptada.** En las imágenes se muestra la evolución del retículo endoplasmático a lo largo de las tres fases definidas (Fase I: a; Fase II: b, c y d; Fase III: e y f). En (f) se muestra la presencia de ribosomas en la membrana del retículo. Ci: citoplasma; M: mitocondria; Pc: pared celular; Pt: plastidio; Re: retículo endoplasmático; V: vacuola.

En relación a las mitocondrias y amiloplastos, en la Figura 67 se muestra su ultraestructura en las diferentes fases descritas. En ambos casos los orgánulos se dilatan y se hacen menos electrodensos a medida que las células entran en Fase II y III, aunque debemos resaltar que, a tenor de lo mostrado en la Figura 67c, parece ser que los amiloplastos se degradan antes que las mitocondrias.



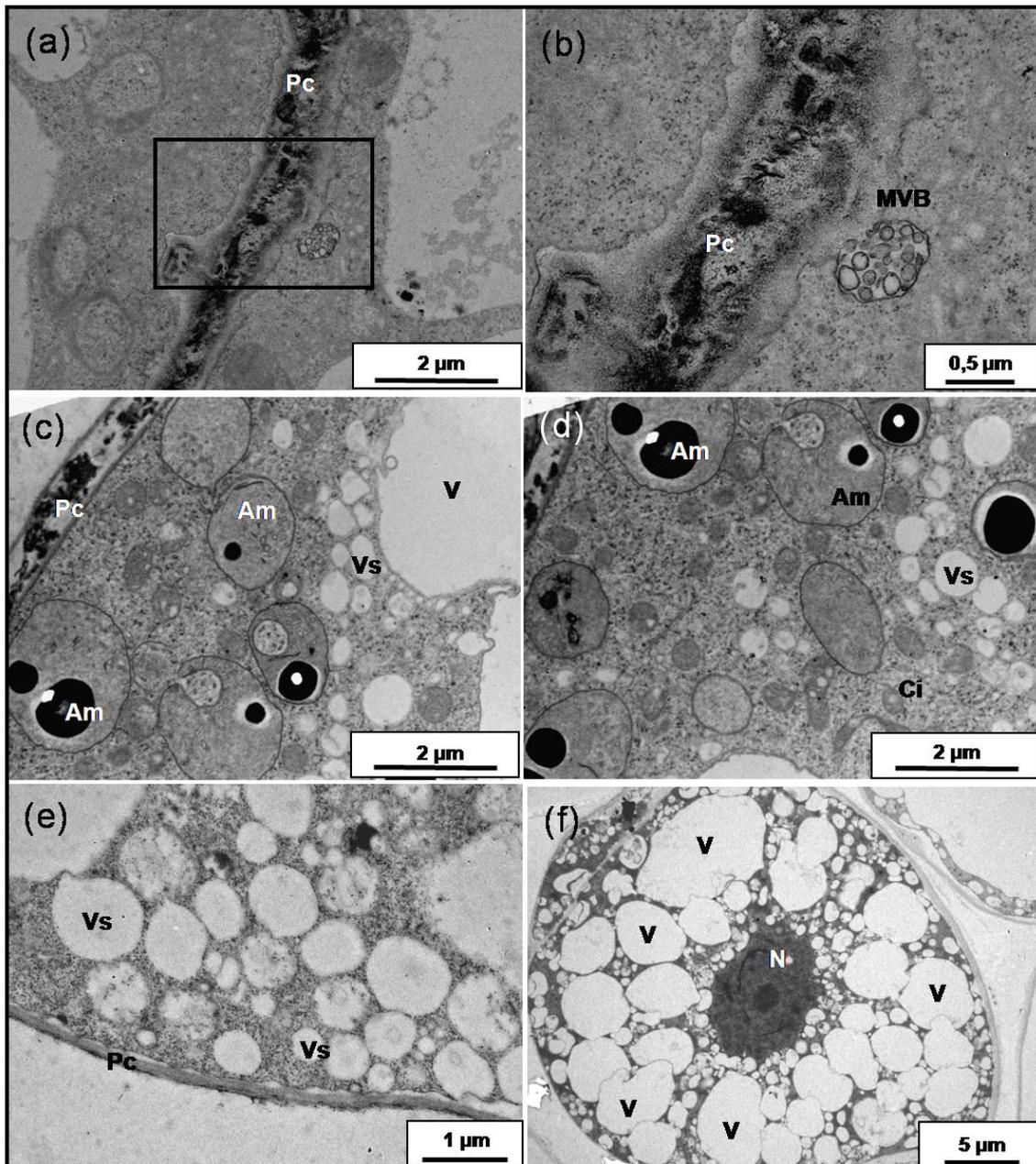
**Figura 67. Ultraestructura de mitocondrias y amiloplastos en células de la línea adaptada.** En las imágenes se muestra la evolución de las mitocondrias y los plastidios a lo largo de las tres fases definidas (Fase I: a y b; Fase II: c y d; Fase III: e y f). Ci: citoplasma; M: mitocondria; Pc: pared celular; Pt: plastidio; Re: retículo endoplasmático; V: vacuola.

La Figura 68 muestra las graves alteraciones experimentadas por la pared celular. En Fase I (Figura 68a) las células muestran una pared celular externa regular y bien desarrollada, algo más electrodensa cuando es compartida por dos células. La entrada en Fase II y III implica la pérdida de la estructura, pasando a ser irregular y desarrollando profundas invaginaciones que penetran en el citoplasma (Figura 68e).



**Figura 68. Ultraestructura de la pared celular en células de la línea adaptada.** En las imágenes se muestran las alteraciones experimentadas en la pared celular a lo largo de las tres fases definidas (Fase I: a; Fase II: b y c; Fase III: d, e y f). Am: amiloplasto; Ci: citoplasma; G: aparato de Golgi; M: mitocondria; Pc: pared celular; V: vacuola.

Las vesículas también experimentan un incremento en número en función de la fase en que se encuentre la célula adaptada, llegando a ocupar gran parte del citoplasma en células en Fase III (Figura 69f). Así mismo, resulta de especial interés la presencia de cuerpos multivesiculares próximos a las paredes en las células en Fase I, (Figura 69a y b).



**Figura 69. Ultraestructura de vesículas en células de la línea adaptada.** En las imágenes se muestran las vesículas a lo largo de las tres fases definidas (Fase I: a; Fase II: b y c; Fase III: d, e y f). Am: amiloplasto; Ci: citoplasma; MVB: cuerpo multivesicular; N: núcleo; Pc: pared celular; V: vacuola; Vs: vesícula.

### **1.11. Marcadores de muerte celular.**

#### **1.11.1. TUNEL.**

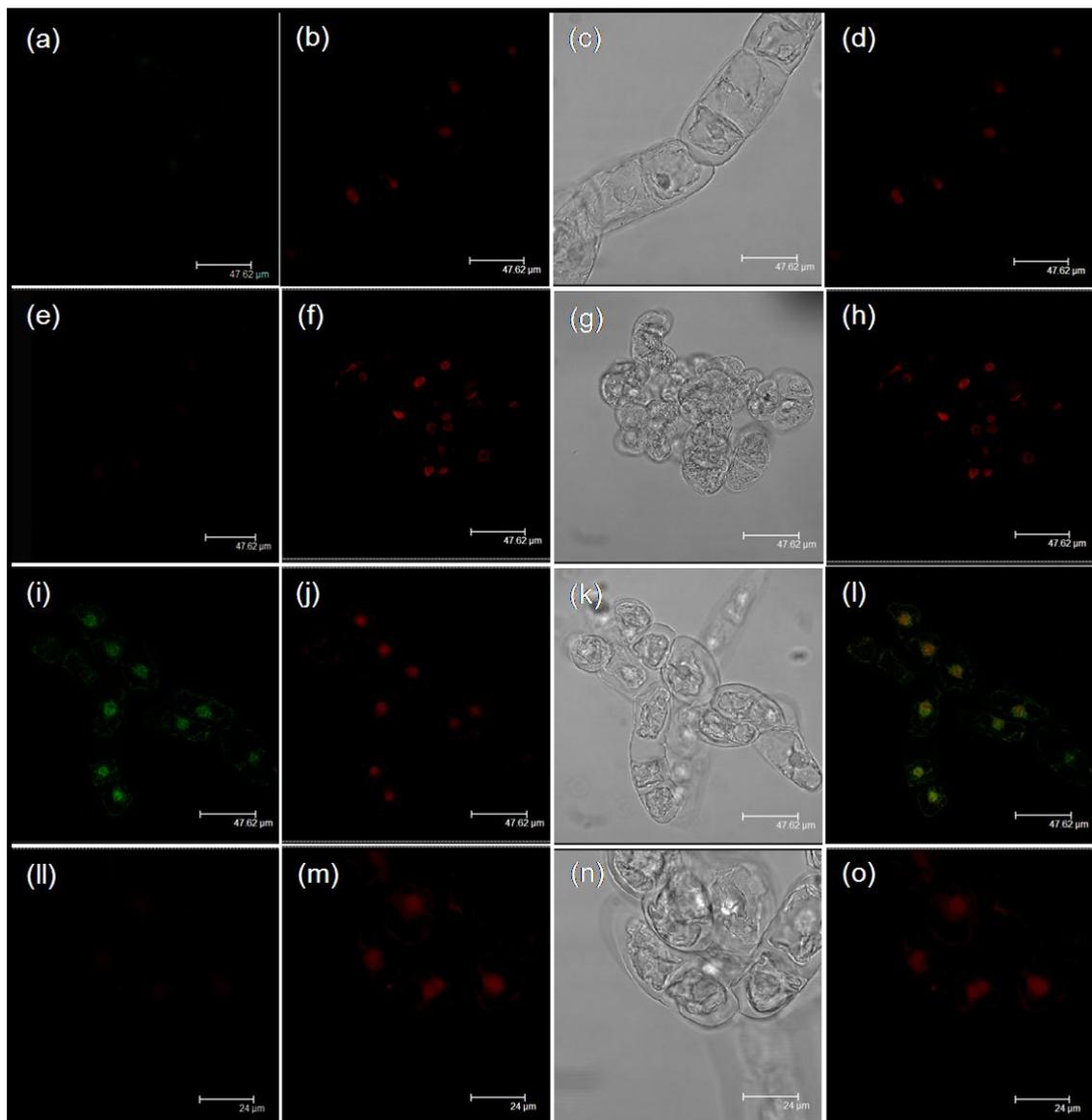
Para determinar si el estrés salino estaba induciendo PCD en los cultivos celulares se realizó un ensayo con el kit comercial TUNEL. Las muestras también fueron tratadas con TO-PRO-3 iodide como marcador nuclear con el fin de poder colocalizar ambos fluoróforos en caso de presencia de fragmentos de ADN generados durante el proceso de PCD. Tal y como refleja la Figura 70, ni los cultivos celulares control ni los adaptados dieron positivo en dicho ensayo. Para comprobar la correcta utilización del kit se introdujeron un control positivo y otro negativo. Tal y como era de esperar, en el control positivo casi la totalidad de las células se tiñeron con el fluoróforo TUNEL mientras que en el control negativo no se captó emisión alguna de fluorescencia.

#### **1.11.2. Actividad caspasa.**

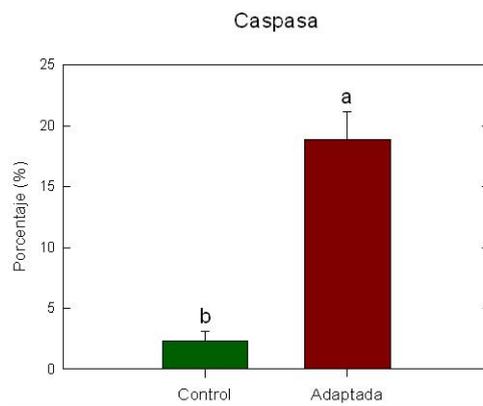
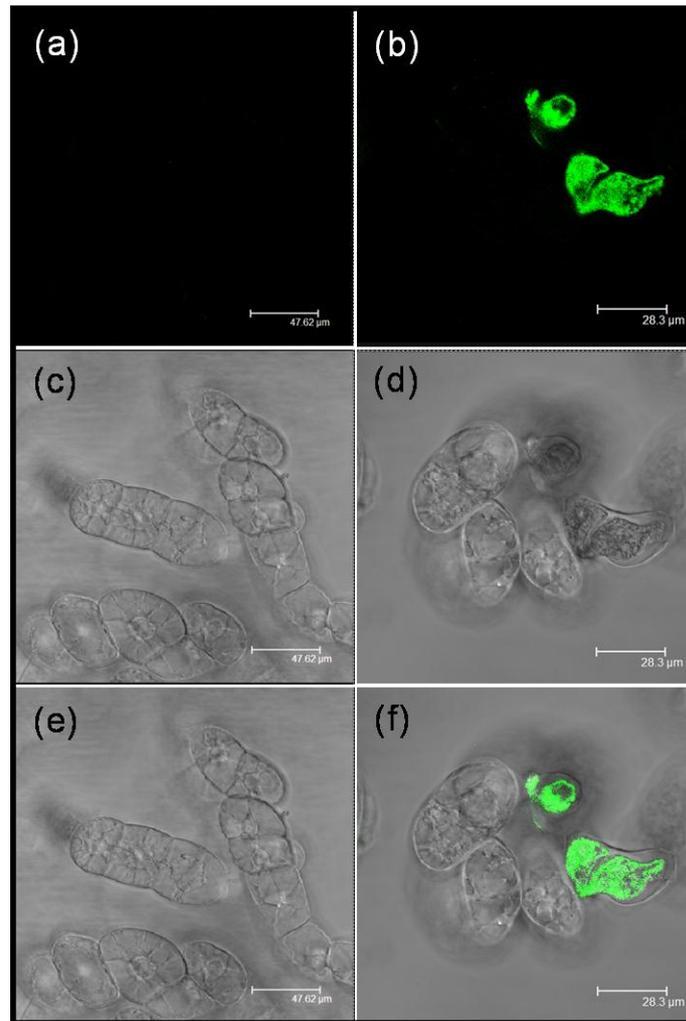
La detección de la actividad caspasa en los cultivos celulares se realizó utilizando el fluoróforo CaspACE FITC-VAD-FMK. El recuento de células que dieron positivo en ambas líneas celulares puso de manifiesto la mayor actividad de este grupo de enzimas en los cultivos celulares adaptados a salinidad con porcentajes 10 veces superiores respecto al control (Figura 71).

### **1.12. Inmunolocalización de ABA y glutatión.**

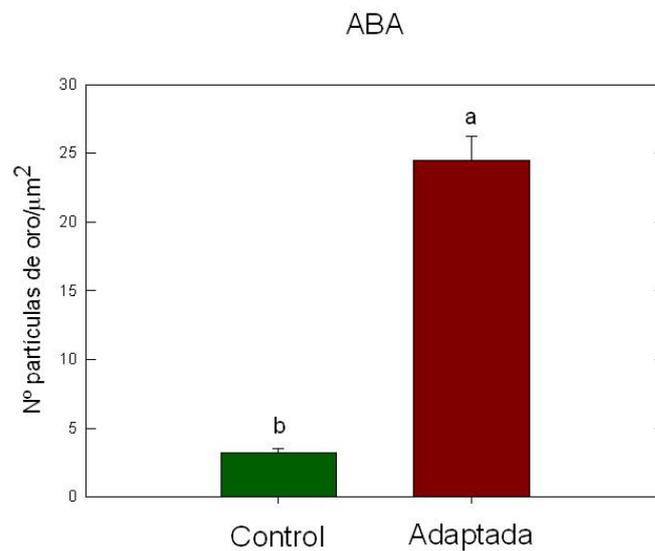
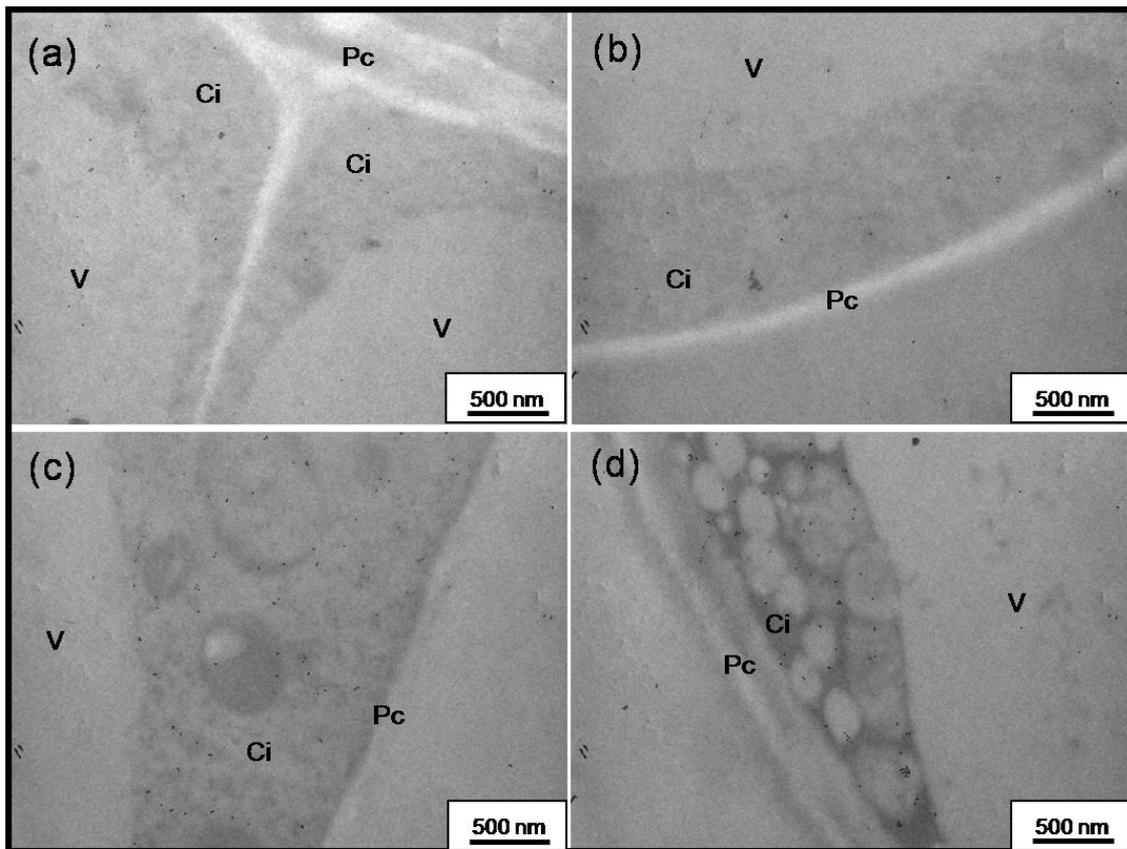
La presencia de ABA en el citoplasma y glutatión en las mitocondrias de las células control y adaptadas se determinó mediante inmunolocalización y posterior cuantificación del número de partículas de oro por  $\mu\text{m}^2$ . Tanto para el caso del ABA como para el del glutatión se establecen diferencias significativas entre ambas líneas celulares. Los valores de ABA resultan muy superiores en las células adaptadas mientras que los de glutatión son mayores en las mitocondrias control (Figuras 72 y 73).



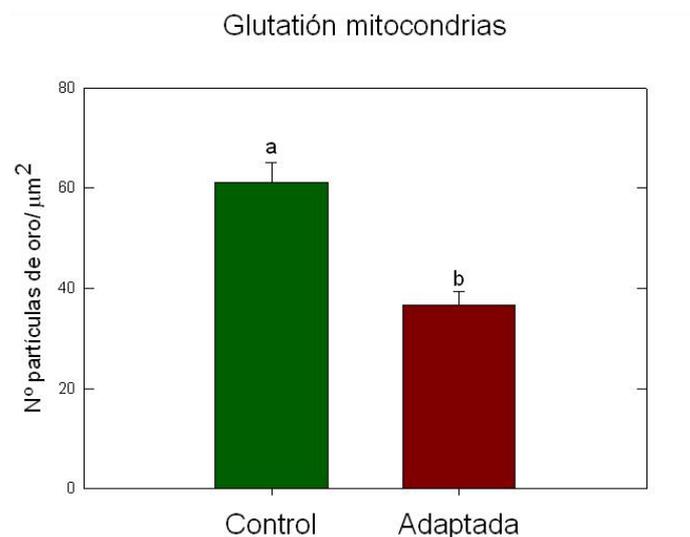
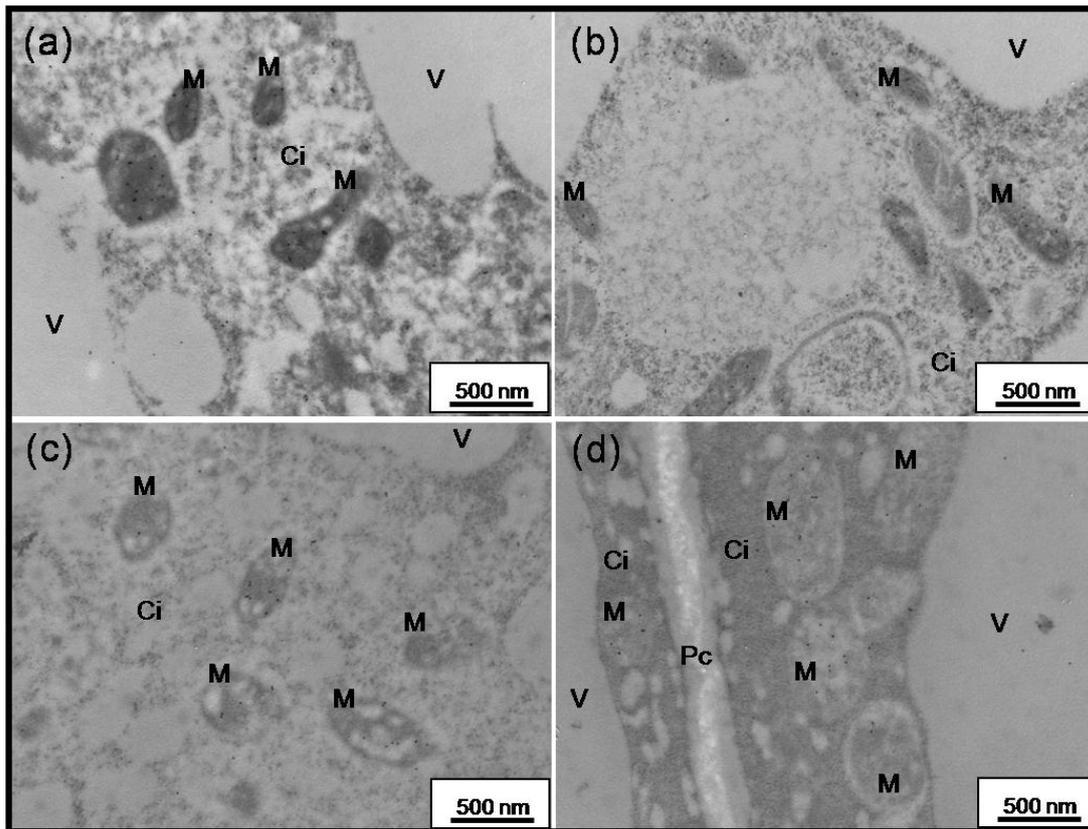
**Figura 70. Detección de muerte celular programada.** Las muestras se tomaron en fase de crecimiento exponencial y se incubaron con el kit comercial TUNEL (verde) y TO-PRO-3 iodide (rojo). Las imágenes (a-d) muestran células de la línea control, (e-f) células de la línea adaptada, (i-l) control positivo-TUNEL, (m-o) control negativo-TUNEL. La primera columna muestra el canal del TUNEL, la segunda el del TO-PRO-3 iodide, la tercera las imágenes en CID y la cuarta la superposición de los canales TUNEL y TO-PRO-3 iodide.



**Figura 71. Detección de la actividad caspasa.** Las imágenes corresponden a células control (a, c y e) y adaptadas (b, d y f) en fase de crecimiento exponencial. En (a y b) se muestra la fluorescencia de la fluoresceína. Las imágenes (c y d) corresponden a las células observadas con la técnica de Normansky. En (e y f) se muestra la superposición de las imágenes anteriores. El gráfico adjunto muestra el porcentaje de células de un total de 900 que dieron positivo para el ensayo.



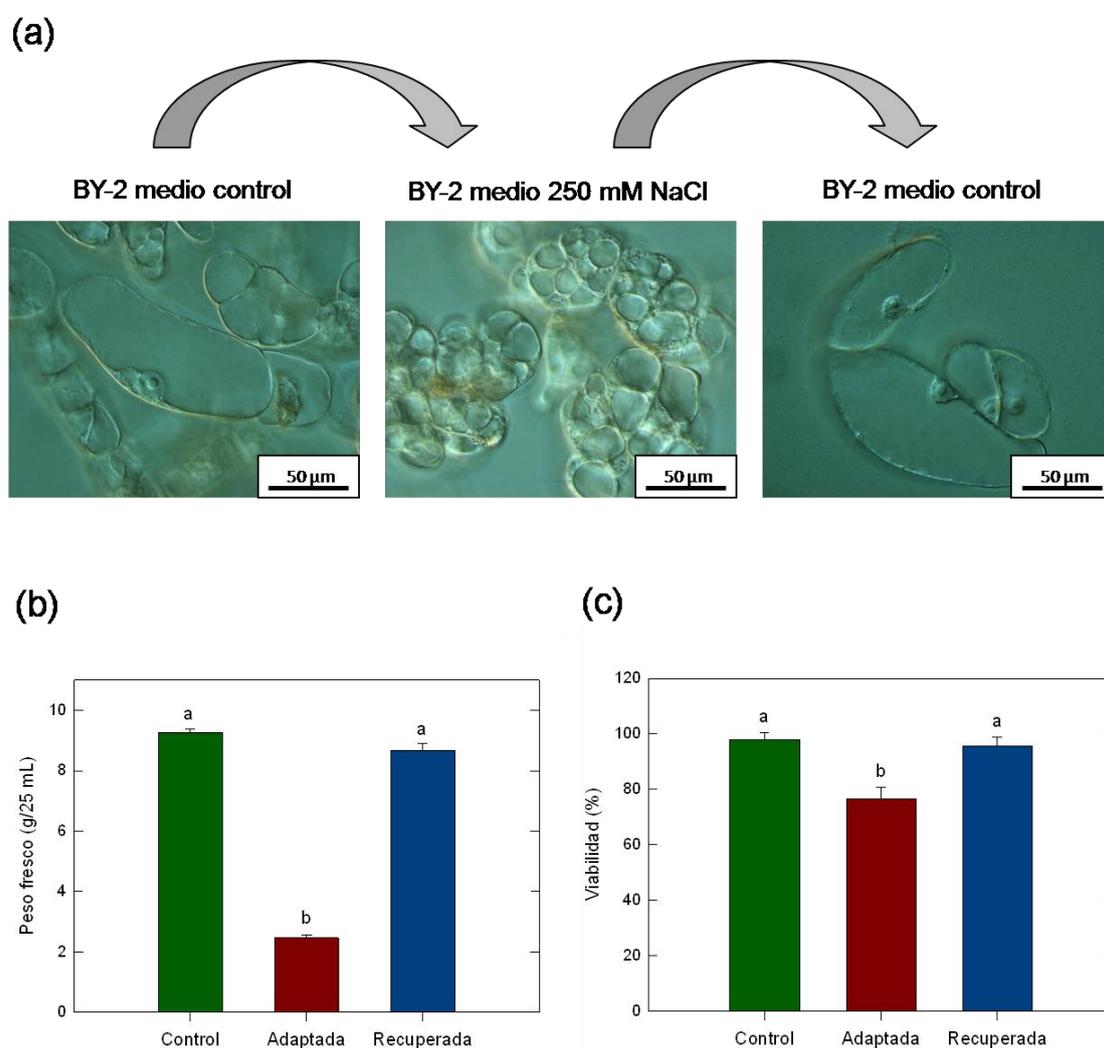
**Figura 72. Inmunolocalización de ABA.** Las imágenes corresponden a células control (a, b) y adaptadas (c, d) en fase de crecimiento exponencial. El gráfico adjunto muestra la cuantificación del número de partículas de oro por  $\mu\text{m}^2$ . Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ). Ci: citoplasma; Pc: pared celular; V: vacuola.



**Figura 73. Inmunolocalización de glutatión.** Las imágenes corresponden a células control (a, b) y adaptadas (c, d) en fase de crecimiento exponencial. El gráfico adjunto muestra la cuantificación del número de partículas de oro por  $\mu\text{m}^2$ . Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ). Ci: citoplasma; M: mitocondria; Pc: pared celular; V: vacuola.

### 1.13. Recuperación del fenotipo original en condiciones control.

Para comprobar si las modificaciones observadas en las células adaptadas podían revertir al fenotipo original, éstas se sometieron a condiciones control (Figura 73a). El estudio de dichas suspensiones celulares mediante microscopía óptica reveló la recuperación del fenotipo celular original tras 3 subcultivos. Estas células aumentaron considerablemente su tamaño y mostraron, al igual que las control, una gran vacuola central que desplazaba al citoplasma y núcleo hacia la periferia celular. Así mismo, los valores del peso fresco de la masa celular y la viabilidad se reestablecieron, alcanzando los niveles propios de las suspensiones celulares control (Figura 74b y c).



**Figura 74. Recuperación del fenotipo original de las células adaptadas al someterlas a condiciones control.** (a) Representación esquemática del proceso de adaptación a elevadas concentraciones salinas y posterior recuperación del fenotipo original en condiciones control. (b) Peso fresco de los cultivos celulares. (c) Viabilidad celular. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 2. Giberelinas.

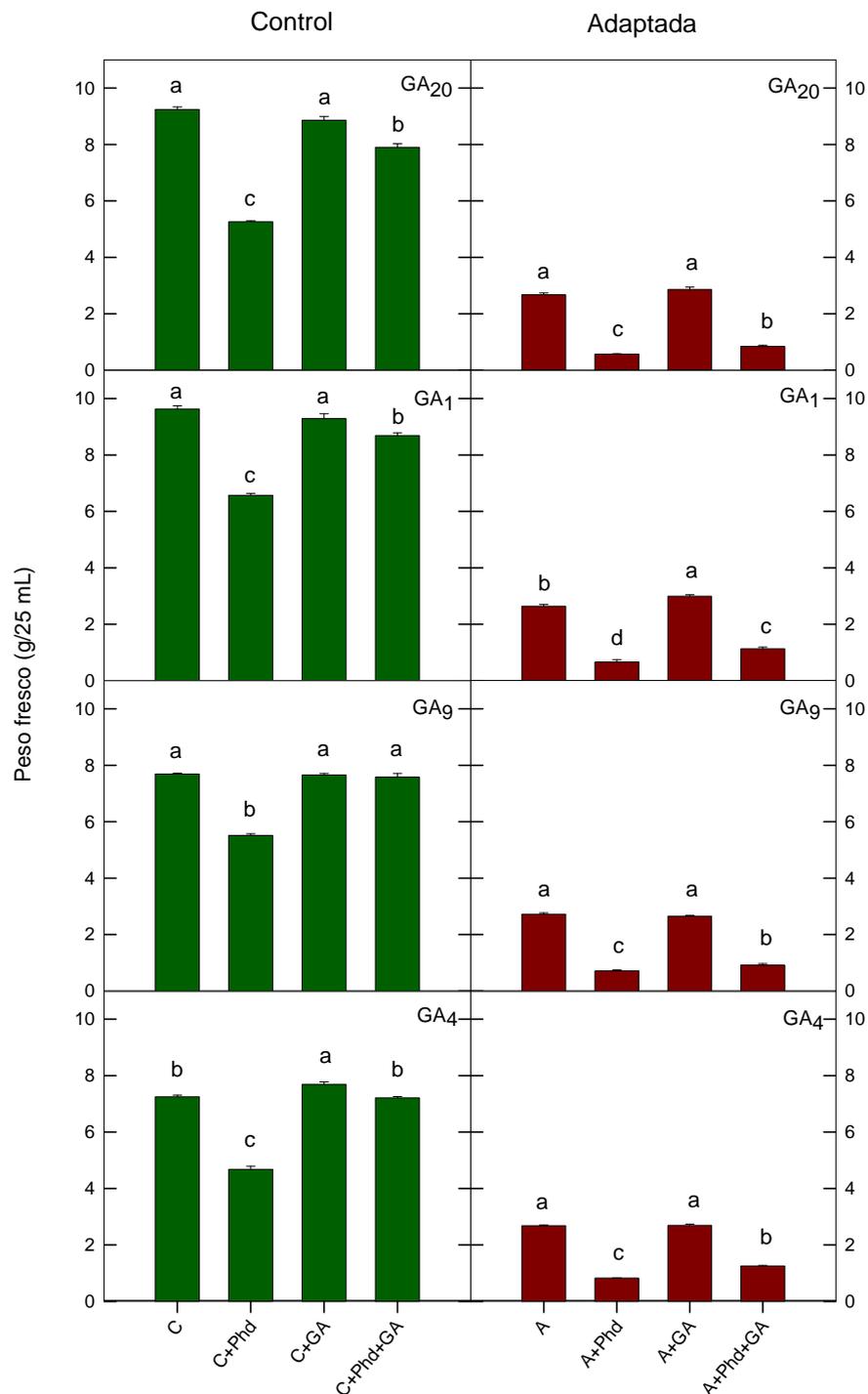
### 2.1. Efecto de la aplicación de Phd y GAs sobre el crecimiento y la viabilidad celular.

Los resultados de variación en peso fresco tras el tratamiento de las líneas celulares control y adaptada con GA<sub>20</sub>, GA<sub>9</sub>, GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub> y Phd se muestran en la Figura 75. Comentaremos, en primer lugar, que los tratamientos con diferentes GAs no afectaron al peso fresco de la masa celular, salvo en el caso de la aplicación de GA<sub>4</sub> en la línea celular control y GA<sub>1</sub> en la adaptada, donde se incrementó levemente aunque de manera significativa. En relación a la aplicación del inhibidor de la ruta de síntesis de GAs, Phd, cabe destacar que hizo disminuir de forma significativa el peso fresco en ambas líneas celulares, resultando mayor el efecto inhibitor en las células adaptadas que en las control. Este efecto se pudo revertir totalmente en las células control al adicionar de forma conjunta Phd y GA<sub>9</sub> o GA<sub>4</sub>. Sin embargo, a pesar de que en el caso del tratamiento conjunto con Phd y GA<sub>20</sub> o GA<sub>1</sub> el peso fresco de las células control se incrementó significativamente respecto al tratamiento con Phd, no se llegaron a recuperar los valores alcanzados por las células no sometidas a tratamiento alguno. En el caso de la línea celular adaptada, la aplicación conjunta de Phd y diferentes GAs hizo recuperar el peso fresco de forma significativa pero sin llegar, en ningún caso, a alcanzar los valores de las células adaptadas no sometidas a tratamiento alguno.

Respecto a los valores de viabilidad (Figura 76), indicaremos que éstos no variaron en la línea celular control tras la aplicación de ninguno de los tratamientos. En cuanto a la línea celular adaptada, el tratamiento con diferentes GAs no modificó la viabilidad. Sin embargo, sí cayó de forma drástica por la aplicación de Phd y, más aún, con el tratamiento combinado Phd+GA. Además, en este último caso, las células mostraron graves alteraciones en su morfología (Figura 76Bb).

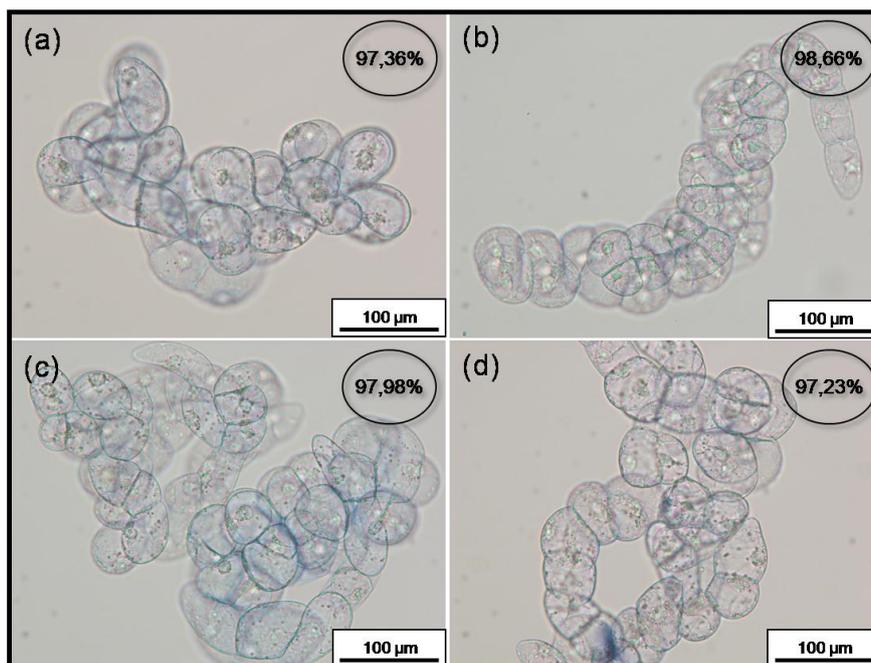
Así mismo, el volumen celular también experimentó variaciones en función del tratamiento aplicado. En la línea control, GA<sub>3</sub> hizo aumentar el volumen celular a lo largo de todo el ciclo de cultivo, mientras que el tratamiento con Phd y la aplicación conjunta de Phd+GA<sub>3</sub> parece que ralentizaron la caída en el volumen celular en fase de crecimiento exponencial. En el caso de la línea adaptada, Phd hizo mantener los valores de volumen celular muy bajos durante todo el ciclo de cultivo, mientras que el

tratamiento combinado de Phd+GA<sub>3</sub> incrementó el volumen celular considerablemente durante la fase de crecimiento exponencial, llegando a alcanzar valores similares a los de la línea control.

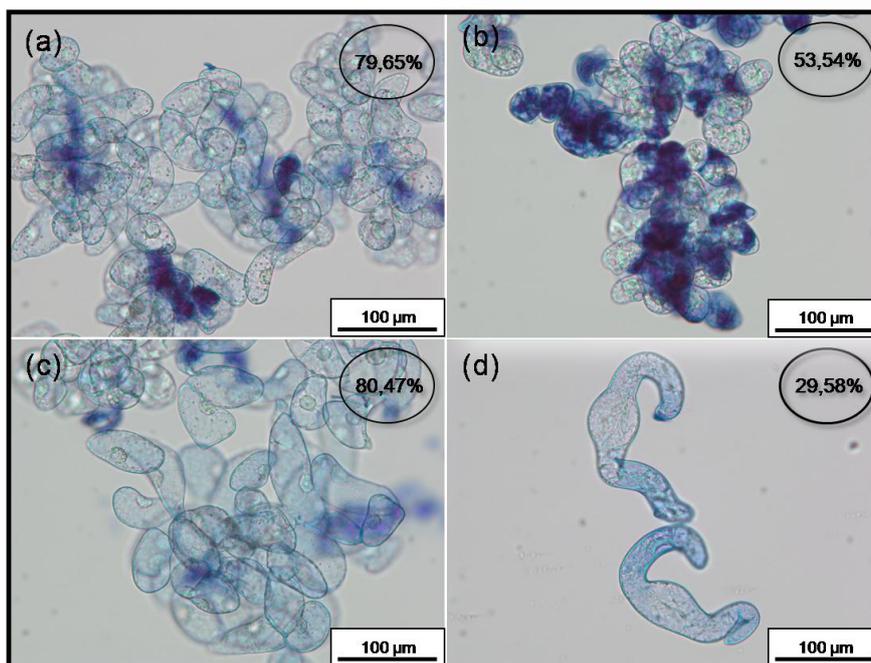


**Figura 75. Peso fresco en fase estacionaria tras el tratamiento con diferentes GAs, Phd o en combinación.** Los cultivos celulares fueron tratados con GA (1 $\mu$ M GA<sub>20</sub>, 1 $\mu$ M GA<sub>9</sub>, 0.1  $\mu$ M GA<sub>1</sub>, 0.1 $\mu$ M GA<sub>4</sub>), 50 $\mu$ M Phd o en combinación. Letras diferentes indican diferencias significativas según el Test de Tukey (p<0,05).

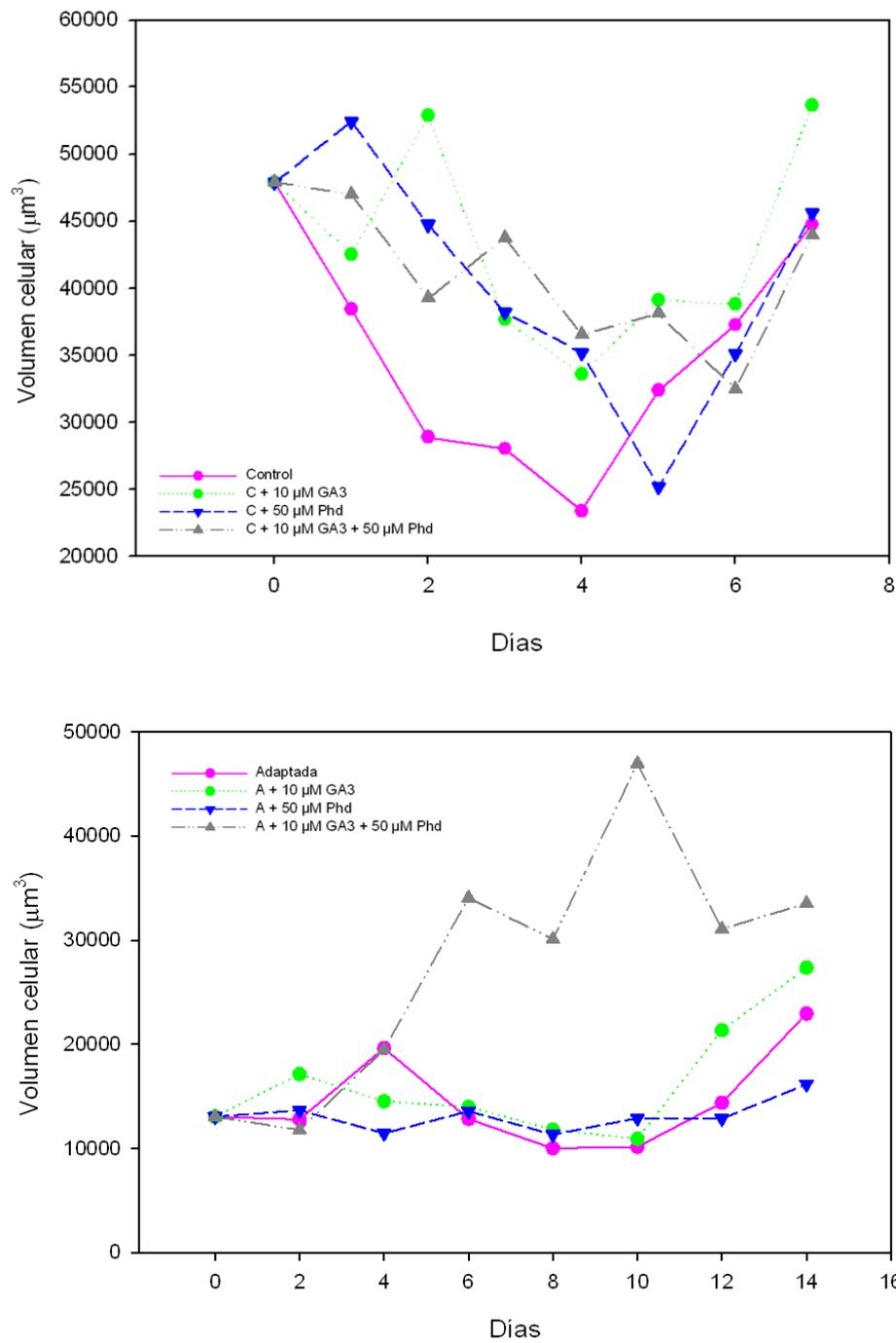
(A)



(B)

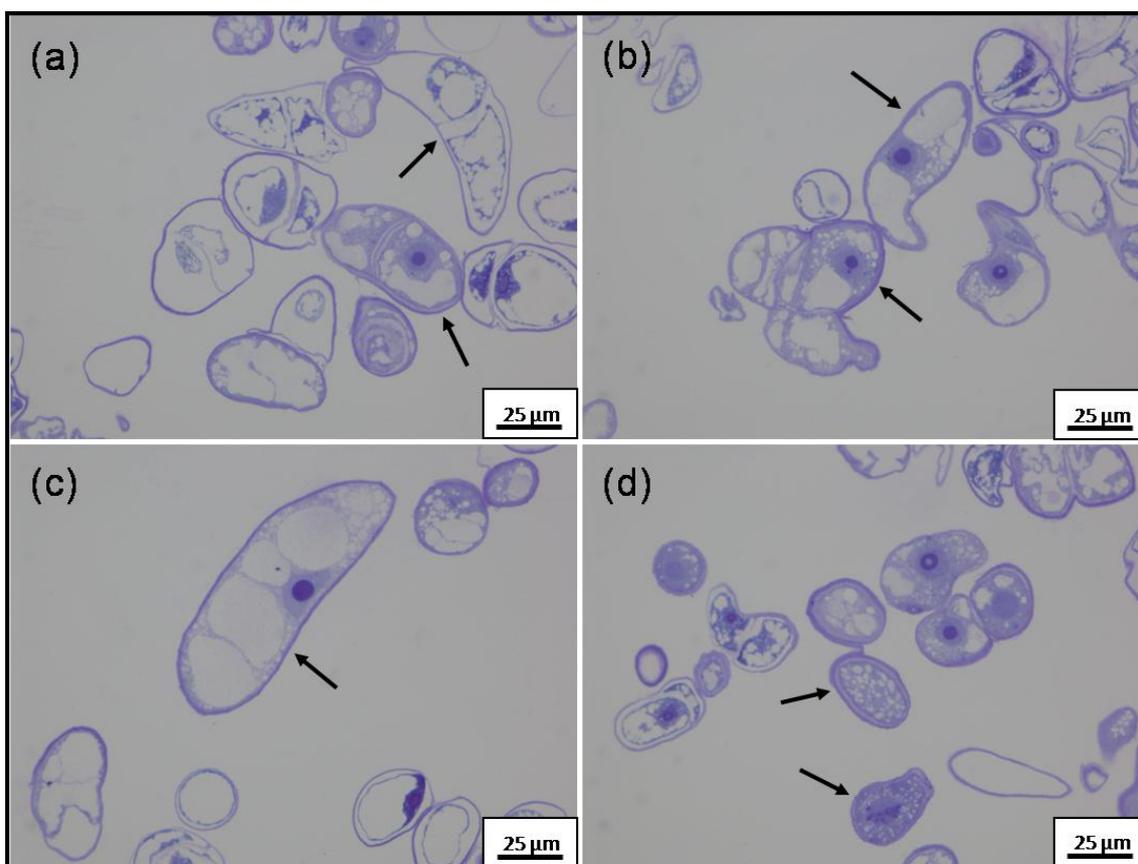


**Figura 76. Viabilidad celular en fase estacionaria tras el tratamiento con GA<sub>20</sub>, Phd o en combinación.** Los cultivos celulares fueron tratados con 1µM GA<sub>20</sub>, 50µM Phd o en combinación. En (A) se muestran imágenes de las células control y en (B) de las adaptadas: (a) control/adaptada, (b) control/adaptada+Phd, (c) control/adaptada+GA<sub>20</sub> y (d) control/adaptada+Phd+GA<sub>20</sub>. Los valores de viabilidad mostrados en cada una de las imágenes resultan representativos para los tratamientos con GA<sub>1</sub>, GA<sub>9</sub> y GA<sub>4</sub>.



**Figura 77. Evolución del volumen celular a lo largo del ciclo de cultivo tras el tratamiento con GA<sub>3</sub>, Phd o en combinación.** Los cultivos celulares fueron tratados con 1µM GA<sub>3</sub>, 50µM Phd o en combinación. En (A) se muestran el volumen celular para la línea control, en (B) la línea adaptada. Los valores representan la media de 900 células diferentes.

Para observar si los diferentes tratamientos producían alteraciones a nivel de la estructura celular, se realizaron inclusiones en resina SPURR y se cortaron secciones semifinas para su observación al microscopio óptico. De las observaciones de las secciones semifinas, solamente cabe destacar las alteraciones en la morfología celular de las muestras de la línea adaptada pertenecientes al tratamiento combinado de Phd y GAs (Figura 78). En este sentido, las imágenes muestran el gran desarrollo de la pared en las células adaptadas sometidas a este tratamiento y el gran desarrollo de algunos tipos celulares.



**Figura 78. Secciones semifinas de células adaptadas tratadas de forma combinada con Phd y GAs.** Las imágenes muestran células adaptadas en fase de crecimiento exponencial tratadas con 50 µM de Phd durante todo el ciclo de cultivo. Las flechas indican tanto el gran desarrollo de la pared celular.

## 2.2. Cuantificación de GAs.

Se analizó la concentración de GAs presentes en muestras de las líneas celulares control y adaptada en fase de crecimiento exponencial tratadas y sin tratar con Phd. Los resultados mostrados en la Tabla 12 indican que las giberelinas bioactivas detectadas con la metodología aplicada fueron GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub>. El resto de GAs corresponden mayoritariamente a la ruta de síntesis de GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>. Entre ellas podemos destacar dos GAs intermediarias de esta ruta (GA<sub>53</sub> y GA<sub>19</sub>) y el producto catabólico de GA<sub>20</sub> (GA<sub>29</sub>), precursor inmediato de GA<sub>1</sub>. También se detectó GA<sub>51</sub>, producto catabólico de GA<sub>9</sub>, el precursor inmediato de GA<sub>4</sub>.

Las GAs bioactivas GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub> se detectaron en las líneas celulares control y adaptada tanto tratadas con Phd como sin tratar. En el caso de GA<sub>4</sub>, no se detectó en las células adaptadas sin tratar con Phd. GA<sub>1</sub> mostró las menores concentraciones, no estableciéndose diferencias significativas entre los cuatro grupos de muestras. Las concentraciones de GA<sub>3</sub> fueron el doble de las detectadas para GA<sub>1</sub> y tampoco se establecieron diferencias significativas entre los diferentes grupos. Respecto a GA<sub>4</sub>, cabe destacar los valores tan elevados detectados en las células control, que representan las mayores concentraciones de GAs bioactivas detectadas en las muestras, y que disminuyen de forma significativa tras el tratamiento con Phd. En la línea celular adaptada no se detectaron niveles de GA<sub>4</sub>, sin embargo, tras el tratamiento con Phd los niveles de esta GA tomaron los valores de la línea celular control tratada con Phd.

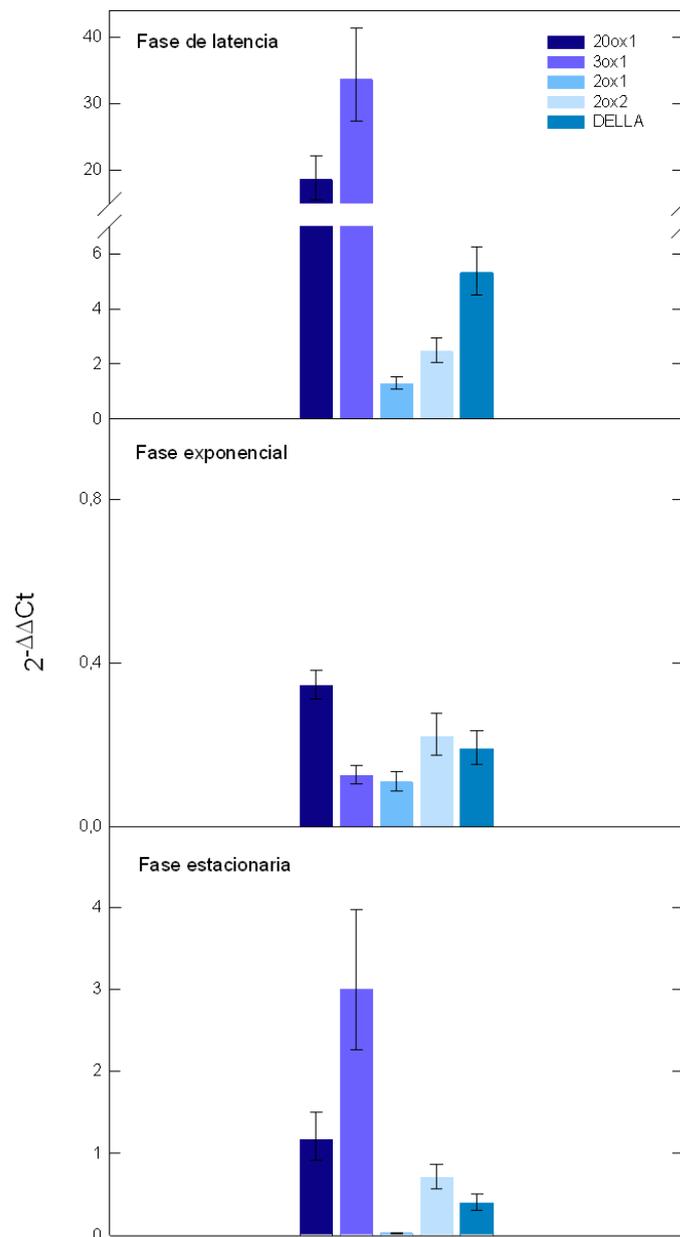
En relación a los precursores inmediatos de GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub> (GA<sub>20</sub> y GA<sub>9</sub>) cabe destacar que no se detectaron en ninguna de las muestras analizadas. Sí se detectaron, sin embargo, los productos del catabolismo de GA<sub>20</sub> (GA<sub>29</sub>) y de GA<sub>4</sub> (GA<sub>51</sub>). GA<sub>29</sub> no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos de muestras mientras que GA<sub>51</sub> solamente se detectó en la línea celular adaptada, aumentando su concentración de forma significativa tras el tratamiento con Phd. Respecto a los intermediarios de las rutas de síntesis de GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub> (GA<sub>53</sub> y GA<sub>19</sub>) destacaremos que no se observaron diferencias significativas en sus concentraciones entre las líneas celulares control y adaptada. El tratamiento con Phd hizo disminuir las concentraciones de ambas hasta el punto de no poder ser detectadas en el caso de GA<sub>53</sub>.

**Tabla 12. Cuantificación de GAs.** Las concentraciones se muestran en  $\text{ng g}^{-1}$  de peso seco. Los datos representan la media de 4 réplicas biológicas. n.d. representa niveles “no detectados” con la metodología utilizada. Las medias dentro de cada columna con letras diferentes representan diferencias significativas según el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ). Los niveles de GA<sub>8</sub>, GA<sub>34</sub>, GA<sub>44</sub>, GA<sub>9</sub>, GA<sub>15</sub> y GA<sub>24</sub> no fueron detectados.

	GA <sub>1</sub>	GA <sub>19</sub>	GA <sub>29</sub>	GA <sub>20</sub>	GA <sub>53</sub>	GA <sub>4</sub>	GA <sub>51</sub>	GA <sub>3</sub>
Control	0,247a	0,070b	0,070a	n.d.	0,537a	0,850a	n.d.	0,517a
Adaptada	0,247a	0,057b	0,073a	n.d.	0,450a	n.d.	0,310b	0,515a
Control+Phd	0,200a	0,100b	0,077a	n.d.	n.d.	0,523b	n.d.	0,503a
Adaptada+Phd	0,205a	0,245a	0,070a	n.d.	n.d.	0,570b	0,690a	0,565a

### 2.3. Niveles de expresión de genes relacionados con la síntesis y degradación de GAs.

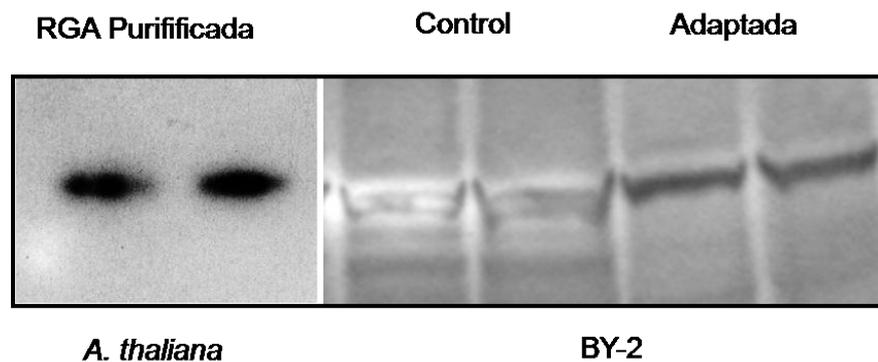
Una vez cuantificada la concentración de GAs presentes en las líneas celulares objeto de estudio, y en base a la información disponible en la bibliografía y las bases de datos, se procedió al análisis del nivel de expresión de los principales genes implicados en la síntesis (*3ox1*, *3ox2*, *20ox1* y *20ox2*) y degradación (*2ox1*, *2ox2*, *2ox3*, *2ox4* y *2ox5*) de GAs, así como del gen regulador de su transcripción (*DELLA*) (Figura 79). Los genes *20ox2*, *3ox2*, *2ox3*, *2ox4* y *2ox5* no estaban expresados en ninguna de las líneas celulares. Los resultados revelaron la expresión diferencial de los genes *20ox1*, *3ox1*, *2ox1* y *2ox2* en cada una de las fases del ciclo de cultivo. En este sentido, parece ser que el metabolismo de GAs se encuentra fuertemente inducido en fase de latencia en las células adaptadas, resultando muy superiores los niveles de expresión de los genes de biosíntesis respecto a los de degradación. Sin embargo, en la fase exponencial la ruta de síntesis y degradación estaba fuertemente reprimida en las células adaptadas respecto al control. Así mismo, el gen que codifica para la proteína *DELLA* mostró un patrón de expresión similar.



**Figura 79. Niveles de expresión de genes implicados en la ruta metabólica de GAs.** La figura muestra los niveles de expresión de los genes de síntesis (*3ox1* y *20ox2*) y catabolismo (*2ox1* y *2ox2*) de la ruta metabólica de GAs en cada una de las fases de crecimiento de la línea celular adaptada con respecto al control. Así mismo, se muestra el nivel de expresión del gen regulador de la transcripción de GAs, *DELLA*. Los resultados están normalizados con el control (valor 1).

#### 2.4. Western-blot.

La identificación de proteínas DELLA en muestras de las células control y adaptadas se realizó por *western-blot* utilizando el anticuerpo generado contra la proteína RGA de *Arabidopsis thaliana*, uno de los cinco miembros que pertenecen a la familia de proteínas DELLA en esta especie. La Figura 80 muestra el análisis por *western-blot* tanto de la proteína RGA purificada de *Arabidopsis thaliana* como de las muestras de los cultivos celulares objeto de estudio. Los resultados indican que, en fase de crecimiento exponencial, el contenido en proteínas DELLA en las células adaptadas a salinidad es mayor que en las células control.

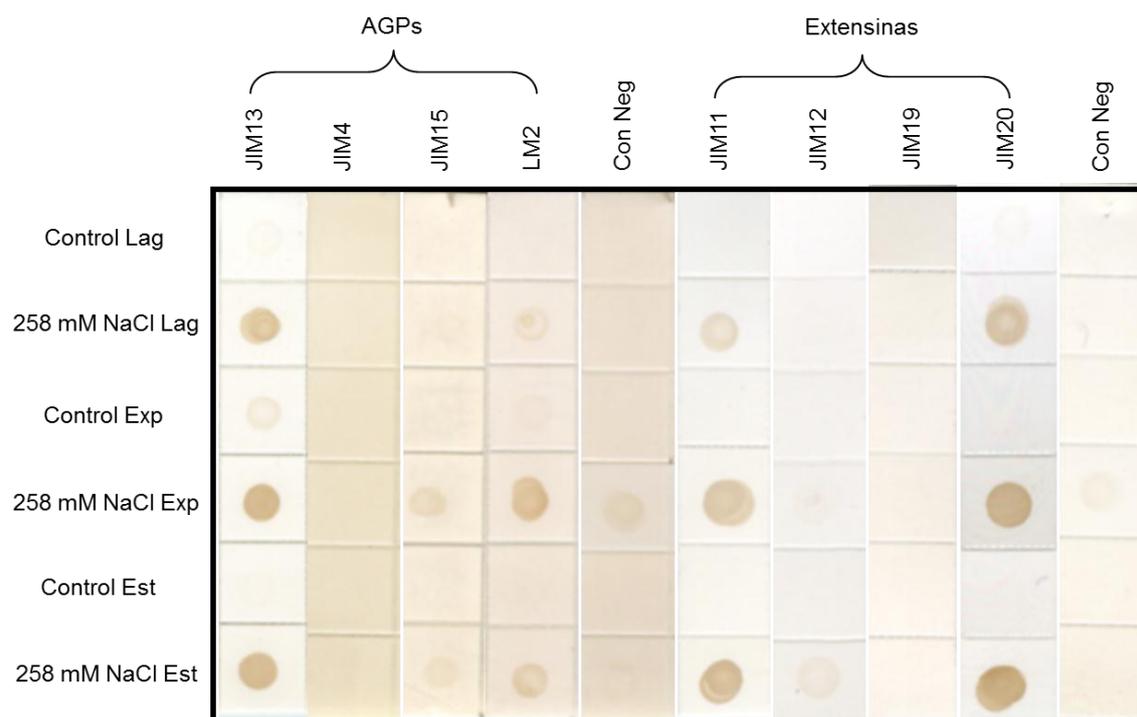


**Figura 80. Análisis por *western-blot* de las proteínas DELLA.** A la izquierda de la imagen se muestra la detección de la proteína RGA purificada de *Arabidopsis thaliana*. A la derecha se pueden observar muestras de células control y adaptadas en fase de crecimiento exponencial. Para el reconocimiento de las proteínas se utilizó el anticuerpo generado contra la proteína RGA (DUR18). .

### 3. Pared celular.

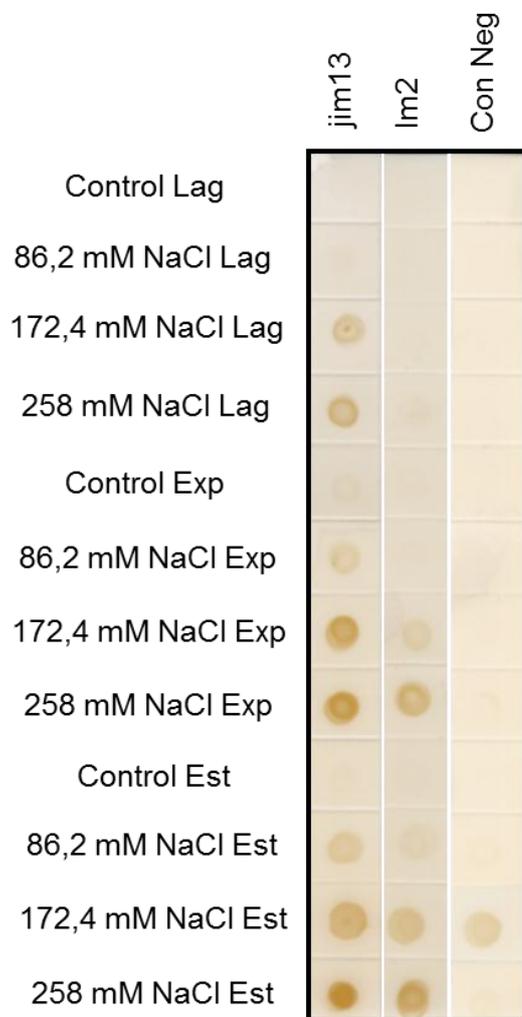
#### 3.1. Inmuno-dot AGPs y EXTs.

Esta técnica se utilizó para detectar, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales, las AGPs y EXTs liberadas al medio de cultivo por las células control y adaptadas. En los resultados mostrados en la Figura 81, se puede observar que no todos los anticuerpos utilizados reconocieron a su antígeno correspondiente. En este sentido, los anticuerpos que dieron mejores resultados fueron JIM13, JIM15 y LM2 para AGPs y JIM11 y JIM20 para EXTs. Así mismo, y para los anticuerpos citados anteriormente, resultan evidentes los elevados niveles de antígeno detectados en el medio de cultivo de las células adaptadas en cada una de las fases de crecimiento con respecto al control, en el que apenas fueron detectados salvo para JIM13 y LM2 en fase de crecimiento exponencial y JIM20 en fase de latencia.



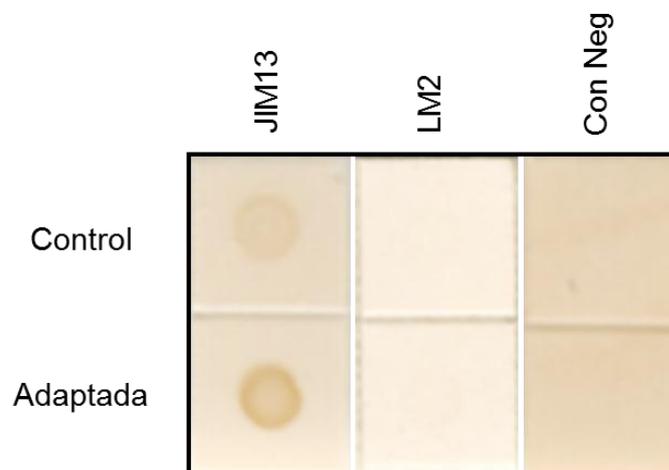
**Figura 81. Inmuno-dot de AGPs para las líneas celulares control y adaptada en cada una de las fases del ciclo de cultivo.** Lag: fase de latencia; Exp: fase exponencial; Est: fase estacionaria.

Con el objeto de comprobar si la liberación de AGPs al medio de cultivo estaba influenciada por el nivel de estrés salino, se repitieron los ensayos anteriores utilizando los cultivos celulares adaptados a 86,2 y 172,4 mM de NaCl. Los resultados mostrados en la Figura 82 ponen de manifiesto que, efectivamente, se trata de un proceso que incrementa a medida que aumenta la concentración de NaCl en el medio de cultivo. Así, los cultivos celulares crecidos en condiciones control son los que liberan una menor cantidad de AGPs, prácticamente nula, aumentando dicho proceso de forma gradual en función del nivel de estrés salino. Por otra parte, la fase de crecimiento en la que se encuentra el cultivo celular también resulta relevante. En este sentido, es en las fases de crecimiento exponencial y estacionaria cuando se detectan los mayores niveles de AGPs.



**Figura 82. Inmuno-dot de AGPs para diferentes concentraciones salinas en cada una de las fases del ciclo de cultivo.** Lag: fase de latencia; Exp: fase exponencial; Est: fase estacionaria.

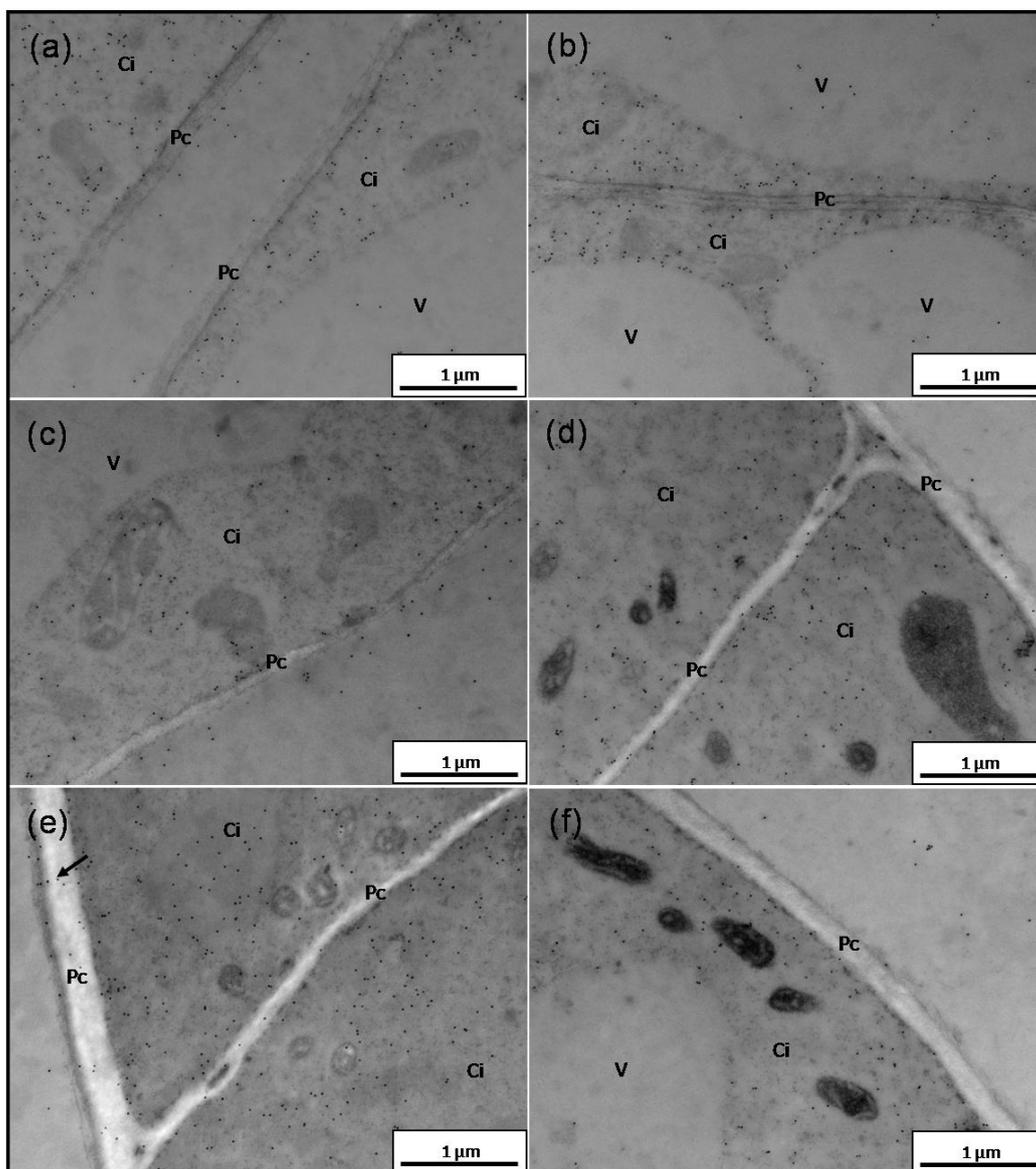
Para comprobar si los mayores niveles de AGPs detectados en el medio de cultivo de la línea celular adaptada eran debidos a una mayor tasa de liberación respecto al control se diseñó un nuevo ensayo. Para ello, se recogió 1 gramo de peso fresco de ambos cultivos celulares en fase de crecimiento exponencial y se resuspendió en el mismo volumen de medio de cultivo fresco, manteniendo las suspensiones celulares obtenidas en las condiciones habituales de crecimiento. A las 24 horas se recogieron muestras de ambos medios de cultivo y se realizó el *immuno-dot*. Los resultados mostrados en la Figura 83 indican de forma clara que la liberación de AGPs al medio de cultivo es más intensa en la línea celular adaptada que en la control. Por otra parte, la no detección de AGPs mediante el anticuerpo LM2, que sí resultó efectivo en los ensayos anteriores, indica que éstas se van acumulando en el medio a lo largo del ciclo de cultivo, por lo que su degradación no es inmediata y deben presentar una vida media prolongada. Con todo, podemos indicar que la liberación de AGPs al medio de cultivo es un proceso dependiente del nivel de estrés salino que resulta en la acumulación de dichas proteínas estructurales de la pared celular en el medio de cultivo.



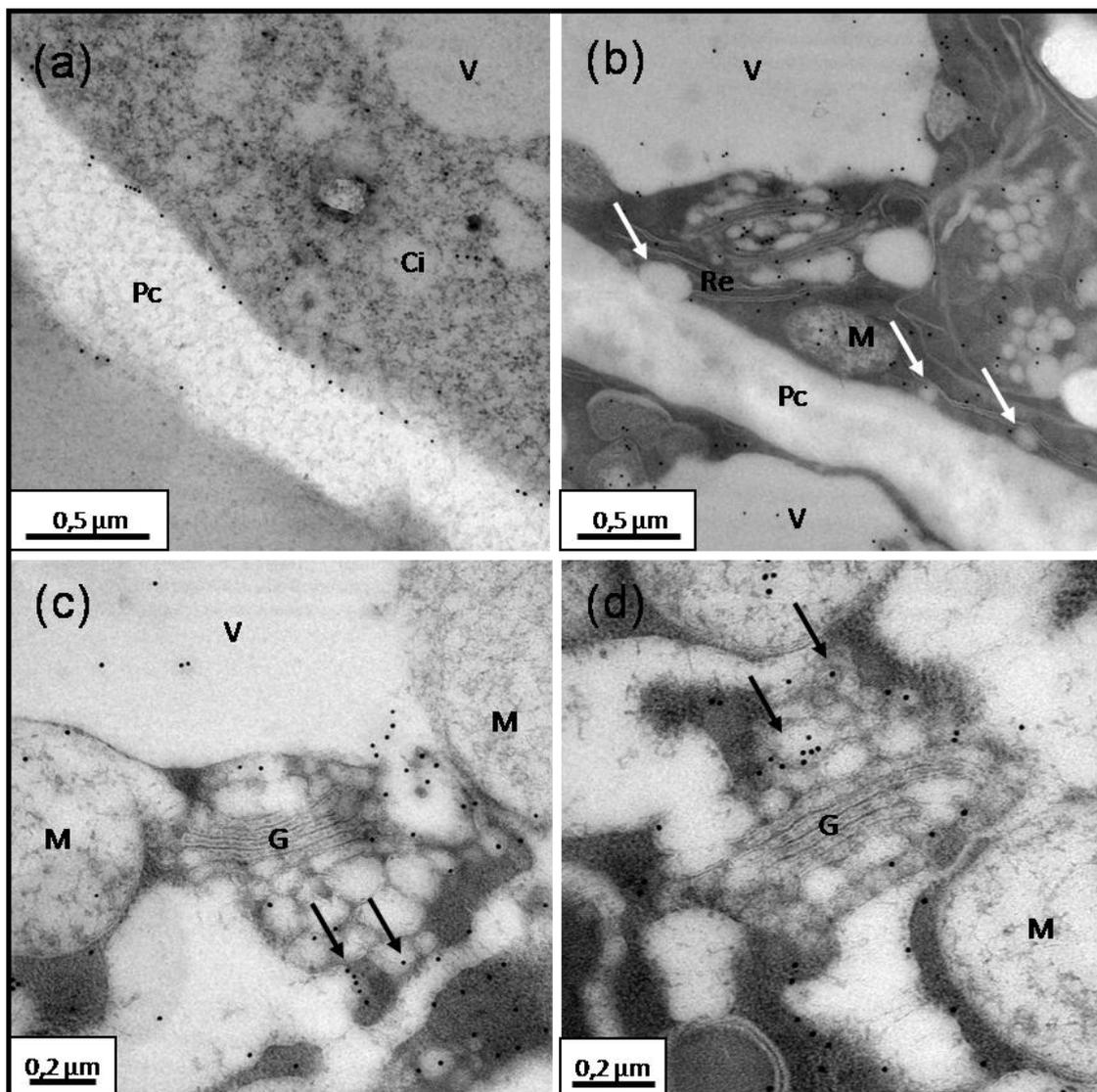
**Figura 83. AGPs liberadas al medio de cultivo en 24 horas.** La imagen muestra la detección mediante anticuerpos monoclonales (JIM13 y LM2) de las AGPs liberadas al medio de cultivo durante un periodo de 24 horas por parte de células control y adaptadas.

### 3.2. Cuantificación de AGPs.

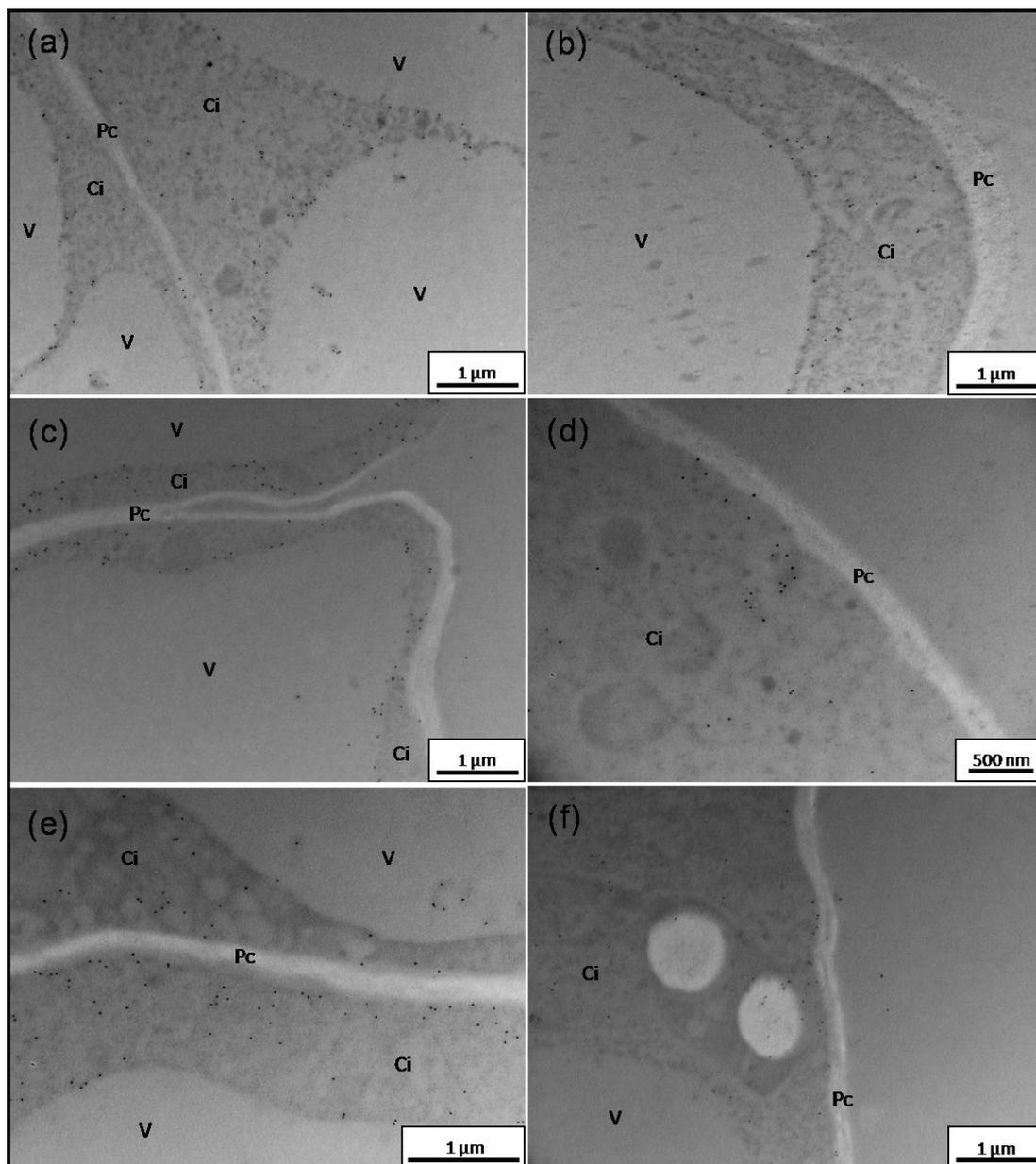
La presencia de AGPs en células control y adaptadas se determinó mediante la inmunolocalización de cuatro epítomos (JIM4, JIM13, JIM15 y LM2) en muestras tomadas en fase de crecimiento exponencial. JIM4 no dio resultados positivos. LM2 mostró un marcaje muy bajo, por ello nos centraremos en JIM13 y JIM15. Estos anticuerpos marcaron en membrana plasmática, tonoplasto y citoplasma, resultando poco frecuente el marcaje en pared celular (Figuras 84, 85 y 86), normalmente localizándose en la parte externa de la misma (Fig 84e).



**Figura 84.** Inmunolocalización de AGPs con el anticuerpo monoclonal JIM13. Las imágenes corresponden a células control (a, b) y adaptadas (c, d, e y f) en fase de crecimiento exponencial. En f se indica el marcaje en la pared externa. Ci: citoplasma; Pc: pared celular; V: vacuola.



**Figura 85. Inmunolocalización de AGPs en endomembranas con el anticuerpo monoclonal JIM13.** Las imágenes corresponden a células control (a) y adaptadas (b, c y d) en fase de crecimiento exponencial. En (b) se indican vesículas marcadas con JIM13 próximas a la pared celular. En (c) y (d) pueden observarse claramente dos aparatos de Golgi en cuya región cis hay una gran acumulación de vesículas marcadas con JIM13 (flecha). Ci: citoplasma; G: aparato de Golgi; M: mitocondria; Pc: pared celular; Re: retículo endoplasmático; V: vacuola.



**Figura 86. Inmunolocalización de AGPs con el anticuerpo monoclonal JIM15.** Las imágenes corresponden a células control (a, b y c) y adaptadas (d, e y f) en fase de crecimiento exponencial. Ci: citoplasma; Pc: pared celular; V: vacuola.

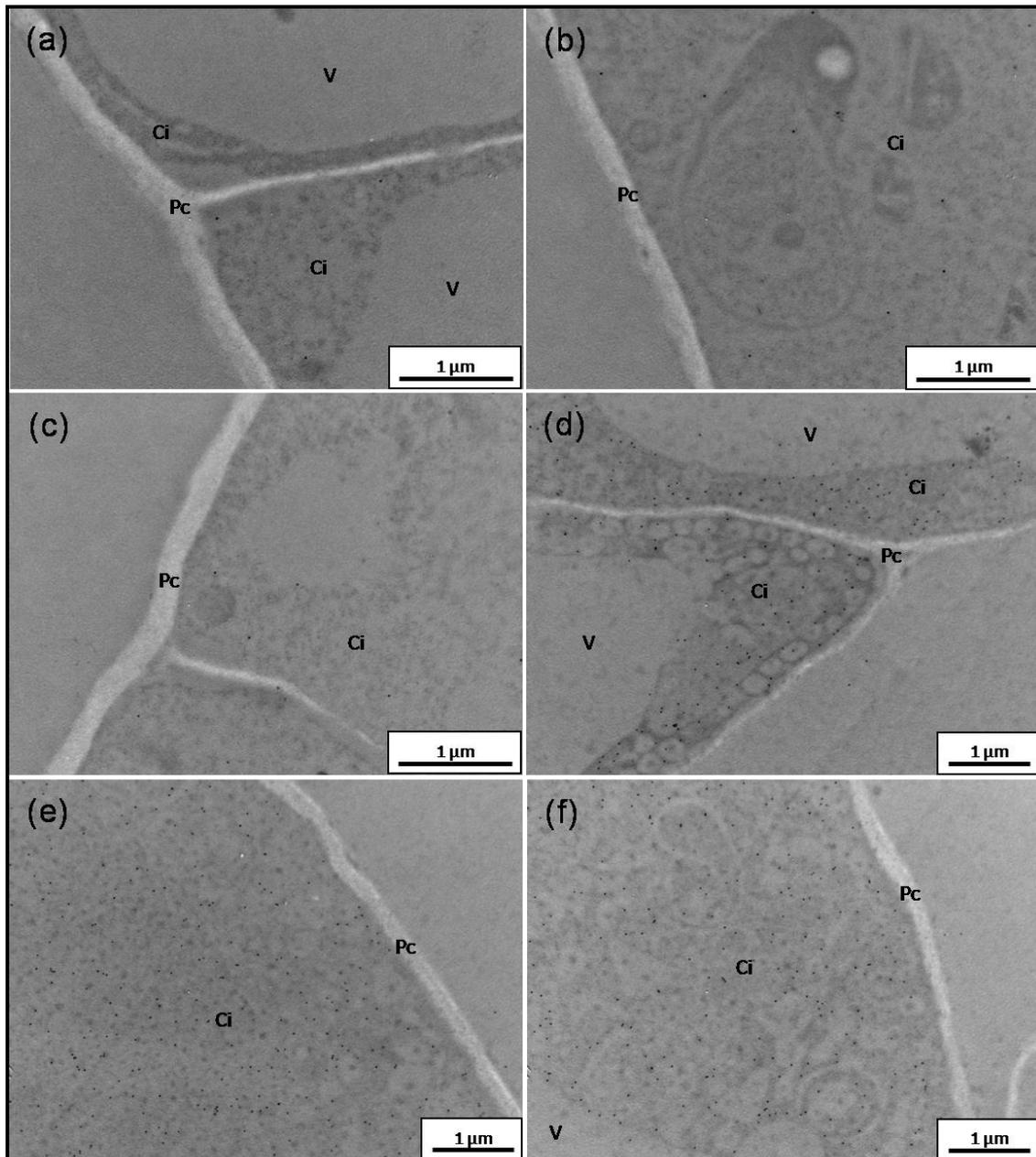
La Tabla 13 recoge los datos del análisis cuantitativo de las partículas de oro. La distribución de los epítomos JIM13 y JIM15 mostró diferencias significativas entre ambas líneas celulares. Así, el número de partículas de oro cuantificado en membrana plasmática, tonoplasto y citoplasma fue superior en las células control respecto a las adaptadas. Sin embargo, al calcular el área media celular en la línea control y la adaptada y multiplicarlo por el número de partículas de oro cuantificadas por  $\mu\text{m}^2$  de citoplasma en cada una, los valores para el epítomo JIM13 resultan superiores en las células adaptadas, no sucediendo lo mismo con JIM15.

**Tabla 13. Análisis cuantitativo del marcaje con JIM13 y JIM15.** Las muestras se tomaron en fase de crecimiento exponencial. Letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas según el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

	Número de partículas de oro			
	Membrana plasmática ( $\mu\text{m}$ )	Tonoplasto ( $\mu\text{m}$ )	Citoplasma ( $\mu\text{m}^2$ )	Total por citoplasma
<b>JIM13</b>				
Control	3,64 $\pm$ 0,41a	4,37 $\pm$ 0,40a	15,14 $\pm$ 0,63a	1432,44
Adaptada	2,67 $\pm$ 0,19b	2,43 $\pm$ 0,14b	12,06 $\pm$ 0,87b	2098,56
<b>JIM15</b>				
Control	2,63 $\pm$ 0,24a	2,41 $\pm$ 0,16a	6,06 $\pm$ 0,44a	621,82
Adaptada	1,37 $\pm$ 0,07b	1,39 $\pm$ 0,06b	3,33 $\pm$ 1,46b	579,45

### 3.3. Cuantificación de EXTs.

La presencia de EXTs en células control y adaptadas se determinó mediante la inmunolocalización de cuatro epítomos (JIM11, JIM12, JIM19 y JIM20) en muestras tomadas en fase de crecimiento exponencial. JIM12, JIM19 y JIM20 no dieron resultados positivos. El epítomo JIM11 se localizó en tonoplasto y citoplasma (Figura 87), mostrando diferencias significativas entre ambas líneas celulares. En este sentido, las células adaptadas mostraron un número ligeramente superior de partículas de oro en tonoplasto, resultando llamativos los valores tan elevados cuantificados en el citoplasma con respecto al control (Tabla 14). Así mismo, el número total de partículas por citoplasma fue muy superior en las células adaptadas.



**Figura 87. Inmunolocalización de extensinas con el anticuerpo monoclonal JIM11.** Las imágenes corresponden a células control (a, b y c) y adaptadas (d, e y f) en fase de crecimiento exponencial. Ci: citoplasma; Pc: pared celular; V: vacuola.

**Tabla 14. Análisis cuantitativo del marcaje con JIM11.** Las muestras se tomaron en fase de crecimiento exponencial. Letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas según el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ). n.c. representa "no cuantificado".

	Número de partículas de oro				
	Membrana plasmática ( $\mu\text{m}$ )	Tonoplasto ( $\mu\text{m}$ )	Citoplasma ( $\mu\text{m}^2$ )	Pared celular ( $\mu\text{m}^2$ )	Total por citoplasma
<b>JIM11</b>					
Control	n.c.	$0,05 \pm 0,02\text{b}$	$1,08 \pm 0,10\text{b}$	$0,10 \pm 0,08\text{a}$	110,82
Adaptada	n.c.	$1,81 \pm 0,05\text{a}$	$15,32 \pm 0,45\text{a}$	$0,03 \pm 0,03\text{a}$	2665,83

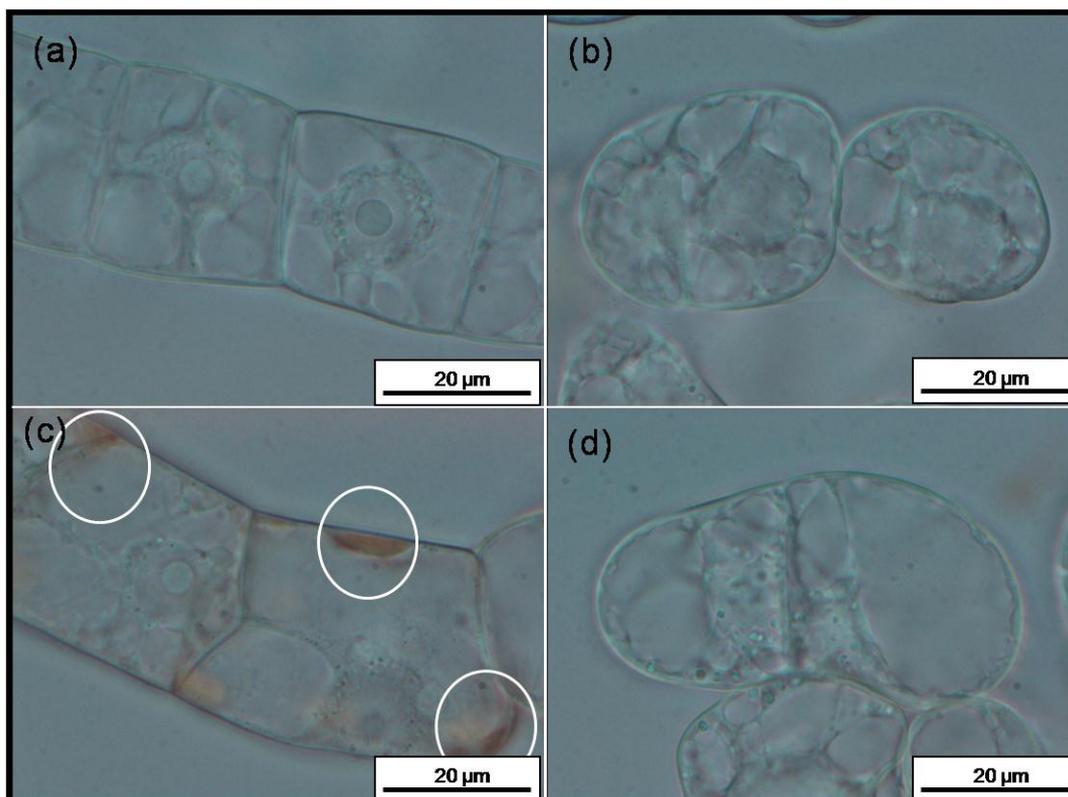
### 3.4. Efecto del tratamiento con $\beta$ -D-glucosil Yariv.

El tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -D-glucosil Yariv durante 24 horas de las líneas celulares control y adaptada produjo variaciones en la viabilidad celular. En este sentido, el porcentaje de células viables descendió entorno a un 10% en la línea control mientras que en la adaptada a salinidad no se observaron variaciones en este parámetro tras el tratamiento con el reactivo (Tabla 15).

**Tabla 15. Viabilidad celular tras el tratamiento con  $\beta$ -D-glucosil Yariv.** Las muestras de ambas líneas celulares en fase de crecimiento exponencial se trataron con 100  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -D-glucosil Yariv durante 24 horas.

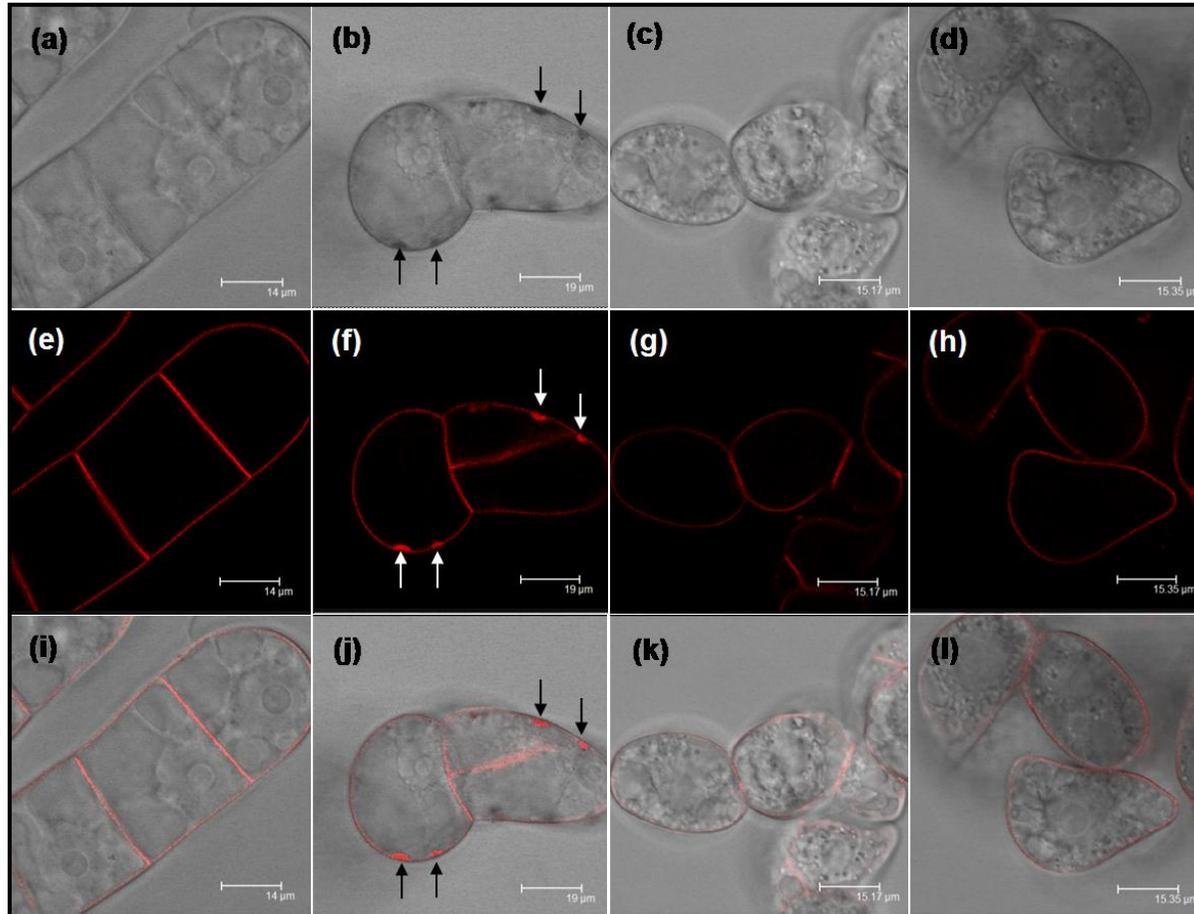
	Control	Control+ $\beta$ -D-glucosil Yariv	Adaptada	Adaptada+ $\beta$ -D-glucosil Yariv
<b>% células viables</b>	96,12	87,22	78,92	79,74
<b>% células no viables</b>	3,88	12,78	21,08	20,26

Con el fin de determinar la causa del descenso en la viabilidad celular, las muestras se sometieron a diversos estudios mediante microscopía óptica, confocal y electrónica. Las observaciones con el microscopio óptico revelaron la presencia de estructuras de color pardo-rojizo distribuidas no uniformemente en la zona próxima a la pared de las células control tratadas con  $\beta$ -D-glucosil Yariv. Las células adaptadas tratadas con el reactivo no experimentaron alteraciones en su morfología (Figura 88).

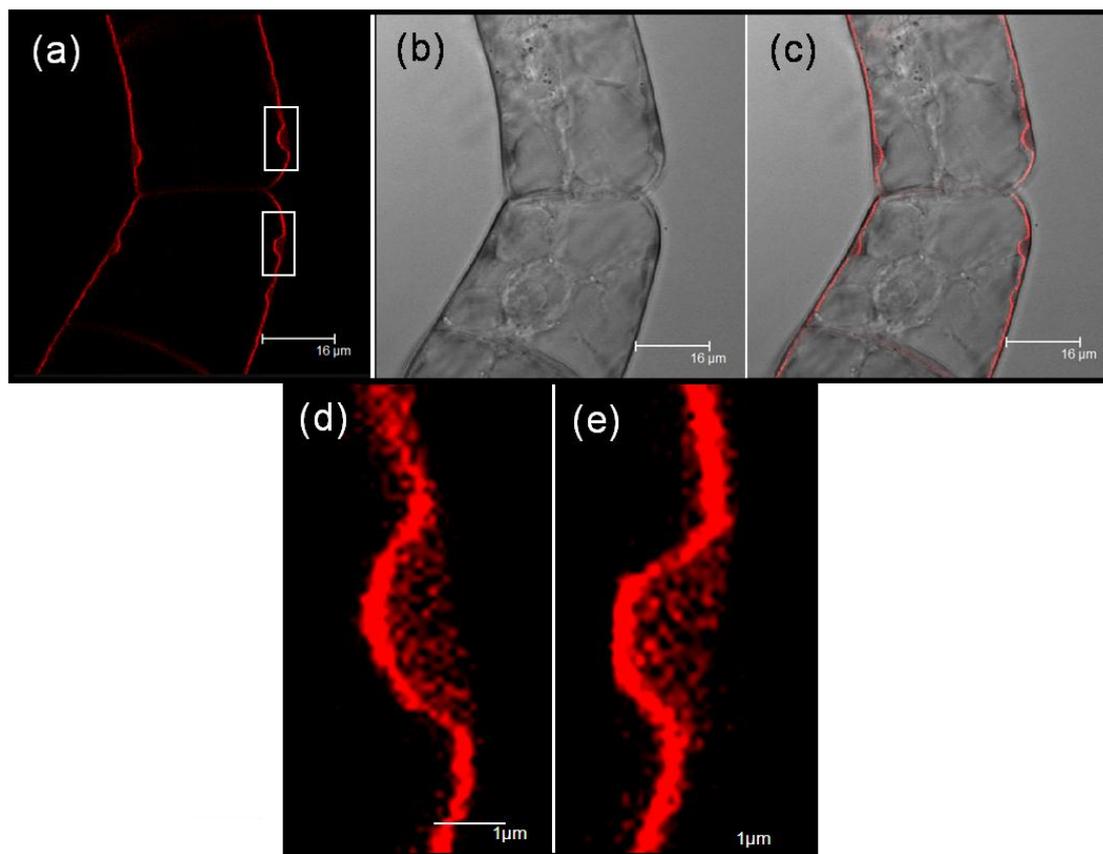


**Figura 88. Alteraciones en la morfología celular tras el tratamiento con  $\beta$ -D-glucosil Yariv.** Las imágenes (a) y (c) corresponden a células control sin tratar y tratadas con  $\beta$ -D-glucosil Yariv respectivamente, (b) y (d) muestran células adaptadas sin tratar y tratadas con  $\beta$ -D-glucosil Yariv. En la imagen (c) se indica la presencia de estructuras de color pardo-rojizo en la zona próxima a la pared celular.

Para comprobar si estas alteraciones se estaban produciendo a nivel de la membrana plasmática, se tiñeron las muestras con FM4-64 y se observaron con el microscopio de láser confocal. Las Figuras 89 y 90 muestran de forma evidente cómo en la zona donde se localizan dichas estructuras pardo-rojizas se produce una invaginación de la membrana plasmática, dejando tras de sí lo que parecen ser nexos de unión con la membrana plasmática. Sin embargo, las células adaptadas tratadas con Yariv no mostraron la presencia de estas estructuras (Figura 89h).



**Figura 89. Alteraciones en la morfología celular tras el tratamiento con  $\beta$ -D-glucosil Yariv.** Las imágenes (a), (e) y (i) corresponden a células control, (b), (f) y (j) muestran células control tratadas con  $\beta$ -D-glucosil Yariv, (c), (g) y (k) células adaptadas y (d), (h) y (l) células adaptadas tratadas con  $\beta$ -D-glucosil Yariv. Las muestras se incubaron con FM4-64 (rojo-imágenes e, f, g y h). Las imágenes (a, b, c y d) corresponden a las mismas células observadas con la técnica de Normansky. En (i, j, k y l) se muestra la superposición de las imágenes anteriores. En el caso de las células tratadas con  $\beta$ -D-glucosil Yariv, éste se incubó durante 24 horas. En (b), (f) y (j) las flechas indican la presencia de alteraciones a nivel de la membrana plasmática.



**Figura 90. Alteraciones en la membrana plasmática de células control tratadas con  $\beta$ -D-glucosil Yariv.** Las imágenes muestran células control tratadas durante 24 horas con el reactivo y posteriormente incubadas con FM4-64 (rojo-imágenes a, d y e). En (b) se muestran las mismas células observadas con la técnica de Normansky. La imagen (c) corresponde a la superposición de (a y b). Las imágenes (d) y (e) corresponden a los detalles de las zonas marcadas en la imagen (a).

La ultraestructura de las células adaptadas tratadas con el reactivo de Yariv no reveló alteraciones aparentes a nivel de la membrana plasmática y la pared celular (Figura 91). Sin embargo, en las células control se evidenciaron los resultados obtenidos mediante microscopía de láser confocal. En este sentido, la Figura 92 muestra imágenes de la ultraestructura de células control tratadas con  $\beta$ -D-glucosil Yariv en las que se pueden apreciar las alteraciones producidas a nivel de la membrana plasmática. Para confirmar si en estas zonas se producía una acumulación de AGPs debida al efecto provocado por el reactivo  $\beta$ -D-glucosil Yariv, se procedió a realizar una inmunolocalización con los anticuerpos monoclonales JIM13 y LM2 (Figura 93). Los anticuerpos marcaron una gran cantidad de AGPs en las zonas

alteradas, que se apreciaban como zonas desestructuradas de la membrana plasmática. Estas estructuras que marcan los AGPs se correspondían con las estructuras membranosas observadas mediante microscopía electrónica de transmisión y laser confocal.

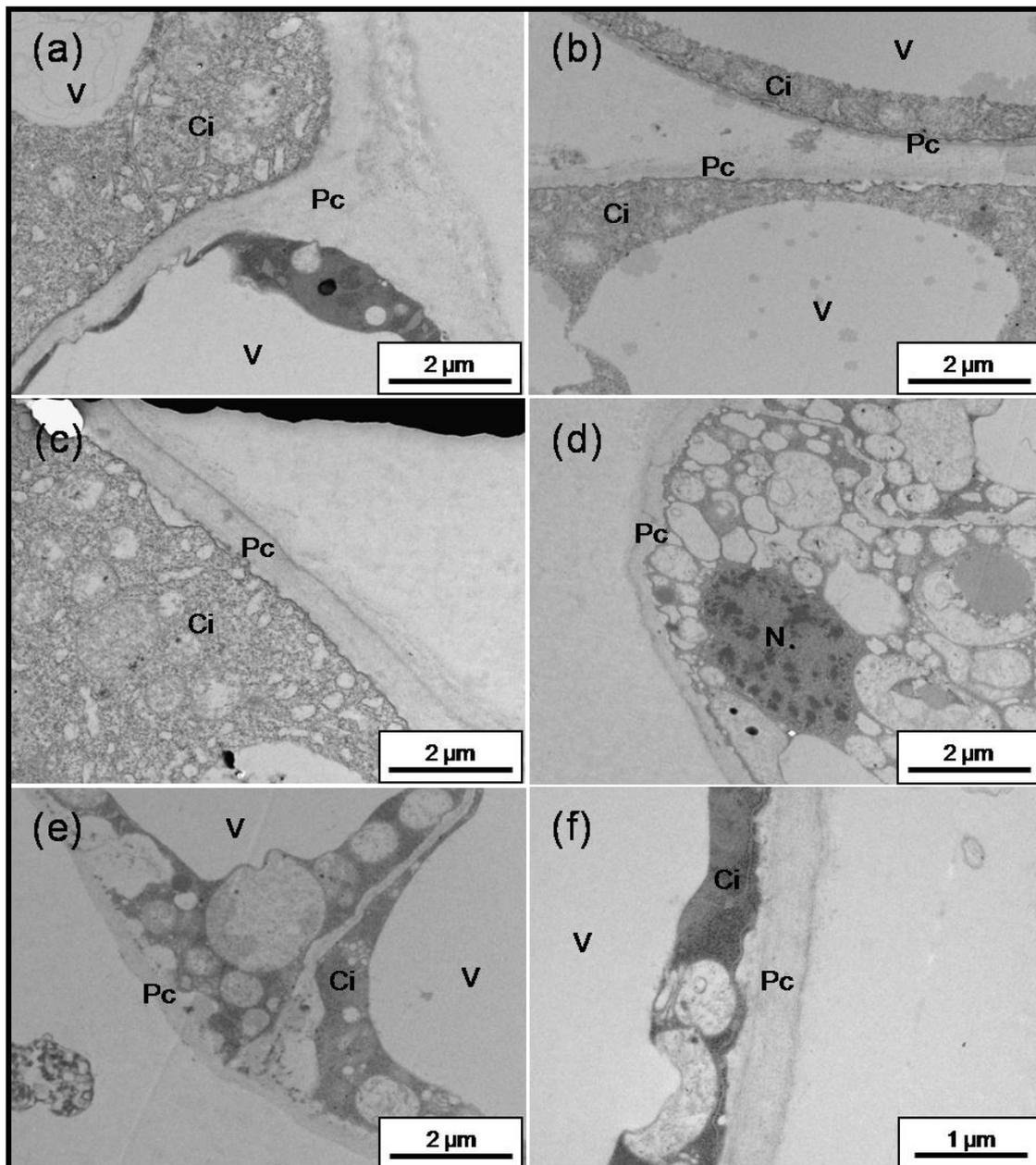


Figura 91. Ultraestructura de las células adaptadas tras el tratamiento con  $\beta$ -D-glucosil Yariv. Ci: citoplasma; N: núcleo; Pc: pared celular; V: vacuola.

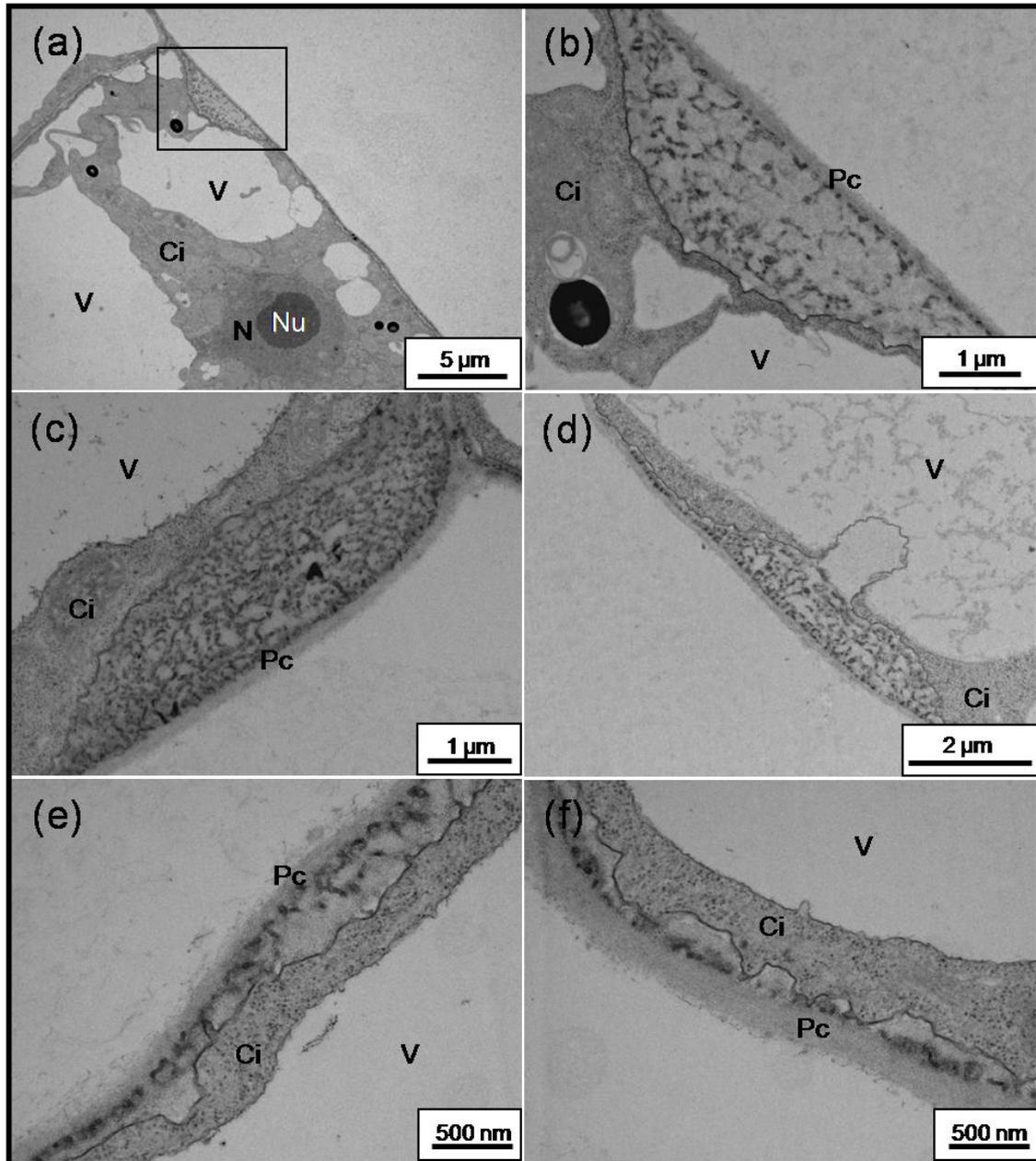
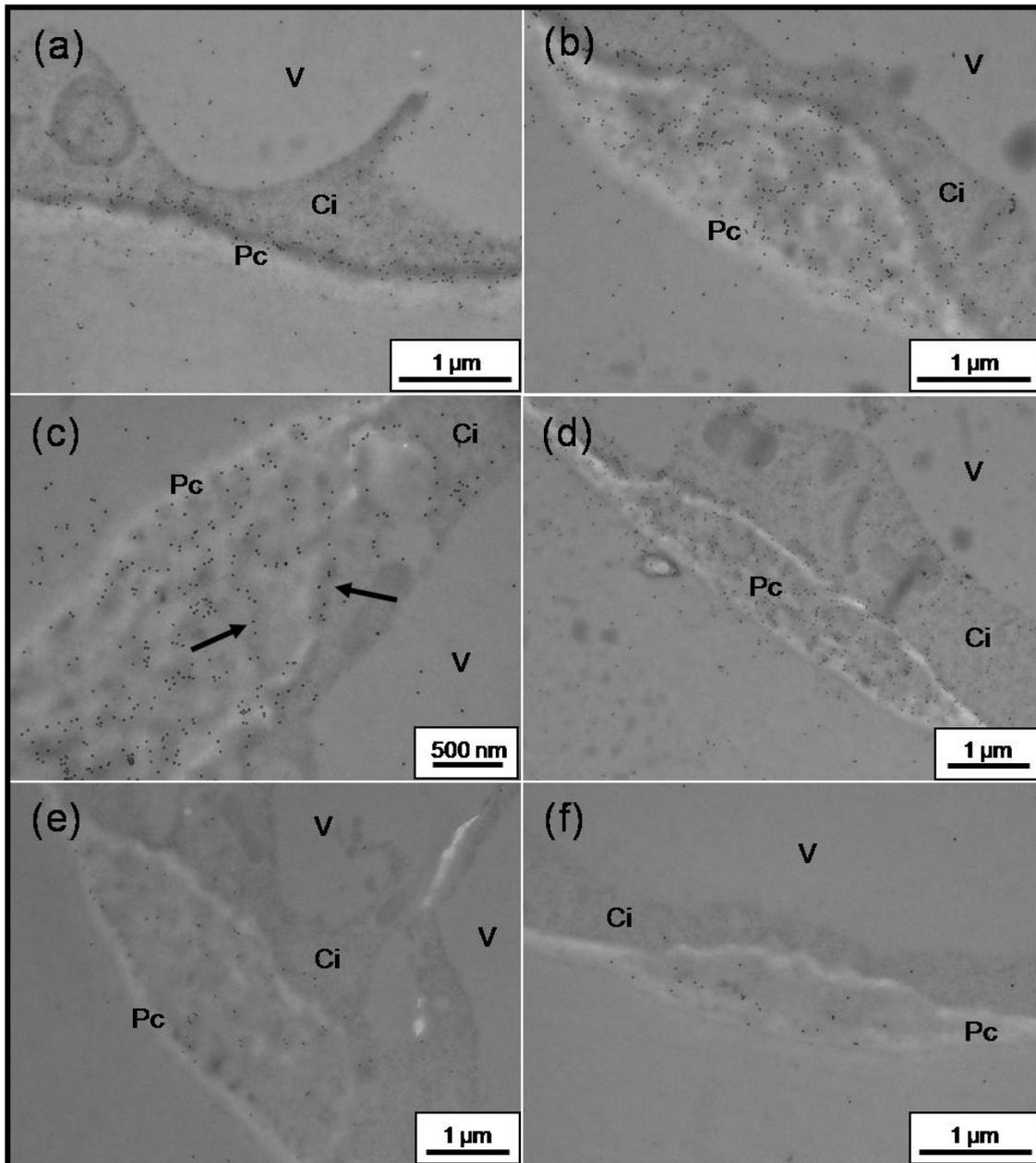


Figura 92. Ultraestructura de las células control tras el tratamiento con  $\beta$ -D-glucosil Yariv. Ci: citoplasma; N: núcleo; Nu: nucléolo; Pc: pared celular; V: vacuola.



**Figura 93. Inmunolocalización de AGPs con los anticuerpos monoclonales JIM13 y LM2.** Las imágenes muestran células adaptadas. (a, b, c y d) corresponden a JIM13, (e y f) a LM2. Ci: citoplasma; Pc: pared celular; V: vacuola.



## V. DISCUSIÓN



## V. DISCUSIÓN.

### 1. Mecanismos celulares de adaptación al estrés salino en cultivos celulares de tabaco BY-2.

La adaptación a elevadas concentraciones salinas en cultivos celulares se obtiene por selección en medio salino mediante un incremento progresivo de la concentración de sal (Rai y col., 2011). En nuestro caso, hemos obtenido una línea celular de tabaco BY-2 estable adaptada a crecer en 258 mM de NaCl aplicando la metodología desarrollada para otras especies y variedades (Binzel y col., 1987; Olmos y col., 1994; Piqueras y col., 1994; Lampion y col., 2006). El proceso de adaptación en cultivos celulares es complejo, habiéndose propuesto que las modificaciones que tienen lugar a nivel celular pueden tener naturaleza epigenética, no siendo debidas a mutaciones genéticas estables (Rai y col., 2011). En el caso de las células de tabaco BY-2 seleccionadas a 258 mM de NaCl, las modificaciones morfológicas y de crecimiento fueron restablecidas al ser crecidas de nuevo en un medio libre de NaCl, recuperando la morfología celular y el crecimiento propios de las células control en tan solo 3 subcultivos. Este hecho indica que las modificaciones observadas pueden ser, al menos parcialmente, revertidas.

Las células de tabaco BY-2 adaptadas a altas concentraciones salinas muestran un conjunto de modificaciones ultraestructurales, fisiológicas, bioquímicas y moleculares que les permiten crecer bajo estas condiciones de estrés. En vista de los resultados obtenidos, a continuación describiremos los principales mecanismos celulares implicados en este proceso de adaptación.

#### ***La adaptación a altas concentraciones salinas induce cambios en el crecimiento y la estructura celular de las células de tabaco BY-2.***

Al observar al microscopio óptico las células adaptadas lo primero que resulta evidente es la reducción del tamaño celular en comparación con las células control. La reducción del tamaño celular es común a la mayoría de los estudios realizados en cultivos celulares adaptados a altas concentraciones salinas. Binzel y col., (1985), en cultivos celulares de tabaco adaptados a 428mM de NaCl también evidenciaron una importante reducción en el tamaño celular. Así mismo, Olmos y Hellín (1996a) observaron que callos de *Pisum sativum* adaptados a 85 mM de NaCl mostraban un menor tamaño celular. La variación del tamaño celular se vió acompañada por un

incremento de la relación citoplasma/vacuola, resultando frecuente el incremento del número de pequeñas vacuolas. Estos resultados estarían de acuerdo con los observados en cultivos celulares de tabaco, *Citrus limon* y *Pisum sativum* (Piqueras y col., 1994; Olmos y Hellin 1996a). Lo comentado anteriormente explicaría el hecho de que los cultivos celulares de tabaco BY-2 adaptados a salinidad presenten un mayor peso seco por gramo de peso fresco y una menor cantidad relativa de agua. Estas modificaciones parecen estar relacionadas con la adaptación a la mayor osmoticidad del medio de cultivo. Así, las células adaptadas tienden a acumular una mayor cantidad de osmolitos para compensar la alta presión osmótica del medio salino (Binzel y col., 1987; Olmos y Hellín, 1996b).

Las células de tabaco BY-2 adaptadas muestran una importante ralentización del crecimiento que se relacionó con un descenso en el índice mitótico. A diferencia de las células control, las células adaptadas mostraron una importante inducción de la muerte celular. El proceso de crecimiento en las células control viene regulado por la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo, resultando el fosfato un factor limitante para la división celular (Sano y col., 1999). Así, el fosfato se agota durante la fase de crecimiento exponencial, induciendo la progresiva entrada en una fase quiescente en la que se detiene la división celular, que volverá a reanudarse al transferir las células a un nuevo medio de cultivo o al adicionar dicho compuesto (Sano y col., 1999). Las células adaptadas muestran un comportamiento similar, sin embargo, al final de la fase de crecimiento exponencial la muerte celular se incrementa. Nuestra hipótesis es que en el momento en que las células adaptadas paran de dividirse y entran en fase  $G_0$  o bien son capaces de volver a reanudar el proceso de división, por ejemplo al ser subcultivadas de nuevo en medio fresco, o bien permanecen en un estado quiescente que finalmente da lugar a un proceso de muerte celular (Figura 94). Diversos autores han propuesto que la exposición a altas concentraciones salinas induciría la muerte celular programa, siguiendo un mecanismo similar al que se induce en los animales (Affenzeller y col., 2009; Zuppini y col., 2010; Wang y col., 2010). Wang y col. (2010) sometieron cultivos celulares de la halófila *Thellungiella halophila* a 300 mM de NaCl y analizaron las modificaciones ultraestructurales. Estos autores encontraron importantes similitudes a las observadas por nosotros en las células adaptadas de tabaco BY-2. En este sentido, observaron una importante dilatación de las mitocondrias, gran acumulación de pequeñas vacuolas y vesículas en el citoplasma, así como condensación de la cromatina nuclear. El proceso de muerte celular en vegetales es complejo y en muchos casos parece seguir un mecanismo parecido al descrito en células animales, sin embargo

presenta importantes diferencias (Van Doorn y col., 2011). Van Doorn y col. (2011) han clasificado la muerte celular en dos grandes grupos: muerte vacuolar y necrosis celular. Los rasgos ultraestructurales de nuestras células de tabaco BY-2 adaptadas a salinidad parecen indicar que la muerte celular observada se origina principalmente por un mecanismo de necrosis, aunque células presentan rasgos no descritos por estos autores como por ejemplo las alteraciones en el aparato de Golgi y las dilataciones del retículo endoplasmático y envoltura nuclear. Nuestra hipótesis se basa en que en las células de tabaco BY-2 adaptadas a salinidad se produce una muerte celular de tipo necrótico donde la mitocondria y el sistema de endomembranas, principalmente Golgi y retículo endoplasmático, estarían regulando el proceso. En los siguientes apartados describiremos en más profundidad cuáles pueden ser estos mecanismos celulares y moleculares que controlan el proceso de adaptación o muerte celular en las células de tabaco BY-2.

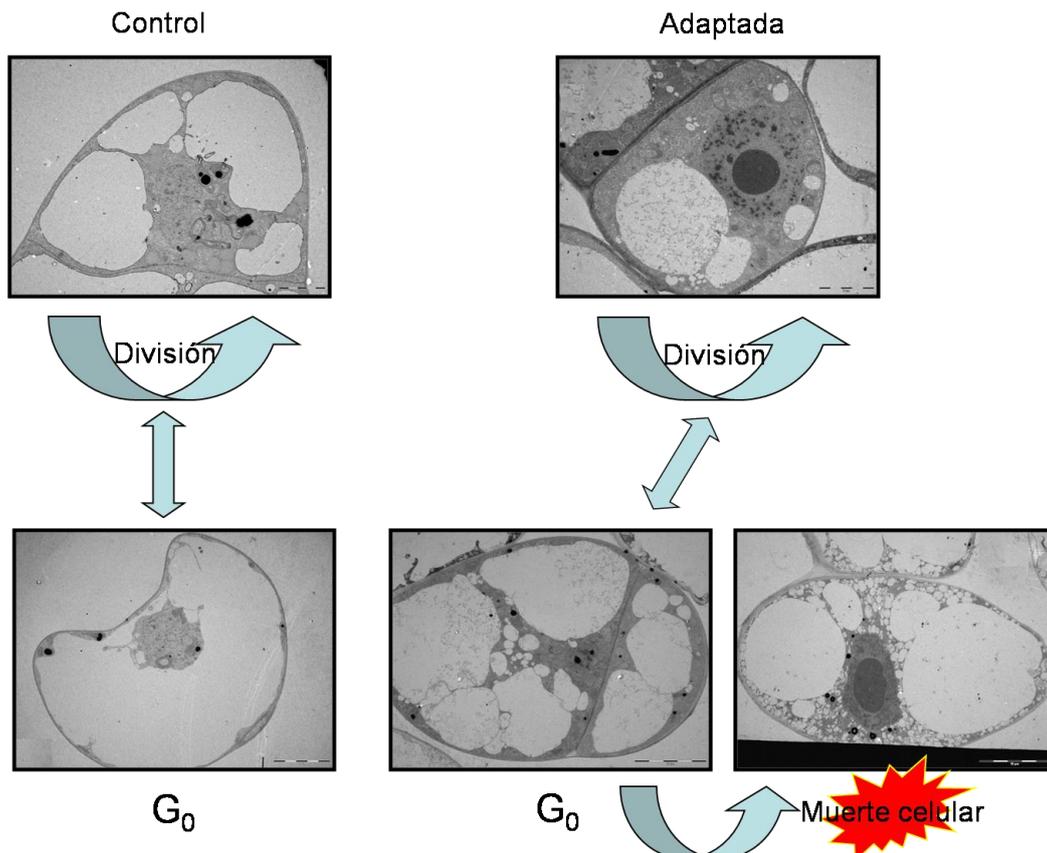


Figura 94. Evolución comparativa del ciclo celular y la inducción de muerte celular en las células control y adaptadas de tabaco BY-2.

**La adaptación a altas concentraciones salinas produce importantes modificaciones en el proteoma y transcriptoma de las células de tabaco BY-2.**

Las herramientas de genómica funcional tales como la transcriptómica, ionómica, metabolómica y proteómica han sido ampliamente utilizadas en estudios relacionados con el estrés abiótico, entre ellos el estrés salino (Shelden y Roessner 2013). Sin embargo, los trabajos que combinan estas aproximaciones resultan poco abundantes. En nuestro estudio hemos realizado una aproximación transcriptómica y proteómica, analizando además el ionoma de las células. Cabe destacar, que la comparación entre los resultados obtenidos debe ser realizada teniendo en cuenta ciertos factores que alteran una perfecta correlación entre los mismos (Deyholos, 2010).

En relación al sistema utilizado para el estudio proteómico, 2D-DIGE, nos permitió observar un 35% más de *spots* que por el método descrito previamente para el proteoma de las células de tabaco BY-2 (Duby y col., 2010). Este mayor número de *spots* observados se debe principalmente a que la técnica 2D-DIGE resulta más sensible que la tinción con azul de Coomassie utilizada por los autores citados anteriormente. Además, la reproducibilidad de las muestras fue muy alta, lo que se traduce en una mayor precisión en los resultados. En cuanto al chip de microarray de la compañía Affymetrix utilizado en nuestro estudio, fue diseñado por Edwards y col. (2010) para realizar un estudio completo de los diferentes órganos y tejidos de tabaco. El genoma de tabaco es muy grande comparado con el de otras especies vegetales, aproximadamente 5 Gb, lo que ha hecho difícil su secuenciación. Además, el tabaco es una especie alelotetraploide ( $2n= 4x12=48$ ) y su genoma está formado por la hibridación interespecífica de dos genomas, *Nicotiana sylvestris* (genoma maternal) y *Nicotiana tomentosiformis* (genoma parental). El análisis de la respuesta al estrés salino mediante mostró la alteración (cambio >2 veces) del 18,2% de los *spots* identificados mediante 2D-DIGE. Igualmente, se obtuvo un resultado muy parecido con la transcriptómica, mostrando un cambio significativo superior a 2 veces del 16.6% de los genes presentes en el microarray. Estos resultados son similares a los publicados en otras especies (Zhou y col., 2007; Molina y col., 2011; Chen y col., 2012).

Recientemente, Zhang y col. (2012) han publicado una revisión acerca de los estudios de proteómica realizados bajo condiciones de estrés salino. En dicho trabajo, que abarca a 34 especies diferentes, se describen 2171 proteínas que responden a salinidad y que representan a 561 proteínas únicas. Así mismo, Aghaei y Komatsu (2013) han revisado la respuesta del proteoma a condiciones salinas en 13 plantas

pertenecientes a diferentes cultivos y 5 plantas medicinales con importancia económica. Ambas revisiones coinciden en los grupos mayoritarios de proteínas y rutas metabólicas afectadas, así como en las proteínas clave alteradas. Nuestros resultados con las células de tabaco BY-2 adaptadas a salinidad coinciden con los trabajos citados anteriormente en el tipo de proteínas expresadas de forma diferencial, resultando la proteína 2-hidroxiacil-Coa liasa (*spot* 904), posible dihidrodipicolinato reductasa (*spot* 1680), y la proteína de ensamblaje del nucleosoma (*spot* 3133) exclusivas de nuestro estudio.

Posiblemente, lo más destacado de nuestro trabajo de proteómica fue la importante alteración en los niveles de chaperonas en las células adaptadas, representando el grupo más abundante (aproximadamente un 40%) del total de proteínas. Las chaperonas forman un amplio grupo de proteínas pertenecientes a cinco grandes familias (Wang y col., 2004), constituyendo un elemento clave en el mantenimiento de la homeostasis celular tanto en condiciones normales como adversas. Su función está enmarcada en el mantenimiento de un correcto plegamiento, ensamblaje, translocación y reparación de proteínas. En condiciones de estrés también participan en la estabilización de proteínas y membranas y en el repliegado de aquellas proteínas que han resultado dañadas (Wang y col., 2004). En la Figura 95 se muestra un esquema general de la posible función de estas proteínas en las células de tabaco BY-2 adaptadas a salinidad. La familia de proteínas más abundante en el proteoma de estas células fue la HSP90, cuyo sustrato son las proteínas implicadas en la traducción de señales, tales como el receptor de hormonas esteroideas y las proteínas implicadas en la señalización por quinasas. El papel principal de las HSP90 es el plegamiento de proteínas pero también participan en el control del ciclo celular y degradación y tráfico de proteínas (Wang y col., 2004). Los resultados del microarray corroboran los obtenidos mediante proteómica, mostrando igualmente que el grupo de las chaperonas se encuentra entre los más alterados en las células BY-2 adaptadas. Por tanto, la adaptación de las células de tabaco BY-2 a elevadas concentraciones salinas implica claramente un proceso de daño en las proteínas, que deben ser reparadas y/o eliminadas por las células para evitar la muerte celular.

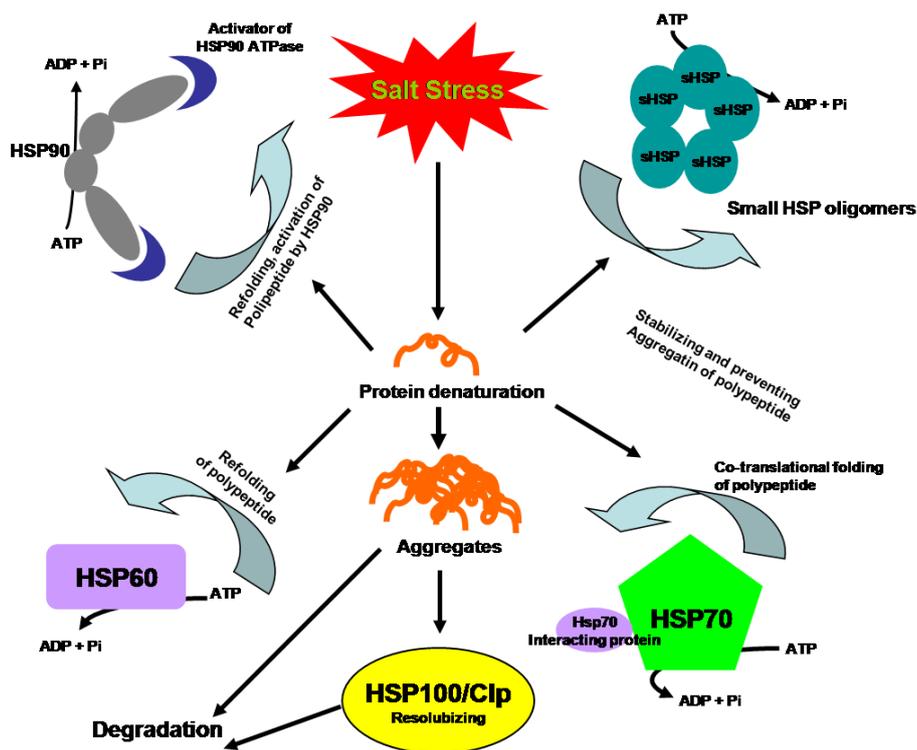


Figura 95. Modelo de actuación de diferentes chaperonas en las células BY-2 adaptadas a salinidad.

El análisis conjunto del microarray y de proteómica demuestra que los grupos de genes y proteínas más afectados por el estrés salino son los clasificados de forma amplia como respuesta al estrés. La bibliografía refleja que en los diferentes trabajos realizados con microarrays y proteómica una de las principales familias inducidas corresponde a la de defensa y eliminación de ROS (Zhang y col., 2012). En nuestro estudio, hemos podido confirmar la acumulación de ROS tanto en el citoplasma como en las mitocondrias de las células adaptadas. Así mismo, nuestros resultados de proteómica muestran la disminución de una dehidroascorbato reductasa (DHAR), enzima implicada en el ciclo ascorbato-glutatión y presente en diferentes compartimentos celulares como el citosol, la mitocondria y los plastidios (Fernández-García y col., 2009). Sin embargo, en el microarray se observa la inducción de una DHAR. Esta enzima resulta muy importante, ya que permite regenerar el ascorbato y mantener la homeostasis redox celular. Jiang y col. (2007) observaron mediante un análisis comparativo del proteoma de raíces de *Arabidopsis* salinizadas una disminución en los niveles de la enzima monodehidroascorbato reductasa en las

raíces tratadas con sal. Esta enzima también forma parte del ciclo ascorbato-glutatión y participa junto a la DHAR en el mantenimiento del *pool* de ascorbato. Estos resultados sugieren que aunque la planta requiere ascorbato reducido para la eliminación de radicales libres, el equilibrio de los sistemas redox es el principal regulador de la respuesta al estrés salino (Hernández y col., 2010).

Otra proteína detectada en nuestro análisis fue la chaperona de cobre, presente en dos *spots* diferentes (*spots* 2179 y 3127). Se considera que esta proteína es un activador de las enzimas Cu, Zn-SODs que actuaría facilitándoles la disponibilidad del cofactor. Huang y col. (2012) han demostrado que las chaperonas de cobre son necesarias para la correcta activación de las SODs. El *spot* 2179 de nuestro estudio de proteómica, que como hemos dicho anteriormente corresponde a una chaperona de cobre, se encuentra inducido 5,2 veces, mientras que el otro *spot* que corresponde a la otra chaperona de cobre, el 3127, está inhibido 4,2 veces. Sin embargo, la abundancia de la proteína es mucho mayor en el *spot* 2179, lo que parece indicar que la proteína estaría inducida en las células adaptadas. El grupo más abundante que mostró en casi la mayoría de genes una inducción fueron las proteínas glutatión-S-transferasas (GSTs). Jiang y Deyholos (2006) observaron de forma parecida que al menos 19 genes de GSTs se encontraban incrementados en raíces de *Arabidopsis* tratadas con NaCl. La familia de las GSTs es muy amplia, habiendo sido implicadas estas proteínas en procesos como la detoxificación de herbicidas y la reducción de hidroperóxidos orgánicos formados por el estrés oxidativo. Así mismo, también están implicadas en las rutas de señalización celular y la regulación de la muerte celular inducida por radiación UV (Dixon y col., 2002). Por tanto, es posible que en las células BY-2 adaptadas a salinidad se produzca una inducción de la síntesis de GSTs como respuesta al estrés oxidativo inducido por la alta acumulación de peróxido de hidrógeno, así como para la detoxificación de hidroperóxidos, tal y como refleja la acumulación de MDA en las células adaptadas.

Los factores de transcripción son claves para la regulación de la expresión génica y la respuesta al estrés, calculándose que aproximadamente el 7% del genoma codifica para dichos factores de transcripción (Udvardi y col., 2007). Rushton y col. (2008) han descrito en el genoma de tabaco la presencia de al menos 2513 factores de transcripción, de los cuales 772 están representados en el microarray de tabaco. De entre todos ellos, hemos destacado la familia de factores de transcripción WRKY que se encuentra entre las más abundantes en plantas y está implicada en la respuesta al ácido abscísico (Rushton y col., 2012). En este sentido, en los últimos años se ha

demostrado que entre las dianas de los WRKY se encuentran genes implicados en la respuesta al ABA tales como *ABF2*, *ABF4*, *ABI4*, *ABI5*, *MYB2*, *DREB1a*, *DREB2a*, *RAB18*, *RD29A* y *COR47* (Rushton y col., 2012). En las células de tabaco BY-2 adaptadas a salinidad hemos observado que la familia WRKY se encuentra altamente regulada, mostrando inducción de los factores de transcripción WRKY6, WRKY7, WRKY11, WRKY17, WRKY22, WRKY23, WRKY32, WRKY33, WRKY40, WRKY70 y la inhibición de WRKY3, WRKY4, WRKY20 y WRKY71. Estos factores de transcripción estarían mediando en la respuesta de adaptación a salinidad de las células de tabaco BY-2, posiblemente siguiendo el mecanismo descrito más abajo (Figura 98).

En los últimos años, el papel de las proteínas reguladoras del transporte núcleo-citoplasma en los mecanismos de señalización celular, están cobrando gran importancia. Así, se ha comprobado que las proteínas del tipo Ran GTPasa están implicadas en el movimiento del ARN a través de la envoltura nuclear y parecen participar en el ensamblaje de la membrana nuclear y la formación del huso mitótico (Merkle, 2011). Nuestros resultados de proteómica muestran la acumulación de una proteína Ran nuclear con motivo de unión a GTP. Como hemos visto anteriormente, los resultados de ultraestructura nos muestran que uno de los efectos provocados por la salinidad en ciertas células adaptadas (aquellas que se encuentran en fase II y fase III) es la alteración de la membrana nuclear, mostrando dilataciones del lumen de la envoltura nuclear. Además, los datos del microarray muestran la inducción de un factor nuclear de transporte (NTF2), proteína que esta implicada en el transporte de la proteína Ran al núcleo (Merkle, 2011). Recientemente, Zang y col. (2010) han observado que una proteína de la familia Ran, OsRAN2, al ser sobreexpresada en *Arabidopsis* indujo hipersensibilidad a la salinidad, ABA y estrés osmótico. Estos autores observaron que las plantas transgénicas mostraban una mayor inducción del gen *AtNCED3* que las plantas silvestres al ser tratadas con NaCl, resultando la enzima OsRAN2 clave en la síntesis de ABA (ver más adelante). Zang y col. sugieren que bajo condiciones de estrés abiótico, el papel de la proteína OsRAN2 sería facilitar la señalización regulando la transferencia de proteínas específicas o ARN del citoplasma al núcleo y/o del núcleo al citoplasma a través de la envoltura nuclear.

**La adaptación a altas concentraciones salinas induce la compartimentación de Na<sup>+</sup> y el tráfico de vesículas en células de tabaco BY-2.**

Los mecanismos de compartimentación de Na<sup>+</sup> en la vacuola parecen ser determinantes en los procesos de adaptación a elevadas concentraciones salinas en plantas y células de tipo glicófitas, al evitar la toxicidad iónica del Na<sup>+</sup> en el citoplasma (Munns y Tester, 2008). Sin embargo, no resulta fácil conocer la distribución subcelular de los diferentes cationes y aniones en células vivas. Las primeras aproximaciones realistas de la distribución subcelular de los elementos químicos se obtuvo mediante las técnicas de microanálisis de rayos X acopladas a microscopios electrónicos de barrido y transmisión en conjunción con técnicas de criofijación (ver revisión de McCully y col., 2010). Así, entre los primeros autores, Stelzer y col. (1988) demostraron que en raíces de *Hordeum vulgare* sometidas a estrés salino el Na<sup>+</sup> se acumulaba en las vacuolas. Por otro lado, los primeros estudios con cultivos celulares de tabaco cv. Wisconsin adaptados a elevadas concentraciones salinas (428 mM de NaCl), mostraron mediante microscopía de barrido y microanálisis de rayos X que la vacuola principal de la célula adaptada acumulaba Na<sup>+</sup>, con un ratio 8 veces superior en la vacuola que en el citoplasma (Binzel y col., 1988).

Mediante análisis iónico hemos observado que las células adaptadas de tabaco BY-2 acumulan Na<sup>+</sup>. En cuanto a la localización subcelular de este catión, en nuestro estudio hemos preferido utilizar técnicas *in vivo* dado que en los últimos años se han desarrollado fluoróforos que se unen al Na<sup>+</sup> de forma específica, pudiendo ser observados mediante microscopía de laser confocal (Kanai y col., 2007; Park y col., 2009; Oh y col., 2009; Hamaji y col., 2009; González y col., 2012). En este sentido, para conocer la distribución subcelular de Na<sup>+</sup> hemos utilizado dos fluoróforos diferentes, CoroNa Green y Asante Natrium Green, que se unen de forma específica al catión emitiendo fluorescencia de forma casi proporcional en función de su concentración (Park y col., 2009). Ambos fluoróforos han dado resultados similares, demostrando que las células adaptadas de tabaco presentan concentraciones de Na<sup>+</sup> inferiores en el citoplasma con respecto a la vacuola en cada una de las fases de crecimiento, con un ratio medio de 6 veces superior en la vacuola que en el citoplasma. Hamaji y col. (2009), utilizando el fluoróforo SBFI, observaron en cultivos celulares de *Arabidopsis* expuestos a 75 mM de NaCl que las células acumulaban el Na<sup>+</sup> principalmente en la vacuola. Por tanto, nuestros resultados parecen confirmar la importancia de la compartimentación de Na<sup>+</sup> en la vacuola como mecanismo de tolerancia a salinidad.

Los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares implicados en la tolerancia a salinidad que controlan la captación y compartimentación de  $\text{Na}^+$  han sido ampliamente estudiados en la bibliografía (Bassil y col., 2012; Barragán y col., 2012). Los antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  vacuolares (NHX1 y NHX2) han sido considerados como los principales responsables de la inclusión de  $\text{Na}^+$  en la vacuola de plantas y células salinizadas (Apse y col., 1999; Zhang y Blumwald., 2001). Sin embargo, nuestros resultados del microarray, muestran que la expresión en las células adaptadas de los dos posibles homólogos de los genes *NHX1* y *NHX2*, no se encuentra alterada. Además, hemos observado que los posibles homólogos de los genes *SOS*, encargados de la exclusión celular del  $\text{Na}^+$  al apoplasto están significativamente reprimidos en las células adaptadas.

Recientemente, Leidi y col. (2010) y Barragán y col. (2012) han mostrado que los transportadores vacuolares NHX1 y NHX2 de *Arabidopsis thaliana* actuarían principalmente en la homeostasis del  $\text{K}^+$  entre la vacuola y el citoplasma, teniendo poca influencia en el transporte de  $\text{Na}^+$  a la vacuola en condiciones de estrés salino. Así, Leidi y col. (2010), utilizando técnicas de criofijación y microanálisis de rayos X, han demostrado que plantas de tomate que sobreexpresaban el gen *AtNHX1* de *Arabidopsis* mostraban un incremento de la proteína en la fracción microsomal. Dichas plantas al ser sometidas a estrés salino mostraron una mayor acumulación de  $\text{K}^+$  en la vacuola, pero no se observaron alteraciones en la concentración de  $\text{Na}^+$  vacuolar. Estos resultados han permitido que se postulen otros tipos de transportadores vacuolares como posibles candidatos al transporte de  $\text{Na}^+$  (Bassil y col., 2012).

Así mismo, en los últimos años se ha observado que el proceso de endocitosis y tráfico de vesículas entre la membrana plasmática y la vacuola podrían desempeñar un papel importante en la tolerancia a salinidad (Mazel y col., 2004; Leshem y col., 2006; Hamiji y col., 2009; Bassil y col., 2012). Nuestros resultados de localización de  $\text{Na}^+$  y vesículas endocíticas mediante el uso del fluoróforo FM4-64, demuestran una evidente colocalización de ambos en las células adaptadas a salinidad. El origen de las vesículas marcadas con FM4-64 en pulsos cortos es considerado como endocítico, tal y como ha sido demostrado anteriormente en cultivos celulares de BY-2 (Uemura y col., 2004; van Gisbergen y col., 2008). Mazel y col. (2004) han observado que en plantas que sobreexpresaban el gen *AtRab7* de *Arabidopsis*, implicado en el tráfico de vesículas, se incrementaba la tolerancia a salinidad. El transcriptoma de las células de tabaco BY-2 adaptadas a salinidad muestra la inducción de dos homólogos de genes implicados en el tráfico de vesículas, *VAMP7c* y *VSP46* (vacuolar sorting protein 46).

*VAMP7c* pertenece a la familia de proteínas v-SNARE (vesicle-synaptobrevin-like) que están implicadas en el proceso de fusión de la vesícula con el tonoplasto (Uemura y col., 2004). Leshem y col. (2006) obtuvieron plantas transgénicas en las que habían suprimido la expresión del gen *AtVAMP711* observando que resultaban más tolerantes al estrés salino, mostrando una importante acumulación de vesículas y ROS en el citoplasma. En cuanto a la función de la proteína VSP46, Ibl y col. (2011) han demostrado que está asociada al complejo mayor ESCRT-III, implicado en la formación de los cuerpos multivesiculares. Por otro lado, hemos observado que las células adaptadas inducen una fosfolipasa Dα1 que, entre otras funciones celulares, participa en la ruta endocítica facilitando la formación de las vesículas endosomales (Donaldson y col., 2009).

Estos resultados estarían apoyados por las modificaciones ultraestructurales observadas en las células de tabaco BY-2 adaptadas, que muestran un incremento significativo del número de vesículas y cuerpos multivesiculares en el citoplasma. Por tanto, nuestra hipótesis es que las células de tabaco BY-2 adaptadas a elevadas concentraciones salinas tienen inducidos los sistemas endocítico y de tráfico de vesículas, pudiendo transportar el Na<sup>+</sup> exterior directamente a las vacuolas y evitando, de esta forma, el paso del Na<sup>+</sup> por el citoplasma.

### ***El metabolismo de la prolina y el ABA están implicados en la adaptación a altas concentraciones salinas en células de tabaco BY-2.***

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal que juega un papel crucial en la señalización y adaptación a diferentes estreses abióticos, principalmente hídrico y salino (Cutler y col., 2012). La acumulación de ABA en respuesta al estrés salino ha sido ampliamente descrita en la bibliografía (Nagy y Galiba, 1995; Gómez-Cadenas y col., 1998; Jia y col., 2002; Zörb y col., 2013). En este sentido, plantas sometidas a condiciones de estrés salino e hídrico pueden llegar a acumular hasta 40 veces más ABA que los controles (Zeevaart y Creelman, 1988). Igualmente, se ha observado que mutantes que presentaban alterada su biosíntesis o percepción resultaban más sensibles al estrés abiótico, mientras que plantas transgénicas con mayores niveles de ABA eran más tolerantes que los cultivares de origen (Iuchi y col., 2001; Qin y Zeevaart, 2002).

A nivel metabólico, la concentración de ABA celular viene determinada por la tasa de biosíntesis y catabolismo de la hormona (Nambara y Marion-Poll, 2005). Nuestros

resultados muestran claramente una importante acumulación de ABA en las células adaptadas, aproximadamente 8 veces superior respecto al control. Barrero y col. (2006) han propuesto que en *Arabidopsis* el gen *NCED3* (9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa 3) y en menor medida los genes *AAO3* (abscísico aldehído oxidasa 3) y *ABA1* (zeaxantina epoxidasa) estarían controlando la acumulación de ABA en condiciones de estrés salino. Estos autores han observado que el gen *NCED3* se encuentra altamente inducido por el estrés salino, tanto en el ecotipo silvestre como en mutantes deficientes en ABA. Esto indica que dicho gen estaría controlado tanto por una vía dependiente como por otra independiente de ABA. En *Nicotiana plumbaginifolia* se han identificado dos mutantes deficientes en ABA, *Npaba2* homólogo de *ABA1* en *Arabidopsis* y *Npaba1* homólogo de *ABA3* (MoCo sulfurasa). Nuestros resultados de expresión en el microarray muestran una inducción del posible gen homólogo de *NCED3* en tabaco, lo que estaría de acuerdo con la hipótesis de que en las células adaptadas a salinidad este gen controlaría la acumulación de ABA observada. Sin embargo, el gen homólogo de *ABA1* en tabaco se encontraba significativamente reprimido en las células adaptadas. Esto podría indicar que el paso inicial de síntesis mediado por *ABA1* no resulta crucial en la regulación de los niveles de ABA en las células adaptadas de tabaco. Los resultados estarían en consonancia con los estudios realizados en plantas transgénicas de *Nicotiana plumbaginifolia* que sobreexpresaban *ABA1* y que no mostraron mayores niveles de ABA ni mayor tolerancia al estrés hídrico (Borel y col., 2001). En la Figura 96 se muestran las posibles rutas metabólicas de biosíntesis y catabolismo del ABA en las células adaptadas de tabaco BY-2. La acumulación de ABA a nivel celular en condiciones de estrés abiótico induce una cascada de señales que da lugar a la inducción de una serie de factores de transcripción que regulan la respuesta al estrés salino (Cutler y col., 2012).

La prolina es posiblemente el aminoácido que experimenta mayores incrementos bajo condiciones de estrés salino, resultando este hecho muy notable en el caso de los cultivos celulares adaptados a salinidad. En este sentido, Binzel y col. (1987) observaron que cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38 mostraron una acumulación 400 veces superior de prolina en las células adaptadas a salinidad. Igualmente, Olmos y Hellín (1996a) evidenciaron la acumulación aproximadamente 5 veces superior de prolina en callos de *Pisum sativum* cv Challis adaptados a 85 mM de NaCl respecto al control. En nuestras células adaptadas de tabaco BY-2 hemos obtenido resultados similares a los aportados por Binzel y col. (1987).

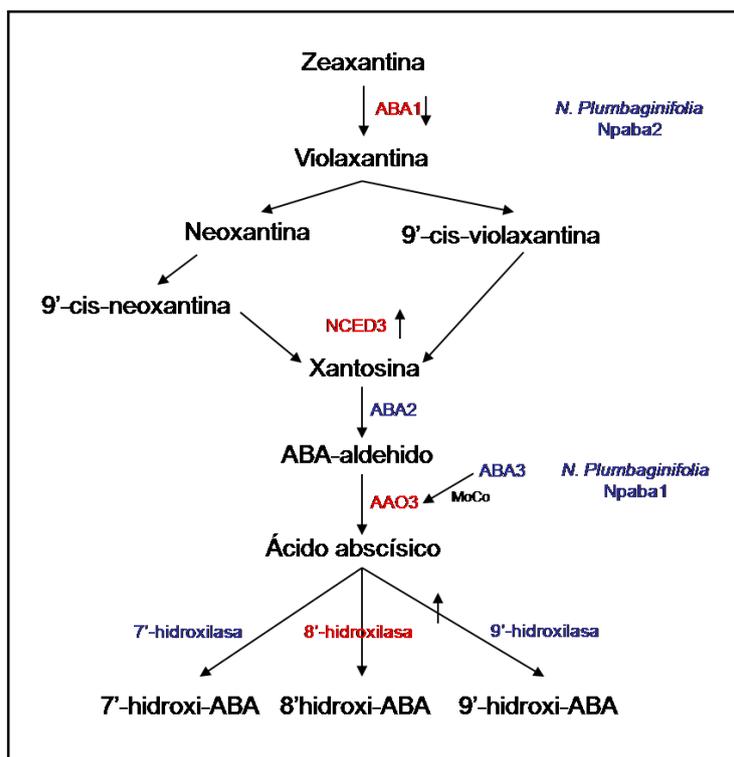


Figura 96. Metabolismo del ABA en células BY-2 adaptadas a salinidad.

El metabolismo de la prolina está regulado por su biosíntesis y catabolismo. Se ha propuesto que en condiciones de estrés la acumulación de prolina estaría controlada por la inducción de su síntesis y la represión de su catabolismo (Szabados y col., 2011). Nuestros resultados muestran claramente una inducción de los genes de síntesis de prolina, *P5CS* y *P5CR*. Así mismo, los resultados de proteómica demuestran una alta acumulación de una P5CS, que se correspondió con una alta expresión de los genes *P5CS2* y *P5CS1*. En cuanto a las enzimas del catabolismo, hemos observado una significativa inducción de una posible ProDH (superior a 2 veces) y la inducción de una posible P5CDH (inferior a 2 veces). Estos resultados muestran que la tasa de biosíntesis parece ser mayor que la tasa de catabolismo, lo que daría lugar a una acumulación neta de prolina en las células adaptadas a salinidad. Nuestra hipótesis es que en las células BY-2 adaptadas se podría estar activando el ciclo de la prolina (Figura 97). Así, la ProDH produciría P5C que sería principalmente transportado al citoplasma donde se utilizaría para generar de nuevo prolina (Miller y col., 2009). Esta mayor actividad de la ProDH y una baja inducción de la P5CDH podrían proporcionar un exceso de electrones en la cadena de transporte electrónico mitocondrial generando, en última instancia, ROS en la mitocondria. Esto podría explicar la mayor acumulación de ROS observada en las mitocondrias de las

células adaptadas. Servet y col. (2012) han propuesto que la oxidación de la prolina por la ProDH resultaría esencial en los procesos celulares en los que la producción de ROS regula la respuesta adaptativa, como en el caso de la adaptación al estrés salino. La acumulación de ROS, si se produce en exceso, puede inducir tanto un estrés oxidativo como dar lugar a una señalización celular. Si finalmente tiene lugar una elevada acumulación de ROS como consecuencia de la activación del ciclo de la prolina, se podría inducir una señalización de muerte celular, tal y como se ha observado en animales y en ciertos tipos de células cancerígenas (Liu y col., 2006). Esta hipótesis podría explicar la inducción de muerte celular observada en las células adaptadas. Por tanto, bajo condiciones de estrés, la célula debe controlar la síntesis de prolina y regular el ciclo de la prolina para evitar una excesiva acumulación de ROS en la mitocondria que pudiera derivar en muerte celular.

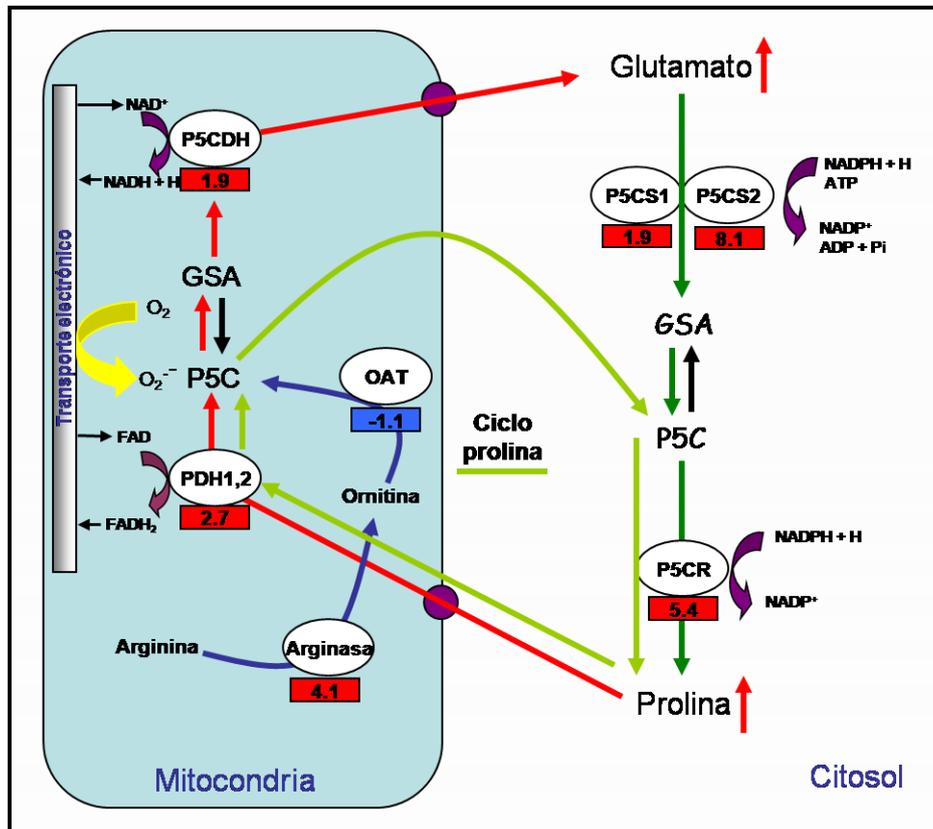


Figura 97. Metabolismo y ciclo de la prolina en células BY-2 adaptadas a salinidad.

Strizhov y col. (1997) demostraron que el ABA es el principal regulador de la acumulación de prolina en condiciones de estrés salino al inducir de forma directa la acumulación del gen clave en la síntesis de prolina, P5CS. Así, el mutante de

*Arabidopsis* deficiente en ABA, *Ataba1*, no mostraba inducción de la P5CS al ser tratado con sal.

Por otro lado, hemos observado que en las células adaptadas de tabaco BY-2 se produce la inducción de una fosfolipasa D $\alpha$ 1 (PLD $\alpha$ 1) que no estaba presente en las células control. Se ha propuesto, que la actividad de la PLD $\alpha$ 1 produce la acumulación de ácido fosfatídico (PA), el cual se uniría a una PP2C (ABI1, HBA1 y AHG3 son PP2Cs) que actúa como un regulador negativo de la señalización de ABA en el cierre estomático y de otros procesos como el desarrollo embrionario (Zhang y col., 2004; Nambara y Marion-Poll, 2005). La PP2C también está controlada por la unión del receptor de ABA, PYR/PYL, y el ABA que se unirían a la PP2C, inhibiendo su acción sobre la kinasa SnRK2 (Figura 98). Así, Thiery y col. (2004) han propuesto que las PLDs podrían ser reguladores negativos de la biosíntesis de prolina en *Arabidopsis* en condiciones salinas. Sin embargo, Ghars y col. (2012) han observado la respuesta contraria de las PLDs en la especie halófila *Thellungiella salsuginea*. Según estos autores, la PLD $\alpha$ 1 jugaría un papel clave como regulador positivo de la síntesis de prolina bajo condiciones de alta salinidad. Este resultado estaría apoyado por las observaciones de Pokotylo y col. (2012) que han mostrado en *Nicotiana tabacum* que las PLDs son activadas bajo condiciones de estrés salino.

En *Arabidopsis thaliana*, mutantes nulos de la PLD $\alpha$ 1 eran más sensibles al estrés salino que el ecotipo silvestre (Bargmann y col., 2009). Por tanto, nuestros resultados sugieren que la PLD $\alpha$ 1 inducida en las células adaptadas de tabaco podría estar implicada como un regulador positivo de la síntesis de prolina, que estaría mediado por ABA.

En los últimos años, se ha visto que el ABA también está implicado en los procesos de remodelación de la cromatina bajo condiciones de estrés salino (Sokol y col., 2007). Por tanto, la remodelización del nucleosoma parece ser clave en los procesos adaptativos en respuesta al estrés. Las proteínas de ensamblaje del nucleosoma (NAPs) son chaperonas de histonas altamente conservadas. Nuestros resultados de transcriptómica y proteómica muestran la alta acumulación de una proteína NAP en las células de tabaco adaptadas a sal. Liu y col. (2009) han demostrado que la proteína NAP1 reprime la respuesta a ABA, sugiriendo que NAP1 puede jugar un papel de regulador negativo de la señal de ABA en condiciones salinas. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que el triple mutante de pérdida de función de los tres genes *NAP1* presentes en *Arabidopsis* muestra una cierta hipersensibilidad al ABA. Además,

la respuesta del mutante *AtNAP1;3T*, que tiene una forma truncada de la proteína NAP1 faltando 34 aminoácidos de la zona reguladora de la parte C terminal, es sensible a salinidad.

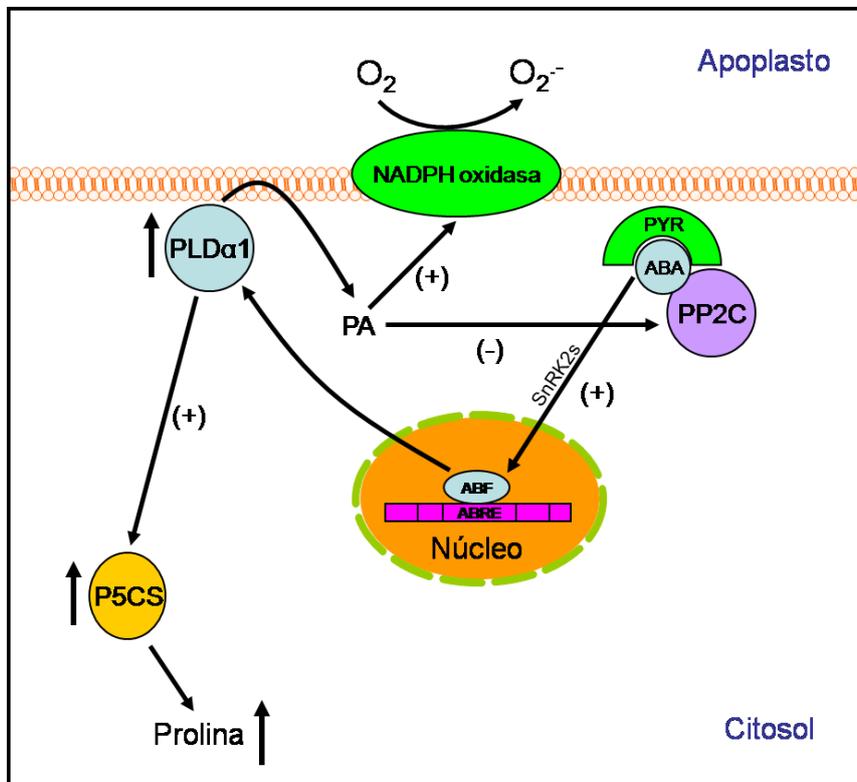


Figura 98. Implicación de la PLD $\alpha$ 1 como regulador positivo en la síntesis de prolina en células BY-2 adaptadas a salinidad (Cutler y col., 2012).

**La producción de ROS en la mitocondria puede actuar como modulador de la adaptación a elevadas concentraciones salinas en células de tabaco BY-2.**

Las ROS son generadas frecuentemente cuando las plantas son sometidas a estrés ambiental. Las ROS pueden actuar como una señal celular activando respuestas relacionadas con el estrés y/o causando daño oxidativo en las células (Foyer & Noctor, 2005; Hernández y col., 2010). En nuestro modelo celular, las células adaptadas de tabaco mostraron una importante acumulación de  $H_2O_2$  y de MDA, indicativo de que en estas células se está produciendo un estrés oxidativo. El estudio *in vivo* realizado en las células adaptadas demuestra que la mitocondria es un sitio importante de producción de ROS. Así mismo, los resultados obtenidos *in vivo* mediante marcaje de mitocondrias junto a los de microscopía electrónica muestran

que la mitocondrias de las células adaptadas están afectadas en su tamaño y forma. Como hemos visto anteriormente, la ultraestructura de ciertas mitocondrias de las células de tabaco adaptadas a salinidad se encuentran dilatadas y el sistema de membranas internas está alterado. Estas alteraciones pueden estar modificando y alterando la función de las enzimas que forman parte de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTEM). La CTEM implica a un número importante de complejos proteínicos que operan para producir ATP utilizando el gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna. Así, se ha propuesto que el estrés salino puede estar alterando la tasa con la que la CTEM acepta o produce electrones (Jacoby y col., 2011). Nuestros resultados del microarray demuestran que la CTEM se encuentra afectada en las células adaptadas de tabaco. La formación de daños en el complejo proteínico de la CTEM implica un alto nivel de reducción en ciertos sitios de la misma, lo que puede generar la acumulación de ROS en la mitocondria. La oxidasa alternativa (AOX) ha sido considerada con un gen modelo en la respuesta al estrés en la mitocondria y en los estudios de la señalización retrógrada mitocondrial (Ho y col. 2008; Suzuki y col. 2012). La función de la AOX en la respuesta al estrés radicaría en alterar el estatus energético de la célula. Van Aken y col. (2009) observaron que las proteínas de las AOXs son inducidas por varios y diferentes estreses. Se ha propuesto que la AOX podría prevenir la excesiva reducción del *pool* de ubiquinona, evitando la formación de ROS (Moller, 2001). Sin embargo, la actividad AOX está correlacionada con una alta expresión de sus genes. Martí y col. (2011) han observado que en largos periodos de salinización reducen la expresión génica de la AOX, en cambio la proteína sí se acumuló y mostró una buena correlación con el incremento de la capacidad de la ruta de la oxidasa alternativa, mientras que el análisis *in vivo* de la actividad de la ruta alternativa mostró que fue mantenida. Este estudio revela la importancia de las modificaciones postranscripcionales y postranslacionales en la regulación proteínica bajo condiciones de estrés salino. Nuestros resultados de expresión génica de la AOX muestran que en las células adaptadas sus genes están inducidos, al igual que dos posibles miembros de la familia de proteínas desacopladoras de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, las cuales se ha visto que pueden ser inducidas a través de diferentes mecanismos de estrés, entre ellos su activación por ROS (Trono y col., 2004). Estas proteínas actúan disipando directamente el potencial de membrana y se ha propuesto que cooperarían con la AOX en la regulación del estatus energético celular durante el estrés salino (Borecky y col., 2006).

Los niveles de ROS también son controlados en la mitocondria por los sistemas antioxidantes (Hernández y col., 2010). En la mitocondria se encuentran todas las enzimas que forman parte del ciclo ascorbato-glutatión (Jiménez y col., 1997). Nuestros resultados de transcriptómica muestran la inducción y en algunos casos la represión de un importante número de enzimas antioxidantes como ascorbato peroxidasas, glutatión reductasas, superóxido dismutasas o glutatión peroxidasas. Así, hemos observado la inducción de una ascorbato peroxidasa y una posible Mn-SOD, isoenzimas que podrían estar localizadas en la mitocondria, aunque no lo podemos confirmar. Otro componente importante de los sistemas antioxidantes son los compuestos antioxidantes ascorbato y glutatión, que han sido localizados en la mitocondria (Jiménez y col., 1997; Zechmann y col., 2008; Fernández-García y col., 2009; Zechmann y col., 2011). Estos compuestos, ascorbato y glutatión, son los principales antioxidantes a nivel celular que controlan el estado redox celular (Foyer y Noctor, 2012). Aunque la síntesis de glutatión tiene lugar en el citoplasma, este es transportado a los diferentes orgánulos celulares. Sorprendentemente, el orgánulo con mayor concentración de glutatión es la mitocondria (Zechmann y col., 2008; Fernández-García y col., 2009). Esto hace suponer que el glutatión desempeñe un papel importante en la mitocondria. El glutatión puede actuar directamente como compuesto reductor y participar en la eliminación de ROS, reduciendo grupos cisteína de las proteínas o bien formando parte del ciclo ascorbato-glutatión. Por tanto, la importante reducción de la concentración de glutatión observada en las mitocondrias de las células adaptadas podría estar afectando al estado redox de la misma, alterando la eliminación de ROS. Así, se ha propuesto que la red de señalización ROS/estado redox de la mitocondria jugaría un papel importante en la adaptación al estrés abiótico (Noctor y col., 2007; Suziki y col., 2012). Por tanto, la acumulación de ROS en las mitocondrias de las células adaptadas podría actuar como una señalización retrógrada al núcleo, afectando a la expresión génica de diferentes genes implicados en el mantenimiento de la homeostasis celular, como serían las alteraciones observadas en los sistemas antioxidantes, chaperonas, transportadores, factores de transcripción, etc. Además, la producción de ROS puede actuar también como señalización para otros compartimentos celulares, como por ejemplo el retículo endoplasmático, afectando tanto a la glicosilación y plegamiento de proteínas como a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma (Liu y col., 2011).

***El sistema de endomembranas, retículo endoplasmático y aparato de Golgi son modificados en el proceso de adaptación a salinidad en células de tabaco BY-2.***

En los últimos años, se ha considerado que el retículo endoplasmático estaría implicado en la respuesta al estrés salino vía señalización ROS (Liu y col., 2011). Sin embargo, este mecanismo ha sido poco estudiado. Por ello, hemos intentado conocer cual es la participación del retículo endoplasmático en la adaptación al estrés salino en las células de tabaco BY-2.

Como hemos visto anteriormente, la morfología del retículo endoplasmático está muy alterada en las células adaptadas a salinidad. La proteína GFP dirigida al retículo endoplasmático mostró que la estructura tridimensional del mismo se encontraba alterada, observándose dilataciones del retículo que parecían acumular dicha proteína. Nakano y col. (2009) han descrito dos mutantes de *Arabidopsis*, *ermo1* y *ermo2*, que muestran una morfología del retículo endoplasmático similar a la observada en las células de tabaco adaptadas a salinidad. Estos mutantes estaban afectados en la proteína GNOM-LIKE1 (*ermo1*) y en la proteína SEC24a (*ermo2*). En cuanto a la proteína GNOM-LIKE1 no hemos encontrado ningún homólogo en tabaco al analizar el genoma secuenciado hasta ahora en la base de datos de *Sol Genomics*. Sin embargo, para el gen *SEC24a* hemos encontrado un posible homólogo, presente en el microarray, cuya expresión estaba reprimida en las células adaptadas de tabaco. Todo esto nos sugiere la pregunta de si las alteraciones morfológicas observadas en el retículo endoplasmático podrían ser reflejo también de una alteración de su función. Nakano y col. (2009) propusieron que las dilataciones del retículo observadas en *ermo1* y *ermo2* podrían acumular proteínas alteradas en el lumen. En el retículo endoplasmático tiene lugar el tránsito de muchas proteínas, principalmente aquellas que van a ser glicosiladas y van a entrar en la vía secretora de la célula. Se ha propuesto que las alteraciones en la N-glicosilación de las proteínas pueden inducir su degradación y mal plegamiento, acumulándose en el lumen del retículo endoplasmático (Banerjee y col., 2007). Así, nuestra hipótesis es que estas estructuras dilatadas del retículo endoplasmático funcionarían como lugar de acumulación celular de proteínas que van a ser degradadas. Por ello, es posible observar tanto células adaptadas con un sistema de endomembranas muy parecido al normal, posiblemente aquellas que están todavía dividiéndose y creciendo de forma activa, como células en las que se ha inhibido el crecimiento y entran en un estado quiescente acumulando daños en las proteínas que se van almacenando en el retículo endoplasmático.

En los vegetales eucariotas, las alteraciones postranscripcionales son realizadas por un complejo oligomérico (OST). Una parte de este complejo se ha visto que es capaz de suprimir la muerte celular en una línea mutante de hamster (*tsBN7*), por lo que ha sido llamado “defender against death 1” (DAD1) (Nakashima y col., 1993). En los vegetales, el ortólogo del gen *DAD* ha sido encontrado en numerosas especies, entre ellas el tabaco. Nuestra línea celular de tabaco adaptada a salinidad mostró una alta inducción del posible homólogo a *DAD2* de *Arabidopsis*. Curiosamente, las células adaptadas de tabaco mostraron un número significativo de células que entraban en muerte celular. Para saber si las células entraban en muerte celular programada realizamos un experimento mediante marcaje del posible ADN degradado utilizando la técnica de TUNEL. Sin embargo, no observamos diferencias significativas entre las células control y adaptadas. Posiblemente, la expresión del gen *DAD* podría estar reduciendo la muerte celular en las células adaptadas, tal y como se ha observado en cultivos celulares de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *DAD* al ser sobreexpuestos a radiación UV (Danon y col., 2004). Por ello, se ha considerado al gen *DAD* como un regulador negativo de la muerte celular inducida por el estrés en el retículo endoplasmático (Cacas, 2010). Por tanto, esto nos hace suponer que la muerte celular observada sea debida probablemente a un proceso de necrosis celular (Van Doorn y col., 2011). Nuestra hipótesis es que las células adaptadas a salinidad tienen un crecimiento más lento que las controles debido posiblemente a una reducción de la división celular, tal y como demuestran un menor índice mitótico y una menor expresión de los genes que codifican para proteínas implicadas en la división celular, como son las CDKs y ciclinas. Estas células que han parado de dividirse serían las que entrarían en muerte celular. Así mismo, creemos que en estas células se induciría la actividad de proteínas similares a caspasas, como muestran nuestros resultados para el test de caspasas que coincide aproximadamente con el porcentaje de células muertas observadas en los cultivos celulares de tabaco adaptados a salinidad.

Nuestra hipótesis estaría de acuerdo con el modelo de muerte celular propuesto por Demidchik y col., (2010) para explicar la muerte celular inducida por el estrés salino. Según este modelo, el estrés salino induciría un importante eflujo de  $K^+$  al apoplasto, el cual estaría mediado por una señal de ROS. Esto estaría de acuerdo tanto con el importante descenso de  $K^+$  observado en las células adaptadas de tabaco como con la acumulación de ROS en la mitocondria y citoplasma de las mismas. Así, el descenso de  $K^+$  en el citoplasma podría inducir la actividad de proteínas similares a caspasas, que se ha visto que son activadas por bajos niveles de este ion (Orloy y

col., 1999), induciendo por tanto la muerte celular. En la Figura 99 se representa cómo sería el proceso en las células adaptadas a salinidad.

La acumulación de ROS puede afectar al plegamiento de las proteínas, induciendo su acumulación en las células (Cerioti, 2011). La acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático derivadas del efecto del estrés abiótico puede estar induciendo una respuesta de estrés en el retículo endoplasmático (Liu y col., 2011). Según estos autores, el estrés salino estaría induciendo el “sistema de degradación asociada a RE” (en inglés, ER-associated degradation (ERAD)) que eliminaría las proteínas mal plegadas. Además, el sistema ERAD induciría la respuesta debida a la acumulación de proteínas mal plegadas (en inglés, unfolded protein response, UPR), la cual activaría la expresión de chaperonas del retículo endoplasmático y componentes del sistema ERAD para ayudar al re-plegado y eliminar la proteínas mal plegadas. Esta hipótesis estaría de acuerdo con la alta expresión general observada de chaperonas de todas las familias en las células adaptadas de tabaco.

Así, la respuesta más frecuentemente inducida por la UPR es la alta expresión de chaperonas del retículo endoplasmático, tales como las chaperonas BiP y las calnexinas. Las células adaptadas de tabaco mostraron una alta expresión de una posible calnexina, sin embargo la expresión de una posible BiP estaba reprimida. Liu y col. (2011) han mostrado que ambas chaperonas se encuentran fuertemente inducidas por el estrés salino en plantas de *Arabidopsis*. Las proteínas BiP son chaperonas localizadas en el lumen del retículo endoplasmático y pertenecen a la familia de las proteínas de choque térmico HS70. Esta familia de proteínas es expresada en respuesta a múltiples condiciones ambientales tales como frío, calor, salinidad, etc (Wang y col., 2004).

El resultado final de un prolongado estrés y, por tanto, de una prolongada respuesta de la UPR puede dar lugar a una inhibición del crecimiento y muerte celular, posiblemente a través de un efecto en la reducción de la síntesis proteica. Las calnexinas, conocidas como marcadores específicos de retículo endoplasmático, son chaperonas unidas a membrana que participan en el plegamiento y control de calidad de las glicoproteínas recién sintetizadas, tanto de membrana como solubles, interaccionando con ellas (Brockmeier y Williams, 2006). Nouri y col. (2012) han observado que la calnexina de la planta de soja es capaz de interaccionar con una proteína de choque térmico HSC70, que resulta ser una proteína con una región de

unión al ATP y con capacidad ATPasa que le permite proporcionar energía a la función chaperona de la calnexina. Además, estos autores observaron que los contenidos de proteína de la calnexina eran drásticamente reducidos por diferentes estreses, entre ellos la salinidad. Por tanto, el equilibrio celular entre la acumulación de proteínas mal plegadas y la capacidad de la célula para eliminarlas y/o replegarlas permitirá a la célula sobrevivir en ambientes extremos de salinidad.

**Modelo celular de adaptación al estrés por altas concentraciones salinas en células de tabaco BY-2.**

A modo de recopilación final, hemos diseñado un modelo que integraría las principales respuestas al estrés salino observadas en células adaptadas de tabaco BY-2 (Figura 99).

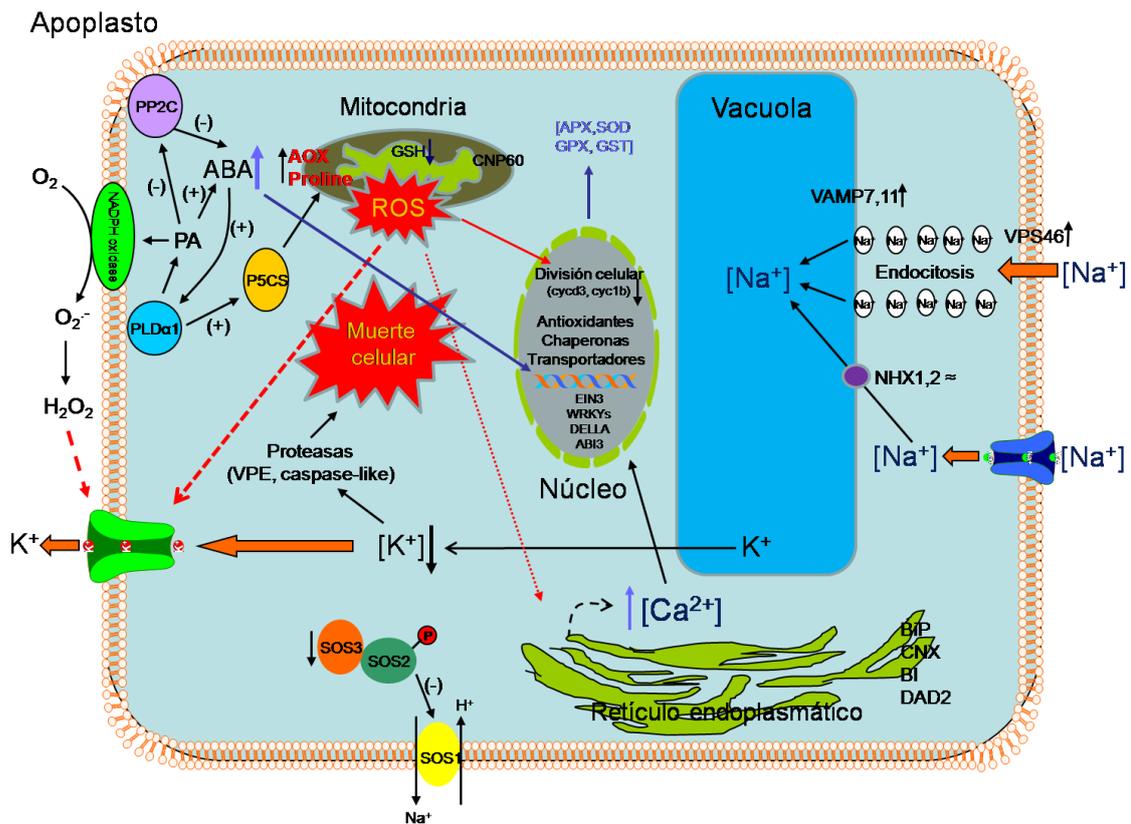


Figura 99. Modelo celular de adaptación a salinidad en células BY-2.

## 2. Papel de las giberelinas en la adaptación al estrés salino en cultivos celulares de tabaco BY-2.

En los últimos años se ha demostrado que las GAs desempeñan un papel relevante en el proceso de respuesta al estrés salino (Achard y col., 2006; Magome y col., 2008). Esta respuesta está mediada principalmente por las proteínas DELLA, que controlarían la expansión celular reduciendo el crecimiento (Magome y col., 2008). Así, mutantes con bajos niveles de GAs mostraron una mayor tolerancia a la salinidad que las plantas silvestres (Magome y col., 2008). Por tanto, nuestra hipótesis de trabajo fue saber si las células de tabaco BY-2 adaptadas a salinidad mostraban menores niveles de GAs y si éstas estaban implicadas en la tolerancia a salinidad.

Una cuestión previa que nos planteamos fue conocer si los cultivos celulares de tabaco BY-2 poseen el metabolismo de síntesis y respuesta a las GAs. Estos cultivos celulares han sido ampliamente utilizados con éxito en el estudio de la mayoría de las hormonas vegetales tales como auxinas, citoquininas, ABA, ácido salicílico, jasmonato y brassinosteroides (Nagata, 2004a; Miyazawa y col., 2003). Así mismo, también se han utilizado en estudios sobre GAs, sin embargo los resultados obtenidos han sido, en algunos casos, contradictorios. Los primeros trabajos realizados con otras especies vegetales, como es el caso de cultivos celulares de *Acer pseudoplatanus* (Digby y Wareing, 1966), mostraron que dichos cultivos eran capaces de responder a la adición exógena de GAs, afectando a la división y tamaño celular. Fry y Street (1980) estudiaron el efecto de la adición exógena de GA<sub>3</sub> en el crecimiento de la masa celular, observando que la respuesta a GAs dependía de la especie utilizada. Así, cultivos celulares de *Spinacia sp* y *Rosa sp* fueron sensibles a la adición de GAs, favoreciendo el crecimiento celular. Sin embargo, en especies como *Vicia hajastana*, *Daucus carota*, *Catharanthus roseus* y *Nicotiana tabacum* no se observó incremento alguno del crecimiento celular. Lance y col. (1976) observaron que la adición exógena de GA<sub>3</sub> en callos de *Nicotiana tabacum* inducía su crecimiento. Por otra parte, la adición de AMO-1618, inhibidor de la síntesis de GAs, reducía el crecimiento de dichos callos.

Park y col. (1983) fueron los primeros en detectar y cuantificar por cromatografía de gases la presencia de GAs bioactivas en cultivos celulares de tabaco BY-2. Igualmente, Park y col. (1984) mostraron que la giberelina GA<sub>1</sub> se acumulaba principalmente durante la fase de crecimiento exponencial. Song y col. (1991) observaron que los cultivos celulares de tabaco BY-2 eran capaces de transformar

GA<sub>12</sub> en GA<sub>53</sub> al ser suministrado de forma exógena. Sin embargo, la adición externa de GA<sub>20</sub> no produjo su conversión en GA<sub>1</sub>. Por tanto, estos autores concluyeron que la ruta de síntesis temprana hasta GA<sub>53</sub> se encontraba activada en los cultivos celulares de tabaco BY-2, pero la ruta de la 13-hidroxilación hasta la GA<sub>1</sub> parecía estar inhibida. Por otro lado, Hussain y col. (2005) demostraron que los cultivos celulares de tabaco BY-2 eran sensibles al mecanismo de señalización de GAs. Para ello, transformaron células BY-2 con diferentes proteínas DELLA de *Arabidopsis* (RGL2) mutadas en las zonas de regulación. Mediante este sistema demostraron que las células BY-2 poseían la maquinaria de respuesta y señalización de GAs mediada por las proteínas DELLA.

***Los cultivos celulares de tabaco BY-2 adaptados a salinidad contienen una menor cantidad de GAs bioactivas y son sensibles a prohexadiona.***

Para probar que las células de tabaco BY-2 contenían GAs bioactivas y presentaban su metabolismo de síntesis y degradación activo, analizamos en primer lugar el contenido de GAs mediante técnicas de extracción y cuantificación por gases-masas. Nuestros resultados confirman la presencia de GAs bioactivas como GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub> en las células control y GA<sub>1</sub> en las adaptadas. Estudios realizados en diferentes órganos de plantas de tabaco han mostrado que la forma de GAs bioactivas más abundante era GA<sub>1</sub> y en menor cantidad GA<sub>4</sub> (Vidal y col., 2001; Gallego Giraldo y col., 2007). Vidal y col. (2001) mostraron que en plantas de tabaco la ruta temprana de la 13-hidroxilación era la preferente, aunque cuando se sobreexpresó el gen de la 20ox de *Citrus* en tabaco se produjo un fenotipo muy elongado y la GA bioactiva principal fue la GA<sub>4</sub> (Vidal y col., 2001). Sin embargo, según los resultados mostrados en la Tabla 12, las células control presentaron 3 veces más de GA<sub>4</sub> que de GA<sub>1</sub>. Esto nos hace proponer que las células de tabaco BY-2 tienen inducida principalmente la ruta de síntesis vía 3β-hidroxilación de la GA<sub>12</sub>, desviando la síntesis hacia GA<sub>4</sub>. Por tanto, nuestros resultados estarían de acuerdo con la hipótesis de que la adaptación a elevadas concentraciones salinas requiere de una disminución de los niveles de GAs bioactivas. En la bibliografía, solamente hemos encontrado dos estudios que analicen los niveles endógenos de GAs bioactivas en condiciones de estrés salino (Magome y col., 2008; Hamayun y col., 2010). Estos estudios muestran, en ambos casos, que los niveles endógenos de GAs realmente se reducen en condiciones de estrés salino.

En segundo lugar, decidimos utilizar la prohexadiona como inhibidor de la síntesis de GAs (Rademacher, 2000) y determinar su efecto tanto sobre el crecimiento celular como sobre el contenido de GAs en células control y adaptadas. Nuestros resultados

mostraron que la prohexadiona hizo disminuir el crecimiento de las células BY-2 control, el cual era recuperado al añadir de forma exógena GAs bioactivas ( $GA_1$  y  $GA_4$ ) y sus respectivos precursores ( $GA_{20}$  y  $GA_9$ ). La primera conclusión que obtuvimos fue que la reducción de crecimiento mediada por prohexadiona podía ser debida a un descenso de GAs bioactivas, ya que dicho crecimiento se recuperaba al añadir tanto  $GA_4$  como  $GA_1$ . La cuantificación de GAs mostró que la prohexadiona reducía de forma significativa el contenido de  $GA_4$  (aproximadamente un 40%) y el de  $GA_1$  (un 20%), aunque en este último caso la variación no resultó significativa. Estos resultados estarían de acuerdo con los efectos descritos en otras especies, donde se observó que la prohexadiona hacía disminuir de forma significativa los niveles de GAs bioactivas, reduciendo el desarrollo de la planta (Brown y col., 1997; Ramírez y col., 2005). Por otra parte, resultó interesante comprobar que el crecimiento celular también se recuperaba tanto con  $GA_{20}$  como con  $GA_9$  (precursores de  $GA_1$  y  $GA_4$  respectivamente). Esto podría ser explicado por el hecho de que la prohexadiona no inhibiera totalmente las enzimas 20oxidasa y 3oxidasa. Por tanto, al añadir en exceso los precursores  $GA_{20}$  y  $GA_9$ , estos podrían ser transformados en las GAs bioactivas recuperándose el crecimiento celular. En el caso de las células adaptadas, la prohexadiona redujo de forma drástica el crecimiento celular, que se acompañó de una disminución en la viabilidad celular. Posiblemente, la prohexadiona esté reduciendo la división celular permitiendo que un mayor número de células entren en fase  $G_0$ , que como vimos en el capítulo anterior, facilitaría la inducción de la muerte celular. El contenido de  $GA_1$  no varió respecto a las células control, pero lo más sorprendente fue la aparición de  $GA_4$  a niveles similares de las células control. Esto podría ser explicado, al menos parcialmente, por el hecho de que la prohexadiona también inhibe las 2oxidases y, por tanto, facilitaría la aparición de  $GA_4$  en las células adaptadas, tal y como se ha observado en otras especies vegetales (Hisamatsu y col., 2000). Además, la adición exógena de GAs no hizo recuperar el crecimiento y redujo drásticamente la viabilidad celular. Por otra parte, el volumen celular se incrementó drásticamente en fase exponencial en los cultivos tratados con prohexadiona en combinación con GAs. La posible explicación sería que las células adaptadas al ser tratadas con prohexadiona se hacían “hipersensibles” a GAs durante la fase exponencial, tendiendo a alcanzar volúmenes celulares similares e incluso mayores que las células control.

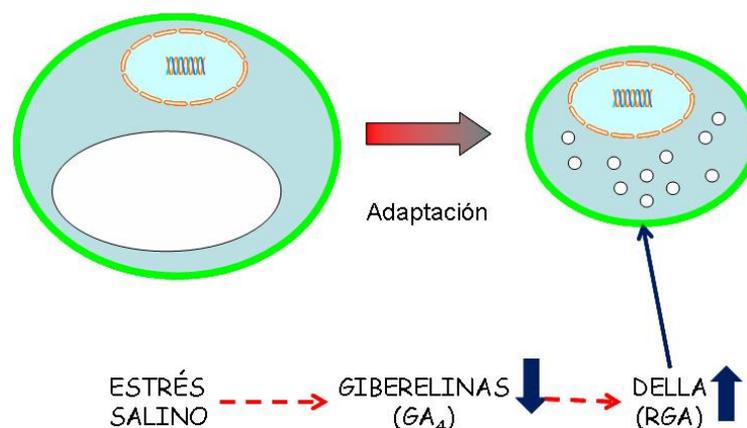
**La expresión de los genes de síntesis y degradación de GAs está regulada de forma diferencial en las células de tabaco BY-2 adaptadas a salinidad.**

Hemos estudiado la expresión de todos los genes implicados en los últimos pasos de síntesis de GAs que han sido clonados hasta el momento, habiéndose observado que tanto los genes implicados en la síntesis (*NtGA20ox1* y *NtGA3ox1*) como los relacionados con la inactivación (*NtGA2ox1* y *NtGA2ox2*) están expresados en células control y adaptadas. Como hemos descrito anteriormente, las células control acumulan principalmente GA<sub>4</sub>. Esto puede ser debido a que el único gen de *Nt20oxidasa1* que está expresado en las células BY-2 sea una enzima que tenga mayor afinidad por la GA<sub>12</sub> que por la GA<sub>13</sub>, favoreciendo, por tanto, la ruta de síntesis de GA<sub>4</sub>.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que en células control los niveles de expresión de genes de síntesis y degradación de GAs se encontraban inducidos principalmente durante la fase exponencial de crecimiento. Por el contrario, en células adaptadas estos niveles de expresión están inducidos en la fase lag e inhibidos en la fase exponencial. En el caso de *Arabidopsis*, la reducción de los niveles de GAs en condiciones de estrés salino parece estar controlada, principalmente, por la acción de la *AtGA2ox7* (Magome y col., 2008). Sin embargo, en el caso de las células BY-2, nuestra hipótesis es que en células adaptadas a salinidad se reducen los niveles totales de GAs durante la fase de crecimiento exponencial por una inhibición de toda la ruta de síntesis.

Como hemos dicho anteriormente, en células control la síntesis de GAs se induce durante la fase de crecimiento exponencial, lo que correspondería con el momento en que las células inician el proceso de expansión celular, tal y como muestran nuestros resultados de evolución del volumen celular a lo largo del ciclo de cultivo. Esto implicaría que, durante este proceso, la célula capta agua y cationes (principalmente K<sup>+</sup> como muestran nuestros datos) del medio de cultivo para mantener el equilibrio osmótico con el medio de cultivo (Dolan y Davies, 2004). Sin embargo, las células adaptadas tendrían inhibida la síntesis de GAs durante la fase exponencial con el fin de evitar una absorción de agua que conllevaría una posible mayor entrada de Na<sup>+</sup> a la célula, dado que es el catión mayoritario en el medio de cultivo. Igualmente, tal y como hemos visto, las variaciones de volumen son menores en las células adaptadas entre las fases exponencial y estacionaria. Por tanto, esto explicaría la menor concentración de GAs observada en las células adaptadas durante la fase de crecimiento exponencial.

Por último, nuestros resultados por *western-blot* de la proteína DELLA mostraron que durante la fase de crecimiento exponencial las células adaptadas contenían una mayor concentración de estas proteínas que las controles. Recientemente, Band y col. (2012) han demostrado que durante el proceso de elongación celular de raíces de *Arabidopsis* se produce una evolución inversa de los niveles de proteína DELLA y la expresión del gen que la codifica. Así, cuando se reduce la concentración de la proteína DELLA se induce la expresión de su gen, lo que coincide con una acumulación en los niveles de GAs bioactivas. Nuestros resultados se ajustarían perfectamente a este modelo, ya que en las células control se induce la expresión del gen DELLA durante la fase de crecimiento exponencial mientras que la proteína es menor. Por el contrario, en las células adaptadas la proteína DELLA se acumula en la fase exponencial y se reduce la expresión de su gen. Este hecho es debido posiblemente a que el mayor nivel de GAs en condiciones control induce la destrucción de las proteínas DELLA mediante un proceso de ubiquitinación (Hauvermale y col., 2012; Davière y Achard., 2013), induciendo por tanto la expansión celular. Por el contrario, en las células adaptadas se produce una acumulación de proteínas DELLA, posiblemente debido a una reducción de los niveles de GAs bioactivas, principalmente GA<sub>4</sub>, que por tanto restringiría la expansión celular (Figura 100). Todo esto conllevaría que las células BY-2 de tabaco adaptadas a salinidad muestren menor tamaño celular que las control.



**Figura 100. Modelo propuesto para la implicación de las GAs en el proceso de adaptación a salinidad en células BY-2.**

**Las proteínas DELLA pueden estar mediando la activación del metabolismo del ácido abscísico en células de tabaco BY-2.**

La interacción entre las GAs y otras hormonas vegetales es bien conocida en la bibliografía (Yamaguchi, 2008). En este sentido, las GAs presentan una interacción recíproca negativa con las citoquininas (Fleishon y col., 2011). Así, se ha observado que en *Arabidopsis* las GAs inhiben la señalización mediada por citoquininas (Maymon y col., 2009). Por otro lado, también se ha observado que las GAs interactúan con el etileno regulando el desarrollo vegetal (Dugardeyn y col., 2008). De esta forma, al contrario de lo que sucede con las GAs, el etileno inhibe en general la expansión celular de las raíces y tallos vía proteínas DELLA (Smalle y col., 1997; Achard y col., 2003). Igualmente, resulta bien conocida la acción del ácido abscísico como antagonista de las GAs, por ejemplo en la germinación y desarrollo embrionario (Yamaguchi, 2008). Zentella y col. (2007), al analizar las posibles dianas de las proteínas DELLA observaron que entre los 14 genes que están regulados de forma diferencial uno se encontraba inducido, el gen *XERICO*. El gen *XERICO* codifica para una proteína que pertenece a la familia RING de las proteínas *zinc-finger* (Ko y col., 2006). Ko y col. (2006) observaron que este gen estaba inducido por el estrés salino y que plantas que lo sobreexpresaban mostraban hipersensibilidad a la sal y al ABA durante la germinación. Además, observaron que al someter estas plantas a estrés hídrico mostraban una rápida y mayor inducción del gen *NCED3*, que como hemos dicho anteriormente es la enzima clave de la síntesis de ABA. En base a todos estos datos, Zentella y col. (2007) han propuesto un modelo por el que la acumulación de las proteínas DELLA induciría la expresión del gen *XERICO* y este a su vez la biosíntesis de ABA (Figura 101). Por tanto, creemos que nuestros datos encajarían en dicho modelo. Así, la reducción de GAs bioactivas en las células adaptadas permitiría la acumulación de la proteína DELLA, lo que a su vez induciría la expresión del gen *XERICO* (en las células adaptadas se incrementa aproximadamente 5 veces) activando el metabolismo de ABA y, por tanto, produciendo la acumulación de ABA en las células adaptadas.

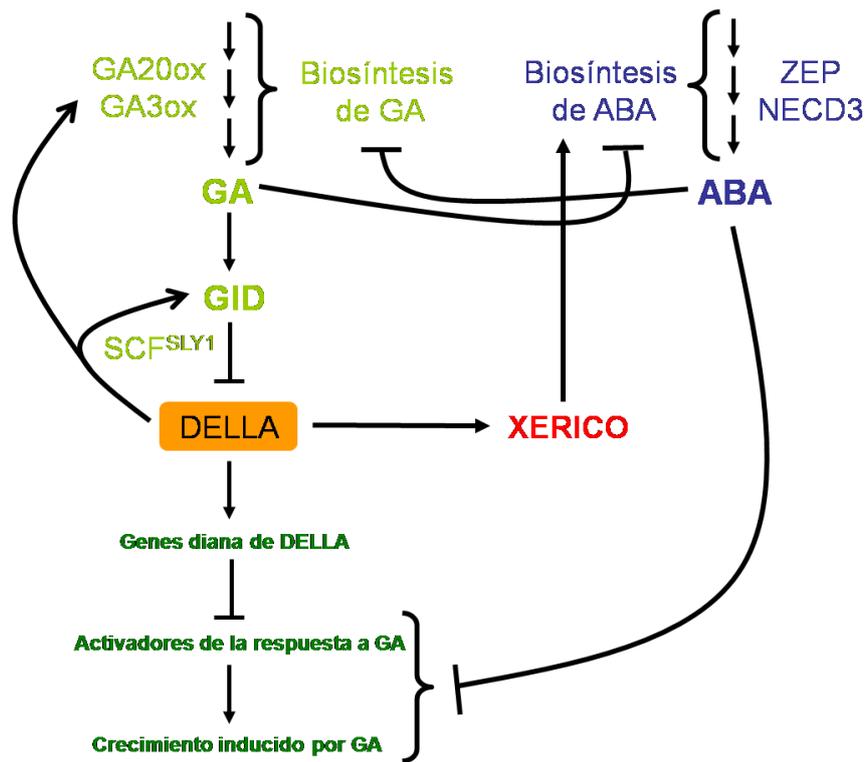


Figura 101. Modelo representativo de la interacción entre las rutas de síntesis de GAs y ABA (Zentella y col., 2007).

### **3. Papel de las AGPs y EXTs en la adaptación a altas concentraciones salinas en cultivos celulares de tabaco BY-2.**

La mayoría de los estudios de cuantificación y análisis de AGPs han sido realizados utilizando fraccionamiento celular y posterior cuantificación con el reactivo de Yariv (Lamport y col., 2006). Sin embargo, en nuestro estudio hemos utilizado para la identificación y cuantificación de AGPs anticuerpos monoclonales obtenidos contra diferentes epítomos de AGPs (Knox y col., 1989; Knox y col., 1995; Yates y col., 1996; Smallwood y col., 1996). Para el estudio de su distribución celular hemos realizado técnicas de inmunomarcaje con dichos anticuerpos en secciones celulares. En cuanto a su cuantificación, hemos seguido un método semicuantitativo como es la técnica de *inmuno-dot*.

En primer lugar, necesitábamos conocer cuáles eran los diferentes anticuerpos contra AGPs que reconocían las células y su medio de cultivo. En un trabajo previo en anteras de tabaco se ensayó la capacidad de reconocimiento de tres anticuerpos diferentes contra AGPs, JIM13, LM2 y JIM4 (Qin y col., 2007). En este estudio se observó que JIM4 no mostraba reactividad con las muestras de antera de tabaco, mientras que LM2 mostró una reactividad media y JIM13 una reactividad alta. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por nuestro grupo en los medios de cultivo de tabaco y en las inmunolocalizaciones. Esto nos indica, que la presencia de estos epítomos está bastante conservada en los diferentes tejidos de tabaco. Además de estos anticuerpos, también hemos incluido el anticuerpo JIM15, que mostró una reactividad menor que JIM13, pero superior a LM2.

#### ***Las células de tabaco BY-2 adaptadas a salinidad acumulan AGPs en el medio extracelular, posiblemente debido a un mayor recambio de AGPs de la membrana plasmática.***

Zhu y col. (1993) fueron los primeros en mostrar que en el proceso de adaptación al estrés salino en cultivos celulares se producía una importante alteración en la distribución y cantidad de AGPs producidos por las células tolerantes al estrés salino. Estos autores observaron que los cultivos celulares adaptados a altas concentraciones salinas (400 mM de NaCl) mostraban una drástica disminución de los AGPs en membrana plasmática y en el medio de cultivo. Posteriormente, Lamport y col. (2006) revisaron estos resultados utilizando cultivos celulares de tabaco BY-2 adaptados a 350 mM de NaCl. Estos autores confirmaron los resultados de Zhu y col. (1993),

quienes indicaban que la membrana plasmática de las células adaptadas a salinidad presentaba un menor contenido de AGPs. Sin embargo, observaron que el medio de cultivo de las células adaptadas acumulaban muchos más AGPs que las células control, contrariamente a lo descrito por Zhu y col. (1993). Según estos autores, las diferencias entre ambos estudios se deben a que Zhu y col. (1993) no tuvieron en cuenta la masa total de peso fresco de las células control y adaptadas, ya que el crecimiento es mucho menor en células adaptadas que en células control, siendo los gramos de peso fresco por mL de medio de cultivo mucho mayor en las controles que en las adaptadas. Estos resultados fueron similares en cultivos celulares de *Dactylis glomerata*, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* y *Acacia sp.* (Lamport y col., 2006; Zagorchev y col., 2008). En nuestro estudio, hemos podido confirmar que también se produce una reducción importante en la densidad de AGPs de membrana plasmática. Lamport y col. (2006) propusieron que la menor presencia de AGPs en la membrana plasmática podría ser debida a un mayor recambio de los mismos. Así, estos autores observaron que las tasas de liberación de AGPs al medio de cultivo eran más de 10 veces superiores en las células adaptadas que en las células control (Lamport y Kieliszewski., 2005; Lamport y col., 2006). Por tanto, nuestros resultados estarían de acuerdo con esta hipótesis ya que tal y como hemos visto las células adaptadas excretaban más AGPs que las células control en un periodo de 24 horas. Según estos autores, las AGPs en las células BY-2 pueden tener al menos dos funciones diferentes. En primer lugar, es posible que estén actuando como un tampón periplasmático, estabilizando la interfase membrana plasmática-pared celular. En segundo lugar, han propuesto que los AGPs tienen la capacidad de migrar a través de la pared celular hacia el medio de cultivo, ayudando a modificar la plasticidad de la pared celular y pudiendo incrementar la extensibilidad de la misma. Sin embargo, surge una pregunta: ¿por qué las células adaptadas tienen un mayor flujo de AGPs al medio de cultivo?. Según estos autores la explicación estaría en que durante el proceso de crecimiento de la pared celular en los cultivos celulares BY-2 adaptados debe haber otros factores que actúen sobre el proceso de expansión celular. Así, proponen que posiblemente los AGPs tendrían una función *in muro* sobre las pectinas, reduciendo la formación de geles de pectato y, por tanto, haciendo más extensible a la pared celular. Esto a su vez, aumentaría la porosidad de la pared celular facilitando la salinidad de los AGPs al medio de cultivo.

Recientemente, Lamport y Varnai (2013) han propuesto una nueva función de las AGPs. Según esta hipótesis, los AGPs podrían actuar como acumuladores apoplásticos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Tal y como se ha comentado anteriormente, las moléculas de

AGPs clásicas cubren la membrana plasmática, presentando una elevada glicosilación con abundantes grupos de ácido glucurónico libres que pueden ligar átomos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos autores han demostrado que una molécula típica de AGP puede llegar a ligar hasta 30 moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$ . El modelo propone que la liberación de protones al apoplasto mediada por la ATPasa de membrana plasmática induciría un descenso local del pH en el periplasma, donde se encuentran las AGPs, dando lugar a la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  ligado a las mismas. Este proceso generaría un pulso de  $\text{Ca}^{2+}$ , entrando al citosol vía transportadores de membrana plasmática. Finalmente, este  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico sería de nuevo secuestrado por los AGPs presentes en las vesículas de exocitosis, que acabarían uniéndose a la membrana plasmática y restableciendo las AGPs ligadas a  $\text{Ca}^{2+}$ . Dicho modelo, encajaría muy bien, por ejemplo, con el proceso de crecimiento del tubo polínico.

Uno de los efectos típicos de la salinidad descritos en la bibliografía es que el  $\text{Na}^+$  compite con el  $\text{Ca}^{2+}$  ligado a membrana, pudiendo desplazarlo (Cramer y col., 1985). Por otro lado, la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio de cultivo de plantas que están creciendo en medio salino mejora el crecimiento (LaHaye y Epstein, 1965). Según Lamport y Varnai (2013), en condiciones salinas el catión  $\text{Na}^+$  posiblemente podría estar desplazando al  $\text{Ca}^{2+}$  en la molécula de AGP y, por tanto, afectando al crecimiento y expansión celular. Esta hipótesis nos hace formularnos la siguiente cuestión, ¿podrían los AGPs ligar el  $\text{Na}^+$  y transportarlo vía endocitosis hasta la vacuola?. Creemos que esta hipótesis estaría de acuerdo con las observaciones en las células adaptadas de tabaco que presentaban vesículas endocíticas que contenían  $\text{Na}^+$  y que posiblemente eran transportadas hacia la vacuola. Por tanto, los AGPs podrían actuar ligando el  $\text{Na}^+$  en las vesículas y dirigiéndolo al tonoplasto.

***Las células de tabaco adaptadas a salinidad muestran una distribución diferencial de AGPs en el citoplasma y tonoplasto en comparación con las células control.***

Hemos podido comprobar que tanto en células control como en células adaptadas el nivel de marcaje en la membrana plasmática era muy similar al observado en el tonoplasto, siendo siempre menor en las células adaptadas. Samaj y col. (2000) observaron que en muestras de *Zea mays* y *Drosera capensis* los anticuerpos JIM13 y LM2 mostraban un marcaje positivo en el tonoplasto y la membrana plasmática de las células. Estos autores han propuesto que la presencia de AGPs en el tonoplasto puede ser debida al transporte de vesículas endocíticas y cuerpos multivesiculares de

la membrana plasmática al tonoplasto. Creemos que esto explicaría que tanto la membrana plasmática como el tonoplasto tengan concentraciones similares de AGPs. Debido a que las células adaptadas tenían más desarrollado el sistema de endomembranas, resulto más fácil estudiar la distribución de AGPs en retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi de las mismas. Samaj y col. (2000) también observaron que los anticuerpos de AGPs marcaban tanto al retículo endoplasmático como al aparato de Golgi. En las células adaptadas de tabaco hemos podido comprobar que el anticuerpo JIM13 marcaba claramente las membranas del retículo endoplasmático situado en la cara *cis* del aparato de Golgi, observándose en algunos casos claramente la formación de vesículas de la zona *cis* del Golgi marcadas con el anticuerpo JIM13. El marcaje en las cisternas del Golgi fue menos abundante que el de las vesículas de la zona *cis*. Igualmente, también se observó marcaje en la zona de la red de *trans* Golgi. El marcaje siempre se observó ligado a las membranas. Esto estaría de acuerdo con la ruta propuesta para el tránsito de los AGPs ligados a membrana. Así, el grupo de anclaje GPI, sería añadido en el retículo endoplasmático para continuar su tránsito en las vesículas de la zona *cis* y finalmente ser modificadas en el Golgi y ser transferidas a la red del *trans* Golgi (Schultz y col., 1998).

Una diferencia importante entre las células control y las adaptadas fue que estas últimas presentaron una menor densidad de marcaje en el citoplasma. Esto sería debido posiblemente a la mayor velocidad de excreción de AGPs en las células adaptadas, que haría disminuir más rápidamente la densidad de AGPs en el citoplasma.

***El reactivo de Yariv induce la muerte celular en las células de tabaco BY-2 control pero no en las células adaptadas a salinidad.***

El reactivo de Yariv, además de ser utilizado para purificar AGPs y para su cuantificación, también ha sido utilizado para conocer la función biológica de las mismas. Con este fin, se utilizaron cultivos celulares a los que se adicionaron diferentes concentraciones del reactivo de Yariv (Driouich y Baskin, 2008). El efecto inhibitor del crecimiento vegetal del reactivo de Yariv fue observado por primera vez en raíces de *Arabidopsis* y suspensiones celulares de zanahoria (Willats y Knox, 1996). Por otra parte, Langan y Nothnagel (1997) observaron que el reactivo de Yariv inducía la muerte celular en cultivos celulares de rosa, *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis*. Según Gao y Showalter (1999), la muerte celular inducida por el reactivo de Yariv en cultivos celulares de *Arabidopsis* era debido a una muerte celular

programada. Igualmente, Baron-Maurer y col. (2010) observaron que en cultivos celulares de *Araucaria angustifolia* tratados con el reactivo de Yariv se inducía la muerte celular programada. Nuestros cultivos celulares de tabaco control mostraron también una respuesta similar al ser añadido el reactivo de Yariv ya que, después de 24 horas, observamos un incremento significativo de la muerte celular. Sin embargo, al observar las células adaptadas, no se apreciaron variaciones en la viabilidad entre las células adaptadas sin tratar y tratadas con Yariv. Esto se podría explicar, como hemos visto anteriormente, por el hecho de que la membrana plasmática de las células adaptadas tenga una menor concentración de AGPs y que la tasa de recambio de los AGPs de la misma sea mayor en las células adaptadas. Una menor concentración de AGPs y una mayor tasa de recambio impedirían que el reactivo de Yariv aglutine un número suficiente de AGPs como para inducir un daño a la membrana plasmática. Por tanto, creemos que este resultado es una prueba adicional de que la membrana plasmática de las células adaptadas tiene una menor concentración de AGPs ligados.

Sin embargo, la cuestión más interesante es saber cómo el reactivo de Yariv induce la muerte celular (Driouich y Baskin, 2008). Las AGPs ligadas a membrana se encuentran a su vez ligadas a los microfilamentos de actina y microtúbulos que se encuentran justo debajo de la cara interna de la membrana plasmática. El mecanismo propuesto por Sardar y col. (2006) es que el reactivo de Yariv desestabilizaría la unión con los microtubulos y filamentos al aglutinar a las moléculas de AGPs, induciendo una cascada de señales que finalmente provocaría la muerte celular (Driouich y Baskin, 2008).

Nuestros resultados parecen confirmar la hipótesis de que el reactivo de Yariv actuaría como aglutinante de los AGPs ligados a membrana plasmática, secuestrándolos en la parte exterior de la misma. En la Figura 102 se muestra el posible modelo de actuación del reactivo de Yariv sobre las AGPs de membrana plasmática. Los resultados *in vivo* obtenidos con FM4-64 parecen indicar que en la zona interna del Yariv aglutinado hay estructuras que parecen ser membranas, posiblemente provenientes del plegamiento de la membrana plasmática celular. Esto vendría a ser confirmado por los resultados de ultraestructura que muestran claramente estructuras membranosas en el engrosamiento provocado por el reactivo de Yariv. Además, el anticuerpo JIM13 marcó claramente dichas estructuras, demostrando la presencia de AGPs. Por tanto, nuestra hipótesis es que el reactivo de Yariv estaría secuestrando las AGPs de membrana, induciendo el plegamiento de la misma y alterando su estructura.

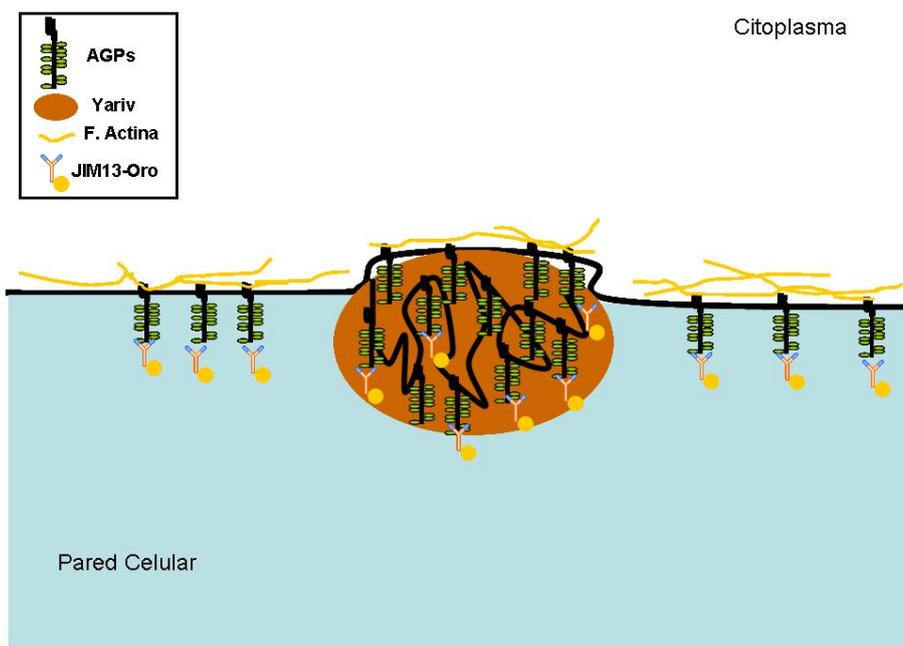


Figura 102. Modelo de actuación del reactivo de Yariv sobre AGPs de membrana plasmática.

**Las células de tabaco adaptadas a salinidad acumulan extensinas en el medio extracelular.**

A diferencia de las AGPs, la distribución celular de las EXTs ha sido muy poco estudiada en los cultivos celulares. Sin embargo, se considera que ambos tipos de proteínas estructurales desempeñan un papel crucial en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal (Velasquez y col., 2011; Wolf y col., 2012). Las extensinas son definidas como glicoproteínas estructurales básicas y extracelulares ricas en hidroxiprolina, alternando en la molécula motivos hidrofóbicos e hidrofílicos, que llevan frecuentemente residuos de tirosina, identificados como sitios potenciales para que se produzca el *cross-linking*. Así, su naturaleza química va a definir principalmente su función biológica. Como principal función biológica se piensa que participan en el ensamblaje de la pared celular. Mutantes de *Arabidopsis* en el gen de la extensina *AtEXT3* muestran importantes alteraciones en el ensamblaje de la pared celular primaria, llegando a ser letal en caso de la pérdida total de dicho gen (Cannon y col., 2008). La carga positiva de las extensinas permite que éstas puedan interactuar con las pectinas, modificando las propiedades de la pared celular al aumentar el nivel de compactación de la misma. Se ha propuesto que, en condiciones de estrés abiótico, la

producción de ROS apoplástico podría estar favoreciendo el *cross-linking* de las extensinas y, por tanto, inhibiendo el crecimiento celular (Evered y col., 2007). El análisis por *inmuno-dot* del medio de cultivo de las células control demostró la total ausencia de extensinas en el mismo. Además, la inmunolocalización mostró igualmente la ausencia de marcaje con JIM12, JIM19 y JIM20, y solamente con JIM11 se mostró un bajo nivel de marcaje en el citoplasma. Esto estaría de acuerdo con el estudio de Sabba y col. (1999) en el que se evidenció la ausencia de marcaje con JIM20 en cultivos celulares de tabaco BY-2. Las células adaptadas de tabaco mostraron una gran acumulación de extensinas en el medio de cultivo, tal y como revelaron los anticuerpos JIM11 y JIM20, sin embargo, el marcaje con los anticuerpos JIM12 y JIM19, no fue positivo. Esto nos está indicando la diferente naturaleza de las extensinas del medio de cultivo.

A nivel subcelular, sorprendentemente sólo el anticuerpo JIM11 mostró un importante marcaje en el citoplasma. Además, contrario a lo que era de esperar, las paredes celulares mostraron un bajísimo marcaje. Una posible explicación es que el epítipo de la extensina esté enmascarado por la unión a otros componentes de la pared celular como las pectinas (Swords y Staehelin, 1993). Estos resultados hacen pensar que principalmente las extensinas son excretadas al medio de cultivo. Esto estaría de acuerdo con los resultados encontrados por Kawasaki (1989), quien observó que los cultivos celulares de tabaco acumulaban extensinas en el medio de cultivo. La excreción de extensinas al medio de cultivo puede estar relacionada con el hecho de que en planta se ha visto que tanto extensinas como pectinas abundan en la lámina media que separa a las células vegetales (Qi y col., 1995; Swords y Staehelin, 1993). También se ha sugerido que las extensinas presentes en el apoplasto puedan participar en la defensa celular ya que al ser excretadas al medio extracelular podrían servir como aglutinantes contra el ataque por patógenos (Wolf y col., 2012).

## VI. CONCLUSIONES



## VI. CONCLUSIONES.

1. A partir de una línea control de cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* BY-2 se ha obtenido, por adaptación progresiva, una línea celular adaptada a 258 mM de NaCl. Las células de tabaco adaptadas a altas concentraciones salinas mostraron importantes modificaciones en la estructura subcelular. En función de la fase de crecimiento en la que se encontraban, estas células presentaban un tamaño de dos a cuatro veces menor que las células crecidas en condiciones control.

2. Las células de tabaco adaptadas a altas concentraciones salinas mostraron importantes diferencias ultraestructurales al ser comparadas con las células crecidas en condiciones control. Estas diferencias se debieron principalmente a las modificaciones inducidas por la muerte celular observada en las células adaptadas. Nuestra hipótesis se basa en el hecho de que cuando las células adaptadas entran en fase G<sub>0</sub> se puede inducir la muerte celular de tipo necrótico, donde la alteración de la mitocondria y del sistema de endomembranas, principalmente el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático, estarían regulando dicho proceso.

3. El proceso de adaptación a altas concentraciones salinas produce importantes modificaciones en el proteoma y transcriptoma de las células de tabaco BY-2. Los resultados obtenidos tanto en proteómica como en transcriptómica coinciden con la importancia en la alteración de las chaperonas como mecanismos de mantenimiento de la homeostasis celular. Otros grupos de genes y proteínas que se ven alterados en las células adaptadas de tabaco BY-2 son los relacionados con la respuesta al estrés, cadena de transporte electrónico mitocondrial, defensa celular, factores de transcripción y WRKY.

4. La adaptación a altas concentraciones salinas induce la compartimentación de Na<sup>+</sup> y el tráfico de vesículas en células de tabaco BY-2. Estos resultados nos permiten proponer la hipótesis de que en las células adaptadas el tráfico de vesículas que contienen Na<sup>+</sup> y que se desplazan desde la membrana plasmática hacia la vacuola podría ser un mecanismo de evitación de la toxicidad del Na<sup>+</sup> a nivel celular.

5. El metabolismo de la prolina y del ABA están implicados en el proceso de adaptación a altas concentraciones salinas en células de tabaco BY-2. Nuestros resultados muestran que la importante acumulación de ABA en las células adaptadas podría estar regulando de forma directa el metabolismo de la prolina.

**6.** La producción de ROS en la mitocondria puede actuar como modulador en el proceso de adaptación a altas concentraciones salinas en células de tabaco BY-2. Nuestros resultados muestran que la mitocondria podría actuar en la señalización retrógrada al núcleo y posiblemente al retículo endoplasmático, controlando el proceso de inducción de muerte celular.

**7.** El sistema de endomembranas, retículo endoplasmático y aparato de Golgi son modificados en el proceso de adaptación a salinidad en células de tabaco BY-2. Mediante la utilización de células de tabaco BY-2 marcadas con GFP, dirigida al retículo endoplasmático, y adaptadas a salinidad hemos podido demostrar que se produce una importante dilatación del lumen del retículo endoplasmático. Este resultado fue confirmado por los estudios ultraestructurales. Posiblemente, en estas dilataciones del retículo endoplasmático se podrían estar acumulando las proteínas dañadas por el estrés salino. Así mismo, estas alteraciones producidas en el sistema de endomembranas podrían estar actuando como señal de la muerte celular.

**8.** Los cultivos celulares de tabaco BY-2 adaptados a salinidad contienen una menor concentración de giberelinas bioactivas y son sensibles a prohexadiona. Nuestros resultados demuestran que en la fase de crecimiento exponencial en las células adaptadas se encuentra inhibida la ruta de la  $3\beta$ -hidroxilación de la  $GA_{12}$ . Así mismo, hemos demostrado que la prohexadiona puede ser considerada como un inhibidor efectivo del metabolismo de las GAs en los cultivos celulares de tabaco BY-2.

**9.** La expresión de los genes de síntesis y degradación de giberelinas está regulada de forma diferencial en las células de tabaco BY-2 adaptadas a salinidad. Por otro lado, las proteínas DELLA parecen estar implicadas en el proceso de adaptación a salinidad. Nuestros resultados demuestran que durante la fase de crecimiento exponencial en las células adaptadas se observó una importante disminución en la expresión de los genes relacionados con las síntesis de giberelinas. Este hecho se correlacionó con un incremento en la concentración de las proteínas DELLA. Igualmente, nuestros resultados sugieren que las proteínas DELLA podrían estar activando el metabolismo del ABA.

**10.** Las células de tabaco BY-2 adaptadas a salinidad acumulan AGPs en el medio extracelular, posiblemente debido a una mayor tasa de recambio en la membrana plasmática.

**11.** Las células de tabaco BY-2 adaptadas a salinidad muestran una distribución diferencial de AGPs en el citoplasma, membrana plasmática y tonoplasto en comparación con las células control. Nuestros resultados muestran que la reducción de AGPs en la membrana plasmática posiblemente pueda estar afectando a las propiedades físicas de la pared celular.

**12.** El reactivo de Yariv induce la muerte celular en las células de tabaco control, pero no en las células adaptadas a salinidad. Nuestra hipótesis se basa en que el reactivo de Yariv aglutinaría las AGPs de membrana plasmática, induciendo la desorganización de la misma y produciendo la muerte celular. Sin embargo, este proceso no tendría lugar en las células adaptadas debido a la baja densidad de AGPs en la membrana plasmática.

**13.** Las células de tabaco BY-2 adaptadas a salinidad acumulan extensinas en el medio extracelular, lo que podría estar relacionado con una respuesta de defensa frente al estrés.





## VII. BIBLIOGRAFÍA





## VII. BIBLIOGRAFÍA.

- Achard, P., Vriezen, W. H., Van Der Straeten, D. Y Harberd, N. P. (2003).** Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *The Plant Cell*. 15: 2816-2825.
- Achard, P. y Genschik, P. (2009).** Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany*. 60: 1085-1092.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J. y Harberd, N. P. (2006).** Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*. 311: 91-94.
- Affenzeller, M. J., Darehshouri, A., Andosch, A., Lutz, C. and Meindl, U. L. (2009).** Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulate*. *Journal of Experimental Botany*. 60: 939-954.
- Aghaei, K. y Komatsu, S. (2013).** Crop and medicinal plants proteomics in response to salt stress. *Frontiers in Plant Science*. 4: 8.
- Alarcón, J. J., Sánchez-Blanco, M. J., Bolarín, M. C. and Torrecillas, A. (1993).** Water relations and osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* during short-term salt exposure and recovery. *Plant Physiology*. 89: 441-447.
- Amber, L. H., Tohru, A. y Camille, M. S. (2012).** Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression. *Plant Physiology*. 160: 83-92.
- Amtmann, A. y Sanders, D. (1999).** Mechanisms of Na<sup>+</sup> uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research*. 29: 75-112.
- Apel, K. y Hirt, H. (2004).** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 373-399.
- Appleford, N. E. J., Evans, D. J., Lenton, J. R., Gaskin, P., Crocker, S. J., Devos, K., Phillips, A. L. y Hedden, P. (2006).** Function and transcript analysis of gibberellins-biosynthetic enzymes in wheat. *Planta*. 223: 568-582.
- Apse, M. P. y Blumwald, E. (2002).** Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 146-150.
- Apse, M. P. y Blumwald, E. (2007).** Na<sup>+</sup> transport in plants. *FEBS Letters*. 581: 2247-2254.
- Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A. y Blumwald, E. (1999).** Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. *Science*. 258: 1256-1258.

- Ariizumi, T., Lawrence, P. K. y Steber, C. M. (2011).** The role of two F-box proteins, SLEEPY1 and SNEEZY, in *Arabidopsis* GA signaling. *Plant Physiology*. 155: 765-775.
- Asano, K., Hirano, K., Ueguchi-Tanaka, M., Angeles-Shim, R. B., Komura, T., Satoh, H., Kitano, H., Matsuoka, M. y Ashikari, M. (2009).** Isolation and characterization of dominant dwarf mutants, *Slr1-d*, in rice. *Molecular Genetics & Genomics*. 281: 223-231.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M. y Sherlock, G. (2000).** Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*. 25: 25-29.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2000).** Fundamentos de Fisiología Vegetal. Edita McGraw Hill Interamericana. Giberelinas. Capítulo 20: 325-342.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2008).** Fundamentos de Fisiología Vegetal. Capítulo 29: Fisiología de las plantas y el estrés (2<sup>nd</sup> ed.). Interamericana Mc Graw Hill. Madrid, España. 577-597.
- Band, L. R., Úbeda-Tomás, S., Dyson, R. J., Middleton, A. M., Hodgman, T. C., Owen, M. R., Jensen, O. E., Bennett, M. J. y King, J. R. (2012).** Growth-induced hormone dilution can explain the dynamics of plant root cell elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 109: 7577-7582.
- Banerjee, S., Vishwanath, P., Cui, J., Kelleher, D. J., Gilmore, R., Robbins, P. W. y Samuelson, J. (2007).** The evolution of N-glycan-dependent endoplasmic reticulum quality control factors for glycoprotein folding and degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 104: 11676-11681.
- Bangerth, F. K. (1997).** Can regulatory mechanism in fruit growth and development be elucidated through the study of endogenous hormone concentrations?. *Acta Horticulturae*. 463: 77-87.
- Banu, N. A., Hoque, A., Watanabe-Sugimoto, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. y Murata, Y. (2009).** Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *Journal of Plant Physiology*. 166: 146-156
- Bargmann, B. O. R., Laxalt, A. M., ter Riet, B., van Schooten, B., Merquiol, E., Testerink, C., Haring, M. A., Bartels, D. y Munnilk, T. (2009).** Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant and Cell Physiology*. 50: 78-89.

- Baron-Maurer, J. B., Pereira-Netto, A. B., Pettolino, F. A., Gaspar, Y. M. y Bacic, A. (2010).** Effects of Yariv dyes, arabinogalactan-protein binding reagents, on the growth and viability of Brazilian pine suspension culture cells. *Trees*. 24: 391-398.
- Barragán, V., Leidi, E. O., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, J. A., Cubero, B. y Pardo, J. M. (2012).** Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 24: 1127-1142.
- Barrero, J. M., Rodríguez, P. L., Quesada, V., Piqueras, P., Ponce, M. R. y Micol, J. L. (2006).** Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of NCED3, AAO3 and ABA1 in response to salt stress. *Plant, Cell and Environment*. 29: 2000-2008.
- Basek, A. y Rademacher, W. (2000).** Growth regulation of pome and stone fruit trees by use of prohexadione-Ca. *Acta Horticulturae*. 514: 41-50.
- Bassil, E., Coku, A. y Blumwald, E. (2012).** Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*. 63: 5727-5740.
- Bazzi, C., Messina, C. H., Tortoreto, L., Stefani, E., Bini, F. F., Sabatini, E., Spinelli, F., Costa, G., Aupmann, S. y Stamler, G. (2003).** Control of pathogen incidence in pome fruits and other horticultural crop plants with Prohexadione-Ca. *European Journal of Horticultural Science*. 68: 108-114.
- Benavides, M. P., Marconi, P. L., Gallego, S. M., Comba, M. E. y Tomaro, M. L. (2000).** Relationship between antioxidant defence systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. *Australian Journal of Plant Physiology*. 27: 273-278.
- Bhojwani, S. S. y Razdan, M. K. (1983).** Plant tissue culture: Theory and practice. *Development in Crop Science. Elsevier Science Publishing Company. New York, USA*. Vol. 5: 1-10.
- Binzel, M. L., Hasegawa, P. M., Handa, A. K. y Bressan, R. A. (1985).** Adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiology*. 79: 118-125.
- Binzel, M. L., Hasegawa, P. M., Rhodes, D., Handa, S., Handa, A. K. y Bressan, R. A. (1987).** Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiology*. 84: 1408-1415.
- Binzel, M. L., Hess, F. D., Bressan, R. A. y Hasegawa, P. M. (1988).** Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiology*. 86: 607-614.
- Blumwald, E. (2000a).** Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology*. 12: 431-434.

- Blumwald, E., Aharon, G. S. y Apse, M. P. (2000b).** Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465:140-151.
- Bolwell, G. P., Davies, D. R., Gerrish, C., Auh, C. K., y Murphy, T. M. (1998).** Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and french bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiology*. 116: 1379-1385.
- Borecky, J., Nogueira, F. T., de Oliveira, K. A., Maia, I. G., Vercesi, A. E. y Arruda, P. (2006).** The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. *Journal of Experimental Botany*. 57: 849-864.
- Borel, C., Audran, C., Frey, A., Marion-Poll, A., Tardieu, F. y Simonneau, T. N. (2001).** N-plumbaginifolia zeaxanthin epoxidase transgenic lines have unaltered baseline ABA accumulations in roots and xylem sap, but contrasting sensitivities of ABA accumulation to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, 52: 427-434.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Bressler, E. y Hoffman, G. J. (1986).** Irrigation management for soil salinity control: theories and tests. *Soil Science Society of America Journal*. 50: 1552-1560.
- Brett, C. T. y Waldron, K. W. (1996).** Physiology and biochemistry of plant cell walls. En *Topics in Plant Functional Biology: 1. Editado por Black, M. y Charlwood, B.*
- Brett, C. L., Tukaye, D. N., Mukherjee, S. y Rao, R. (2005).** The yeast endosomal  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Molecular Biology of the Cell*. 16: 1396-1405.
- Brockmeier, A. y Williams, D. B. (2006).** Potent lectin-independent chaperone function of calnexin under conditions prevalent within the lumen of the endoplasmic reticulum. *Biochemistry*. 45: 12906-12916.
- Brown, R. G. S., Kawaide, H., Yang, Y-Y., Rademacher, W. y Kamiya, Y. (1997).** Daminozide and prohexadione have similar modes of action as inhibitors of the late stages of gibberellins metabolism. *Physiologia Plantarum*. 101: 309-313.
- Bueno, P., Piqueras, A., Kurepa, J., Savoure, A., Verbruggen, N., Van Montagu, M. e Inzé, D. G. (1998).** Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Science*. 138: 27-34.
- Cacas, J. L. (2010).** Devil inside: does plant programmed cell death involve the endomembrane system? *Plant, Cell and Environment*. 33: 1453-1473.

- Cakmak, I. y Horst, W. J. (1991).** Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*. 83: 463-468.
- Cannon, M. C., Terneus, K., Hall, Q., Tan, L., Wang, Y., Wegenhart, B. L., Chen, L., Lamport, D. T. A., Chen, Y. y Kieliszewski, M. J. (2008).** Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 105: 2226-2231.
- Carillo, P., Annunziata, M. G., Pontecorvo, G., Fuggi, A. y Woodrow, P. (2011).** Salinity stress and salt tolerance. En *Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations*. In Tech. Editado por Shanker, A. 21-38.
- Carpita, N. C. y McCann, M. (2000).** The cell Wall. En *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD. Editado por Buchanan, B. B., Gruissem, W. y Jones, R. L. 52-108.
- Cauchy, A. L. (1821).** *Cours d'analyse de l'Ecole Royale Polytechnique*. París, France: Imprimerie Royale.
- Cerioti, A. (2011).** Waste disposal in the endoplasmic reticulum, ROS production and plant salt stress response. *Cell Research*. 21: 555-557.
- Chao, A. Y., Luo, Y. H., Shi, M., Luo, D. y Lin, H. X. (2005).** Salt responsive genes in rice revealed by cDNA microarray analysis. *Cell Research*. 15: 796-810.
- Cheeseman, J. M. (2006).** Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of Experimental Botany*. 57: 2435-2444.
- Chen, S., Jiang, J., Li, H. Y. y Liu, G. F. (2012).** The salt responsive transcriptome of *Populus simonii* x *Populus nigra* via DGE. *GENE*. 504: 203-212.
- Cho, H. T. y Kende, H. (1997).** Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. *The Plant Cell*. 9: 1661-1671.
- Coelho, S., Taylor, A. R., Sousa-Pinto, T., Ryan, K., Brown, M. T. y Brownlee, C. (2002).** Spatio-temporal patterning of reactive oxygen production and calcium wave propagation in *Fucus* rhizoid cells. *The Plant Cell*, 14: 2369-2381.
- Cong, L., Zheng, H.C., Zhang, Y. X. y Chai, T. Y. (2008).** *Arabidopsis DREB1A* confers high salinity tolerance and regulates the expression of GA dioxygenases in Tobacco. *Plant Science*. 174: 156-164.
- Cosgrove, D. J. (1997).** Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 13: 171-201.
- Cosgrove, D. J. (2000).** Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*. 407: 321-326.
- Cosgrove, D. J. (2005).** Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6: 850-861.

- Costa, G., Andreotti, C., Bucchi, F., Sabatini, E., Bazzi, C., Malaguti, S. y Rademacher, W. (2001).** Prohexadione-Ca (Apogee®): growth regulation and reduced fire blight incidence in pear. *Horticultural Science*. 36: 931-933.
- Cramer, G. R., Lauchli, A. y Polito, V. S. (1985).** Displacement of  $\text{Ca}^{2+}$  by  $\text{Na}^+$  from the plasmalemma of root cells. *Plant Physiology*. 79: 207-211.
- Crawford, R. M. M. (1989).** Studies in plant survival: Ecological case histories of plant adaptation to adversity. En *Studies in Ecology*. Vol. 11. Blackwell Scientific Publications. Oxford, England. 265-281.
- Crocker, S. J., Gaskin, P., Hedden, P., MacMillan, J. y MacNeil, K. A. G. (1994).** Quantitative analysis of gibberellins by isotope dilution mass spectrometry: a comparison of the use of calibration curves, an isotope dilution fit program and arithmetical correction of isotope ratios. *Phytochemical Analysis*. 5: 74-80.
- Cuartero, J., Bolarín, M.C., Moreno, V. and Pineda, B. (2008).** La adaptación al ambiente y los estreses abióticos en la mejora vegetal. En *Tolerancia a la salinidad*. IFAPA, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. Editado por Avila, C.M., Atienza, S.G., Moreno, M.T. y Cubero, J.I. 231-262.
- Cuin, T. A., Miller, A. J., Laurie, S. A. y Leigh, R. A. (2003).** Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *Journal of Experimental Botany*. 54: 657-661.
- Cutler, S. R., Rodríguez, P. L., Finkelstein, R. R. y Abrams, S. R. (2010).** Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*. 61: 651-679.
- Dajic, Z. (2006).** Salt stress. En *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer, Netherlands. Editado por Rao, K. V. M., Raghavendra, A. S. y Reddy, K. J. 41-99.
- Danon, A., Delorme, V., Mailhac, N. y Gallois, P. (2000).** Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38: 647-655.
- Danon, A., Rotari, V. I., Gordon, A., Mailhac, N. y Gallois, P. (2004).** Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and defender against apoptotic death. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 779-787.
- Davidson, S. E., Elliott, R. C., Helliwell, C. A., Poole, A. T. y Reid, J. B. (2003).** The pea gene *NA* encodes *ent*-kaurenoic acid oxidase. *Plant Physiology*. 131: 335-344.

- Davière, J. M., de Lucas, M. y Prat, S. (2008).** Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. *Current Opinion in Genetics and Development*. 18: 295-303.
- Davière, J. M. y Achard, P. (2013).** Gibberellin signaling in plants. *Development*. 140: 1147-1151.
- de Lucas, M., Davière, J. M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M. A., Titarenko, E. y Prat, S. (2008).** A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*. 451: 480-484.
- De Gara, L., De Pinto, M. C. y Tommasi, F. (2003).** The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41: 863-870.
- Delauney, A. J. y Verma, D. P. S. (1993).** Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*. 4: 215-223.
- Demidchik, V. y Tester, M. (2002).** Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*. 128: 379-387.
- Demidchik, V. y Maathuis, F. J. (2007).** Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*. 175: 387-404.
- Demidchik, V., Cuin, T. A., Svistunenko, D., Smith, S. J., Miller, A. J., Shabala, S., Sokolik, A. y Yurin, V. (2010).** *Arabidopsis* root K<sup>+</sup>-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science*. 123: 1468-1479.
- Derbyshire, P., Findlay, K., McCann, M. C. y Roberts, K. (2007).** Cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls involves dynamic changes in cell wall thickness. *Journal of Experimental Botany*. 58: 2079-2089.
- Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, J. T. y Neill, S. J. (1998).** Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Biochemical Journal*. 330: 115-120.
- Deyholos, M. K. (2010).** Making the most of drought and salinity transcriptomics. *Plant, Cell and Environment*. 33: 648-654.
- Díaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M. J., Rubio, M., Olmos, E., García, J. A., Martínez-Gómez, P. y Hernández, J. A. (2008).** Alteration in the chloroplast

- metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to plum pox virus. *Journal of Experimental Botany*. 59: 2147-2160.
- Díaz-Vivancos, P., Rubio, M., Mesonero, V., Periago, P. M., Ros Barceló, A., Martínez-Gómez, P. y Hernández, J. A. (2006).** The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to plum pox virus. *Journal of Experimental Botany*. 57: 3813-3824.
- Dietz, K. J., Tavakoli, N., Kluge, C., Mimura, T., Sharma, S., Harris, G. C., Chardonnens, A. N. y Golldack, D. (2001).** Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of Experimental Botany*. 52: 1969-1980.
- Digby, J. y Wareing, P. F. (1966).** The effect of growth hormones on cell division and expansion in liquid suspension cultures of *Acer pseudoplatanus*. *Journal of Experimental Botany*. 17: 718-725.
- Dill, A., Jung, H. S. y Sun, T. P. (2001).** The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 98: 14162-14167.
- Dixon, D. P., Laphorm, A. y Edwards, R. (2002).** Plant glutathione transferases. *Genome Biology*. 3: 3004.1.
- Dolan, L. y Davies, J. (2004).** Cell expansión in roots. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 33-39.
- Donaldson, J. G. (2009).** Phospholipase D in endocytosis and endosomal recycling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1791: 845-849.
- Driouich, A. y Baskin, T. I. (2008).** Intercourse between cell wall and cytoplasm exemplified by arabinogalactan proteins and cortical microtubules. *American Journal of Botany*. 95: 1491-1497.
- Dschida, W. J., Platt-Aloia, K. A. y Thomson, W. W. (1992).** Epidermal peels of *Avicennia germinans* (L.) stearn: a useful system to study the function of salt glands. *Annals of Botany*. 70: 501-509.
- Duby, G., Degand, H., Faber, A. M. y Boutry, M. (2010).** The proteome complement of *Nicotiana tabacum* Bright-Yellow-2 culture cells. *Proteomics*. 10: 2545- 2550.
- Dugardeyn, J., Vandenbussche, F. y Van Der Straeten, D. (2008).** To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by *in silico* gene expression analysis?. *Journal of Experimental Botany*. 59: 1-16.
- Edwards, K. D., Bombarely, A., Story, G. W., Allen, F., Mueller, L. A., Coates, S. A. y Jones, L. (2010).** TobEA: an atlas of tobacco gene expression from seed to senescence. *BMC Genomics*. 11: 142.

- Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C. J. y Bacic, A. (2010).** Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface?. *Plant Physiology*. 153: 403-419.
- Evans, L. y Regusci, C. L. (1999).** Mode of action, metabolism and uptake of BAS-125W prohexadione-calcium. *Horticultural Science*. 34: 1200-1201.
- Evered, C., Majevadia, B. y Thompson, D. S. (2007).** Cell wall water content has a direct effect on extensibility in growing hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Experimental Botany*. 58: 3361-3371.
- Fambrini, M., Mariotti, L., Parlanti, S., Picciarelli, P., Salvini, M., Ceccarelli, N. y Pugliesi, C. (2011).** The extreme dwarf phenotype of the GA-sensitive mutant of sunflower, *dwarf2*, is generated by a deletion in the *ent-kaurenoic acid oxidase1 (HaKAO1)* gene sequence. *Plant Molecular Biology*. 75: 431-450.
- Ferl, R. y Paul, A. L. (2000).** Genome organization and expression. En *Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists. Editado por Buchanan, B. Gruissem, W. and Jones, R.* 312-357.
- Fernández-García, N., Martí, M. C., Jiménez, A., Sevilla, F. y Olmos E. (2009).** Sub-cellular distribution of glutathione in an *Arabidopsis mutant (vtc1)* deficient in ascorbate. *Journal of Plant Physiology*. 166: 2004-2012.
- Fernández-García, N., Hernández, M., Casado-Vela, J., Bru, R., Elortza, F., Hedden, P. y Olmos, E. (2011).** Changes to the proteome and targeted metabolites of xylem sap in *Brassica oleracea* in response to salt stress. *Plant, Cell and Environment*. 34: 821-836.
- Ferreira, A. L. y Lima-Costa, M. E. (2008).** Growth and ultrastructural characteristics of citrus cells grown in médium containing NaCl. *Biologia Plantarum*. 52: 129-132.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T. Y Steber, C. (2008).** Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 387-415.
- Fleet, C. M. (2011).** Teaching tools in plant biology: gibberellins. *The Plant Cell*.
- Fleishon, S., Shani, E., Ori, N. y Weiss, D. (2011).** Negative reciprocal interactions between gibberellin and cytokinin in tomato. *New Phytologist*. 190: 609-617.
- Flowers, T. J. (2004).** Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 55: 307-319.
- Flowers, T. J., Hajibagheri, M. A. and Yeo, A. R. (1991).** Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *The Plant Cell Environment*. 14: 319-325.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D. G., Davies, J. M. y**

- Dolan, L. (2003).** Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 422: 442-446.
- Fowler, M. W. (1985).** Plant cell culture and natural product synthesis: An academic dream or a commercial possibility?. *BioEssays*, 3: 172-175.
- Foyer, C. H. y Noctor, G. (2005).** Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant, Cell and Environment*. 17: 1866-1875.
- Foyer, C. H. y Noctor, G. (2012).** Managing the cellular redox hub in photosynthetic organisms. *Plant, Cell and Environment*. 35: 199-201.
- Freshour, G., Clay, R. P., Fuller, M. S., Albersheim, P., Darvill, A. G. y Hahn, M. G. (1996).** Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiology*. 110:1413-1429.
- Fridovich, I. (1986).** Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 247: 1-11.
- Fry, S. C. (1989).** The structure and functions of xyloglucan. *Journal of Experimental Botany*. 40: 1-11.
- Fry, S. C. y Street, H. E. (1980).** Gibberellin-sensitive suspension cultures. *Plant Physiology*. 65: 472-477.
- Fu, X. y Harberd, N. P. (2003).** Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature*. 421: 740-743.
- Gallego Giraldo, L. M. (2008).** Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de genes del metabolismo de giberelinas sobre el desarrollo de tabaco. Universidad de Valencia.
- Gallego Giraldo, L. M., García-Martínez, J. L., Moritz, T. y Upez-Díaz, I. (2007).** Flowering in tobacco needs gibberellins but is not promoted by the levels of active GA(1) and GA(4) in the apical shoot. *Plant and Cell Physiology*. 48: 897-898.
- Gao, M. y Showalter, A. M. (1999).** Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *The Plant Journal*. 19: 321-331.
- Gapper, C. y Dolan, L. (2006).** Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiology*. 141: 341-345.
- Garnier, L., Simon-Plas, F., Thuleau, P., Agnel, J. P., Blein, J. P., Ranjeva, R. y Montillet, J. L. (2006).** Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant, Cell and Environment*. 29: 1956-1969.

- Geelen, D. N. V. e Inzé, D. G. (2001).** A Bright Future for the Bright Yellow-2 Cell Culture. *Plant Physiology*. 127: 1375-1379.
- Ghars, M. A., Richard, L., Lefebvre-De Vos, D., Leprince, A. S., Parre, E., Bordenave, M., Abdelly, C. y Savouré, A. (2011).** Phospholipases C and D modulate proline accumulation in *Thellungiella halophila/salsuginea* differently according to the severity of salt or hyperosmotic stress. *Plant and Cell Physiology*. 53: 183-192.
- Glenn, E. P., Brown, J. J. y Blumwald, E. (1999).** Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews in Plant Science*. 18: 227-255.
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F. R., Primo-Millo, E. y Talon, M. (1998).** Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of citrus seedlings to salt shock. *Physiologia Plantarum*. 103: 475-484.
- González, P., Syvertsen, J. P. y Etxeberria, E. (2012).** Sodium distribution in salt-stressed citrus rootstock seedlings. *Horticultural Science*. 47: 1504-1511.
- Gratao, P. L., Pompeu, G. B., Capaldi, F. R., Vitorello, V. A., Lea, P. J. y Azevedo, R. A. (2008).** Antioxidant response of *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 cells to cadmium and nickel stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 94: 73-83.
- Greenway, H. y Munns, R. (1980).** Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*. 31: 149-190.
- Gygi, S. P., Rist, B. y Aebersold, R. (2000).** Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. *Current Opinion in Biotechnology*. 11: 396-401.
- Haberlandt, G. (1902).** Kultivversuche mit isollerten Pflanzellen. *Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften in Wien*, 111: 62-69.
- Halfter, U., Ishitani, M. y Zhu, J. K. (2000).** The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academu of Sciences, USA*. 97: 3735-3740.
- Halliwell, B. (1999).** Antioxidant defense mechanisms: From the beginning to the end. *Free Radical Research*. 31: 261-272.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (1989).** Free Radical in Biology and Medicine. Clarendon Press. Oxford.
- Hamaji, K., Nagira, M., Yoshida, K., Ohnishi, M., Oda, Y., Uemura, T., Goh, T., Sato, M. H., Morita, M. T., Tasaka, M., Hasezawa, S., Nakano, A., Hara-Nishimura, I., Maeshima, M., Fukaki, H. y Mimura, T. (2009).** Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*. 50: 2023-2033.

- Hamayun, M., Khan, S. A., Khan, A. L., Shin, J-H., Ahmad, B., Shin, D-H. y Lee, I-J. (2010).** Exogenous gibberellic acid reprograms soybean to higher growth, and salt stress tolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 7226-7232.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. y Bohnert, H. J. (2000).** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51: 463-499.
- Hauvermale, A. L., Ariizumi, T. y Steber, C. M. (2012).** Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression. *Plant Physiology*. 160: 83-92.
- Hedden, P. (2012).** Gibberellin biosynthesis. En eLS John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0023720.
- Hedden, P. y Thomas, S. G. (2012).** Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal*. 444: 11-25.
- Helliwell, C. A., Chandler, P. M., Poole, A., Dennis, E. S. y Peacock, W. J. (2001).** The CYP88A cytochrome P450, *ent*-kaurenoic oxidase, catalyzes three steps of the gibberellins biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 98: 2065-2070.
- Hernández, J. A., Jiménez, A., Mullineaux, P. y Sevilla, F. (2000).** Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term salt stress is associated with the induction of antioxidant defences. *Plant, Cell and Environment*. 23: 853-862.
- Hernández, J. A., Olmos, E. Corpas, F. J., Sevilla, F. y del Río, L. A. (1995).** Salt induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science*. 105: 151-167.
- Hernández, M., Fernández-García, N., Díaz-Vivancos, Pedro y Olmos, E. (2010).** A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. *Journal of Experimental Botany*. 2: 521-535.
- Hillel, D. (2000).** Salinity management for sustainable irrigation. The World Bank, Washington, D.C.
- Hirano, K., Asano, K., Tsuji, H., Kawamura, M., Mori, H., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M. y Matsuoka, M. (2010).** Characterization of the molecular mechanism underlying gibberellin perception complex formation in rice. *The Plant Cell*. 22: 2680-2696.
- Hisamatsu, T., Koshioka, M., Kubota, S., Fujime, Y., King, R. W. y Mander, L. N. (2000).** The role of gibberellins biosynthesis in the control of growth and flowering in *Matthiola incana*. *Physiologia Plantarum*. 109: 97-105.

- Ho, L. H. M., Giraud, E., Uggalla, V., Lister, R., Clifton, R., Glen, A., Thirkettle-Watts, D., Van Aken, O. y Whelan, J. (2008). Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 147: 1858-1873.
- Hoeberichts, F. A. and Woltering, E. J. (2002). Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *BioEssays*. 25(1): 47–57.
- Hogarth, P. J. (1999). The biology of mangroves. Oxford University Press, New York.
- Hoque, M. A., Banu, M. N. A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. y Murata, Y. (2007a). Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology*. 165: 813-824.
- Hoque, M. A., Banu, M. N. A., Okuma, E., Amako, K., Nakamura, Y. y Shimoishi, Y. (2007b). Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate–glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. *Journal of Plant Physiology*. 164: 1457-1468.
- Horie, T. y Schroeder, J. I. (2004). Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiology*. 136: 2457-2462.
- Hossain, Z., López-Climent, M. F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R. M. y Gómez-Cadenas, A. (2009). Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage. *Journal of Plant Physiology*. 166: 1391-1404.
- Hou, X., Hu, W-W., Shen, L., Lee, L. Y. C., Tao, Z., Han, J. H. y Yu, H. (2008). Global identification of DELLA targets genes during *Arabidopsis* flower development. *Plant Physiology*. 147: 1126-1142.
- Hrmova, M., Farkas, V., Lahnstein, J. y Fincher, G. B. (2007). A barley xyloglucan xyloglucosyl transferase covalently links xyloglucan, cellulosic substrates, and (1,3;1,4)-beta-D-glucans. *The Journal of Biological Chemistry*. 282: 12951-12962.
- Huang, J., Hirji, R., Adam, L., Rozwadowski, K. L., Hammerlindl, J. K., Keller, W. A. y Selvaraj, G. (2000). Genetic engineering of glycine betaine production towards enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiology*. 122: 747-756.
- Huang, C. H., Kuo, W. Y., Weiss, C. y Jinn, T. L. (2012). Copper chaperone-dependent and -independent activation of three copper-zinc superoxide

- dismutase homologs localized in different cellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 158: 737-746.
- Huertas, R. (2011). Sobreexpresión en tomate de transportadores de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> y sus proteínas reguladoras: papel en la homeostasis iónica.** Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Hughes, F. M. y Cidlowski, J. A. (1999).** Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo. *Advances in Enzyme Regulation*. 39: 157-171.
- Huh, G. H., Damsz, B., Matsumoto, T. K., Reddy, M. P., Rus, A. M., Ibeas, J. I., Narasimhan, M. L., Bressan, R. A. y Hasegawa P. M. (2002).** Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *The Plant Journal*. 29: 649–659.
- Hussain, A., Cao, D., Cheng, H., Wen, Z. y Peng, J. (2005).** Identification of the conserved serine/threonine residues important for gibberellins-sensitivity of *Arabidopsis* RGL2 protein. *The Plant Journal*. 44: 88-89.
- Ibl, V., Csaszar, E., Schlager, N., Neubert, S., Spitzer, C. y Hauser, M. T. (2011).** Interactome of the plant-specific ESCRT-III component AtVPS2.2 in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Proteome Research*. 11: 397-411.
- Immerzeel, P., Eppink, M. M., deVries, S. C., Schols, H. A. y Alphons, G. J. (2006).** Carrot arabinogalactan proteins are interlinked with pectins. *Physiologia Plantarum*. 128: 18-28.
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sato, Y., Ashikari, M. y Matsuoka, M. (2002).** The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell*. 14: 57-70.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2001).** Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 27: 325-333.
- Jacoby, R. P., Taylor, N. L. y Millar, A. H. (2011).** The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. *Trends in Plant Science*. 16: 614-623.
- Jia, W., Wang, Y., Zhang, S. y Zhang, J. (2002).** Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *Journal of Experimental Botany*. 53: 2201-2206.
- Jiang, Y. y Deyholos, M. K. (2006).** Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes, *BMC Plant Biology*. 6: 25.

- Jiang, Y., Yang, B., Harris, N. S. y Deyholos, M. K. (2007).** Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany*, 58: 3591-3607.
- Jiménez, A., Hernández, J. A., del Río, L. A. y Sevilla, F. (1997).** Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*. 114: 275-284.
- Joo, J. H., Bae, Y. S. y Lee, J. S. (2001).** Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology*. 126: 1055-1060.
- Jordan, E. T., Hatfield, P. M., Hondred, D., Talon, M., Zeevaart, A. D. y Vierstra, R. D. (1995).** Phytochrome A over-expression in transgenic tobacco. Correlation of dwarf phenotype with high concentrations of phytochrome in vascular tissue and attenuated gibberellin levels. *Plant Physiology*. 107: 797-805.
- Kanai, M., Higuchi, K., Hagihara, T., Konishi, T., Ishii, T., Fujita, N., Nakamura, Y., Maeda, Y., Yoshida, M. and Tadano, T. (2007).** Common reed produces starch granules at the shoot base in response to salt stress. *New Phytologist*. 173: 572-580.
- Kato, K., Matsumoto, T., Koiwai, A., Mizusaki, S., Nishida, K., Noguchi, M. y Tamaki, E. (1972).** Liquid suspension culture of tobacco cells. En *Fermentation Technology Today*. Society of Fermentation Technology, Osaka. Editado por G. Terui. 689-695.
- Kawasaki, S. (1989).** Extensin secreted into the cultura médium by tobacco cells. *Plant and Cell Physiology*. 30: 259-265.
- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D. y Bohnert, H. J. (2001).** Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell*. 13: 889-905.
- Knight, H., Trewavas, A. J. y Knight, M. R., (1997).** Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant Journal*. 12: 1067-1078.
- Knox, J. P., Day, S. y Roberts, K. (1989).** A set of cell surface glycoproteins forms an early marker of cell position, but not cell type, in the root apical meristem of *Daucus carota* L. *Development*. 106: 47-56.
- Knox, J.P., Peart, J. y Neil, S. J. (1995).** Identification of novel cell surface epitopes using a leaf epidermal-strip assay system. *Planta*. 196: 266–270.
- Ko, J-H., Yang, S. H. y Han, K-H. (2006).** Upregulation of an *Arabidopsis* RING-H2 gene, *XERICO*, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. *The Plant Journal*. 47: 343-355.

- Kobayashi, M., MacMillan, J., Phinney, B., Gaskin, P., Spray, C. R. y Hedden, P. (2000).** Gibberellin biosynthesis: metabolic evidence for three steps in the early 13-hydroxylation pathway of rice. *Phytochemistry*. 55: 317-321.
- Koornneef, M. y van der Veen, J. H. (1980).** Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Theoretical and Applied Genetics*. 58: 257-263.
- Kranner, I., Minibayeva, F. V., Beckett, R. P. y Seal, C. E. (2010).** What is stress?. Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist*. 188: 655-673.
- Kreps, J. A., Wu, Y., Chang, H. S., Zhu, T., Wang, X. y Harper, J. F. (2002).** Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic and cold stress. *Plant Physiology*. 130: 2129-2141.
- Krikorian, A. D. y Berquam, D. L. (1969).** Plant cell and tissue cultures: the role of Haberlandt. *Botanical Review*. 35: 59-88.
- Krishnamurthy, K. V., Krishnaraj, R., Chozhavendan, R. y Christopher, F. S. (2000).** The program of cell death in plants and animals: a comparison. *Current Science*. 79: 1169–1181.
- Kumagai-Sano, F., Hayashi, T., Sano, T. y Hasezawa, S. (2006).** Cell cycle synchronization of tobacco BY-2 cells. *Nature Protocols*. 6: 2621-2627.
- Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z. M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangi, J. L., Bloom, R. E., Bodde, S., Jones, J. D. G. y Schroeder, J. I. (2003).** NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*. 22: 2623-2633.
- LaHaye, P. A. y Epstein, E. (1969).** Salt tolerance by plants: enhancement with calcium. *Science*. 166: 395-396.
- Lamport, D. T. A. y Kieliszewski, M. J. (2005).** Stress upregulates periplasmic arabinogalactan-proteins. *Plant Biosystems*. 139: 60-64.
- Lamport, D. T. A. y Varnai, P. (2013).** Periplasmic arabinogalactan glycoproteins act as a calcium capacitor that regulates plant growth and development. *New Phytologist*. 197: 58-64.
- Lamport, D. T. A., Kieliszewski, M. J. y Showalter, A. M. (2006).** Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function. *New Phytologist*. 169: 479-492.
- Lance, B., Reid, D. M. Y Thorpe, T. A. (1976).** Endogenous gibberellins and growth of tobacco callus cultures. *Physiologia Plantarum*. 36: 287-292.
- Langan, K. J. Y Nothnagel, E. A. (1997).** Cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to cell proliferation and viability. *Protoplasma*. 196: 87-89.

- Larcher, W. (1987). Strelß bei Pflanzen. *Naturwissenschaften*. 74: 158–167.
- Lee, Y., Choi, D. y Kende, H. (2001a). Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Current Opinion in Plant Biology*. 4: 527-532.
- Lee, D. H., Kim, Y. S. y Lee, C. B. (2001b). The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology*. 158: 737-745.
- Leidi, E. O., Barragán, V., Rubio, L., El-Hamdaoui, A., Ruiz, T., Cubero, B., Fernández, J. A., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., Quintero, F. J. y Pardo, J. M. (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *The Plant Journal*. 61: 495-506.
- Leshem, Y., Melamed-Book, N., Cagnac, O., Ronen, G., Nishri, Y., Solomon, M., Cohen, G. y Levine, A. (2006). Suppression of *Arabidopsis* vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences, USA*. 103: 18008-18013.
- Levitt, J. (1980). Responses of plant to environmental stresses. Vol. I. Academic Press, New York.
- Lichtenthaler, H. K., (1996). Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*. 148: 4-14.
- Lichtenthaler, H. K., (1998). The stress concept in plants: an introduction. En *Stress of life: from molecules to man*. Vol. 851. *Annals of New York Academy of Sciences*. Editado por Csermely, P. 187-198.
- Liu, J. y Zhu, J. K. (1997). An *Arabidopsis* mutant with increased calcium requirement for potassium nutrition and salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 94: 14960-14964.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C. S. y Zhu, J. K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 97: 3730-3734.
- Liu, L., Cui, F., Li, Q., Yin, B., Zhang, H., Lin, B., Wu, Y., Xia, R., Tang, S. y Xie, Q. (2011). The endoplasmic reticulum-associated degradation is necessary for plant salt tolerance. *Cell Research*. 21: 957-969.
- Liu, Y., Borchert, G. L., Surazynski, A., Hu, C. A. y Phang, J. M. (2006). Proline oxidase activates both intrinsic and extrinsic pathways for apoptosis: the role of ROS/superoxides, NFAT and MEK/ERK signaling. *Oncogene*. 25: 5640-5647.
- Liu, Z. Q., Gao, J., Dong, A. W. Y Shen, W. H. (2009). A truncated *Arabidopsis* nucleosome assembly protein 1, AtNAP1;3T, alters plant growth responses to abscisic acid and salt in the *Atnap1;3-2* mutant. *Molecular Plant*. 2: 688-699.

- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods*. 25:402-408.
- Lumba, S., Cutler, S. y McCourt, P. (2010).** Plant nuclear hormone receptors: a role for small molecules in protein–protein interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 26: 445-469.
- MacMillan, J. y Takahashi, N. (1968).** Proposed procedure for the allocation of trivial names to the gibberellins. *Nature*. 217: 170-171.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y. y Oda, K. (2004).** dwarf and delayed-flowering 1, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *The Plant Journal*. 37: 720-729.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y. y Oda, K. (2008).** The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellins deactivating gene, GA2ox7, under high-salinity stress in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 56: 613-626.
- Mahajan, S. y Tujeta, N. (2005).** Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 444: 139-158.
- Mano, J. (2002).** Early events in environmental stresses in plants. Induction mechanisms of oxidative stress. En *Oxidative Stress in Plants*. Taylor and Francis, London. Editado por Inzé, D. G. y Van Montagu, M. 217-246.
- Mansour, M. M. F. (1998).** Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 36: 767–772.
- Martí, M., Florez-Sarasa, I., Camejo, D., Ribas-Carbó, M., Lázaro, J. J., Sevilla, F. y Jiménez, A. (2011).** Response of mitochondrial thioredoxin PsTrxo1, antioxidant enzymes, and respiration to salinity in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany*. 62: 3863-3874.
- Martínez-Esteso, M. J., Sellés-Marchart, S., Vera-Urbina, J. C., Pedreño, M. A. y Bru-Martínez, R. (2011).** DIGE analysis of proteome changes accompanying large resveratrol production by grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to methyl- $\beta$ -cyclodextrin and methyl jasmonate elicitors. *Journal of Proteomics*. 74: 1421-1436.
- Maymon, I., Greenboim-Wainberg, Y., Sagiv, S., Kieber, J. J., Moshelion, M., Olszewski, N. y Weiss, D. (2009).** Cytosolic activity of SPINDLY implies the existence of a DELLA-independent gibberellin-response pathway. *The Plant Journal*. 58: 979–988.

- Mazel, A., Leshem, Y., Tiwari, B. S. y Levine, A. (2004).** Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiology*. 134: 118–128.
- McAinsh, M. R., Clayton, H., Mansfield, T. A. y Hetherington, A. M. (1996).** Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiology*. 111: 1031-1042.
- McCabe, P. F., Valentine, T. A., Forsberg, L. S. y Pennell, R. I. (1997).** Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. *The Plant Cell*. 9: 2225-2241.
- McCann, M. C., Shi, J., Roberts, K. y Carpita, N. C. (1994).** Changes in pectin structure and localisation during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells. *The Plant Journal*. 5: 773-785.
- McCully, M., Canny, M. J., Huang, C. X., Miller, C. y Brink, F. (2010).** Cryo-scanning electron microscopy (CSEM) in the advancement of functional plant biology: energy dispersive X-ray microanalysis (CDEX) applications. *Functional Plant Biology*. 37: 1011-1040.
- McGinnis, K. M., Thomas, S. G., Soule, J. D., Strader, L. C., Zale, J. M., Sun, T. P. y Steber, C. M. (2003).** The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell*. 15: 1120-1130.
- McNeil, M., Darvill, A. G., Fry, S. C. y Albersheim, P. (1984).** Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry*. 53: 625-663.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D. M. y Cosgrove, D. J. (1992).** Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell*. 4: 1425-1433.
- McQueen-Mason, S. y Cosgrove, D. J. (1995).** Expansin mode of action on cell walls: Analysis of wallhydrolysis, stress relaxation and binding. *Plant Physiology*. 107: 87–100.
- Merkle, T. (2011).** Nucleo-cytoplasmic transport of proteins and RNA in plants. *Plant Cell Reports*. 30: 153-176.
- Miller, G., Honig, A., Stein, H., Suzuki, N., Mittler, R. y Zilberstein, A. (2009).** Unraveling delta 1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*. 284: 26482-26492.
- Mimura, T., Kura-Hotta, M., Tsujimura, T., Ohnishi, M., Miura, M., Okazaki, Y., Mimura, M., Maeshima, M. y Washitani-Nemoto, S. (2003).** Rapid increase of vacuolar volume in response to salt stress. *Planta*. 216: 397-402.

- Mitsuhashi, N., Shimada, T., Mano, S., Nishimura, M. y Hara-Nishimura, I. (2000).** Characterization of organelles in the vacuolar-sorting pathway by visualization with GFP in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiology*. 41: 993-1001.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. y Van Breusegem, F. (2004).** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*. 9: 490-498.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M. y Guy, M. (2002).** Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum*. 115: 393-400.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M. y Guy, M. (2003).** Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant, Cell and Environment*. 26: 845-856.
- Miyazawa, Y., Nakajima, N., Abe, T., Sakai, A., Fujioka, S., Kawano, S., Kuroiwa, T. y Yoshida, S. (2003).** Activation of cell proliferation by brassinolide application in tobacco BY-2 cells: effects of brassinolide on cell multiplication, cell-cycle-related gene expression, and organellar DNA contents. *Journal of Experimental Botany*. 54: 2669-2678.
- Molina, C., Zaman-Allah, M., Khan, F., Fatnassi, N., Horres, R., Rotter, B., Steinhauer, D., Amenc, L., Drevon, J. J., Winter, P. y Kahl, G. (2011).** The salt responsive transcriptome of chickpea roots and nodules via deep-SuperSAGE. *BMC Plant Biology*. 11: 31.
- Moller, I. M. (2001).** Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 561-591.
- Munns, R. (2002).** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*. 25: 239-250.
- Munns, R. (2005).** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*. 167: 645-663.
- Munns, R., Husain, S., Rivelli, A. R., James, R. A., Condon, A. G., Lindsay, M. P., Lagudah, E. S., Schachtman, D. P. y Hare, R. A. (2002).** Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically-based selection traits. *Plant and Soil*. 247: 93-105.
- Munns, R., Greenway, H. y Kirst, G. O. (1983).** Halotolerant eukaryotes, En *Encyclopedia of Plant Physiology New Series, Vol. 12C. Physiological Plant Ecology III*. Berlin, Springer-Verlag. Editado por Lange, O. L., Nobel, P. S., Osmond, C. B. y Ziegler, H. 59-135.

- Munns, R. y Tester, M. (2008).** Mechanism of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 651-81.
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T. P. y Hakoshima, T. (2008).** Gibberellin- induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature*. 456: 459-463.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473–497.
- Murata, Y., Pei, Z. M., Mori, I. C. y Schroeder, J. I. (2001).** Abscisic acid activation of plasma membrane  $Ca^{2+}$  channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *The Plant Cell*. 13: 2513-2523.
- Nagata, T., Nemoto, Y. y Hasezawa, S. (1992).** Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology*. 132: 1-30.
- Nagata, T. y Kumagai, F. (1999).** Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. *Methods in Cell Science*. 21: 123-127.
- Nagata, T., Hasezawa, S. e Inzé, D. G. (2004a).** Tobacco BY-2 cells. En *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 53. Editado por Nagata, T., Lorz, H. y Widholm, J.M. Springer.*
- Nagata, T., Sakamoto, K. y Shimizu, T. (2004b).** Tobacco BY-2 cells: The present and beyond. *In vitro cellular & developmental biology-plant*. 40: 163-166.
- Nagy, Z. y Galiba, G. (1995).** Drought and salt tolerance are not necessarily linked: a study on wheat varieties differing in drought resistance under consecutive water and salinity stresses. *Journal of Plant Physiology*. 145:168-174.
- Nakano, R. T., Matsushima, R., Ueda, H., Tamura, K., Shimada, T., Li, L., Hayashi, Y., Kondo, M., Nishimura, M. y Hara-Nishimura, I. (2009).** GNOM-LIKE1/ERMO1 and SEC24a/ERMO2 are required for maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. 21: 3672-3685.
- Nakashima, T., Sekiguchi, T., Kuraoka, A., Fukushima, K., Shibata, Y., Komiyama, S. y Nishimoto, T. (1993).** Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1 whose defect causes apoptotic cell death in Hamster BHK21 cells. *Molecular and Cellular Biology*. 13: 6367-6374.
- Nambara, E. y Marion-Poll, A. (2005).** Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*. 56: 165-185.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. y Ehrhardt, W. (1988).** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear

- background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 9: 255-262.
- Nguema-Ona, E., Bannigan, A., Chevalier, L., Baskin, T. I., Driouich A. (2007).** Disruption of arabinogalactan proteins disorganizes cortical microtubules in the root of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 52: 240-251.
- Noctor, G., De Paepe, R. y Foyer, C. H. (2007).** Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*. 12: 125-134.
- Nothnagel, E. A. (1997).** Proteoglycans and related components in plant cells. *International Review of Cytology*. 174: 195–291.
- Nouri, M. Z., Hiraga, S., Yanagawa, Y., Sunohara, Y., Matsumoto, H. y Komatsu, S. (2012).** Characterization of calnexin in soybean roots and hypocotyls under osmotic stress. *Phytochemistry*. 74: 20-29.
- Nuccio, M. L., Rhodes, D., McNeil, S. D. y Hanson, A. D. (1999).** Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. 2: 128-134.
- Oh, D-H., Leidi, E., Zhang, Q., Hwang, S-M., Li, Y., Quintero, F. J., Jiang, X., D'Urzo, M. P., Lee, S. Y., Zhao, Y., Bahk, J. D., Bressan, R. A., Yun, D-J., Pardo, J. M. y Bohnert, H. J. (2009).** Loss of halophytism by interference with SOS1 expression. *Plant Physiology*. 151: 210-222.
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U. y Zhu, J. K. (2003).** A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 100: 11771-11776.
- Olmos, E., Hernández, J. A., Sevilla, F. y Hellín, E. (1994).** Induction of several antioxidant enzymes in the selection of a salt tolerant cell line of *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology*. 144: 594-598.
- Olmos, E. y Hellín, E. (1996a).** Cellular adaptation from a salt tolerant cell line of *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology*. 148: 727-734.
- Olmos, E. y Hellín, E. (1996b).** Mechanisms of salt tolerance in a cell line of *Pisum sativum*: biochemical and physiological aspects. *Plant Science*. 120: 37-45.
- Olmos, E. y Hellín, E. (1997).** Cytochemical localization of ATPase plasma membrane and acid phosphatase by cerium based in a salt-adapted cell line of *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany*. 48: 1529-1535.
- Olmos, E., Martínez-Solano, J. R., Piqueras, A. y Hellín, E. (2003).** Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *Journal of Experimental Botany*. 54: 291-301.
- Orlov, S. N., Thorin-Trescases, N., Kotelevtsev, S. V., Tremblay, J. y Hamet, P. (1999).** Inversion of the intracellular Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio blocks apoptosis in vascular

- smooth muscle at a site upstream of caspase-3. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 16545-16552.
- Osterlund, T. (2001).** Structure-function relationships of hormone-sensitive lipase. *European Journal of Biochemistry*. 268: 1899-1907.
- Ouyang, B., Yang, T., Li, H., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, J., Fei, Z. y Yei, Z. (2007).** Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis. *Journal of Experimental Botany*. 58: 507-520.
- Öztürk, Z. N., Talamé, V., Deyholos, M., Michalowski, C. B., Galbraith, D. W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R. y Bohnert, H. J. (2002).** Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought and salt stressed barley. *Plant Molecular Biology*. 48: 551-573.
- Pardo, J. M., Cubero, B., Leidi, E. O. y Quintero, F. J. (2006).** Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 57: 1181-1199.
- Parida, A. K., y Das, A. B. (2005).** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60: 324-349.
- Park, K-H., Fujisawa, S., Sakurai, A., Yamaguchi, I. y Takahashi, N. (1983).** Gibberellin production in cultured cells of *Nicotiana tabacum*. *Plant and Cell Physiology*. 24: 1241-1249.
- Park, K-H., Fujisawa, S., Sakurai, A., Yamaguchi, I. y Takahashi, N. (1984).** Changes in endogenous gibberellin contents during growth of cultured tobacco cells. *Plant and Cell Physiology*. 25: 1303-1306.
- Park, M., Lee, H., Lee, J. S., Byun, M. O. y Kim, B. G. (2009).** In planta measurement of Na<sup>+</sup> using fluorescent dye CoroNa Green. *Journal of Plant Biology*. 52: 298-302.
- Pastori, G. M. y Foyer, C. H. (2002).** Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology*. 129: 460-468.
- Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A. y York, W. S. (1999).** Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The Plant Journal*. 20: 629-639.
- Pei, Z. M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G. J., Grill, E. y Schroeder, J. I. (2000).** Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature*. 406: 731-734.
- Pelletier, S., Van Orden, J., Wolf, S., Vissenberg, K., Delacourt, J., Ndong, Y. A., Pelloux, J., Bischoff, V., Urbain, A., Mouille, G., Lemonnier, G., Renou, J.**

- P. y Höfte, H. (2010).** A role for pectin demethylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *New Phytologist*. 188: 726-739.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P. y Harberd, N. P. (1997).** The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes and Development*. 11: 3194-3205.
- Pennewiss, K., Mühling, K. H. y Sattelmacher, B. (1997).** Leaching from the leaf surface and its significance for apoplastic ion balance. En *Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment, Japan, Kluwer Academic Publisher*. Editado por Ando, T. y col. 87-88.
- Pesaresi, P., Masiero, S., Eubel, H., Braun, H. P., Bhushan, S., Glaser, E., Salamini, F. y Leister, D. (2006).** Nuclear photosynthetic gene expression is synergistically modulated by rates of protein synthesis in chloroplasts and mitochondria. *The Plant Cell*. 18: 970-991.
- Pessarakli, M. y Szabolcs, I. (1994).** Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. En *Handbook of Plant and Crop Stress*. Marcel Dekker, New York. Editado por Pessarakli, M. 1-15.
- Phillips, A. L. y Huttly, A. K. (1994).** Cloning of two gibberellin regulated cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by subtractive hybridization: expression of the tonoplast water channel  $\gamma$ -TIP is increased by GA3. *Plant Molecular Biology*. 24: 603-615.
- Phillips, A. L., Ward, D. A., Uknes, S., Appleford, N. E. J., Lange, T., Huttly, A. K., Gaskin, P., Graebe, J. E. y Hedden, P. (1995).** Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 108: 1049-1057.
- Piqueras, A., Olmos, E. y Hellín, E. (1994).** Cytological changes related with salt tolerance in embryogenic callus of *Citrus limon*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 39: 13-18.
- Piqueras, A., Hernández, J. A., Olmos, E., Sevilla, F. y Hellín, E. (1996).** Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of *Citrus* cells to salt stress. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 45: 53-60.
- Piqueras, A., Olmos, E., Martínez-Solano, J. R. y Hellín, E. (1999).** Cd-induced oxidative burst in tobacco BY2 cells: time course, subcellular location and antioxidant response. *Free Radical Research*. 31: 33-38.
- Pitman, M. G. y Läuchli, A. (2002).** Global impact of salinity and agricultural ecosystems. En *Salinity: Environment–Plants–Molecules*. The Netherlands.

- Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Editado por Läuchli, A. y Lüttge, U.* 3-20.
- Plackett, A. R. G., Powers, S. J., Fernández-García, N., Urbanova, T., Takebayashi, Y., Seo, M., Jikumaru, Y., Benlloch, R., Nilsson, O., Ruiz Rivero, O., Phillips, A. L., Wilson, Z. A., Thomas, S. G. y Hedden, P. (2012).** Analysis of the developmental roles of the *Arabidopsis* gibberellin 20-oxidases demonstrates that *GA20ox1*, -2, and -3 are the dominant paralogs. *The Plant Cell*. 24: 941-960.
- Plackett, A. R. G., Thomas, S. G., Wilson, Z. A. y Hedden, P. (2011).** Gibberellin control of stamen development: a fertile field. *Trends in Plant Science*. 16: 568-578.
- Pokotylo, I. V., Kretinin, S. V. y Kravets, V. S. (2012).** Role of phospholipase D in metabolic reactions of transgenic tobacco *cax1* cells under the influence of salt stress. *Cytology and Genetics*. 46: 131-135.
- Pysh, L. D., Wysocka-Diller, J. W., Camilleri, C., Bouchez, D., y Benfey, P. N. (1999).** The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant Journal*. 18: 111-119.
- Qi, X., Behrens, B. X., West, P. R. y Mort, A. J. (1995).** Solubilization and partial characterization of extension fragments from cell walls of cotton suspension cultures: evidence for a covalent cross-link between extension and pectin. *Plant Physiology*. 108: 1691-1701.
- Qin, Y., Chen, D. y Zhao, J. (2007).** Localization of arabinogalactan proteins in anther, pollen and pollen tube of *Nicotiana tabacum* L. *Protoplasma*. 231: 43-53.
- Qin, X. Q. y Zeevaart, J. A. D. (2002).** Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiology*. 128: 544-551.
- Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y., Shang, M., Chen, S., Pardo, J. M. y Guo, Y. (2007).** SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *Plant Cell*. 19: 1415-1431.
- Rademacher, W. (2000).** Growth retardants: effects on gibberellins biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51: 501-531.

- Raeymaekers, T., Potters, G., Asard, H., Guisez, Y. y Horemans, N. (2003).** Copper-mediated oxidative burst in *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 cell suspension cultures. *Protoplasma*. 221: 93-100.
- Rai, M.K., Kalia, R.K., Singh, R., Gangola, M. P. y Dhawan, A. K. (2011).** Developing stress tolerant plants through in vitro selection - An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*. 71: 89-98.
- Ramírez, H., Peralta-Manjarrez, R. M., Benavides-Mendoza, A., Sánchez-López, A., Robledo-Torres, V., Hernández-Davila, J. (2005).** Efectos de prohexadiona-Ca en tomate y su relación con la variación de la concentración de giberelinas y citocininas. *Chapingo. Serie Horticultura*. 11: 283-290.
- Rayle, D. L. y Cleland, R. E. (1992).** The acid growth theory of auxin- induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*. 99: 1271–1274.
- Rhodes, D., Nadolska-Orczyk, A. y Rich, P. (2002).** Salinity, osmolytes and compatible solutes. En *Salinity: Environment-Plants-Molecules. The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Editado por Läuchli, A. y Lüttge, U.* 181-204.
- Ricardo, R. y Phelan, K. (2008).** Counting and determining the viability of cultured cells. *Journal of Visualized Experiments*. 16: 752.
- Richards, D. E., King, K. E., Ait-ali, T. y Harberd, N.P. (2001).** How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 67-88.
- Rilke, S. y Reimann, C. (1996).** Morphological and ecophysiological differences between the subspecies of *Salsola kali* L. in Europe: results of culture experiments. *Flora*. 191: 363-376.
- Rodríguez-Martín, M. D. y Nicolás Rodríguez, C. (2004).** Metabolismo y Modo de Acción de Fitohormonas. Universidad de Salamanca. Ediciones Universidad de Salamanca.
- Rodríguez-Navarro, A. (2000).** Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1469: 1-30.
- Roemmelt, S., Fischer, T. C., Halbwirth, H., Peterek, S., Schlangen, K., Speakman, J. B., Treutter, D., Forkmann, G. y Stich, K. (2003).** Effect of dioxigenase inhibitors on the resistance-related flavonoid metabolism of apple and pears: chemical, biochemical and molecular biological aspects. *European Journal of Horticultural Science*. 68: 129-136.

- Romero, C., Cutanda, M. C., Cortina, C., Primo, J. y Culiáñez-Macià, F. A. (2002). Plant environmental stress response by trehalose biosynthesis. *Current Topics in Plant Biology*. 3: 73-88.
- Roppolo, D., DeRybel, B., Tendon, V. D., Pfister, A., Alassimone, J., Vermeer, J. E., Yamazaki, M., Stierhof, Y. D., Beeckman, T. y Geldner, N. (2011). A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature*. 473: 380-383.
- Ross, J. J., Reid, J. B. y Dungey, H. S. (1992). Ontogenetic variation in levels of gibberellin A1 in *Pisum*. Implications for the control of stem elongation. *Planta*. 186: 166-171.
- Ross, J. J., Reid, J. B., Swain, S. M., Hasan, O., Poole, A. T., Hedden, P. y Willis, C. (1995). Genetic regulation of gibberellin deactivation in *Pisum*. *Plant Journal*. 7: 513-523.
- Rumyantseva, N. I. (2005). Arabinogalactan proteins: involvement in plant growth and morphogenesis. *Biochemistry*. 70: 1073-1085.
- Rushton, P. J., Bokowiec, M. T., Han, S. C., Zhang, H. B., Brannock, J. F., Chen, X. F., Laudeman, T. W. y Timko, M. P. (2008). Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the Solanaceae. *Plant Physiology*. 147: 280-95.
- Rushton, D. L., Tripathi, P., Rabara, R. C., Lin, J., Ringler, P., Broken, A. K., Langum, T. J., Smidt, L., Boomsma, D. D., Emme, N. J., Chen, X., Finer, J. J., Shen, Q. X. J. y Rushton, P. J. (2012). WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. *Plant Biotechnology Journal*. 10: 2-11.
- Sabba, R. P., Durso, N. A. y Vaughn, K. C. (1999). Structural and immunocytochemical characterization of the walls of dichlobenil-habituated BY-2 tobacco cells. *International Journal of Plant Sciences*. 160: 275-290.
- Sakamoto, T., Miura, K., Itoh, H., Tatsumi, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Agrawal, G. K., Takeda, S., Abe, K., Miyao, A., Hirochika, H., Kitano, H., Ashikari, M. y Matsuoka, M. (2004). An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiology*. 134: 1642-1653.
- Samaj, J., Braun, M., Baluska, F., Ensikat, H. J., Tsumuraya, Y. y Volkmann, D. (1999). Specific localization of arabinogalactan-protein epitopes at the surface of maize root hairs. *Plant and Cell Physiology*. 40: 874-883.
- Samaj, J., Samajova, O., Baluska, E., Lichtscheidl, I., Knox, J. P. y Volkmann, D. (2000). Immunolocalization of LM2 arabinogalactan protein epitope associated with endomembranes of plant cells. *Protoplasma*. 212:186-196.

- Sanders, D., Boeownlee, C. y Harper, J. F. (1999).** Communicating with calcium. *The Plant Cell*. 11: 691-706.
- Sano, T., Kuraya, Y., Amino, S. y Nagata, T. (1999).** Phosphate as a limiting factor for the cell division of tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology*. 40: 1-8.
- Sardar, H. S., Yang, J. y Showalter, A. M. (2006).** Molecular interactions of arabinogalactan-proteins (AGPs) with cortical microtubules and F-actin in bright yellow-2 (BY-2) tobacco cultured cells. *Plant Physiology*. 142: 1469-1479.
- Schachtman, D. y Liu, W. (1999).** Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends in Plant Science*. 4: 281-287.
- Schleiden, M. J. (1838).** Beiträge zur Phytogenesis. *Archives for Anatomy and Physiology. Müller's Archives*. 5: 137-176.
- Schömburg, F. M., Bizzell, C. M., Lee, D. J., Zeevaart, J. A. y Amasino, R. M. (2003).** Overexpression of a novel class of gibberellins 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *The Plant Cell*. 15: 151-163.
- Schultz, C., Gilson, P., Oxley, D., Youl, J. y Bacic, A. (1998).** GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. *Trends in Plant Science*. 3: 426-431.
- Schwann, T. (1839).** Mikroskopische Untersuchungen über die Ü bereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum des Thiere und Pflanzen. *W. Engelmann: Leipzig* 176.
- Seifert, G. J. y Roberts, K. (2007).** The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology*. 58: 137-161.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. y Shinozaki, K. (2002).** Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold, and high salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal*. 31: 279-292.
- Selye, H. (1936).** A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 138: 32-34.
- Selye, H. (1956).** The Stress of life. New York, USA. McGraw-Hill.
- Serrano, R. (1996).** Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *International Review of Cytology*. 165: 1-52.

- Serrano, R. (2002).** Halotolerance genes in yeast. En *Salinity: Environment-Plants-Molecules. The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Editado por Läuchli, A. y Lüttge, U.* 491-504.
- Servet, C., Ghelis, T., Richard, L., Zilberstein, A. y Savoure, A. (2012).** Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis. *Frontiers in Bioscience.* 17: 607-620.
- Sha Valli Khan, P. S., Hoffman, L., Renaut, J. y Housman, J. F. (2007).** Current initiatives in proteomics for analysis of plant salt tolerance. *Current Science.* 93: 807-817.
- Shabala, S. (2009).** Salinity and programmed cell death: unravelling mechanisms for ion specific signaling. *Journal of Experimental Botany.* 60: 709-712.
- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T. A., Smith, S. J., Miller, A. J., Davies, J. M. y Newman, I. A. (2006).** Extracellular  $Ca^{2+}$  ameliorates NaCl-induced  $K^+$  loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane  $K^+$ -permeable channels. *Plant Physiology.* 141: 1653-1665.
- Shabala, S. y Cuin, T. A. (2008).** Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum.* 133: 651-669.
- Sharma, P. y Dubey, R. S. (2005).** Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *Journal of Plant Physiology.* 162: 854-864.
- Shelden, M. C. y Roessner, U. (2013).** Advances in functional genomics for investigating salinity stress tolerance mechanisms in cereals. *Frontiers in Plant Science.* 4: 123.
- Shi, H. Z., Quintero, F. J., Pardo, J. M. y Zhu, J. K. (2002).** The putative plasma membrane  $Na^+/H^+$  antiporter SOS1 controls long-distance  $Na^+$  transport in plants. *Plant Cell.* 14: 465-477.
- Shi, H. Z., Kim, Y., Guo, Y., Stevenson, B. Y Zhu, J. K. (2003).** The *Arabidopsis* SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *Plant Cell.* 15: 19-32.
- Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., Kato, H. y Matsuoka, M. (2008).** Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature.* 456: 520-523.
- Shin, R. y D. P. Schachtman. (2004).** Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 101: 8827-8832.
- Showalter, A. M. (1993).** Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell.* 5: 9-23.

- Showalter, A. M. (2001).** Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58: 1399-1417.
- Silberbush, M. y Ben-Asher, J. (2001).** Simulation study of nutrient uptake by plantas from soilless cultures as affected by salinity buildup and transpiration. *Plant and soil*. 233: 59-69.
- Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N. y Sun, T. P. (1998).** The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction-pathway. *The Plant Cell*. 10: 155-69.
- Silverstone, A. L., Jung, H. S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y. y Sun, T. P. (2001).** Repressing a repressor: gibberellins-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 13: 1555-1565.
- Silverstone, A. L., Tseng, T. S., Swain, S. M., Dill, A., Jeong, S. Y., Olszewski, N.E. y Sun, T. P. (2007).** Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 143: 987-1000.
- Singh, N. K., Handa, A. K., Hasegawa, P. M. y Bressan, R. A. (1985).** Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl, *Plant Physiology*. 79: 126-137.
- Smalle, J., Haegman, M., Kurepa, J., VanMontagu, M. y VanderStraeten, D. (1997).** Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Proceedings of the National Academic of Sciences, USA*. 94: 2756-2761.
- Smallwood, M., Yates, E. A., Willats, W. G. T., Martin, H. y Knox, J. P. (1996).** Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. *Planta*. 198: 452-459.
- Smekens, M. J. y Vantienderen, P. H. (2001).** Genetic variation and plasticity of *Plantago coronopus* under saline conditions. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology*. 22: 187-200.
- Sobhanian, H., Aghaei, K. y Komatsu, S. (2011).** Changes in the plant proteome resulting from salt stress: toward the creation of salt-tolerance crops?. *Journal of Proteomics*. 74: 1323-1337.
- Sokol, A., Kwiatkowska, A., Jerzmanowski, A. y Prymakowska-Bosak, M. (2007).** Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and *Arabidopsis* cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications. *Planta*. 227: 245-254.
- Song, N. H., Fujioka, S., Kamiya, Y., Sakurai, A. y Liu, J. R. (1991).** Gibberellin A<sub>12</sub> is converted to gibberellins A<sub>53</sub> in cultured cells of *Nicotiana tabacum* and *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Physiology*. 32: 783-789.

- Sponsel, V. y Hedden, P. (2004).** Gibberellin biosynthesis and inactivation. En *Plant Hormones: biosynthesis, signal transduction, action. Capítulo 2. The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Editor Davies, P. J.* 63-94.
- Spray, C. R., Kobayashi, M., Suzuki, Y., Phinney, B. O., Gaskin, P. y Macmillan, J. (1996).** The dwarf-1 (*d1*) mutant of *Zea mays* blocks 3 steps in the gibberellins-biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academic of Sciences, USA.* 93: 10515-10518.
- Spurr, A. R. (1969),** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research.* 26: 31-43.
- Spychalla, J. P. y Desborough, S. L. (1990).** Superoxide dismutase, catalase and alpha-tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiology.* 94: 1214-1218.
- Sreenivasulu, N., Miranda, M., Prakash, H. S., Wobus, U. y Weschke, W. (2004).** Transcriptome changes in foxtail millet genotypes at high salinity: identification and characterization of a PHGPX gene specifically upregulated by NaCl in salt tolerant line. *Journal of Plant Physiology.* 161: 467-477.
- Sreenivasulu, N., Sopory, S. K. y Kishor, P. B. K. (2007).** Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene.* 388: 1-13.
- Srivastava, M. y Dwivedi, U. (1998).** Salicylic acid modulates glutathione metabolism in pea seedlings. *Journal of Plant Physiology.* 153: 409-414.
- Stelzer, R., Kuo, J. y Koyro, H. W. (1988).** Substitution of Na<sup>+</sup> by K<sup>+</sup> in tissues and root vacuoles of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Aramir). *Journal of Plant Physiology.* 132: 671-677.
- Street, H. E. (1977).** Cell (suspension) cultures techniques. En *Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publishing. Oxford, England. Editado por Street H. E.* 61-102.
- Strizhov, N., Abraham, E., Okresz, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C. y Szabados, L. (1999).** Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during saltstress requires ABA and is regulated by *ABA1*, *ABI1* and *AXR2* in *Arabidopsis*. *The Plant Journal.* 12: 557-569.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. y Miller, G. (2012).** ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment.* 35:259-270.
- Swords, K. M. M. y Staehelin, L. A. (1993).** Complementary immunolocalization patterns of cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins studied with the use of

- antibodies directed against different carbohydrate residues. *Plant Physiology*. 102: 891-901.
- Szabados, L. y Savouré, A. (2010).** Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 15: 89-97.
- Szabados, L., Kovacs, H., Zilberstein, A. Y Bouchereau, A. (2011).** Plants in extreme environments: Importance of protective compounds in stress tolerance. *Advances in Botanical Research*. 57: 105-150.
- Sze, H., Li, X. y Palmgren, M. G. (1999).** Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup> pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *The Plant Cell*. 11: 677-689.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006).** Paredes celulares: estructura, biogénesis y expansión. En *Fisiología Vegetal. Volumen 2. Unidad 3: Crecimiento y desarrollo. Publicacions de la Universitat Jaume I. Castelló de la Plana*.
- Taji, T., Seki, M., Satou, M., Sakurai, T., Kobayashi, M., Ishiyama, K., Narusaka, Y., Narusaka, M., Zhu, J. K. y Shinozaki, K. (2004).** Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis* related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiology*. 135: 1697-1709.
- Talón, M. (2000).** Giberelinas. En *Fundamentos de Fisiología Vegetal. Interamericana Mc Graw Hill. Barcelona, España. Editores Azcón-Bieto, J. y Talón, M.* 325-341.
- Tan, Li., Showalter, A. M., Egelund, J., Hernández-Sánchez, A., Doblin, M. S. y Bacic, A. (2012).** Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans. *Frontiers in Plant Science*. Vol. 3. Art. 140.
- Tester, M. y Davenport, R. (2003).** Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of Botany*. 91: 503-527.
- Thierry, L., Leprince, A. S., Lefebvre, D., Ghars, M. A., Debarbieux, E. y Savouré, A. (2004).** Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 14812-14818.
- Thomas, S. G., Phillips, A. L. y Hedden, P. (1999).** Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellins deactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 96: 4698-4703.
- Thomas, S. G., Rieu, I., y Steber, C. M. (2005).** Gibberellin metabolism and signaling. En *Vitamins and Hormones. Elsevier, London. Editado por Litwack, G.* 289-337.
- Torres, M. A. (2010).** ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*. 138: 414-429.
- Torres, M. A., Jones, J. D. y Dangl, J. L. (2006).** Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*. 141: 373-378.

- Trono, D., Flagella, Z., Laus, M. N., Di Fonzo, N. y Pastore, D. (2004). The uncoupling protein and the potassium channel are activated by hyperosmotic stress in mitochondria from durum wheat seedlings. *Plant, Cell and Environment*. 27: 437-448.
- Tujeta, N. (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in Enzymology*. 428: 419-438.
- Türkan, I. y Demiral, T. (2009). Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 67: 2-9.
- Ubeda-Tomás, S., Swarup, R., Coates, J., Swarup, K., Laplaze, L., Beemster, G.T., Hedden, P., Bhalerao, R. y Bennett, M. J. (2008). Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nature Cell Biology*. 10: 625-628.
- Udvardi, M. K., Kakar, K., Wandrey, M., Montanari, O., Murray, J., Andriankaja, A., Zhang, J. Y., Benedito, V., Hofer, J. M. I., Chueng, F. y Town, C. D. (2007). Legume transcription factors: Global regulators of plant development and response to the environment. *Plant Physiology*. 144: 538-549.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T. Y., Hsing, Y. I., Kitano, H., Yamaguchi, Y. y Matsuoka, M. (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*. 437: 693-698.
- Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Motoyuki, A. y Matsuoka, M. (2007). Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 58: 183-98.
- Uemura, T., Ueda, T., Ohniwa, R. L., Nakano, A., Takeyasu, K. y Sato, M. H. (2004). Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Structure and Function*. 29: 49-65.
- Ulm, R., Baumann, A., Oravec, A., Máté, Z., Adám, E., Oakeley, E. J., Schäfer, E. y Nagy, F. (2004). Genome wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 101: 1397-1402.
- Unrath, C. R. (1999). Prohexadione-Ca: a promising chemical for controlling vegetative growth of apples. *Horticultural Science*. 34: 1191-1200.
- van Aken, O., Zhang, B., Carrie, C., Uggalla, V., Paynter, E., Giraud, E. y Whelan, J. (2009). Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*. 2: 1310-1324.
- van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A. M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L.

- A., Petersen, M., Smertenko, A., Taliansky, M., Van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhivotovsky, B. y Bozhkov, P. V. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*. 18: 1241-1246.
- van Gisbergen, P. A. C., Esseling, A. y Vos, J. W. (2008). Microinjecting FM4-64 validates it as a marker of the endocytic pathway in plants. *Journal of Microscopy*. 231: 284-290.
- van Wijk, K. J. (2001). Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiology*. 126: 501-508.
- Vasil, I. K. (2008). A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*. 27: 1423-1440.
- Vasil, V. y Hildebrandt, A. C. (1965a). Growth and tissue formation from single, isolated tobacco cells in microculture. *Science*. 147: 1454–1455.
- Vasil, V. y Hildebrandt, A. C. (1965b). Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. *Science*. 150: 889–892.
- Vasil, V. y Hildebrandt, A. C. (1967). Further studies on the growth and differentiation of single, isolated cells of tobacco in vitro. *Planta*. 75: 139–151.
- Velasquez, S. M., Ricardi, M. M., Dorosz, J. G., Fernández, P. V., Nadra, A. D., Pol-Fachin, L., Egelund, J., Gille, S., Harholt, J., Ciancia, M., Verli, H., Pauly, M., Bacic, A., Olsen, C. E., Ulvskov, P., Petersen, B. L., Somerville, C., Iusem, N. D. y Estevez, J. M. (2012). O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science*. 332: 1401-1403.
- Vidal, A. M., Gisbert, C., Talón, M., Primo-Millo, E., López-Díaz, I. y García-Martínez, J. L. (2001). The ectopic over-expression of a citrus gibberellin 20-oxidase enhances the non-13-hydroxylation pathway of gibberellins biosynthesis and induces an extremely elongated phenotype in tobacco. *Physiology Plantarum*. 112: 251-260.
- Vinocur, B. y Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*. 16: 123-132.
- Wagley, L. M., Galdelfer, H. J. y Phillips, G. C. (1987). De novo shoot organogenesis of *Pinus elliottii* Mill. in vitro II. Macro- and micro-photographic evidence of de novo regeneration. *Plant Cell Reports*. 6: 167-171.
- Walia, H., Wilson, C., Condamine, P., Liu, X., Ismail, A. M., Zeng, L. H., Wanamaker, S. I., Mandal, J., Xu, J., Cui, X. P. y Close, T. J. (2005). Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under

- salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiology*. 139: 822-835.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. y Altman, A. (2004).** Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*. 9: 244-252.
- Wang, J., Li, X., Liu, Y. y Zhao, X. (2010).** Salt stress induces programmed cell death in *Thellungiella halophila* suspension-cultured cells. *Journal of Plant Physiology*. 167: 1145-1151.
- Wei, W., Yang, C., Luo, J., Lu, C., Wu, Y. e Yuan, S. (2010).** Synergism between cucumber alpha-expansin fungal endoglucanase and pectin lyase. *Journal of Plant Physiology*. 167: 1204-1210.
- Willats, W. G. T. y Knox, J. P. (1996).** A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of  $\beta$ -glucosil Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 9: 919-925.
- Winkler, V. W. (1997).** Reduced risk concept for prohexadione-calcium, a vegetative growth control plant growth regulator in apples. *Acta Horticulturae*. 451:667-671.
- Wise, R. R. y Naylor, A. W. (1987).** Chilling-enhanced photooxidation: evidence for the role of singlet oxygen and endogenous antioxidants. *Plant Physiology*. 83: 278-282.
- Wolf, S., Hématy, K. y Höfte, H. (2012).** Growth control and cell wall signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 63: 381-407.
- Wong, S. H. Y., Knight, J. A., Hopfer, S. M., Zaharia, O., Leach, Ch. N. y Sunderman, F. W. (1987).** Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry*. 33: 214-220.
- Wood N. T. (2001).** Apoptosis: a way of life for plants?. *Trends in Plant Science*. 6: 451-452.
- Woodson, J. D. y Chory, J. (2008).** Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nature Reviews Genetics*. 9: 383-395.
- Wu, S. J., Ding, L. y Zhu, J. K. (1996).** SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *The Plant Cell*. 8: 617-627.
- Yamaguchi, S. (2008).** Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plan Biology*. 59: 225-251.
- Yamaguchi, S. y Kamiya, Y. (2000).** Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiology*. 41: 251-257.

- Yariv, J., Rapport, M. M. y Graf, L. (1962).** The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochemical Journal*. 85: 383-388.
- Yates, E. A., Valdor, J. F., Haslam, S. M., Morris, H. R., Dell, A., Mackie, W. y Knox, J. P. (1996).** Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology*. 6: 131-139.
- Yoshida, Y., Aoki, C., Iuchi, S., Nanjo, T., Seki, M., Sekiguchi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2001).** Characterization of four extensin genes in *Arabidopsis thaliana* by differential gene expression under stress and non-stress conditions. *DNA Research*. 8: 115-122.
- Zagorchev, L. y Odjakova, M. (2011).** Hydroxyproline rich proteins in salt adapted embryogenic suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 25: 2321-2328.
- Zang, A. P., Xu, X. J., Neill, S. y Cai, W. M. (2010).** Overexpression of OsRAN2 in rice and *Arabidopsis* renders transgenic plants hypersensitive to salinity and osmotic stress. *Journal of Experimental Botany*. 61: 777-789.
- Zechmann, B., Mauch, F., Sticher, L. y Muller, M. (2008).** Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *Journal of Experimental Botany*. 59: 4017-4027.
- Zechmann, B., Stumpe, M. y Mauch, F. (2011).** Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta*. 233: 1-12.
- Zentella, R., Zhang, Z. L., Park, M., Thomas, S. G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C. M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y. y Sun, T. P. (2007).** Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellins signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 19: 3037-3057.
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J. y Wang, X. (2004).** Phospholipase D $\alpha$ 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 22: 9508-9513.
- Zhang, X., Dong, F. C., Gao, J. F. y Song, C. P. (2001a).** Hydrogen peroxide-induced changes in intracellular pH of guard cells precede stomatal closure. *Cell Research*. 11: 37-43.
- Zhang, X., Miao, Y. C., An, G. Y., Zhou, Y., Shangguan, Z. P., Gao, J. F. y Song, C. P. (2001b).** K<sup>+</sup> channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in *Vicia* guard cells. *Cell Research*. 11: 195-202.

- Zhang, X., Zhang, L., Dong, F., Gao, J., Galbraith, D. W. y Song, C. P. (2001c).** Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology*. 126: 1438-1448.
- Zhang, H. X. y Blumwald, E. (2001d).** Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology*. 19: 765-768.
- Zhang, H., Han, B., Wang, T., Chen, S., Li, H., Zhang, Y. y Dai, S. (2012).** Mechanisms of plant salt response: insights from proteomics. *Journal of Proteome Research*. 11: 49-67.
- Zhou, S., Wei, S., Boone, B. y Levy, S. (2007).** Microarray analysis of genes affected by salt stress in tomato. *African Journal of Environment Science and Technology*. 1:14-26.
- Zhu, J. K. (2002).** Salt and drought signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 53: 247-273.
- Zhu, J. K. (2003).** Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 441-445.
- Zhu, J. K. (2007).** Plant salt stress. En *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester.
- Zhu, J. K., Bressan, R. y Hasegawa, P. (1993).** Loss of arabinogalactan-proteins from the plasma membrane of NaCl-adapted tobacco cells. *Planta*. 190: 221-226.
- Ziegler, H. y Lutge, U. (1967).** Die saltzdrüsen von *Limonium vulgare*. II. Mitteilung die lokalisierung des chlorids. *Planta*. 74: 1-17.
- Zörb, C., Geilfus, C. M., Mühlring, K. H. y Ludwig-Müller, J. (2013).** The influence of salt stress on ABA and auxin concentrations in two maize cultivars differing in salt resistance. *Journal of Plant Physiology*. 170: 220-224.
- Zupini, A., Gerotto, C. Y Baldan, B. (2010).** Programmed cell death and adaptation: two different types of abiotic stress response in a unicellular chlorophyte, *Plant and Cell Physiology*. 51: 884-895.