

UNIVERSIDAD DE MURCIA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Implicación de las Giberelinas y el Metabolismo del Nitrógeno en la Respuesta al Estrés Salino en Plantas de Tomate (Solanum Lycopersicum L.)

> D^a Enas Abdalla Bardisi Ahmad 2015





Implicación de las giberelinas y el metabolismo del nitrógeno en la respuesta al estrés salino en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Tesis Doctoral

D^a. Enas Abdalla Bardisi Ahmad

Directores de la Tesis

Dr. Enrique Manuel Olmos Aranda

Dra. María Nieves Fernández García





D. Manuel Acosta Echevarría , Catedrático de Universidad del Área de Fisiología Vegetal en el Departamento de Biología Vegetal, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Implicación de las giberelinas y el metabolismo del nitrógeno en la respuesta al estrés salino en plantas de tomate (Solanum lycopersicum L.)", realizada por D^a. Enas Abdalla Bardisi, en el Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), bajo la dirección del D. Enrique Manuel Olmos Aranda y Dña. Maria Nieves Fernández García, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 3, de diciembre de 2015





MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD



NIEVES FERNÁNDEZ GARCÍA, INVESTIGADORA RAMÓN Y CAJAL DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, CON DESTINO EN EL CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA APLICADA DEL SEGURA.

AUTORIZA:

A Dña. Enas Abdalla Bardisi, para que presente la tesis Doctoral cuyo título es: "Implicación de las giberelinas y el metabolismo del nitrógeno en la respuesta al estrés salino en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*)." Realizada bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Y para que conste, firmo el presente informe en Murcia, a 3 de diciembre de dos mil quince.

105

Fdo. Nieves Fernández García



MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD



ENRIQUE MANUEL OLMOS ARANDA, INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, CON DESTINO EN EL CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA APLICADA DEL SEGURA.

AUTORIZA:

A Dña. Enas Abdalla Bardisi, para que presente la tesis Doctoral cuyo título es: "Implicación de las giberelinas y el metabolismo del nitrógeno en la respuesta al estrés salino en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*)." Realizada bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Y para que conste, firmo el presente informe en Murcia, a 3 de diciembre de dos mil quince.

Fdo. Enrique Olmos Aranda

AGRADECIMIENTOS

Llegado este momento echo la vísta atrás y los recuerdos se agolpan en mí mente. La realización del trabajo presentado en esta memoria ha sido posible gracias a la ayuda desinteresada de muchas personas que durante estos últimos cuatro años han confiado en mí y que de manera directa e indirecta han hecho posible que este trabajo se pueda llevar a cabo.

Antes que nada, dar las GRACIAS a **ALLAH**, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de este estudio.

GRACIAS a mís directores de tesis, el Dr. Enríque Olmos Aranda y la Dra. María Nieves Fernández García, por qué me hayan abierto las puertas de su grupo de investigación dándome la oportunidad de tener una visión más amplia del mundo de la investigación, por su dirección y apoyo durante estos años y por todo lo que me han enseñado para sacar adelante este trabajo, por lo mucho que he disfrutado trabajando con ellos, y que no sólo me han enseñado ciencia, sino que también se han preocupado de que estuviera "como en casa" desde el primer día.

Al catedrático **Manuel Acosta Echeverría**, por su tutoría en la Universidad de Murcia. Al **Dr. José Salvador Rubio Asensio** por su experiencia y por todo lo que me ha enseñado, por sus consejos, y por confiar y creer en mi capacidad para finalizar este trabajo.

A mi compañero de laboratorio **Jesús García de la Garma**, le agradezco todo lo que he aprendido trabajando junto a él y el haber sido compañero y guía indiscutible de mis primeros pasos, por todo lo que me ha enseñado dentro y fuera del ámbito científico y por su apoyo incondicional. GRACIAS.

A la **Dra. Carmen López Berenguer**, por ofrecerme su amístad y por su apoyo.

Al Dr. José Antonio Hernández Cortes y a su grupo, Pedro, María José y Gregorio, así como al Dr. Abel Piqueras Castillo, quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento y alegrías durante mi estancia en el CEBAS.

A **José Ramón Rodríguez**, gracías por tus consejos, por preocuparte por mí y por supuesto por tus chistes. No voy a olvidar de decírte buenos días cada mañanas desde Egipto, ¡sí no!

A todos mís amigos del CEBAS; Félix, Lydia, Mohamed, Jorge, Ascensión, Carlos, Belén, Irene, Muna, Osama, Sandra, Ana Ortíz, Aingueru, Marga, Juan Francisco, Vito, Pascual, Adriana, Juan, Elena y a todos los que no nombro porque son muchísimos, por su apoyo y conocimientos y los que a lo largo de esta etapa compartieron conmigo penas y alegrías e hicieron de esta experiencia una de las más especiales. Os echaré mucho de menos. A todos mis compañeros y amigos; en mi país, **Egípto** y en mi segundo país, **España** y a todas aquellas personas que de una manera u otra han contribuido para el logro de mis objetivos, gracías por vuestra amistad y por estar siempre ahí.

A mis amigos de otros países árabes que conocí en España, especialmente Fatima Al-Zahra, Insaf, Mariam, Hakima, Nagla, Manal El-Bajta, Ismahen, Mohamed Batnini, Hisham, Munia, Manal & Anis, Shokri, Nader, Yousef y otros más, gracías por los momentos agradables que hemos pasado juntos.

A todos **mís profesores** de mí carrera, y claro mís profesores de toda mí vída, gracías porque de alguna manera forman parte de lo que soy hoy.

Mi profundo agradecimiento y sentido a mi familia, especialmente **mis padres** (mis súper héroes), **Abdalla y Shokria**, mi fuente de apoyo constante e incondicional en toda mi vida y más aún en mis años de carrera profesional. GRACIAS por vuestro amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias por vuestros sabios consejos y gracias por haber creido siempre en que seré capaz y siempre orgullosos de mi. Gracias a **mis hermanos; Samar, Ahmed, Samaa y Omar** por preocuparse por su hermana mayor y por los grandes lotes de felicidad y de diversas emociones que siempre me han causado. Y claro que no me olvido de tí, **mi sobrina Farida**, la niña más cariñosa de todo el mundo, gracias por cuidarte de tu primo Muaz y enseñarle como bailar ©, te quiero. Mí más profundo agradecimiento con todo mí amor y cariño a **mí amado marido, Shadi Mohamed,** por haber estado siempre a mi lado, por haber creido en mí más que yo, por sus palabras y confianza, siempre dispuesto a ayudarme y sacarme una sonrisa, aunque hemos pasado momentos muy difíciles siempre ha estado brindándome su comprensión, cariño y amor. Siempre juntos, compartiendo experiencias, aventuras y momentos incomparables que quedaran para toda la vida. Y POR TODO, GRACIAS.

A mi precioso bebé, Muaz, 9 meses esperando con muchas ganas tú llegada al mundo y al final llegaste (13.08.2015) y trajiste contigo toda la felicidad y toda la diversión a mi propio y pequeño mundo. ¿Adivina qué? Tu mami está a punto de ser catedrática, aunque todavía no puedes leer, pero un día vas a aprender y por eso te dedico esta tesis. Gracias por tus ruíditos chistosos de bebé, por no dormir durante toda la noche y por tu preciosa sonrisa (El dezka thawen ay geraz ©). TE ADORO, MI TESORO.

GRACIAS A TODOS DE CORAZON.

A mís querídos padres; ABDALLA y SHOKRIA

A mí querído marído; SHADI Y a mí adorable bebé; MUAZ

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	Ι
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XVII
ABREVIATURAS	XIX
RESUMEN	XXIII
SUMMARY	XXV

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. El cultivo de tomate	1
1.1. El cultivo de tomate y su importancia económica	1
1.2. El tomate en el contexto de la investigación científica	3
1.3. Tomate cv. Micro-Tom. Introgresiones de mutantes deficientes en	
giberelinas (gib3) y de la proteína DELLA (procera) en Micro-Tom	3
2. El problema de la salinidad	6
2.1. Factores abióticos que causan estrés en las plantas	7
2.2. Salinidad y agricultura. Efectos sobre los cultivos de interés	
agronómico	7
2.3. Efecto de la salinidad sobre las plantas	8
2.4. Tolerancia de las plantas a la salinidad	11
2.4.1. Respuesta al estrés osmótico inducido por salinidad	12
2.4.2. Respuesta al estrés iónico inducido por salinidad	14
2.4.2.1.Exclusión de Na ⁺	15
2.4.2.2.Compartimentación y excreción iónica	15
3. Estrés oxidativo y señalización medida por ROS	21

3.1. Producción de ROS (especies reactivas de oxígeno)	21
3.2. Sistemas antioxidantes	23
3.3. Señalización celular medida por ROS	24
4. Fotosíntesis y salinidad	25
5. Giberelinas	28
5.1. Estructura química	28
5.2. Actividad biológica	29
5.3. Biosíntesis de las giberelinas	30
5.3.1. Síntesis de <i>ent</i> -kaureno a partir de GGPP en los plastidos	31
5.3.2. Conversión de <i>ent</i> -kaureno a GA ₁₂ en el retículo endoplasmático	31
5.3.3. Formación de GAs de 19 y 20 carbonos en el citoplasma	31
5.4. Desactivación de las giberelinas	34
5.5. Regulación de la ruta de biosíntesis	35
5.5.1. Homeostasis de las giberelinas	35
5.5.2. Regulación mediante otras hormonas	36
5.6. Mecanismos de señalización de giberelinas	36
5.6.1. Proteínas DELLA: inhibidoras de la ruta de GAs	37
5.6.2. Receptor de GAs: GID1	38
5.7. La sumoilación de la proteína DELLA	39
5.8. Mecanismos transcripcionales regulados por proteína DELLA	41
5.9. Implicación de las giberelinas en la respuesta al estrés salino	43
5.10. Integración de los sistemas redox y el metabolismo de las giberelinas en	
el desarrollo de la planta en condiciones salinas	45
6. Nitrógeno	46
6.1. La importancia del nitrógeno para las plantas	46
6.1.1. El nitrógeno como elemento mineral esencial para las plantas	46
6.1.2. La fertilización nitrogenada en la agricultura	47
6.2. La concentración y forma de nitrógeno como factores clave en el	
crecimiento y desarrollo de las plantas	49
6.3. Nitrógeno y salinidad	51
6.4. Interacción del metabolismo del nitrógeno con el metabolismo de las	
giberelinas y la influencia de la nutrición nitrogenada en plantas de	
tomate	53

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
III. MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. Material vegetal	57
2. Condiciones de crecimiento y tratamientos	57
2.1. Germinación	57
2.2. Cultivo hidropónico	58
2.3. Experimentos de salinidad	58
2.4. Experimentos de nitrógeno	59
3. Determinación de parámetros fisiológicos de desarrollo	60
3.1. Velocidad de crecimiento relativo	60
3.2. Producción de biomasa y su distribución	61
3.3. Peso específico de la hoja	61
4. Determinación del estado nutricional de las plantas	62
4.1. Determinación de cationes	62
4.2. Determinación de aniones	62
4.3. Determinación de nitrato, nitrógeno total y nitrógeno orgánico	63
5. Parámetros de fluorescencia de las clorofilas	63
5.1. Contenido de clorofilas	64
5.2. Cinética	64
5.3. Curvas de luz	65
5.4. Parámetros de fluorescencia	66
5.4.1. Rendimiento cuántico máximo	66
5.4.2. Rendimiento cuántico efectivo	66
5.4.3. Rendimiento cuántico de disipación de energía regulada	67
5.4.4. Rendimiento cuántico de disipación de energía no-regulada	67
5.4.5. Tasa de transporte de electrones	67
6. Intercambio gaseoso de CO ₂ y H ₂ O entre la planta y la atmosfera, y	
concentración de carbono total	68
6.1. Tasa de fotosíntesis neta	68
6.2. Conductancia estomática	69
6.3. Eficiencia intrínseca en el uso del agua	69
6.4. Contenido de carbono total	69
7. Estado hídrico de la planta	70

7.1. Contenido relativo de agua	70
7.2. Contenido de agua	71
8. Técnicas de microscopía	71
8.1. Microscopia electrónica de transmisión	71
8.2. Microscopia óptica	72
8.3. Microscopia de laser confocal	72
9. Identificación de proteínas por <i>Western-Blot</i>	73
9.1. Extracción de proteínas	73
9.2. Cuantificación de proteínas	73
9.3. Electroforesis de proteínas	74
9.4. Western-Blot	74
10. Cuantificación y extracción de hormonas	75
11. Análisis de expresión génica por RT-qPCR	76
11.1. Extracción y purificación de ARN	76
11.2. Transcripción inversa. Síntesis de la primera cadena de ADNc	77
11.3. Estimación de la concentración de ácidos nucleicos	77
11.4. Oligonucleótidos	77
11.5. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real	
(RT-qPCR)	78
12. Análisis del transcriptoma por microarray	78
13. Análisis estadístico	80
IV. RESULTADOS	81
Experimentos de salinidad	81
1. Velocidad de crecimiento relativo	81
2. Producción de biomasa y su distribución	82
2.1. Biomasa peso fresco	82
2.2. Biomasa peso seco	84
3. Peso específico de la hoja	86
4. Longitud del tallo	87
5. Estado nutricional	88
5.1. Concentración de iones Na ⁺ y Cl ⁻	88
5.2. Concentración de los cationes K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y el ratio Na^+/K^+	89
5.3. Balance de nitrógeno y carbono	91

6. Contenido de clorofilas	93
7. Fluorescencia de las clorofilas: cinética	94
8. Fluorescencia de las clorofilas: curva de luz	98
9. Asimilación de CO_2 , conductancia estomática y eficiencia en el uso del	
agua	101
10.Estado hídrico de la planta	103
11.Microarray	104
11.1. Análisis de términos GO	105
11.2. Análisis de términos <i>Bin</i> mediante PageMan	113
11.3. Expresión génica diferencial en condiciones control entre Micro-	
Tom (wt) y los mutantes <i>pro</i> y <i>gib3</i>	115
11.4. Expresión génica diferencial en condiciones salinas entre Micro-	
Tom (wt) y los mutantes <i>pro</i> y <i>gib3</i>	117
11.4.1. Familias génicas implicadas en la fotosíntesis	118
11.4.2. Ciclo de Calvin	121
11.4.3. Factores de transcripción	122
11.4.3.1. Factores de transcripción NAC	122
11.4.3.2. Factores de transcripción WRKY	123
11.4.3.3. Factores de transcripción TCP	123
11.4.3.4. Factores de transcripción Dof	123
11.4.3.5. Factores de transcripción ERF	125
11.4.4. Ciclo celular y división celular	125
11.4.5. Sistemas antioxidantes	126
11.4.5.1. Enzimas antioxidantes	126
11.4.5.2. Glutatión-S-transferasas	127
11.4.6. Metabolismo y señalización hormonal	128
11.4.6.1. Ácido abscísico	128
11.4.6.2. Etileno	129
11.4.6.3. Ácido jasmónico	131
11.4.7. Transportadores iónicos	131
11.4.8. Proteína de estrés	132
11.4.8.1. Familia Heat Shock 20	132
11.4.8.2. Familia Heat Shock 60	134

11.4.8.3. Familia Heat Shock 70
11.4.8.4. Familia Heat Shock 90
11.4.8.5. Familia Heat Shock 100
11.4.8.6. Familia Heat Shock 40 y DnaJ
11.4.8.7. Familia Heat Shock Factors
11.4.9. Complejo ribosomal del cloroplasto
12.Respuesta al estrés salino del sistema hormonal
12.1. Respuesta al estrés salino del metabolismo de las giberelinas
12.2. Respuesta al estrés salino de diferentes sistemas hormonales
12.3. Expresión génica mediante qRT-PCR de los genes implicados en e
metabolismo de las giberelinas
13. Proceso de sumoilación en Micro-Tom (wt) y los mutantes pro y gib3
14.Microscopia
14.1. Estudio ultraestructural de los cloroplastos de Micro-Tom (wt), pro
y <i>gib3</i> en condiciones salinas
14.2. Análisis morfométrico del tamaño de los cloroplastos y
plastoglóbulos
14.3. Localización subcelular del sodio en raíces del mutante pro
 Experimentos de interacción fuente de nitrógeno y salinidad
1. Velocidad de crecimiento relativo
2. Producción de biomasa y su distribución
2.1. Biomasa peso fresco
2.2. Biomasa peso seco
3. Peso específico de la hoja
4. Longitud del tallo
5. Estado nutricional
5.1. Concentración de iones Na ⁺ y Cl ⁻
5.1.1. Raíz
5.1.2. Ноја
5.1.3. Tallo
5.2. Concentración de los cationes K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y el ratio Na^+/K^+
5.2.1. Raíz
5.2.2. Ноја

5.2.3. Tallo	179
5.3. Balance de nitrógeno y carbono	182
5.3.1. Raíz	183
5.3.2. Ноја	185
5.3.3. Tallo	187
6. Contenido de clorofilas	189
7. Fluorescencia de las clorofilas: cinética	190
7.1. Rendimiento cuántico efectivo del PSII	191
7.2. Rendimiento cuántico de disipación de energía regulada no- fotoquímica	192
7.3. Rendimiento cuántico de disipación de energía no-regulada	193
8. Fluorescencia de las clorofilas: curva de luz	194
8.1. Rendimiento cuántico efectivo del PSII	194
8.2. Rendimiento cuántico de disipación de energía regulada no-	
fotoquímica	195
8.3. Rendimiento cuántico de disipación de energía no-regulada	196
8.4. Tasa de transporte de electrones	197
9. Asimilación de CO ₂ , conductancia estomática y eficiencia en el uso del	
agua	198
9.1. Fotosíntesis neta	198
9.2. Conductancia estomática	199
10.Estado hídrico de la planta	200
V. DISCUSIÓN	203
CAPITULO I. Salinidad	203
1. Respuesta fisiológica al estrés salino en wt y los mutantes de giberelinas	
pro y gib3	203
2. El estrés salino induce un mayor daño en el sistema fotosintético del	
mutante <i>pro</i>	205
3. El estrés salino induce cambios ultraestructurales en los cloroplastos.	
Papel de los plastoglóbuli en el mutante pro	210
4. Regulación iónica en condiciones de estrés salino. Homeostasis iónica	213
5. Localización subcelular del sodio y papel de los transportadores NHXs	
en tomate	214

6. Los niveles hormonales basales de GAs son diferentes entre wt y los	216
 7. El estrés salino induce niveles más bajos de giberelinas bioactivas en wt, 	210
pero induce su acumulación en <i>pro</i>	216
8. Interacción de diferentes sistemas hormonales con la respuesta al estrés	
salino en tomate. Papel del ácido salicílico y su relación con los sistemas	
antioxidantes	220
9. Regulación de la expresión génica mediada por factores de	
transcripción	223
10.Papel de los factores de transcripción de las familias, NAC, WRKY y	
Dof en la respuesta al estrés salino y su posible interacción con la	
proteína DELLA	224
11.El factor de transcripción TCP3 parece estar regulado por las giberelinas	
y por el estrés salino	229
12. Regulación de la expresión de las proteínas implicadas en la respuesta al	
estrés. Proteínas de tipo chaperonas (heat shock proteins)	231
CAPITULO II. Interacción fuente de nitrógeno y salinidad	233
1. El crecimiento en altos niveles de NH4 ⁺ produce una reducción	
importante de la biomasa total y crecimiento en condiciones control en	
los diferentes genotipos estudiados	233
2. La presencia de altos niveles de NH4 ⁺ incrementó la tolerancia al estrés	
salino, reduciendo la distribución de sodio en la parte aérea de forma	
diferencial según el genotipo	235
3. La nutrición con NH_4^+ induce un efecto inhibidor del PSII en todos los	
genotipos aunque fue mas intenso en el mutante gib3. La combinación	
de salinidad y alto NH_4^+ indujo importantes daños en el PSII de <i>gib3</i>	237
VI. CONCLUSIONES	239
VII. BIBLIOGRAFÍA	243
VIII. REFERENCIA ANEXO	287
1. Anexo figura S1	287
2. Tablas anexas	288

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Plantas de tomate cv. Micro-Tom
Figura 2	Efecto del estrés salino sobre la tasa de crecimiento
Figura 3	Vías metabólicas de síntesis de prolina
Figura 4	Ruta SOS para la regulación de la homeostasis iónica bajo
	estrés salino
Figura 5	Homeostasis de los iones Na ⁺ y K ⁺
Figura 6	Eliminación de las ROS
Figura 7	La señalización redox como eje de la respuesta al estrés
Figura 8	Estructura química de ent-giberelano y ent-20-nor-giberelano
Figura 9	Estructura química de las giberelinas bioactivas
Figura 10	Vías principales del metabolismo de GAs en plantas
	superiores
Figura 11	Mecanismo de desactivación enzimática de GAs bioactivas
Figura 12	Mecanismos enzimáticos de desactivación de GAs bioactivas
Figura 13	Esquema que muestra la regulación homeostática de la
	biosíntesis de GAs
Figura 14	Interacción de GAs con su receptor soluble GID1
Figura 15	Estructura de la proteína DELLA
Figura 16	Modelo de la ruta de señalización de GAs
Figura 17	Modelo del proceso de acumulación de la proteína DELLA
	dependiente del proceso de sumoilización
Figura 18	Mecanismo de inhibición de la elongación del hipocotilo por la
	interacción de la proteína DELLA con los factores de
	transcripción PIFs
Figura 19	Papel de la proteína DELLA como modulador de la señal de
	jasmonato
Figura 20	Modelo de la proteína DELLA como activador del factor de
	transcripción IDD
Figura 21	Modelo de respuesta adaptativa a elevadas concentraciones
	salinas en plantas

Figura 22	Modelo de acción en la homeostasis de GAs por señalización	
	por luz y respuesta a estreses bióticos y abióticos	46
Figura 23	Efecto de la fertilización nitrogenada en el crecimiento y	
	desarrollo del trigo	51
Figura 24	Regulación del crecimiento de la parte aérea por influencia del	
	N en plantas silvestres	53
Figura 25	Plantas wt y los mutantes pro y gib3 crecidas en medio	
	hidropónico	59
Figura 26	Plantas wt y los mutantes pro y gib3 crecidas en medio	
	hidropónico con los tratamientos de nitrógeno.	6(
Figura 27	Planta silvestre de Micro-Tom	61
Figura 28	Secuencia de pulsos de luz seguida en las medidas de	
	fluorescencia de clorofilas	65
Figura 29	Cubeta PLC6 - CIRAS-2	69
Figura 30	Discos de hojas sumergidos con agua destilada	7(

I. Experimentos de salinidad.

Figura 31	Velocidad de crecimiento relativo	\$1
Figura 32	Efecto de los diferentes tratamientos salinos en el crecimiento	
	de la planta 8	32
Figura 33	Producción de biomasa $(g_{pf} planta^{-1})$ de parte aérea, raíz,	
	biomasa total y el ratio parte aérea/raíz	33
Figura 34	Producción de biomasa $(g_{pf} planta^{-1})$ de hoja y tallo	34
Figura 35	Producción de biomasa $(g_{ps} \text{ planta}^{-1})$ de parte aérea, raíz,	
	biomasa total y el ratio parte aérea/raíz	35
Figura 36	Producción de biomasa $(g_{ps} planta^{-1})$ de hoja y tallo	36
Figura 37	Peso específico de las hojas	36
Figura 38	Longitud de tallo	37
Figura 39	Concentración de iones Na^+ y Cl^- en raíz, hoja y tallo	38
Figura 40	Concentración de los cationes K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y el ratio Na^+/K^+	
	en raíz, hoja y tallo)()
Figura 41	Balance de nitrógeno y carbono en raíz, hoja y tallo)2
Figura 42	Contenido de clorofilas)4

Figura 43	Parámetros de fluorescencia de las clorofilas; día 0 (control) 95
Figura 44	Parámetros de fluorescencia de las clorofilas; a las 24 horas de
	la aplicación del tratamiento salino
Figura 45	Parámetros de fluorescencia de las clorofilas; a los 7 días de la
	aplicación del tratamiento salino
Figura 46	Curvas de respuesta de los parámetros de fluorescencia de las
	clorofilas a la luz; día 0 (control)
Figura 47	Curvas de respuesta de los parámetros de fluorescencia de las
	clorofilas a la luz; a las 24 horas de la aplicación del
	tratamiento salino 100
Figura 48	Curvas de respuesta de los parámetros de fluorescencia de las
	clorofilas a la luz a los 7 días de la aplicación del tratamiento
	salino
Figura 49	Parámetros fotosintéticos en hoja 102
Figura 50	Estado hídrico en plantas 103
Figura 51	Presentación en PageMan (MapMan software) de las categorías
	génicas (términos Bin) afectados por la salinidad en (A) hoja y
	(B) raíz de wt, <i>pro</i> y <i>gib3</i> 114
Figura 52	Análisis de co-expresión de los genes <i>NAC1</i> y <i>WRKY39</i> 116
Figura 53	Análisis del promotor del gen <i>SlNAC1</i> 116
Figura 54	Intersección de las listas de genes expresados de forma
	diferencial y significativa en hoja y raíz de los diferentes
	genotipos
Figura 55	Representación mediante MapMan de la expresión de la familia
	de genes implicados en los centros de reacción del cloroplasto 119
Figura 56	Heatmap representando la expresión génica de la familia de
	genes implicados en el proceso fotosintético
Figura 57	Heatmap representando la expresión de la familia de genes
	implicados en el ciclo de Calvin
Figura 58	Heatmap representando la expresión de la familia de factores de
	transcripción; (A) NAC y (B) WRKY 122
Figura 59	Heatmap representando la expresión de la familia de factores de
	transcripción; (A) TCP, (B) Dof y (C) ERF 124

Figura 60	Heatmap representando la expresión de los genes implicados en	
	la división y ciclo celular	126
Figura 61	Heatmap representando la expresión de los genes implicados	
	principalmente en la respuesta antioxidante y en la eliminación	
	de radicales libres	127
Figura 62	Heatmap representando la expresión de los diferentes grupos de	
	la familia génica de las glutatión-S-transferasas	128
Figura 63	Heatmap representando la expresión de la familia génica del	
	metabolismo y señalización del (A) ácido abscísico, (B) etileno	
	y (C) ácido jasmónico	130
Figura 64	Heatmap representando la expresión de los principales genes	
	implicados en el transporte de sodio	132
Figura 65	Heatmap representando la expresión génica del grupo de las	
	proteínas de choque térmico correspondiente a las familias; (A)	
	HSP20, (B) HSP60, (C) HSP70, (D) HSP90 y (E) HSP100	133
Figura 66	Heatmap representando la expresión génica (A) del grupo de	
	las proteínas de choque térmico correspondiente a la familia	
	HSP40 y (B) del grupo de factores de transcripción implicados	
	en la regulación del choque térmico	136
Figura 67	Heatmap representando la expresión génica de las proteínas del	
	complejo ribosomal del cloroplasto	138
Figura 68	Niveles de expresión del gen DELLA y genes implicados en la	
	biosíntesis y catabolismo de giberelinas en tejido foliar	146
Figura 69	Niveles de expresión del gen DELLA y genes implicados en la	
	biosíntesis y catabolismo de giberelinas en raíz	147
Figura 70	(A) Western-Blot de la proteína SUMO en extractos de	
	proteínas totales en hoja de plantas control y salinizadas de	
	Micro-Tom, (B) Alineamiento de varias proteínas DELLA de	
	diferentes especies en la región conservada para sumoilación,	
	(C) Análisis in silico de los sitios de sumoilación de la proteína	
	SIGAI de tomate y (D) Heatmap de expresión de los genes	
	SUMO presentes en el microarray en plantas de wt, pro y gib3,	
	tratadas con 150mM de NaCl durante una semana	150

Figura 71	Ultraestructura de los cloroplastos de Micro-Tom (wt) crecido
	en condiciones control
Figura 72	Ultraestructura de los cloroplastos de los mutantes pro y gib3
	crecidos en condiciones control
Figura 73	Modificaciones ultraestructurales de los cloroplastos de Micro-
	Tom (wt) crecido en 150 mM de NaCl durante una
	semana
Figura 74	Modificaciones ultraestructurales de los cloroplastos del
	mutante pro crecido en 150 mM de NaCl durante una
	semana
Figura 75	Modificaciones ultraestructurales de los cloroplastos del
	mutante gib3 crecido en 150 mM de NaCl durante una
	semana
Figura 76	Análisis morfométrico del tamaño del cloroplasto y el efecto
	del tratamiento salino de 150 mM de NaCl durante una
	semana
Figura 77	Análisis morfométrico del diámetro de los plastoglóbulos
Figura 78	Localización subcelular de sodio en raíces del mutante pro
	tratado con 150 mM de NaCl durante una semana
II. Experin	ientos de interacción fuente de nitrógeno y salinidad.
Figura 79	Velocidad de crecimiento relativo
Figura 80	Producción de biomasa (g _{pf} planta ⁻¹) de planta completa, parte
	aérea, raíz y el ratio parte aérea/raíz
Figura 81	Producción de biomasa (g _{pf} planta ⁻¹) de hoja y tallo
Figura 82	Producción de biomasa (g _{ps} planta ⁻¹) de planta completa, parte
	aérea, raíz y el ratio parte aérea/raíz
Figura 83	Producción de biomasa (g _{ps} planta ⁻¹) de hoja y tallo
Figura 84	Peso específico de las hojas
Figura 85	Longitud del tallo
Figura 86	Concentración de iones Na ⁺ y Cl ⁻ en raíz
Figura 87	Concentración de iones Na ⁺ y Cl ⁻ en hoja
Figura 88	Concentración de iones Na ⁺ y Cl ⁻ en tallo

Figura 89	Concentración de los cationes K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y el ratio Na^+/K^+
	en raíz
Figura 90	Concentración de los cationes K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y el ratio Na^+/K^+
	en hoja
Figura 91	Concentración de los cationes K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y el ratio Na^+/K^+
	en tallo
Figura 92	Balance de nitrógeno y carbono en raíz
Figura 93	Balance de nitrógeno y carbono en hoja
Figura 94	Balance de nitrógeno y carbono en tallo
Figura 95	Contenido de clorofilas
Figura 96	Rendimiento cuántico máximo [Y(II) máx] del PSII
Figura 97	Rendimiento cuántico efectivo [Y(II)] del PSII
Figura 98	Rendimiento cuántico de disipación de energía regulada
	[Y(NPQ)] del PSII
Figura 99	Rendimiento cuántico de disipación de energía no-regulada
	[Y(NPQ)] del PSII
Figura 100	Curvas de respuesta del rendimiento cuántico efectivo [Y(II)] a
	la luz
Figura 101	Curvas de respuesta del rendimiento cuántico de disipación de
	energía regulada [Y(NPQ)] a la luz
Figura 102	Curvas de respuesta del rendimiento cuántico de disipación de
	energía no-regulada [Y(NO)] a la luz
Figura 103	Curvas de respuesta de la tasa de transporte de electrones [ETR]
	a la luz
Figura 104	Tasa de fotosíntesis neta
Figura 105	Conductancia estomática
Figura 106	Estado hídrico en plantas
Figura 107	Esquema del metabolismo de las giberelinas en hoja de wt
	tratadas con 150 mM de NaCl durante 1 semana
Figura 108	Esquema del metabolismo de las giberelinas en hoja de pro
	tratadas con 150 mM de NaCl durante 1 semana
Figura 109	Esquema del metabolismo de las giberelinas en hoja de gib3
	tratadas con 150 mM de NaCl durante 1 semana

Figura 110	Posible mecanismo de regulación del factor de transcripción	
	SINAC1 mediado por su interacción con la proteína DELLA	227
Figura 111	Mecanismo de respuesta al estrés salino en Micro-Tom	
	mediado por la posible interacción de las proteínas DELLA y	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Producción mundial de tomate (Fuente: FAO static)
Tabla 2	Producción del cultivo de tomate en España (Fuente: FAO
	static)
Tabla 3	Efecto del estrés salino en plantas
Tabla 4	Mutaciones hormonales introgresadas en cv. Micro-Tom
Tabla 5	Concentración de las sales utilizadas para la preparación de la
	disolución nutritiva
Tabla 6	Fluoróforos utilizados en los estudios realizados con
	microscopia confocal
Tabla 7	Cebadores utilizados para la amplificación mediante PCR y
	RT-qPCR
Tabla 8	Los diferentes factores en los experimentos ensayados
Tabla 9	Resumen de los genes expresados de forma diferencial en
	raíces de Micro-Tom, pro y gib3 crecidas durante una semana
	a 150 mM de NaCl. p≤0.05 y FDR≤0.05
Tabla 10	Resumen de los genes expresados de forma diferencial en
	hojas de Micro-Tom, pro y gib3 crecidas durante una semana
	a 150 mM de NaCl. p≤0.05 y FDR≤0.05
Tabla 11	Raíz de Micro-Tom (wt) tratada con 150 mM de NaCl durante
	una semana. Análisis del enriquecimiento en términos GO
	usando el test de Fisher
Tabla 12	Hoja de Micro-Tom (wt) tratada con 150 mM de NaCl
	durante una semana. Análisis del enriquecimiento en términos
	GO usando el test de Fisher
Tabla 13	Raíz de <i>pro</i> tratada con 150 mM de NaCl durante una semana.
	Análisis del enriquecimiento en términos GO usando el test de
	Fisher
Tabla 14	Hoja de pro tratada con 150 mM de NaCl durante una
	semana. Análisis del enriquecimiento en términos GO usando
	el test de Fisher.

Tabla 15	Raíz de gib3 tratada con 150 mM de NaCl durante una	
	semana. Análisis del enriquecimiento en términos GO usando	
	el test de Fisher	111
Tabla 16	Hoja de gib3 tratada con 150 mM de NaCl durante una	
	semana. Análisis del enriquecimiento en términos GO usando	
	el test de Fisher	112
Tabla 17	Cuantificación del contenido en giberelinas en raíz de wt, pro	
	y gib3 tratadas con 150 mM de NaCl durante una	
	semana	142
Tabla 18	Cuantificación del contenido en giberelinas en hoja de wt, pro	
	y gib3 tratadas con 150 mM de NaCl durante una	
	semana	142
Tabla 19	Cuantificación del contenido en diferentes fitohormonas en	
	raíz de wt, pro y gib3 tratadas con 150 mM de NaCl durante	
	una semana	144
Tabla 20	Cuantificación del contenido en diferentes fitohormonas en	
	hoja de wt, pro y gib3 tratadas con 150 mM de NaCl durante	
	una semana	144
ABREVIATURAS

μg	Microgramo					
μl	Microlitro					
μΜ	Micromolar					
μmol	Micromol					
°C	Grado centígrado					
ABA	Ácido abscísico					
ADNc	ADN complementario					
ANOVA	nálisis de varianza					
ARNc	ARN complementario					
C/N	Ratio carbono/nitrógeno					
CEBAS	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura					
cm	Centímetro					
CRA	Contenido relativo de agua					
DDS	Días después de la siembra					
EDTA	Ácido etilendinitrilotetraacético sal disódica dihidrato					
ETR	Tasa de transporte de electrones fotosintética					
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la					
	Alimentación					
FDR	Tasa de falsos positivos					
F_m	Máxima fluorescencia en hojas adaptadas a la oscuridad					
F_m'	Máxima fluorescencia en hojas adaptadas a la luz después de aplicar					
	un pulso saturante de luz actínica					
F_{0}	Mínima fluorescencia en hojas adaptadas a la oscuridad					
F_{0}'	Mínima fluorescencia en hojas adaptadas a la luz después de un pulso					
	de luz roja					
F_t	Valor de fluorescencia justo antes de la saturación de luz					
F_{v}	La competencia variable de la fluorescencia					
F_v/F_m	Rendimiento cuántico máximo de los centros de reacción del PSII					
g	Gramo					
GAs	Giberelinas					
gib3	Mutante moderadamente deficiente en la síntesis de giberelinas					
g GAs gib3	Gramo Giberelinas Mutante moderadamente deficiente en la síntesis de giberelinas					

gs	Conductancia estomática					
HPLC	Cromatografía liquida de alta resolución					
ICP-OES	Espectrometría de plasma acoplado inductiva- espectrofotómetr					
	emisión óptico					
iWUE	Eficiencia intrínseca en el uso del agua					
JA	Ácido jasmónico					
L	Litro					
Ln	Logaritmo natural					
LSM	Peso específico de la hoja					
Μ	Molar					
mg	Miligramo					
min	Minuto					
mL	Mililitro					
mm	Milimetro					
mМ	Milimolar					
МО	Microscopia óptica					
ng	Nanogramo					
nm	Nanómetro					
OMS	Organización Mundial de la Salud					
PA/R	Ratio parte aérea/raíz					
PBS	Tampón fosfato potásico 10 mM pH 7.4 + 150 mM NaCl					
PF	Peso fresco					
Pn	Tasa de fotosíntesis neta					
pro	Procera					
PS	Peso seco					
РТ	Peso túrgido					
p/v	peso/volumen					
PVP	Polivinil pirrolidona					
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa					
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real					
VCR	Velocidad de crecimiento relativo					
ROS	Especies reactivas de oxígeno					
rpm	Revoluciones por minuto					

S	Segundos				
SDS	Dodecil sulfato de sodio				
t	Tiempo				
t/ha	toneladas / hectárea				
TPNa	Tampón fosfato sódico				
wt	Wild type				
Y(II)	Rendimiento cuántico efectivo				
Y(NO)	Rendimiento cuántico de disipación de energía no-regulada [Y(NO)				
	= quenching fotoquímico]				
Y(NPQ)	Rendimiento cuántico de disipación de energía regulada $[Y(NPQ) =$				
	quenching no fotoquímico]				

RESUMEN

La salinidad es uno de los mayores problemas en nuestra agricultura actual, suponiendo grandes pérdidas económicas en el sureste español. Esta memoria de tesis ha tenido como objetivo aportar nuevos conocimientos que ayuden a paliar este problema. El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos vegetales más importantes en alimentación a nivel mundial, frecuentemente cultivado en regiones que presentan condiciones adversas como pueden ser la falta de agua y suelos salinos (por ejemplo la cuenca Mediterránea). El objetivo de esta tesis ha sido estudiar el papel de la hormona giberelina y su señalización (proteínas DELLA) en el proceso de adaptación a la salinidad. En esta tesis hemos tratado de avanzar en el conocimiento de los mecanismos responsables del proceso de respuesta en plantas al estrés salino. Para ello, hemos realizado un estudio integral del proceso a diferentes niveles de complejidad funcional, y abarcando el tema a nivel celular, fisiológico y molecular.

Todos los experimentos desarrollados en esta tesis han sido realizados en plantas silvestres y dos mutantes de tomate, cv. Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L). Por un lado, el mutante *gib3* (con una posible mutación en el gen *ent-kaureno sintetasa*), que se caracteriza por mostrar bajos niveles de giberelinas y un fenotipo enano, y el mutante *procera* (*pro*) que presenta un fenotipo alto y delgado, mostrando una respuesta constitutiva a la hormona giberelina debido a una mutación puntual en el gen *SIDELLA*.

A partir de resultados obtenidos en el metabolismo de las giberelinas, demostramos que la salinidad alteró las concentraciones de giberelinas bioactivas GA₁ y GA₄. Estos niveles eran regulados de una forma diferencial entre la planta silvestre y los dos mutantes, debido posiblemente, a la modificación de la expresión génica de las enzimas implicadas en la síntesis y catabolismo de las giberelinas (200xs, 30xs y 20xs).

También hemos desarrollado un estudio transcriptómico de estas plantas (silvestre, *gib3* y *pro*) crecidas en 150 mM de NaCl. El análisis de los términos GO y *Bin* nos mostró un incremento en la representación de términos implicados en los procesos de fotosíntesis, estrés abiótico, síntesis y degradación de proteínas, estrés

térmico, pared celular y metabolismos de hormonas tales como son etileno, jasmónico y giberelinas. También se ha realizado un análisis de la ultraestructura de estos mutantes crecidos en condiciones de estrés salino.

Finalmente, también se ha estudiado la respuesta de los mutantes de giberelinas bajo condiciones de estrés salino y diferentes fuentes de nitrógeno (nitrato y amonio) y como los cambios de estas fuentes pueden afectar a la adaptación al estrés salino.

SUMMARY

Salinity is one of the most important problems in the present-day agriculture, assuming large economic losses in the Southwest of Spain. This PhD Thesis aims to provide new knowledge that can help alleviate this problem. Tomato (*Solanum lycopersicum* L) is one of the most important food crops worldwide, frequently cultivated in regions with adverse conditions like poor-watered and saline soils (i.e. Mediterranean basin). The aim of this Thesis is to study the possible role of gibberellin metabolism and signaling (DELLA proteins) under salt stress. In this thesis, we try to advance the current understanding of the mechanisms involved in salt stress response in plants, developing a comprehensive study of the process at different levels of functional complexity, and following different technical approaches such as molecular, cellular and physiological.

Tomato plants (*Solanum lycopersicum*, cv. Micro-Tom) and two tomato mutants, *gib3* (mutation in Ent-Kaurene Synthetase), with low level of gibberellins showing dwarf phenotype and *procera* (*pro*) mutant, showing a constitutive gibberellin response (slender and tall phenotype) due to a point mutation in the *SI*DELLA protein, were used for all the experiments developed in this thesis.

From the results obtained in the metabolism of gibberellin was demonstrated that salinity induced alterations in the bioactive gibberellin (GA_1 and GA_4) concentrations. This level was differentially regulated in Micro-Tom and the mutants by modification in the gene expression of the enzymes implicated in the synthesis and catabolism of gibberellins (200xs, 30xs and 20xs).

We have also developed a transcriptomic analysis for MicroTom, *gib3* and *procera* plants growing at 150 mM of NaCl. GO and *Bin* terms analysis demonstrated the over-representation of terms implicates in photosynthesis, abiotic stress, protein synthesis and degradation, heat shock, cell wall and phytohormone metabolism such as ethylene, jasmonic acid or gibberellins. Cellular ultrastructure was also analyses in the different mutant under salt stress conditions.

Finally, we have examined the response of gibberellin mutants under the salinity stress conditions and different nitrogen sources (nitrate or ammonium) and how these changes may affect the plant salt adaptation.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. El cultivo de tomate.

1.1. El cultivo de tomate y su importancia económica.

La palabra tomate procede del azteca Nahuatl, de la familia de las lenguas mayas. Se tiene constancia de su cultivo en el 700 A.C. en Mesoamérica, aunque originalmente proviene de los Andes, mucho antes de que se desarrollase la civilización inca.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), es una especie incluida dentro de la familia de las Solanáceas cultivada en todo el mundo para su consumo tanto fresco como procesado. El tomate tiene un elevado valor nutricional ya que es un alimento con escasa cantidad de calorías y que constituye una fuente importante de minerales (como potasio y magnesio), vitaminas (entre las que destacan la B1, B2, B5 y C) y carotenoides como el licopeno que junto a la vitamina C, actúan como antioxidantes. Estas propiedades hacen del tomate una hortaliza de gran interés nutricional y comercial.

La producción mundial del tomate en 2013 fue de más de 165 millones de toneladas (FAOSTAT, 2013). En la Unión Europea, la producción de tomate se reparte entre Italia, en primer lugar, seguido de España, Grecia y Portugal. En España, la producción se centra mayoritariamente en Andalucía y Extremadura, siendo la Región de Murcia la tercera región de mayor producción. El principal productor mundial es China con 46.87 millones de toneladas y España ocupa el octavo lugar con 4.31 millones de toneladas (FAOSTAT, 2013). En el año 2013 se produjeron en el mundo 34698.267 kg/ha de tomate fresco (FAOSTAT, 2013) (Tabla 1).

Tabla 1.	Producción	mundial de tomate	e (Fuente: 1	FAO static.).	

Año Superficie cultivada (millones de ha)		Producción (millones de t)	Rendimiento (kg/ha)	
2010	4.54	152.08	33475.095	
2011	4.72	158.21	33501.247	
2012	4.93	161.33	32703.078	
2013	4.73	163.96	34698.267	

ha = hectáreas; t = toneladas

El cultivo de tomate en España. La zona mediterránea es de gran importancia en el cultivo del tomate, por lo que los problemas derivados de un exceso de salinidad, ya sea en el suelo o en el agua de riego, van a ser determinantes en la calidad y producción de este cultivo (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999).

En 2014 se cultivaron en España 46.623 ha que produjeron 3.77 millones de toneladas (Fuente: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2014) (Tabla 2).

Año	Superficie cultivada (ha)	Producción (millones de t)	Rendimiento (kg/ha)
2010	59267	4.31	72767.459
2011	51204	3.86	75465.198
2012	48600	4.05	83259.259
2013	45300	3.68	81315.673

Tabla 2. Producción del cultivo de tomate en España.

ha = hectáreas; t = toneladas

El cultivo de tomate en la región de Murcia. La Región de Murcia es una de las principales productoras de tomate en el ámbito nacional e internacional, gracias a sus inmejorables condiciones climáticas y de suelo. Por la Región de Murcia se extienden actualmente 2692 ha de cultivo de tomate fresco, principalmente repartidas en las zonas de Águilas, Lorca y Mazarrón, que en conjunto producen cerca de 300.000 toneladas anuales. Estas zonas, incluyendo algunas de sus pedanías costeras, constituyen las principales zonas productoras de tomate de la Región de Murcia. Dentro de los productos hortofrutícolas de la Región de Murcia que se exportan en fresco, el tomate supone el 19.92% de estas exportaciones y su participación dentro de este sector es del 23.18%. A nivel nacional, la participación murciana en las exportaciones españolas de tomates se eleva a 200.000 toneladas (Datos 2014; Fuente: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino).

Los principales mercados exteriores para el tomate murciano son Reino Unido, Alemania y últimamente, Estados Unidos.

1.2. El tomate en el contexto de la investigación científica.

Además de su valor comercial y nutricional, la especie *Solanum lycopersicum* L. se ha convertido en una de las especies en la que se están obteniendo mayores avances en áreas de genética, genómica y mejora, convirtiéndose en un excelente modelo tanto para la investigación básica como para la investigación aplicada de plantas. En cuanto a su importancia como sistema modelo se encuentran, entre otras características el crecimiento simpodial, formación de hojas compuestas, frutos climatéricos carnosos tipo baya, un ciclo de vida relativamente corto, insensibilidad al fotoperíodo (su floración y fructificación no están influidas por el fotoperiodo), genoma relativamente pequeño (950 Mpb) y facilidad para la transformación genética (Carvalho *y col.*, 2011), características que no se aprecian en especies modelo como pueden ser Arabidopsis y arroz (*Oryza sativa* L.).

1.3. Tomate cv. Micro-Tom. Introgresiones de mutantes deficientes en giberelinas (*gib3*) y de la proteína DELLA (*procera*) en Micro-Tom.

El cv. Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L.) se obtuvo con propósitos ornamentales a partir del cruzamiento de los cultivares Florida Basket y Ohio 4013 (Scott y Harbaugh, 1989). Micro-Tom se caracteriza principalmente por presentar un fenotipo enano con frutos pequeños (Harbaugh y Scott, 1999). El fenotipo que presenta Micro-Tom se debe a varias mutaciones puntuales en los siguientes genes (Marti *y col.*, 2006): *self pruning (sp)* (Pnueli *y col.*, 1998), que producen un fenotipo determinado/indeterminado; *Dwarf (d,* metabolismo de los brasinosteroides) que reduce la longitud del entrenudo y produce hojas más pequeñas, rugosas y verde oscuro y del gen *Intenode Length Reduction (Ilr)*, posiblemente similar a *Miniature (Mnt)* que aún no ha sido caracterizado (Martinez Bello Liliam, 2014). Sin embargo, los ovarios polinizados se desarrollan normalmente y responden a los tratamientos con auxinas y giberelinas, por lo que se considera un modelo extrapolable en estudios sobre el cuajado y desarrollo del fruto (Marti *y col.*, 2006). Su pequeño tamaño, rápido crecimiento y fácil transformación le ha llevado a ser utilizado como sistema modelo en investigación (Meissner *y col.*, 1997; Carvalho *y col.*, 2011) (Figura 1).



Figura 1: Plantas de tomate cv. Micro-Tom: wt, pro y gib3.

En los últimos años, el grupo del profesor Lazaro EP Peres del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Sao Paulo ha desarrollado una colección de mutantes del metabolismo hormonal en Micro-Tom mediante su introgresión de mutantes hormonales disponibles de tomate (Carvalho *y col.*, 2011). Esta introgresión consiste en una serie de retrocruzamientos sucesivos hasta alcanzar la sexta generación, donde al menos el 99% de los genes pertenecen al cv. Micro-Tom. Entre los mutantes que se ha realizado su introgresión se encuentran los siguientes mutantes del metabolismo de las giberelinas:

Mutante *gib3*. El mutante giberelinas-3 (*gib3*) cv. Moneymaker, de la línea LA2895, se obtuvo mediante mutagénesis química (EMS) y fue seleccionado por su pequeño tamaño y por recuperar el fenotipo silvestre tras la adicción de GAs de forma exógena. El mutante *gib3* es una planta enana, de hojas arrugadas, color verde oscuro y deficiente en la síntesis endógena de GAs (Koornneef *y col.*, 1990). El fenotipo mostrado en la introgresión en Micro-Tom reproduce el fenotipo de su parental (Carvalho *y col.*, 2011). El análisis bioquímico del mutante *gib3* mostró que la mutación podría estar en la ruta temprana de la síntesis de giberelinas, concretamente entre el paso de *ent*-copalil difosfato y el *ent*-kaureno, paso que está regulado por la *ent*-kaureno sintasa (Bensen y Zeevaart, 1990). Sin embargo, no tenemos constancia que la mutación haya sido identificada a nivel molecular en el mutante *gib3*. Con la reciente secuenciación del genoma del tomate se ha visto que el gen *ent*-kaureno sintasa es único en tomate.

Mutante *procera*. El mutante *procera*, cv. Condine Red, de la línea LA0565, presenta una mutación recesiva que da lugar a un fenotipo de respuesta constitutiva a las GAs, mostrando un tallo elongado y forma alterada de las hojas, presentando un borde menos dentado de la hoja (Jones *y col.*, 1987). Su introgresión en el cultivar Micro-Tom también muestra dichas características fenotípicas (Carvalho *y col.*, 2011). Bassel *y col.* (2008) han mostrado que esta alteración fenotípica es debida a una mutación puntual del gen *SIDELLA*. Esta mutación se encuentra en una secuencia conservada típica de las proteínas DELLA, motivo VHVID (Figura 15), donde se produce un cambio del tercer aminoácido del motivo conservado valina por el aminoácido glutamato. En cuanto a los contenidos endógenos de GAs, Jones (1987) observó que los tejidos foliares de *procera (pro)* mostraban niveles inferiores a los normales de GA₂₀ y posiblemente también de GA₁ (GA bioactiva). Por otro lado, Bassel *y col.* (2008) han observado que el mutante *pro* muestra una sobre-expresión del gen *SIDELLA* en condiciones normales.

Recientemente, se ha visto que la mutación *pro* participa también en la morfología de la flor, la división celular y expansión, además de regular el gen de señalización de auxinas AUXIN RESPONSE FACTOR7 durante el desarrollo del fruto (Carrera *y col.*, 2012).

2. El problema de la salinidad.

¿Qué es el estrés? El término "estrés biológico" fue definido en 1972 por Jacob Levitt como el estrés generado a partir de todas las alteraciones que se producen en el medio ambiente y que van a influir de manera adversa en el crecimiento o desarrollo normal de la planta. 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 cantidad aplicada, subrayando que en la mayor parte de los casos las plantas pueden recuperarse cuando desaparecen los agentes estresantes (Lichtenthaler, 1996; 1998). Se puede considerar que una planta se encuentra bajo estrés cuando está sometida a unas condiciones diferentes de las óptimas para la vida. Ante esta situación, la planta debe invertir energía extra en el mantenimiento de sus funciones vitales (Larcher, 1995).

En general, podemos clasificar los tipos de estrés como bióticos y abióticos (Azcón-Bieto y Talón, 2008):

- El estrés biótico es causado por la acción de organismos vivos como animales, plantas (fenómenos de competencia y alelopatía), microorganismos (bacterias y hongos) y otros agentes fitopatógenos como los virus.
- En cuanto al estrés abiótico, este puede 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). Como factores químicos destacan los metales pesados, los plaguicidas, la salinidad (en su componente iónico) y la deficiencia de elementos minerales. El estrés abiótico es uno de los estreses más perjudiciales para las plantas, y en particular el más dañino de todos es la salinidad (Mahajan y Tujeta, 2005; Parida y Das, 2005).

2.1. Factores abióticos que causan estrés en las plantas.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la agricultura actual se enfrenta al enorme desafío de producir suficientes alimentos para una población cada vez más numerosa. A partir de estimaciones actuales, en los próximos 40 años tendremos que producir alimentos para poder alimentar a una población que pasará de 6.000 a 9.000 millones. Actualmente, nuestra sociedad debe de afrontar este reto sin la posibilidad de un aumento significativo de la superficie de tierra cultivable y en un panorama de drásticas alteraciones ambientales provocadas por el cambio climático.

Como ya comentamos, uno de los efectos que más limitan la producción agrícola son los factores abióticos, que son aquellos que determinan el espacio físico en el que se desarrollan las plantas. Los factores abióticos principales que nos van a limitar tanto las especies que se pueden cultivar en cada región como la superficie de tierra cultivables son el agua, la temperatura, la luz, el pH y los nutrientes del suelo. La variación de estos factores, ya sea por exceso o por defecto de los niveles necesarios para el desarrollo de la planta, va a verse reflejado en alteraciones del crecimiento y la producción final de la planta.

2.2. Salinidad y agricultura. Efectos sobre los cultivos de interés agronómico.

Desde hace más de 3000 años la salinidad ha sido una amenaza para la agricultura en algunas partes del mundo; viéndose incrementada esta amenaza en los últimos tiempos (Flowers, 2006). La salinidad es el resultado de procesos naturales y/o antrópicos presentes en todos los suelos que conducen en menor o mayor grado a una acumulación de sales, que puede afectar la fertilidad del suelo (Flores *y col.*, 1996). Las sales constituyen un elemento común del suelo, resultando muchas de ellas nutrientes esenciales para las plantas (Carillo *y col.*, 2011). Sin embargo, la presencia de elevadas concentraciones salinas en el suelo, va a producir en las plantas importantes alteraciones fisiológicas y bioquímicas que van a afectar a su desarrollo. La salinidad producida por la irrigación intensiva, no sólo produce efectos a corto sino también a largo plazo que pueden ser irreversibles, por ejemplo, una continua degradación del suelo puede llegar a su desertificación. Así, durante los últimos 50 años, a nivel global, dos tercios de las tierras agrícolas han sufrido en cierta medida degradación y prácticamente el 40% de las tierras agrícolas del mundo se encuentran

gravemente degradadas. Se calcula que la desertificación irreversible afecta ya a 1900 millones de hectáreas y, cada año, 10 millones más quedan inservibles para labores agrícolas.

La organización mundial de salud (OMS) estima que para 2030, la demanda de productos agrícolas será aproximadamente un 60% mayor a la actual. Un porcentaje mayor al 85% de esta demanda se deberá a los países en desarrollo, donde se está dando un mayor crecimiento poblacional (FAO, 2013).

2.3. Efecto de la salinidad sobre las plantas.

La salinidad afecta diferentes aspectos de la fisiología de la planta y su metabolismo. La consecuencia más común de la salinidad sobre las plantas es la reducción de su desarrollo debido a: i) una disminución del potencial osmótico del medio y, en consecuencia del potencial hídrico del suelo; ii) una toxicidad específica, normalmente asociada con la absorción excesiva de Na⁺ y Cl⁻; iii) un desequilibrio nutricional debido a la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales; y iv) la combinación de los efectos antes indicados (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). Como resultado de estos efectos primarios, a menudo ocurren otros estreses secundarios, como sería el daño oxidativo (Zhu, 2001).

Las plantas disponen de complejos mecanismos moleculares de respuesta a estos efectos de la salinidad, que incluyen biosíntesis de solutos compatibles, control del flujo hídrico, y transporte de iones para reestablecer la homeostasis (Hasegawa *y col.*, 2000; Zhu, 2001).

Efecto osmótico. Este efecto está relacionado con la disminución del potencial osmótico del agua en el suelo, originado por la presencia de las sales disueltas. Esto se va a traducir en una disminución de la capacidad de las raíces de la planta para absorber agua del medio. En un principio, la reducción del rendimiento por la salinidad se relaciona con la alteración en el balance del agua, la planta realiza un ajuste osmótico para poder obtener el agua necesaria para sobrevivir.

Toxicidad iónica. Efecto debido a la absorción de iones salinos específicos, que llegan a ser tóxicos para la planta produciendo desórdenes fisiológicos. Estos efectos,

que van a producir un daño inducido por un estrés primario o de toxicidad, pueden ser directos, que son de rápida aparición (minutos u horas) e identificados con daños a membranas; o indirectos, los cuales requieren exposiciones más prolongadas al estrés para que se desarrollen (días o semanas) y que se van a traducir en una alteración de diversos procesos metabólicos.

Desequilibrio nutricional. La presencia de elevadas concentraciones de iones $Na^+ y$ Cl⁻ pueden modificar la absorción de los nutrientes esenciales como el K⁺ o el Ca²⁺, lo que podría derivar en desequilibrio nutricional.

Estrés oxidativo. La salinidad también produce, a más largo plazo, un estrés oxidativo en las plantas, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS).

Para poder elucidar como responden los mecanismos fisiológicos responsables de la tolerancia a la salinidad en las plantas, es necesario conocer como el crecimiento de la planta va a estar limitado por el efecto osmótico de la sal presente en el suelo, o por el efecto tóxico de la sal en la planta. Haciendo un simple análisis sobre cómo responde la planta a dicho estrés, vemos que la reducción del crecimiento del tallo ocurre en dos fases (Tabla 3): una respuesta rápida al aumento de la presión osmótica externa, y una respuesta más lenta debido a la acumulación de Na⁺ en las hojas.

Tabla 3.	. Efecto	del	estrés	salino	en	plantas.
----------	----------	-----	--------	--------	----	----------

Efectos del estrés	Estrés osmótico	Estrés iónico		
Velocidad de inicio	Rápido	Bajo		
Partes de la planta donde primero se hacen visibles los	Disminución del crecimiento de la parte	Aumento de la senescencia de las hojas		
efectos	aérea	adultas		

Munns describió estos cambios en diferentes escalas de tiempo durante el desarrollo de la planta (Figura 2); momentos después de la salinización, las células se deshidratan y reducen su tamaño, aunque pueden recuperar su volumen original unas horas después. A pesar de esta recuperación, la elongación y la división celular se ven afectadas, conduciendo a tasas más bajas del crecimiento de la planta.



Figura 2. Efecto del estrés salino sobre la tasa de crecimiento. Esquema de la respuesta de las dos fases de crecimiento de una planta a la salinidad para los genotipos que difieren en la tasa de crecimiento cuando la sal (NaCl) alcanza niveles tóxicos en las hojas (Munns, 2005).

La primera fase es una respuesta rápida que comienza cuando la concentración de iones salinos alrededor de las raíces aumenta hasta un umbral, este valor de umbral es de aproximadamente 40 mM de NaCl para la mayoría de las plantas (Munns, 2005). La tasa de crecimiento a la cual las hojas se expanden se reduce, nuevas hojas y brotes laterales emergen y se desarrollan más despacio, o bien permanecen quiescentes, formándose menos ramas y brotes laterales. El crecimiento del tallo es más sensible que el crecimiento de la raíz (Munns y Tester, 2008). Las concentraciones que se acumulan en la planta de Na⁺ y Cl⁻ no van a producir una inhibición en los tejidos en crecimiento debido a que los tejidos meristemáticos se alimentan principalmente a través del floema, donde la sal será excluida de una forma eficiente. Mientras que las células que están en la fase de elongación, pueden incluir el sodio que llega a través del xilema dentro de sus vacuolas (Munns, 2005). La segunda fase (ión-específica o estrés iónico) de respuesta de las plantas a la salinidad comienza con la acumulación de iones a concentraciones tóxicas en las hojas adultas (Munns y Tester, 2008). La causa del daño es probablemente que la carga de sal excede la capacidad de las células de compartamentalizar las sales en la vacuola. Las sales se acumulan rápidamente en el citoplasma e inhiben la actividad enzimática (Amtmann y Sanders, 1999; Mahajan y Tujeta, 2005). Alternativamente, pueden acumularse en las paredes celulares y deshidratar a la célula (Munns, 2005). Esta situación va a conducir a una senescencia prematura de la hoja, que finalmente se traducirá en la muerte de la hoja. Si la tasa a la que las hojas mueren es mayor que la tasa a la que nuevas hojas se desarrollan, la capacidad fotosintetizadora de la planta no podrá suplementar los requerimientos de carbohidratos de las hojas jóvenes, que a continuación reducen su propia tasa de crecimiento (Munns y Tester, 2008).

Basado en este concepto de dos tipos de respuesta de fases, la reducción inicial de crecimiento, tanto para plantas sensibles como tolerantes a la salinidad, está causado por un efecto osmótico debido a las sales que se encuentran en el medio alrededor de las raíces. En cambio, en la segunda fase, una especie o un genotipo sensible a la salinidad difiere de otra más tolerante a la salinidad por su incapacidad de evitar la acumulación de la sal en las hojas hasta llegar a los niveles tóxicos (Munns *y col.*, 2006).

2.4. Tolerancia de las plantas a la salinidad.

La tolerancia a la salinidad puede definirse en base a distintos enfoques. Bernstein (1963) define tolerancia como el grado con que una planta es capaz de ajustar su potencial osmótico con un sacrificio mínimo de crecimiento, y Levitt (1980) asocia la tolerancia con la ausencia de efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas que acumulan sales en sus tejidos. Maas (1986) considera que la tolerancia se puede analizar desde tres puntos de vista: (1) la aptitud para sobrevivir en condiciones salinas, (2) el rendimiento absoluto en condiciones salinas y (3) el rendimiento en condiciones salinas relativo al obtenido en condiciones no salinas (Aragues *y col.*, 1999). Más recientemente, Munns y Tester (2008) definieron la tolerancia a la salinidad como la capacidad del cultivo a completar su ciclo de vida desarrollándose en un medio que contiene altas concentraciones de sales solubles. Las diferentes especies vegetales difieren notablemente en sus respuestas de desarrollo frente a la salinidad, clasificándose en tres grandes grupos (Greenway y Munns, 1980):

1. Halófitas. Plantas muy tolerantes, capaces de completar su ciclo de vida en suelos con elevadas concentraciones salinas que oscilan entre 200 y 500 mM NaCl:

- Plantas muy tolerantes como el esparrago, palmera y tamariz.
- Plantas moderadamente tolerantes como el pino, olivo ruso, cebada y algodón.

2. Halófitas-Glicófitas. A este grupo pertenecen plantas halófitas que toleran menores concentraciones salinas que las descritas en el apartado anterior (100-200 mM NaCl) y glicófitas tolerantes que son capaces de crecer en ambientes con concentraciones salinas comprendidas entre 50-100 mM de NaCl como el tomate, lechuga, uva, espinaca, pimiento, maíz, pepino, sandia, brócoli, coliflor y flores en general.

3. Glicófitas. Plantas muy sensibles a la salinidad, que ven afectado su crecimiento a concentraciones de 50 mM NaCl como la manzana, cereza, pera, ciruela, zanahoria, berenjena, fresa, los cítricos y cebolla.

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).

2.4.1. Respuesta al estrés osmótico inducido por salinidad.

Uno de los primeros efectos provocados por el estrés salino es una disminución en el crecimiento de la planta, que va a estar inducido por un ajuste osmótico, que se va traducir en una disminución del potencial hídrico de la solución del suelo. Este efecto se va a producir en el momento en el cual la concentración de sales presentes en el medio donde se encuentra la raíz de la planta, supere el umbral de tolerancia que para la mayoría de las plantas es de 40 mM de NaCl (aunque puede ser menor en plantas como Arabidopsis y arroz). En esta nueva situación, las plantas deben ajustarse osmóticamente para evitar la pérdida de agua, acumulando solutos con el fin de mantener el volumen celular y la turgencia de forma que disminuya el potencial osmótico en la célula. Los solutos que van a contribuir al ajuste osmótico son solutos inorgánicos procedentes del sustrato y solutos orgánicos sintetizados por la planta (Alarcón y col., 1993). El balance osmótico en el citoplasma se consigue por acumulación de solutos que no inhiban procesos metabólicos, llamados osmolitos compatibles (Hasegawa y col., 2000). Dentro de éstos encontramos azúcares (principalmente glucosa y fructosa), polialcoholes (glicerol, inositoles metilados), azúcares complejos (trehalosa, fructanos y rafinosa), iones (K^{+}) , metabolitos cargados

(glicina, betaína) y aminoácidos como la prolina. Algunas halófitas pueden acumular grandes cantidades de sales inorgánicas en los orgánulos de las células, como por ejemplo la vacuola. La síntesis y acumulación de solutos orgánicos es una respuesta común en el proceso de adaptación de plantas tanto a un déficit hídrico como a un estrés salino.

Papel de la prolina en la respuesta al estrés salino. La prolina es uno de los marcadores más estudiados en situaciones de estrés (Szabados *y col.*, 2011). Este aminoácido se encuentra a bajas concentraciones en las plantas cuando estas no se encuentran bajo situaciones de estrés. En plantas superiores, la prolina es sintetizada principalmente a partir de glutamato, que se reduce a glutamato semialdehido (GSA) por acción de la enzima pirrolin-5-carboxilato sintetasa (P5CS). Finalmente, el GSA se convierte, de forma espontánea, en pirrolin-5-carboxilato (P5C) que vuelve a ser reducido por la enzima P5C reductasa generando prolina (Figura 3). 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 (Szábados 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 O2 como aceptor electrónico final (Miller y col., 2009). Este ciclo, que en principio pudiera parecer

intrascendente, puede describir en humanos la inducción de la muerte celular programada en células cancerosas mediante un sistema de señalización celular que da lugar a apoptosis (Liu *y col.*, 2006).



Figura 3. Vías metabólicas de síntesis de prolina. Las enzimas son: 1. Pirrolín-5-carboxilato (P5C) sintasa; 2. P5C deshidrogenasa; 3. Ornitina aminotransferasa; 4. P5C reductasa; 5. Prolina oxidasa (Valpuesta *y col.*, 1992).

2.4.2. Respuesta al estrés iónico inducido por salinidad.

No todas las plantas son capaces de realizar un ajuste osmótico por medio de la absorción de sales sin padecer los efectos tóxicos que estas pueden ocasionarle. Los daños causados por las sales, se deben a que los orgánulos celulares son incapaces de adaptarse a la elevada concentración iónica a nivel celular, y también al efecto negativo que estos iones tienen sobre ciertos enzimas (Miller y Evans, 1956; Hiatt y Evans, 1960; Hasegawa *y col.*, 2000).

La acumulación de iones salinos (Na⁺ y Cl⁻) en el citosol provoca un estrés iónico en la planta. El efecto de la toxicidad iónica puede deberse no sólo por la presencia de las altas concentraciones de estos iones sino también al desequilibrio iónico producido por el exceso del ion Na⁺, frente al K⁺, el cual puede llegar a afectar a las actividades enzimáticas (Yeo, 1983). Para evitar esta toxicidad iónica, la planta lo hace principalmente mediante tres mecanismos: exclusión, compartimentación y excreción. La importancia de cada uno de los mecanismos 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.

2.4.2.1. Exclusión de Na⁺.

Ocurre a nivel radicular, consiste en la exclusión del ion tóxico mediante su no absorción. 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⁺ del citoplasma al medio externo vía membrana plasmática por un antiporte Na⁺/H⁺ impulsado por una H⁺-ATPasa de membrana (Sze *y col.*, 1999; Horie y Schroeder, 2004).

2.4.2.2. Compartimentación y excreción iónica.

Papel de los transportadores iónicos en la tolerancia al estrés salino.

En los últimos años se han descrito un gran número de genes que participan en la distribución y compartimentación del sodio en la planta, entre lo que se encuentran las siguientes familias de transportadores: HKT (Berthomieu *y col.*, 2003; Ren *y col.*, 2005; Davenport *y col.*, 2007; Moller *y col.*, 2009; Jha *y col.*, 2010; Ali *y col.*, 2012), NHX (Gaxiola *y col.*, 1999), SOS (Qiu y *col.*, 2002; Shi *y col.*, 2002), AVP (Gaxiola *y col.*, 2001; Zhao *y col.*, 2006) y AHA (Apse *y col.*, 1999). Sin embargo, la mayoría de estos estudios a nivel de estrés salino se han centrado en los transportadores NHXs y HKTs:

•Transportadores HKT. Los transportadores HKT se clasifican en dos subfamilias, la subfamilia-1 (HKT1) que muestra una gran preferencia por el transporte de sodio sobre otros cationes, y la subfamilia-2 (HKT2) que transporta sodio a mayor afinidad, pero exhiben también una mayor permeabilidad para potasio cuando son expresados en sistemas heterólogos (Horie *y col.*, 2009). Un importante número de trabajos realizados en diferentes especies muestran que los genes *HKT* están implicados en el transporte y distribución del sodio a través de la planta (Fairbairn *y col.*, 2000; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Moller *y col.*, 2009; Yao *y col.*, 2010; Mian *y col.*, 2011; Ali *y col.*, 2012). Los estudios realizados en Arabidopsis muestran que mutantes del gen *AtHKT1; 1*, presentan una elevada sensibilidad al estrés salino,

debido a una alta acumulación de sodio en la parte aérea y baja en las raíces (Rus y col., 2004; Sunarpi y col., 2005). Los estudios de localización celular mediante expresión del gen GUS han mostrado que se expresa en las células parenquimaticas que cargan el xilema de raíces y hojas (Sunarpi y col., 2005), por tanto se ha propuesto que participaría regulando la velocidad de transporte del sodio de las raíces a la parte aérea, retirando o reabsorbiendo el ion sodio desde los vasos xilematicos a las células parenquimaticas del xilema de hojas y raíces (Davenport y col., 2007). Los estudios moleculares realizados en tomate en esta familia génica son muy escasos. Recientemente, Asins y col. (2012) han mostrado que los genes SlHKT1; 1 y SlHKT1; 2 (HKT transportadores de clase 1), se encontraban fuertemente ligados a un QTL del cromosoma 7 de tomate que contribuía a la tolerancia al estrés salino en líneas RIL (Recombined Inbred Lines) de tomate (Villalta y col., 2008).

•**Transportadores NHX.** Los transportadores NHX pertenecen a una amplia familia de transportadores monovalentes catión/H⁺ (CPA1), junto con otros miembros cercanos que incluyen los intercambiadores CHX y KEA (CPA2) (Chanroj *y col.*, 2012). El análisis filogenético de esta familia muestra que se encuentran presentes en todos los organismos eucarióticos. En Arabidopsis se han descrito ocho isoformas pertenecientes a tres clases. Dos se encuentran localizados en la membrana plasmática (SOS1/AtNHX7 y AtNHX8) y seis isoformas intracelulares que se encuentran o bien en el tonoplasto de la vacuola (AtNHX1-AtNHX4) o bien en vesículas endosomales (AtNHX5 y AtNHX6) (Bassil *y col.*, 2012). Igualmente, se ha observado que hay una gran similaridad con sus ortólogos en otras especies que van desde *Chlamydomonas* a tomate. El hecho de que se encuentren en grupos filogenéticos tan dispares, que incluyen las algas, sugiere que la función de los transportadores NHXs tienen una función única que se encuentra conservada desde muy temprano en la evolución (Bassil y Blumwald, 2014).

Se acepta de forma general que los transportadores NHXs participan en el transporte o bien de potasio o bien de sodio al interior de la vacuola o vesículas endosomales por el intercambio de H^+ al citosol (transportadores AtNHX1-6) y en el eflujo de sodio fuera de la célula por el intercambio de H^+ al interior celular (transportadores de plasma membrana SOS1/AtNHX7 y AtNHX8) (Leidi *y col.*,

2010; Bassil y Blumwald, 2014). Dado que el genoma del tomate ha sido secuenciado, nos ha permitido identificar aquellos transportadores NHXs presentes. En la actualidad, se han descrito 5 transportadores NHXs, tres NHXs son de Clase I y se encuentran localizados en el tonoplasto vacuolar (SINHX1-3), uno de clase II que se encuentra en vesículas endosomales (SINHX2) (Venema *y col.*, 2003; Rodriguez-Rosales *y col.*, 2008) y uno que se localiza en la membrana plasmática (SISOS1).

Papel de los transportadores SOS. Regulación del sistema SOS.

Como hemos visto anteriormente uno de estos genes de la familia NHX, *AtSOS1*, se encuentra localizado en la membrana plasmática de Arabidopsis (Zhu, 2002). En estos estudios iniciales, se describió la ruta que controlaba la excreción de Na⁺ de la célula en plantas mutantes de Arabidopsis hipersensibles a sal, denominados a estos mutantes SOS (Salt Overly Sensitive), de ahí el nombre de las proteínas implicadas (Zhu, 2002). El proceso de excreción esta principalmente realizado y controlado por 3 genes *SOS* (Figura 4):

•Gen *SOS1*: codifica una proteína para un antiportador Na^+/H^+ localizada en la membrana plasmática, que como hemos visto anteriormente pertenece a la familia NHX (Shi *y col.*, 2000; Qiu *y col.*, 2002; Quintero *y col.*, 2002; Shi *y col.*, 2002). Las mutaciones en *SOS1*, convierten las plantas de Arabidopsis en plantas extremadamente sensibles al estrés salino que requieren mayores niveles de K⁺ para un crecimiento normal (Shi *y col.*, 2000). AtSOS1 es un intercambiador de Na⁺/H⁺ que es específico para Na⁺ y no puede transportar Li⁺ o K⁺ (Qiu *y col.*, 2002, Qiu *y col.*, 2003). La mayor actividad de *AtSOS1* ha sido detectada en la raíz y en las células que rodean el tejido vascular de la planta (Shi *y col.*, 2002). El patrón de expresión de *SOS1*, junto con los resultados obtenidos con mutantes, sugieren que *SOS1* posee distintas funciones. Primero, expulsar el Na⁺ a la vacuola; y tercero, controlar el transporte a larga distancia de Na⁺ entre la raíz y las hojas de la planta.

•Gen SOS2: codifica una proteína del tipo Ser/Thr quinasa (Qiu y col., 2002; Halfter y col., 2000). Se ha demostrado que la actividad quinasa del dominio catalítico de SOS2 situado en el extremo N-terminal de la proteína es requerida para la función de SOS2 en la tolerancia a la salinidad (Qiu y col., 2002). 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). Recientemente, Huertas *y col.* (2012) han mostrado que la sobre-expresión del ortólogo en tomate, SISOS2, inducía la tolerancia al estrés salino en tomate, dando lugar a un incremento de la expresión de SISOS1, así como de los transportadores SINHX2 y SINHX4.

•Gen SOS3: codifica una proteína miristoilada que une calcio y que actuaría como sensor del mismo. Este gen actúa como efector de los mecanismos celulares de señalización por calcio que se genera en el citosol como respuesta al estrés salino. Se ha demostrado que SOS3 interactúa específicamente con la proteína SOS2 formando un complejo mediado por la señal de calcio en respuesta a estrés salino (Qiu *y col.*, 2002). SOS2 y SOS3 son requeridos para la activación de la expresión de SOS1 que a su vez regula la homeostasis iónica en plantas (Qiu *y col.*, 2002). Por tanto, parece que estos tres genes participan en la misma vía de transducción de señales en respuesta al estrés iónico provocado por el NaCl.



Figura 4. Ruta SOS para la regulación de la homeostasis iónica bajo estrés salino. Bajo condiciones de estrés salino, los iones Na^+ 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^+/H^+ de membrana plasmática SOS1 o de los antiportadores vacuolares NHX1 y NHX2, que además parecen contribuir a secuestrar K^+ en la vacuola El estrés salino induce señales de Ca^{2+} que son percibidas por SOS3, el cual activa la quinasa SOS2. La quinasa SOS2 activada fosforila la bomba Na^+/H^+ (SOS1), la cual entonces bombea Na^+ fuera del citosol.

Homeostasis iónica y los transportadores NHXs en la tolerancia al estrés salino. Como hemos comentado anteriormente los transportadores NHXs median el intercambio tanto Na⁺/H⁺ como K⁺/H⁺ (Venema *y col.*, 2002; Apse *y col.*, 2003; Leidi *y col.*, 2010) y por tanto afectando a la nutrición del potasio y la tolerancia al estrés salino. La obtención de plantas transgénicas que sobre-expresaban el gen *AtNHX1* mostró la importancia del proceso de compartimentación intracelular del sodio para incrementar la tolerancia a la salinidad (Apse *y col.*, 1999). Estudios posteriores en otras especies han confirmado que la sobre-expresión de NHX incrementa la tolerancia al estrés salino (Zhang y Blumwald, 2001; Zhang *y col.*, 2001; Ohta *y col.*, 2002; Brini *y col.*, 2007; Rodriguez-Rosales *y col.*, 2008; Liu *y col.*, 2008). Estos datos apoyan la idea que el mantenimiento de un bajo ratio citosólico Na⁺/K⁺ mediante la movilización del exceso de sodio al interior de la vacuola, junto con una extrusión de sodio al apoplasto vía la acción de SOS1/NHX7 podría ser crucial para la tolerancia al estrés salino (ver figura 5).



Figura 5. Homeostasis de los iones $Na^+ y K^+$ de una célula en (a) un suelo normal y (b) salinizado. En células no estresadas, la concentración de K⁺ citoplasmática es muy superior a la del medio. Para ello, el K⁺ es asimilado del medio externo y acumulado en el citoplasma y la vacuola. Parte de este K⁺ va a ser devuelto al medio para así mantener un correcto equilibrio o bien como respuesta a un ajuste osmótico. La presencia de altas concentraciones de Na⁺ en el medio externo, inhibe el flujo de K⁺ al interior de la célula y favorece la entrada y acumulación de Na⁺ en el citoplasma. La célula pone en marcha mecanismos para la devolución del Na⁺ al medio externo o para acumularlo en la vacuola (el grosor de las puntas de flecha indica magnitudes relativas) (Sanchez-Barrera 2005).

Galvez *y col.* (2012) han observado que variedades de tomate silvestre tolerantes al estrés salino (*Solanum pimpinelifolium*) mostraban una mayor expresión basal de los transportadores vacuolares NHXs que la especie sensible a salinidad de tomate *Solanum lycopersicum* cv. Volgogradskij. La tolerancia a salinidad observada

en las plantas transgénicas que sobre-expresan los transportadores NHXs no parece depender de la especie ni de la isoforma de NHX usada. Posiblemente esta tolerancia observada es debida a la regulación de la expresión de los NHXs endógenos y/o a los cambios en la homeostasis del potasio provocados por los altos niveles intracelulares de Na⁺ y a una posible regulación de la selectividad catiónica (Bassel y Blumwald, 2014). Así, por ejemplo, el transportador endosomal/vesicular NHXs puede transportar preferencialmente K^+ comparado con Na⁺ (Venema v col., 2003). El mecanismo preciso por el cual las interacciones sodio y potasio son reguladas permanece poco claro. La sobre-expresión de estos transportadores ha mostrado una acumulación iónica diferencial entre plantas transgénicas y silvestres, que podría reflejar una función primaria de los transportadores NHX vacuolares en el proceso del mantenimiento del ajuste osmótico, tanto durante el crecimiento en condiciones normales como salinas. Sorprendentemente, cuando el doble mutante de perdida de función de Arabidopsis *nhx1nhx2*, al que le faltan dos transportadores vacuolares, fue sometido a un estrés salino moderado (30 mM de NaCl), dio lugar a una mejora en el crecimiento en comparación con el control (Bassil v col., 2012). Por otro lado, el silenciamiento o eliminación de las isoformas de NHX endosomal han dado lugar a plantas sensibles al estrés salino (Leidi y col., 2010; Bassil y col., 2013). Los mutantes de falta de función de la actividad V-ATPasa tienen una capacidad reducida para almacenar NO_3^- o tolerar concentraciones toxicas de Zn^{2+} , no mostrando sensibilidad a altas concentraciones salinas. Sin embargo, si la mutación era en una V-ATPasa localizada en las vesículas endosomales de la red del trans-Golgi si se inducia la sensibilidad a salinidad (Krebs y col., 2010). Recientemente, en nuestro grupo, García-Garma y col. (2015) han observado que cultivos celulares de tabaco tolerantes a altas concentraciones salinas mostraban una importante inducción del proceso endocítico, con una gran acumulación de sodio en pequeñas vesículas citoplasmáticas. Este y otros estudios apuntan a la importancia que puede tener el sistema de transporte de vesículas en el incremento de la tolerancia al estrés salino (Mazel y col., 2004; Hamaji y col., 2009; Hernández y col., 2009).

Cabe esperar que dada la importancia que tiene el potasio tanto como cofactor de ciertas enzimas, en el balance de carga así como compuesto osmótico, sus concentraciones deben ser controladas de una manera muy precisa (Leigh, 2001). Dados los potenciales electroquímicos del tonoplasto y de la membrana plasmática, el transporte del potasio al citosol es pasivo, pero requiere energía para ser acumulado en la vacuola en concentraciones superiores a 20 mM (Walker *y col.,* 1996; Carden *y col.,* 2003). Para mantener constante el potasio citosólico, tanto la absorción desde el apoplasto como el intercambio con la vacuola, son esenciales (Walker *y col.,* 1996).

Por último, el mantenimiento de la concentración del potasio citosólico es también crucial para evitar la muerte celular (Shabala *y col.*, 2006). Demidchik *y col.* (2010), han propuesto que en condiciones salinas, la caída del potasio celular producido por un eflujo de potasio al apoplasto mediado por transportadores iónicos que son activados por ROS, daría lugar a la inducción de meta-caspasas que activarían el proceso de muerte celular programada. Igualmente, en células de tabaco adaptadas a altas concentraciones, la caída del potasio celular parecía inducir la actividad de meta-caspasa, produciendo la activación de la muerte celular (García-Garma *y col.*, 2015).

3. Estrés oxidativo y señalización mediada por ROS.

3.1. Producción de ROS (especies reactivas de oxígeno).

En los tejidos verdes de las plantas, la fuente más importante de producción de ROS son los cloroplastos y peroxisomas (Foyer y Noctor, 2003; Asada, 2006). Sin embargo, en plantas que son crecidas en oscuridad o en tejidos no verdes, la principal fuente de ROS son las mitocondrias (Maxwell *y col.*, 1999; Moller *y col.*, 2001). Está generalmente aceptado que los ROS son producidos de forma continua en las células vegetales y si son acumulados pueden inducir daños oxidativos en las proteínas, ADN, y lípidos (Fridovich, 1986; Wise y Naylor, 1987; Imlay y Linn, 1988; Halliwell y Gutteridge, 2001). Además, la producción de ROS tiene un papel clave en la traducción de señales en respuesta a diferentes estreses bióticos y abióticos tanto en plantas como en animales (Moller *y col.*, 2007; Swanson *y col.*, 2011).

Cualquier condición que produzca algún cambio en la homeostasis redox va a ser capaz de inducir un estrés oxidativo en los vegetales. El oxígeno es fundamental para la vida aerobia, pero la acumulación de los ROS durante el metabolismo aerobio tales como el peróxido de hidrógeno, el radical superóxido, el oxígeno sínglete y los radicales hidroxilo pueden ser peligrosos para el metabolismo celular (Halliwell, 2006; Kim *y col.*, 2008).

- •Oxigeno sínglete. El oxígeno sínglete (${}^{1}O_{2}$) no es un radical, normalmente es generado de una forma fotodinámica en una reacción de transferencia de energía entre una molécula en estado de triplete excitado y el oxígeno molecular. El oxígeno sínglete es la forma más reactiva del oxígeno, con el oxígeno un estado energético superior. El oxígeno sínglete puede oxidar directamente proteínas, ADN y lípidos (Halliwell, 2006). Es capaz de oxidar muy rápidamente moléculas que contienen dobles enlaces carbono-carbono para formar hidroperóxidos y endoperoxidos. Los cloroplastos producen ${}^{1}O_{2}$ durante los procesos fotosintéticos a nivel del fotosistema (Moller *y col.*, 2007). Además, en condiciones de fotoinhibición, el principal fotosistema dañado es el fotosistema II como resultado de la acumulación de ${}^{1}O_{2}$.
- •**Radical superóxido**. Otra especie de oxi-radicales son los radicales superóxido, los cuales no son tóxicos *per se*, la toxicidad de ellos se deriva por su capacidad de ser transformados rápidamente a la forma extremadamente reactiva de radicales hidroxilo (HO[•]). El radical superóxido (O_2^{--}) está implicado en diversos procesos fisiológicos mediados por el oxígeno, tales como la peroxidación lipídica, la inactivación viral, el daño de membranas celulares, rotura del ADN, etc. (Fridovich, 1986; Fernández-García y Olmos, 2011). Durante la fotosíntesis, los cloroplastos producen O_2^{--} en el fotosistema I y II (Moller *y col.*, 2007). En la mitocondria, la producción de O_2^{--} tiene lugar en los complejos I y III. Se ha visto que entre el 1-5% del oxígeno consumido por mitocondrias aisladas resulta en la producción de ROS (Moller *y col.*, 2007). En los peroxisomas, la producción de O_2^{--} es consecuencia de su metabolismo normal, con importante producción en varias reacciones claves del metabolismo peroxisomal (Del Rio *y col.*, 2006; Moller *y col.*, 2007). El radical superóxido puede ser también producido por la acción de la actividad de las enzimas de membrana plasmática NADPH oxidasas (Moller *y col.*, 2007).
- •**Peróxido de hidrógeno.** El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es una molécula relativamente estable bajo condiciones normales, su vida media es aproximadamente 1 ms, mientras que otras formas de ROS (radical superóxido, radicales hidroxilo y oxigeno sínglete) tienen una vida media más corta, aproximadamente 2-4 μ s (Bhattacharjee, 2005). Esta relativa estabilidad y permeabilidad a través de las membranas, hace que el peróxido de hidrógeno sea un buen mensajero secundario para la señalización mediada por ROS (Neil *y col.*, 2002; Foyer y Noctor 2009). El

peróxido de hidrógeno es producido en diversos compartimentos subcelulares. También puede ser acumulado en el apoplasto, debido a la acción coordinada de las NADPH oxidasas junto con las superóxido dismutasas (SODs) que producen H₂O₂. En la pared celular, el peróxido de hidrógeno puede ser usado para los procesos de lignificación.

•Radical hidroxilo. El radical hidroxilo (HO[•]) es considerado como el más dañino de los diferentes ROS producidos por la célula vegetal. El radical hidroxilo es un radical fuertemente oxidante que puede reaccionar con diversos componentes de la célula, por tanto dañando su estructura molecular. Los radicales hidroxilo pueden ser generados por reacciones de tipo Haber-Weiss por la interacción de H₂O₂ and O₂⁻⁻ o bien vía reacción de Fenton en presencia de iones de hierro o cobre.

3.2. 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), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), peroxidasa (POX), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), mientras que el glutatión (GSH), el ascorbato (ASC), el α -tocoferol y el β -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.

3.3. 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 O2⁻⁻ y H2O2, 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 H₂O₂ en la mitocondria y en 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).

En los últimos años se ha propuesto que el sistema redox celular funcionaria como un eje crucial en el proceso de respuesta al estrés, tanto biótico como abiótico (Foyer y Noctor, 2012; Bartoli *y col.*, 2013). Igualmente, los procesos de tolerancia cruzada son frecuentes en los vegetales y están normalmente ligados a la producción de ROS tales como el peróxido de hidrógeno, dando lugar a señales oxidativas y la regulación de la expresión de genes a través del eje de señalización redox (Figura 7).



Figura 7. La señalización redox como eje de la respuesta al estrés (según Bartoli y col., 2013).

4. Fotosíntesis y salinidad.

El término "fotosíntesis" representa un proceso físico-químico por el cual las plantas transforman compuestos inorgánicos en compuestos orgánicos usando energía solar (Munns *y col.*, 2006). Es decir, los carbohidratos son obtenidos a partir de dióxido de carbono y agua, generando oxigeno:

$$6CO_2 + 6H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

El conocimiento de este proceso es de vital importancia para entender las relaciones entre los seres vivos y la atmósfera así como el balance de la vida sobre la tierra. Los compuestos reducidos de carbono, son la base para la incorporación de elementos primordiales como nitrógeno, fosforo y azufre, generando compuestos orgánicos como ácidos grasos, aminoácidos, nucleótidos, y otros carbohidratos más

complejos que se ensamblan para formar proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos que constituyen la biomasa de cualquier organismo vivo (Lehninger *y col.*, 1995).

El estrés salino da lugar a una alteración del balance osmótico, iónico y nutricional de la planta. Todo esto afecta al transporte electrónico de la fotosíntesis y a la actividad de las enzimas fijadoras del carbono. La capacidad de las plantas para adaptarse o aclimatarse a los diferentes cambios ambientales está directamente o indirectamente relacionada con la plasticidad de la fotosíntesis, en combinación con otros procesos (Chaves *y col.* 2011). Por tanto, resulta esencial la identificación de los factores limitantes de la fotosíntesis, así como los procesos reguladores bajo condiciones de estrés, los cuales son esenciales para minimizar el impacto negativo de los estreses. La salinidad altera la absorción de agua de la planta y la biosíntesis de ABA en las hojas, dando lugar a una rápida respuesta en la conductancia estomática. La fotosíntesis puede estar limitada a varios niveles, desde la difusión de CO_2 (a través del cierre y apertura estomática), y a nivel fotoquímico (estabilidad/reparación del fotosistema I y II, eliminación de especies reactivas de oxígeno, etc.) y el metabolismo del carbono, actividad de la RuBisCO, RuBisCO activasa, etc. (Saibo *y col.*, 2009).

Diferentes estudios moleculares han mostrado que estos cambios fisiológicos producidos durante el estrés salino dan lugar a la alteración de la expresión de genes implicados en la fotosíntesis, tales como CAB (chlorophyll a/b binding proteins), la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) y la RuBisCO activasa (RCA), las cuales parecen tener un papel relevante en la tolerancia al estrés salino (Wong *y col.*, 2006; Zhang *y col.*, 2001, 2008). Otro componente importante es el proceso de reacción lumínica, la luz es capturada por los complejos LHCs que transferirán la energía a los diversos complejos proteínicos como el complejo OEC (Oxygen Evolving Complex). Diversos estudios han mostrado que la salinidad produce alteraciones en los genes y proteínas del complejo proteínico LHC-CAB, OEC y de la proteína OEE (Oxygen Evolving Enhancer Protein) y causa cambios en la actividad del fotosistema II (PSII). Igualmente, diferentes proteínas que forman parte del PSII, tales como PSII D1 o CP47 son también afectadas por el estrés salino.
En la última década, la introducción de las "omicas" ha permitido realizar estudios que abarquen la expresión de miles de genes y proteínas al mismo tiempo. Así, se han realizado estudios de proteómica y transcriptómica en un importante número de especies vegetales. El análisis y la clasificación funcional de los genes y proteínas identificadas en estos estudios, muestran que entre los grupos más relevantes afectados por la salinidad están los genes y proteínas implicados en la fotosíntesis y el metabolismo de carbohidratos. Estos estudios han sido realizados en plantas modelo como Arabidopsis (Nishiyama *y col.*, 2012) y *Thellungiella halophila* (Zhang *y col.*, 2008), en árboles con un importante interés económico como son los *Populus* (Chen *y col.*, 2012) y en especies agrícolas con un relevante interés económico como el tomate (Sun *y col.*, 2010), remolacha (Yang *y col.*, 2012), tabaco (Razavizadeh *y col.*, 2009), arroz (Parker *y col.*, 2006; Kim *y col.*, 2005), patata (Aghaei *y col.*, 2008) y trigo (Wang *y col.*, 2008; Caruso *y col.*, 2008). El análisis de estos estudios muestra que una de las principales respuestas frente al estrés abiótico es la modificación de la fotosíntesis y del metabolismo del C (Zhang *y col.*, 2012).

Implicaciones en la eficiencia del Fotosistema II. Los organismos fotosintéticos poseen dos fotosistemas, Fotosistema I (PSI) y Fotosistema II (PSII). Cada fotosistema está formado por una antena colectora de energía luminosa (Light Harvesting Complexes-LHC) y un centro de reacción fotoquímico que incluye una molécula de clorofila *a*. Ambos fotosistemas se diferencian por el pico de absorción de la clorofila: el Fotosistema I lo presenta a 700 nm; el Fotosistema II, a 680 nm. La eficiencia fotoquímica del PSII para captar la energía de la luz y convertirla a carbohidratos, se ve reducida cuando hay limitaciones a la entrada de CO₂ desde la atmosfera, con lo que hay un exceso de energía de las reacciones de la fotosíntesis que dependen de la luz. En este caso aumenta la energía que se disipa en forma de calor (NPQ) y cuando la intensidad luminosa es demasiado alta hay una inhibición de la fotosíntesis. Mishra *y col.* (1991), Masojidek y Hall (1992), Everard *y col.* (1994) y Singh y Dubey (1995), indicaron que el estrés salino inhibe la actividad de PSII.

5. Giberelinas.

Las giberelinas (GAs) son hormonas vegetales y son conocidas como uno de los mayores estimuladores del crecimiento, que actúan como reguladores endógenos controlando diversos procesos del desarrollo de las plantas, incluyendo la germinación de semillas, elongación del tallo, expansión de las hojas, floración, etc. (Achard y Genschik, 2009). Su designación es GA seguida de un número (GA₁, ₂, ₃,... n), según el orden cronológico de su descubrimiento (MacMillan y Takahashi, 1968), y hasta la fecha han sido identificadas más de 150 GAs en plantas superiores, hongos y bacterias, aunque solo unas pocas GAs tienen actividad biológica (http://www.planthormones.bbsrc.ac.uk/gibberellin_information2.htm), (Yamaguchi, 2008).

Historia. En Japón, en plantaciones de arroz se suelen encontrar plantas que destacan del resto de la plantación por presentar una altura muy superior a la normal. Los japoneses asociaron este fenotipo a una enfermedad que denominaron «bakanae» y cuya traducción literal significa «plantón loco». Los primeros datos sobre la aparición de esta enfermedad se remontan a finales del siglo XIX. Entre los años 1919 y 1926, el investigador E. Kurosawa descubrió que la causa de esta enfermedad tenía su origen en una substancia química producida por un hongo, logrando reproducir los efectos de esta enfermedad aplicando filtrados del hongo a plántulas sanas de arroz. En los años 30, H. W. Wollenweber corrige la clasificación taxonómica del hongo nombrándola en su estadio sexual *Gibberella* fujikuroi (Sawada).

En 1935, Teijiro Yabuta y Yusuke Sumiki consiguen aislar e identificar químicamente este compuesto, y deciden bautizarla como giberelina, en honor al nombre genérico del hongo que la producía (Yabuta y Sumiki, 1938). Posteriormente, en 1965, se logró por vez primera el aislamiento de la giberelina, pero no partiendo del hongo, sino de una planta superior, concretamente, de la semilla de judía, *Phaseolus vulgaris*, quedando demostrado lo que hasta entonces se suponía: los vegetales superiores producían también en mayor o menor medida, dicha substancia.

5.1. Estructura química.

Las GAs constituyen un amplio grupo de ácidos diterpenos tetracíclicos naturales cuya estructura básica está constituida por un anillo de *ent*-giberelano, clasificándose en dos grupos en base al número de átomos de carbono presentes en su

estructura química; (i) las GAs C-20, con 20 átomos de carbono en el esqueleto de *ent*-giberelano y (ii) las GAs C-19, con 19 átomos de carbono por perder el carbono 20 mediante el metabolismo (*ent*-20-nor-giberelano) (Figura 8).



Figura 8. Estructura química de (A) ent-giberelano y (B) ent-20-nor-giberelano.

5.2. Actividad biológica.

Actualmente, entre las GAs identificadas, solo unas pocas tienen actividad biológica, y curiosamente, fueron de las primeras en ser descubiertas, GA₁, GA₄, GA₃ y GA₇ (Hedden y Phillips, 2000). Estas GAs activas poseen concentraciones que se encuentran entre valores de ng g⁻¹ a μ g g⁻¹ de peso fresco (Hedden, 2012), mientras que el resto de GAs podemos definirlas como los compuestos precursores o de degradación de las GAs activas y normalmente se encuentran presentes a concentraciones superiores a las propias formas activas (Kobayashi *y col.*, 2000, Hedden y Thomas, 2012).

Todas las GAs poseen un esqueleto de *ent*-giberelano y se clasifican en dos grupos, las que poseen 19 átomos de carbono (GAs C_{19}) y las que poseen 20 átomos de carbono (GAs C_{20}). Las GAs C_{20} se diferencian entre sí por el grado de oxidación de C_{20} , que puede encontrarse como grupo metilo (-CH₃), aldehído (-CHO), carboxílico (-COOH) o hidroximetilo (-CH₂OH). Las GAs C_{20} con un grupo aldehído en el C_{20} pueden perder este carbono por descarboxilación oxidativa dando lugar a GAs C_{19} . Dentro de este grupo de C_{19} encontramos las GAs activas, siendo las principales GA₁, GA₄, GA₃, y GA₇ (Talón, 2000) (Figura 9). Las GAs activas que se encuentran en la mayoría de las especies en plantas superiores son GA₁ y GA₄, aunque en función de la especie, una resulta mayoritaria sobre la otra, mientras que

GA₃ y GA₇ se han encontrado sólo ocasionalmente en un número reducido de especies. En *Arabidopsis thaliana* y algunos miembros de la familia Cucurbitácea GA₄ es mayoritaria (Yamaguchi, 2008), mientras que GA₁ es predominante en tabaco (Jordan *y col.*, 1995; Vidal *y col.*, 2001) y guisante (Ross *y col.*, 1992). Respecto a las GAs C20, éstas no poseen actividad biológica *per se* a menos que sean metabolizadas a GAs C19 3β-hidroxiladas. La β-hidroxilación en la posición C-3 del *ent*-giberelano de las GAs C19 determina la existencia de actividad biológica mientras que la β-hidroxilación 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 9. Estructura química de las giberelinas bioactivas GA1, GA4, GA3 y GA7.

5.3. Biosíntesis de las giberelinas.

Tanto el metabolismo como el catabolismo de GAs han sido ampliamente descritos en la bibliografía (Lange, 1998; Kamiya y García-Martínez, 1999; Hedden y Phillips, 2000; Yamaguchi y Kamiya, 2000), siendo estas rutas bastante complejas (Figura 10). La ruta de biosíntesis en plantas superiores se desarrolla en tres compartimentos celulares distintos (Yamaguchi, 2008), implicando tres tipos distintos de enzimas: ciclasas, monooxigenasas dependientes del citocromo P450 y dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (20DDs). El precursor de la biosíntesis de GAs es el GeranilGeranilDifosfato (GGPP), derivado del Isopentenil Difosfato del metabolismo de isoprenoides.

5.3.1. Síntesis de ent-kaureno a partir de GGPP en los plastidos.

En la primera etapa el GGPP se convierte a *ent*-kaureno en una reacción de ciclación que tiene lugar en dos pasos; i) catalización por la enzima *ent*-copalildifosfato sintasa (CPS) en la que se convierte el GGPP a *ent*-copalil difosfato (CDP) y ii) catalización por la enzima *ent*-kaureno sintasa (KS) en la que se convierte el CDP al producto final *ent*-kaureno (MacMillan, 1997; Hedden y Phillips, 2000; Talón, 2000).

5.3.2. Conversión de ent-kaureno a GA₁₂ en el retículo endoplasmático.

Esta segunda etapa que es catalizada por monooxigenasas dependientes de citocromo P450, ocurre en la membrana del retículo endoplasmático (Yamaguchi, 2008). El *ent*-kaureno que es oxidado por las dos enzimas citadas anteriormente, produce GA₁₂, la primera GA de la ruta que está considerada como el precursor común a todas las giberelinas en plantas. A continuación, el ácido *ent*-kaurenóico es oxidado a ácido *ent*-7 α -hidroxikaurenóico, el cual, tras una contracción del anillo β , produce GA₁₂-aldehído que es oxidado a GA₁₂. Estos tres últimos pasos de la vía son catalizados por KAO. Finalmente, la GA₁₂ se puede convertir a GA₅₃ por la enzima GA 13-hidroxilasa (GA13ox).

5.3.3. Formación de GAs de 19 y 20 carbonos en el citoplasma.

Esta tercera etapa que tiene como punto de partida la GA_{12} puede ser diferente según la especie, e incluso puede variar entre tejidos de una misma planta (Hedden y Phillips, 2000; Yamaguchi, 2008; Magome *y col.*, 2013). Las dos rutas principales son:

Ruta de la hidroxilación temprana en el C-13. La GA₁₂ es oxidada en su C-13 por la enzima GA13ox (una monoxigenasa P450) transformándose en GA₅₃. Posteriormente, el C-20 de la GA₅₃ sufre dos oxidaciones consecutivas catalizadas por GA20ox generándose GA₄₄ y GA₁₉. A continuación, se produce la eliminación del C-20 de GA₁₉ sintetizándose GA₂₀, que es la primera GA C-19 de la ruta. La incorporación de un grupo hidroxilo en la posición 3β de GA₂₀ va a producir GA₁, (GA de elevada actividad biológica). La GA con actividad biológica GA₃ puede obtenerse a partir de una vía alternativa, formada a partir de GA₂₀ al ser oxidada

por GA3ox transformándose a GA₅, que a su vez se oxida por otra GA3ox dando lugar a GA₃ (Yamaguchi, 2008).

• Ruta de la no hidroxilación temprana en el C-13. La GA₁₂ es oxidada en su C-20 por la enzima GA20ox dos veces dando GA₁₅ y GA₂₄, sucesivamente. Posteriormente, se elimina el C-20 de GA₂₄ dando GA₉. Este paso también esta catalizado por la enzima GA20ox. A continuación, la incorporación de un grupo hidroxilo en la posición 3β de GA₉ produce GA₄ (compuesto con actividad biológica); éste proceso es catalizado por la enzima GA3ox. Al final de esta ruta, y al igual que en la ruta de la hidroxilación temprana en el C-13, las GAs C-19 se desactivan de forma irreversible mediante la 2β-hidroxilación, catalizada por la GA2ox donde la GA₄ se transforma en la inactiva GA₃₄. También, en una ramificación de la ruta metabólica principal, se puede formar otra GA con actividad biológica, la GA₇, formada a partir de GA₉ vía el intermediario 2,3-didehidro-GA₉ por acción de GA3ox.



Figura 10: Vías principales del metabolismo de GAs en plantas superiores. Los grupos funcionales introducidos o modificados en cada etapa se indican en rojo. Las GAs bioactivas están señaladas en cuadros verdes. Las enzimas que catalizan estas reacciones son: *ent*-copalildifosfato sintasa (CPS), *ent*-kaureno sintasa (KS), *ent*-kaureno oxidasa (KO), *ent*-kaurenóico oxidasa (KAO), GA 3-oxidasas (3ox), GA 20-oxidasas (20ox), GA 13-hidroxilasa (13ox) y GA 2-oxidasas (2ox) (Olszewski *y col.*, 2002; Hedden y Phillips, 2000; Yamaguchi y Kamiya, 2000 - Modificada).

5.4. Desactivación de las giberelinas.

Se han identificado varios mecanismos de desactivación de las GAs, siendo el más común el de la 2β-hidroxilación, catalizado por las GA 2-oxidasas (GA2ox).

Las GA2ox oxidan el C-2 de sus substratos originando compuestos 2β hidroxilados inactivos (Ross *y col.*, 1995). La importancia de estos enzimas en la desactivación de GAs bioactivas ha sido demostrada por estudios que muestran que su sobreexpresión se traduce en plantas de fenotipo enano deficientes en GAs (Rieu *y col.*, 2008). De esta forma, los precursores inactivos GA₉ y GA₂₀ y las GAs bioactivas GA₄ y GA₁ pueden transformarse en los productos inactivos GA₅₁, GA₂₉, GA₃₄ y GA₈ (Yamaguchi, 2008), (Figura 11).



Figura 11. Mecanismo de desactivación enzimática de GAs bioactivas o de conversión de sus precursores a formas inactivas. Mecanismo de 2β -hidroxilación y posterior oxidación a GA-catabolitos (Hedden y Phillips, 2000; Nakaminami *y col.*, 2003).

Las GAs son desactivadas también por otros dos mecanismos enzimáticos, la epoxidación y la formación de metil éster (Yamaguchi, 2008; Hedden, 2012). Ambos mecanismos realizan una función catabólica dentro de la regulación de la síntesis de GAs en los procesos de desarrollo de la planta. En estos mecanismos participan tanto las GAs epoxidasas, que catalizan la 16α ,17-epoxidación, como las GAs

metiltransferasas (GAMTs), que catalizan la metilación del grupo carboxilo C-7 generando ésteres metilados de GAs (Figura 13).



GA₄-metíl éster

Figura 12. Mecanismos enzimáticos de desactivación de GAs bioactivas (GA₄). i) La epoxidación (flechas azules) y ii) la formación de esteres metilados de GAs (flecha verde) (Yamaguchi, 2008).

5.5. Regulación de la ruta de biosíntesis.

5.5.1. Homeostasis de las giberelinas.

Los niveles de GAs bioactivas en plantas se pueden mantener dentro de un rango limitado por la retroalimentación y la regulación de alimentación directa del metabolismo de GAs (Hedden y Phillips, 2000; Olszewski *y col.*, 2002; Yamaguchi y Kamiya, 2000). El nivel de GAs bioactivas es probable que se mantenga mediante la modulación de su síntesis y su catabolismo. Sin embargo, este mecanismo homeostático puede eludirse cuando es necesario el aumento de la producción de GAs bioactivas durante el desarrollo de la planta (Yamaguchi y Kamiya, 2000).

La regulación transcripcional de los genes implicados en el metabolismo de las GAs tiene lugar mediante un mecanismo de retroalimentación negativa en el caso de los genes biosintéticos (GA 20-oxidasa y GA 3-oxidasa), o positiva en el caso de los genes catabólicos (GA -2oxidasa) de forma que la homeostasis se mantiene a través de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (GA20ox, GA3ox y GA2ox) (Figura 13) (Yamaguchi, 2008).



Figura 13: Esquema que muestra la regulación homeostática de la biosíntesis de GAs. La barra-T representa la inhibición por retroalimentación negativa de los genes de biosíntesis (GA 200xidasa y GA 30xidasa) y la flecha de color rojo representa la retroalimentación positiva de los genes que regulan el catabolismo (GA 20xidasa) (Yamaguchi y Kamiya, 2000. Modificada).

5.5.2. Regulación mediante otras hormonas.

Varias hormonas suelen participar en la regulación de un proceso biológico determinado. Por ejemplo, las GAs bioactivas y las auxinas regulan la elongación del tallo, positivamente. En el guisante (*Pisum sativum*), la auxina indol-3-acético (IAA) es esencial para el mantenimiento de los niveles de GA₁ en los entrenudos alargados (Ross *y col.*, 2000). La decapitación (eliminación de la yema apical, la fuente de auxina) reduce drásticamente el nivel de GA₁ endógeno en los entrenudos y la aplicación de IAA a las plantas decapitadas invierte estos efectos completamente. La inducción de los niveles GA₁ por IAA está relacionada con un aumento en la abundancia del transcrito de *PsGA3ox1* y una disminución en los niveles de transcripción de *PsGA2ox1* (O'Neill y Ross, 2002). Una interacción auxina-GA similar ocurre en los tallos de plantas de tabaco (Wolbang y Ross, 2001).

5.6. Mecanismos de señalización de giberelinas.

En los últimos años, la identificación de mutantes enanos con problemas de germinación ha permitido caracterizar tanto genes implicados en la síntesis como en la señalización de esta hormona. Los mutantes deficientes en la síntesis de GAs germinan mal y muestran fenotipo enano, un color verde oscuro, etc., defectos que van a revertir cuando se le añade GAs de forma exógena. Sin embargo, los mutantes que tienen afectada la ruta de señalización de GAs que presenta un fenotipo parecido,

no revierten su fenotipo tras la aplicación de GAs. Estos mutantes de señalización suelen presentar altos niveles de esta hormona, debido a que los genes implicados en los últimos pasos de síntesis, tienen alterada su regulación por retroalimentación. En la actualidad, se han identificado mutantes con un fenotipo alargado que presentan la perdida de función de los genes GA2-oxidasa que catalizan la inactivación de GAs activas o de los genes *DELLA*. En ausencia de GAs activas, las proteínas DELLA que son reguladores negativos de la señalización de GAs que se acumulan en el núcleo, van a actuar inhibiendo la trascripción de los genes que codifican para las proteínas que intervienen en procesos dependientes de GAs. La señal de esta hormona va a ser activada por la unión de GA a su receptor GID1 (Figura 14).



Figura 14. Modelo de la interacción de GAs con su receptor soluble GID1. (Hedden, 2008 modificado).

5.6.1. Proteínas DELLA: inhibidoras de la ruta de GAs.

Como hemos comentado en el párrafo anterior, las proteínas DELLA están localizadas en el núcleo, donde bloquean la expresión de los genes regulados por GAs y actúan como represores en la ruta de señalización. Esta proteína pertenece a la familia GRAS de factores de transcripción específicos de plantas y presentan un dominio altamente conservado. El nombre DELLA fue acuñado en base a un corto tramo de aminoácidos (D-E-L-L-A) en su extremo N-terminal, que está bien conservada entre todas las especies vegetales (Locascio *y col.*, 2013). 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).

Los represores DELLA como RGA, GAI de Arabidopsis y SLR1 de arroz son miembros de la familia GRAS. Homólogos de estos genes han sido identificados en otras especies como trigo, maíz, cebada y tomate (*SlDELLA*), presentando estas proteínas un elevado grado de conservación, lo que podría indicar una regulación común. Mutantes de pérdida de función en estos genes (*rga-24* y *gai-t6* de Arabidopsis), *slr1* de arroz, *sln1* de cebada presentan un fenotipo de plantas tratadas con exceso de GAs, presentando tallos más largos y floreciendo antes que sus correspondientes silvestres. Sin embargo, la mutación por ganancia como los mutantes gai-1, rht, etc., presentan un fenotipo enano y floración tardía. Todas las mutaciones expuestas afectan al dominio DELLA, por lo que se le asignó el papel de regulador negativo en la ruta de señalización (Dill *y col.*, 2001; King *y col.*, 2001).



Figura 15. Estructura de la proteína DELLA. La imagen muestra los dominios y subdominios conservados involucrados en la unión a GID1 (azul), la unión diana (naranja), la localización nuclear (gris), y la unión a SLY1/GID2 (verde).

5.6.2. Receptor de GAs: GID1.

El descubrimiento del receptor soluble de GAs fue gracias a la identificación del gen *GID1* (Gibberellin-Insensitive Dwarf1) en plantas de arroz. Los mutantes *gid1* presentaban un fenotipo enano, con niveles altos de GAs y de la proteína DELLA, no recuperando el fenotipo silvestre cuando se le adicionaba GAs de forma exógena (Ueguchi-Tanaka *y col.*, 2005).

Modelo de interacción entre GAs, receptor (GID1) y proteínas DELLA. Según el modelo actual (Figura 16) para la ruta de señalización de GAs supone 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. Por tanto, podemos decir que las GAs inhiben al inhibidor transcripcional DELLA. El modelo de señalización se comporta de la siguiente forma, en presencia de GAs se

produciría la unión de estas al receptor GID1, formando un complejo, el cual va a secuestrar a la proteína DELLA, de forma que la planta va a crecer. Sin embargo, o bien en ausencia de GAs, o bien porque estas no se puedan unir a su receptor, no se va a producir la destrucción de DELLA, lo que dará lugar a su acumulación.



Figura 16. Modelo de la ruta de señalización de GAs. En ausencia de GAs bioactivas, las proteínas DELLA reprimen la respuesta a GAs. En presencia de GAs bioactivas, el receptor GID1 se une a GA, promoviendo su interacción con la proteína DELLA. El complejo GA-GID1-DELLA se une a una ligasa E3 SCF (1), activando la ubiquitinación y la degradación de DELLA por el proteasoma 26S. Las proteínas DELLA también pueden ser inactivadas a través de la vía independiente de la proteólisis en ausencia de F-box AtSLY1/OsGID2 (2). La degradación o inactivación final de DELLA, reprime la respuesta a GAs (Achard y Genschik, 2009).

5.7. La sumoilación de la proteína DELLA regula la respuesta al estrés salino independiente de los niveles de GAs bioactivas.

La sumoilación es un proceso de modificación post-traduccional que tiene lugar en ciertas proteínas. Este proceso es debido a una unión covalente de una proteína SUMO (Small Ubiquitin related Modifier) con una proteína diana. Todo el proceso es relativamente complejo e incluye diferentes pasos enzimáticos (Navatchkova *y col.*, 2012). A diferencia del proceso de ubiquitinación, que induce la degradación de la proteína por el sistema del proteosoma 26S, la sumoilación parece conferir estabilidad a las proteínas a las que se une. Recientemente, se ha visto que el proceso de sumoilación puede tener un papel muy relevante en la respuesta a diferentes estreses, entre ellos el estrés salino (Castro *y col.*, 2012). Conti *y col.* (2008) observaron que dobles mutantes de Arabidopsis que tenían una expresión nula en dos proteasas SUMO, OST1 y OST2, mostraban una inhibición del crecimiento radicular cuando eran expuestas a 100 mM de NaCl, resultando ser más sensibles al tratamiento salino que las plántulas silvestres. Posteriormente, al profundizar en el análisis de estos mutantes, Conti *y col.* (2014) han descrito un mecanismo de control del crecimiento mediado por DELLA y que puede ser regulado de forma independiente a las giberelinas. Según este modelo, el proceso de sumoilación estaría controlando la respuesta rápida al estrés salino. El modelo que han propuesto estos autores se puede observar en la figura 17:



Figura 17. Modelo del proceso de acumulación de la proteína DELLA dependiente del proceso de sumoilación e independiente de GAs. En condiciones de estrés salino, la proteína DELLA puede ser rápidamente sumoilada uniéndose al receptor GID en la zona de tapadera, dando lugar a una estabilización de la proteína DELLA que inhibiría rápidamente el crecimiento celular.

¿Cómo funciona este modelo en estrés salino? En primer lugar, el estrés salino induciría un rápido proceso de sumoilación de la proteína DELLA. Posteriormente, la proteína DELLA-SUMO es capaz de unirse al receptor de GAs (GID) a través de una región SIM (SUMO Interaction Motif) presente en la región N terminal de la proteína GID (ver Figura 17). Esto va a permitir que la proteína DELLA se acumule y estabilice, inhibiendo el crecimiento celular. Según estos autores, este sistema actuaria principalmente, como una respuesta rápida de la planta, dando lugar a una rápida reducción de la elongación celular. Sin embargo, el proceso de respuesta mediado por el descenso de la concentración GAs en estrés salino (Achard *y col.*, 2006), es un proceso más lento que actuaría *a posteriori*, dado que es más complejo y necesita la regulación de la ruta metabólica de las giberelinas.

5.8. Mecanismos transcripcionales regulados por proteína DELLA.

La proteína DELLA está localizada en el núcleo, por ello se ha pensado que tendría algún papel en el proceso de la expresión génica. Sin embargo, no hay evidencias directas de que la proteína DELLA pueda unirse directamente al ADN. Esto ha sugerido que podría actuar interaccionando con otros factores de transcripción. En los últimos años, se ha propuesto que las proteínas DELLA regulan la transcripción génica mediante al menos tres mecanismos:

Secuestrando factores de transcripción con capacidad de unión al ADN, induciendo o reprimiendo los genes diana de dichos factores. Así, la proteína DELLA puede actuar bloqueando la actividad del factor de transcripción uniéndose a él directamente, como es el caso del proceso de regulación de la elongación del hipocotilo mediada por los factores de transcripción PIFs (Phytochrome interacting factors; De Lucas *y col.*, 2008; Feng *y col.*, 2008; Gallego-Bartolome, 2010), que pertenecen a la familia de factores de transcripción bHLH.



Figura 18. Mecanismo de inhibición de la elongación del hipocotilo por la interacción de la proteína DELLA con los factores de transcripción PIFs. En ausencia de GAs, la proteína DELLA se acumula, secuestrando a PIF y produciéndose la inhibición de la elongación del hipocotilo. En presencia de GAs, estas se van a unir al receptor GID1, secuestrando a DELLA, y liberando a PIF, produciéndose por tanto la elongación del hipocotilo (Lucas *y col.*, 2008).

Dentro de esta misma familia también existen otros factores de transcripción que pueden ser secuestrados por DELLA, como son ALC (ALCATRAZ), implicado en el desarrollo del fruto de Arabidopsis (Arnaud *y col.*, 2010) o SPT (SPATULA), implicado en la germinación de la semilla (Gallego-Bartolomé *y col.*, 2010; Josse *y col.*, 2011). La proteína DELLA puede interaccionar con otras familias de factores de transcripción como BES1 y BZR1, implicados en la ruta de señalización dependiente de brasinosteroides (Bai *y col.*, 2012; Gallego-Bartolome *y col.*, 2012; Li *y col.*, 2012). También se ha descrito que es capaz de secuestrar al factor de transcripción EIN3 de la familia EIL, implicado en el *cross-talk* giberelinas-etileno, afectando al desarrollo del gancho apical formado durante el desarrollo inicial del hipocotilo en oscuridad (An *y col.*, 2012). En la figura 18 se muestra un ejemplo explicativo de este mecanismo de actuación con el factor de transcripción PIF.

La proteína DELLA también puede actuar inhibiendo la actividad de un factor transcripción que no se liga directamente al ADN, como en el caso de los factores de transcripción de la familia JAZ (jasmonate-ZIM-domain), implicados en la ruta de señalización del jasmonato (Hou *y col.*, 2010; Wild *y col.*, 2012; Yang *y col.*, 2012).



Figura 19. Papel de la proteína DELLA como modulador de la señal de jasmonato. El receptor JAZ, cuando no hay jasmonato en el medio, actúa secuestrando a MYC2, por tanto no hay respuesta de genes de la síntesis del JA. Cuando hay JA en el medio, JAZ se va a unir a él, liberando a MYC2. Esta unión se va a traducir en una respuesta de los genes del JA. Por otro lado, cuando la proteína DELLA está presente en el medio en ausencia de GAs, esta se va a unir a JAZ, liberando a MYC2 y produciéndose la respuesta de genes. La presencia de GAs va a dar lugar a la no respuesta de genes de la síntesis de JA debido al secuestro de MYC2 por JAZ (Hou *y col.*, 2010).

En este mecanismo la proteína DELLA secuestraría a JAZ, el cual liberaría al factor de transcripción MYC2, induciendo la respuesta a jasmonato (ver figura 19). Este mecanismo se ha revelado de gran importancia en la respuesta mediada por giberelinas mediante la modulación de la respuesta y señalización a patógenos a través de la interacción DELLA-JAZ (Hou *y col.*, 2010; Wild *y col.*, 2012).

Recientemente, se ha descrito que la proteína DELLA puede actuar como un activador de la transcripción mediante la unión a factores de transcripción de la familia IDD (INDETERMINATE DOMAIN) que se unen directamente al ADN. Así, se ha visto que el complejo DELLA/IDD induciría la expresión de genes regulados de forma positiva por las giberelinas como es el gen *SCL3* (SCARECROW-LIKE 3), implicado en el desarrollo radicular en Arabidopsis, actuando a nivel de la endodermis controlando la elongación celular en la zona de elongación/diferenciación de la raíz (Heo *y col.*, 2011). A su vez, *SCL3* también puede interaccionar con IDD, suprimiendo su propia expresión (Yoshidaa *y col.*, 2014). En la figura 20 se muestra este mecanismo.



Figura 20. Modelo de la proteína DELLA como activador del factor de transcripción IDD. DELLA puede actuar como activador de los factores de transcripción IDD (indeterminate). Cuando la proteína DELLA se acumula, esta se va a unir a IDD, que es capaz de reconocer la región promotora que regula genes como *SCL3* (ScareCRow like), gen que está implicado en el desarrollo de la raíz (Hideki *y col.*, 2014).

5.9. Implicación de las giberelinas en la respuesta al estrés salino.

En general, los efectos adversos de la salinidad se traducen en una disminución del crecimiento de la planta, que se refleja en un menor tamaño de hoja y una menor altura. Además, el riego de cultivos con aguas salinas produce una inhibición del rendimiento y crecimiento del fruto (Greenway y Munns, 1980).

Muchos de estos aspectos están controlados por la respuesta hormonal a las variaciones de las condiciones medioambientales. Así, Munns y Tester (2008) han sugerido que la interacción hormonal entre el ABA y las giberelinas podría tener un papel crucial en el control del crecimiento y desarrollo vegetales en condiciones salinas y este control podría estar mediado por las proteínas DELLA. Estudios recientes han demostrado la implicación de las giberelinas en la adaptación de las plantas al estrés salino (Magome v col., 2008). Sin embargo, son escasos los estudios sobre el papel que realizan las GAs en la adaptación de las plantas al estrés abiótico. Estudios previos (Koornneef y Van der Veen, 1980; Magome y col., 2004) han demostrado que plantas de Arabidopsis deficientes en la biosíntesis de GAs son tolerantes al estrés salino. Estos mutantes de Arabidopsis, gal y ddfl, muestran diferentes fenotipos (enanismo, hojas oscuras, floración tardía, etc.) los cuales son recuperados por aplicación exógena de GAs. Magome v col. (2004) describe que la rápida capacidad de respuesta del gen DDF1 inducida bajo condiciones de alta salinidad (Sakuma y col., 2002) y el incremento de sobreexpresión de dicho gen a la aplicación del tratamiento salino, nos indica su implicación en la tolerancia al estrés. Dichos autores demostraron que tanto gal como ddfl, cuando eran crecidos en altas concentraciones de NaCl, su fenotipo no se veía afectado a los trece días de la aplicación de dicho tratamiento, mientras que si se le añadía GA₃ de forma exógena, el porcentaje de supervivencia de dichas plantas se veía muy afectado, lo que puso de manifiesto que la ausencia de GAs en dichas plantas le estaba confiriendo una tolerancia a la salinidad. Recientemente estos mismos autores han propuesto que el mecanismo de acción del gen DDF1 sería regulando la expresión del gen AtGA2ox7. Así, el incremento de la expresión de AtGA2ox7 daría lugar a una reducción de la concentración de GAs bioactivas, que induciría una acumulación de proteínas DELLA. Estos autores han propuesto el siguiente modelo de regulación en el proceso de adaptación a altas concentraciones salinas (Figura 21) (Magome y col., 2008):



Figura 21. 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).

5.10. Integración de los sistemas redox y el metabolismo de las giberelinas en el desarrollo de la planta en condiciones salinas.

En los últimos años se ha demostrado la importante función de la proteína DELLA en condiciones de estrés ambiental (Achard *y col.*, 2006; 2008). Así, se ha observado que en estrés salino se produce una estabilización de DELLA que reduce el crecimiento de la planta, lo que resulta beneficioso para su supervivencia (Achard *y col.*, 2006). Recientemente, Achard *y col.* (2009) han propuesto un modelo en Arabidopsis (Figura 22), donde las proteínas DELLA reprimirían la acumulación de ROS actuando sobre los sistemas enzimáticos que controlan las proteínas implicadas en la eliminación de ROS, incrementando por tanto, una reducción de la elongación celular y su tolerancia al estrés salino. Además, la acumulación de proteínas DELLA es un sistema de control feedback del nivel de las enzimas del metabolismo de las GAs, controlando su homeostasis. Contrariamente, cuando los niveles de GAs son altos, se induce la degradación de DELLA induciéndose la elongación celular (Achard *y col.*, 2009). Como actúan las GAs en el control del nivel de ROS es todavía desconocida. Posiblemente, los ROS actúen como segundo mensajero y module los niveles de calcio o bien sobre la expansión de la pared celular disminuyendo la resistencia de la

pared a la presión osmótica (Achard *y col.*, 2008; Hernández *y col.*, 2010). Sea cual sea el mecanismo, es evidente que las GAs contribuyen a la respuesta del estrés salino mediante un preciso control de los niveles de ROS, afectando por tanto al crecimiento vegetal y la tolerancia.



Figura 22. Modelo de acción en la homeostasis de GAs por señalización por luz y respuesta a estreses bióticos y abióticos.

6. El nitrógeno.

6.1. La importancia del nitrógeno para las plantas.

6.1.1. El nitrógeno como elemento mineral esencial para las plantas.

El nitrógeno (N) es el nutriente mineral más importante en las plantas (Marschner, 1995). Tanto su disponibilidad como la forma con que se presenta en el suelo (nitrato (NO₃⁻), amonio (NH₄⁺)) son parte de los factores externos más importantes que van a modular el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Bloom, 2015). El N es un componente esencial de la clorofíla y de los aminoácidos, los cuales forman la base de las proteínas. Además, el N, es el principal constituyente de los ácidos nucleicos y los nucleótidos. Dependiendo de la especie, la fase de desarrollo y del órgano, la concentración de N en la planta puede variar entre 2 y 5% de su peso seco. Además, la concentración de N en los diferentes tejidos de la planta debe estar equilibrada respecto a la concentración de carbono, lo cual se traduce en que las tasas de absorción, asimilación y removilización de N deben estar bien coordinadas con la tasa de asimilación de CO₂ y removilización de compuestos carbonados (Huppe y Turpin, 1994). Por su parte, la fotosíntesis, es otro proceso que determina en gran

medida el crecimiento y desarrollo de las plantas, y que está altamente influenciado por los factores ambientales que rodean a las plantas, como es la disponibilidad de N en la zona radicular (Stitt y Krapp, 1999).

6.1.2. La fertilización nitrogenada en la agricultura.

La mayor parte de los suelos, tanto naturales como de sistemas agrícolas, no tienen el suficiente N para proporcionar a las plantas la máxima velocidad de crecimiento y alcanzar la máxima productividad (Epstein y Bloom, 2005). Es por ello, que una de las prácticas agrícolas más comunes para incrementar el rendimiento de las cosechas, sea abonar con fertilizantes nitrogenados. Una gran cantidad de fertilizantes nitrogenados son aplicados a los cultivos de todo el mundo cada año, y en algunos de éstos cultivos, como son los cereales, la fertilización nitrogenada supone el mayor coste de la actividad productiva. En el año 2009, se aplicaron 116 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados a nivel mundial, mientras que de P_2O_5 y K_2O se aplicaron 38 y 22 millones de toneladas, respectivamente (FAO, 2015). Se prevé que el uso mundial de N aumente un 1.4% cada año hasta 2018 (FAO, 2015).

Problemas medioambientales que produce la fertilización nitrogenada.

Necesidad de aumentar el uso eficiente del nitrógeno. La aplicación de fertilizantes es una forma de reponer el nitrógeno que extraen del suelo los cultivos, tanto para su crecimiento como en la cosecha. Gracias a la fijación sintética del nitrógeno atmosférico, el uso de fertilizantes minerales nitrogenados en las últimas cinco décadas se ha extendido rápidamente, lo que ha ayudado a la rápida expansión de la actividad agrícola y a incrementar considerablemente el rendimiento de las cosechas (Good *y col.*, 2004). En la actualidad, se estima que entre el 50 y 70% del nitrógeno aplicado se pierde del sistema suelo-planta (Garnett *y col.*, 2009). Este exceso de N se pierde por escorrentía superficial o en forma de NO₃⁻ lixiviado en el agua subterránea, o bien por desnitrificación microbiana, proceso por el cual el nitrato es convertido a óxidos de nitrógeno (N₂O y NO) y nitrógeno elemental. El N que se pierde en el suelo por lixiviación puede llegar hasta ríos y mares, cambiando la cadena trófica, y contribuyendo al efecto invernadero.

En lugares como el África subsahariana, los fertilizantes nitrogenados son infrautilizados, las plantas extraen más del suelo de lo que se repone a través de fertilizantes (Liu *y col.*, 2010). En estos casos, tiene lugar una paulatina degradación de la tierra y la disminución de los rendimientos. Por lo expuesto anteriormente, sería necesario obtener un incremento en la eficiencia del uso del nitrógeno (UEN), con el objetivo final de conseguir la máxima biomasa por unidad de N usada por planta, evitando pérdidas al medio ambiente y aumentando el rendimiento de las cosechas (Xu *y col.*, 2012).

Moll *y col.* (1982) definieron el UEN como el rendimiento de grano por unidad de N disponible en el suelo (incluyendo el N residual presente en el suelo y el fertilizante). Este UEN se puede dividir en dos procesos cuando se quiere tener una interpretación fisiológica: 1) eficiencia de absorción de N (**AbEN**; capacidad de la planta para absorber N del suelo en forma de iones de NO_3^- y NH_4^+) y 2) la eficiencia de utilización de N (**UtEN**; capacidad de utilizar N, es decir asimilar el N inorgánico y removilizarlo en forma orgánica a los órganos de interés).

Uso Eficiente de Nitrógeno (UEN) = AbEN + UtEN

El aumento del UEN en los cultivos va a ser un componente importante en cualquier estrategia utilizada con la finalidad de reducir las pérdidas de N de fertilizantes en la agricultura (Garnett *y col.*, 2009; Matson *y col.*, 1998). Un ejemplo seria, con alta concentración de N en la zona radicular, la variación genética en el UEN en maíz parece estar relacionada con la eficiencia de absorción de N, mientras que con una baja concentración de N, estaría relacionada con las diferencias en la utilización (asimilación y removilización) de N (Moll *y col.*, 1982). Las raíces son el órgano clave de la planta para la mejora tanto de AbEN como de UtEN, por determinar la absorción de NO₃⁻ y NH₄⁺, y por tener un papel crítico en la asimilación y transporte de NO₃⁻ a otras partes de la planta (Xu *y col.*, 2012; Garnett *y col.*, 2009). Entre las distintas formas de aumentar el UEN a través de la raíz encontramos; modificar el ratio PA/R, la morfología de la raíz y su vigor (longitud de raíces por volumen, proporción entre raíces profundas y en superficie, simbiosis con micorrizas, número y densidad de los pelos radiculares), y aumentar la expresión de los transportadores de NO₃⁻ y NH₄⁺ (Garnett *y col.*, 2009; Werner *y col.*, 2010).

6.2. La concentración y forma de nitrógeno como factores clave en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

La disponibilidad de nitrógeno y la adaptación de las plantas a la carencia de nitrógeno. En la naturaleza, las plantas han desarrollado multitud de mecanismos para hacer frente a las diferentes variaciones respecto a las concentraciones de nitrógeno que vamos a encontrar en suelos de sistemas no agrícolas (Jackson *y col.,* 2008). El principal mecanismo de adaptación que vamos a encontrar es una disminución del crecimiento, que se va a producir como consecuencia de un desequilibrio entre la asimilación de carbono y nitrógeno (Huppe y Turpin, 1994). La adaptación de las plantas a las diferentes concentraciones de nitrógeno presentes en el suelo presenta varios niveles:

i) Adaptación morfológica a escala de planta completa. La concentración de N es uno de los factores ambientales que participan en el programa de desarrollo de la planta para influir en la distribución de recursos entre parte aérea y las raíces (Deak y Malamy, 2005; Raghothama, 1999; Stitt *y col.*, 2002). En general, una mayor distribución de recursos a la raíz se va a incrementar en relación con la parte aérea, cuando la concentración de N presente en el suelo esté limitada (Miller y Cramer, 2005). Esto va a compensar la deficiencia de N al tener la planta la oportunidad de obtener más N del suelo (Reynolds y Dantonio, 1996). Esta respuesta adaptativa de las plantas es una consecuencia de los cambios metabólicos que se producen en la parte aérea y que conllevan un mayor transporte de carbohidratos a la raíz (Hermans *y col.*, 2006).

ii) Adaptación morfológica de la raíz. La concentración de N en el suelo y el estado nutricional de la planta van a determinar el patrón de ramificación de la raíz y definirán las estrategias de la raíz para la adquisición de N, que en última instancia dependerá de transportadores específicos de NO_3^- y NH_4^+ . Estos transportadores no sólo van a transportar estos iones, sino también van a precibir las concentraciones externas de ellos, actuando como reguladores del crecimiento del sistema radicular (Desnos, 2008; Lima *y col.*, 2010; Zhang *y col.*, 1999).

La fuente de N en el suelo $(NO_3^- vs. NH_4^+)$ determina su adaptación al medio. Cuando la concentración de N presente en el suelo es muy baja (problemas de deficiencia) o muy alta (problemas por toxicidad), será la concentración y no la fuente quien determine el crecimiento y desarrollo de la planta. En cambio, cuando la concentración de N presente en el suelo no es deficiente ni toxica para la planta, será la fuente de N quien determine el crecimiento y desarrollo de la planta (Bloom, 2015).

Las plantas absorben N del suelo, principalmente en las formas inorgánicas de nitrato y amonio, siendo un factor determinante de su adaptación al medio, el ratio en que ambas formas son absorbidas por las plantas (Boudsocq y col., 2012; Britto y Kronzucker, 2013). En los ecosistemas naturales, el NO_3^- es la forma predominante presente en los suelos aireados y alterados, mientras que el NH4⁺ es la forma predominante que va a estar presente en aquellos suelos con las siguientes condiciones (Mengel y Kirkby, 1987): (1) bajo pH de suelo que disminuve sustancialmente la oxidación microbiana de NH_4^+ ; (2) baja concentración de oxígeno (por ejemplo, suelos inundados); (3) baja materia orgánica, como fuente de carbón para las bacterias, (4) suelos secos y (5) bajas temperaturas de suelo que disminuyen la nitrificación, debido a la baja actividad de los microorganismos de suelo. No obstante, el equilibrio entre ambas formas de N está en gran parte determinado por la capacidad de los microorganismos específicos del suelo en convertir NH4⁺ a NO3⁻ (por ejemplo, las especies de Nitrosomonas, Nitrosospiras y Nitrobacter) y también por la distribución de estos organismos en el suelo (Oaks, 1992; Hiorns *v col.*, 1995). La forma de N que predomina en los suelos agrícolas suele ser el NO₃, aunque suelen ser ambas formas, el NO_3^- y el NH_4^+ , las aportadas externamente a los cultivos, teniendo un papel clave en su rendimiento final. En el suelo, la concentración de NO_3^{-1} varía dependiendo del tipo de ecosistema, variando su concentración desde valores inferiores a 100 µM en los ecosistemas naturales, a valores mayores de 10 mM en los ecosistemas agrícolas (Rubio-Asensio y col., 2012). Sin embargo, la concentración de NH₄⁺ presente en los suelos suele estar comprendida entre los siguientes valores, 0.11 -0.55 mM. Dependiendo de la forma de nitrógeno aplicada, las plantas responden tanto a escala fisiológica como morfológica para ajustar su crecimiento y desarrollo (Walch-Liu y col., 2005). La preferencia de las plantas entre NO_3^- y NH_4^+ depende de diferentes factores que pueden ser tanto ambientales como fisiológicos (Britto y Kronzucker, 2013). Sin embargo, la aportación de NH_4^+ con respecto al NO_3^- , es en términos energéticos más favorable para las plantas, aunque su uso indiscriminado va a producir un efecto toxico para la planta (Bloom v col., 1992; Britto y Kronzucker,

2002). Diferentes especies han mostrado tener respuestas diferentes según la fuente de N aplicada; aunque estas especies aumentaron su crecimiento al recibir NO_3^- como única fuente de N (Figura 23A), la entrada en producción en el caso del trigo es acelerada al recibir únicamente NH_4^+ (Figura 23B) (Bloom, 2015).

Para conocer la respuesta de las plantas a cualquier factor externo, biótico o abiótico, se debe de tener en cuenta las preferencias de la planta por una u otra fuente de nitrógeno, así como la respuesta de dichas plantas al estrés impuesto por la aplicación de una u otra fuente de N.



Figura 23. Efecto de la fertilización nitrogenada (concentración y fuente) en el crecimiento y desarrollo del trigo. A) Plantas de trigo (cv. Yecora rojo) (68 días tras la germinación) afectadas por la concentración y fuente de N; de izquierda a derecha; 2 mM NO_3^- , 0.2 mM NO_3^- , 2 mM NH_4^+ y 0.2 mM NH_4^+ . B) Espigas de trigo (cv. Veery 10) después de 38 días de crecimiento en solución nutritiva con 0.2 mM de NO_3^- o 0.2 mM de NH_4^+ como fuente única de N. (Bloom *y col.*, 2010). Todos los cationes en la solución nutritiva tienen la misma concentración. La barra de calibración equivale a 10 mm.

6.3. Nitrógeno y salinidad.

En general, la fertilización con nitrógeno tiene un papel destacado en la tolerancia al estrés salino, siendo necesario un aporte suplementario de nitrógeno para compensar y corregir los desequilibrios nutricionales causados por la salinidad (Botella *y col.*, 1997; Gomez *y col.*, 1996). En muchas especies de plantas sometidas a estrés salino, estos desequilibrios se deben principalmente a una disminución en la absorción de nutrientes como es el NO_3^- (Aslam *y col.*, 1984; Botella *y col.*, 1997). Cadahíá (1968), señaló la existencia en plantas de tomate de una interacción entre C1⁻ y NO_3^- , de forma que al aumentar la concentración de NO_3^- en el medio radicular disminuía la concentración de C1⁻ en la planta. En cuanto a la asimilación de

nitrógeno en condiciones salinas, no existe acuerdo en los distintos artículos que encontramos en la bibliografía. Diferentes autores han señalado que la presencia de NaCl en el medio induce deficiencia de nitrógeno (Helal y Mengel, 1979). Por otro lado, otros autores han descrito que la presencia de NaCl favorece la asimilación de nitrógeno (Langlade *y col.*, 1973; Luque *y col.*, 1981).

Según Gomez *y col.* (1996), plantas de pimiento aumentaron tanto su crecimiento como el rendimiento del fruto cuando se aumentaba el suministro de NO₃⁻. Por otro lado, Lewis *y col.* (1989) sugirieron que plantas de maíz y trigo crecidas con NH₄⁺ mostraban una mayor sensibilidad a este estrés. Bajo condiciones de estrés salino, la aplicación de NH₄⁺ como única fuente de N, redujo el crecimiento de la raíz y aumentó la concentración de aminoácidos a costa del contenido de proteínas en plantas de guisante (Speer *y col.*, 1994). Diferentes especies herbáceas (*Pisum sativum, Helianthus anuus, Glycine max*) han mostrado ser menos sensibles al estrés salino cuando se les aplicaba NO₃⁻ como única fuente de N en comparación con la fuente de NH₄⁺ (Bourgeais-Chaillou *y col.*, 1992; Ashraf y Sultana, 2000; Frechilla *y col.*, 2001). Una posible explicación a los distintos resultados encontrados en la bibliografía podría ser el gran desconocimiento que existe a la hora de poder distinguir entre los procesos de toxicidad producidos en la raíz por el propio NH₄⁺ y/o por la salinidad.

El NO₃⁻, una vez absorbido, puede ser acumulado en la vacuola o asimilado a compuestos orgánicos nitrogenados. Cuando el NO₃⁻ es acumulado en la vacuola, no sólo se comporta como una fuente de almacenamiento importante de nitrógeno, sino que también está implicado en mantener el turgor celular (Miller y Smith, 2008). Sin embargo, poco se sabe sobre cómo influye el efecto de la salinidad en el proceso de asimilación de NO₃⁻ por parte de la planta, un paso clave en la tolerancia a la salinidad que está aún por esclarecer. Popova *y col.* (2003) mostraron mediante un análisis de expresión de genes que la presencia de sal en el medio puede estimular la expresión de los transportadores de NO₃⁻. Los autores Bourgeais-Chaillou *y col.* (1992) y Cramer y Lips (1995) demostraron que la nitrato-reductasa (NR), la primera enzima en la reducción del NO₃⁻, se comportaba de forma diferente según la especie, en respuesta al estrés salino.

6.4. Interacción del metabolismo del nitrógeno con el metabolismo de las giberelinas y la influencia de la nutrición nitrogenada en plantas de tomate.

El efecto de las GAs sobre el metabolismo del nitrógeno podría actuar a diferentes niveles a través de su interacción con las rutas de señalización implicadas en la absorción, asimilación y removilización del nitrógeno (Kiba *y col.*, 2011; Sánchez-Fernández *y col.*, 1997), y a través de sus efectos en la fotosíntesis y respiración (Nagel y Lambers, 2002, Pellny *y col.*, 2008). En *Nicotiana sylvestris*, Pellny *y col.* (2008) observaron que la disponibilidad de N modificaba la expresión de genes pertenecientes a las familias de génicas *GA2ox* y *GA3ox*. Esto sugiere que el N podría estar modulando el metabolismo de GAs y por tanto su influencia en el crecimiento vegetal. Till *y col.* (2008) observaron que la presencia de un alto contenido de N se percibía en la raíz como un incremento en el ratio aminas/nitrato, esto incrementaba la concentración de GAs presentes en la planta, manteniendo bajos niveles de DELLA, e incrementado, como resultado final, la biomasa de la parte aérea de la planta (Figura 24a). Al contrario, baja concentración de N, daba lugar a baja concentración de GAs presente en la planta que incrementaba las proteínas DELLA, inhibiendo el crecimiento de la planta (Figura 24b).



Figura 24: Regulación del crecimiento y desarrollo de la parte aérea (PA) por influencia del N en plantas silvestres (*Nicotiana sylvestris***) (Pellny y col., 2008).** El esquema está basado en la importancia de la degradación de las proteínas DELLA (represoras de crecimiento) mediante ácido giberélico (GA) en el control del crecimiento de la PA de las plantas (Achard y col., 2006; Sun y Gubler, 2004).

En estudios realizados en plantas de tomate silvestres (*Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker) y en mutantes *gib3* y *gib1* (deficientes en GAs; Koornneef *y col.,* 1990), demostraron que en condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno y fosfato podemos obtener una alta proporción de distribución de biomasa en la raíz (RMR; Root Mass Ratio) (Brouwer, 1963; Boot *y col.,* 1992; Van der Werf *y col.,* 1993) que va a depender de la concentración de GAs presentes en la planta.

Por otro lado, el uso agrícola de los inhibidores de GAs para reducir el crecimiento de la parte aérea bajo condiciones de alto suministro de N apoya la idea de que las GAs están involucradas en la respuesta de la asignación al suministro de N (Marschner, 1986). En el estudio mencionado anteriormente, las plantas de tomate fueron crecidas en condiciones de bajo suministro de NO_3^- para forzar a las plantas a crecer a la misma baja tasa de crecimiento, donde se encontraron diferencias en la distribución de biomasa en la raíz entre los tres genotipos de tomate, lo que indicaría que el alto valor de RMR de los mutantes es un efecto directo de las GAs y no una consecuencia indirecta de una tasa de crecimiento más baja o una disminución de la capacidad para asimilar NO_3^- (Nagel *y col.*, 2001 a). La persistencia de las diferencias en RMR de los mutantes era un efecto directo de las GAs, lo que era independiente del suministro de NO_3^- (Nagel *y col.*, 2001 a; b).

Nagel *y col.* (2002) investigaron cómo las diferencias en el crecimiento y la morfología entre plantas de tomate silvestre de rápido crecimiento, y plantas del mutante deficiente en GAs de crecimiento lento, *gib1*, se reflejaban en el número y tamaño de sus células. Sus resultados mostraron que cuando es bajo tanto el suministro de NO_3^- como la concentración de GAs endógenas en la planta, se va a reducir el número y tamaño de células de las hojas, mientras que el tamaño y el número de células del córtex de la raíz aumentan. Por lo tanto podemos decir que los efectos de un bajo suministro de N sobre el tamaño y el número de células en las hojas y raíces no dependían de los niveles endógenos de GAs.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

ΙΙ. ΗΙΡΌΤΕSIS Υ ΟΒJΕΤΙVOS

Hipótesis.

Nuestra hipótesis de trabajo está basada en que el metabolismo de las giberelinas juegue un papel importante en la tolerancia a salinidad mediante el control del desarrollo y crecimiento vegetal. Por otra parte, dada la influencia de la fuente de nitrógeno en el crecimiento y desarrollo de las plantas, debe existir un sistema bien regulado que coordine la síntesis de GAs con el transporte y asimilación de N. Este mecanismo podría controlar el estado de desarrollo de la planta y la respuesta al ambiente (salinidad).

Objetivos generales.

El objetivo principal de esta tesis ha sido profundizar en el conocimiento de los mecanismos de tolerancia de las plantas al estrés abiótico, centrándonos en estrés por salinidad, identificando los factores que influyen en la adaptación a altos niveles salinos (como podría ser el metabolismo del nitrógeno) y el papel de las giberelinas en dicho proceso. El objetivo final de esta tesis es que los conocimientos obtenidos sirvan para sentar las bases y poder obtener en el futuro plantas con respuestas más eficientes frente a estrés salino y de los mecanismos que lo controlan. Para ello se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1.

Estudiar la respuesta a salinidad en mutantes de señalización y síntesis de GAs.

- Estudiar el papel de las giberelinas en el crecimiento en plantas de tomate silvestres y mutantes del metabolismo de GAs y su implicación en la adaptación a la salinidad. Para ello, se han determinado y cuantificado los contenidos de GAs, además de la expresión de los genes implicados en su metabolismo.
- Realizar un análisis transcriptómico de la respuesta de los mutantes de tomate al estrés salino a nivel foliar y radicular.

Objetivo 2.

Abordar los mecanismos intrinsecos que pueden estar participando en la tolerancia a salinidad.

- Estudiar el efecto de la salinidad en los procesos fotosintéticos para identificar los procesos de respuesta y adaptación de la fotosíntesis a dicho estrés, así como su interacción con la síntesis de GAs.
- Estudiar el efecto de la salinidad en parámetros de desarrollo y crecimiento.
- Estudiar las posibles alteraciones subcelulares que tienen lugar en la tolerancia a altas concentraciones salinas de los mutantes de GAs. Estudiar las modificaciones celulares y ultraestructurales mediante técnicas de microscopia electrónica de transmisión y microscopia laser confocal. Igualmente se estudiaran nuevos mecanismos de captación y almacenamiento subcelular de sodio mediante técnicas *in vivo* usando microscopia de laser confocal.

Objetivo 3.

Identificar mecanismos de tolerancia a salinidad en plantas de tomate que confieren un aumento en el uso eficiente del nitrógeno y están regulados por la biosíntesis de GAs.

- Identificar y estudiar los mecanismos implicados en la tolerancia al estrés salino en plantas de tomate, en un escenario donde están implicados tanto la fuente de nitrógeno (N-NO₃⁻ vs. N-NH₄⁺), como la de biosíntesis de giberelinas (GAs).
- Estudiar del efecto de la salinidad en los parámetros fotosintéticos de la planta y su interacción con la síntesis de GAs.
- Estudiar el efecto de la salinidad en parámetros de desarrollo y crecimiento

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material vegetal.

Todos los experimentos de esta tesis se han realizado en plantas de tomate cv. Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L). Las líneas utilizadas en estos estudios han sido: i) la planta silvestre (wild type, wt); ii) el mutante procera (*pro*) y iii) el mutante giberelinas-3 (*gib3*) (Tabla 4). Estas líneas han sido previamente descritas en el apartado 1.3 de la introducción.

Mutante	Clase	Efecto /	Origen	
	hormonal	Función del gen		
pro	GA DELLA	Contiene una mutación puntual en un gen que convierte el dominio DNA- binding putativo VHVD del gen del tomate DELLA en VHEID	LA0565 cv. Condine Red (Bassel <i>y col.</i> , 2008)	
gib3	GA	Deficiencia de las GAs. Defectuoso para <i>ent</i> -kaureno sintasa	LA2895 cv. Moneymaker (Bensen y Zeevaart, 1990)	

Tahla 4	Mutaciones	hormonales	introgressdas	en cv	Micro-Tom
I abla 4.	wrutaciones	normonales	mitiogresauas	en cv.	where-rom.

2. Condiciones de crecimiento y tratamientos.

2.1. Germinación.

Para la germinación, las semillas se colocaron en microtubos de 2 mL con agua destilada, salvo en el caso de las semillas *gib3* que en vez de utilizar agua destilada se utilizaba una solución 100 μ M de ácido giberélico (GA₃). Las semillas se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente durante 24 horas. Al día siguiente, wt y *pro* fueron esterilizadas con lejía al 20% durante 20 minutos, y las semillas *gib3* se esterilizaron con lejía al 50% durante 40 minutos, seguido de varios lavados con agua destilada para eliminar cualquier rastro de lejía. A continuación, las semillas wt y *pro* se colocaron sobre papel de filtro humedecido con agua destilada en placas Petri, mientras que el mutante *gib3* se germinó en un papel humedecido con 100 μ M GA₃. A estas semillas se procedió a quitarles la testa con una cuchilla antes de traspasarlas a las placas Petri, utilizando una lupa binocular. La germinación se llevó a cabo en una cámara de condiciones controladas en oscuridad a una temperatura de 27°C. Las semillas tardaron en germinar entre 5 y 6 días. Después de la germinación, las plántulas se trasplantaron a bandejas con vermiculita, con una última aplicación de 100 μ M GA₃ a las plántulas del mutante *gib3*. Las bandejas se cubrieron con film transparente para evitar la pérdida de humedad y se colocaron en una cámara de crecimiento controlada, con un fotoperiodo de 15 horas de luz (350 μ mol m⁻² s⁻¹), 26°C y 60% de humedad relativa y 9 horas de oscuridad a 18-20°C y 80% de humedad relativa.

2.2. Cultivo hidropónico.

Transcurridos 10-12 días en vermiculita, las plántulas fueron traspasadas a disolución nutritiva en contenedores de 15 L de capacidad, preparada siempre con agua destilada. Las disoluciones nutritivas eran cambiadas semanalmente, y se mantuvieron en continua aireación, con el pH entre 6.0-6.5. La disolución nutritiva utilizada en los experimentos de salinidad fue la descrita en la tabla 5, mientras que la disolución utilizada en los experimentos de nitrógeno fue la disolución descrita en la tabla 5 pero modificando las concentración y fuente de nitrógeno (Epstein y Bloom, 2005).

Compuesto	Concentración final	Compuesto	Concentración final
KH ₂ PO ₄	0.25 mM	KCl	50 µM
K ₂ HPO ₄	0.75 mM	H ₃ BO ₃	25 μM
KNO3	2 mM	MnSO ₄ .H ₂ O	2 μΜ
NH ₄ Cl	1 mM	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2 μΜ
CaSO ₄	1.25 mM	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.5 μΜ
MgSO ₄	0.75 mM	Na ₂ MoO ₄	0.5 μΜ
		Fe-EDDHA	0.2 g L ⁻¹

Tabla 5. Concentración de las sales utilizadas para la preparación de la disolución nutritiva.

2.3. Experimentos de salinidad.

Transcurridos 10 días en la disolución nutritiva descrita en la tabla 5, se procedió a la aplicación de los tratamientos salinos. Se establecieron tres niveles; 0, 75 y 150 mM NaCl. La combinación de los tres niveles de NaCl y los tres genotipos resulto en un total de 6 tratamientos. Cada nivel de NaCl se aplicó en 2 contenedores, resultando un total de 6 plantas por tratamiento (Figura 25). Con este diseño


experimental se estudió la interacción de la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) con el metabolismo de las giberelinas (wt, *pro* y *gib3*). El experimento se repitió 8 veces.

Figura 25. Plantas wt y los mutantes *pro* y *gib3* crecidas en medio hidropónico en cubetas de 15 L y aireación continúa en la cámara de crecimiento controlado.

2.4. Experimentos de nitrógeno.

Para estudiar la interacción de la fertilización nitrogenada (concentración y fuente) con la salinidad y el metabolismo de las giberelinas usamos un diseño experimental que combinaba los siguientes factores; concentración de nitrógeno (2 y 0.2 mM), fuente de nitrógeno (NO₃⁻ y NH₄⁺), nivel de NaCl (0 y 75 mM) y genotipo de tomate (wt, *pro* y *gib3*). En los tratamientos que sólo llevaban NH₄⁺ o 0.2 mM de NO₃⁻, el potasio se ajustaba con K₂SO₄ para igualar la concentración del tratamiento con 2 mM NO₃⁻. La combinación de concentración, fuente, salinidad y genotipo resultó en un total de 24 tratamientos. Para cada combinación de estos factores se usaron dos contenedores, lo que daba un total de 6 plantas por tratamiento (Figura 26). Los diferentes genotipos pasaron de la vermiculita a contendores con los tratamientos de nitrógeno definidos (concentración y fuente) y a los 10-12 días se aplicó el NaCl. El experimento se repitió 5 veces.

En los experimentos de nitrógeno no se les aplicó el tratamiento salino de 150 mM NaCl, porque en el tratamiento de 75 mM NaCl ya se afectaban bastante las plantas, entonces con 150 mM NaCl las plantas se dañarían por el efecto de la alta

concentración salina donde no se podría diferenciar el efecto de los tratamientos de nitrógeno (fuente y concentración).



Figura 26. Plantas wt y los mutantes *pro* y *gib3* crecidas en medio hidropónico con los tratamientos de nitrógeno en cubetas de 15 L y aireación continúa en la cámara de crecimiento controlado.

3. Determinación de parámetros fisiológicos de desarrollo.

3.1. Velocidad de crecimiento relativo.

La velocidad de crecimiento relativo (VCR) es la medida principal del análisis de crecimiento, y se define como la ganancia de biomasa por unidad de biomasa y tiempo. Cada 3-4 días a partir de los 24 días después de la siembra (DDS) y hasta el final del experimento (45-50 DDS) se realizaron registros del peso fresco de las plantas. La primera medida coincide con el inicio de la aplicación de NaCl y la última medida coincide con la cosecha final de plantas para la determinación de la biomasa y de distintos metabolitos en hoja, tallo y raíz.

Para la determinación de la VCR se utilizó la siguiente fórmula propuesta por Leopold y Kriedemann (1975):

Siendo;

Ln = el logaritmo natural

 t_1 = tiempo en la primera medida

 t_2 = tiempo en la segundo medida

- $PF_1 = el peso fresco de la planta en la primera medida (en gramos)$
- $PF_2 = el peso fresco de la planta en la segunda medida (en gramos)$

3.2. Producción de biomasa y su distribución.

La producción de biomasa y su distribución entre la parte aérea y la raíz fue determinada a las dos semanas de añadir el NaCl a la solución nutritiva (Figura 27). Para ello las plantas fueron separadas en hoja, tallo, raíz y fruto, y tomado el peso fresco (PF) de las distintas partes. Ese material vegetal fresco se mantuvo durante 72 horas en una estufa a 65°C para la determinación de su peso seco (PS).



Figura 27. Planta silvestre de microtomate.

3.3. Peso específico de la hoja.

El peso específico de la hoja (LSM, siglas del inglés Leaf Specific Mass, la proporción entre el peso y el área de la hoja) se obtuvo a partir del peso fresco y el peso seco y el área de hoja (mg_{pf} cm⁻² y mg_{ps} cm⁻²).

Las muestras de hojas eran discos de 0.385 cm², se extrajeron con un sacabocados (evitando el nervio principal) de las hojas jóvenes más expandidas adyacentes a las empleadas para las medidas de intercambio gaseoso y fluorescencia.

Las muestras se extrajeron de 4 plantas de cada línea de microtomate en cada tratamiento, se colocaron en microtubos previamente pesados y se pesaron rápidamente para obtener su peso fresco. Posteriormente, los discos se secaron en una estufa durante un mínimo de dos días consecutivos a 65°C y se determinó su peso seco.

4. Determinación del estado nutricional de las plantas.

La concentración y contenido de nutrientes en las plantas se determinó tras una semana de exposición de las plantas a los tratamientos salinos. El material vegetal se colocó en una estufa a 65°C durante un mínimo de tres días. Posteriormente, para conseguir una muestra homogénea, el material vegetal fue triturado mediante un molino mezclador MM400 (Retsch, Dusseldorf, Germany) durante 10-15 minutos.

4.1. Determinación de cationes.

Las concentraciones de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺ se realizaron a partir de 100 mg de material seco y molido, posteriormente digerido en una mezcla de HNO₃:H₂O₂ (4:1 v/v) en un Ultraclave-Microondas Millestone a 220°C durante 20 minutos y finalmente pasado por filtros de 0,45 μ m (Sartorius Stedim Minisart RC15). Las medidas se realizaron en el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-óptico, Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, EE.UU.).

4.2. Determinación de aniones.

La determinación de cloruro, fosfato y sulfato en material vegetal se realizó a partir de 50 mg de material seco y molido (ver apartado 4). A los 50 mg de muestra se le añadieron 10 mL de agua bidestilada y se mantuvo en agitación durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 27.000 x g durante 20 minutos y el sobrenadante se pasó por filtros de 0.45 μ m. La concentración de Cl⁻, SO₄²⁻ y PO₄³⁻ 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). La recogida y el procesado de los datos se realizaron mediante el programa informático Chromeleon, que calcula la concentración de aniones de la muestra por comparación de las áreas con las de una muestra patrón.

4.3. Determinación de nitrato, nitrógeno total y nitrógeno orgánico.

La extracción y cuantificación de NO_3^- libre en material vegetal se realizó a partir de 10-20 mg de muestra seca y molida según lo descrito en el apartado 4. A los 10-20 mg de muestra se le añadieron 1.5 mL CaSO₄ 10 mM y se mantuvo en agitación durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante 9 minutos recogiendo el sobrenadante. La concentración de NO_3^- se midió con el espectrofotómetro (Doane y Horwarth, 2003), mediante la adición de un reactivo compuesto por 200 mL HCl 0.5 M, 0.5 g vanadium III chloride, 0.2 g sulfanilamide y 0.01 g N-(1-naphthyle) ethylenediamine dihydrochloride. Se compara la absorbancia de la muestra con una recta patrón con una cantidad de nitrato conocida. Para la reacción se utilizan 20 µL de muestra y 1 mL de reactivo incubando la reacción durante una hora a 60°C antes de medir. El nitrógeno total se midió en un analizador elemental (LECO TruSpec Micro Series, St. Joseph, MI, USA). Las medidas fueron realizadas a partir de material seco y triturado de raíz, hoja y tallo por el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC. La concentración de nitrógeno orgánico se obtuve tras restar al nitrógeno total la fracción de NO_3^- libre.

5. Parámetros de fluorescencia de las clorofilas.

Se estudió el contenido de clorofilas así como distintos parámetros relacionados con procesos fotosintéticos como; rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m), rendimiento cuántico efectivo (Y(II)), y parámetros relacionados con procesos no-fotosintéticos tales como el rendimiento cuántico de disipación de energía regulado (Y(NPQ)) y no regulada (Y(NO)). El estudio de la fluorescencia de las clorofilas comprendió tanto cinética como curvas de luz. Las medidas de fluorescencia se realizaron en las hojas jóvenes totalmente expandidas y adyacentes a las usadas para la determinación de los parámetros de intercambio gaseoso, con un total de 4-5 medidas por línea y por tratamiento. El análisis de los datos y cálculos se realizaron utilizando el software ImaginWin v2.46i (Heinz Walz GMBH). La fluorescencia de clorofilas en hojas se analizó con un fluorímetro (Imaging-PAM MAXI-versión, Heinz Walz GMBH). Las medidas se realizaron justo antes de añadir el tratamiento salino (día 0) y a las 24 horas, 7 días y 10 días después de la adición de los tratamiento de salinidad.

5.1. Contenido de clorofilas.

Se estimó el contenido de las clorofilas de las hojas mediante un SPAD-502 (Chlorophyll meter SPAD-502, MINOLTA. Inc. Japan). Es un medidor compacto, diseñado para mejorar la calidad y producción de los cultivos mediante la indicación de la cantidad de clorofila presente en las hojas de la planta lo que nos permite hacer una estima de la cantidad de nitrógeno. La cantidad relativa de clorofila presente se determina mediante la medición de la absorción de la hoja en las longitudes de onda características de las clorofilas (400–500 nm y 600–700 nm). Utilizando estas dos transmisiones el medidor calcula el valor numérico SPAD que es proporcional a la cantidad de clorofila presente en la hoja. El SPAD-502 percibe las mediciones sin perjuicio alguno para la planta; simplemente al encenderlo la pantalla muestra (CAL), lo que significa esperar hasta finalizar la calibración y apretando las pinzas del medidor a una hoja, se recibe una lectura con el contenido de clorofila en menos de 2 segundos.

5.2. Cinética.

La cinética de fluorescencia de clorofilas se realizó como se muestra en la figura 28. La fluorescencia de las clorofilas es proporcional (a un punto) a la cantidad de radiación fotosintéticamente activa. Si la energía de luz no está disponible durante un tiempo, por ejemplo, 30 minutos, la fluorescencia de la clorofila es cero, y para ello, primero las hojas de las plantas fueron adaptadas a la oscuridad durante 30 minutos, entonces se iluminaron con luz de baja intensidad fotosintética (PAR ≤ 1 µmol m⁻² s⁻¹) para medir una fluorescencia de clorofila muy baja (Fluorescencia mínima, F_0). A esta medida le siguió un pulso de intensa saturación de luz de 12000 μ mol m⁻² s⁻¹ durante 0.8 segundos con el que la fluorescencia se aumenta al nivel máximo (Fluorescencia máxima, F_m). Entonces las hojas se iluminaron con luz actínica, y cada intervalos segundos, se le aplica un pulso de saturación de luz. Con cada pulso de luz se mide la (F_m) . La F_m es generalmente menor que F_m . Restando Fm' de Fm, la diferencia se debe a las reacciones no-fotoquímicas (qN o NPQ). Las reacciones no-fotoquímicas compiten con las reacciones fotoquímicas en la supresión (quenching) de fluorescencia máxima. Después se apagó la luz actínica e inmediatamente se aplicó un pulso de saturación de luz roja de 735 nm de intensidad 12000 μ mol m⁻² s⁻¹ durante 0.8 segundos para medir la F_{0} (valor de fluorescencia mínima en hojas adaptadas a la luz después de aplicar un pulso de luz roja). Así, con los resultados de las medidas de la fluorescencia mínima, variable y máxima se pueden manipular matemáticamente para determinar cuanta energía de luz es utilizada y/o disipada.



Figura 28. Secuencia de pulsos de luz seguida en las medidas de fluorescencia de clorofilas.

5.3. Curvas de luz.

Las curvas de respuesta a la luz indican la respuesta que tienen las plantas a diferentes niveles de intensidad de luz (Pérez-Martínez y Melgarejo, 2012). La respuesta de la fluorescencia a la intensidad lumínica se analiza incrementando en pasos escalonados la intensidad lumínica, al final de los cuales el rendimiento efectivo cuántico PS II, así como varios otros parámetros, se determinan con la ayuda de un pulso de saturación. Tanto el parámetro de ETR (Tasa de trasporte de electrones fotosintética = $0.5 \times \text{Yield} \times \text{PAR} \times 0.84 \mu \text{equivalents m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) o los diferentes parámetros de fluorescencia se pueden visualizar. El eje X en una curva de luz corresponde a PAR incidente que en condiciones normales es conocido (18.5 cm de distancia entre la muestra y la unidad de iluminación LED-Array). Con el aumento de PAR, el parámetro Y (II) disminuye continuamente, mientras que el parámetro Y (NPQ) aumenta y el parámetro Y (NO) se mantiene prácticamente constante.

5.4. Parámetros de fluorescencia.

5.4.1. Rendimiento cuántico máximo.

El rendimiento cuántico máximo (*Fv/Fm*) mide la eficiencia máxima del PS II, es decir, la eficiencia cuántica si todos los centros del PS II estuviesen abiertos (Maxwell y Johnson, 2000).

Normalmente, después de la adaptación a la oscuridad, todos los centros de reacción de PS II están abiertos ($F = F_0$) y la disipación de la energía no-fotoquímica es mínima (qN = NPQ = 0) y se alcanza el rendimiento cuántico máximo durante un pulso de saturación. Para la determinación de F_v/F_m se utilizó la siguiente fórmula:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

Siendo;

 F_m ; Valor máximo de fluorescencia en hojas adaptadas a la oscuridad.

 F_0 ; Valor mínimo de fluorescencia en hojas adaptadas a la oscuridad.

 F_{ν} ; La competencia variable de fluorescencia ($F_{\nu} = F_m - F_0$).

5.4.2. Rendimiento cuántico efectivo.

El rendimiento cuántico efectivo (Y(II)) mide la eficiencia de la fotoquímica del PS II. En concreto mide la proporción de luz absorbida por la clorofila asociada con el PS II que es usada en procesos fotoquímicos, y puede variar entre 0 y 1. Si por ejemplo, Y(II) = 0.5, esto significa que la mitad de las quanta absorbidas se convierten en energía químicamente fija por la separación de la carga fotoquímica en los centros de reacción de PS II. La otra mitad de la quanta se disipa en calor y fluorescencia. Para la determinación de Y(II) se utilizó la siguiente fórmula descrita por Genty *y col.* (1989):

$$Y(II) = (F_m' - F_t) / F_m'$$

Siendo;

 F_m' ; Valor de fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la luz después de aplicar un pulso saturante de luz actínica.

 F_t ; Valor de fluorescencia justo antes de la saturación de luz.

5.4.3. Rendimiento cuántico de disipación de energía regulada.

El rendimiento cuántico de disipación de energía regulada (Y(NPQ)) es la medida de la fluorescencia no-fotoquímica, reflejando la baja regulación de PS II como un mecanismo de protección contra el exceso de la intensidad de la luz. Un alto valor de Y(NPQ), por un lado indica que la densidad del flujo de fotones es excesivo, y por otro lado muestra que la planta tiene conservado los medios fisiológicos para protegerse, por ejemplo, la disipación de la energía de excitación excesiva en calor inofensivo. Sin dicha disipación, se formarían oxígeno singlete y radicales reactivos que causan daños irreversibles. Para la determinación de Y(NPQ) se utilizó la siguiente fórmula (Kramer *y col.*, 2004):

$$Y(NPQ) = 1 - Y(II) - 1/(NPQ + 1 + qL(Fm/F0-1)))$$

5.4.4. Rendimiento cuántico de disipación de energía no-regulada.

El rendimiento cuantico de disipación de energía no-regulada (Y (NO)) indica que tanto la conversión de la energía fotoquímica como los mecanismos de protección son ineficientes. Este dato nos indica que la planta tiene problemas para enfrentarse a esa radiación incidente. Para la determinación de Y(NO) se utilizó la siguiente fórmula (Kramer *y col.*, 2004):

$$Y(NO) = 1/(NPQ+1+qL(F_m/F_0-1))$$

5.4.5. Tasa de transporte de electrones.

La tasa de trasporte de electrones (ETR; Electron Transport Rate) fotosintética se determinó con la siguiente formula:

$$ETR = 0.5 x$$
 Yield x PAR x 0.84 µequivalents m⁻² s⁻¹

Siendo;

PAR; Las radiaciones fotosintéticamente activa (Photosynthetically Active Radiation); la medida de la potencia de radiación.

Yield; Rendimiento cuántico máximo (Fv /Fm).

6. Intercambio de CO₂ y H₂O entre la planta y la atmósfera, y concentración de carbono total.

Para el estudio de la tasa de fotosíntesis neta (Pn) y la conductancia estomática (gs), se utilizó el sistema portátil de fotosíntesis CIRAS-2 (CIRAS-2 portable photosynthesis System (PP SYSTEMs, AMESBURY; MA, USA)). Se ajustó la temperatura y la presión atmosférica del CIRAS-2 a las condiciones de la cámara de crecimiento. La intensidad de luz con que se realizaban las medidas era la misma que tenían las plantas en la cámara ($350 \mu mol m^{-2} s^{-1}$). Las medidas se realizaron siempre en el mismo intervalo de tiempo, e intercalando los diferentes tratamientos. La medida se hacía en el foliolo de hojas jóvenes totalmente expandidas en la cubeta-cabezal PLC6 del CIRAS-2 de un total de 4-5 medidas en cada línea de microtomate y en cada tratamiento. Las medidas se realizaron justo antes de añadir los tratamientos salinos (día 0) y en los días 2, 4, 6, 8 después de los tratamientos de salinidad.

6.1. Tasa de fotosíntesis neta.

Teniendo en cuenta que el área del foliolo de micro-tom en el que se mide la fotosíntesis no cubre todo el área de la cubeta PLC6 (1.75 cm²), los valores iniciales obtenidos se recalculaban en base al área foliar real (LAR) que había en la cubeta durante la medida. Para ello se utilizaba el software del mismo fabricante del equipo cambiando el área teórica (1.75 cm²) por el área foliar real. Para el cálculo del área real del foliolo en la cubeta se realizaban fotografías de cada hoja cuando estaba dentro de la cubeta (Figura 29). Con ayuda del software Photoshop CS5 (Adobe Systems Software Ireland Ltd) y la opción contar pixeles tanto del área desconocida (hoja) como del área conocida (cubeta, 1.75 cm²), se calculaba el área del foliolo en la cubeta.



Figura 29. Cubeta PLC6 del CIRAS-2. Cubeta PLC6 donde se introduce la hoja de la planta para medir los parámetros de fotosíntesis. En la imagen se observa que el foliolo de la hoja no cubre todo el área de la cubeta (1.7 cm^2) .

6.2. Conductancia estomática.

Este parámetro es muy importante para caracterizar la respuesta de las plantas al estrés salino. Este indicador del estrés describe la pérdida de agua de la hoja a través de los estomas y de la cutícula, aportando información sobre el funcionamiento de los estomas. Al igual que la fotosíntesis neta, su valor inicial se ajustó al área real de foliolo en la cubeta.

6.3. Eficiencia intrínseca en el uso del agua

Se calculó como la fracción entre la tasa de fotosíntesis neta y la conductancia estomática (Pn/gs) (Ehleringer *y col.*, 1993).

6.4. Concentración de carbono total.

Se determinó la concentración de carbono total en el mismo material vegetal que usamos para saber la concentración de nutrientes. Se usó un analizador elemental (LECO TruSpec Micro Series, St. Joseph, MI, USA). Las medidas fueron realizadas por el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC.

7. Estado hídrico de la planta.

7.1. Contenido relativo de agua.

El contenido relativo de agua, es decir la cantidad de agua que tiene con respecto a la máxima que puede contener, se considera como uno indicador de tolerancia al estrés hídrico en cultivos. Parte importante de este experimento, fue determinar el tiempo requerido para lograr la máxima imbibición de los discos para la obtención de su peso túrgido. Se medió el contenido relativo de agua utilizando discos de hoja como los descritos en el apartado 3.3. Las muestras se extrajeron a mediodía de 3 plantas por línea y por tratamiento, se colocaron en microtubos de 1.5 mL previamente pesados y se pesaron rápidamente para obtener su peso fresco (PF). Posteriormente los discos se colocaron en una placa de 48 pocillos cerrada con agua destilada durante 3-4 horas bajo condiciones de luz tenue y temperatura ambiente (Figura 30) (Barrs y Weatherley, 1962), que de acuerdo con observaciones previas, se determinó que es un período suficiente para que los discos alcancen la máxima imbibición y lleguen a plena turgencia. Los discos se secaron superficialmente, sin presionar, con papel absorbente y se obtuvo su peso túrgido (PT). Finalmente, los discos se secaron en una estufa durante un mínimo de dos días a 65°C y se determinó su peso seco (PS). El CRA se calculó mediante la siguiente formula descrita por Morgan (1984):



	CRA ((%) = ((PF -	PS) /	(PT –	PS)	Х	100
--	-------	---------	-------	---------------	-------	-----	---	-----

Figura 30. Discos de hojas sumegidos con agua destilada en los pocillos de una placa para obtener su peso túrgido.

7.2. Contenido de agua.

El contenido de agua es otra medida importante que nos informa de estado hídrico de las plantas y nos dice la cantidad de agua que tiene en un momento dado en relación al peso seco. El contenido de agua se calculó a partir de los pesos de los discos usados para el contenido relativo de agua. El contenido de agua se calculó mediante la siguiente formula:

Contenido de agua (%) = [(PF - PS) * 100] / PF

8. Técnicas de microscopía.

8.1. Microscopia electrónica de transmisión.

Inclusión de muestras en resina SPURR. Secciones de hoja (1x1 mm) y de raíz (2 mm de longitud desde el ápice) se procesaron según el siguiente protocolo:

- * Fijación. Las muestras se fijaron en una disolución de glutaraldehído 2.5% y paraformaldehído 4% en tampón fosfato sódico (TPNa) 0.1 M, pH 7.2 durante dos horas y media a 4°C.
- Lavados. Tras la fijación, las muestras se sometieron a 3 lavados sucesivos de 15 minutos cada uno con TPNa 0.1 M, pH 7.2 a 4°C.
- * Postfijación. La postfijación se realizó en una disolución de tetraóxido de osmio al 1% en TPNa 0.1 M, pH 7.2 durante dos horas.
- Lavados. Tras las dos horas de postfijación, se retiró la disolución de tetróxido de osmio realizando otros tres lavados con TPNa 0.1 M, pH 7.2 y se mantuvieron en el propio tampón a 4°C durante toda la noche.
- * Deshidratación. Las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación mediante su inmersión consecutiva en disoluciones cada vez más concentradas de etanol (35%, 50%, 75%, 96% y etanol absoluto), permaneciendo las muestras en cada concentración de etanol durante 30 minutos.
- * Inclusión. Para incluir las muestras se aplicó el siguiente procedimiento:
 - ✓ Óxido de propileno 100% en dos etapas de 30 minutos cada una.
 - ✓ Posteriormente óxido de propileno: resina Spurr (Spurr, 1969) (1:1), durante 1.5 hora.

- ✓ A continuación, las muestras se mantuvieron en resina Spurr 100% a 4°C durante una noche.
- ✓ Solidificación. Las muestras se colocaron en moldes rellenados con resina Spurr 100% y se colocaron en una estufa a 70°C durante 16 horas.

Una vez obtenidos los bloques, se tallaron y se realizaron cortes ultrafinos (70-80 nm) con un ultramicrotomo Leica Ultracut UCT. Estas secciones se montaron sobre rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Finalmente, para la observación de las secciones ultrafinas se utilizó un microscopio electrónico Philips Tecnia 12 (Philips, Holanda) y las imágenes se captaron con una cámara CCD SIS Mega View III. Los estudios morfométricos se realizaron utilizando el software Visualización Philips Mega View III.

8.2. Microscopia óptica.

Las secciones se obtuvieron utilizando los bloques incluidos anteriormente, realizando cortes semifinos de 0.5-0.7 micras mediante un ultramicrotomo Leica VT1200, (Leica, Alemania). Estos cortes se montaron en un portaobjetos y teñidos con una solución de azul de toluidina al 0,5%. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio Leica LMR en campo claro. Los análisis morfométricos se realizaron usando el sistema de análisis Qwin de Leica. Leica LMR en campo claro equipado con una cámara digital Leica DC 500.

8.3. Microscopia de láser confocal.

La siguiente tabla recoge los fluoróforos utilizados con indicaciones precisas de su afinidad, longitudes de onda de excitación (λ_{Exc}) y emisión (λ_{Em}), concentraciones de ensayo y tiempos de incubación. Las muestras se tomaron a los 7 días de la aplicación del tratamiento salino.

Para la preparación de las muestras con el fluoróforo CoroNa-Green, fue necesario añadirlo a un tampón compuesto de 10 mM MES a pH 6.1, 10 μ M CaCl2 y 0.02% Pluronic durante un periodo de tiempo que oscilo entre 3-4 horas, en agitación y en oscuridad. Antes de la observación de las muestras, se realizaron varios lavados con el tampón descrito anteriormente, pero sin Pluronic.

Fluoróforo	Afinidad	λ _{Exc} /λ _{Em} (nm)	Concentración de ensayo	Tiempo de incubación (min)	Casa comercial
FM4-64	Membranas biológicas	488/625-665	16 µM	5 min antes del ensayo	Invitrogen
CoroNa- Green	Na^+	488/510-530	10 µM	3-4 horas antes del ensayo	Invitrogen

 Tabla 6. Fluoróforos utilizados en los estudios realizados con microscopia confocal. Láseres utilizados: Argón (488 nm).

Una vez realizados los lavados, y justo antes de la observación de las muestras en el microscopio, se le adicionó el fluoróforo FM4-64.

Para su observación, las muestras fueron montadas sobre portaobjetos y selladas, utilizando el objetivo 63x de aceite de inmersión de un microscopio de láser confocal Leica TCS SP2.

9. Identificación de proteínas por Western-Blot.

9.1. Extracción de proteínas.

Muestras de hojas (0.5 g) crecidas en tratamiento control y a 150 mM NaCl fueron homogeneizadas a 4°C con un homogenizador IKA T25 ultra-turrax en tampón de extracción que contenía 50 mM tampón fosfato potásico pH 7.8 en una relación ½ (p/v), 0.1 mM EDTA, 0.2% Tritón X-100 (v/v), 5mM Cys, 1% PVP soluble y cóctel comercial de inhibidor de proteasas (Complete Protease Inhibitor Products-Roche). El homogenado se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y el sobrenadante se puso 5 minutos a 95°C y se enfrió en hielo para desnaturalizar las proteínas.

9.2. Cuantificación de proteínas.

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 abscisas. La concentración de proteínas de las muestras se calculó por extrapolación de su valor de absorbancia a 595 nm en dicha recta patrón.

9.3. Electroforesis de las muestras.

La electroforesis para muestras con proteínas en condiciones desnaturalizantes se realizó en una fuente eléctrica Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, California) siguiendo las indicaciones del fabricante y a temperatura ambiente. Las muestras se prepararon a concentración (20µg/10µl), y se cargaron en geles comerciales Mini-PROTEAN® TGX[™] 10 mm (Bio-Rad, California). Las muestras fueron diluidas en una relación 1:2 con el tampón de carga (0.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 25% Glicerol, 1% azul de bromofenol, 5% 2-mecaptoetanol) e incubadas 5 minutos a 95°C y puestas en hielo una vez transcurrido este tiempo. 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 ProteinTM WesternCTM Standars (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. El tampón de electroforesis utilizado fue 1X Tris/Glycine/SDS para SDS-PAGE de Bio-RAD.

9.4. Western-Blot.

La transferencia a la membrana se realizó mediante el sistema de transferencia Trans-Blot® TurboTM blotting de Bio-Rad. Las proteínas, previamente separadas mediante la electroforesis, fueron transferidas a una membrana de 0.2 μ m de nitrocelulosa mediante el kit Trans-Blot[®] TurboTM Midi format Transfer Pack (Bio-Rad, California) tal y como indica el comerciante. Una vez realizada la transferencia, la membrana se incubó en una solución de bloqueo (5% leche en polvo desnatada (p/v) + 0.1% Tween-20 en 1XPBS) con agitación suave durante 1 h, cambiando la solución cada 20 minutos. Tras esa hora, se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno con tampón PBS + 0.05% Tween 20, manteniendo la membrana en agitación suave.

Tras retirar la solución de bloqueo, la membrana se incubó anticuerpo primario toda la noche, a 4°C y en agitación. La dilución fue elegida dependiendo del anticuerpo:

- ✓ RuBisCo (Anti Rabbit Rbcl, Type I + Type II (RuBisCo), Agrisera), dilución 1/5000 en PBS + 0.05% Tween 20.
- ✓ SUMO1. (Anti Rabbit- Small Ubiquitin-like Modifier Protein 1, Agrisera), dilución 1/5000 en PBS + 0.05% Tween 20.

El anticuerpo primario se retiró realizando tres lavados de 15 minutos con tampón 1XPBS y en agitación.

Por último, la membrana se incubó durante una hora y 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación con el anticuerpo secundario que fue el mismo para los diferentes anticuerpos (Pierce 31460 anti Rabbit – HRP), dilución 1/10000 en 1XPBS. Tras retirar la el anticuerpo secundario, la membrana se realizaron tres lavados de 15 minutos en tampón PBS y en agitación.

Para visualizar la proteína, se utilizó el Thermo scientific Pierce® ECL 2 (Western Blotting Substrate). La disolución del sustrato quimioluminiscente (substrato A: substrato B = 40:1) se repartió de forma uniforme sobre la membrana y se incubó durante 5 minutos, envuelta en un film de plástico. Tras ese tiempo, la membrana se reveló en una cámara oscura mediante autoradiografía. El film que contenía la membrana se puso en contacto con la autoradiografía durante 30-60 segundos dentro del cassette, posteriormente, se reveló con el líquido revelador y fijador de Kodak. Las proteínas unidas a los anticuerpos quedaron marcadas en este proceso.

10. Cuantificación y extracción de hormonas.

50 mg de tejido procedente de hojas y raíces previamente congelado en nitrógeno líquido y posteriormente liofilizado, fue utilizado para la cuantificación de giberelinas. Esta cuantificación se realizó mediante un Espectrómetro de Masas acoplado a Cromatografía Líquida de Alta Presión (LC-MS-MS).

La extracción de hormonas se realizó a partir de muestras de hoja y raíz siguiendo el siguiente protocolo:

Alícuotas de 50 mg de material liofilizado y molido fue resuspendido en 80% metanol-1% ácido acético durante una hora a 4°C y en agitación continua, junto a una mezcla de hormonas deuteradas que se usaron como estándares internos ([17, 17-2H]GA₁, [17, 17-2H]GA₄, [17, 17-2H]GA₈, [17, 17-2H]GA₉, [17, 17-2H]GA₁₂, [17, 17-2H]GA₁₅, [17, 17-2H]GA₁₉, [17, 17-2H]GA₂₀, [17, 17-2H]GA₂₄, [17, 17-2H]GA₂₉, [17, 17-2H]GA₅₁, [17, 17-2H]GA₅₃, [17, 17-2H]GA₄₄), [2H6]ABA, y dhJA) para la cuantificación del JA. Transcurrido este tiempo, el homogeneizado se centrifugo a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante se conservó en agitación a -20°C toda la noche. Antes de empezar la purificación, el metanol fue eliminado mediante un rotavapor. El residuo obtenido fue disuelto en agua con 1% de ácido acético y se pasó a través de una columna de fase reversa Oasis HLB, según describe Seo y col. (2011). El material retenido en la columna fue eluido con una mezcla de metanol 80% -ácido acético 1% (v/v), y para eliminar el metanol del eluato obtenido de la columna, se volvió a pasar por el rotavapor y el residuo obtenido se redisolvió en ácido acético 1%. El material obtenido volvió a ser pasado a través de otra columna MCX y los restos retenidos en la columna fueron eluidos con metanol al 80%. Ya por último, el eluato obtenido de la columna anterior se volvió a pasar por una columna WAX, y dicha columna fue eluida primero con metanol 80% - ácido acético 1% (v/v) y después con metanol 80% - ácido fórmico 1% (v/v). Ambos eluatos fueron juntados y se llevaron a sequedad en el rotavapor. El residuo obtenido se disolvió en 5% de acetonitrilo - 1% de ácido acético. Las diferentes hormonas fueron separadas por un autosampler adaptado a un espectrómetro Q-Exactive spectrometer (Orbitrap detector; ThermoFisher Scientific) acoplado a un UPHL. La cuantificación de dichas hormonas se realizó mediante curvas de calibrado y los programas Xcalibur 2.2 SP1 build 48 y TraceFinder.

Análisis de expresión génica por RT-qPCR. 11.1. 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.)

11.2. Transcripción inversa. Síntesis de la primera cadena de ADNc.

La transcripción inversa se realizó a partir de 1µg 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, Mg²⁺ y retrotranscriptasa. Pasado este tiempo, se inactivó la retrotranscriptasa incubando a 95°C durante 3 minutos.

11.3. Estimación de la concentración de ácidos nucleicos.

La pureza y cuantificación de ácidos nucleicos se realizó con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, EE.UU.), que determina las medidas de concentración de ARN y ADN a la absorbancia de 260 nm. La relación entre la absorbancia medida a 260/280 nm, indica la pureza de los ácidos nucleicos.

11.4. Oligonucleótidos.

Los cebadores que se utilizaron en la RT-qPCR (real time retrotranscriptionquantitative polymerase chain reaction) (Tabla 7) se diseñaron buscando las secuencias de los exones de los genes de interés de *Solanum Lycopersicum* L. en la base de datos SolGenomics Network. Una vez obtenida la secuencia se utilizó el programa Primer3 para su diseño. Todos los oligonucleótidos empleados en esta tesis fueron sintetizados por INVITROGEN. Su elección se llevó a cabo estableciendo los siguientes requisitos:

- ✓ Longitud del cebador entre 20-25 pb.
- ✓ Temperatura de hibridación (Tm) menor de 70°C.
- \checkmark No deben de formar estructuras secundarias y no deben de hibridar entre ellos.

Gen	Número de acceso
SlGA20ox1	AF049898
SlGA20ox2	AF049899
SlGA20ox3	AF049900
SlGA20ox4	EU652334
SlGA3ox1	AB010991
SlGA3ox2	AB010992
SlGA2ox1	EF441351
SlGA2ox2	EF441352
SlGA2ox3	EF441353
SlGA2ox4	EF441354
SlGA2ox5	EF441355
SIDELLA	AY269087
SlEF-1a	X14449.1

Tabla 7. Cebadores utilizados para la amplificación mediante PCR y RT-qPCR.

11.5. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RTqPCR).

El análisis de la expresión génica de cada gen se realizó por la amplificación de una región seleccionada de aproximadamente 100 pb, utilizando los cebadores de la tabla 7. Las reacciones se llevaron a un volumen final de 10 µl, siendo 5 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Appied Biosystems, California, EE.UU.), 3 µl de cebadores con una concentración final de 200 nM y 2 µl de ADNc (20 ng). Los valores de Ct de los genes se relativizaron respecto al gen calibrador que en nuestro caso es el gen EF1. Se obtuvieron rectas de calibrado para el gen, haciendo diluciones seriadas de ADNc sintetizado a partir de 1 µg de ARN. Con estas rectas pudimos comprobar que los datos obtenidos eran fiables. Con las rectas de calibración se selecciona la cantidad óptima de ADNc para realizar las PCR a tiempo real. Con la cantidad de ADNc seleccionado, se realizaron las RT-q PCR de todos los genes de la tabla 7 y del gen calibrador. Los datos de las Ct obtenidos para los distintos genes, serán relativizados respecto al gen calibrador por el método de la Ct de Livak y Schmittgen (2001).

12. Análisis del transcriptoma por microarray.

El estudio de expresión del transciptoma se realizó en el Servicio de Biologia Molecular de la Universidad de Murcia, usando el sistema de Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array (Affymetrix, santa clara, CA). Este microarray está compuesto de 10219 sondas que corresponden aproximadamente a 9200 transcritos diferentes. Para este estudio se realizaron 3 réplicas biológicas de cada tratamiento que correspondieron a un total de 36 chips hibridados. El ARN fue extraído siguiendo el mismo protocolo descrito para la RT-PCR cuantitativa (apartado 11.1). La calidad del ARN fue analiza mediante un sistema electroforético capilar 2100 Bioanalyzer de Agilent Terchnologies. El proceso de hibridación de las sondas y escaneado de los chips fue realizado siguiendo las instrucciones de la casa comercial para el GeneChip Tomato Genome Array (Affymetrix, Santa Clara, CA). El análisis de los chips se realizó mediante la plataforma GeneAtlas Microarray System de Affymetrix (Affymetrix, santa clara, CA). Los chips fueron escaneados y convertidos en archivos .CEL mediante el programa propio de Affymetrix. Las muestras que pasaron los controles de calidad fueron normalizados utilizando el algoritmo RMA importando los archivos .CEL al programa Partek Genomics Suite (Partek Incorporated, St Louis, USA). Los valores de intensidad media de las tres replicas biológicas de cada muestra fueron transformados a una escala log2. Sólo se consideraron para este estudio aquellas sondas que mostraban una variación igual o superior a ± 2 . La expresión diferencial entre control y tratamiento salino se realizó mediante el análisis de la T-Student y con un P $\leq 0,05$, al que se le aplicó el test de corrección para el porcentaje de falsos descubrimientos (FDR) de Benjamini y Hochberg (1995) (FDR ≤0,05). Finalmente, las diferentes familias fueron agrupadas y representadas en heatmaps.

Anotación génica y clasificación funcional. Para la anotación génica y análisis de términos GO se siguió la suministrada por Affymetrix (correspondiente a la última actualización del 30/10/2012) y descargada en el programa Partek Genomics Suite (Partek Incorporated, St Louis, USA). Para el análisis de términos GO se utilizó el test de Fisher y un P≤0,05. Sin embargo, los términos GO asignados en las anotaciones de tomate solo estaban presentes aquellos exclusivos de tomate. Por ello, para el estudio funcional de los genes también utilizamos el programa MapMan (Thimm *y col.*, 2004) que presentaba una base más completa de asignaciones. El análisis estadístico seguido con MapMan fue el test de Willcoxon y aquellas genes que mostraban una variación igual o superior a ± 2 y con un P≤0,05, al que se le aplicó el test de corrección para el porcentaje de falsos descubrimientos (FDR) de Benjamini and Hochberg (FDR ≤0,05), excepto en el caso del mutante *gib3* en hoja que se aplicó solo un P≤0,05, sin corrección de FDR dado al bajo número de genes con significación.

13. Análisis estadístico.

Tanto en los experimentos de salinidad como de nitrógeno y en los estudios que involucraban parámetros fisiológicos de desarrollo, estado nutricional de las plantas, contenido y fluorescencia de las clorofilas, intercambio gaseoso y estado hídrico de las plantas, el análisis estadístico se realizó con el objeto de ver la interacción entre los distintos factores ensayados (Tabla 8).

Se realizaron 8 experimentos de salinidad y 5 experimentos de nitrógeno, donde en al menos dos de cada tipo se realizó el mismo estudio. Los diferentes experimentos repetidos en el tiempo fueron tratados como bloques distintos.

Todos los análisis de datos se hicieron con el software SPSS v. ad (Sldfa). En el análisis de varianza (ANOVA) los factores salinidad, fuente de nitrógeno y concentración de nitrógeno fueron tratados como fijos, y el bloque como factor variable. Cuando el test ANOVA dio diferencias significativas hubo diferencias significativas entre tratamientos se realizó un test (Tukey) para separar las medias. Se consideraron diferencias significativas entre medias cuando (p) menor o igual a 0.95.

Experimento	Factor	Nivel	
	NaCl (mM)	0	
	NaCI (IIIM)	75	
Salinidad		150	
	Genotino	wt	
	Seneupe	pro	
		gib3	
	NaCl (mM)	0	
		75	
	Genotino	wt	
Nitrágono	Genoupo	pro	
Thu ogeno		gib3	
	Fuente de nitrógeno	Nitrato	
		Amonio	
	Concentración de nitrógeno (mM)	2	
		0.2	

Tabla 8. Los diferentes factores en los experimentos ensayados.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

• Experimentos de salinidad.

1. Velocidad de crecimiento relativo.

La velocidad de crecimiento relativo (VCR) se determinó a partir del día en el cual se iniciaron los tratamientos salinos (30 DDS) hasta el momento en el que las plantas iniciaron la fase de cuajado de frutos. Independientemente del genotipo, la VCR disminuyó progresivamente con la edad de la planta (Figura 31). En condiciones control no hubieron diferencias entre wt y *pro*, aunque fue menor en *gib3* durante los primeros 15 días (Figura 31A). En el tratamiento de 75 mM de NaCl, los valores más bajos durante los primeros 15 días se observaron en *gib3*, observándose también en *pro* en momentos puntuales (a los 7 y 18 días) una disminución de la VCR con respecto a wt (Figura 31B). En el tratamiento de 150 mM de NaCl, se produjo una caída drástica de la VCR durante los primeros 7 días en todos los genotipos (Figura 31C). A este nivel de salinidad, *gib3* tuvo los valores más bajos durante los primeros días de salinización, y respecto a wt y *pro* se observaron diferencias, siendo al inicio la VCR mayor en *pro* que en wt, y ocurriendo lo contrario al final.





Figura 31. Velocidad de crecimiento relativo. Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en la VCR en wt, *pro* y *gib3*, a partir del momento de iniciar los tratamientos salinos (30 DDS; 10 días después de crecer las plantas en solución nutritiva) hasta el inicio de la fase de cuajado de los frutos (55 DDS). Los datos representan valores medios \pm error estándar, n = 5.

2. Producción de biomasa y su distribución.

2.1. Biomasa peso fresco.

El efecto de la salinidad en la producción de biomasa fresca y su distribución entre parte aérea y raíz dependió del genotipo (Figuras 32 y 33), excepto en la producción de biomasa en hoja, que disminuyó en *gib3* respecto a wt y *pro*, y disminuyó a medida que aumentó la concentración de NaCl en el medio (Figura 34, Tabla Anexa 1).



Figura 32. Efecto de los diferentes tratamientos salinos en el crecimiento de la planta. Las imágenes corresponden al final del tratamiento salino. Plantas (A) wt, (B) *pro* y (C) *gib3* crecidas en medio control, 75 mM y 150 mM de NaCl;

En wt no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control y 75 mM NaCl en cuanto a la producción de biomasa fresca de la parte aérea, raíz, biomasa total (Figura 33A, B y C) y tallo (Figura 34B). En wt, aumentando la concentración a 150 mM NaCl se disminuyó la producción de biomasa aérea (tallo y hoja) con respecto al control pero no con respecto al tratamiento de 75 mM NaCl. La biomasa de raíz disminuyó al aumentar de 75 a 150 mM NaCl. En *pro* tampoco hubo diferencias entre los tratamientos control y 75 mM NaCl en cuanto a la producción de



biomasa fresca de la parte aérea, raíz, biomasa total (Figura 33A, B y C) y tallo (Figura 34B).

Figura 33. Producción de biomasa (g_{pf} planta⁻¹) de parte aérea, raíz, biomasa total y el ratio parte aérea/raíz. Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en; wt, *pro* y *gib3*. (A) Parte aérea, (B) raíz, (C) biomasa total y (D) el ratio PA/R. Las barras representan valores medios ± error estándar, n = 8-11. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

Al contrario que en wt, en *pro* cuando se aumentó la concentración a 150 mM NaCl, se disminuyó la biomasa con respecto a los tratamientos control y 75 mM NaCl. La producción de biomasa en *gib3* no se vio afectada por los tratamientos salinos. Contrastando el efecto de la salinidad entre los genotipos wt y *pro*, destacamos el hecho de que a 150 mM NaCl, el peso fresco de la planta cayó un 49.1 % en wt, y un 69.5 % en *pro* con respecto al tratamiento control. La producción de biomasa de la raíz que cayó notablemente con 150 mM NaCl en wt y *pro*, no se vio afectada en *gib3*.

El ratio parte aérea/raíz (PA/R) disminuyó en *pro* respecto a wt, y en *gib3* respecto a *pro* (Figura 33D, Tabla Anexa 1). Interesantemente, la distribución de biomasa en respuesta a la salinidad dependió del genotipo, disminuyendo en wt al aumentar la salinidad a 75 mM NaCl, pero aumentando al aumentar a 150 mM NaCl, no encontrando diferencias entre el tratamiento control y 75 mM NaCl en *pro* y *gib3*, pero aumentando al aumentar a 150 mM NaCl.



Figura 34. Producción de biomasa (g_{pf} planta⁻¹) de hoja y tallo. Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en wt, *pro* y *gib3*. (A) Hoja y (B) tallo. Las barras representan valores medios \pm error estándar, *n* = 8-11. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

2.2. Biomasa peso seco.

Al igual que con el peso fresco, el efecto de la salinidad en la producción de biomasa seca y su distribución entre parte aérea y raíz dependió del genotipo, excepto la producción de biomasa en hoja, que disminuyó en *gib3* respecto a wt y *pro*, y disminuyó a medida que aumentó la concentración de NaCl en el medio radicular (Tabla Anexa 2).

En wt no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control y 75 mM NaCl en la producción de biomasa seca de la parte aérea, raíz y biomasa total (Figura 35A, B y C), pero al aumentar la concentración a 150 mM de NaCl, la biomasa de raíz, parte aérea y total con respecto al control disminuyó, pero no con respecto al tratamiento de 75 mM NaCl. La producción de biomasa del tallo (Figura 36B) sólo disminuyó al aumentar la concentración de 0 a 75 mM NaCl. En

pro, al igual que en wt, no hubo diferencias entre los tratamientos control y 75 mM NaCl. En cambio, a diferencia del genotipo wt, tanto la biomasa de la raíz como la del tallo disminuyeron al aumentar de 0 a 75 mM NaCl (Figuras 35B y 36B).



Figura 35. Producción de biomasa (g_{ps} planta⁻¹) de parte aérea, raíz, biomasa total y el ratio parte aérea/raíz. Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en wt, *pro* y *gib3*. (A) Parte aérea, (B) raíz, (C) biomasa total y (D) el ratio Pa/R. Las barras representan valores medios ± error estándar, *n* = 8-11. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

En *pro*, también a diferencia de wt, aumentando la concentración a 150 mM NaCl se disminuyó la biomasa total con respecto al tratamiento de 75 mM NaCl (Figura 35C). La producción de biomasa en *gib3* no se vio afectada por los tratamientos salinos (Figura 35). También, al igual que hemos visto para el peso fresco, la producción de biomasa seca en el tratamiento de 150 mM NaCl en comparación con las plantas control (0 mM NaCl), disminuye un 46.6 % y 67.6 %, en wt y *pro*, respectivamente. El ratio PA/R disminuyó en *pro* y *gib3* respecto a wt (Figura 35D, Tabla Anexa 2). La distribución de biomasa en respuesta a la salinidad dependió del genotipo; mientras que en el genotipo wt y *gib3* no hubo efecto de la salinidad, en el genotipo *pro* el ratio PA/R aumentó al aumentar de 75 a 150 mM NaCl.



Figura 36. Producción de biomasa (g_{ps} **planta**⁻¹**) de hoja y tallo.** Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en wt, *pro* y *gib3*. (A) Hoja y (B) tallo. Las barras representan valores medios \pm error estándar, *n* = 8-11. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

3. Peso específico de la hoja.

El efecto de la salinidad en el peso fresco específico de la hoja (LSM-pf) no dependió del genotipo y disminuyó en *pro* respecto a wt y *gib3* independientemente de la salinidad y aumentó al aumentar la concentración de NaCl en el medio radicular independientemente del genotipo (Figura 37A, Tabla Anexa 3).



Figura 37. Peso específico de las hojas (mg_{pf} cm⁻² y mg_{ps} cm⁻²). Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en el peso específico de las hojas (LSM) en wt, *pro* y *gib3*. (A) Peso específico fresco y (B) peso específico seco. Las barras representan valores medios \pm error estándar, n = 8-11. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

En cambio, en el caso del peso seco específico de la hoja (LSM-ps), el efecto de la salinidad dependió del genotipo; disminuyendo en todos los genotipos al aumentar la salinidad de 0 a 75 mM, pero mientras que en wt no hubo diferencias entre 75 y 150 mM, en *pro* y *gib3* si las hubo, al aumentar la salinidad a 150 mM hubo un pequeño aumento, pero significativo (Figura 37B).

4. Longitud del tallo.

El efecto de la salinidad en la longitud del tallo dependió del genotipo (Figura 38, Tabla Anexa 4). En el genotipo wt, aumentando la concentración a 150 mM NaCl, disminuía la longitud del tallo con respecto al tratamiento control pero no con respecto al de 75 mM NaCl. Al contrario que en wt, en el mutante *pro* aumentando la concentración de salinidad a 75 mM NaCl disminuyó la longitud de tallo con respecto al tratamiento control, y al aumentarla a 150 mM NaCl disminuyó con respecto a los tratamientos control y 75 mM NaCl. La longitud de tallo en *gib3* no se vio afectada por los tratamientos salinos.



Figura 38. Longitud del tallo. Efecto de la salinidad, 0 (control); 75 y 150 mM NaCl en la longitud de tallo wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios \pm error estándar, *n* = 8-11. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

5. Estado nutricional de la planta.

5.1. Concentración de iones Na⁺ y Cl⁻.

En los tratamientos control, independientemente de la parte de la planta estudiada, la concentración de Na⁺ o no fue detectada o fue muy pequeña (Figura 39A, B y C). El aumento de la concentración de NaCl a 75 mM, aumentó drásticamente la concentración de Na⁺ en raíz, hoja y tallo, y un aumento a 150 mM, aunque también aumentó la concentración de Na⁺ en los diferentes tejidos, este aumento no fue proporcional al aumento de la concentración de NaCl en la solución nutritiva. Entre las diferentes partes de la planta, las mayores concentraciones de Na⁺ se obtuvieron en hoja, seguido del tallo y finalmente la raíz. Entre los distintos genotipos hubo diferencias en cuanto a la concentración de Na⁺ en los tejidos de hoja y tallo, pero no en la raíz. En el tratamiento de 75 mM de NaCl, la concentración de Na⁺ en hoja y tallo fue mayor en *pro* que en wt y *gib3*, y con 150 mM la concentración de Na⁺ en el tallo de *pro* fue muy superior al encontrado en wt y *gib3*.



Figura 39. Concentración de iones Na⁺ y Cl⁻ en raíz, hoja y tallo. Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en la concentración (mg g_{ps}^{-1}) de los iones Na⁺ y Cl⁻ en raíz, hoja y tallo en wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios ± error estándar, n = 5. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

En cuanto al ion Cl⁻, (Figura 39D, E y F) en el tratamiento control e independientemente del genotipo, encontramos valores comprendidos entre 10 y 20 mg g_{ps}^{-1} debido al aporte de NH₄⁺ a la solución nutritiva en forma de NH₄Cl. El aumento de la concentración de NaCl a 75 mM aumentó notablemente la concentración de Cl⁻ en todas las partes de la planta, y un aumento de NaCl a 150 mM siguió aumentando la concentración de Cl⁻ también en los diferentes tejidos, y de forma notable en el tallo del mutante *pro*.

5.2. Concentración de los cationes K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y el ratio Na^+/K^+ .

La figura 40 muestra la concentración (mg g_{ps}^{-1}) de los cationes K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y el ratio Na⁺/K⁺ en raíz, hoja y tallo en función del genotipo (wt, *pro* y *gib3*) y del nivel de salinidad aplicado (0, 75 y 150 mM). La concentración de K⁺ fue mayor en raíz y tallo que en hoja, disminuyendo notablemente con la presencia de NaCl en la solución nutritiva (Figura 40A). En la raíz, el aumento de la concentración de NaCl hizo disminuir progresivamente la concentración de K⁺. Por el contrario, en hoja y especialmente en tallo, la concentración de K⁺ cayó notablemente con la presencia de NaCl en la solución nutritiva, independientemente de su concentración. En cuanto a las diferencias entre genotipos es de destacar que, el efecto de la salinidad en la concentración de K⁺ en hoja dependió del genotipo, así en *pro* disminuyó progresivamente con el aumento de la concentración de NaCl, mientras que en wt y *gib3*, el aumento de 75 a 150 mM no reducía significativamente la concentración de K⁺ en la hoja.

La concentración de Ca^{2+} fue mayor en hoja que en tallo y raíz (Figura 40B), disminuyendo en raíz y tallo con el aumento de la concentración de NaCl en la solución nutritiva, sin efectos distintivos a causa del genotipo (Tablas anexas 6 y 8). En hoja, el incremento de la salinidad también hizo disminuir la concentración de Ca^{2+} , sin embargo hubo un efecto diferencial según el genotipo; mientras que en condiciones control la mayor concentración de Ca^{2+} se encontró en *pro*. Respecto al tratamiento de 75 mM de NaCl, no hubo diferencias entre genotipos y con 150 mM sólo hubo diferencias entre wt y *pro*.

La concentración de Mg^{2+} , al igual que la de Ca^{2+} fue mayor en hoja que en tallo y raíz (Figura 40C). En tallo, la concentración de Mg^{2+} disminuyó con el

aumento de la salinidad y fue mayor en *gib3* que en wt (Tabla Anexa 8). En raíz y hoja, el efecto de la salinidad en la concentración de Mg^{2+} dependió del genotipo; i) en raíz de wt y *gib3* sólo disminuyó al aumentar la concentración de NaCl de 75 a 150 mM, mientras que en *pro* disminuyó a medida que aumentó la concentración de NaCl;



Figura 40. Concentración de los cationes K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y el ratio Na⁺/K⁺ en raíz, hoja y tallo. Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en la concentración (mg g_{ps}^{-1}) de los cationes (A) K⁺, (B) Ca²⁺, (C) Mg²⁺ y (D) el ratio Na⁺/K⁺ en raíz, hoja y tallo en wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios ± error estándar, n = 5. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

ii) en hoja, ocurrió algo similar al Ca^{2+} , en *pro*, y sólo en condiciones control, la concentración de Mg²⁺ fue mayor que en wt y *gib3*.

El ratio Na^+/K^+ , independientemente de la parte de la planta analizada, siempre fue mayor en *pro* que en wt (Figura 40D, Tablas Anexas 6, 7 y 8). Igualmente, el ratio Na^+/K^+ aumentó al aumentar la salinidad, pero este aumento no fue igual para todos los genotipos; mientras que en wt y *gib3* el aumento fue pequeño y en el caso de la raíz no significativo, en *pro* el aumento fue mayor y en todos los casos significativo.

5.3. Balance de nitrógeno y carbono.

La concentración de N total fue mayor en hoja que en tallo y raíz (Figura 41A, Tablas Anexas 9 y 11). En hoja y tallo, el efecto de la salinidad en la concentración de N total dependió del genotipo, siendo *pro* el genotipo con mayor disminución de N total en condiciones de salinas.

Los mayores valores de NO_3^- se encontraron en raíz, e independientemente de la parte de la planta analizada, la concentración de NO_3^- disminuyó al aumentar la salinidad (Figura 41B). El efecto de la salinidad en la concentración de NO_3^- de raíz, hoja y tallo dependió del genotipo empleado; i) en raíz y tallo y sólo en condiciones control, la concentración de NO_3^- fue mayor en *pro* que en wt y *gib3*, mientras que en condiciones de salinidad (75 o 150 mM NaCl) las mayores concentraciones de $NO_3^$ se dieron en *gib3*; ii) en hoja y sólo en condiciones control, la concentración de NO_3^- , fue mayor en wt que en *pro* y *gib3*.

La concentración de N orgánico en hoja y tallo fue menor en *pro* que en wt y *gib3* (Figura 41C), y el efecto de la salinidad dependió del genotipo y también de la parte de la planta estudiada; en la raíz y sólo en wt y *gib3* la concentración de N orgánico aumentó al aumentar la salinidad de 0 a 75 mM y de 75 a 150 mM, en cambio en *pro* no hubo aumento (Tabla Anexa 9).



Figura 41. Balance de nitrógeno y carbono en raíz, hoja y tallo. Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en la concentración (mg g_{ps}^{-1}) de (A) N total, (B) Nitrato, (C) N orgánico, (D) C total, y (E) el ratio C/N en raíz, hoja y tallo en wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios \pm error estándar, *n* = 5. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).
En cuanto a la concentración de C total, con el aumento de la salinidad esta aumentó en raíz y este aumento fue mayor en wt y *pro* que en *gib3* (Figura 41D). En hoja, la concentración de C total disminuyó a medida que aumentó la concentración de NaCl en los tres genotipos; mientras que en los genotipos wt y *pro* se observaron diferencias significativas sólo entre el tratamiento control y el de 75 mM NaCl, en *gib3* disminuyó a medida que aumentó la salinidad. En el tallo, la concentración de C total en wt y *gib3* no se vió afectado por los tratamientos salinos, y en *pro*, la concentración de C total disminuyó con el aumento de la concentración de NaCl.

El ratio C/N fue siempre mayor en *pro* que en wt, independientemente del tejido analizado (Figura 41E), excepto en la raíz donde la proporción C/N disminuyó en wt respecto a *pro*, y aumentó en presencia de NaCl en la solución nutritiva (Tabla Anexa 9). El efecto de la salinidad en el ratio C/N dependió del genotipo. Con el aumento del tratamiento salino, se observó en hoja y tallo de *pro* un aumento paulatino en el ratio C/N. En cambio, en wt y *gib3* o no se encontraron diferencias (Figura 41E, tallo) o sólo aumentaba entre 75 y 150 mM de NaCl.

6. Contenido de clorofilas (SPAD).

La concentración de clorofilas (SPAD) disminuyó al incrementar la salinidad independientemente del genotipo (Figura 42). También, independientemente del tratamiento salino, la concentración de clorofilas fue mayor en *gib3*, seguido de wt y la concentración más baja la tuvo *pro*. Aumentando la concentración de NaCl de 0 a 75 mM NaCl, no hubo gran diferencia en la disminución del contenido de clorofilas entre los diferentes genotipos (11.26%, 14.28% y 8.41% en wt, *pro* y *gib3*, respectivamente), pero al aumentarla de 75 a 150 mM NaCl se observó que la caída en la concentración de clorofilas en *pro* fue mayor respecto a wt y *gib3* (18.33%, 44.71% y 19.11% en wt, *pro* y *gib3*, respectivamente).



Figura 42. Contenido de clorofilas. Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en el contenido de clorofila (SPAD) en hoja en wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios \pm error estándar, *n* = 5-6. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

7. Fluorescencia de las clorofilas: cinética.

Antes de iniciarse los tratamientos salinos (día 0), la fluorescencia máxima no era diferente entre los distintos genotipos: 0.788 en wt, 0.779 en pro y 0.780 en gib3 (Figura 43A). La eficiencia fotoquímica del fotosistema II [Y(II)] en el día 0 aumentó hasta 0.4 a medida que la planta se adaptaba a la luz, y disminuyó en este orden pro>wt>gib3 (Figura 43B). La fracción de la energía absorbida pero disipada de manera regulada en forma de calor [Y(NPQ)] aumentó de forma brusca durante los primero segundos de exposición a la luz, llegando hasta valores de 0.45. A partir de ese momento disminuyo ligeramente hasta 0.4, y se mantuvo con diferencias entre genotipos; gib3>wt>pro. Por último, en el día 0, la fracción de la energía absorbida que se disipó en forma de calor pero de manera no regulada [Y(NO)] partió de un valor de 1, es decir, toda la energía era disipada de manera no regulada en forma de calor, y disminuyó progresivamente hasta estabilizarse en 0.2, sin diferencias entre los tres genotipos. A las 24 horas de iniciar los tratamientos salinos, la Y(II)máx no varío entre los distintos genotipos (Figura 44). En wt, el valor de Y(II) disminuyó al crementar la salinidad al inicio del periodo de adaptación a la luz, desapareciendo las diferencias una vez adaptada la hoja a la luz (Figura 44D).



Figura 43. Parámetros de fluorescencia de las clorofilas; día 0 (control). Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en los parámetros de fluorescencia de las clorofilas; Y máx, Y(II), Y(NPQ) y Y(NO) en el día 0 (control) en wt, *pro* y *gib3*. Los datos representan valores medios \pm error estándar, *n* = 15. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

En *pro* y en *gib3*, los valores de Y(II) fueron durante el periodo de adaptación a la luz, inferiores en las plantas crecidas a 150 mM de NaCl (Figura 44E y F). A los 60 segundos de iniciarse la luz, Y(NPQ) alcanzó los máximos valores, que en *pro* y en *gib3*, fueron mayores al aumentar la salinidad (Figura 44H e I). Al final del periodo de adaptación, las diferencias debidas a los tratamientos salinos desaparecieron en wt y en *pro*, pero no en *gib3*, donde las plantas crecidas a 150 mM NaCl seguían manteniendo los mayores valores. Para los valores de Y(NO), no se encontraron diferencias entre los tres genotipos debido al efecto de la salinidad (Figura 44J, K y L).

Tras 7 días de salinización, el efecto de la salinidad en Y(II) máx dependió del genotipo. Aunque en *pro* su valor seguía siendo inferior al valor en wt y *gib3*, el

efecto de la salinidad fue más severo en *pro* que en los otros genotipos, y Y(II) máx disminuyó con cada aumento del nivel salino. En momentos puntuales al inicio de la adaptación a la luz, los valores de Y(II) disminuyeron al aumentar la salinidad en los tres genotipos.



Figura 44. Parámetros de fluorescencia de las clorofilas; a las 24 horas de la aplicación de los tratamientos salinos. Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en los parámetros de fluorescencia de las clorofilas; Y máx, Y(II), Y(NPQ) y Y(NO) tras 24 horas de empezar los tratamientos salinos en wt, *pro* y *gib3*. Los datos representan valores medios \pm error estándar, *n* = 15. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).



Figura 45. Parámetros de fluorescencia de las clorofilas, a los 7 días de la aplicación de los tratamientos salinos. Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en los parámetros de fluorescencia de las clorofilas; Y máx, Y(II), Y(NPQ) y Y(NO) tras 7 días de empezar los tratamientos salinos en wt, *pro* y *gib3*. Los datos representan valores medios \pm error estándar, n = 15. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

En cambio al final del periodo de adaptación a la luz, las diferencias debidas a la salinidad sólo se mantuvieron en *pro*, con una disminución brusca en las plantas crecidas en 150 mM NaCl. Al final del periodo de adaptación a la luz, Y(NPQ) sólo aumentó significativamente en *pro* con 150 mM NaCl (Figura 45H). A los 7 días de la aplicación del tratamiento salino de 150 mM NaCl, se observó un incremento en Y(NO) con respecto a las crecidas en tratamiento control, incremento que sólo se mantuvo hasta el final del periodo en *pro* (Figura 45K).

8. Fluorescencia de las clorofilas: curva de luz.

Las figuras 46, 47 y 48 muestran la respuesta de los diferentes parámetros de fluorescencia de las clorofilas (Y(II), Y(NPQ), Y(NO) y la tasa de transporte de electrones (ETR)) a una serie progresiva de intensidad de luz; desde 0 a 1075 PAR (μ mol de fotones m⁻² s⁻¹), en los días 0 (control), 1 (24 horas) y 7 de la salinización.

El incremento de la intensidad lumínica produjo un descenso gradual en Y(II) y un incremento en Y(NPQ), mientras que Y(NO) permaneció prácticamente constante en el tiempo (Figuras 46, 47 y 48). Antes de comenzar con los tratamientos salinos (día 0), observamos que el valor de Y(II) a lo largo del rango de luz ensayada era menor en *gib3* que en *pro* y en wt (Figura 46A). En los parámetros Y(NPQ) y Y(NO) sólo se observaron diferencias entre genotipos en momentos muy puntuales (Figura 46B y C). Por otra parte, la velocidad de transporte de electrones (ETR) incrementó sus valores entre 0 y 600 PAR y a partir de ahí disminuyó (Figura 46D). A partir de 300 PAR, la ETR fue mayor en *pro*, seguido de wt y *gib3*.

Independientemente del genotipo, a 24 horas de la aplicación del tratamiento salino, y a intensidades lumínicas superiores a 600 PAR, los valores de Y(II) fueron inferiores en las plantas crecidas en 150 mM NaCl (Figura 47A, B y C). Igualmente, Y(NPQ) fue mayor en plantas tratadas con 150 mM NaCl, pero no se encontraron diferencias entre plantas crecidas en tratamiento control y 75 mM NaCl, especialmente a altas intensidades lumínicas (Figura 47D, E y F). Sólo con la aplicación de la máxima intensidad lumínica se observaron diferencias en Y(NO), disminuyendo esta al aumentar la salinidad en wt y *pro* (Figura 47G, H e I). Los valores de ETR siguieron un patrón similar al descrito a día 0, disminuyendo en los tres genotipos y saturándose a baja intensidad lumínica con el aumento de la salinidad

(Figura 47J, K y L). A los 7 días de la aplicación de los tratamientos salinos, las diferencias debidas a los efectos de la salinidad en Y(II) se redujeron en wt, mientras que en *gib3*, y en *pro* disminuyeron con 150 mM NaCl (Figura 48A, B y C). Algo similar ocurrió con los valores de Y(NPQ), donde principalmente en *pro* y con el tratamiento de 150 mM NaCl se observaron las mayores diferencias (Figura 48D, E y F).



Figura 46. Curvas de respuesta de los parámetros de fluorescencia de las clorofilas a la luz; día 0 (control). Efecto de una serie progresiva de intensidad de luz (de 0 a 1075 PAR) en los parámetros de fluorescencia de las clorofilas; Y(II), Y(NPQ), Y(NO) y ETR en el día 0 de salinización (control) en wt, *pro* y *gib3*. Los datos representan valores medios \pm error estándar, n = 15.



Figura 47. Curvas de respuesta de los parámetros de fluorescencia de las clorofilas a la luz; a las 24 horas de la aplicación de los tratamientos salinos. Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl a lo largo de una serie progresiva de intensidad de luz (de 0 a 1075 PAR) en los parámetros de fluorescencia de las clorofilas; Y(II), Y(NPQ), Y(NO) y ETR tras 24 horas de empezar los tratamientos salinos en wt, *pro* y *gib3*. Los datos representan valores medios \pm error estándar, *n* = 15.

En wt y *gib3* sólo se observaron diferencias importantes con intensidades de luz concretas en valores de Y(NO), en cambio en *pro*, Y(NO) fue mayor a medida que se incrementó la salinidad, reduciéndose estas diferencias al aumentar la intensidad lumínica (Figura 48G, H e I). Finalmente, ETR en este punto del desarrollo de la planta se comportó de forma parecida a lo descrito tras 24 h de la aplicación del tratamiento salino, salvo en wt, donde las diferencias se reducen entre tratamientos salinos y en *pro* donde las diferencias se hacen más notables (Figura 48J, K y L).



Figura 48. Curvas de respuesta de los parámetros de fluorescencia de las clorofilas a la luz a los 7 días de la aplicación de los tratamientos salinos. Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl a lo largo de una serie progresiva de intensidad de luz (de 0 a 1075 PAR) en los parámetros de fluorescencia de las clorofilas; Y(II), Y(NPQ), Y(NO) y ETR tras 7 días de empezar los tratamientos salinos en wt, pro y gib3. Los datos representan valores medios \pm error estándar, n = 15.

9. Asimilación de CO₂, conductancia estomática y eficiencia en el uso del agua.

El pequeño tamaño de las hojas del mutante gib3 hizo imposible la determinación de estos parámetros. El efecto de la salinidad sobre la asimilación neta de CO₂ (Pn) y la conductancia estomática (gs) dependió del genotipo, del nivel de salinidad aplicado y del tiempo transcurrido bajo condiciones de salinidad (Figura 49, Tabla Anexa 14).



Figura 49. Parámetros fotosintéticos en hoja. (a) Los gráficos muestran el efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en la tasa de fotosíntesis neta (Pn), conductancia estomática (gs) y la eficiencia intrínseca en el uso del agua (iWUE) en los días 0, 2, 4, 6, 8 de la salinización en wt y *pro*. Los datos representan valores medios \pm error estándar, n = 5.

Respecto a Pn, independientemente del nivel salino aplicado, disminuía al aumentar la edad de la planta (Figura 49A, B y C). En general, Pn fue menor en *pro* que en wt durante el periodo de estudio (0, 2, 4, 6, 8 días tras la aplicación de los tratamientos salinos). En el tratamiento de 150 mM de NaCl, las diferencias entre wt y *pro* fueron mayores que las diferencias entre estos genotipos, tanto en condiciones control como en 75 mM NaCl. Resultados similares fueron obtenidos con gs, disminuyendo con la edad de la planta. Esta disminución fue menor en *pro* que en wt y las diferencias entre ambos genotipos fueron más marcadas con el aumento de la

salinidad (Figura 49D, E y F). En cuanto a la eficiencia intrínseca en el uso del agua (iWUE) se observaron diferencias entre wt y *pro*, especialmente con 150 mM de NaCl y a los 6 y 8 días de la aplicación de los tratamientos (Figura 49G, H e I).

10. Estado hídrico de la planta.

En los estudios del estado hídrico de las plantas, se demostró que el efecto de la salinidad en el contenido de agua en hojas de diferentes genotipos de Micro-Tom dependió del genotipo (Figura 50, Tabla Anexa 15), disminuyendo en el mutante *pro* respecto a wt y *gib3* y aumentando con el incremento de concentración de 75 y 150 mM NaCl en el medio radicular. Entre los tres genotipos no se observaron diferencias significativas en el contenido de agua entre los tratamientos de 75 y 150 mM NaCl, mientras en el tratamiento control, el contenido de agua disminuyó significativamente con respecto a los dos tratamientos salinos.



Figura 50. Estado hídrico en plantas. Efecto de la salinidad; 0 (control), 75 y 150 mM NaCl en el contenido y el contenido relativo de agua (CRA) en wt y *pro* y *gib3*. Letras diferentes representan diferencias significativas según el Test de Tukey (p < 0.05). Las barras representan valores medios \pm error estándar, *n* = 8-11. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre terta de Tukey (p < 0.05).

Tanto el contenido de agua como el contenido relativo de agua (CRA), aumentaron con los tratamientos salinos respecto al tratamiento control. En el tratamiento control, se observó menor CRA en *pro* en comparación con wt y *gib3*, mientras se observó lo contrario al aumentar la concentración de NaCl en la solución nutritiva a 75 mM donde fue el mayor CRA en el mutante *pro* con respecto a wt y *gib3*. En el tratamiento salino de 150 mM NaCl, los tres genotipos tenían casi el mismo CRA.

11. Microarray.

Recientemente se ha clonado y ensamblado el genoma de tomate del cultivar 'Heinz 1706' (The Tomato Genome Consortium, 2012). Este estudio ha confirmado las predicciones de un tamaño aproximado de genoma de 900 Mb. La anotación del genoma ha dado lugar a la predicción de 34.727 posibles genes que codificarían para una proteína, estando la expresión de estos confirmada mediante análisis por ARNseq para 30.855 genes. En nuestro estudio de transcriptómica, hemos usado el microarray de Affymetrix, en el cual están representados aproximadamente 9200 transcritos diferentes. Así pues, la cobertura posible de genes expresados por este chip es de aproximadamente del 30% del genoma expresado en tomate. Por tanto, los resultados obtenidos con esta metodología nos permiten hacer una aproximación bastante amplia de la respuesta molecular al estrés salino en Micro-Tom y los mutantes *gib3* y *pro*. En las Tablas 9 y 10 se muestra un resumen de los genes expresados de forma diferencial y con una significación que cumple el test de FDR tanto en raíz como en hoja, aplicando un cambio superior a 1 o 2.

Tabla 9. Resumen de los genes expresados de forma diferencial en raíz de Micro-Tom, pro y gib3crecidas durante una semana a 150 mM de NaCl. $p \le 0.05$ y FDR ≤ 0.05 .

Raíz		wt vs sal	<i>pro</i> vs sal	<i>gib3</i> vs sal	wt vs <i>pro</i>	wt vs gib3	pro vs gib3
FC>1	Inducidos	467	459	1563	7	130	252
	Inhibidos	507	321	2072	11	56	119
FC>2	Inducidos	257	189	451	5	25	51
	Inhibidos	155	56	336	8	63	92

Tabla 10. Resumen de los genes expresados de forma diferencial en hoja de Micro-Tom, *pro* y *gib3* crecidas durante una semana a 150 mM de NaCl. p≤0.05 y FDR≤0.05.

Hoja		wt vs sal	<i>pro</i> vs sal	<i>gib3</i> vs sal	wt vs <i>pro</i>	wt vs gib3	pro vs gib3
FC>1	Inducidos	1768	1827	229	36	25	374
	Inhibidos	1819	1415	127	108	88	666
FC>2	Inducidos	570	682	107	20	6	229
	Inhibidos	730	945	38	40	40	168

Sin embargo, en nuestro estudio sólo hemos considerado aquellos genes con un incremento o disminución igual o superior a 2. Debido al gran número de genes expresados, los datos individuales de cada uno se presentan en tablas Excel para cada columna en el anexo de esta tesis (Tablas S1-12 (CD anexo)).

11.1. Análisis de términos GO.

Se han analizado los términos GO más abundantes y su significación estadística mediante el test de Fisher usando el software del programa Partek GenomeSuite. En las Tablas 11-16 se muestran estos resultados obtenidos para los tratamientos salinos tanto en raíz como hoja.

Sobre el efecto del estrés salino en raíz de wt destacar la inducción de las familias implicadas en los procesos biológicos de óxido-reducción, pared celular, respuesta a patógenos (bacterias) y respuesta al peróxido de hidrógeno. Dentro de las funciones moleculares, destacar los procesos de actividad transferasa y de actividad peroxidasa (Tabla 11). En el tratamiento salino de hoja de wt destacan igualmente los procesos de óxido-reducción. Sin embargo, sí que presenta diferencias significativas con la raíz, destacando los procesos de defensa frente al estrés (respuesta hipersensible a patógenos), división y ciclo celular, biosíntesis de terpenoides, etc. (Tabla 12).

En el tratamiento salino de raíz en *pro*, al igual que en wt también se observó un enriquecimiento de los términos GO implicados en la respuesta al peróxido de hidrógeno y los procesos de óxido-reducción. Sin embargo, son específicos los procesos de traducción de señales y de fosforilación. A nivel foliar, al igual que wt, el término GO de los procesos de óxido-reducción esta inducido por la salinidad. Destacar que en *pro*, los términos GO relativos a los procesos fotosintéticos como son el ensamblaje del fotosistema II y de la organización de las membranas tilacoidales, se encuentran enriquecidos. También, se encuentra enriquecido el término GO relativo al procesamiento de ácidos grasos y el proceso de β -oxidación de ácidos grasos.

El tratamiento salino en el mutante *gib3*, indujo a nivel radicular también el enriquecimiento de los términos GO implicados en los procesos de óxido-reducción, así como de respuesta al peróxido de hidrógeno. Destacar que en *gib3* se produjo un enriquecimiento de términos relacionados con las paredes celulares y su proceso de

remodelación, como son los términos GO de los procesos catabólicos de quitinas, polisacáridos y del metabolismo de glucanos. A nivel foliar, el termino GO de transporte de iones metálicos fue el que estuvo principalmente enriquecido por el tratamiento salino. También destaca, el enriquecimiento del termino GO de la función molecular de la actividad de quinasas de proteínas.

Tabla 11. Raíz de Micro-Tom (wt) tratada con 150 mM de NaCl durante una semana. Análisis del enriquecimiento en términos GO usando el test de Fisher. Solo se han considerado aquellos términos GO con un enriquecimiento del valor P≤0.05. BP= Biological Process; MF= Molecular Function; CC= Celular Component.

Function	Type Ontolog	Enrichment Score	Enrichment	% genes in group	# genes in list,	# genes not in list in group
oxidation-reduction process	RP	8 37104	0.00023147	9 33941	A1	398
response to hydrogen peroxide	BP	6 52162	0.00147129	60	3	2
chitin catabolic process	BD	5 35047	0.0047459	42 8571	3	2
nolvsaccharide catabolic process		4 02112	0,0047455	42,0371		
regulation of protein dephoendorylation	BP	4,92112	0,00729098	57,5	3	5
	ВР	3,26015	0,0383825	33,3333	2	4
defense response to bacterium	BP	3,10751	0,0447123	20	3	12
extracellular region	CC	7,10536	0,0008207	16,4179	11	56
extracellular space	CC	5,86933	0,00282476	50	3	3
oxidoreductase activity, acting on paired donors	MF	12,2761	4,66E-06	25,5319	12	35
peroxidase activity	MF	8,55246	0,00019307	20,8333	10	38
heme binding	MF	8,3554	0,00023512	15,1515	15	84
transferase activity	MF	6,8748	0,0010335	10,5727	24	203
hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	MF	5,96821	0,00255882	13,6364	12	76
transporter activity	MF	5,73538	0,00322965	15,7895	9	48
geranylgeranyl-diphosphate geranylgeranyltransferase activity	MF	4,76068	0,00855981	66,6667	2	1
transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups	MF	4,55619	0,010502	33,3333	3	6
transferase activity, transferring glycosyl groups	MF	4,1564	0,0156639	14,2857	7	42
transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups	MF	3,70157	0,0246847	19,0476	4	17
protein tyrosine kinase activity	MF	3,62948	0,0265299	40	2	3
calcium-dependent phospholipid binding	MF	3,62948	0,0265299	40	2	3
cysteine synthase activity	MF	3,62948	0,0265299	40	2	3

Tabla 12. Hoja de Micro-Tom (wt) tratada con 150 mM de NaCl durante una semana. Análisis del enriquecimiento en términos GO usando el test de Fisher. Solo se han considerado aquellos términos GO con un enriquecimiento del valor P≤0.05. BP= Biological Process; MF= Molecular Function; CC= Celular Component.

Function	Type	Enrichmen	Enrichment	% genes in group	# genes in list,	# genes not in
anidation makestion museum	Untolog	t Score	p-value	that are present	in group	list, în group
oxidation-reduction process	BP	10,2388	3,5757E-05	21,4123	94	345
terpenoid biosynthetic process	BP	6,68109	0,00125441	60	6	4
cell division	BP	6,68109	0,00125441	60	6	4
regulation of cell cycle	BP	6,02499	0,00241758	54,5455	6	5
polysaccharide catabolic process	BP	5,93822	0,00263673	62,5	5	3
nucleosome assembly	BP	5,41172	0,00446394	34,375	11	21
positive regulation of translation	BP	5,19701	0,00553307	66,6667	4	2
chitin catabolic process	BP	4,47324	0,0114103	57,1429	4	3
chromatin silencing	BP	4,46978	0,0114498	75	3	1
protein targeting to membrane	BP	4,2123	0,0148123	45,4545	5	6
response to chitin	BP	3,90287	0,0201838	50	4	4
regulation of plant-type hypersensitive response	BP	3,80023	0,0223657	41,6667	5	7
carotenoid biosynthetic process	BP	3,52153	0,0295541	35,2941	6	11
regulation of defense response	BP	3,09113	0,0454507	50	3	3
extracellular space	CC	5,19701	0,00553307	66,6667	4	2
iron ion binding	MF	8,21674	0,0002701	28,5714	28	70
heme binding	MF	6,3342	0,00177456	26,2626	26	73
protochlorophyllide reductase activity	MF	5,73918	0,00321739	100	3	0
terpene synthase activity	MF	4,47324	0,0114103	57,1429	4	3
oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	MF	3,66765	0,0255363	25,4545	14	41

Tabla 13. Raíz de *pro* tratada con 150 mM de NaCl durante una semana. Análisis del enriquecimiento en términos GO usando el test de Fisher. Solo se han considerado aquellos términos GO con un enriquecimiento del valor P≤0.05. BP= Biological Process; MF= Molecular Function; CC= Celular Component.

Function	Type	Enrichment	Enrichment	% genes in group	# genes in list,	# genes not in
	Untolog	Score	p-value	that are present	in group	list, in group
response to hydrogen peroxide	BP	9,91997	4,92E-05	60	3	2
developmental process	BP	7,02649	0,00088804	66,6667	2	1
regulation of transcription, DNA-templated	BP	6,4599	0,00156495	4,54545	12	252
signal transduction by phosphorylation	BP	4,39711	0,0123129	20	2	8
phosphorelay signal transduction system	BP	3,60558	0,0271716	13,3333	2	13
transcription, DNA-templated	BP	3,52106	0,029568	4,41176	6	130
carotenoid biosynthetic process	BP	3,48317	0,03071	12,5	2	14
oxidation-reduction process	BP	3,34311	0,0353268	2,96128	13	426
intracellular signal transduction	BP	3,06794	0,0465167	10	2	18
vacuolar membrane	СС	4,39711	0,0123129	20	2	8
geranylgeranyl-diphosphate geranylgeranyltransferase activity	MF	7,02649	0,00088804	66,6667	2	1
heme binding	MF	6,53931	0,00144549	7,07071	7	92
protein histidine kinase activity	MF	5,12561	0,00594257	28,5714	2	5
transferase activity, transferring glycosyl groups	MF	4,61995	0,00985333	8,16327	4	45
phosphorelay response regulator activity	MF	4,60905	0,00996125	22,2222	2	7
transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups	MF	4,60905	0,00996125	22,2222	2	7
phosphorelay sensor kinase activity	MF	4,39711	0,0123129	20	2	8
oxidoreductase activity, acting on paired donors	MF	4,2837	0,0137915	7,40741	4	50
sequence-specific DNA binding	MF	3,94987	0,0192573	5,55556	5	85
sequence-specific DNA binding transcription factor activity	MF	3,73714	0,0238222	4,21687	7	159
iron ion binding	MF	3,61979	0,0267884	5,10204	5	93
transferase activity	MF	3,19107	0,0411279	3,52423	8	219

Tabla 14. Hoja de *pro* tratada con 150 mM de NaCl durante una semana. Análisis del enriquecimiento en términos GO usando el test de Fisher. Solo se han considerado aquellos términos GO con un enriquecimiento del valor P≤0.05. BP= Biological Process; MF= Molecular Function; CC= Celular Component.

Function	Type Ontolog	Enrichment Score	Enrichment p-value	% genes in group that are present	# genes in list, in group	# genes not in list, in group
oxidation-reduction process	BP	9,71199	6,06E-05	24,6014	108	331
rRNA processing	BP	5,75209	0,00317615	50	8	8
thylakoid membrane organization	BP	5,69651	0,00335765	60	6	4
fatty acid metabolic process	BP	4,0766	0,0169651	46,1538	6	7
stomatal complex morphogenesis	BP	3,94603	0,0193312	75	3	1
chromatin assembly or disassembly	BP	3,94603	0,0193312	75	3	1
glycine catabolic process	BP	3,91394	0,0199616	50	5	5
cell differentiation	BP	3,82108	0,0219041	57,1429	4	3
fatty acid beta-oxidation	BP	3,82108	0,0219041	57,1429	4	3
glycerol ether metabolic process	BP	3,67576	0,0253302	42,8571	6	8
photosystem II assembly	BP	3,17045	0,0419848	60	3	2
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	BP	3,17045	0,0419848	60	3	2
glutamine metabolic process	BP	3,17045	0,0419848	60	3	2
iron ion binding	MF	5,30436	0,00496986	28,5714	28	70
protochlorophyllide reductase activity	MF	5,19011	0,00557142	100	3	0
dioxygenase activity	MF	4,0766	0,0169651	46,1538	6	7
fructose 1,6-bisphosphate 1-phosphatase activity	MF	3,94603	0,0193312	75	3	1
oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors	MF	3,27679	0,0377492	50	4	4
ion channel activity	MF	3,17045	0,0419848	60	3	2
carbohydrate binding	MF	3,02139	0,0487336	33,3333	8	16

Tabla 15. Raíz de *gib3* tratada con 150 mM de NaCl durante una semana. Análisis del enriquecimiento en términos GO usando el test de Fisher. Solo se han considerado aquellos términos GO con un enriquecimiento del valor P≤0.05. BP= Biological Process; MF= Molecular Function; CC= Celular Component.

Function	Туре	Enrichment	Enrichment	% genes in group	# genes in list,	# genes not in
	Ontolog	Score	p-value	that are present	in group	list, in group
oxidation-reduction process	BP	16,3275	8,11E-08	17,3121	76	363
zinc ion transmembrane transport	BP	6,98067	0,00092968	100	3	0
glutamate metabolic process	BP	5,66994	0,00344807	75	3	1
response to hydrogen peroxide	BP	4,82882	0,00799595	60	3	2
chitin catabolic process	BP	3,72519	0,0241085	42,8571	3	4
cellular glucan metabolic process	BP	3,44181	0,0320068	26,3158	5	14
polysaccharide catabolic process	BP	3,32914	0,0358239	37,5	3	5
extracellular region	CC	17,4279	2,70E-08	34,3284	23	44
extracellular space	СС	6,76615	0,00115212	66,6667	4	2
membrane	CC	3,09791	0,0451435	12,285	50	357
heme binding	MF	14,7829	3,80E-07	27,2727	27	72
hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	MF	14,6168	4,49E-07	28,4091	25	63
oxidoreductase activity, acting on paired donors	MF	14,026	8,10E-07	36,1702	17	30
transporter activity	MF	12,5002	3,73E-06	31,5789	18	39
peroxidase activity	MF	12,0304	5,96E-06	33,3333	16	32
transferase activity, transferring glycosyl groups	MF	11,7267	8,08E-06	32,6531	16	33
glutamate decarboxylase activity	MF	6,98067	0,00092968	100	3	0
oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	MF	6,43612	0,00160261	24,0741	13	41
nutrient reservoir activity	MF	6,23822	0,00195333	40	6	9
dioxygenase activity	MF	5,55679	0,00386115	41,6667	5	7
iron ion binding	MF	5,15266	0,00578397	18,3673	18	80

calcium-dependent phospholipid binding	MF	4,82882	0,00799595	60	3	2
transferase activity	MF	4,48253	0,0113048	14,5374	33	194
manganese ion binding	MF	3,74537	0,0236268	33,3333	4	8
inorganic phosphate transmembrane transporter activity	MF	3,61936	0,0267997	66,6667	2	1
xyloglucan:xyloglucosyl transferase activity	MF	3,44181	0,0320068	26,3158	5	14
inorganic diphosphatase activity	MF	3,32914	0,0358239	37,5	3	5

Tabla 16. Hoja de *gib3* tratada con 150 mM de NaCl durante una semana. Análisis del enriquecimiento en términos GO usando el test de Fisher. Solo se han considerado aquellos términos GO con un enriquecimiento del valor *P*≤0.05. BP= Biological Process; MF= Molecular Function; CC= Celular Component.

Function	Type Ontolog	Enrichment Score	Enrichment p-value	% genes in group that are present	# genes in list, in group	# genes not in list, in group
Metal ion transport	BP	3,30277	0,036781	11,7647	2	15
Protein serine/threonine kinase activity	MF	5,68089	0,00341051	5,67376	8	133
Protein kinase activity	MF	4,69714	0,00912137	4,81928	8	158
Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	MF	4,69714	0,00912137	4,81928	8	158
Hydrolase activity, hydrolyzing O- glycosyl compounds	MF	3,89558	0,0203315	5,68182	5	83

11.2. Análisis de términos Bin mediante PageMan.

Realizamos un segundo análisis de las familias génicas usando el software de MapMan que clasifica las familias génicas mediante un sistema de clasificación jerárquica que utiliza unos descriptores llamados términos *Bin*. En las figuras 51A y B se muestran estos resultados en formato de *heatmap*.

A nivel foliar (Figura 51A) podemos observar como el mutante gib3 mostró la menor variación en la expresión diferencial de las familias génicas, mostrando sólo una reducción significativa en los genes implicados en el metabolismo de la pared celular a diferencia de pro y wt. Así, las mayores alteraciones de la expresión génica tienen lugar entre wt y pro. El análisis de los términos Bin implicados en los procesos fotosintéticos como son los fotosistemas están claramente más reprimidos en el mutante pro que en wt, confirmando lo observado en los términos GO anteriormente analizados. Entre otros procesos que están fuertemente reprimidos en el mutante pro nos encontramos con los genes de las familias de las pectin-metil esterasas, implicadas en los procesos de remodelación de las paredes celulares. También, en el mutante pro, se observó una fuerte represión de las familias génicas implicadas en la síntesis de proteínas, principalmente las proteínas ribosomales del cloroplasto. En wt se observó una represión significativa de las familias génicas implicadas en la división y ciclo celular. Destacar que entre las familias fuertemente inducidas tanto en pro como en wt, se encontraron los genes implicados en respuesta al estrés, siendo principalmente inducidos en pro los implicados en la respuesta al estrés abiótico. En pro se indujo, de una forma significativa, la familia de genes implicados en la respuesta al choque térmico, donde destacan las proteínas llamadas chaperonas. Tanto en pro como en wt se observó una inducción de los genes de la familia de las glutatión-S-transferasas implicadas en la respuesta al estrés abiótico. En el mutante pro también se encontraron inducidos los genes implicados en los procesos de degradación de lípidos mediante el proceso de β-oxidación. En cuanto a la respuesta hormonal, destacar la inducción del metabolismo del etileno en wt. Finalmente, en el mutante pro tuvo también lugar la inducción del proceso de degradación de proteínas mediado por el proceso de ubiquitinación.



Figura 51. Presentación en PageMan (MapMan software) de las categorías génicas (términos *Bin*) afectados por la salinidad en (A) hoja y (B) raíz de wt, *pro* y *gib3*. Se ha aplicado la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para identificar los grupos con expresión diferencial. Los cuadros coloreados indican los grupos con significación estadística (Benjamini & Hochberg-corrected $P \le 0.05$). La escala de color muestra en color verde sobre-expresión con respecto al control y color rojo inhibición de la expresión respecto al control.

A nivel radicular, los efectos fueron menos marcados (Figura 51B). Destacar, al igual que anteriormente, que en el mutante *gib3* la expresión de las familias génicas implicadas en el metabolismo de la pared celular, encontraban inhibidas su expresión. Igualmente, en el mutante *gib3*, encontramos inhibida la expresión genes pertenecientes a las familias de transportadores de membrana, entre los que destacan las acuaporinas, implicadas en el transporte de agua entre el apoplasto y la célula, así como entre citoplasma y vacuola. En el mutante *pro* sólo encontramos inducido, de forma general, el metabolismo hormonal, mientras que en wt se indujo la respuesta general al estrés biótico y en *gib3* la respuesta general al estrés.

11.3. Expresión génica diferencial en condiciones control entre Micro-Tom y los mutantes *pro* y *gib3*.

En este apartado nos fijamos en las variaciones de expresión génica entre las plantas wt y *pro* (raíz y hoja) y entre wt y *gib3* (raíz y hoja), crecidas en condiciones control. Estos resultados están incluidos en las tablas anexas (ver disco DVD anexo a la tesis).

En el caso de wt y pro, como se observa en la tabla S1, a nivel radicular sólo se vio en pro la sobrexpresión de 13 genes, correspondiendo precisamente uno de ellos al gen mutado SIGAI (Les.4311.1.S1 at). También cabe destacar la sobreexpresión de un gen de transporte de alta afinidad de nitrato, NRT2,1 (Les.28.2.S1 a at). Las modificaciones fueron mayores a nivel foliar, donde 60 genes mostraron su expresión diferencial. Entre los genes, destacar la inducción de los implicados en el metabolismo de etileno como son ACSI (Les.1841.1.S1 at) implicado en síntesis de etileno, un factor de transcripción SIERF25 (LesAffx.63544.1.S1 at) y la kinasa ctr1 (LesAffx.68419.1.S1 at) implicada en la señalización de la ruta del etileno. También se observó una fuerte inducción del factor de transcripción SINAC1 (Les.4483.1.S1 at), implicado en múltiples respuestas al estrés biótico y abiótico. Debido al interés de este factor de transcripción en la respuesta al estrés, hemos realizado un análisis de co-expresión del gen SINACI, (Tomato Functional Genomics Database, http://ted.bti.cornell.edu/). Entre los diversos genes co-expresados, encontramos otro factor de transcripción, WRKY39 (LesAffx.9910.1.S1 at), el cual mostró un alto valor de co-expresión (r-value=0.841, Figura 53). En el análisis realizado del gen, WRKY39 quedaría fuera (FDR≤0.05; tabla

anexa). Sin embargo, sería significativo si aplicáramos un FDR≤0.07, mostrando una alta expresión (aproximadamente 9 veces sobre-expresado en *pro*).



Figura 52. Análisis de co-expresión de los genes NAC1 y WRKY39.

Mediante un análisis *in silico* hemos realizado también un estudio de la secuencia promotora del gen *SINAC1*. Para este estudio hemos utilizado el programa disponible en la web "PLACE", analizándose 1000 nt aguas arriba del comienzo del codón de lectura para dicho gen. En la figura 53 aparecen resaltadas aquellas secuencias *cis* que son relevantes para nuestro estudio.

Figura 53. Análisis del promotor del gen SINAC1. El comienzo de la lectura (ATG) se muestra en
rojo. Sitios de reconocimiento: DOFCOREZM en naranja (AAAG); WRKY71OS en verde (TGAC);
ERELEE4 en azul (AMICROTOMTCAAA); ABRELATERD1 en violeta (ACGTG). Se ha utilizado el
softwarepLACE(https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-
bin/sogo.cgi?sid=&lang=en&pj=640&action=page&page=newplace)

En *pro*, entre los genes interesantes que encontramos estarían el factor de transcripción TCP3 y una oxidasa alternativa mitocondrial que estarían inducidos, mientras que por otro lado encontramos una lipoxigenasa C con una fuerte inhibición.

En el caso de wt y *gib3*, los resultados a nivel foliar mostraron la expresión diferencial de 46 genes (40 inducidos y 6 inhibidos). Entre los genes inhibidos destacar claramente 2 genes implicados en la síntesis de giberelinas como son 200x1 y 200x3 que están fuertemente inducidos en el mutante *gib3*.

Entre los genes inhibidos se encuentra el gen *TCP3*, que como vimos anteriormente se encontraba inducido en el mutante *pro*. Este hecho parece indicar que este gen estaría regulado diferencialmente por las giberelinas.

A nivel radicular, en el mutante *gib3* encontramos expresados de forma diferencial 88 genes (63 inducidos y 25 inhibidos). Al igual que en el tejido foliar, los genes que presentaron una mayor inducción son los genes de síntesis de giberelinas *20ox1* y *20ox3*, además de la *3ox1*. Entre otros genes inducidos fuertemente en el mutante *gib3* encontramos el gen *SCARECROW-LIKE* (LesAffx.69645.1.S1_at), gen cuya expresión suele estar regulada por las giberelinas. Igualmente, se han encontrado inducidas dos proteínas implicadas en el metabolismo y señalización del ácido salicílico como son la enzima SAMT (Les.2504.1.A1_at) y la proteína SABP (LesAffx.57437.1.S1_at).

11.4. Expresión génica diferencial en condiciones salinas entre Micro-Tom (wt) y los mutantes *pro* y *gib3*.

Para este estudio hemos seguido un análisis mediante el diagrama de Venn, que se muestra en la figura 54. Este análisis nos ha permitido identificar aquellos genes que se expresan de forma común y a su vez diferencial, entre los diferentes genotipos analizados.

A nivel foliar, al comparar los tres genotipos podemos ver que el bajo nivel de expresión en *gib3* (145 genes) condiciona claramente el número de genes modificados en común (sólo 27). Sin embargo, si comparamos entre si *pro* y wt (que tienen niveles de expresión similares), se observa una coincidencia de 708 genes, lo cual nos está indicando una coincidencia con wt de *pro* de aproximadamente un 55%.

A nivel radicular, dado el menor nivel de expresión en *pro*, la coincidencia de expresión común es de 100 genes. Sin embargo, si en este caso comparamos entre *gib3* y wt, la coincidencia es de 280 genes, que corresponde aproximadamente a un 68% de coincidencia con wt.



Figura 54. Intersección de las listas de genes expresados de forma diferencial y significativa en hoja y raíz de los diferentes genotipos. Se han considerado los genes regulados de forma diferencial por el tratamiento en comparación con los tratamientos salinos de 150 mM de NaCl durante una semana. Las áreas de intersección muestran el número de genes expresados de forma diferencial en común en los diferentes genotipos. P<0.05 y FDR<0.05.

Para obtener una visión más detallada de la respuesta génica se ha analizado la expresión génica de las diferentes familias de interés en base a los resultados obtenidos previamente con los términos GO y términos *Bin*. Para ello, se ha utilizado una presentación de los datos en formato de *heatmap*.

11.4.1. Familias génicas implicadas en la fotosíntesis.

Debido al gran número de genes implicados en los procesos fotosintéticos representados en el microarray, en la figura 56 sólo se muestran aquellos que mostraron variaciones significativas en alguno de los genotipos analizados.

Al analizar los términos GO y *Bin* encontramos que los que están relacionados con el ensamblaje de los fotosistemas, organización de los tilacoides y diferentes proteínas de los complejos fotosintéticos, presentaban un mayor enriquecimiento. Como podemos observar en los términos *Bin*, el mutante *pro* mostró una mayor inhibición de estos sistemas, al compararlo con wt y *gib3*. El mutante *gib3* mostró escasas variaciones en estos sistemas en condiciones salinas.

Como vemos en la figura 56, el mutante *pro* mostró niveles de expresión muy inferiores en la mayoría de los casos, en comparación con wt. Entre las proteínas que mostraron mayor inhibición encontramos varias que formaban parte de los complejos de unión a las clorofilas dentro del fotosistema II. Otros genes que mostraron una fuerte inhibición fueron las proteínas W de los centros de reacción, así como las proteínas psbP, pertenecientes también a los complejos de reacción del fotosistema II. Otros componentes como son las ferredoxinas, también mostraron una fuerte inhibición debido al efecto de la salinidad en el mutante *pro*. Todos estos resultados indicaron claramente una fuerte inhibición de los fotosistemas y del transporte electrónico en *pro*, inducido por la salinidad. Dentro de todos los genes presentes en el microarray, sólo uno mostró una inducción significativa en wt y *pro*, una plastoquinol oxidasa (*PTOX*), presente en la membrana tilacoidal y relacionada con el proceso de clororespiración. En la figura 55 se muestra la distribución y expresión diferencial de estos genes en los tilacoides y cloroplastos, usando el programa MapMan.



Figura 55. Representación mediante MapMan de la expresión de la familia de genes implicados en los centros de reacción del cloroplasto. (A) wt y (B) *pro*. Fold Change $\geq \pm 2$, p-value ≤ 0.05 y FDR ≤ 0.05 .

			Leaf			L
		WT vs Salt	Pro vs Salt	Gib vs Salt	- •	
lesaffx.67716.1.s1_at	chlorophyll synthase, chloroplastic-like				°	
les.608.1.s1_at	chlorophyll a-b binding protein CP26, chloroplastic-like					
les.4492.2.s1_at	chlorophyll a-b binding protein CP24 10B, chloroplastic-like					L
les.4492.3.s1_at	chlorophyll a-b binding protein CP24 10B, chloroplastic-like					L
les.147.1.s1_at	chlorophyll a/b-binding protein precursor				1	L
les.2286.1.s1_at	chlorophyll a-b binding protein 7, chloroplastic-like					L
les.3297.1.s1_at	chlorophyll a-b binding protein P4, chloroplastic-like					L
les.4359.1.s1_at	chlorophyll a-b binding protein 3C, chloroplastic-like					L
les.3062.2.s1_at					-8	L
lesaffx.57669.1.s1_at	chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I chloroplastic-like					L
les.3016.1.s1_at	chlorophyll a-b binding protein 13, chloroplastic-like					L
les.4492.1.s1_at	Chlorophyll a-b binding protein CP24 10A					L
les.1736.1.a1_at	chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I chloroplastic-like					L
les.4359.2.a1_at	chlorophyll a-b binding protein 3C, chloroplastic-like					L
les.626.2.s1_at	psbP-like protein 2, chloroplastic-like					L
lesaffx.48402.1.a1_at	Thylakoid lumenal 21.5 kDa protein, chloroplast precursor					L
les.2620.1.s1_at	photosystem II reaction center W protein, chloroplastic-like					L
les.2620.2.s1_at	photosystem II reaction center W protein, chloroplastic-like					L
les.1923.1.s1_at	Thylakoid lumenal 29.8 kDa protein					L
lesaffx.48402.1.s1_at	psbP domain-containing protein 1, chloroplastic-like					L
lesaffx.66410.1.s1_at	photosystem II 44 kDa protein					L
les.5738.1.s1_at	psbP-like protein 1, chloroplastic-like					L
lesaffx.67937.1.s1_at	psbP domain-containing protein 5, chloroplastic-like					L
les.3073.1.s1_at	photosystem II 22 kDa protein, chloroplastic-like					L
les.626.3.s1_at	psbP-like protein 2, chloroplastic-like					L
lesaffx.70106.1.s1_at	psbP domain-containing protein 3, chloroplastic-like					L
les.1472.1.s1_at	photosystem II oxygen-evolving complex protein 3					L
les.482.1.s1 at	photosystem II 23 kDa protein					L
lesaffx.70106.2.s1 at	psbP domain-containing protein 3, chloroplastic-like					L
les.325.2.s1 at	uncharacterized LOC101253996					L
les.325.1.a1 at	uncharacterized LOC101253996					L
les.325.3.a1 a at	uncharacterized LOC101253996					L
lesaffx.67435.2.s1 at	one helix protein 2					L
les.1603.1.a1 at	chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic-like					L
les.4259.1.s1 at	chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic-like					L
les.4492.1.s1 at	Chlorophyll a-b binding protein CP24 10A					L
les 241.2 s1 at	30S ribosomal protein S5, chloroplastic-like					L
les 2168 1 s1 at	nhotosystem I reaction center subunit N, chloroplastic-like					L
les 324 1 s1 at	nhotosystem i reaction center subunit III, chloroplastic-like					L
les 3087 1 a1 at	uncharacterized LOC101250638					L
lesaffy 11222 1 a1 at	chloronlast gape encoding subunit IV of the outochrome b6/f complex					L
lecaffy 11323.1.01_dt	chloroplast gene encoding subunit IV of the cytochrome b6/f complex					L
los 3087 2 s1 at	sutochrome hef complex subunit (netM) nutative					L
les 986 1 s1 at	atoF					L
los 220 1 s1 at	ATP synthesis delta chain, chloroplastic like					L
los 4867 1 s1 at	ATP synthase dana chain, chloroplastic-like					L
los 1260 1 s1 at	ATP synthase guillina chain, chioroplastic like					L
locoffy 70924.1 c1 at	ATP synthase 5000mic 0, chloroplastic-ine					L
los /615 1 s1 at	ATP synthase protain L-related					L
los 4201 1 s1 at	pre platograpia (AA -64 to 106)					L
les 4428 1 s1 a at	carbonic anhydrase					L
les.4420.1.51_d_dt	forradovia 1. chlorealartic lika					L
les 656 1 al at	ferredoxin-1, chloroplastic-like					L
les.656.2.c1_at	forredovin related					L
les.030.2.51_dt	ferredoxin-felated					L
les.3333.1.51_dt						L
lesalix.49534.1.51_at	(NAD(P)H:PLASTOQUINONE DEHTDROGENASE COMPLEX SOBUNITO					L
lesaffix AAA7A 1 -1 -1	NAD(F)n-quinone oxidoreductase subunit N-like					
lesaffx.44474.1.51_at	NADH denydrogenase subunit 4					L
iesamx.444/4.1.a1_at	NADIH denyarogenase subunit 4					
resaffx./0450.1.s1_at	NAUH denyarogenase subunit 6					L
lesaffx.27440.1.s1_at	serine/threonine-protein kinase STN7, chloroplastic-like					
lesaffx.35136.1.s1_at	NADH dehydrogenase subunit 4L					
lesaffx.44224.1.s1_at	NADH dehydrogenase ND1					
lesaffx.44224.1.a1_at	NADH dehydrogenase ND1					
les.4455.1.s1_at	plastid quinol oxidase					

Figura 56. Heatmap representando la expresión de la familia de genes implicados en el proceso fotosintetico. Fold Change $\geq \pm 2$, p-value ≤ 0.05 y FDR ≤ 0.05 .

11.4.2. Ciclo de Calvin.

Dada la implicación del ciclo de Calvin en el proceso fotosintético, se ha analizado la expresión diferencial del tejido foliar. Al igual que en el proceso fotosintético, destacar la fuerte inhibición de enzimas importantes dentro del ciclo de Calvin como son la fructosa bifosfatasa, sobre todo la isoforma citoplasmática, y la GPADH cloroplastídica. Como vemos en el *heatmap* de la figura 57, esta inhibición resultó ser mayor en el mutante *pro*. En el caso del mutante *gib3* no se observó efecto significativo.



Figura 57. Heatmap representando la expresión de la familia de genes implicados en el ciclo de Calvin. Fold Change ≥±1, p-value≤0.05 y FDR≤0.05.

11.4.3. Factores de transcripción.

11.4.3.1. Factores de transcripción NAC.

En tomate, la familia de factores de transcripción NAC se encuentra formada por 101 genes, de los cuales 19 se encuentran representados en el microarray (Figura 58A). Como se observa en la figura 58A, podríamos decir de forma general, que la familia génica de los factores de transcripción NAC se encuentra inducida por los tratamientos salinos. A nivel foliar esta inducción fue claramente superior en wt, donde 8 genes fueron inducidos y sólo 1 reprimido.



Figura 58. Heatmap representando la expresión de la familia de factores de transcripción; (A) NAC (Se ha seguido la nomenclatura descrita por Zhu *y col.*, 2014), (B) WRKY (Se ha seguido la nomenclatura descrita por Huang *y col.*, 2012). Fold Change $\geq \pm 1$, p-value ≤ 0.05 y FDR ≤ 0.05 .

Sin embargo, a nivel radicular mostró un patrón inverso, la mayor inducción fue en *gib3* donde se indujeron 7 genes, después *pro* con 3 y finalmente wt con 2 genes. Finalmente, destacar que NAC1, NAC4 y NAC-domain (Les4355.1.S1_at) fueron los que mostraron una mayor respuesta entre los diferentes tratamientos y genotipos.

11.4.3.2. Factores de transcripción WRKY.

La familia de factores de transcripción WRKY en tomate, se encuentra formada por 81 genes diferentes, de los cuales se encuentran representados en el microarray 22 (Figura 58B). De forma general podemos decir que la familia de factores de transcripción WRKY se encuentra principalmente inducida por la salinidad. A nivel foliar, observamos cómo esta inducción sólo se observa en wt, donde se inducen 3 genes diferentes (*WRKY17, 39 y 81*). Sin embargo, a nivel radicular se observa una mayor inducción de 3 genes a nivel radicular (*WRKY10, 39 y 81*). Curiosamente, en wt se inducen 3 genes pero diferentes al tejido foliar (*WRKY8, 23 y 61*).

11.4.3.3. Factores de transcripción TCP.

Esta familia génica está representada en el microarray de tomate por 10 posibles genes. Como se observa en la figura 59A, 4 genes mostraron alteración en su expresión, *SlTCP2*, *SlTCP3*, *SlTCP17* y *SlTCP24*. Destacar la fuerte inhibición a nivel foliar del gen *SlTCP3* en el mutante *pro*, y su fuerte inhibición a nivel radicular en wt.

11.4.3.4. Factores de transcripción Dof.

Esta familia génica se encuentra representada en el microarray por 7 posibles genes. Como podemos ver en la figura 59B, sólo dos de ellos mostraron su expresión alterada (*SlDof22* y *SlDof4*). Destacar la fuerte inhibición de *Dof22* en la raíz de wt.



Figura 59. Heatmap representando la expresión génica de la familia de factores de transcripción (A) TCP, (B) Dof (Se ha seguido la nomenclatura descrita por Parapunova *y col.*, 2014). Fold Change $\geq \pm 2$, p-value ≤ 0.05 y FDR ≤ 0.05 y (C) ERF. (Se ha seguido la nomenclatura del Plant Transcription Factor Database, excepto para aquellos marcados con (*) que se ha seguido la nomenclatura descrita por Zhu *y col.*, 2014). Fold Change $\geq \pm 1$, p-value ≤ 0.05 y FDR ≤ 0.05 .

11.4.3.5. Factores de transcripción ERF.

En tomate, la familia de factores de transcripción ERF se encuentra formada por 139 genes diferentes, de los cuales 43 se encuentran representados en el microarray (Figura 59C). La respuesta a la salinidad de estos factores de transcripción dependió claramente del fenotipo analizado. Así, a nivel foliar destacar que en el mutante *pro* todos los genes expresados de forma diferencial, en total 6, estaban inhibidos por la salinidad. Sin embargo, en wt, se inhibieron 5, de los cuales 3 coincidieron con *pro* (*ERF30*, 37 y 41) y se indujeron 4 (*ERF2*, 55, 60 y 70).

A nivel radicular la respuesta de esta familia génica estuvo más atenuada. Así, en el mutante *pro* sólo se produjo la inducción de los genes *ERF2* y *ERF55*. En wt además de los genes inducidos en *pro* (*ERF2* y *ERF55*), también se indujo la expresión de los genes *ERF60* y *ER78*. Sin embargo, en el mutante *gib3*, además de la inducción de estos mismos genes también se produjo la inhibición del gen *ERF41*, el cual también se encontraba inhibido en wt.

11.4.4. Ciclo celular y división celular.

Como hemos visto anteriormente al analizar los términos *Bin* y GO, en wt se observó un claro enriquecimiento de estos términos, mostrando la represión de esta familia a nivel foliar. Destacar la fuerte inhibición de diferentes ciclinas como la Ciclina A y las ciclinas CyCD3, así como diferentes kinasas dependientes de ciclinas. Sin embargo, en el mutante *pro* el efecto fue mucho menor y en *gib3* no se observaron alteraciones significativas. Sólo se observó la inducción de forma significativa de un gen, *p27KIP1-related-protein 2*, curiosamente esta familia de proteínas esta descrita como inhibidora de ciclinas del tipo CyCd3 y CDC2a. A nivel radicular, el mayor efecto se observó en el mutante *gib3*, aunque la respuesta estuvo muy atenuada en comparación con wt a nivel foliar (Figura 60).



Figura 60. Heatmap representando la expresión de los genes implicados en la división y ciclo celular. Fold Change ≥±1, p-value≤0.05 y FDR≤0.05.

11.4.5. Sistemas antioxidantes.

11.4.5.1. Enzimas antioxidantes.

Las enzimas de los sistemas antioxidantes están incluidas dentro de diferentes términos GO y Bin, como son los de defensa, respuesta al estrés abiótico y biótico, etc. Para este estudio nos hemos fijado en aquellas proteínas implicadas principalmente en la eliminación de radicales libres y peróxido de hidrógeno y que forman parte del ciclo glutatión-ascorbato. Como podemos ver en la figura 61, los sistemas antioxidantes fueron principalmente alterados a nivel foliar, predominando los procesos de inhibición. A nivel foliar el mutante gib3 mostró muy pocas alteraciones en su expresión, al igual que el mutante pro a nivel radicular. En el microarray se encuentran representadas 7 posibles isoenzimas de la enzima ascorbato peroxidasa, la cual puede presentar diferentes localizaciones subcelulares. Como se observaba en la figura 61, la isoenzima SIAPX3, cuya localización subcelular es el citoplasma, fue la principalmente expresada en todos los genotipos y órganos, mostrando a nivel foliar una fuerte inducción por salinidad, principalmente en wt y pro. Sin embargo, la isoenzima SIAPX6, localizada en la membrana de los tilacoides, mostró un comportamiento inverso a nivel foliar, siendo inhibida su expresión en wt y pro. Otro gen que fue inducido de forma significativa a nivel foliar, tanto en wt como en pro, fue una glutatión reductasa, enzima implicada en la reducción del glutatión oxidado. Finalmente, en el microarray también se encuentran representadas diferentes isoenzimas de la superoxido dismutasa (SOD), las cuales presentaron inhibida su expresión a nivel foliar. Destacar la inhibicion de Cu, Zn SOD2 y Fe-SOD en el mutante *pro*, enzimas localizadas en el cloroplasto. Estos resultados parecen mostrar una importante disminución de la capacidad de eliminar radicales libres en el cloroplasto de *pro*.



Figura 61. Heatmap representando la expresión de los genes implicados principalmente en la respuesta antioxidante y en la eliminación de radicales libres. Fold Change $\geq \pm 1$, p-value ≤ 0.05 y FDR ≤ 0.05 .

11.4.5.2. Glutation-S-transferasas.

La familia génica de la enzima glutatión-S-transferesa es relativamente grande en tomate (Figura 62). Según Csiszar *y col.* (2014) esta familia estaría formada por 81 miembros distribuidos en diferentes subfamilias. En nuestro microarray, se encuentran representados 29 posibles genes diferentes, con representantes de todas las subfamilias. Esta familia mostró también un enriquecimiento positivo en los términos *Bin* tanto en wt como en *pro*, como hemos visto anteriormente.

La inducción del estrés salino mostró claramente una importante inducción de la mayoría de los genes en los distintos genotipos, excepto en *gib3* a nivel foliar y en el mutante *pro* a nivel radicular donde el efecto estaba fuertemente atenuado. Sólo unos pocos genes fueron inhibidos por la salinidad, destacando la fuerte inhibición del gen *SlGSTF1* a nivel foliar en wt. Los genes *SlGSTU5*, *SlGSTU26* y *SlGSTL3*. mostraron ser inducidos en la mayoría de los genotipos y órganos.

				Leaf		Root		
		Wt vs Salt	Pro vs Salt	Gib vs Salt	Wt vs Salt	Pro vs Salt	Gib vs Salt	
Les.293.1.S1_at	SIGSTU4							5
Les.131.1.S1_at	SIGSTU5							
LesAffx.64054.1.S1_at	SIGSTU11							
LesAffx.56167.1.S1_at	SIGSTU12							
Les.3735.1.S1_at	SIGSTU15							1
Les.4076.1.S1_at	SIGSTU18							
Les.1645.1.A1_at	SIGSTU20							
Les.413.1.S1_s_at	SIGSTU24							
Les.3276.1.A1_at	SIGSTU25							-5
Les.3276.2.S1_at	SIGSTU25							
Les.3276.3.S1_at	SIGSTU25							
Les.3734.1.S1_at	SIGSTU26							
Les.2746.1.S1_at	SIGSTU31							
Les.2746.2.A1_at	SIGSTU31							
LesAffx.55582.1.S1_at	SIGSTU32							
LesAffx.3002.1.S1_at	SIGSTU34							
Les.4501.1.S1_at	SIGSTU39							
Les.123.1.S1_at	SIGSTU43							
LesAffx.57342.1.S1_at	SIGSTF1							
LesAffx.1959.1.S1_at	SIGSTF2							
LesAffx.1959.3.S1_at	SIGSTF2							
LesAffx.46036.1.S1_at	SIGSTF3							
LesAffx.47142.1.S1_at	SIGSTF4							
LesAffx.71535.1.S1_at	SIGSTL2							
Les.1724.1.S1_at	SIGSTL3							
Les.1724.2.S1_at	SIGSTL3							
Les.1724.3.A1_at	SIGSTL3							
LesAffx.24206.1.S1_at	SIGSTT2							
Les.854.1.A1_at	SIGSTT3							
LesAffx.27206.1.S1_at	SIGSTZ1							
Les.3172.1.S1_at	SIGSTZ2							
LesAffx.25313.1.S1_at	SIMGST							
LesAffx.65433.1.S1_at	SITCHOD							
Les.1925.1.A1_at	SIDHAR2							
Les.1925.2.S1_at	SIDHAR2							
Les.296.1.S1_at	SIDHAR5							

Figura 62. Heatmap representando la expresión de los diferentes grupos de la familia génica de las glutatión-S-transferasas. Fold Change ≥±1, p-value≤0.05 y FDR≤0.05.

11.4.6. Metabolismo y señalización hormonal.

11.4.6.1. Ácido abscísico.

El ácido abscísico (ABA) es una de las hormonas más estudiadas en la respuesta al estrés hídrico y al estrés salino, teniendo un papel muy importante en el proceso de adaptación de las plantas a las condiciones de estrés. En el microarray se encuentran representados diferentes componentes del metabolismo y señalización del ABA. Como podemos ver en la figura 63A, no se observaron importantes alteraciones del transcriptoma, ni a nivel foliar, ni radicular. Los mayores efectos se vieron en wt a nivel foliar y en *gib3* a nivel radicular. En el microarray se encuentran representados diferentes isoformas del receptor de ABA, *SIPYLs*. Sólo se observó una expresión
significativa de *SIPYL4* en wt a nivel foliar, así como una inhibición en la raíz de *gib3*. *SIPYL5* también mostró cierta inhibición en *gib3* y *pro*.

La enzima clave en la síntesis de ABA parece ser el gen *NCED1*, el cual sólo mostró una fuerte inhibición de su expresión en el mutante *gib3* a nivel foliar. Las rutas de señalización estaban en general poco afectadas por la salinidad, destacar sólo la inducción de una fosfatasa (*SIPP2C4*) en hojas de wt. A nivel foliar, también se observó una inhibición significativa en wt de los genes implicados en la síntesis temprana del ABA, como son *ABA1* y *ABA4*.

11.4.6.2. Etileno.

Entre los términos *Bin* que mostraron un enriquecimiento significativo se encontraba la síntesis y señalización del etileno en wt a nivel foliar. El análisis del microarray que se muestra en la 63B, nos muestra una inducción significativa a nivel foliar en wt de los 2 principales genes implicados en la síntesis de etileno, como son las ACC oxidasas (*LeACO3* y *LeACO4*) y las ACC sintasas (*LeACS1a* y *LeACS2*), mientras que en el mutante *pro* sólo se indujo una isoforma de *LeACO3*-like. Curiosamente, esta isoforma estaba fuertemente inducida en todos los genotipos a nivel radicular. Igualmente, a nivel radicular también se encontró inducida de una forma significativa la isoforma *LeACS2* en todos los genotipos. Las rutas de señalización estaban poco afectadas en todos los genotipos y órganos, destacando sólo la inducción de *LeCTR1* en el mutante *pro* a nivel foliar. En cuanto a los receptores de etileno, destaca sobre todo la inducción de *LeETR4* en todos los genotipos y órganos, excepto en *gib3* a nivel foliar. En *pro* y wt, el receptor *LeETR6* fue inducido sólo a nivel radicular.



Figura 63. Heatmap representando la expresión de la familia génica del metabolismo y señalización del (A) ácido asbcísico, (B) etileno y (C) ácido jasmónico. Fold Change $\geq \pm 1$, p-value ≤ 0.05 y FDR ≤ 0.05 .

11.4.6.3. Ácido jasmónico.

La síntesis de ácido jasmónico (JA) y oxilipinas forman parte de una ruta común, aunque diferentes isoenzimas son las que van a derivar en el ácido α -linoleico, al JA o bien a las oxilipinas. En tomate, el primer paso clave es la transformación del ácido α-linoleico por las lipoxigenasas, derivando la lipoxigenasa A (LOXA) hacia la síntesis de oxilipinas y la lipoxigenasa D (LOXD) hacia la síntesis de JA. En el microarray (Figura 63C) observamos cómo sólo en la raíz de wt se está inhibiendo la LOXA, mientras que no se observaron alteraciones en la expresión de LOXD en ninguno de los tratamientos. La enzima clave en la síntesis del JA es la enzima aleno oxido sintasa. En tomate encontramos 3 isoformas, estando 2 de ellas implicadas en la síntesis del JA (AOS1 y AOS2) y una en la síntesis de oxilipinas (AOS3). En el microarray hemos observado como AOS2 estaba inducida en hoja de wt y pro, pero no en gib3. Respecto a AOS1 y a nivel radicular, observamos una fuerte inducción en el mutante pro. Sin embargo, observamos una inducción de AOS3 a nivel radicular tanto en pro como en gib3. Las rutas de señalización vieron poco alterada su expresión, mostrando sólo una inducción significativa en el gen CUL1 en el mutante pro a nivel foliar.

Finalmente, destacar una inducción del gen *JMT* en hoja de wt y *pro*, gen implicado en la conversión del JA en metil-jasmonato. La forma bioactiva del jasmonato es en su forma de jasmonato de isoleucina, que es obtenido por la transformación del JA mediante la acción de la enzima JAR (jasmonoil–isoleucina conjugado sintasa), enzima presente en el microarray. Sin embargo, su expresión no mostró variaciones significativas en ninguno de los tratamientos.

11.4.7. Transportadores ionicos.

Dada la importancia del transporte y acumulación del sodio en la respuesta al estrés salino, hemos estudiado la expresión de los genes más importantes implicados en dicho proceso en tomate (Figura 64). Como podemos observar, a nivel foliar sólo se observó una respuesta significativa en el mutante *pro*, donde los antiporteadores Na⁺/H⁺ NHX2 y NHX3 estaban inducidos por salinidad, mientras que el gen *SOS3* tenía reprimida su expresión. A nivel radicular, sólo observamos la inducción del gen *NHX1* en el mutante *gib3*.



Figura 64. Heatmap representando la expresión de los principales genes implicados en el transporte de sodio. Fold Change $\geq \pm 1$, p-value ≤ 0.05 y FDR ≤ 0.05 .

11.4.8. Proteinas de estrés.

Heatshock proteins (HSPs). Como vimos en el análisis general de los términos *Bin*, una familia importante inducida a nivel foliar en el mutante *pro* es la respuesta al estrés térmico, formado principalmente por chaperonas, las cuales forman diferentes familias. Dado el gran número de ellas, hemos realizado un estudio de forma individual de cada subfamilia de chaperonas. Para ello, hemos seguido la clasificación realizada para tomate por Fragkostefanakis *y col.* (2015).

11.4.8.1. Familia Heat Shock 20.

Las HSP20 son las de menor peso molecular, englobando a proteínas diferentes que pueden estar localizadas en diversos orgánulos celulares. En nuestro array esta familia se compone de 11 genes diferentes. En la figura 65A se muestra el *heatmap* de respuesta a salinidad de los diferentes genotipos. De forma general podemos decir que las HSP20 son mayoritariamente inducidas por la salinidad.

A nivel foliar se vio claramente una fuerte inducción de la mayoría de las HSP20 en *pro*, mientras que en *gib3* no se observó ninguna alteración significativa. En wt observamos la inducción de 4 genes y la inhibición de 1 solo gen. A nivel radicular la respuesta fue más homogénea. Se observó la inducción/represión de 2 genes en los 3 genotipos (AtHSP17.6A-Cl y AtHSP17.6-CII).



Figura 65. Heatmap representando la expresión génica del grupo de las proteínas de choque térmico correspondiente a las familias; (A) HSP20, (B) HSP60, (C) HSP70, (D) HSP90 y (E) HSP100. Fold Change $\geq \pm 1$, p-value ≤ 0.05 y FDR ≤ 0.05 .

11.4.8.2. Familia Heat Shock 60.

Esta familia de HSPs mostró claramente una inhibición de su expresión bajo condiciones de estrés salino (Figura 65B). No se observaron modificaciones significativas ni en *gib3* a nivel foliar, ni en wt y *pro* a nivel radicular. Sin embargo, a nivel foliar tanto wt como *pro* mostraron un comportamiento similar, produciéndose una inhibición de la mayoría de los genes expresados. Sin embargo, destacar la fuerte inhibición en *pro* de las proteínas Cpn60- α (2) y Cpn10(1), ambas de localización cloroplastídica. A nivel radicular, sólo se observaron alteraciones en *gib3* mostrando una inhibición generalizada de las proteínas HSP60, aunque su nivel de inhibición fue menor en comparación con el tejido foliar.

11.4.8.3. Familia Heat Shock 70.

Esta familia está representada en el microarray por 12 posibles genes diferentes (Figura 65C). Principalmente, a nivel foliar destaca la fuerte inducción del gen Hsp70-18 (Les.3550.1.S1_at) en el mutante *pro*, la proteína puede estar localizada tanto en citoplasma como en el núcleo. A nivel radicular destaca la inducción del gen AtHsp70-1 en el mutante *pro*, a diferencia de wt y *gib3* que no vieron alterada su expresión. Al igual que en hoja, el gen AtHsp70-1 fue fuertemente inducido en *pro*, aunque también en wt y *gib3*, aunque en un menor grado.

11.4.8.4. Familia Heat Shock 90.

Esta familia se encuentra representada en el microarray por tan sólo 4 genes diferentes (Figura 65D). Destacar la fuerte inducción a nivel foliar del gen AtHsp90-2 en *pro*, localizado en el citoplasma y núcleo. Este gen también fue inducido en wt, aunque en menor grado. A nivel radicular, este mismo gen fue el único inducido en el mutante *gib3*.

11.4.8.5. Familia Heat Shock 100.

Esta familia se encuentra representada en el microarray sólo por dos posibles genes (Figura 65E). Destacar a nivel foliar la fuerte inducción del gen *AtHsp101*, tanto en wt como en *pro*. A nivel radicular no se observaron modificaciones significas.

11.4.8.6. Familia Heat Shock 40 y DnaJ.

Esta familia es la más representada en el array de tomate mostrando 47 posibles genes diferentes (Figura 66A).

A nivel foliar, la mayor respuesta se observó en el mutante *pro* donde aproximadamente 1/3 de los genes vieron afectada su expresión. Dentro de ellos destacar la fuerte inhibición de 2 genes, AtDJA6 y AtDJA79 ambos localizados en el cloroplasto y la fuerte inducción de AtDJC15, localizada en el apoplasto y de AtDJC28, localizada en el citoplasma. En el caso de wt, la respuesta estuvo más atenuada en comparación con *pro*, ambos genes también fueron inhibidos pero en un menor grado. El mutante *gib3* mostró sólo la inhibición de 2 genes (AtDJB1). A nivel radicular, *gib3* fue el más afectado, mostrando la alteración de un 20% de los genes, destaca la inducción de AtDJC36, localizado en el citoplasma y de AtDJC76, localizado en el cloroplasto. Por otro lado, se observó la inhibición de 2 DnaJ C y D, de localización nuclear. Sin embargo, el mutante *pro* fue poco afectado por el estrés salino, mostrando sólo una ligera inducción de 4 genes y la alteración de 4, destacando la inducción del gen AtDJC15, que también fue inducido en hoja pero en menor grado.

11.4.8.7. Familia Heat Shock Factors.

Esta familia génica no está formada por heat-shock proteins, sino por factores de transcripción implicados en la regulación de su expresión génica (Figura 66B).

A nivel foliar destacar la inducción del factor de transcripción HsfA5, el cual estaba inducido tanto en wt como en *pro*. A nivel radicular sólo destacar la inducción del factor de transcipción HsfA4b en el mutante *gib3*.



Figura 66. Heatmap representando la expresión génica (A) del grupo de las proteínas de choque térmico correspondiente a la familia HSP40 y (B) del grupo de factores de transcripción implicados en la regulación por choque térmico. Fold Change $\geq \pm 1$, p-value ≤ 0.05 y FDR ≤ 0.05 .

11.4.9. Complejo ribosomal del cloroplasto.

El análisis de los términos *Bin* mostró que el mutante *pro* tenía un enriquecimiento en los términos *Bin* relacionados con la síntesis de proteínas en el cloroplasto. Como se muestra en la figura 67, se observó en *pro* una fuerte inhibición de un importante número de proteínas que forman parte de la subunidad 50S del ribosoma del cloroplasto. Aunque en wt también se encuentran inhibidos un importante número de genes, su nivel de inhibición fue muy inferior a *pro*. El mutante *gib3*, no mostró alteraciones significativas de su expresión Por tanto, estos resultados parecen indicar que en el mutante *pro* tiene lugar una fuerte inhibición del proceso de síntesis de proteínas en el cloroplasto, que puede estar afectando de una forma muy significativa a su respuesta al estrés salino.



Figura 67. Heatmap representando la expresión génica de las proteínas del complejo ribosomal del cloroplasto. Fold Change ≥±1, p-value≤0.05 y FDR≤0.05.

12. Respuesta al estrés salino del sistema hormonal.

12.1. Respuesta al estrés salino del metabolismo de las giberelinas.

En este apartado hemos realizado un estudio de la mayoría de los metabolitos intermediarios de la síntesis de GAs, así como de las GAs bioactivas, GA₁ y GA₄. Debido a la falta del estándar interno para GA₃₄, este metabolito correspondiente al catabolismo de GA₄ no pudo ser cuantificado. Este estudio lo hemos realizado tanto en hoja como en raíz de wt, *pro* y *gib3*.

De forma general indicar que los niveles hormonales tanto de GAs bioactivas como de los metabolitos intermedios mostraron niveles inferiores en raíz que en hoja. Igualmente, los niveles de GA_4 en todas las muestras y tejidos analizados, fueron siempre mucho mayores que los niveles de GA_1 , tanto en raíz como en hoja, aunque siendo siempre esta diferencia mayor en hoja.

En la tabla 17 se muestra el resultado para los tejidos radiculares:

wt: Los tejidos radiculares mostraron bajos niveles de GA_4 y GA_1 . El estrés salino indujo una desaparición de la hormona GA_1 , mientras que la GA_4 aumentó ligeramente su concentración. En cuanto a los metabolitos intermedios de la ruta de 13-hidroxilacion (implicada en la síntesis de GA_1), no se observó modificaciones significativas en su concentración excepto para GA_{29} (catabolito de GA_{20}) que descendió su concentración. Por otro lado, la ruta de la no 13-hidroxilación (implicada en la síntesis de GA_4) no mostró variaciones significativas en la concentración de sus metabolitos intermedios.

pro: Los tejidos radiculares mostraron bajos niveles de GA_4 y GA_1 . El estrés salino indujo la desaparición de la hormona GA_1 , mientras que la GA_4 no varió su concentración. En cuanto a los metabolitos intermedios de la ruta de la 13hidroxilacion, no se observó modificaciones significativas en su concentración excepto para GA_{29} que desapareció en condiciones salinas. Por otro lado, en la ruta de la no 13-hidroxilación se mostró un ligero descenso de los niveles de GA_{12} y un ligero incremento de los niveles de GA_{15} en condiciones salinas.

gib3: Los tejidos radiculares mostraron niveles muy bajos de GA₄, mientras que la GA₁ no pudo ser detectada ni en condiciones control ni salinas. Además, el estrés salino indujo la desaparición de GA₄. En cuanto a los metabolitos intermedios de la

ruta de la 13-hidroxilacion, estos mostraron de forma general niveles muy bajos en comparación con wt y *pro*, el tratamiento salino sólo indujo la acumulación de GA_{44} (catabolito de GA_{19}) mientras que el resto no mostró variaciones significativas. Igualmente, en la ruta de la no 13-hidroxilación, todos los metabolitos mostraron niveles inferiores a los obtenidos en wt y *pro*, a excepción de la GA_{15} que mostró niveles muy altos. El tratamiento salino sólo indujo un descenso significativo de la GA_{12} .

En la tabla 18 se muestra el resultado para los tejidos foliares:

wt: Los tejidos foliares mostraron concentraciones mayores de GA₁ y GA₄ en comparación con los tejidos radiculares. El tratamiento salino produjo una fuerte disminución de la concentración de GA₄ y la desaparición de GA₁. En cuanto a los metabolitos intermedios de la ruta de la 13-hidroxilacion, observamos que se produjo un incremento de la concentración de GA₂₉ así como una disminución de la concentración de GA₂₀. Este hecho nos podría estar indicando un control de los niveles de GA₁ mediante la activación de la concentración de GA₄₄ en condiciones salinas. Por otro lado, en la ruta de la no 13-hidroxilación, observamos una fuerte acumulación de GA₉ (precursor de GA₄), dando lugar a una posible reducción de los niveles de GA₄. Sin embargo, dado que no hemos podido medir la GA₃₄ (catabolito de GA₄) no podemos saber si la disminución de GA₄ fue también debida a una activación de su catabolismo.

pro: El mutante mostró una concentración de GA₄ mucho menor que wt en condiciones control, mientras que la concentración de GA₁ fue muy parecida. En condiciones salinas se produjo un incremento de la concentración de GA₄, mientras que la GA₁, aunque descendió, este descenso no fue significativo. En cuanto a los metabolitos intermedios de la ruta de la 13-hidroxilacion, estos no mostraron alteraciones en sus concentraciones por el tratamiento salino, excepto en la GA₄₄, que se incrementó significativamente. Por otro lado, en la ruta de la no 13-hidroxilación, no se observaron modificaciones en las concentraciones de los metabolitos intermedios por el tratamiento salino.

gib3: Los niveles de GA₄ en *gib3* en comparación con wt fueron significativamente inferiores, aunque sorprendentemente fueron más elevados de lo

esperado. Sin embargo, la hormona GA_1 no pudo ser detectada en condiciones control ni salinas. El tratamiento salino no produjo alteraciones significativas en la concentración de GA_4 . En cuanto a los metabolitos intermedios en la ruta de la 13hidroxilacion, la concentración de GA_{29} y GA_8 fueron muy inferiores a los observados en wt en condiciones control. También se observó un importante aumento del catabolito GA_{44} por el tratamiento salino. Por otro lado, en la ruta de la no 13hidroxilación, no se observaron modificaciones en las concentraciones de los metabolitos intermedios por el tratamiento salino.

RAÍZ	Ruta de la no 13-hidroxilación						Ruta de la 13-hidroxilación							
	GA ₁₂	GA ₁₅	GA ₂₄	GA9	GA ₅₁	GA ₄	GA ₅₃	GA ₄₄	GA ₁₉	GA ₂₀	GA ₂₉	GA ₁	GA ₈	
wt	0.29a	1.76a	0.067a	0.063a	0.31a	0.43b	0.35a	0.38a	0.94a	0.23a	0.41a	0.21	1.01a	
wt + Sal	0.23a	1.75a	0.030a	0.067a	0.36a	0.54a	0.29a	0.41a	0.80a	0.18a	0.13b	0	0.50a	
pro	0.39a	1.40b	0.063a	0.067a	0.29a	0.37a	0.22a	0.290a	0.93a	0.20a	0.29	0.21	0.05a	
pro + Sal	0.20b	1.82a	0.040a	0.060a	0.32a	0.38a	0.22a	0.450a	0.51a	0.15a	0	0	0.04a	
gib3	0.58a	6.71a	0.15a	0.08a	0.06a	0.06a	0	0.39a	0.13a	0.04a	0.025a	0	0	
gib3 + Sal	0.28b	6.16a	0.14a	0.07a	0.06a	0.06a	0	1.13b	0.37a	0.25a	0.020a	0	0	

Tabla 17. Cuantificación del contenido en giberelinas en raíz de wt, pro y gib3 tratadas con 150 mM de NaCl durante una semana. Se analizaron 3 muestras biológicas por tratamiento. Se muestra la media (ng/g_{dw}) y su significación estadística. Diferentes letras muestras diferencias estadísticas (p< 0.05).

Tabla 18. Cuantificación del contenido en giberelinas en hoja de wt, pro y gib3 tratadas con 150 mM de NaCl durante una semana. Se analizaron 3 muestras biológicas por tratamiento. Se muestra la media (ng/g_{dw}) y su significación estadística. Diferentes letras muestras diferencias estadísticas (p< 0.05).

НОЈА	Ruta de la no 13-hidroxilación						Ruta de la 13-hidroxilación						
	GA ₁₂	GA ₁₅	GA ₂₄	GA9	GA ₅₁	GA ₄	GA53	GA 44	GA ₁₉	GA ₂₀	GA29	GA ₁	GA ₈
wt	0	0	1.08a	0.30b	0.45a	5.53a	0.54a	1.79a	3.57a	3.55a	8.12b	0.77	8.41a
wt + Sal	0	0	1.03a	2.14a	0.31a	1.90b	0.51a	0.79b	4.49a	1.05b	13.84a	0	8.07a
pro	0	0	0.46a	1.91a	0.17a	1.40b	0.52a	0.40b	2.89a	0.49a	1.51a	0.62a	0.56a
pro + Sal	0	0	0.81a	1.42a	0.21a	2.86a	0.53a	0.77a	2.45a	0.35a	0.95a	0.24a	1.10a
gib3	0	0	0.47a	1.89a	0.26a	4.46a	0.12a	0.87b	0.26a	1.88a	0.31a	0	0.35a
gib3 + Sal	0	0	0.66a	2.07a	0.77a	5.28a	0.13a	4.14a	0.18a	2.02a	0.13a	0	0.45a

12.2. Respuesta al estrés salino de diferentes sistemas hormonales.

Se ha realizado también un estudio de las diferentes hormonas vegetales que podrían tener un papel importante en la respuesta al estrés salino, tales como el ácido abscísico (ABA), el ácido jasmónico (JA), el ácido salicílico (SA), el ácido indolacético (IAA), y las citoquininas dihidro-zeatina (DHZ), trans-zeatina (Tz) y la isopentenil adenina (IP).

En la tabla 19 podemos observar que a nivel radicular el ABA aumentó de forma significa con la salinidad en todos los genotipos, llegando a ser este aumento casi del doble en el mutante *pro*.

En el caso del JA la salinidad incrementó de forma significativa su concentración en wt y *gib3* pero no en el mutante *pro*. Destacar los bajos niveles en *gib3* de JA en condiciones control, que fueron hasta 5 veces inferiores en comparación con *pro*. En cuanto al SA, la salinidad incremento de forma significativa su concentración en todos los genotipos, siendo mayor este incremento en *pro* que llego a ser de casi 3 veces. En condiciones control destacar los bajos niveles de SA en el mutante *pro* en comparación con wt y *gib3*. El IAA tuvo un comportamiento muy parecido, siendo incrementada su concentración de forma significativa por los tratamientos salinos en todos los genotipos. Este incremento fue mayor en wt, que llego a ser de 4 veces superior en el tratamiento salino. Los niveles de citioquininas fueron muy bajos en todos los genotipos y se vieron poco afectados por el tratamiento salino.

El estudio a nivel foliar se muestra en la tabla 20. Las concentraciones de ABA fueron mucho mayores en hoja que las presentes a nivel radicular, llegando a ser de aproximadamente 10 veces superior. A diferencia de la raíz, el tratamiento salino no mostró ninguna diferencia con los resultados obtenidos en el tratamiento control. Destacar que los niveles basales de ABA fueron menores en el mutante *gib3* en comparación con wt y *pro*.

El análisis de los niveles de JA mostró que el tratamiento salino sólo indujo un descenso significativo en *pro*, mientras que en wt y *gib3* no variaron de forma significativa. Destacar que los niveles basales fueron mayores en el mutante *pro* en comparación con wt y *gib3*. El SA mostró una fuerte inducción en el wt, superior a 10

veces. Aunque en el mutante *pro* también se produjo un incremento importante de la concentración de SA, este fue sólo de 3 veces. Sin embargo, los niveles de SA en *gib3* no se modificaron de forma significativa. Destacar que en el mutante *pro* los niveles basales de SA fueron del doble en comparación con wt y *gib3*. Los niveles de citoquininas también fueron muy bajos en los tejidos foliares, no pudiéndose detectar ni la DHZ ni la IP. En cuanto a la Tz, no se observaron variaciones en los niveles por el tratamiento salino.

Tabla 19. Cuantificación del contenido en diferentes fitohormonas en raíz de wt, pro y gib3 tratadas con 150 mM de NaCl durante una semana. Se analizaron 3 muestras biológicas por tratamiento. Se muestra la media (ng/g_{dw}) y su significación estadística. Diferentes letras muestran diferencias estadísticas (p< 0.05).

RAÍZ	Citoquininas						
	ABA	JA	SA	IAA	DHZ	IP	Tz
wt	187b	109b	2088b	11.9b	0.009a	0.12a	0
wt + Sal	237a	521a	4006a	47.9a	0.01a	0.45a	0
pro	149b	188a	569b	13.6b	0.0077a	0.17a	0
pro + Sal	294a	313a	1661a	24.3b	0.0076a	0.08b	0
gib3	107b	33b	4812b	78.8a	0	0.20a	0
gib3 + Sal	246a	126a	6156a	78.8a	0	0.23a	0

Tabla 20. Cuantificación del contenido en diferentes fitohormonas en hoja de wt, pro y gib3 tratadas con 150 mM de NaCl durante una semana. Se analizaron 3 muestras biológicas por tratamiento. Se muestra la media (ng/g_{dw}) y su significación estadística. Diferentes letras muestran diferencias estadísticas (p< 0.05).

HOJA		Citoquininas					
	ABA	JA	SA	IAA	DHZ	IP	Tz
wt	2542a	276a	1401b	45.3a	0	0	1.64a
wt + Sal	2475a	227a	16376a	62a	0	0	0.66a
pro	2985a	434a	3938b	34.9b	0	0	1.07a
pro + Sal	2665a	205b	12980a	76.8a	0	0	0.27a
gib3	1414a	305a	1410a	24.9b	0	0	0.69a
gib3 + Sal	1487a	269a	2399a	48.7a	0	0	0.95a

12.3. Expresión génica mediante qRT-PCR de los genes implicados en el metabolismo de las giberelinas.

Las familias génicas del metabolismo de las giberelinas de tomate las hemos dividido en:

a) Genes implicados en la síntesis de GAs, *200xidasas* y *30xidasas*. En el genoma de tomate están presentes 3 genes pertenencientes a la familia 200xidasa (200x1-3) y 2 genes de la familia 30xidasa (30x1-2).

b) Genes implicados en el catabolismo de GAs, 20xidasas. En el genoma de tomate están presentes 5 genes de la familia 20xidasa (*20x1-5*).

c) Genes implicados en la ruta de señalización, *SlDELLA*. En el genoma de tomate sólo se encuentra una única proteína DELLA.

En la figura 68, se muestra el estudio realizado en tejidos foliares de wt, pro y gib3:

wt: El estudio de la expresión de los genes del catabolismo en wt nos mostró que en condiciones salinas se produjo una fuerte inducción del gen 2ox3, mientras que la expresión de 2ox2 fue reprimida. La expresión de 2ox1 no pudo ser cuantificada dado que su expresión estaba por debajo del umbral de detección. En cuanto a 2ox4 y 2ox5 su expresión no varió de forma significativa. Se considera que los genes principales en el catabolismo foliar son 2ox3 y 2ox4. Por tanto en el caso de hoja de wt podemos considerar una inducción del catabolismo mediado por la fuerte inducción del gen 2ox3. El estudio de la expresión de los genes de síntesis en hojas de wt nos mostró que en condiciones salinas se produjo una fuerte inducción de 20ox3 y una inhibición de 20ox1. El gen 2ox2 no mostró expresión en el tejido foliar. De forma parecida se observó una inducción de la inhibición de la expresión en el tejido foliar. De forma parecida se observó una inducción de la inhibición de la expresión de 20ox1 y 3ox2 mediante la sobre expresión de la inhibición de la expresión del gen SIDELLA en el tejido foliar mostró una clara inhibición de su expresión por el tratamiento salino.

pro: El estudio de la expresión de los genes del catabolismo en *pro* nos mostró que en condiciones salinas se produjo una fuerte inhibición del proceso catabólico, mostrando una fuerte inhibición de los genes *2ox2-5*. Al igual que en wt, *2ox1* no se expresó en hoja. El estudio de la expresión de los genes de síntesis en hojas de *pro*

nos mostró un comportamiento muy parecido a wt, inducción de 20ox3 y 3ox1 y una inhibición de 20ox1 y 3ox2. Igualmente, el gen 20ox2 no se expresó en el tejido foliar de *pro*. Finalmente, la expresión del gen *DELLA* en el tejido foliar no mostró una alteración significativa.

gib3: El estudio de la expresión de los genes del catabolismo en *gib3* nos mostró que los genes 2ox2, 2ox3 y 2ox4 seguian un patrón muy parecido a wt, mostrando una clara inducción de 2ox3, inhibición de 2ox2 y sin variación en 2ox4. Sin embargo, 2ox1 que no estaba presente en wt ni en el mutante *pro*, mostró estar inhibida por la salinidad en *gib3*. Por otro lado, se observó una fuerte inducción del gen 2ox5.



Figura 68. Niveles de expresión del gen *DELLA* y genes implicados en la biosíntesis y catabolismo de giberelinas en tejido foliar. Niveles de expresión de diferentes genes de la ruta metabólica de las giberelinas obtenidos en wt, *pro* y *gib3* después de 7 días creciendo en 150 mM de NaCl y normalizados respecto a sus respectivos tratamientos controles (tres replicas biológicas y dos replicas técnicas). La cuantificación relativa de la expresión se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como control endógeno el gen *EF1*.



Figura 69. Niveles de expresión del gen *DELLA* y genes implicados en la biosíntesis y catabolismo de giberelinas en raíz. Niveles de expresión de diferentes genes de la ruta metabólica de las giberelinas obtenidos en wt, *pro* y *gib3* después de 7 días creciendo en 150 mM de NaCl y normalizados respecto a sus respectivos tratamientos controles (tres replicas biológicas y dos replicas técnicas). La cuantificación relativa de la expresión se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como control endógeno el gen *EF1*.

En la figura 69, se muestra el estudio realizado en raíz de wt, *pro* y *gib3*. De forma general en los tejidos radiculares tanto en wt, como *pro* y *gib3*, los genes de la 2ox1 y 2ox5, 20ox1-2 y 3ox1 no mostraron expresión en ninguna de las condiciones estudiadas.

wt: A nivel radicular observamos que se produjo una fuerte inducción de *2ox3* y la *2ox4*, mientras que la *2ox2* fue ligeramente inhibida. Por tanto, estos resultados señalaban una posible inducción del catabolismo en condiciones salinas. En cuanto los genes implicados en la síntesis de GAs observamos una fuerte inducción de *20ox3*.

Sin embargo, no observamos expresión de 3ox1-2. Por, tanto cabe esperar una reducción de la síntesis de GAs en condiciones salinas. Finalmente, el gen *SIDELLA* mostró una inhibición significativa en su expresión de forma parecida que los tejidos foliares.

pro: Tuvo un comportamiento parecido a wt, mostrando una inducción de los genes 20x3-4, además de una inducción de 20x2. Por tanto, parecía estar también inducido el proceso catabólico en condiciones salinas. En cuanto a los genes implicados en la síntesis de GAs, pudimos observar, al igual que wt una fuerte inducción del gen 200x3, pero a diferencia que wt observamos también una inducción de 30x2. La expresión del gen *SIDELLA* a diferencia de wt, mostró una inducción significativa en condiciones salinas.

gib3: Al igual que el mutante *pro*, *gib3* mostró una fuerte inducción del catabolismo mostrando una sobre-expresión de los genes 2*ox2-4*. Destacar una fuerte inducción del gen 2*ox3* (aproximadamente de 50 veces mayor en condiciones salinas). En los genes de síntesis es donde se observaron sus mayores diferencias con wt y *pro*, mostrando una inhibición de los genes de síntesis 20*ox3* y 3*ox2*. Por último, al igual que wt, mostró una inhibición de la expresión del gen *SIDELLA* en condiciones salinas

13. Proceso de sumoilación en Micro-Tom (wt) y los mutantes pro y gib3.

Se ha realizado un estudio del proceso de sumoilación en wt y en los mutantes *gib3* y *pro*, mostrando en la figura 70A un *Western-Blot* con el resultado obtenido. Hemos observado una banda positiva para SUMO al tamaño esperado de estas proteínas en tomate, que se encuentra entre los valores de 11-12 kDa. Destacar los bajos niveles de proteína SUMO en el mutante *pro*, tanto en condiciones control como salinas. En wt, no se observaron variaciones significativas en la concentración de la proteína SUMO por el tratamiento salino, mientras que en el mutante *gib3* se observó un ligero descenso de la concentración de SUMO en el tratamiento salino. También observamos una banda localizada entre los pesos moleculares 73-74 kDa. En el caso de wt y *gib3*, se produjo un importante incremento en la concentración debido al tratamiento salino. Sin embargo, en el mutante *pro* no se observó dicha banda. Aunque no podemos asegurarlo, dado su tamaño molecular, que corresponderia a la suma del peso de la proteína DELLA más la proteína SUMO (62.5 kDa y 11.5 kDa,

respectivamente) y tambien debido a su desaparición en el mutante *pro*, sugerimos que esta banda podría corresponder a la proteína DELLA sumoilada.

Debido a estos resultados obtenidos, se estudió la posibilidad de que la proteína SIDELLA de tomate pudiera estar sumoilada. Así, al estudiar su secuencia y compararla con otras especies (Figura 70B), vimos una posible secuencia conservada que al ser analizada *in silico* (Figura 70C) mostró ser un posible sitio de sumoilación.

También hemos analizado en el microarray la posible presencia de la proteína SUMO y su respuesta al estrés salino. En la figura 70D vemos que en el array se encuentran representadas dos posibles proteínas SUMO, SUMO1 y SUMO2. El estrés salino sólo produjo una inhibición significativa de la expresión del gen SUMO2 en el mutante *pr*o a nivel foliar.



Figura 70. (A) Western-Blot de la proteína SUMO en extractos de proteínas totales en hojas de plantas control y salinizadas de Micro-Tom a los 7 días de tratamiento. (B) Alineamiento de varias proteínas DELLA de diferentes especies en la región conservada para sumoilación. En rojo está enmarcado el dominio no canónico de sumoilación. En gris está marcado el residuo lisina al que se uniría la proteína SUMO. (C) Análisis *in silico* de los sitios de sumoilación de la proteína SIGAI de tomate mediante el software. (D) Heatmap de expresión de los genes SUMO presentes en el microarray en plantas de wt, pro y gib3, tratadas con 150mM de NaCl durante una semana.

14. Microscopia.

14.1. Estudio ultraestructural de los cloroplastos de Micro-Tom (wt), *pro* y *gib3* en condiciones salinas.

Se ha realizado un estudio ultraestructural de los cloroplastos de los diferentes genotipos tanto en condiciones control como en condiciones salinas. El analisis de ultraestructura en condiciones control mostró que no había diferencias significativas entre los diferentes genotipos (Figuras 71 y 72). Los cloroplastos en condiciones control de los diferentes genotipos se caracterizaron por tener una forma discoidal, con una grana bien desarrollada, que contenía entre 5-20 tilacoides por grana, con gránulos de almidón y plastoglóbuli. En estos cloroplastos era frecuente observar invaginaciones del citoplasma (Figuras 71A y 72; *pro* A y C).

(wt)



Figura 71. Ultraestructura de los cloroplastos de Micro-Tom (wt) crecido en condiciones control. (A) y (C) Imágenes generales mostrando varios cloroplastos. (B) y (D) detalles de la ultrastructura del cloroplasto mostrando tilacoides bien apilados y plastoglóbulos pequeños. A= amiloplasto; G= Grana; P= pared celular; Pt= Plastoglobulo; V= vacuola.





Figura 72. Ultraestructura de los cloroplastos de los mutantes *pro* y *gib3* crecidos en condiciones control. (A) y (C) Imágenes generales mostrando varios cloroplastos. (B) y (D) detalles de la ultrastructura del cloroplasto mostrando tilacoides bien apilados y plastoglóbulos pequeños. A= amiloplasto; G= Grana; P= pared celular; Pt= Plastoglobulo; V= vacuola.

En wt y en condiciones salinas, se observaron diferentes poblaciones de cloroplastos. Así, un importante número de cloroplastos mostró un grana bien organizado, sin alteración en el número y tamaño de los plastoglóbulos, aunque si se observó una reducción de los gránulos de almidón (Figura 73A y B). Sin embargo, también se observaron cloroplastos que presentaban tilacoides dilatados y cierta desorganización de la estructura del grana (Figura 73C y D). En algunos casos los cloroplastos presentaron una fuerte desorganización de la ultraestructura interna del grana, abundantes plastoglóbulos y la membrana del cloroplasto presentaba abundantes ondulaciones (Figura 73E y F).

El mutante *pro* mostró importantes diferencias en la ultraestructura del cloroplasto en condiciones salinas en comparación con wt y *gib3*. La gran mayoría de los cloroplastos mostraron un gran descenso en el número de tilacoides por grana, no siendo superior a 3 tilacoides (Fifura 74A y B), en los que no se observaban dilataciones del lumen del tilacoides. Sin embargo, en otros cloroplastos se observaban granas con tilacoides poco abundantes y dilatados (Figura 74C). La característica más importante fue la formación de plastoglóbulos de gran tamaño que en algunos casos ocupaban gran parte del estroma (Figura 74E). En algunos casos hemos observado cómo estos plastoglóbulos se presentaban en la periferia presionando a la membrana cloroplastídica, aunque no observamos que fueran expulsados al citoplasma (Figura 74B).

El mutante *gib3* fue el que mostró un menor efecto a nivel de la ultraestructura del cloroplasto. Al igual que wt, *gib3* mostró una importante población de cloroplastos sin diferencias en su ultraestructura, mostrando granas bien organizados (Figura 75A y C). Sin embargo, sí que se observó la presencia de dilataciones del lumen del tilacoide en los cloroplastos (Figura 75B y D), siendo estas dilataciones menores que las observadas en wt y *pro* (comparar con las figuras 73D y F y 74C). En cuanto a los plastoglóbulos se observó un mayor número así cómo un incremento de su tamaño (ver más adelante el estudio morfométrico).



Figura 73. Modificaciones ultraestructurales de los cloroplastos de Micro-Tom (wt) crecido en 150 mM de NaCl durante una semana. (A), (C) y (E) Imágenes generales mostrando el efecto de la salinidad en los cloroplastos. (B) detalle de un cloroplasto que muestra un grana bien apilado y sin dilatacones. (D) y (F) Detalle de cloroplastos que muestran tilacoides dilatados por el efecto de la salinidad. A= amiloplasto; G= Grana; P= pared celular; Pt= Plastoglobulo; V= vacuola.



Figura 74. Modificaciones ultraestructurales de los cloroplastos del mutante *pro* **crecido en 150 mM de NaCl durante una semana.** (A) Imagen general mostrando el efecto de la salinidad en los cloroplastos. (C) Imagen general mostrando dilatación de los tilacoides y la presencia de plastoglóbulos de gran tamaño. (E)Imagen general mostrando un cloroplasto con abundantes plastoglóbulos. (B), (D) y (E) Detalles de diferentes cloroplastos que muestra un grana bien apilado y sin dilataciones y plastoglóbulos de gran tamaño. A= amiloplasto; G= Grana; P= pared celular; Pt= Plastoglobulo; V= vacuola.



Figura 75. Modificaciones ultraestructurales de los cloroplastos del mutante *gib3* crecido en 150 mM de NaCl durante una semana. (A), (C) y (E) Imágenes generales mostrando el efecto de la salinidad en los cloroplastos. (B) y (D) Detalles de diferentes cloroplastos que muestra un grana bien apilado y con pequeñas dilataciones y plastoglóbulos pequeños. (F) Detalle de un cloroplasto mostrando un grana bien apilado y un plastoglobulo de gran tamaño. A= amiloplasto; G= Grana; P= pared celular; Pt= Plastoglobulo; V= vacuola.

14.2. Análisis morfométrico del tamaño de los cloroplastos y plastoglóbulos.

Para analizar las diferencias entre los cloroplastos de los diferentes genotipos y su respuesta al estrés salino, se ha realizado un estudio morfométrico. El análisis mostró que en condiciones control, el cloroplasto del mutante *gib3* tenía un tamaño relativamente menor en comparación con wt y *pro*, no mostrando estos dos últimos, diferencias entre ellos. De forma general, podemos decir que la salinidad produjo en todos los genotipos, una disminución significativa del tamaño del cloroplasto (Figura 76). Aunque, como se ve en la figura 76 esta reducción fue mucho más marcada en el mutante *pro* donde se llegó a reducir casi 3 veces, en comparación con wt que sólo se redujo 1.4 veces.



Figura 76. Análisis morfométrico del tamaño del cloroplasto y el efecto del tratamiento salino de 150 mM de NaCl durante una semana. Al menos 40 cloroplastos han sido analizados por tratamiento y genotipo. La media y desviación estándar han sido analizadas mediante la T-Student (p<0.05). Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas.

En condiciones control, el diámetro del plastoglóbulo en *pro* y wt no mostró diferencias significativas (Figura 77). Sin embargo, los plastoglóbulos del mutante *gib3* fueron de un menor tamaño. El tratamiento salino no afectó de forma significativa al tamaño de los plastoglóbulos de wt. Sin embargo, el tratamiento salino si indujo un mayor diametro de los platoglóbulos del mutante *gib3*, debido a la

formación de una población de plastoglóbulos en la que su tamaño oscilaba entre 200 y 370 nm, aunque el mayor incremento en tamaño del plastoglóbulo se observó en el mutante *pro* donde su diametro medio fue superior en 2.4 veces al de wt. En el mutante *pro* se observó la aparición de una importante población de plastoglóbulos de gran tamaño comprendido entre 250-500 nm.



Figura 77. Análisis morfométrico del diámetro de los plastoglóbulos. Histogramas de las frecuencias de tamaño. El análisis de las frecuencias se ha realizado mediante el programa Statistix 8.0. Al menos 200 plastoglóbulos han sido analizados por tratamiento y genotipo. La media y desviación estándar han sido analizadas mediante la T-Student (p<0.05). Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas.

14.3. Localización subcelular del sodio en raíces del mutante pro.

Este estudio se ha realizado en raices jovenes, y para la localización subcelular del sodio hemos utilizado CoroNaGreen, un fluorocromo con alta especificidad que nos ha permitido localizar subcelularmente el sodio en tejido vivo, (Garcia Garma *y col.,* 2015). En la figura 78 se muestran los resultados obtenidos en *pro*, los obtenidos con *gib3* y wt fueron muy similares, por ello no se muestran.

En la figura 78, observamos como a nivel citoplasmático la intensidad de fluorescencia es muy baja al compararla con la obtenida en la vacuola, donde parece acumularse principalmente el sodio presente en la raíz. Destacar, que en algunos casos pudimos observar pequeñas vesículas de tamaño comprendido entre 0.5-1 μ m, que muestran también una fuerte fluorescencia. Estas vesículas suelen localizarse muy cercanas a la membrana plasmática (Figura 78F), la cual está marcada con el fluorocromo especifico FM4-64.



Figura 78. Localización subcelular de sodio en raíces del mutante *pro* tratado con 150 mM de NaCl durante una semana. (A) Marcaje con CoroNa Green para la localización del sodio. (B) Marcaje de la membrana plasmática con FM4-64. (C) Combinación de las imágenes A y B. (D) detalle de la figura A mostrando la localización del sodio en las vacuolas. (E) Detalle de la figura B mostrando las células marcadas. (F) Detalle de C, las flechas indican posibles pequeñas vesículas que contienen sodio.

• Experimentos de interacción fuente de nitrógeno y salinidad.

Todos los experimentos realizados en este apartado se han realizado solamente a 75 mM de NaCl.

1. Velocidad de crecimiento relativo.

La velocidad de crecimiento relativo (VCR) se determinó desde el momento en que se iniciaron los tratamientos salinos (30 DDS) hasta que las plantas iniciaron la fase de cuajado de frutos. En general, la VCR disminuyó progresivamente con la edad de la planta y los mayores valores se encontraron en el genotipo wt y con alta concentración de NO_3^- (Figura 79). En concentraciones altas de N, la VCR fue siempre inferior en *gib3* respecto a los genotipos wt y *pro* (Figura 79A, B, E, y F). En cambio en concentraciones bajas de N, las diferencias entre genotipos, especialmente cuando se utilizó NO_3^- , se redujeron, y sólo con NH_4^+ la VCR de *pro* fue inferior a wt (Figura 79C, D, G, y H). A la semana de comenzar los tratamientos salinos, al aplicar 2 mM de NH_4^+ hubo una importante caída en la VCR (Figura 79E, F). Respecto al tratamiento salino observamos que en *gib3* y más marcadamente cuando se utilizó NH_4^+ , la VCR se mantuvo constante durante la primera semana (Figura 79G, H, E, F).



Figura 79. Velocidad de crecimiento relativo. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO_3^- y NH_4^+ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la VCR en wt, *pro* y *gib3*; a partir del momento de iniciar los tratamientos salinos (30 DDS; 10 días después de crecer las plantas en la solución nutritiva) hasta el inicio de la fase de floración (45 DDS). Los datos representan valores medios ± error estándar, *n* = 5.

2. Producción de biomasa y su distribución.

2.1. Biomasa peso fresco.

En general observamos que el genotipo que produjo mayor biomasa tras el periodo experimental fue wt, seguido por *pro* (-14.3% respecto a wt), y *gib3* (-74.7% respecto a wt) (Figuras 80 y 81, Tabla Anexa 16). Esto fue observado en todas las partes de la planta estudiadas excepto en el tallo que fue igual en wt y *pro*. El nivel salino ensayado, 75 mM NaCl, redujo la producción de biomasa total en un 12.3%. Todas las partes de la planta, excepto la raíz, disminuyeron su biomasa fresca debido al efecto del tratamiento salino. Las plantas crecidas en NH₄⁺ tuvieron un 24.9% menos de biomasa total que las plantas crecidas en NO₃⁻. Las plantas tratadas con alta concentración de N produjeron mayor biomasa que las tratadas con baja concentración, viendo reducida su biomasa en un 43.5%. No obstante decir que, ni la fuente de N (NO₃⁻ y NH₄⁺), ni su concenctración (2 y 0.2 mM), ni el tratamiento salino aplicado (0 y 75 mM NaCl) afectaron por igual a los diferentes genotipos. En cuanto a la producción de biomasa aérea y total (Figura 80A y C) decir que:

- i) En plantas wt y crecidas con alta concentración de N, produjeron mayor biomasa aérea y total las crecidas en NO₃⁻ en comparación con las crecidas en NH₄⁺, independientemente del tratamiento salino. Sin embargo, en plantas wt y crecidas con baja concentración de N, no se encontraron diferencias entre las crecidas con NO₃⁻ y con NH₄⁺, independientemente de la salinidad.
- ii) El mutante *pro* crecido en 0 mM NaCl y con alta concentración de NO₃⁻ produjo notablemente más biomasa aérea y total que las plantas crecidas con NH₄⁺. Por otro lado, cuando el mutante *pro* fue crecido con alta concentración de NO₃⁻ y NH₄⁺ y a 75 mM NaCl, decir que no se encontraron diferencias significativas en la biomasa de la parte aérea, aunque la biomasa total fue ligeramente superior en plantas crecidas con NO₃⁻ respecto a las crecidas en NH₄⁺. Con baja concentración de N e independientemente de la salinidad, las plantas tratadas con NO₃⁻ produjeron más biomasa aérea y total que las plantas crecidas en NH₄⁺. En *pro*, con baja concentración de N, e independientemente del tratamiento salino, las plantas tratadas con NO₃⁻ produjeron más biomasa aérea y total que las plantas aérea y total que las tratadas con NH₄⁺.
- iii) El mutante *gib3* aunque sigue las tendencias generales descritas, no presenta diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

En cuanto a la producción de biomasa de raíz e independientemente del tratamiento salino (Figura 80B, Tabla Anexa 16; Gen x Fuente x Concentración) decir que:

- i) En plantas wt, la baja concentración de NH₄⁺ aumentó la biomasa de raíz con respecto a una concentración alta. Por otro lado, no presentó diferencias entre una baja y una alta concentración de NO₃⁻.
- ii) El mutante *pro* al ser tratado con NO₃⁻, presento una mayor biomasa de raíz que al ser tratado con NH₄⁺, siendo menor con bajas concentraciones de N que con altas, independientemente de la fuente de N aplicada.
- iii) El mutante *gib3* no presento diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Independientemente de la concentracion de N los resultados obtenidos fueron los siguientes (Figura 80B, Tabla Anexa 16; Gen x Fuente x Sal):

- i) En plantas wer la salinidad sólo redujo la producción de biomasa de raíz en las plantas tratadas con NH₄⁺.
- ii) La salinidad redujo la producción de biomasa de raíz en el mutante *pro* cuando la fuente de N fue NO₃⁻, pero no con NH₄⁺.
- iii) En gib3 no se encontraron diferencias significativas.

De forma general el ration PA/R fue mayor en wt que en *pro*, y a su vez mayor en *pro* que en *gib3* (Figura 80D, Tabla Anexa 16). El efecto conjunto de la salinidad, el NH_4^+ y la concentración de 2 mM de N, hizo que aumentara el ratio PA/R respecto a las plantas crecidas en 0 mM NaCl, NO_3^- y una concentración de 0.2 mM de N. Entre los distintos genotipos, el ratio PA/R estuvo afectado por la combinación de la fuente de N y el nivel salino, siendo independiente de la concentración de N (Gen x Fuente x Sal):

- i) En plantas wt y *pro* el aumento de la salinada hizo que aumentara el ratio PA/R en plantas crecidas con NH_4^+ pero no con NO_3^- .
- ii) En el mutatne *gib3*, sólo encontramos diferencias significativas entre las plantas crecidas en 0 mM NaCl y NO₃⁻ y las plantas crecidas en 75 mM NaCl y NH₄⁺, siendo mayor el ratio PA/R en estas últimas.



Figura 80. Producción de biomasa (g_{pf} planta⁻¹) de planta completa, parte aérea, raíz y el ratio parte aérea/raíz. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la producción de biomasa fresca en wt, *pro* y *gib3*; (A) parte aérea, (B) raíz, (C) biomasa total y (D) el ratio PA/R. Las barras representan valores medios ± error estándar, n = 13-15. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).



Figura 81. Producción de biomasa (g_{pf} **planta**⁻¹**) de hoja y tallo.** Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la producción de biomasa fresca en wt, *pro* y *gib3*; (A) hoja y (B) tallo. Las barras representan valores medios \pm error estándar, n = 13-15. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

2.2. Biomasa peso seco.

En cuanto a la producción de biomasa seca, al igual que en la producción de biomasa fresca, la mayor producción fue en el genotipo wt, seguido de *pro* (-7.9% respecto a wt), y *gib3* (-73.23% respecto a wt) (Figuras 82 y 83, Tabla Anexa 17). Uno de los efectos más notables que se observó en todas las partes de la planta fue el efecto de la salinidad, con una reducción de un 25.5% en la producción de biomasa seca total. Al igual que en la producción de biomasa fresca, las plantas tratadas con NH₄⁺ tuvieron un 20.4% menos de biomasa total seca que las plantas tratadas con NO₃⁻. Y también las plantas con baja concentración de N produjeron menor biomasa que las plantas con alta concentración, con una reducción de un 41.88% en la producción de biomasa seca total respecto a las plantas con concentración alta de N.
Los resultados obtenidos respecto a la producción de biomasa aérea seca (Figura 82A) fueron los siguientes:

- i) En plantas wt crecidas en alta concentración de N y al igual que la producción de biomasa aérea fresca, las plantas tratadas con NO₃⁻ produjeron más biomasa aérea que las tratadas con NH₄⁺, independientemente del tratamiento salino aplicado. También, al igual que la biomasa fresca, en bajas concentraciones de N, no se encontraron diferencias significativas entre plantas tratadas con NO₃⁻ y plantas tratadas con NH₄⁺, independientemente del tratamiento.
- ii) El mutante *pro* crecido con alta concentración de N y en tratamiento control (0 mM NaCl), produjo una mayor biomasa aérea cuando la fuente de N aportada era el NO₃⁻. En *pro* con alta y baja concentración de N, las plantas con NO₃⁻ tenían más biomasa que las plantas con NH₄⁺ y no hubo diferencias entre plantas con NO₃⁻ en tratamiento salino con 75 mM NaCl y plantas con NH₄⁺ en tratamiento control.
- iii) En el mutante *gib3* no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

En cuanto a la producción de biomasa total (Figura 82C) los resultados fueron:

- i) En plantas wt crecidas en alta concentración de N, la biomasa total fue mayor en plantas crecidas con NO₃⁻ que con NH₄⁺, pero con baja concentración de N no hubieron diferencias significativas entre plantas con NO₃⁻ y con NH₄⁺. En el tratamiento control no se encontraron diferencias significativas entre plantas crecidas en NO₃⁻ y en NH₄⁺, pero en el tratamiento de 75 mM NaCl, las plantas con NO₃⁻ produjeron mayor biomasa total que las plantas con NH₄⁺.
- ii) En el mutante *pro* y al igual que en la producción de biomasa fresca total, con alta concentración de N y con 0 mM NaCl, las plantas con NO₃⁻ produjeron notablemente más biomasa total que las plantas con NH₄⁺.
- iii) En cuanto al mutante *gib3*, al igual que la producción de biomasa aérea no hubieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.



Figura 82. Producción de biomasa (g_{ps} planta⁻¹) de planta completa, parte aérea, raíces y el ratio parte aérea/raíz. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la producción de biomasa fresca en wt, *pro* y *gib3*; (A) parte aérea, (B) raíz, (C) biomasa total y (D) el ratio PA/R. Las barras representan valores medios ± error estándar, n = 13-15. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

Respecto a la producción de biomasa de raíz (Figura 82B):

- i) En plantas wt y crecidas con NO₃⁻, no hubieron diferencias significativas entre alta y baja concentración de N, aunque con alta, las plantas crecidas con NO₃⁻ produjeron mayor biomasa de raíz que las crecidas con NH₄⁺.
- ii) Al igual que en la producción de biomasa aérea y biomasa total, con alta concentración de N y con 0 mM NaCl, las plantas crecidas con NO₃⁻ produjeron notablemente más biomasa total que las crecidas con NH₄⁺.
- iii) En gib3 no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.



Figura 83. Producción de biomasa (g_{ps} **planta**⁻¹**) de hoja y tallo.** Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la producción de biomasa fresca en wt, *pro* y *gib3*; (A) hoja y (B) tallo. Las barras representan valores medios \pm error estándar, n = 13-15. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

Independientemente de la concentración de N (Figura 82B, Tabla Anexa 17; Gen x Fuente x Sal), tanto en wt como en *pro*, la salinidad redujo la producción de biomasa de la raíz, sin embargo, en *gib3* no hubieron diferencias significativas entre el tratamiento control y el de 75 mM NaCl.

El ratio PA/R fue mayor en wt que en *pro*, y mayor en *pro* que en *gib3* (Figura 82D, Tabla Anexa 17). La aplicación del tratamiento de 75 mM NaCl, NH_4^+ y la concentración de 2 mM de N, hizo que se incrementara el ratio PA/R respecto a las plantas crecidas en 0 mM NaCl, NO_3^- y en una concentración de 0.2 mM de N, respectivamente.

3. Peso específico de la hoja.

El peso específico fresco (LSM-PF) y seco (LSM–PS) de hojas de Micro-Tom fue mayor en *gib3*, seguido de wt y *pro* (Figura 84, Tabla Anexa 18). El efecto de la salinidad sobre el peso específico de las hojas se tradujo en un aumento del LSM-PF y una disminución del LSM-PS. El LSM-PF fue mayor con el tratamiento de NO₃⁻ que con el de NH₄⁺, y lo contrario ocurrio con LSM-PS, donde aumentó con NH₄⁺⁻. En plantas con baja concentración de N, los valores de LSM-PF y de LSM-PS fueron mayores. Independientemente de la concentración de N y del tratamiento salino aplicado, el valor LSM-PF en wt fue siempre mayor con NO₃⁻ que con NH₄⁺, ocurriendo lo contrario en *gib3*, mientras que en *pro* no hubo diferencias significativas en LSM-PF al ser tratadas con NO₃⁻ o con NH₄⁺ (Figura 84, Tabla Anexa 18).

Independientemente de la salinidad, en plantas wt no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de NO_3^- y NH_4^+ (con alta o baja concentración de N) en el valor de LSM-PS (Figura 84D, Tabla Anexa 18). El mutante *pro* crecido con alta o baja concentración de N no mostró diferencias significativas entre los tratamientos de NO_3^- y NH_4^+ (Figura 84E, Tabla Anexa 18). En el mutante *gib3*, el valor de LSM-PS aumentó notablemente con el tratamiento de baja concentración de NH_4^+ (Figura 84F, Tabla Anexa 18). *gib3* crecido en alta concentración de NH_4^+ (Figura 84F, Tabla Anexa 18). *gib3* crecido en alta concentración de N no mostró diferencias significativas entre los tratamientos con baja concentración de N, el valor de LSM-PS disminuyó significativamente en las hojas tratadas con NO_3^- respecto a tratadas con NH_4^+ . Tanto en tratamiento control como salino, ni wt ni *pro* ni *gib3*, crecidos con NO_3^- y con NH_4^+ mostraron diferencias (Figura 84, Tabla Anexa 18).



Figura 84. Peso específico de las hojas (mg peso fresco y seco por cm² de hoja). Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en peso específico de las hojas en wt, *pro* y *gib3*; (A, B y C) Peso específico fresco y (D, E y F) peso específico seco. Las barras representan valores medios ± error estándar, n = 20. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

4. Longitud del tallo.

La longitud de tallo del mutante *pro* fue mayor que en wt, y en wt mayor que en *gib3* (Figura 85, Tabla Anexa 19). Con el tratamiento salino y con NH_4^+ , la longitud de tallo disminuyó respecto al tratamiento control y con NO_3^- , respectivamente.

En la figura 85, podemos observar que:

i) En plantas wt, la longitud de tallo de plantas con concentración alta de N y crecidas con NO₃⁻ es mayor que en las plantas con NH₄⁺, independientemente de la salinidad, pero no hubo diferencias significativas en la longitud de tallo entre

los tratamientos con NO_3^- o NH_4^+ en condiciones de concentración baja de N. También se observó que las plantas con concentración alta de NH_4^+ fueron las de menor longitud de tallo respecto a los otros tres tratamientos.

- ii) El mutante *pro* en todas las combinaciones de concentración alta o baja de N y de NO₃⁻ o NH₄⁺ tuvieron mayor longitud de tallo respecto a wt y *gib3*. En *pro*, con concentración alta y baja de N, las plantas con NO₃⁻ eran de mayor longitud de tallo que con NH₄⁺.
- iii) En gib3 no hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.



Figura 85. Longitud de tallo. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la longitud de tallo en wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios ±error estándar, n = 5-6. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

5. Estado nutricional de la planta.

5.1. Concentración de los iones Na⁺ y Cl⁻.

Generalmente en raíz, hoja y tallo de wt, *pro* y *gib3*, la concentración de Na⁺ y de Cl⁻ aumentó al aumentar la concentración de NaCl en el medio radicular (Figuras 86, 87 y 88, Tablas Anexas 20, 21 y 22).

La concentración de Na⁺ o no fue detectada, o fue muy pequeña en los tratamientos control, independientemente de la parte de la planta analizada (Figuras 86A, B y C; 87A, B y C; 88A, B y C). El aumento de la concentración de NaCl a 75 mM en la solución nutritiva aumentó drásticamente la concentración de Na⁺ en la planta, obteniéndose las mayores concentraciones de Na⁺ en hoja, tallo y por ultimo raíz. La fuente y concentración de N no tuvo efecto sobre la concentración de Na⁺ en los tejidos de raíz y tallo, pero si en hoja, donde aumentó la concentración de Na⁺ en

las hojas de plantas con NO_3^- y las plantas con concentración baja de N respecto a las hojas de plantas con NH_4^+ y las plantas con concentración alta de N, respectivamente (Figura 87A, B y C, Tabla Anexa 21).

La concentración de Cl⁻ comportó de manera diferente de un tejido a otro: i) en raíz, la concentración de Cl⁻ disminuyó en *pro* respecto a wt y *gib3*, mientras que la fuente y concentración de N no tuvieron efecto (Figura 86D, E y F, Tabla Anexa 20); ii) en hoja, la concentración de Cl⁻ fue mayor en *pro* respecto a *gib3*, y mayor en *gib3* respecto a wt, aumentando con la baja concentración de N, mientras que la fuente de N no tuvo efecto ninguno sobre la concentración de Cl⁻ (Figura 87 D, E y F, Tabla Anexa 21); iii) por último, la concentración de Cl⁻ en el tallo de wt fue mayor respecto a *pro* y *gib3*, siendo además mayor en el tallo de plantas crecidas tanto con fuente de N en forma de NH₄⁺ respecto a las plantas con NO₃⁻, cómo con concentración baja de N (Figura 88D, E y F, Tabla Anexa 22).



Figura 86. Concentración de los iones Na⁺ y Cl⁻ en raíz. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la concentración (mg g_{ps}⁻¹) de los iones Na⁺ y Cl⁻ en raíz en wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios \pm error estándar, n = 6. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

5.1.1. Raíz.

Independientemente de la fuente y de la concentración de N (Figura 86, Tabla Anexa 20; Gen x Sal); i) la mayor concentración de Cl⁻ en raíz fue en wt y *pro* en condiciones de 75 mM NaCl; ii) en condiciones de tratamiento control, no hubo diferencias en la concentración de Cl⁻ en raíz entre los distintos genotipos; iii) en el tratamiento salino, la concentración de Cl⁻ disminuyó significativamente en *gib3* respecto a wt y *pro*.

5.1.2. Hoja.

La mayor acumulación del ion Na⁺ en hoja, independientemente de la fuente y de la concentración de N fue en el mutante *pro* en condiciones salinas (Figura 87, Tabla Anexa 21; Gen x Sal).



Figura 87. Concentración de los iones Na⁺ y Cl⁻ en hoja. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la concentración (mg g_{ps}⁻¹) de los iones Na⁺ y Cl⁻ en hoja en wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios \pm error estándar, n = 6. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

Mientras que en condiciones de tratamiento control no hubieron diferencias en la concentración de Na⁺ entre los distintos genotipos; mientras en condiciones salinas, la concentración de Na⁺ disminuyó significativamente en wt y *gib3* respecto a *pro*.

En cuanto a la concentración de Cl⁻, independientemente de la fuente y de la concentración de N (Figura 87D, E y F, Tabla Anexa 21; Gen x Sal); i) al igual que Na⁺, la mayor concentración de Cl⁻ fue en *pro* en condiciones salinas; ii) y al igual que el Na⁺, en condiciones control no hubieron diferencias en los valores de Cl⁻ en hoja entre los distintos genotipos; iii) en condiciones de 75 mM de NaCl, la concentración de Cl⁻ fue mayor en *pro* respecto a *gib3* y mayor en *gib3* respecto a wt. Independientemente del nivel de salinidad (Figura 87, Tabla Anexa 21; Gen x Fuente x Concentración) no hubo diferencias significativas en la concentración de Cl⁻ entre los distintos y genotipos.

5.1.3. Tallo.

Independientemente de la fuente y de la concentración de N (Figura 88, Tabla Anexa 22; Gen x Sal); i) al igual que en hoja, en condiciones de tratamiento control no hubieron diferencias en la concentración de Na⁺ entre los distintos genotipos; ii) al aumentar la concentración de NaCl en el medio radicular a 75 mM NaCl, los valores de Na⁺ aumentaron significativamente, y a diferencia de las hojas, la mayor acumulación de Na⁺ fue en *pro* y *gib3* respecto a wt. La mayor acumulación de Cl⁻ en condiciones salinas fue en wt, disminuyendo significativamente en *pro* y *gib3*. Respecto a las condiciones control, la concentración de Cl⁻ fue menor en *pro* que en wt y *gib3*.

Independientemente de la concentración de N (Figura 88, Tabla Anexa 22; Gen x Fuente x Sal); i) la mayor concentración de Cl⁻ se observó en wt con NO₃⁻ y NH₄⁺ en condiciones salinas; ii), la concentración de Cl⁻ en wt y en condiciones control, fue menor en plantas tratadas con NO₃⁻ que con NH₄⁺; iii) en *pro* y *gib3* en condiciones control y de salinidad, no hubieron diferencias en la concentración de Cl⁻ al ser tratadas con NO₃⁻ y NH₄⁺.



Figura 88. Concentración de los iones Na⁺ y Cl⁻ en tallo. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la concentración (mg g_{ps}⁻¹) de los iones Na⁺ y Cl⁻ en tallo en wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios \pm error estándar, *n* = 6. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

5.2. Concentración de los cationes K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y el ratio Na^+/K^+ .

Las figuras 89, 90 y 91 muestran la concentración (mg g_{ps}^{-1}) de los cationes K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y el ratio Na⁺/K⁺ en raíz, hoja y tallo en función del genotipo (wt, *pro* y *gib3*), el nivel de salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente de N (NO₃⁻ y NH₄⁺) y la concentración de N (0.2 y 2 mM). Al igual que en los experimentos de salinidad, la concentración de K⁺ fue mayor en raíz y tallo que en hoja (Figuras 89, 90 y 91, Tablas Anexas 23, 24 y 25), y la concentración de los cationes Ca²⁺ y Mg²⁺ fue mayor en hoja que en tallo y raíz. En cuanto al ratio Na⁺/K⁺ fue mayor en hoja que en tallo y raíz, y fue mayor en raíz y hoja del mutante *pro* respecto a wt y *gib3*, pero en el tallo fue mayor en *gib3* respecto a *pro* y wt. El ratio Na⁺/K⁺ aumentó con el aumento de la salinidad en la solución nutritiva.

5.2.1. Raíz.

En general, la concentración de K⁺ en raíz del mutante *gib3* fue mayor que en wt y a su vez, mayor en wt que en *pro* (Figura 89A, B y C, Tabla Anexa 23). La concentración de K⁺ disminuyó con el aumento de la concentración de NaCl en la solución nutritiva, y disminuyó con la fuente N-NH₄⁺ respecto a la fuente N-NO₃⁻ y con la baja concentración de N respecto a la alta. En wt y *pro* no hubo diferencias significativas respecto a la concentración de K⁺ en raíces de plantas tratadas con NO₃⁻ y NH₄⁺, pero en *gib3* disminuyó la concentración de K⁺ en raíces de plantas tratadas con NO₃⁻. En cuanto al efecto de la interacción Gen x Concentración; en *pro* y *gib3* la concentración de N no tuvo efecto sobre la concentración de K⁺ en raíz, pero en wt la concentración de K⁺ aumentó con la concentración baja de N respecto a la alta.

La concentración de Ca^{2+} en raíz (Figura 89D, E y F, Tabla Anexa 23) y al igual que la concentración de K⁺, disminuyó con el aumento de la concentración de NaCl en la solución nutritiva, y disminuyó con la fuente N-NH₄⁺ respecto a la fuente N-NO₃⁻ y con la concentración baja de N respecto a la alta, excepto que su concentración no dependió del genotipo. Independientemente de la fuente y concentración de N, en condiciones de tratamiento control no hubo diferencias en la concentración de Ca²⁺ entre los distintos genotipos, y aumentando la concentración de NaCl en el medio radicular disminuyó la concentración de Ca²⁺ significativamente, pero también sin diferencias entre los distintos genotipos.

La concentración de Mg^{2+} en raíz y al igual que la concentración de K⁺ dependió del genotipo, salinidad, fuente y concentración de N, y el efecto de cada factor, independientemente de los otros factores, fue igual que su efecto sobre la concentración de K⁺ (Figura 89G, H e I, Tabla Anexa 23). Independientemente de la salinidad; i) en wt, la concentración de Mg²⁺ en raíz con concentración baja de N fue mayor que en plantas con concentración alta en caso de las dos fuentes de N; y ii) en los mutantes *pro* y *gib3*, con concentración alta y baja e independientemente de la salinidad, no hubo diferencias en la concentración de Mg²⁺ en raíz de plantas tratadas con NO₃⁻, mientras en plantas con NH₄⁺, disminuyó su concentración con la concentración alta de N respecto a la baja.



Figura 89. Concentración de los cationes K⁺, **Ca**²⁺, **Mg**²⁺ y el ratio Na⁺/K⁺ en raíz. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la concentración (mg g_{ps}^{-1}) de los cationes K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y el ratio Na⁺/K⁺ en raíz en wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios ± error estándar, *n* = 6. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

Independientemente de la concentración de N; i) en wt y *gib3*, la concentración de Mg^{2+} en plantas con NO_3^- disminuyó significativamente en el tratamiento salino respecto al control, mientras en plantas con NH_4^+ no hubo diferencias en la concentración de Mg^{2+} entre los tratamientos control y salino, ii) y en *pro*, en plantas con NO_3^- y con NH_4^+ no hubo diferencias en la concentración de Mg^{2+} entre los tratamientos control y salino, ii) y en *pro*, en plantas con NO_3^- y con NH_4^+ no hubo diferencias en la concentración de Mg^{2+} entre los tratamientos control y salino.

El ratio Na⁺/K⁺ en raíz de los diferentes genotipos no dependió de la fuente ni de la concentración de N (Figura 89J, K y L, Tabla Anexa 23). Independientemente de la concentración de N, en condiciones de tratamiento control, no hubo diferencias en el ratio Na⁺/K⁺ entre plantas con NO₃⁻ y plantas con NH₄⁺ de los distintos genotipos. En el tratamiento salino; i) El mayor ratio Na⁺/K⁺ se observó en plantas *pro* tratadas con NO₃⁻; y ii) en wt y *pro* el ratio Na⁺/K⁺ fue mayor en plantas tratadas con NO₃⁻ que en plantas con NH₄⁺, mientras en gib3 ocurrió lo contrario.

5.2.2. Hoja.

La concentración de K⁺ en hoja de wt fue mayor respecto a *pro* y *gib3* (Figura 90A, B y C, Tabla Anexa 24). Al igual que en raíz, la concentración de K⁺ disminuyó con el aumento de la concentración de NaCl en la solución nutritiva, y también disminuyó con la concentración baja de N respecto a la alta, no dependiendo de la fuente de N. Independientemente del tratamiento salino aplicado; i) en plantas wt con NO₃⁻, la concentración de K⁺ en hoja disminuyó más en plantas con concentración baja de N que en plantas con concentración alta, mientras que no se observaron diferencias en plantas con concentración alta o baja de NH₄⁺; ii) en *pro*, no hubieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos; y iii) en 75 mM de NaCl en *gib3*, la mayor concentración de K⁺ fue en plantas con concentración alta de NH₄⁺, y disminuyó significativamente en los otros tres tratamientos sin diferencias significativas entre ellos.

La concentración de Ca^{2+} (Figura 90D, E y F, Tabla Anexa 24) fue mayor en hoja de *pro* respecto wt y *gib3*. Al igual que en raíz, la concentración de Ca^{2+} disminuyó en el tratamiento salino respecto al control y también disminuyó con la fuente N-NH₄⁺ respecto a la fuente N-NO₃⁻ pero al contrario que en raíz, aumentó con la concentración baja de NH₄⁺ respecto a la alta.



Figura 90. Concentración de los cationes K⁺, **Ca**²⁺, **Mg**²⁺ **y el ratio Na**⁺/**K**⁺ **en hoja.** Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración deN; 0.2 y 2 mM en la concentración (mg g_{ps} ⁻¹) de los cationes K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y el ratio Na⁺/K⁺ en hoja en wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios ± error estándar, *n* = 6. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

Independientemente de la salinidad, plantas wt, *pro* y *gib3* con alta concentración de N, tuvieron una concentración de Ca²⁺ mayor en plantas crecidas con NO₃⁻ que con NH₄⁺, mientras con baja concentración de N, no hubo diferencias entre plantas con NO₃⁻ y plantas con NH₄⁺.

Independientemente de la salinidad (Figura 90G, H e I, Tabla Anexa 24); i) en plantas wt tratadas con alta o baja concentración de N, la concentración de Mg^{2+} fue mayor en las tratadas con NO_3^- que en las tratadas con NH_4^+ . En plantas wt tratadas con NO_3^- , la concentración de Mg^{2+} en las hojas fue mayor en plantas con alta que con baja concentración de N, mientras en plantas con NH_4^+ , no hubieron diferencias significativas entre plantas con alta y baja concentración de N; y ii) en los mutantes *pro* y *gib3*, no hubieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

Al contrario que en la raíz, el ratio Na^+/K^+ en hoja de los diferentes genotipos sí que dependió de la fuente y de la concentración de N (Figura 90J, K y L, Tabla Anexa 24); la cual disminuyó con N-NH₄⁺ respecto a la fuente N-NO₃⁻, y disminuyó con la concentración baja de N respecto a la alta. Independientemente de la concentración de N; i) el mayor ratio Na^+/K^+ fue en hoja de *pro* con NO₃⁻ y en tratamiento salino con 75 mM NaCl; ii) al igual que en las raíces, en condiciones de tratamiento control no hubo diferencias en el ratio Na^+/K^+ entre plantas crecidas con NO₃⁻ y con NH₄⁺ en los distintos genotipos; y iii) en el tratamiento salino, el ratio Na⁺/K⁺ en hoja de wt, *pro* y *gib3* fue mayor en plantas crecidas en NO₃⁻ que en plantas con NH₄⁺.

5.2.3. Tallo.

En wt, al igual que en hoja, la concentración de K^+ fue mayor respecto a *pro* y a *gib3* (Figura 91A, B y C, Tabla Anexa 25). También al igual que en raíz y hoja, la concentración de K^+ disminuyó con el aumento de la concentración de NaCl en la solución nutritiva, disminuyó con la concentración baja de N respecto a la alta y no dependió de la fuente de N.



Figura 91. Concentración de los cationes K⁺, **Ca**²⁺, **Mg**²⁺ **y el ratio Na**⁺/**K**⁺ **en tallo.** Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la concentración (mg g_{ps}^{-1}) de los cationes K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y el ratio Na⁺/K⁺ en el tallo en wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios ± error estándar, *n* = 6. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

La concentración de Ca^{2+} (Figura 91D, E y F, Tabla Anexa 25) fue mayor en tallo de *gib3* respecto wt y *pro*. Al igual que en raíz y hoja, la concentración de Ca^{2+} disminuyó en el tratamiento salino respecto al tratamiento control y también disminuyó con la fuente N-NH₄⁺ respecto a la fuente N-NO₃⁻. Al igual que en hoja y al contrario que en raíz, la concentración de Ca^{2+} aumentó con la concentración baja de N respecto a la alta. Independientemente de la salinidad; i) al igual que en hoja, en plantas de wt, *pro* y *gib3* con concentración alta de N, la concentración de Ca^{2+} fue mayor en plantas con NO₃⁻ que en plantas con NH₄⁺; y ii) la concentración de Ca^{2+} en el tallo de plantas wt con concentración baja de N fue mayor en plantas con NO₃⁻ que

La concentración de Mg^{2+} (Figura 91G, H e I, Tabla Anexa 25) al igual que Ca^{2+} fue mayor en tallo de *gib3* respecto wt y *pro*, disminuyó en el tratamiento salino respecto al control, disminuyó con la fuente N- NH_4^+ respecto a la fuente N- NO_3^- y aumentó con la concentración baja de N respecto a la alta. Independientemente de la salinidad y la fuente de N (Figura 91, Tabla Anexa 25; Gen x Concentración), la mayor concentración de Mg^{2+} fue en el mutante *gib3*, y disminuyó significativamente en el resto de los tratamientos de la interacción Gen x Concentración sin diferencias significativas entre ellos.

Al contrario que en raíz y al igual que en hoja, el ratio Na^+/K^+ en el tallo dependió de la fuente y de la concentración de N (Figura 91J, K y L, Tabla Anexa 25); disminuyendo con la fuente N- NH_4^+ respecto a la fuente N- NO_3^- , y con la concentración alta de N respecto a la baja. Independientemente de la fuente de N; i) el mayor ratio Na^+/K^+ fue en el tallo de *gib3* con baja concentración de N en condiciones del tratamiento salino; ii) al igual que en raíz y hoja, en tratamiento control no hubo diferencias en el ratio Na^+/K^+ entre plantas con NO_3^- y plantas con NH_4^+ de los distintos genotipos; y iii) al contrario que en hoja, en el tratamiento salino, el ratio Na^+/K^+ en el tallo de wt, *pro* y *gib3* fue mayor en plantas con NH_4^+ que en plantas con NO_3^- .

5.3. Balance de nitrógeno y carbono.

Al igual que en los experimentos de salinidad, la concentración de N total fue mayor en hoja que en tallo y raíz (Figuras 92A, B, y C; 93A, B y C; 94A, B y C). En raíz y hoja, la concentración de N total fue mayor en wt seguido de *gib3* y *pro*, mientras que en tallo fue mayor en wt y *gib3* respecto a *pro* (Figuras 92, 93 y 94, Tablas Anexas 26, 27 y 28) y disminuyó con el aumento de la concentración de NaCl (75 mM NaCl) en la solución nutritiva, excepto en raíz, donde la concentración de N total no dependió de la concentración de NaCl. Solamente en hoja, la concentración de N total dependió de la fuente de N, disminuyendo con la fuente N-NO₃⁻ respecto a la fuente N-NH₄⁺, e independientemente de la parte de la planta analizada, la concentración de N total disminuyó con la concentración baja de N (0.2 mM).

Los mayores valores de NO₃⁻ fueron en raíz (Figuras 92D, E y F; 93D, E y F; 94D, E y F), e independientemente del tejido analizado, la concentración de NO₃⁻ disminuyó con el aumento de la concentración de NaCl en el medio radicular, y disminuyó en plantas con NH₄⁺ respecto a las plantas con NO₃⁻ y disminuyó con la concentración baja de N (Figuras 92, 93 y 94, Tablas Anexas 26, 27 y 28).

En cuanto a la concentración de C total en raíz, hoja y tallo (Figuras 92G, H e I; 93G, H e I; 94G, H e I) disminuyó a medida que aumentó la concentración de NaCl, y disminuyó con la fuente N-NO₃⁻ respecto a la fuente N-NH₄⁺, y también disminuyó con la concentración alta de N, excepto en raíz donde disminuyó la concentración de C total con la fuente N-NH₄⁺ respecto a la fuente N-NO₃⁻ y disminuyó con la baja concentración de N (Figuras 92, 93 y 94, Tablas Anexas 26, 27 y 28).

Independientemente de la parte de la planta analizada, el ratio C/N fue mayor en *pro* que en wt y *gib3* (Figuras 92J, K y L; 93J, K y L; 94J, K y L), y disminuyó con el aumento de la concentración de NaCl. El ratio C/N disminuyó con la fuente N-NH₄⁺ respecto a la fuente N-NO₃⁻, excepto en la hoja de los distintos genotipos donde el ratio C/N no dependió de la fuente de N, disminuyendo también con la concentración baja de N (Figuras 92, 93 y 94, Tablas Anexas 26, 27 y 28).

5.3.1. Raíz.

Independientemente del nivel de salinidad y de la fuente de N (Figura 92A, B y C, Tabla Anexa 26; Gen x Concentración): i) la mayor concentración de N total fue en la raíz de wt con concentración alta de N y disminuyó significativamente en la raíz de *pro* y *gib3* con alta concentración de N; ii) la concentración de N total disminuyó significativamente en la raíz de plantas con concentración baja de N en los distintos genotipos. Independientemente de la fuente y concentración de N (Figura 92, Tabla Anexa 26; Gen x Sal); i) No se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento control y salino en los diferentes genotipos; ii) en el tratamiento control, la concentración de N total en *pro* disminuyó significativamente respecto a wt, pero no a *gib3*; iii) mientras en el tratamiento salino no hubieron diferencias significativas entre los distintos genotipos.

En raíz, la concentración de NO_3^- en general fue mayor en el mutante *gib3* que en wt y *pro* (Figura 92D, E y F, Tabla Anexa 26), y la concentración de C total fue mayor en *pro* seguido de *gib3* y por último wt (Figura 92G, H e I, Tabla Anexa 26).

En cuanto al ratio C/N, independientemente del nivel de salinidad y de la concentración de N aplicado (Figura 92J, K y L, Tabla Anexa 26; Gen x Fuente); i) el mayor ratio C/N se observó en el mutante *pro*, disminuyendo significativamente en wt y *gib3* con las dos fuentes de N; NO_3^- y NH_4^+ ; ii) en los tres genotipos no hubieron diferencias significativas con los distintos tratamientos. Independientemente del nivel de salinidad y de la fuente de N aplicada (Figura 92, Tabla Anexa 26; Gen x Concentración); i) el mayor ratio C/N se observó en la raíz de *pro* con concentración baja de N; ii) con concentración alta de N, no hubieron diferencias en el ratio C/N entre *pro* y *gib3* y disminuyó significativamente en wt, e independientemente de la fuente y concentración de N (Figura 92, Tabla Anexa 26; Gen x Sal); el mayor ratio C/N se observó en el mutante *pro*, y disminuyó significativamente en wt y *gib3*en los tratamientos control y 75 mM NaCl; ii) en cada uno de los distintos genotipos no hubieron diferencias significativas entre el tratamiento control y 75 mM NaCl.



Figura 92. Balance de nitrógeno y carbono en raíz. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la concentración (mg g_{ps}⁻¹) de N total, Nitrato (NO₃⁻), N orgánico, C total, y el ratio C/N en raíz en wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios ± error estándar, n = 6. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

5.3.2. Hoja.

La concentración de N total, independientemente de la fuente y concentración de N (Figura 93A, B y C, Tabla Anexa 27; Gen x Sal); i) disminuyó significativamente en pro respecto a wt y gib3 en condiciones control y 75 mM NaCl; ii) entre los distintos genotipos, no hubieron diferencias significativas entre el tratamiento control y 75 mM NaCl. Independientemente del tratamiento control o salino (Figura 93, Tabla Anexa 27; Gen x Fuente x Concentración); i) la mayor concentración de N total se dio en hoja de wt con fuente $N-NH_4^+$ y alta concentración de N; ii) en wt, la concentración de N total fue mayor en plantas con alta concentración de N que las crecidas en baja concentración y en condiciones de concentración alta o baja de N, la concentración de N total fue mayor en plantas con fuente N-NH₄⁺ que N-NO₃; iii) en *pro*, con alta concentración de N, no hubieron diferencias entre plantas tratadas con fuente N-NO₃⁻ o N-NH₄⁺, y tampoco en condiciones de baja concentración de N; iv) en gib3, en condiciones de alta concentración de N, la concentración de N total fue mayor en plantas con la fuente N-NH4⁺, pero en condiciones de baja concentración de N, no se encontraron diferencias entre plantas tratadas con fuente N-NO₃ o N-NH₄⁺.

La concentración de C total fue menor en *pro* respecto a wt y *gib3*. Independientemente del nivel de salinidad aplicado (Figura 93G, H e I, Tabla Anexa 27; Gen x Fuente x Concentración); i) la mayor concentración de C total se observó en hoja de wt con fuente N-NH₄⁺ y alta concentración de N; ii) en wt y con la fuente N-NO₃⁻ no se encontraron diferencias entre plantas con alta y baja concentración de N, mientras que con la fuente N-NH₄⁺, la concentración de C total fue menor en plantas con baja concentración de N que con alta; iii) en plantas *pro* y *gib3* crecidas con una u otra fuente N (NO₃⁻ o NH₄⁺), no hubieron diferencias significativas entre plantas tratadas con alta y baja concentración de N. En cuanto al ratio C/N; i) el mayor ratio C/N fue observado en *pro* crecido con la fuente N-NH₄⁺ y baja concentración de N; ii) en wt, *pro* y *gib3*, con alta concentración de N no se encontraron diferencias en el ratio C/N en plantas tratadas con fuente N-NO₃⁻ o N-NH₄⁺. Sin embargo, en plantas tratadas con baja concentración, el ratio C/N fue menor en plantas crecidas con la fuente N-NH₄⁺ que con la fuente N-NO₃⁻, excepto en *gib3* donde no hubieron diferencias significativas.



Figura 93. Balance de nitrógeno y carbono en hoja. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la concentración (mg g_{ps}⁻¹) de N total, Nitrato (NO₃⁻), N orgánico, C total, y el ratio C/N en hoja en wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios ± error estándar, n = 6. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

5.3.3. Tallo.

La concentración de N total, independientemente del nivel de salinidad (Figura 94A, B y C, Tabla Anexa 28; Gen x Fuente x Concentración): i) en wt, en condiciones de alta o baja concentración de N no se encontraron diferencias significativas en los valores de N total en plantas tratadas con fuente N-NO₃⁻ y N-NH₄⁺; ii) en wt en condiciones de fuente N-NO₃⁻ o N-NH₄⁺, la concentración de N total fue menor en plantas tratadas con baja que con alta concentración de N; iii) en pro, al igual que wt en condiciones de fuente N-NO₃ o N-NH₄⁺, la concentración de N total fue menor en plantas con baja que con alta concentración de N, y también al igual que wt en condiciones de baja concentración de N, no se encontraron diferencias en la concentración de N total en plantas con fuente N-NO₃⁻ y N-NH₄⁺, pero si en plantas con concentración alta de N donde la concentración de N total fue menor en plantas con NH₄⁺ que en plantas con NO₃⁻; iv) gib3 se comportó como pro, excepto en los valores de N total en condiciones de alta concentración de N, siendo esta menor en plantas con NO_3^- que en plantas con NH_4^+ . Independientemente de la concentración de N (Figura 94, Tabla Anexa 28; Gen x Fuente x Sal); i) en wt y gib3, no hubieron diferencias entre los distintos tratamientos; ii) en pro no hubieron diferencias significativas entre los tratamientos control y 75 NaCl, crecidas en NO_3^- y en NH_4^+ ; iii) en pro, en condiciones de 75 NaCl no hubieron diferencias entre plantas con NO_3^{-1} y con NH₄⁺, pero si en las condiciones control donde la concentración de N total fue menor en plantas tratadas con NO_3^- que en plantas con NH_4^+ .

La concentración de NO₃⁻ en tallo no dependió del genotipo (Figura 94D, E y F, Tabla Anexa 28), e independientemente de la fuente y de la concentración de N (Figura 94, Tabla Anexa 28; Gen x Sal). Sólo se encontraron diferencias significativas en alta concentración de NO₃⁻ en tratamiento control en los tres genotipos.

La concentración de C total en general fue mayor en *gib3* seguido de wt y seguido de *pro* (Figura 94G, H e I, Tabla Anexa 28) e independientemente de la fuente y de la concentración de N (Figura 94. Tabla Anexa 28; Gen x Sal), no hubieron diferencias en la concentración de C total en el tallo de los distintos genotipos en los distintos tratamientos, excepto en *pro* en 75 mM NaCl donde disminuyó la concentración de C total significativamente respecto al resto de las interacciones Gen x Sal.



Figura 94. Balance de nitrógeno y carbono en tallo. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la concentración (mg g_{ps}⁻¹) de N total, Nitrato (NO₃⁻), N orgánico, C total, y el ratio C/N en el tallo en wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios ± error estándar, n = 6. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

En cuanto al ratio C/N, independientemente del nivel de salinidad y de la concentración de N (Figura 94J, K y L, Tabla Anexa 28; Gen x Fuente): i) el mayor ratio C/N se dio en el tallo de *pro* con NH_4^+ ; ii) en wt y *gib3* no hubieron diferencias en el ratio C/N entre plantas con NO_3^- y con NH_4^+ , iii) el ratio C/N en *pro* fue menor en plantas con NO_3^- que en plantas con NH_4^+ . Independientemente del nivel de salinidad y de la fuente de N (Figura 94, Tabla Anexa 28; Gen x Concentración): i) el mayor ratio C/N se observó en pro con baja concentración de N; ii) en condiciones de alta y baja concentración de N, el ratio C/N fue mayor en pro respecto a wt y gib3; iii) en wt y gib3, el ratio C/N fue menor en plantas con alta concentración de N, pero en pro ocurrió lo contrario. E independientemente de la fuente y de la concentración de N (Figura 94, Tabla Anexa 28; Gen x Sal): i) el mayor ratio C/N se observó en el tallo de pro en condiciones control; ii) en condiciones control y salinas, el ratio C/N fue mayor en pro respecto a wt y gib3; iii) en wt y gib3, no hubieron diferencias en el ratio C/N entre los tratamientos control y 75 mM NaCl, mientras que en pro, el ratio C/N, fue menor en las plantas crecidas en condiciones salinas respecto a condiciones control.

6. Contenido de clorofilas (SPAD).

La concentración de clorofilas, medidas por el índice SPAD, fue inferior en *pro* que en wt, disminuyendo en plantas crecidas en tratamiento salino respecto a las plantas en tratamiento control, aumentando en las plantas con NH_4^+ , respecto a las plantas con NO_3^- , y aumentando en las plantas con 2 mM de N respecto a las plantas con 0.2 mM (Figura 95, Tabla Anexa 35). La concentración de clorofilas en wt y *pro* dependió de la fuente de N y del nivel salino aplicado, y fue independiente de la concentración de N (Figura 95, Tabla Anexa 35; Gen x Fuente x Sal); en wt pero no en *pro*, y sólo en presencia de NaCl, el cambio de NO_3^- a NH_4^+ aumentó la concentración de clorofilas.



Figura 95. Contenido de clorofilas. Los gráficos muestran el efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO_3^- y NH_4^+ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en el contenido de clorofila (SPAD) en hojas en wt y *pro*. Las barras representan valores medios ± error estándar, *n* = 4. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

7. Fluorescencia de las clorofilas: cinética.

El test ANOVA nos indicó que la fluorescencia máxima fue mayor en *gib3*, seguido de wt y menor en *pro* (Figura 96, Tabla Anexa 36). Además, también nos indicó que disminuía en condiciones salinas, que aumentaba en las plantas con NH₄⁺ respecto a las plantas con NO₃⁻, y que era mayor con 2 que con 0.2 mM de N. No obstante encontramos que; i) la fuente y concentración de N afectaron distintamente a los genotipos (Gen x Fuente x Concentración), independientemente del tratamiento control y salino. En wt y *pro*, la disminución de Y(II) máx al bajar la concentración de NO₃⁻ o NH₄⁺, Y(II) máx disminuyó por igual; y ii) la concentración de N, ya fuese NO₃⁻ o NH₄⁺, Y(II) máx disminuyó por igual; y ii) la concentración x Sal), independientemente de la fuente de N. Mientras que en wt y *gib3* la disminución que se produjo en Y(II) máx fue similar entre plantas con 0 y con 75 mM de NaCl, en el genotipo *pro* la disminución que se produjo en Y(II) máx fue mayor con 75 que con 0 mM de NaCl. (Figura 96).



Figura 96. Rendimiento cuántico máximo [Y(II) máx] del PSII. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en el rendimiento cuántico máximo en; wt, *pro* y *gib3*. Las barras representan valores medios \pm error estándar, *n* = 15. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

7.1. Rendimiento cuántico efectivo del PSII.

En general el rendimiento cuántico efectivo del PSII [Y(II)] durante el periodo de adaptación de las plantas a la luz (5 min), fue menor en *gib3* respecto a wt y *pro*, especialmente cuando se utilizó NO_3^- (Figura 97A, B, C, D). También con NO_3^- y sólo en salinidad, observamos que Y(II) en *pro* fue mayor que la de wt, concretamente con 2 mM N (Figura 97B y D). Cuando la concentración de N fue 2 mM y la fuente NH_4^+ , Y(II) se redujo considerablemente respecto a las plantas con 2 mM de NO_3^- , y los valores de *pro* fueron mayores que los de wt (Figura 97A, B, E, y F). Las diferencias entre genotipos, especialmente entre wt y *gib3* desaparecieron cuando se aplicó 0.2 mM de NH_4^+ , independientemente del nivel de salinidad aplicado (Figura 97G y H).



Figura 97. Rendimiento cuántico efectivo [Y(II)] del PSII. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en el rendimiento cuántico efectivo en; wt, *pro* y *gib3*. Los datos representan valores medios \pm error estándar, *n* = 15.

7.2. Rendimiento cuántico de disipación de energía regulada no-fotoquímica.

Las mayores diferencias en el rendimiento cuántico de disipación de energía regulada no-fotoquímica [Y(NPQ)] entre genotipos al final del periodo de adaptación a la luz, se obtuvieron utilizando alta concentración de N y en presencia de NaCl (Figura 98B y F). En estos tratamientos (2 mM de NO₃⁻ o 2 mM de NH₄⁺, con 75 mM NaCl) el mutante *gib3* aumentó paulatinamente el valor de Y(NPQ) con el tiempo de exposición a la luz, alcanzando valores superiores a wt y *pro* al final de los 5 min (Figura 98B y F). Los genotipos wt y *pro* en estos tratamientos y también en el resto de tratamientos alcanzaron los máximos valores de Y(NPQ) aproximadamente a los 2 min de iniciar la luz, y a partir de ahí Y(NPQ) disminuyó ligeramente. El nivel de salinidad y la concentración de N empleado tuvieron efectos similares en la respuesta de Y(NPQ) en el genotipo wt y *pro*, en cambio la fuente de N afectó de manera distinta la dinámica de Y(NPQ) durante el tiempo de adaptación a la luz: i) cuando se utilizó NH₄⁺ como fuente de N (Figura 98E, F, G, y H) los valores de Y(NPQ) en *pro* aumentaron más rápidamente que en wt, y aproximadamente a los dos minutos de

iniciarse la luz, estos valores descendieron por debajo de los valores de Y(NPQ) en wt; ii) al inicio de la adaptación a la luz, cuando se utilizó NO_3^- como fuente de N (Figura 98A, B, C, y D) no hubo este desfase en el valor de Y(NPQ), siendo Y(NPQ), en ausencia de NaCl, superior en *pro* respecto a wt (Figura 98A y C), y en presencia de NaCl, el valor de Y(NPQ) en wt fue superior al valor de *pro* (Figura 98B y D).



Figura 98. Rendimiento cuántico de disipación de energía regulada [Y(NPQ)] del PSII. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en el rendimiento cuántico de disipación de energía regulada de en wt, *pro* y *gib3*. Los datos representan valores medios \pm error estándar, *n* = 15.

7.3. Rendimiento cuántico de disipación de energía no-regulada.

Los mayores valores de rendimiento cuántico de disipación de energía noregulada [Y(NO)] durante el tiempo de adaptación a la luz se dieron en *gib3*, encontrando diferencias entre genotipos al final de los 5 minutos, sólo cuando se utilizó 2 mM de NH₄⁺ (Figura 99E y F). También destacar que sólo cuando se utilizó NH₄⁺ como fuente de N, la curva de respuesta de Y(NO) mostró consistentemente mayores valores en el genotipo wt que en *pro* durante los primeros tres minutos de adaptación a la luz, con diferencias mayores entre estos genotipos cuando se utilizó NH₄⁺ respecto a NO₃⁻ (Figura 99E, F, G, y H). Cuando fue NO₃⁻ la fuente de N, o bien no hubieron diferencias entre wt y *pro* (Figura 99A, C, y D), o bien fueron ligeramente superiores en wt que en *pro* (Figura 99B).



Figura 99. Rendimiento cuántico de disipación de energía no-regulada [Y(NO)] del PSII. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en el rendimiento cuántico de disipación de energía no-regulada en; wt, *pro* y *gib3*. Los datos representan valores medios \pm error estándar, *n* = 15.

8. Fluorescencia de las clorofilas: curva de luz.

8.1. Rendimiento cuántico efectivo del PSII

La curva de respuesta a la luz del rendimiento cuántico efectivo del PSII [Y(II)] nos mostró un descenso progresivo de este parámetro a medida que aumentó la intensidad lumínica (Figura 100). Las diferencias entre genotipos fueron o muy reducidas o inexistentes cuando se empleó baja concentración de N (Figura 100C, D, G, y H). Cuando se utilizó alta concentración de N, encontramos que con 75 mM NaCl, el Y(II) alcanzó los valores máximos en *pro*, seguido de wt y por ultimo *gib3*, aunque no hubieron diferencias entre wt y *pro* cuando la intensidad lumínica superaba los 800 µmol m⁻² s⁻¹ (Figura 100B y F). Cuando se utilizó alta concentración de N, pero sin tratamiento salino, no hubieron diferencias entre wt y *pro* cuando la fuente fue NO₃⁻, y la Y(II) fue mayor en *pro* que en wt cuando la fuente empleada fue NH₄⁺

(Figura 100A y E). También se observó una pequeña recuperación en la Y(II) al llegar la intensidad lumínica a 350 μ mol m⁻² s⁻¹, concretamente en wt y *pro*, y sólo con 2 mM NH₄⁺ en salinidad (Figura 100E).



Figura 100. Curvas de respuesta del rendimiento cuántico efectivo [Y(II)] de las clorofilas a la luz. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM a lo largo de una serie progresiva de intensidad de luz (de 0 a 1251 PAR) en el rendimiento cuántico efectivo de las clorofilas en; wt, *pro* y *gib3*. Los datos representan valores medios \pm error estándar, *n* = 15.

8.2. Rendimiento cuántico de disipación de energía regulada no-fotoquímica

El rendimiento cuántico de disipación de energía regulada no-fotoquímica [Y(NPQ)] respondió de manera inversa a Y(II), aumentando paulatinamente a medida que aumentó la intensidad lumínica (Figuras 100 y 101). Cuando la concentración de N fue 0.2 mM, las diferencias entre genotipos fueron muy pequeñas o inexistentes (Figura 101C, D, G, y H). Cuando la concentración de N fue 2 mM encontramos diferencias entre genotipos en los valores de Y(NPQ), principalmente en presencia de 75 mM NaCl, donde los valores de Y(NPQ) fueron mayores en *gib3*, seguidos de wt y por último *pro* (Figura 101B y F).



Figura 101. Curvas de respuesta del rendimiento cuántico de disipación de energía regulada [Y(NPQ)] de las clorofilas a la luz. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO_3^- y NH_4^+ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM a lo largo de una serie progresiva de intensidad de luz (de 0 a 1251 PAR) en el rendimiento cuántico de disipación de energía regulada de las clorofilas en; wt, *pro* y *gib3*. Los datos representan valores medios ± error estándar, *n* = 15.

8.3. Rendimiento cuántico de disipación de energía no-regulada.

El valor del rendimiento cuántico de disipación de energía no-regulada [Y(NO)] se mantuvo relativamente constante a medida que aumentó la intensidad lumínica (Figura 102). Al igual que los dos parámetros anteriores, con baja concentración de N las diferencias entre tratamientos fueron muy reducidas o inexistentes (Figura 102C, D, G, y H), mientras que con alta concentración de N, encontramos que en *gib3* se dieron los valores más altos (particularmente con NH₄⁺), seguido de wt y por último *pro* (Figura 102A, B, E, y F).



Figura 102. Curvas de respuesta del rendimiento cuántico de disipación de energía no-regulada **[Y(NO)] de las clorofilas a la luz.** Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO_3^- y NH_4^+ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM a lo largo de una serie progresiva de intensidad de luz (de 0 a 1251 PAR) en el rendimiento cuántico de disipación de energía no-regulada de las clorofilas en; wt, *pro* y *gib3*. Los datos representan valores medios ± error estándar, *n* = 15.

8.4. Tasa de transporte de electrones.

La máxima tasa de transporte de electrones (ETR) se alcanzó entre 600 y 800 μ mol m⁻² s⁻¹. Los mayores valores de ETR con alta concentración de N se encontraron en *pro* y los menores en *gib3* (Figura 103A, B, E, y F); en *pro*, la ETR fue mayor que en wt con los tratamientos de 2 mM de NO₃⁻ y75 mM de NaCl o 2 mM de NH₄⁺ y 0 mM de NaCl (Figura 103B y F). Con baja concentración de N y usando NO₃⁻, sólo se encontraron diferencias entre genotipos muy puntuales (Figura 103C y D). Con concentración baja de N y usando NH₄⁺ y en presencia de NaCl, la ETR de *pro* fue menor que en wt y *gib3* (Figura 103H).



Figura 103. Curvas de respuesta de la tasa de transporte de electrones [ETR] de las clorofilas a la luz. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM a lo largo de una serie progresiva de intensidad de luz (de 0 a 1251 PAR) en la tasa de transporte de electrones de las clorofilas en; wt, *pro* y *gib3*. Los datos representan valores medios \pm error estándar, *n* = 15.

9. Asimilación de CO₂, conductancia estomática y eficiencia en el uso del agua. 9.1. Fotosíntesis neta.

El análisis de los factores principales (genotipo, salinidad, fuente y concentración de N, y edad de la planta) nos indicó que la fotosíntesis neta fue mayor en wt que en *pro*, disminuyó en 75 mM NaCl respecto a plantas con 0 mM NaCl, no se vio afectada por la fuente de N, disminuyó con 0.2 mM de N respecto a plantas con 2 mM de N, y disminuyó con la edad de la planta (Figura 104, Tabla Anexa 37). No obstante, destacar que cuando la fuente empleada fue NO_3^- (Figura 104A, B, E, y F) sólo se observaron diferencias entre wt y *pro* con concentraciones de 2 mM y 0 mM de NaCl, en cambio cuando la fuente fue NH_4^+ , el genotipo wt aumentó la fotosíntesis neta respecto a *pro*: i) a lo largo de los 4 días de medida, utilizando 0.2 mM de NH_4^+ y 75 mM de NaCl, ii) en los tres últimos días de medida, utilizando 2 mM de NH_4^+ y 75 mM de NaCl, y iii) en días puntuales, utilizando 0.2 mM de NH_4^+ y 0 mM de NaCl.



Figura 104. Tasa de fotosíntesis neta. Los gráficos muestran el efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la tasa de fotosíntesis neta (Pn) en dos genotipos de microtomate; wt y *pro*. Los datos representan valores medios \pm error estándar, n = 3.

9.2. Conductancia estomática.

La conductancia estomática tuvo una respuesta parecida a la fotosíntesis neta a los distintos factores estudiados; siendo mayor en wt que en *pro*, disminuyendo con 75 mM NaCl respecto a plantas con 0 mM NaCl, y no estando afectada por la fuente de N, disminuyendo con 0.2 mM de N respecto a plantas con 2 mM de N, y disminuyendo con la edad de la planta (Figura 105, Tabla Anexa 37). Igualmente, las mayores diferencias entre los genotipos wt y *pro* se obtuvieron cuando se utilizó NH_4^+ en lugar de NO_3^- , y en presencia de NaCl en el medio de cultivo.



Figura 105. Conductancia estomática. Los gráficos muestran el efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO_3^- y NH_4^+ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en la conductancia estomática (gs) en dos genotipos de microtomate; wt y *pro*. Los datos representan valores medios \pm error estándar, n = 3.

10. Estado hídrico de la planta.

Los resultados del test ANOVA sobre los principales efectos nos indican que el mayor contenido de agua en hoja fue en *gib3*, seguido de wt y por último *pro* (Figura 106A, B y C, Tabla Anexa 38). El contenido de agua también aumentó con la salinidad, en las plantas con NO₃⁻ respecto a las plantas con NH₄⁺, y en las plantas con alta concentración de N respecto a las plantas con concentración baja de N. No obstante, el test ANOVA también indicó que el contenido de agua en los distintos genotipos dependió de la fuente y concentración de N y el nivel salino (Figura 106, Tabla Anexa 38; Gen x Fuente x Concentración x Sal); i) en wt con 0 mM NaCl, el contenido de agua no cambió con la concentración de N, y fue inferior en las plantas con NH₄⁺ que en las plantas con 0.2 mM de NO₃⁻; ii) en *pro* con 0 mM de NaCl, al igual que wt, el contenido de agua fue inferior con baja concentración de N que con alta, independientemente de la fuente de N (Figura 106A). En *pro* con 75 mM NaCl, al igual que wt, el contenido de agua fue inferior con baja concentración de N que con alta, independientemente de la fuente de N (Figura 106B). En *pro* con 75 mM NaCl no se encontraron diferencias entre tratamientos; y iii) en *gib3*, independientemente
del nivel de salinidad, no hubieron diferencias debido a la fuente o concentración de N (Figura 106C).

En cuanto al contenido relativo de agua, el resultado del test ANOVA nos indicó que fue mayor en *gib3* que en wt y *pro*, disminuyendo en plantas con NH_4^+ respecto a plantas con NO_3^- , y que aumentaba con 0.2 mM respecto a 2 mM de N (Figura 106D, E y F, Tabla Anexa 38). En cuanto al efecto de la salinidad decir que dependió del genotipo (Figura 106D, E y F, Tabla Anexa 38, Gen x Sal); en wt el CRA no aumentó en plantas con 75 mM NaCl respecto a plantas con 0 mM NaCl, pero si lo hizo en *pro* y *gib3* (Figura 106D, E, F).



Figura 106. Estado hídrico en plantas. Efecto de la salinidad; 0 (control) y 75 mM NaCl, la fuente de N; NO₃⁻ y NH₄⁺ y la concentración de N; 0.2 y 2 mM en el contenido y el contenido relativo de agua (CRA) en; wt, *pro* y *gib3*. Los datos representan valores medios \pm error estándar, *n* = 20. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas entre éstos según el Test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

CAPITULO I. Salinidad.

1. Respuesta fisiológica al estrés salino en wt y los mutantes de giberelinas *pro y gib3*.

En condiciones de alta salinidad, las especies glicófitas como son las especies cultivadas de tomate (*Solanum lycopersicum*) muestran importantes efectos negativos en el crecimiento y desarrollo vegetativo (Maggio *y col.*, 2007; Deinlein *y col.*, 2014). El estudio de la evolución de los parámetros de crecimiento nos ha permitido observar que el mutante *pro* fue el más sensible a los tratamientos salinos (75 y 150 mM de NaCl) observándose los mayores efectos en el tratamiento a 150 mM.

Un parámetro de gran interés para analizar es la relación parte aérea/raíz. En condiciones control observamos que tanto en el mutante pro como en gib3 sus ratios respecto a wt fueron menores. En el caso de pro se debió principalmente a un mayor desarrollo radicular en comparación con wt, mientras que la parte aérea se mantuvo igual. Esto parece indicar que en pro, la mutación del gen DELLA induce un mayor desarrollo radicular. En pro, el análisis del transcriptoma de la raíz en comparación con wt, nos mostró que entre los pocos genes que están expresados de forma diferencial y altamente inducidos, se encuentra el gen SINRT2;1. Este gen es un posible transportador de NO_3^- de alta afinidad que se expresa casi exclusivamente en raíz. El gen NRT2; 1 de tomate muestra una alta homología con su posible ortólogo en Arabidopsis thaliana, AtNRT2;1. Curiosamente, este gen fue clonado en Arabidopsis a partir de un mutante insensible a altas concentraciones de azúcares y bajo nitrógeno en el medio, reprimiendo el desarrollo de raíces laterales (Little y col., 2005). Según estos autores, este transportador, más que actuar como propiamente un transportador de NO₃⁻, actuaría principalmente como un sensor o traductor de señales con el fin de regular el desarrollo radicular en respuesta al estado nutricional de la planta. La respuesta fenotípica de la alteración radicular se debió principalmente al balance C/N. Mientras que las concentraciones estuvieran bien equilibradas, esto es bajo carbono / bajo NO₃⁻ o bien alto carbono / alto NO₃⁻, no se produciría alteración del desarrollo radicular, aunque en el caso de que se indujese alto carbono /bajo nitrógeno, esto se traduciría en la inhibición del desarrollo lateral radicular. Los ratios C/N de los mutantes de GAs y wt, mostraron que en el caso de *pro* se produjo un incremento significativo del ratio C/N a nivel foliar, principalmente debido a un menor contenido de N total y NO_3^- foliar.

Por otro lado, sería también posible que la proteína DELLA pudiese estar afectando a su expresión. Recientemente, Marín-de la Rosa *y col.* (2014) han analizado mediante la técnica de ChIP en Arabidopsis, las posibles regiones promotoras de genes que podrían estar controladas por la proteína DELLA, encontrando entre ellas al gen *AtNRT2;2*. Este hecho abre la posibilidad de que las giberelinas puedan estar participando en la señalización del nitrógeno y por tanto afectando al desarrollo radicular.

Cuando wt y los mutantes *pro* y *gib3* fueron sometidos a condiciones salinas, los ratios parte aérea / raíz mostraron un comportamiento diferente. Así, en wt el ratio se vio poco afectado a altas concentraciones salinas, sin embargo *gib3* y *pro* mostraron un importante incremento del ratio, siendo este siempre superior en *pro*. Albacete *y col.* (2008) observaron en que tratamientos salinos de 100 mM de NaCl, el cultivar de tomate Moneymaker, sensible a salinidad, incrementaba el ratio raíz / parte aérea. Este incremento fue debido principalmente al descenso de peso fresco de la parte aérea. En nuestro caso, wt mostró un comportamiento similar a 75 mM de NaCl. Sin embargo, a altas concentraciones salinas, el comportamiento fue el inverso, sobre todo en *gib3* y *pro*.

En condiciones salinas, un efecto común en los tres genotipos fue un claro incremento en todos los órganos del ratio C/N, siendo este más marcado en el mutante *pro*. Aunque se produjeron descensos significativos en el contenido total de carbono, posiblemente debido al efecto de la salinidad sobre la fotosíntesis, también se produjo un fuerte descenso del nitrógeno total. En los tres genotipos los niveles de NO_3^- se redujeron de forma drástica, sobre todo en el mutante *pro*. En base a lo expuesto anteriormente, es posible que el incremento del ratio de C/N en wt y *gib3* podría estar induciendo al gen *NRT2;1* que está fuertemente inducido por salinidad en wt y *gib3*. Curiosamente, aunque *pro* mostró un mayor incremento del ratio C/N no se produjo una inducción adicional del gen *NRT2;1*. Esto podría explicarse porque posiblemente ya en condiciones control está saturada la vía de respuesta mediada por el gen *NRT2;1* y por tanto el estrés salino no produciría ninguna expresión adicional.

Uno de los más importantes efectos nutricionales que produce el estrés salino es la inhibición de la absorción de NO₃⁻ por la raíz (Lewis y col., 1989; Kafkafi y col., 1992; Yao y col., 2008). Perez-Alfocea y col. (1993) al comparar el efecto de la salinidad en diferentes genotipos que variaban en su tolerancia a la salinidad, observaron que las especies más tolerantes no mostraban variaciones en los contenidos de NO_3^- en los tejidos foliares y tallo, mientras que la más sensible mostró una importante reducción de la concentración de NO3. Cuando en el medio externo de cultivo los niveles de NO₃⁻ fueron superiores a 1mM de NO₃⁻, los transportadores que presentaron mayor relevancia fueron los transportadores de baja afinidad de NO₃. En tomate están descritos dos transportadores de baja afinidad NRT1;1 y NRT1;2, localizados en los pelos radiculares, siendo su expresión exclusiva en raíz (Lauter y col., 1996). Yao y col. (2008) observaron que plantas salinizadas de tomate, mostraban un importante descenso en los contenidos de NO₃⁻ y que ambos transportadores tenían inhibida su expresión. Nuestros resultados estarían de acuerdo con este estudio. Así, en los tres genotipos hemos observado un fuerte descenso de los niveles de NO₃⁻ y además en el microarray también hemos podido observar que el gen NRT1;1 se encuentra inhibido por los tratamientos salinos. Sin embargo, el comportamiento de estos transportadores de NO₃⁻ en otras especies, fue diferente. En el caso de arroz, la expresión del gen OsNRT1;3 no se vio afectada por la salinidad pero si fue inducido por el estrés hídrico (Hu y col., 2006). Por otro lado, en la especie halófita M. crystallinum, el gen McNRT1 fue inducido en condiciones salinas (Popova y col., 2003). Las diferencias entre tomate y estas especies pueden ser debidas a que, en el caso de arroz, la fuente de N principal no es NO_3^- sino NH_4^+ , mientras que en el caso de M. crystallinum al tratarse de una especie tolerante al estrés salino podría responder de forma diferencial.

2. El estrés salino induce un mayor daño en el sistema fotosintético del mutante *pro*.

La protección del proceso fotosintético durante el proceso de estrés es una característica básica en la capacidad de tolerancia de una especie. En general, en especies glicófitas y con una tolerancia media al estrés salino, es común un descenso significativo de la fotosíntesis neta (Pn). Sin embargo, en especies halófitas si se suele inducir una mejora de la fotosíntesis y del crecimiento en condiciones salinas extremas (Stepien y Johnson, 2009; Redondo-Gómez y col., 2010). La salinidad puede

inducir el cierre estomático como respuesta a una caída del turgor foliar, a un déficit de la presión de vapor en la atmosfera o bien debido a un señal generada por la raíz en respuesta a dicho estrés (Chaves *y col.*, 2009). Esto se va a traducir en una disminución en la disponibilidad de CO_2 a la enzima RuBisCo, predisponiendo al aparato fotosintético a incrementar la energía de disipación e inhibición de la fotosíntesis (Brugnoli y Bjorkman, 1992). Así en tomate, diferentes autores han comprobado que en variedades cultivadas, el estrés salino produce una disminución significativa de *Pn* (Balibrea *y col.*, 2000; Wargent *y col.*, 2013; Muneer *y col.*, 2014; Amjad *y col.*, 2014; Hu *y col.*, 2014; Wang *y col.*, 2015). En nuestro estudio, hemos podido observar como el mutante *pro* mostró una importante caída de *Pn* a partir ya del segundo día de salinización en comparación con wt. Esta drástica disminución de *Pn* en *pro* puede ser en parte debida a un mayor cierre estomático, como muestra la reducción de la conductancia estomática (*gs*). En principio, este cierre estomático no puede ser atribuido a las modificaciones hormonales de la concentración de ABA, dado que estas no varían en hoja de wt ni de *pro*.

La capacidad de fijación del CO₂ por la enzima RuBisCo es muy compleja y depende de varios factores entre los que encontramos la RuBisCo activasa (isoenzima presente en el microarray, LesAffx.41316.1.S1_at), que es un regulador crucial para la inducción del estado activado de la RuBisCo (Zhang *y col.*, 2002). En el microarray se aprecia igualmente una inhibición de su expresión en wt, siendo esta mayor en *pro*, pero no encontrándose afectada en *gib3*. Igualmente, al analizar el contenido de la subunidad mayor de la proteína RuBisCo mediante *Western-Blot*, hemos observado que los tratamientos salinos redujeron la concentración final de la proteína significativamente en wt y *pro*, aunque no en *gib3*. Este resultado, estaría de acuerdo con los estudios realizados mediante el análisis del proteoma en varias especies donde se ha observado que la salinidad reducía de forma significativa los niveles de la proteína RuBisCo (Kim *y col.*, 2005; Parker *y col.*, 2006; Sobhanian *y col.*, 2011).

El análisis de los parámetros de fluorescencia nos mostró una importante reducción en Y(II) máxima a la semana de la aplicación del tratamiento salino en el mutante *pro* en comparación con wt o *gib3*, indicándonos este parámetro el proceso de fotoinhibición que se está produciendo en *pro*. Un descenso en el valor de Y(II) máxima nos podría estar indicando que el exceso de energía estaría siendo disipado en forma de calor en el complejo antena del PSII dando lugar a un descenso de Y(II). Sin

embargo, nuestros resultados muestran que el descenso observado en Y(II), aunque se ve acompañado con una mayor capacidad de disipación de energía controlada (mayor Y(NPQ)), también dio lugar a un mayor incremento de la energía disipada de forma no controlada en forma de calor y/o fluorescencia (mayor Y(NO)), lo cual podría estar dando lugar a una mayor producción de radicales libres en los tilacoides. Sin embargo, en el caso de wt y *gib3*, los valores de Y(NPQ) y Y(NO) se encuentran compensados, lo cual nos está indicando un mayor control en condiciones de estrés de la energía disipada de forma pasiva. Según Klughammer y Schreider (2008), el cálculo del ratio Y(NPQ)/Y(NO) es un buen indicador de la capacidad fotoprotectiva de los centros de reacción. Al realizar este cálculo (ver datos suplementarios, figuras 1A y B), observamos que la caída del ratio en condiciones salinas en wt fue de aproximadamente 13.8% con respecto al tratamiento control, mientras que en *pro* fue de un 20.7% y en el mutante *gib3* de sólo un 8.6%. Por tanto, estos datos nos demuestran que el mutante *pro* mostró una menor capacidad fotoprotectiva en condiciones salinas en comparación con *gib3* y wt.

Por otro lado, en el análisis de las curvas de luz el mutante *pro* mostró un mayor efecto negativo en la tasa de transporte electrónico en comparación con wt y *gib3*. Al final de la aplicación tratamiento salino de 150 mM de NaCl, *pro* mostró una menor ETR_{max} (29.9 ± 4.7), mientras que en wt y *gib3* los valores de ETR_{max} fueron mayores (wt: 70.7 ± 11.7; *gib3*: 48.8 ± 5.3). Estos resultados nos muestran que la salinidad redujo el flujo de electrones del PSII al PSI, flujo que serviría para la formación de NAPH + H⁺ y a su vez sería usado para la fijación de CO₂ (Ritchie y Bunthawin, 2010).

El análisis del transcriptoma de los mutantes *pro* y *gib3* en comparación con wt en condiciones salinas, mostró diferencias significativas entre ellos. En el análisis del transcriptoma de tomate realizado por Sun *y col.* (2010) se puede observar cómo tanto la variedad sensible (Moneymaker), cómo la tolerante (PI 365967), mostraron una reducción general de los genes implicados en los fotosistemas, ATP sintasa, etc, siendo esta inhibición claramente mayor en la variedad sensible. De forma parecida, el transcriptoma del mutante *gib3* mostró muy pocas variaciones en la expresión de estos genes, lo cual parece indicar una mayor tolerancia de su maquinaria fotosintética al estrés salino en comparación con wt o *pro*. El estudio del proteoma de cloroplastos aislados de plantas de tomate salinizadas mostró igualmente una fuerte reducción en

los diferente componentes del PSI (RCI + LHCI), PSII, citocromo b6/f, etc (Muneer *y col.*, 2014).

En los resultados obtenidos por mi grupo, hemos podido observar que todos los genes analizados o estaban implicados en el proceso fotosintético o bien tenían su expresión inhibida o bien no estaba alterada por el tratamiento salino. De todos estos genes, solamente el gen *PTOX* (Plastid Terminal Oxidase; les.4455.1.s1_at) mostró una sobre-expresión significativa, estando inducida en wt y *pro*, siendo mayor su inducción en el caso de *pro*. PTOX es una proteína que contiene dos átomos de hierro y es capaz de tomar electrones desde el plastoquinol (PQH₂) para reducir el oxígeno mediante un proceso no electrogénico (Nawrocki *y col.*, 2015). En cuanto a la función fisiológica de este gen se han propuesto diversas hipótesis, que principalmente se resumen en tres: (1) clororespiración, (2) sumidero alternativo de electrones y (3) biosíntesis de carotenoides. Se ha propuesto que en condiciones de salinidad, posiblemente el proceso de clororespiración tenga un papel relevante (Nawrocki *y col.*, 2015).

La clororespiración se ha definido como una cadena de transporte de electrones (ETC) respiratoria que tiene lugar en los tilacoides de los cloroplastos, la cual interacciona con la ETC fotosintética. Este proceso implica la reducción no fotoquímica y oxidación de las plastoquinonas con la correspondiente consumición de oxígeno (Bennoun, 1994). Durante el proceso de clororespiración son esenciales dos enzimas tilacoidales: (1) el complejo NADH codificado por plastídios y (2) una oxidasa terminal plastidial (PTOX) codificada por el núcleo (Kuntz, 2004). El complejo NADH es un punto de entrada de los electrones en la cadena de transporte electrónico fotosintético, implicando la reducción no fotoquímica de las plastoquinonas. Por otro lado, la PTOX es un punto de transferencia de electrones desde el plastoquinol al oxígeno molecular, dando lugar a la formación de agua en el estroma y reduciendo la formación de especies reactivas de oxígeno (Peltier y Cournac, 2002). El complejo NADH además de participar en la clororespiración, está también implicado en el flujo cíclico de electrones del PSI. Alrededor del PSI existen dos rutas cíclicas paralelas, por un lado una que implicaría al complejo NADH y por otro lado una ruta sensible a la antimycin A, la cual está formada por dos componentes esenciales: una proteína tilacoídal codificada por el gen pgr5 (PGR5) y otra proteína trans-tilacoídal (PGRL1), la cual es capaz de interaccionar tanto física

como funcionalmente con PGR5 (DalCorso *y col.*, 2008). El papel fisiológico de estas rutas electrónicas del cloroplasto que operan en el entorno del PSI no está claro. Se cree que estas rutas no tienen un papel significativo en el proceso de fotosíntesis en condiciones control. Sin embargo, sí que se ha propuesto que estén participando en la flexibilidad de las reacciones de transferencia electrónica requerida para el balance ATP/NADPH, cuando la fotosíntesis está funcionando bajo condiciones estresantes (Joliot y Johnson, 2011).

En la última década se ha sugerido que la clororespiración podría tener un papel relevante como sistema de protección o mecanismo de adaptación de las plantas a estreses ambientales como podrían ser alta iluminación, calor, estrés hídrico y salinidad (Segura y Quiles, 2015). La abundancia de PTOX parece estar correlacionada positivamente con las condiciones de estrés tales como frio, alta insolación y salinidad (Nawrocki y col., 2015). En estas condiciones de estrés es muy común que se produzca un incremento del estado reducido del pool de plastoquinona (PQ), bien causado por una excesiva afluencia de equivalentes reducidos generados por luz, o bien causado por una insuficiente perdida obstaculizada por la represión del ciclo Calvin-Benson-Bassham inducido por el estrés. En la mayoría de estos casos, no sólo se produce una inducción de la PTOX, sino que el complejo NADH tiene un comportamiento similar, lo que sugiere que la activación del flujo clororespiratorio estaría inducida por el estrés. Tanto en wt como en pro se observó una clara disminución del ciclo de Calvin que podría estar incrementando el estado reducido del pool de PQ, aunque esta represión parece ser mucho mayor en el mutante pro. Además, tanto en wt como en pro se observó la inducción de la PTOX, siendo esta mayor en el caso de pro. Sin embargo, en pro se observó también una importante inhibición de varias proteínas que forman parte del complejo NDH, que a diferencia de wt, está poco afectado. Recientemente, Wiciarz y col. (2015) han comparado la respuesta a la salinidad de una especies halófita (Thellungiella salsuginea) y otra glicófita (Arabidopsis thaliana), estudiando la respuesta del cloroplasto. Estos autores observaron que en la especie halófita se producía una intensa producción de peróxido de hidrógeno en las membranas de los tilacoides, que estuvo acompañada con una alta actividad de la PTOX, mientras que la inhibición de esta enzima dio lugar a la acumulación de peróxido de hidrógeno. Por tanto, en el caso de pro la respuesta mediada por la clororespiración podría no estar funcionando de forma eficiente,

permitiendo la acumulación de radicales libres y peróxido de hidrógeno en las membranas tilacoidales, afectando al proceso fotosintético.

3. El estrés salino induce cambios ultrastructurales en los cloroplastos. Papel de los plastoglóbuli en el mutante *pro*.

El análisis ultrastructural de hojas de wt, *pro* y *gib3* en condiciones control no mostró diferencias significativas en la ultraestructura de los cloroplastos. Sin embargo, el análisis morfométrico del tamaño del cloroplasto mostró un menor tamaño de los cloroplastos de *gib3* en comparación con wt y *pro*. Estas diferencias podrían deberse al menor desarrollo foliar observado en el mutante *gib3*, que podría estar afectando al tamaño del cloroplasto.

El efecto del estrés salino en la ultraestructura del cloroplasto va a depender del grado de tolerancia de cada especie a la salinidad. Así, especies que muestran tolerancia a salinidad, no suelen mostrar alteraciones significativas de la ultraestructura del cloroplasto. Morales y col. (2001) al comparar Limonium pectinatum (especie silvestre) y un hibrido frecuentemente usado en horticultura como Limonium latifolium x limonium caspium cv Beltlaard crecidos en 200 mM de NaCl durante 4 meses, mostró que el genotipo silvestre mantuvo su estructura cloroplastídica sin alterarse, mientras que el hibrido presentaba importantes dilataciones de los tilacoides, así como un grana irregular y desestructurado. Igualmente, Zahra y col. (2014), han observado de forma parecida en cebada que el cultivar silvestre XZ16 no mostró alteraciones por el tratamiento salino, mientras que los cultivares Yerong y Gairner mostraron un grana desorganizado y tilacoides dilatados conforme se aumentaba la concentración salina. De forma general, un hecho frecuente en las especies sensibles a salinidad es el proceso de desestructuración del grana y dilatación de los tilacoides (Fidalgo y col., 2004; Yamane y col., 2004; Navarro y col., 2007; Barhoumi y col., 2007; Stefanic y col., 2013; Zahra y col., 2014; Gao y col., 2015). Normalmente estas modificaciones ultraestructurales van acompañadas con efectos negativos en la fotosíntesis, así como en los parámetros de fluorescencia de los fotosistemas (Navarro y col., 2007; Hu y col., 2014; Zahra y col., 2014). Por tanto, en nuestro estudio hemos podido observar como wt y gib3 responden de forma parecida, mostrando un importante número de cloroplastos con tilacoides dilatados y granas desestructurados, aunque siempre en menor grado en el

mutante *gib3*. El efecto final sería una reducción de la fotosíntesis, posiblemente afectando a la cadena de transporte electrónico y al gradiente electroquímico reduciendo la capacidad formadora de energía. En el mutante *pro* el efecto fue más marcado desde el punto de vista de una importante reducción del tamaño del cloroplasto, así como del desarrollo de los grana. Aunque no hemos cuantificado el número de tilacoides por grana, resulta evidente un menor número de tilacoides por grana en el mutante *pro*, así como de la concentración de clorofila. El importante incremento del tamaño de los plastoglóbulos podría igualmente correlacionarse con el descenso del número de tilacoides. Por tanto, estos hechos podrían explicar la importante reducción de la fotosíntesis en este mutante.

Es posible que uno de los causantes de estos efectos estructurales sea la formación de radicales libres y peróxido de hidrógeno en los tilacoides del grana inducidos por el estrés salino (Yamane *y col.*, 2004; Yamane *y col.*, 2012). Así, Yamane *y col.* (2012) observaron mediante técnicas de localización subcelular de peróxido de hidrógeno, que el estrés salino estaba induciendo la acumulación de peróxido de hidrógeno en los tilacoides, acumulándose este en el estroma. Igualmente, diferentes autores han publicado que el tratamiento con compuestos químicos que pueden actuar como eliminadores de radicales libres y/o incrementar las defensas antioxidantes suelen incrementar la tolerancia al estrés salino (Yamane *y col.*, 2004; Hu *y col.*, 2014).

Aunque el plastoglóbulo fue descrito desde hace mucho tiempo, su función y estructura molecular era poco conocida. Austin *y col.* (2006) realizaron un análisis morfológico mediante técnicas de fijación de alta presión y análisis tomográfico mediante microscopia electrónica de transmisión mostrando que el plastoglóbulo es una estructura más compleja de lo que se consideraba hasta ahora en la bibliografía clásica. Estos autores demostraron que el plastoglóbulo se forma a partir de las membranas tilacoidales, permaneciendo unido a ellas mediante pequeños puentes de unión de unos pocos nanómetros. Igualmente, observaron que ciertas proteínas, como es el caso de la enzima implicada en la síntesis de tocoferol VTE (tocoferol ciclasa) se localizaba en la periferia del plastoglóbulo. En la última década, se han purificado y analizado mediante técnicas de proteómica los plastoglóbulos de varias especies, confirmando que pueden poseer al menos 32 proteínas diferentes, algunas de ellas implicadas en diferentes procesos metabólicos (Nacir y Brehelin 2013; Lundquist *y*

col., 2014). Por tanto, todos estos datos parecen mostrar que el plastoglóbulo podría tener cierta función fisiológica en el metabolismo activo del cloroplasto.

Las modificaciones del número y tamaño del plastoglóbulo por el efecto de la salinidad ya fueron descritas por nuestro grupo en *Pisun sativum* (Hernández y col., 1995), mostrando que la salinidad inducía un incremento del tamaño de los plastoglóbulos. Varios estudios realizados en plantas de tomate tratadas con 75 y 150 mM de NaCl mostraron también un incremento en el número y tamaño de los platoglóbulos (Makela y col., 2000; Sam y col., 2004). Posteriores estudios en otras especies como cebada, patata, Arbutus unedo, Limonium spp., Mesembryanthemum crystallynum, Aeluropus littoralis y Cucumis sativus crecidos en condiciones salinas mostraron también un incremento en el tamaño y/o del número de plastoglóbulos (Morales y col., 2001; Paramonova y col., 2004; Navarro y col., 2007; Barhoumi y col., 2007; Zhen y col., 2011; Shu y col., 2013; Zahra y col., 2014; Gao y col., 2015). Sin embargo, su posible función en condiciones de estrés salino no está clara, aunque una posible explicación podría ser el papel que realizan durante el proceso de senescencia. Así, es conocido que un incremento en número y tamaño de los plastoglóbulos es típico de cloroplastos que entran en una fase de senescencia, conocidos también como gerontoplastos (Wise 2006). En cierto modo, el proceso de respuesta al estrés salino también puede considerarse como un proceso de inducción de una senescencia prematura. En ciertos casos de estrés se ha observado que además de la inducción del número y tamaño de los plastoglóbulos también tiene lugar un proceso de exclusión del plastoglóbulo al citoplasma (Miyake v col., 1989; Keskitalo v col., 2005; Hermle v col., 2007; Mulisch v Krupinska 2013). Recientemente, nuestro grupo ha podido observar en plantas mutantes de tabaco deficientes en GAs y crecidas con 150 mM de NaCl dicho proceso de exclusión de los plastoglóbulos al citoplasma (Soto y col., 2015). Hopkins y col. (2007) propusieron la hipótesis de que el proceso de exclusión de plastoglóbulos al citoplasma podría ser como un mecanismo para obtener energía por parte de la célula sin la necesidad de degradar toda la estructura cloroplastídica mediante un posible proceso de clorofágia. En nuestro caso, en el mutante pro se produce un incremento muy importante de los plastoglóbulos en comparación con wt y gib3, aunque no hemos observado el proceso de exclusión, es muy posible que este tenga lugar y no sea observado dado que puede tener lugar en una estrecha ventana temporal. Los datos obtenidos en el análisis del microarray, nos muestra que en el mutante *pro* se encuentra inducido un término *Bin* implicado en la degradación de ácidos grasos mediante la β -oxidación, lo cual podría permitir la obtención de energía mediante la degradación de lípidos disponibles en el plastoglóbulo. Por tanto, el mutante *pro* podría estar activando la formación de plastoglóbulos para obtener energía mediante un proceso posterior de degradación celular de dichos plastoglóbulos, dado que los procesos fotosintéticos se encuentran fuertemente afectados por la salinidad.

4. Regulación ionica en condiciones de estrés salino. Homeostasis iónica.

Tester y Davenport (2003) han descrito como un rasgo característico de la tolerancia al estrés salino la capacidad de exclusión del sodio de la raíz o al menos de los tejidos foliares y un mantenimiento de altos niveles de K⁺. Por ello, la capacidad de discriminar entre sodio y potasio, medido como el ratio Na⁺/K⁺, suele utilizarse como un indicador de la tolerancia al estrés salino (Flowers 2004). Asch y col. (2000) mostraron que en arroz se produce una correlación entre la tolerancia a salinidad de diferentes genotipos y su ratio foliar K⁺/Na⁺. En tomate este parámetro ha sido también utilizado por diferentes autores como indicador de la diferente tolerancia entre genotipos (Saranga y col., 1993; Rubio y col., 2004; Juan y col., 2005; Ouyang y col., 2007; Yang y col., 2014). En tomate, el ratio parece comportarse de forma diferente según sea una especie tolerante o sensible. Así, Galvez y col. (2012) han observado en tratamiento salino que la especie tolerante Solanum pinpenillifolium mostró un mayor ratio Na⁺/K⁺ que la especie sensible Solanum lycppersicum cv Volgogradskij. Recientemente, Schmidt y col. (2013) han observado que mutantes de arroz nulos para el factor de transcripción OsERF1, eran más sensibles al estrés salino, mostrando tanto en hoja como en raíz un ratio Na^+/K^+ mayor que su especie silvestre. De forma similar, en nuestro estudio, el mutante pro mostró tanto en raíz, tallo y hoja los mayores ratios Na^+/K^+ , lo cual se correlaciona con el mayor efecto negativo de la salinidad en la producción de biomasa y crecimiento de pro. Por otro lado, aunque el mutante gib3 mostró una acumulación similar de sodio en los tejidos foliares, fue capaz de una mayor capacidad de retención de potasio, dando lugar a un menor ratio Na^+/K^+ foliar en comparación con wt y pro. Por tanto, el mutante gib3 podría estar usando el catión sodio como ajuste osmótico, lo cual le permitiría bajar el coste energético de utilizar solutos orgánicos, contribuyendo a su mayor tolerancia al estrés salino.

El análisis del microarray muestra una fuerte inducción del gen SKOR (stelar K^+ outward-rectifying channel) de tomate (LesAffx.43032.1.S1 at) en hojas del mutante pro, sin embargo su expresión no estuvo alterada ni en gib3 ni en wt. El gen SKOR de tomate muestra homologías con el de Arabidopsis thaliana AtSKOR, el cual se ha visto que participa en la descarga de potasio desde las células parenquimáticas de la estela al xilema en raíces (Gaymard y col., 1998). Aunque, debido a su homología con AtSKOR sugeriría un papel principal a nivel radicular, también es posible que se esté expresando en las células del mesófilo, descargando potasio al apoplasto, tal y como sugieren Gao y col. (2015) en su modelo propuesto para Solanum tuberosum. Así, sugerimos que posiblemente esta mayor expresión de SKOR en *pro*, podría estar movilizando potasio de las hojas adultas promoviendo la descarga de potasio en el xilema. Además, se ha visto que estos canales se encuentran fuertemente activados por las ROS (Demidchik y col., 2014). El mutante pro parece tener una menor respuesta de los sistemas antioxidantes (ver más adelante) en comparación con wt y gib3, lo cual podría estar facilitando la acumulación de ROS y por tanto activando dichos canales.

5. Localización subcelular del sodio y papel de los transportadores NHXs en tomate.

La localización subcelular del catión sodio es crucial por su efecto toxico a nivel citoplasmático, la compartimentación en las vacuolas es el mecanismo más común para evitar su acumulación en el citoplasma (Munns y Tester, 2008). Un procedimiento *in vivo* para su localización es mediante fluoroforos que se unen de forma específica al sodio emitiendo fluorescencia que nos va a permitir localizarlo mediante técnicas *in vivo* de microscopia de laser confocal. En nuestro grupo, esta técnica nos ha permitido localizar el sodio subcelularmente en cultivos celulares de tabaco BY2 adaptados a altas concentraciones salinas (García-Garma *y col.*, 2015). Nuestros resultados en raíz de tomate, muestran una alta compartimentación de sodio en las vacuolas, aunque no hemos podido observar diferencias entre los dos mutantes y el silvestre en condiciones salinas. Hamaji *y col.* (2009) usando cómo fluoróforo el compuesto SBFI para la localización de sodio, observaron también que células de Arabidopsis tratadas con 75 mM de NaCl, mostraban una acumulación principal de sodio en las vacuolas celulares. Un hecho interesante que pudimos observar en nuestras muestras de tomate y que quizás necesite un estudio en mayor profundidad,

fue la aparición de pequeñas vesículas marcadas de forma positiva con el fluoroforo CoroNaGreen. Hamaji y col. (2009) y más recientemente, García-Garma y col. (2015) han propuesto que estas vesículas podrían estar participando en el tráfico de vesículas, así como en el transporte y carga de sodio citoplasmático hacia la vacuola central, estando estos resultados de acuerdo con el posible papel en la tolerancia al estrés salino, de los transportadores NHX endosomales presentes en las membranas de las vesículas citoplasmáticas (Bassil y col., 2012). Estos transportadores podrían estar cargando el sodio al interior de la vesícula y transportándolo a la vacuola principal. Rodriguez-Rosales y col. (2008) observaron que el transportador LeNHX2 de tomate, ortólogo del transportador AtNHX5 de Arabidopsis, se encuentra localizado en las membranas de los endosomas, y su inhibición induce sensibilidad al estrés salino. Sin embargo, a nivel radicular, no vimos diferencias entre el genotipo silvestre y los mutantes pro y gib3 en la expresión del gen LeNHX2 en los tratamientos salinos. A nivel foliar, si observamos una significativa mayor expresión del gen LeNHX2 en pro, desafortunadamente no hemos podido estudiar la localización del sodio en hojas dada la dificultad estructural de la hoja de tomate en comparación con los ápices radiculares, no pudiendo constatar si esto implicó un mayor transporte a las vesículas endosomales. Por otro lado, a nivel foliar si hemos encontrado un incremento significativo de la expresión del gen SINHX3 en pro, que de acuerdo con el estudio de Gálvez y col. (2012) muestra su mayor inducción en hoja y su expresión se mantiene durante todo el periodo de salinización. En relación con esta posibilidad, Villalta vcol. (2008) observaron que el gen SINHX3 se ha localizado en un QTL de tomate que está asociado a la acumulación foliar de sodio. Esto podría explicar, al menos en parte, la mayor acumulación de sodio en las hojas de pro, tanto a 75 mM como a 150 mM de NaCl.

El gen *SlNHX1*, isoforma más cercana al transportador de Arabidopsis *AtNHX4*, mostró una expresión significativa en la raíz de *gib3* en tratamiento salino a diferencia de wt y *pro*. Al igual que *AtNHX4*, el gen de tomate *SlNHX1*, presentó una expresión basal baja, en comparación con los otros NHXs, siendo mucho mayor en las variedades tolerantes (Gálvez *y col.*, 2012). Nuestros resultados estarían de acuerdo con estos autores, donde los mayores acumuladores de sodio, en nuestro caso *pro*, mostraron mayor inducción del gen *SlNHX3*, aunque este hecho, no se correlacionó con una mayor tolerancia al estrés.

6. Los niveles hormonales basales de GAs son diferentes entre wt y los mutantes *pro y gib3*.

El análisis de los niveles hormonales de GAs de wt muestra que tanto en hoja como en raíz, GA₄ es mayoritaria en comparación con GA₁, siendo estos valores en hoja hasta 7 veces superiores. Por otro lado, de forma general los niveles hormonales fueron siempre superiores en hoja que en raíz. Los estudios de los contenidos de GAs bioactivas en los mutantes *pro* y *gib3* se limitan tan sólo a un trabajo realizado por Jones (1987) en el mutante *pro*, en el cual sólo pudo analizar los contenidos de GA₂₀ de forma cuantitativa y de GA₁ de una forma semi-cuantitativa, mostrando una concentración mucho menor de ellas en *pro* que en el silvestre. Nuestros análisis de GAs estarían de acuerdo con este estudio previo. Así, *pro* presenta no tan sólo una reducción de GA₁, sino también de GA₄. Estos niveles inferiores de GAs bioactivas se podrían explicar por un proceso de regulación negativa. Así, la mutación puntual de *SlGAI* en *pro* daría lugar a una respuesta activada a giberelinas, reprimiendo la síntesis e induciendo el catabolismo de GAs.

Nuestros resultados más sorprendentes han sido los contenidos de GAs obtenidos en el tejido foliar del mutante *gib3*. Aunque no observamos la presencia de GA₁ en hoja, como cabía esperar, los niveles de GA₄ fueron mayores a lo esperado (siempre menores que en el wt). A nivel radicular los niveles de GA₄ fueron mucho menores que en wt, estando la GA₁ ausente. Actualmente no tenemos una explicación plausible de los altos niveles de GA₄ en las hojas de *gib3*. Sin embargo, dado que la enzima *ent*-kaureno sintasa es única en el genoma de tomate y que la mutación de *gib3* no ha sido identificada a nivel molecular, podría ocurrir que esta mutación no fuera totalmente nula permitiendo una activación diferencial del gen según las condiciones ambientales.

7. El estrés salino induce niveles más bajos de giberelinas bioactivas en wt, pero induce su acumulación en *pro*.

La mayor parte de los estudios que analizan el metabolismo de las giberelinas en condiciones salinas se han realizado en *Arabidopsis thaliana*, usando los diferentes mutantes disponibles en diversas colecciones. Achard *y col.* (2006) cuantificaron los niveles de giberelinas endógenas presentes en plantas de Arabidopsis tratadas con 100 mM de NaCl durante dos semanas, observando que se producía un descenso significativo tanto de GA_4 como de GA_1 . Posteriormente, Magome *y col.* (2008) también observaron un patrón de respuesta parecida cuando analizaron los niveles de GAs bioactivas en plantas de Arabidopsis tratadas con 100 mM de NaCl, sin embargo, sólo observaron un descenso significativo en los contenidos de GA_4 . Aparte de estos estudios en *Arabidopsis thaliana*, también se ha publicado recientemente un trabajo realizado en plántulas de soja, donde se cuantifican los contenidos de GAs bioactivas en condiciones salinas (Hamayun *y col., 2015*). En este estudio, los autores también describen un importante descenso de los niveles de las GAs bioactivas (GA₁ y GA₄) tras 24 horas de tratamiento de 100 mM de NaCl.

Los resultados obtenidos en wt estarían de acuerdo con los estudios anteriores en Arabidopsis y soja, aunque la respuesta fue siempre más marcada en hoja, donde el contenido de GA4 disminuyo hasta 3 veces en comparación con las condiciones control, y estando la concentración de GA1 por debajo de los límites de detección. Los datos de expresión génica parecen indicar que la disminución de los niveles de GAs bioactivas se podrían deber a una acción conjunta en la reducción de la síntesis de GAs, principalmente debido a una inhibición en la expresión de 20ox1 y 3ox2 y al papel del catabolismo, principalmente a la inducción de 20x3, dado que en plantas tratadas con NaCl vemos que se produce un incremento significativo de la concentración de GA₂₉, y un descenso de los niveles de GA₂₀, hecho que podría explicar la desaparición de GA₁. Por otro lado en la ruta de la no 13-hidroxilación, el descenso de los niveles de GA₄ podría explicarse por la reducción de *3ox2*, que daría lugar a la acumulación de GA₉ observada. Sin embargo, tampoco podemos excluir el papel del catabolismo, aunque no vemos variaciones de los niveles de GA_{51} , no hemos podido determinar los niveles de GA₃₄, producto del catabolismo de GA₄ y por tanto no sabemos si se produce una acumulación de este catabolito. En el estudio de Magome y col. (2008) se atribuye principalmente la reducción de los niveles de GAs bioactivas a la inducción de una At2ox7 que estaría disminuyendo los niveles de GAs bioactivas, aunque no excluyen la posible reducción de la síntesis mediada por 20 oxidasas y 3 oxidasas. Otro punto de control que podría afectar a los niveles finales de GAs estaría en la síntesis temprana de GAs. Así, en el microarray también se observó una reducción significativa de la enzima ent-kaureno oxidasa que podría estar disminuyendo la concentración de precursores de la síntesis de GAs (Figura 107).

A nivel radicular en wt, los niveles hormonales fueron muy inferiores a los obtenidos en hoja. El tratamiento salino produjo un pequeño incremento aunque significativo en los niveles de GA₄, mientras que la GA₁ no pudo ser detectada. El estudio de la expresión génica nos mostró que principalmente se produjo una fuerte inducción de 2ox3-4, lo cual podría explicar la desaparición de la GA₁.

Colebrook *y col.* (2014) han realizado un análisis de expresión usando los datos depositados en *Genevestigator* de experimentos de microarray de Arabidopsis en diversas condiciones de estrés abiótico.



Figura 107. Esquema del metabolismo de las giberelinas en hoja de wt tratadas con 150 mM de NaCl durante 1 semana. Las flechas en rojo indican disminución de los niveles del compuesto o de la expresión génica. Las flechas en verde indican acumulación del compuesto o inducción de la expresión génica.

Según este estudio, en condiciones salinas, además de la inducción de varias 20xidasas tanto en raíz como en hoja, también se observó una reducción en la expresión de las 30xidasas, así como de una 200xidasa en hoja y la inducción de una 200xidasa en raíz. Este comportamiento parece ser extensible al resto de estreses abióticos estudiados. Por tanto, los genes de enzimas implicados en la biosíntesis de GAs (200xidasas y 30xidasas) tendrían reprimida su expresión, mientras que los genes implicados en su catabolismo (20xidasas) la tendrían inducida.

La respuesta de *pro* al tratamiento salino fue diferente a wt. Como hemos visto anteriormente, los niveles de GAs bioactivas fueron mucho menores que en wt. Sin

embargo, a diferencia de wt el estrés salino dio lugar a un incremento de la concentración de GA_4 mientras que los niveles de GA_1 no se modificaron significativamente. En este caso, sólo podemos especular sobre el mecanismo de acumulación de GA_4 . Así, aunque se produce una reducción significativa de la 30x2, lo más destacado fue la fuerte inhibición de todas las isoformas de 20xidasas, indicando una represión del catabolismo de GAs. Por tanto, este hecho podría explicar la mayor acumulación de GA_4 . Sin embargo, no nos ha sido posible medir los niveles de GA_{34} (catabolito de la GA_4), valor que podría haber confirmado que los niveles GA_4 aumentaran por un mayor descenso del catabolismo que de su síntesis (Figura 108).



Figura 108. Esquema del metabolismo de las giberelinas en hoja de *pro* tratadas con 150 mM de NaCl durante 1 semana. Las flechas en rojo indican disminución de los niveles del compuesto o de la expresión génica. Las flechas en verde indican acumulación del compuesto o inducción de la expresión génica.

En la hoja de *gib3*, parece que el estrés salino afectó poco a su metabolismo tal y como se observa en la figura 109. Sólo se incrementaron los niveles de GA₄₄ en salinidad, mientras que la expresión génica mostró una inhibición de su síntesis, baja expresión de *200x1,-3* y de *30x1* y una inducción del catabolismo, inducción de *20x3*, -5. Por tanto, estas modificaciones no fueron suficientemente significativas para afectar a las concentraciones finales de GAs bioactivas.



Figura 109. Esquema del metabolismo de las giberelinas en hoja de *gib3* tratadas con 150 mM de NaCl durante 1 semana. Las flechas en rojo indican disminución de los niveles del compuesto o de la expresión génica. Las flechas en verde indican acumulación del compuesto o inducción de la expresión génica.

8. Intereacción de diferentes sistemas hormonales con la respuesta al estrés salino en tomate. Papel del ácido salicílico y su relación con los sistemas antioxidantes.

El ácido salicílico (SA) fue la hormona que mostró una mayor respuesta al estrés salino, tanto en raíz como en hoja. A nivel foliar, el mayor incremento se observó en wt, que llego a ser 10 veces superior al tratamiento control, *pro* también mostró un fuerte incremento, siendo aproximadamente 3 veces superior, no mostrando variaciones significativas el mutante *gib3*. Sawada *y col.* (2006) observaron que plántulas de arroz sometidas a estrés salino mostraban un incremento significativo de la concentración de SA, el cual se vio acompañado con un incremento de la actividad enzimática de la ácido benzoico 2-hidroxilasa, enzima clave en la síntesis del SA. Conforme aumentaba el tiempo de tratamiento salino se fueron incrementando también los compuestos derivados no bioactivos del SA, como son las formas glicosiladas del SA y el Metil-salicílico.

El análisis del microarray mostró la presencia del gen *SAMT* (Les.2504.1.A1_at, salicylic acid carboxyl methyltransferase), que mostró una fuerte inducción a nivel radicular, sobre todo en wt y *pro*, pero no mostró variaciones a nivel foliar. Esta enzima está encargada de la conversión del SA en metil-salicílico (MeSA), que no muestra actividad biológica. Sin embargo, se ha visto que en la

respuesta a patógenos, el MeSA puede ser transportado a larga distancia vía floema para ser posteriormente transformado otra vez en SA (Seskar y col., 1998). Nuestros resultados sugieren que a nivel radicular el SA puede ser convertido en MeSA y transportado a la parte aérea donde se acumularía. Este elevado nivel de SA en hoja de wt, explicaría el enriquecimiento de los términos GO y términos Bin que estaban implicados en los sistemas de respuesta hipersensible a patógenos y de forma general al estrés biótico. De forma paralela aunque en un menor nivel, el mutante pro también mostró la inducción del termino Bin implicado en la respuesta al estrés biótico. Sin embargo, el mutante gib3 no mostró variaciones en estos términos GO y Bin. Igualmente, a nivel radicular, sólo wt mostró un enriquecimiento significativo del termino GO de respuesta a patógenos (en este caso de respuesta a infección por bacterias) y del termino *Bin* general de respuesta al estrés biótico. Por tanto, parece evidente que el SA puede tener un papel relevante en la respuesta al estrés salino (Jayakannan y col., 2015). Así, se ha observado que el mutante de Arabidopsis thaliana, sid2-1, el cual muestra una mutación en el gen clave de la síntesis de SA, *ICS1* (Isocorismato sintasa 1), mostraba una mayor sensibilidad a diferentes estreses abióticos como luz UV, ozono y salinidad (Ogawa y col., 2005; Demsey y col., 2011). Por tanto, estos resultados parecen indicar que la síntesis de SA es crucial para la respuesta al estrés abiótico.

Se ha sugerido que el papel del SA en la respuesta y adaptación al estrés salino podría estar relacionado con la activación de los sistemas de protección antioxidantes celulares, evitando la acumulación de daños en los sistemas de membranas (Miura y Tada, 2014). Así, se ha visto que la aplicación exógena de SA puede mejorar la respuesta al estrés salino en diferentes especies (Khan *y col.*, 2010; Nazar *y col.*, 2011). En tomate, se ha observado que la aplicación radicular de bajas concentraciones de SA (10 μ M de SA), incrementaron los pigmentos fotosintéticos, los niveles de potasio y la concentración de azucares, favoreciendo su adaptación al estrés salino (Wasti *y col.*, 2012). Igualmente, la aplicación de SA en cultivo hidropónico de tomate indujo la acumulación de ABA, favoreciendo la adaptación al estrés salino (Szepesi *y col.*, 2009). Sin embargo, en algunos casos el efecto del SA parecer ser contradictorio. La misma concentración de SA puede tener un efecto diferente según sea el tipo de estrés, pudiendo en un caso aumentar la tolerancia y en otros casos aumentar la sensibilidad (Nemeth *y col.*, 2002; Miura y Tada 2014).

Diferentes estudios han mostrado una relación directa entre la acumulación de SA y la producción de especies reactivas de oxigeno (ROS, reactive oxygen species). Así, la aplicación exógena de SA inhibe la expresión y actividad de enzimas implicadas en la eliminación de ROS como las ascorbato peroxidasas, catalasas, etc (Chen y col., 1993; Conrath y col., 1995; Durner y Klessig 1995; Slaymaker y col., 2002). Por tanto, la principal consecuencia de esta inhibición será la acumulación de ROS que puede dar lugar a la producción de daños celulares. El análisis del microarray de diferentes enzimas antioxidantes mostró que a nivel foliar, tanto en wt como en pro la respuesta fue muy similar. Así, se observó una inducción de una SIAPX3 en wt y pro, mientras que las isoenzimas SIAPX5 y SIAPX6 presentaron inhibida su expresión. La isoenzima SIAPX6, se localiza a nivel de la membrana tilacoidal, por lo que su reducción puede implicar una disminución en la capacidad de eliminar peróxido de hidrógeno en el tilacoide. En el mutante pro, además se observó la inhibición de una catalasa (Les.3549.1.A1 at). Por otro lado, las enzimas eliminadoras de radical superóxido (SOD, superoxido dismutasas), mostraron una inhibición importante de su expresión. Destacar que una de las isoenzimas de SOD que mostraron mayor inhibición fue una Fe-SOD (Les.3014.1.S1 at), isoenzima que está localizada en el cloroplasto, lo cual podría estar facilitando la acumulación de radical superóxido en los tilacoides del mutante pro. Por tanto, estos resultados parecen indicar que habría una disminución de la capacidad antioxidante tanto en wt como en pro.

Otro grupo importante de genes implicados en la respuesta al estrés abiótico son las glutatión-S-transferasas (GSTs). Esta familia de enzimas es muy diversa y multifuncional, cuya actividad general es usar glutatión en su forma reducida en diversas reacciones catalíticas, teniendo un papel muy importante en los procesos de detoxificación de xenobióticos, peróxidos lipídicos tóxicos para la célula, reducción del dehidroascorbato, metabolismo primario y reacciones secundarias del metabolismo. Igualmente, también se les ha implicado en mecanismos no catalíticos, actuando como transportadores de proteínas y compuestos químicos a la vacuola (Csiszar $y \ col.$, 2014). Las GSTs pueden tener un papel muy importante en los procesos de aclimatación al estrés salino, sin embargo la respuesta de las diferentes familias de GSTs puede ser diferencial (Kumar $y \ col.$, 2013). Chen $y \ col.$ (2012) observaron que el mutante nulo del gen de Arabidopsis *GSTU17*, mostraba una mayor

resistencia al estrés salino, atribuyendo estos autores esta mayor resistencia al hecho de que el mutante tuviese mayores niveles de GSH y de ABA en condiciones de estrés salino.

El estudio de nuestro transcriptoma mostró claramente una fuerte expresión de las diferentes familias de las GSTs, como confirma el análisis de los términos Bin que muestran una inducción significativa de las GSTs a nivel foliar. Nuestros resultados estarían de acuerdo con el estudio del transcriptoma de tomate realizado por Sun y col. (2010), que mostraba tanto en la variedad sensible, como en la tolerante una fuerte inducción de las GSTs. Csiszar y col., (2014) han realizado un estudio también en tomate, de diferentes familias de las GSTs, su respuesta a la salinidad y al SA, demostrando que el tratamiento salino inducía la acumulación de un importante número de GSTs, entre ellas varias de las observadas en nuestro estudio. Igualmente, observaron que el tratamiento con SA indujo la expresión diferencial de un importante número de GSTs y esta respuesta dependió de la concentración de SA aplicada. El análisis in silico de varios promotores de GSTs mostró que poseían regiones cis de respuesta al SA (elementos -TCA), y sobre todo la mayoría de los genes presentaban motivos implicados en la defensa contra el estrés biótico (zonas repetidas ricas en TC), así como elementos implicados en la respuesta sistémica adquirida (motivos TGACG).

Finalmente, la síntesis de SA parece estar regulada a nivel transcripcional principalmente por factores de transcripción de las familias MYB y WRKY, los cuales se ha visto que incrementan positivamente la inducción del gen *ICS1*, enzima clave en la síntesis de SA (Jayakannan *y col.*, 2015). Igualmente, el SA también puede inducir la expresión de ciertos factores de transcripción WRKY (Chen y Chen y 2000; VanVerk *y col.*, 2008; Yanjiao *y col.*, 2015). Como veremos posteriormente, la inducción de estos factores WRKY podría estar afectando a la respuesta al estrés abiótico mediada por los factores de transcripción NAC.

9. Regulación de la expresión génica mediada por factores de transcripción.

Los factores de transcripción actúan como mediadores en la respuesta a los estreses abióticos, mediando entre las rutas que reconocen una situación de estrés y la respuesta a nivel nuclear induciendo o reprimiendo los genes de respuesta a dicha situación. En la base de datos "*Plant Transcription Factor Database* (PTFD)" se han

identificado 1845 posibles factores de trascripción en el genoma de tomate, pertenecientes a 58 familias diferentes, estando un importante número de ellos implicados en la respuesta al estrés. Los diferentes estudios realizados en salinidad muestran que principalmente hay seis familias que se expresan de forma diferencial bajo condiciones de estrés salino, que incluyen a los bZIP, WRKY, AP2/ERF, MYB, bHLH y NAC (Yao *y col.*, 2011; Lindemose *y col.*, 2013; Golldack *y col.*, 2014; Deinlein *y col.*, 2014). Recientemente, Corrales *y col.* (2014) también han observado que la familia de factores de transcripción Dof podrían ser también componentes importantes de la respuesta al estrés salino en tomate. El análisis de los factores de transcripción de nuestros experimentos del microarray, nos confirman que al menos algún componente de cada una de estas familias esta diferencialmente regulado por el estrés salino.

10. Papel de los factores de transcripción de la familia, NAC, WRKY y Dof en la respuesta al estrés salino y su posible interacción con la proteína DELLA.

Recientemente, Marin-de la Rosa y col. (2014) han desarrollado un estudio del interactoma de la proteína GAI de Arabidopsis mediante el método del doble híbrido en levadura, usando una librería donde se encuentran representados 1172 factores de transcripción de Arabidopsis (Castrillo y col., 2011). En este estudio, los autores describen la capacidad de interacción de GAI con al menos 58 factores de transcripción de los cuales la mayoría pertenecen a las familias TCP (12), bHLH (11), AP2/EREBP (8) y NAC (6). Entre los factores NAC (NAM, ATAF1;2, CUC2) se encuentra el factor AtNAC2, que ha sido asociado a la senescencia inducida por salinidad (Balazadeh y col., 2010). La capacidad de interacción de la proteína DELLA con los factores de transcripción NAC también ha sido observada en arroz (Huang vcol., 2015a). Según estos autores, la proteína DELLA de arroz, denominada SLR, en ausencia de GAs, estaría secuestrando a los FTs NAC29/31. Sin embargo, en presencia de GAs, se activaría el proceso de degradación de SLR mediado por el proteosoma 26, liberando a los FTs NAC29/31 e induciendo una cascada de señalización que finalmente afectará a la inducción de la celulosa sintasa, que dará lugar a la elongación de los entrenudos (Huang y col., 2015a). Por tanto, estos resultados parecen indicar que la capacidad de la proteína DELLA de interaccionar con los factores de transcripción NAC está extendida entre las diferentes especies.

En nuestro microarray hemos podido observar que en hoja de wt, además de inducirse el gen SINACI, la salinidad inducía la expresión de otros 5 genes NACs, mientras que en pro se inducen 2 y en gib3 sólo 1. Estos resultados parecen indicar una regulación diferencial en los mutantes de GAs. En los últimos años, diversos trabajos han mostrado que la familia génica de los factores de trascripción NAC podría tener un papel relevante en la respuesta a diferentes estreses bióticos y abióticos (Puranik y col., 2012). Los genes NAC pertenecen a una familia exclusiva de plantas que participan en el crecimiento y desarrollo vegetal. Los genes NAC constituyen una de las mayores familias de factores de transcripción específicos de plantas, que contienen un domino conservado NAC en su región N-terminal implicado en su unión al ADN (≈ 150 aa), mientras que su región C-terminal es muy variable y parece estar implicada en la activación trascripcional (Olsen y col., 2005). El análisis bioinformático de los diferentes transcriptomas publicados en estrés abiótico y en diferentes especies muestran que entre un 20-25% de los genes NAC están regulados por estreses abióticos tales como el estrés salino, hídrico o por frío (Puranik *v col.*, 2012).

Nuestro estudio transcriptómico de los mutantes pro y gib3 en comparación con wt en condiciones control mostró que en hoja de pro se producía una fuerte inducción del factor de transcripción SINAC1 (Solyc04g009440.2.1). Sin embargo, el estrés salino no modificó su expresión en pro. Por el contrario, tanto en gib3 como en wt estaba significativamente expresado por salinidad en raíz y en hoja. Al comparar nuestro resultados con otros estudios transcriptómicos realizados en tomate comprobamos que estos estudios también mostraban el factor de trascripción SINAC1 fuertemente inducido por el estrés salino (Ouyang y col., 2007; Sun y col., 2010). Igualmente, Yang y col. (2011) han estudiado el patrón de expresión de SINAC1 en diferentes órganos y bajo condiciones de estrés salino mostrando que su expresión estaba fuertemente inducida en raíz, aunque también en otros órganos como hoja y fruto, aunque en menor medida. Ma y col. (2013) observaron que el gen SINAC1, además de estar inducido por diversos factores abióticos como estrés por frío, estrés osmótico, calor y salinidad, también se encontraba inducido por tratamientos hormonales como ABA, etileno, salicílico y giberelinas. Estos factores NAC también pueden ser inducidos por el estrés biótico (Puranik y col., 2012). Así, Huang y col.

(2013) han mostrado que SINAC1 está fuertemente inducido en plantas infectadas con *Pseudomonas*.

En el mutante pro también se observó una inducción significativa del factor de transcripción SIDof3 (Solyc02g067230; LesAffx.51704.1.S1 at) en condiciones control. Por otro lado, el promotor del gen SINAC1 presenta varias secuencias cis-ADN específicas de unión de los factores de transcripción Dof (5'-AAAG-3'). Corrales y col. (2014) han demostrado que SIDof3 (nombrado según los autores SICDF4) se encuentra localizado en el núcleo y es capaz de unirse a esta secuencia cis-ADN, dando lugar a la trans-activación génica. Recientemente, He y col. (2015) han mostrado en Arabidopsis thaliana que el gen AtDof5.8 es capaz de activar la expresión de un factor de transcripción NAC (ANA069) uniéndose a su promotor en condiciones de estrés salino, hídrico y tratamiento con ABA. Por tanto, podemos especular que el gen SINAC1 podría estar activado por la acción del factor SIDof3 en el mutante pro. Otro factor de transcripción que podría estar participando en la regulación de SINAC1 sería el factor de transcripción WRKY39 que esta también fuertemente inducido en pro, tanto en condiciones control como salinas. Diferentes estudios han mostrado que los factores de transcripción WRKY pueden ser inducidos por el estrés salino. Así, la sobre-expresión del factor de transcripción GhWRKY39 y GhWRKY17 de algodón en tabaco dio lugar a un incremento de la tolerancia al estrés salino y patógenos (Yan y col., 2014; Shi y col., 2014). Estos factores de transcripción WRKY pueden ser activados por la acumulación de fitohormonas tales como el ABA, SA y JA, por ello se considera que estos factores de transcripción WRKY también tienen un papel importante en la repuesta al estrés biótico (Rushton y col., 2010). Nuestros resultados del análisis de fitohormonas muestran que los niveles basales de SA son mayores en *pro* que en wt en condiciones normales (aproximadamente 3 veces superior), y dado que el promotor de SINAC1 posee 4 secuencia de reconocimiento cis para estos factores de transcripción WRKY (5'-CWTGAC-3') estando 2 de ellas en tándem, nos permite especular que este factor de transcripción también podría estar participando en la co-regulación de la expresión de SINAC1. Además, esta hipótesis también se vería apoyada por el estudio de co-expresión de SINAC1 y WRKY39, que mostraría una alta capacidad de co-regulación entre ambos. Para explicar cómo funcionaría este sistema en pro en condiciones control se esquematiza en la figura 110:



Figura 110. Posible mecanismo de regulación del factor de transcripción SINAC1 mediado por su interacción con la proteína DELLA.

¿Cómo funcionaría en estrés salino? Consideramos que como en el caso de Arabidopsis (Marin-de la Rosa y col., 2014), la proteína DELLA de tomate podría interaccionar con los factores NAC, funcionando como activadores de la transcripción mediada por los factores NAC, uniéndose a las secuencias de reconocimiento específico de los NAC (NACRS) en los promotores de los genes diana. Como podemos ver en la figura 110, la señalización de GAs estaría inducida en el mutante pro, debido a la mutación puntual. Esto daría lugar a una reducción de los niveles de la proteína DELLA de forma constitutiva, bien por ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma 26S, o bien por una mayor inestabilidad debido a una reducción del proceso de sumoilación. Conti y col. (2014) han propuesto que el proceso de sumoilación de la proteína DELLA es un mecanismo independiente a la hormona, que estaría contribuyendo a la estabilización de la proteína DELLA, sobre todo en los primeros momentos de la aplicación del estrés. Estos mismos autores han demostrado que la proteína AtGAI puede ser sumoilada por estrés salino. La proteína SIGAI (SIDELLA) de tomate muestra el mismo domino de sumoilación que las proteínas DELLA de Arabidopsis, así como de otras especies, siendo por tanto también susceptible de ser sumoilada. Como hemos visto por Western-Blot contra las proteínas SUMO en pro, los niveles de las proteínas SUMO son muy bajos, posiblemente aumentando la inestabilidad de DELLA en condiciones salinas. Curiosamente, en nuestros Western-Blot contra SUMO, aparecieron en wt y gib3 en tratamiento salino una fuerte inducción de una banda de una proteína posiblemente sumoilada, cuyo peso molecular coincidiría con la proteína SIGAI sumoilada (≈74 kDa), sin embargo, en el mutante *pro* no se observó dicha banda.

En definitiva, esto impediría la unión de la proteína SIGAI con SINAC1 y su posterior unión a los sitios NACRS y por tanto no produciéndose la activación génica de los genes diana. En última instancia, este proceso podría estar suponiendo una falta de respuesta al estrés salino mediada por la factores NAC e independiente de la ruta de respuesta activada por ABA (Nakashima *y col.*, 2012; Puranik *y col.*, 2012). Por tanto, creemos que podría justificar, al menos en parte, la sensibilidad al estrés mostrada por el mutante *pro*. El comportamiento de wt en condiciones salinas como hemos comentado mostró ser diferente. En la figura 111 se muestra cuál sería su posible mecanismo de respuesta:



Figura 111. Mecanismo de respuesta al estrés salino en Micro-Tom mediado por la posible interacción de las proteínas DELLA y los factores de transcripción NAC.

El análisis de expresión del microarray nos muestra que en hoja de wt en condiciones salinas se inducen al menos 6 factores de transcripción NAC. Estos resultados estarían de acuerdo con los estudios realizados por microarray en tomate bajo condiciones salinas (200 mM de NaCl, durante 5 horas) en dos variedades de tomate, una sensible (Moneymaker) y otra tolerante al estrés (PI365967) donde se

observó que un 50% de los factores NAC estaban sobre-expresados en al menos uno de los dos cultivar (Sun *y col.*, 2010 y *Tomato Functional Genomics Database*), entre ellos se encuentran los descritos en nuestro experimento. Igualmente, el análisis de expresión en condiciones de estrés abiótico en plantas de tomate mostró que además de SINAC1, los factores SINAC4 y SINAC7 están también sobre-expresados por el tratamiento salino (Zhu *y col.*, 2014). Como hemos visto anteriormente, en wt y en condiciones salinas se produce un descenso muy significativo de los niveles de GAs bioactivas (GA₁ y GA₄), dando lugar a una acumulación de las proteínas DELLA y promoviendo la activación de genes regulados por los factores NACs.

La sobre-expresión del factor ATAF1 de Arabidopsis y en condiciones de estrés hídrico dio lugar a una doble respuesta, por un lado positiva y por otra negativa (Wu *y col.*, 2009). Según estos autores, dada la redundancia de los factores NAC y su amplia respuesta al estrés, resulta difícil poder evaluar de forma individual la respuesta al estrés abiótico. Sin embargo, la sobre-expresión en arroz del factor de transcripción OsNAC10, dio lugar a plantas que en condiciones de estrés hídrico eran capaces de tener una mayor producción de grano (Jeong *y col.*, 2010). Igualmente, en trigo la sobre-expresión del gen TaNAC69, bajo el control del promotor inducible por estrés hídrico HvDhn4 de cebada, mostró una mayor resistencia a la deshidratación y el estrés salino (Xue *y col.*, 2011). Recientemente, Huang *y col.* (2015b) han mostrado que el factor de transcripción TaNAC29 de trigo al ser sobre-expresado en Arabidopsis confirió tolerancia al estrés salino e hídrico en las diferentes fases de crecimiento del ciclo vegetal.

11. El factor de transcripción TCP3 parece estar regulado por las giberelinas y por el estrés salino.

Las proteínas TCP (cuyo nombre viene de las iniciales de <u>T</u>EOSINTE BRANCHED, <u>C</u>YCLOIDEA y <u>P</u>ROLIFERATING CELL FACTORS) son factores de transcripción específicos de los vegetales que participan en diferentes funciones, como el desarrollo foliar, la simetría floral, la formación de las ramas laterales del tallo y en la senescencia (Parapunova *y col.*, 2014). Sin embargo, esta familia ha sido poco estudiada en tomate. Recientemente, Parapunova *y col.* (2014) han descrito y caracterizado 30 SITCPs de tomate durante las diferentes fases de crecimiento del tomate. Entre ellos se encuentra el factor SITCP3, el cual pertenece a la Clase II de TCPs y a la subclase CIN (CINCINNATA). Según estos autores, el gen *SITCP3* se expresa principalmente en hojas y flores en antesis. Igualmente, al realizar un estudio de interacción entre los diferentes TCPs observaron que SITCP3 era de los pocos que no interaccionaba consigo mismo y/o con otros TCPs. Además, el gen *SITCP3* mostró una región como posible diana del microRNA miR319a. Según estos autores SITCP3 estaría implicado en el desarrollo foliar junto con otros factores TCPs.

En nuestros resultados del microarray hemos podido comprobar que este factor de transcripción SITCP3 se encuentra inducido en condiciones control en el mutante *pro*, mientras que se encuentra reprimido en el mutante *gib3*. Este hecho parece indicar que su expresión estaría regulada por las giberelinas de forma diferencial. En el mutante *gib3*, cabe esperar una fuerte acumulación de la proteína DELLA, la cual podría estar actuando como represora de la expresión de SITCP3. Sin embargo, cabe esperar que el mutante *pro* presente bajos niveles de DELLA, con la ruta de señalización de GAs activada y por tanto induciendo su expresión. Creemos que este hecho vendría reforzado por el estudio de Davière *y col*. (2014) que recientemente han demostrado que la proteína DELLA de Arabidopsis es capaz de interaccionar con los TCPs de Clase I, regulando el tamaño de la planta. Igualmente, Martínez de la Rosa *y col*. (2014) ha observado también que en Arabidopsis una de las familias con las que interactúa la proteína DELLA es con la familia de factores de transcripción TCPs.

Al analizar los datos del microarray en condiciones salinas observamos que la expresión del gen *SITCP3* se encontraba reprimida con la salinidad, tanto en wt como en *pro*, aunque mutante *gib3* no se veía afectado. Como hemos visto anteriormente, wt presentó bajos niveles de GAs bioactivas en condiciones salinas, por tanto cabía esperar una mayor acumulación de la proteína DELLA que como hemos visto anteriormente inhibiría la expresión de *SITCP3*. En *gib3*, la respuesta fue la esperada ya que los niveles de DELLA no estaban modificados por la salinidad y por tanto su expresión no se alteraría. En cuanto al mutante *pro*, su explicación resultó un poco más compleja debido a que la mutación *pro* no es totalmente nula, permitiendo una pequeña respuesta a la aplicación exógena de GAs y paclobutrazol (Carreras *y col.*, 2014; Livne *y col.*, 2015). Como hemos visto anteriormente, la salinidad dio lugar a un incremento de los niveles de GAs en *pro*, pudiendo tener un efecto negativo en la expresión del gen *SITCP3*. Por tanto, parece ser que la regulación del gen *SITCP3*

podría tener cierta relevancia en el proceso de desarrollo foliar durante el estrés salino, participando en la adaptación al estrés.

12. Regulación de la expresión de las proteínas implicadas en la respuesta al estrés. Proteínas de tipo chaperonas (heat shock proteins).

Las proteínas de choque térmico o también llamadas chaperonas están implicadas en el plegamiento, ensamblaje, translocación y degradación de las proteínas (Vierling 1991), teniendo un papel muy relevante en los procesos celulares de estabilización de membranas y proteínas, participando en el replegamiento de las proteínas bajo condiciones de estrés (Wang *y col.*, 2004). Después de su descubrimiento como proteínas inducidas por el choque térmico, se ha observado que también son inducidas por diferentes estreses abióticos, tales como el estrés hídrico, salino, metales pesados, etc. Recientemente, en nuestro grupo hemos realizado un estudio transcriptómico y proteómico en cultivos celulares de tabaco adaptados a altas concentraciones salinas, donde se mostraba una fuerte alteración de la expresión y contenido de las HSPs. Principalmente observamos la acumulación de ciertas HSP90, así como de chaperonas de pequeño tamaño molecular (sHSPs 12-40kDa). Diversos estudios transcriptómicos y proteómicos muestran también la importancia de estas proteínas en la respuesta al estrés salino (Sobhanian *y col.*, 2001).

En nuestro estudio en tomate, destaca el efecto de la salinidad en la familia sHSPs, mostrándose una fuerte inhibición de esta familia, sobre todo a nivel foliar en el mutante *pro*. Las sHSPs no son capaces de forma individual de activar el replegamiento de las proteínas. Su acción es la de unirse a las proteínas no nativas, probablemente a través de reacciones hidrofóbicas, y estabilizar y prevenir la agregación con otras proteínas (Wang *y col.*, 2004). Como hemos comentado anteriormente, en el mutante *pro* se produjo una inducción significativa de varias sHSPs, las cuales se encuentran localizadas en diferentes orgánulos como la mitocondria, el cloroplasto y el peroxisoma. La inducción de las sHSP mitocondriales de maíz hizo mejorar su respuesta al estrés salino, mejorando el transporte electrónico mitocondrial mediante la protección de la actividad NADH:ubiquinona reductasa (Complejo I) (Hamilton y Heckathorn 2001). Song y Ahn (2011) observaron que en hojas de zanahoria, el estrés salino produjo una fuerte inducción de una sHSP, DcHsp17.7, la cual al ser sobre-expresada en *E. coli* indujo tolerancia al estrés salino.

Igualmente, el estrés salino también indujo la expresión de una sHSP en *Physcomitrella patens*, PpHsp16.4, además también era inducida por fitohormonas como el ABA y el SA (Ruibla *y col.*, 2013).

Recientemente, Perez-Salamo *y col.* (2014) han demostrado en *Arabidopsis thaliana* que la sobre-expresión del factor de transcripción HSFA4A confería tolerancia al estrés salino. El análisis del interactoma de este factor de transcripción mostró que entre los genes que activaba se encontraban dos quinasas de proteínas, MPK3 y MPK6. La activación de estas quinasas por fosforilación, indujo una fuerte expresión de una sHSP, AtHsp17.6A. En nuestro microarray se muestra sobre todo, la inducción del factor de transcripción SIHSFA5 en hoja de wt y *pro*, mientras que en raíz se observó la expresión del factor SIHSFA4B. Por tanto, es posible que estos factores de transcripción estén activando la fuerte inducción de las sHSPs observada en los tejidos foliares de wt y *pro*.

Otra familia génica que mostró modificaciones importantes en el microarray fueron las HSP60 o también llamadas chaperoninas. Estas HSP60 están formadas por dos familias, la chaperoninas tipo GroE (Grupo I), que se encuentran en bacterias, mitocondrias y cloroplastos, y las chaperoninas CCT (chaperonins containg t-complex polypepetide 1, GrupoII), que se encuentran en arqueobacterias y en el citosol de los eucariotas (Wang y col., 2004). Se cree que su principal función es ayudar en el replegado de las proteínas de los orgánulos, ayudando a su estabilización. Así se ha visto que participan a nivel plastídial en el mantenimiento de la RuBisCo (Hemmingsen v col., 1988). En nuestro estudio, hemos podido observar que la familia de las chaperoninas CCT estaba poco afectada. Sin embargo, las chaperoninas tipo GroE, estaban fuertemente inhibidas, sobre todo las chaperoninas Cpn60- α (2) v Cpn10(1), localizadas en el cloroplasto. Esto podría explicar en cierto modo los daños observados a nivel cloroplastídico en wt y pro. Igualmente, mediante Western-Blot observamos que tanto en wt, y sobre todo en pro, se producía una importante reducción de la proteína RuBisCo. Como hemos mencionado, esta inhibición fue mucho más patente en el mutante pro, lo cual indicaría una menor protección del cloroplasto frente al estrés salino.

CAPITULO II. Interacción fuente de nitrógeno y salinidad.

 El crecimiento en altos niveles de NH₄⁺ produce una reducción importante de la biomasa total y crecimiento en condiciones control en los diferentes genotipos estudiados.

El nitrógeno puede ser suministrado a las plantas en diferentes formas, normalmente como NH₄⁺, NO₃⁻ y en combinación. Sin embargo, diversos autores han mostrado que se produce una importante reducción del crecimiento cuando el NH₄⁺ es suministrado en altas concentraciones, en comparación con el NO₃⁻ (Magalhaes *y* Wilcox 1983; Gerendás *y col.*, 1997; Zhu *y col.*, 2000; Nasraoui-Hajaji *y* Gouia, 2013; Borgognone *y col.*, 2014). En nuestro estudio hemos podido observar el efecto negativo del NH₄⁺ en el crecimiento en los tres genotipos estudiados. Por tanto, nuestros resultados estarían de acuerdo con lo observado por Borgognone *y col.* (2014) en plantas de tomate tratadas con diferentes combinaciones de NO₃⁻ y NH₄⁺, mostrando que plantas de tomate crecidas sólo con NH₄⁺ como única fuente de N, mostraban un menor crecimiento.

El mecanismo mediante el cual el NH_4^+ ejerce su efecto negativo en el crecimiento y desarrollo vegetal no está del todo claro. Se han propuesto diferentes hipótesis en base a los diferentes estudios realizados por diversos autores (Bittsanszky *y col.*, 2015), aunque las tres principales son: (1) Inducción de un ciclo fútil de NH_4^+ , (2) Un efecto negativo en el equilibrio iónico y (3) Un efecto negativo sobre el proceso fotosintético. Evidentemente, ninguno de ellos es excluyente de otro mecanismo y posiblemente el efecto final sea una combinación de todos ellos.

El efecto negativo de un ciclo fútil del NH_4^+ fue propuesto por Britto *y col.* (2001). Según este modelo, en especies sensibles a altas concentraciones de NH_4^+ (como en el caso de tomate) las raíces tienen una alta absorción de NH_4^+ que se acumula en el citoplasma. Las células radiculares, para evitar su toxicidad, inducen un mecanismo de eflujo de NH_4^+ el cual iría contra gradiente, necesitando un gran aporte energético. Según el estudio de estos autores, este eflujo activo puede llegar hasta un 80% del NH_4^+ absorbido, creando por tanto un ciclo fútil del NH_4^+ que va a consumir gran cantidad de energía. Sin embargo, en especies tolerantes a altos niveles de NH_4^+ , como es el caso del arroz, no se produce este ciclo fútil sino que las plantas utilizan estrategias alternativas que no consumen energía. Por tanto, este mecanismo podría

explicar al menos en parte la importante reducción de la biomasa vegetal a altas concentraciones de NH₄⁺. Como hemos dicho anteriormente, otro posible efecto es un desequilibro en el balance iónico inducido por altos niveles de NH₄⁺. Así, diferentes autores han observado que la presencia de altos niveles de NH₄⁺ induce una menor absorción de otros cationes como son el potasio, calcio y magnesio, creando por tanto ciertas deficiencias en estos iones que pueden afectar al crecimiento vegetal (Speer *y* Kaiser, 1994; Borgognone *y col.*, 2014). Nuestros resultados estarían en total concordancia con esta hipótesis, donde las plantas de tomate crecidas con NH₄⁺ como única fuente de N, mostraban un importante descenso en los valores de los iones calcio y magnesio, descenso que podría ser la principal causa de la reducción en el crecimiento vegetal.

Finalmente, el efecto negativo del NH_4^+ sobre la capacidad fotosintética de la planta estaría disminuyendo en última instancia la capacidad de la planta de generar NADPH y ATP, necesarios para el crecimiento y desarrollo vegetal. Borgognone *y col.* (2014) observaron que el tratamiento a largo plazo con altos niveles de NH_4^+ indujo una importante reducción de la fotosíntesis neta. Sin embargo, en nuestro estudio, ni en wt ni en *pro* no se observó una clara disminución de la fotosíntesis.

¿Qué ocurre cuando los niveles de nitrógeno, bien NO₃⁻ o NH₄⁺, son bajos? Es bien conocido que diferentes niveles de nitrógeno afectan al desarrollo y crecimiento de la planta (Borgognone y col., 2014). Cuando el suministro de N es bajo, se produce un importante ralentizamiento y descenso del crecimiento vegetal. Nuestros resultados mostraron que cuando los niveles de NO₃⁻ eran altos, tanto pro como wt mostraban una mayor VCR, mientras que, como cabía esperar, era menor en el mutante gib3. Sin embargo, con bajos niveles de NO₃, la VCR en los tres genotipos se igualaron con el tiempo. Con altos niveles de NH₄⁺, el resultado obtenido fue muy parecido que con altos niveles de NO_3^- . Sin embargo, cuando los niveles de NH_4^+ fueron bajos sólo la VCR de pro se igualó a la de gib3, mientras que en wt, la VCR fue siempre superior. Igualmente, el mutante pro crecido en bajos niveles de NH4⁺, mostró una drástica reducción de la biomasa total en comparación con wt y gib3. Además, la reducción de biomasa total fue de un 125% si la comparamos con pro crecida en bajos niveles de NO_3 , mientras que en wt y en *gib3* no varió significativamente. Estos resultados nos indican que el mutante *pro* presentaría una menor capacidad de utilizar el NH₄⁺ como fuente de N a bajas concentraciones en comparación con wt y el mutante gib3. Otra
posibilidad sería que el mutante *pro* pudiese acumular más NH_4^+ a nivel celular en los tejidos foliares, incrementando así su toxicidad. Al comparar el microarray de las hojas de wt con *pro* en condiciones control (ver tabla suplementaria S5, FDR0.1) se observó que el gen *AMT1;2*, implicado en el transporte de alta afinidad de NH_4^+ , se encontraba fuertemente inducido en el mutante *pro*. Aunque evidentemente nuestro microarray ha sido realizado en condiciones normales de NO_3^- y NH_4^+ , nos está indicando que en el mutante *pro* este gen podría estar sobre-inducido de forma constitutiva. Esto, estaría apoyado por los estudios de Zebarth *y col*. (2012), los cuales observaron en patata que bajos niveles de nitrógeno en el medio de cultivo inducia la expresión del gen *AMT1* a nivel foliar.

La presencia de altos niveles de NH4⁺ incremento la tolerancia al estrés salino, reduciendo la distribución de sodio en la parte aérea de forma diferencial según el genotipo.

Como hemos visto anteriormente el NH₄⁺ en altos niveles redujo el crecimiento vegetal de los diferentes genotipos. Sin embargo, cuando se aplicó el tratamiento salino el efecto negativo en el crecimiento y biomasa fue mucho menor en las plantas crecidas en NH₄⁺ que en aquellas crecidas en NO₃⁻, indistintamente del genotipo. Según Ghanem *y col.* (2011), cuando el N es suministrado en forma de NO₃⁻ solamente, la salinidad puede tener un mayor efecto negativo, ya que se puede producir un antagonismo entre la absorción del NO₃⁻ y el Cl⁻, produciendo por tanto deficiencias de N en la parte aérea. Sin embargo, diferentes autores han observado un incremento de la tolerancia al estrés salino conforme se aumentaba la concentración del NH₄⁺ respecto al NO₃⁻ (Flores *y col.*, 2001; Siddiqi *y col.*, 2002; Kant *y* Kafkafi, 2003). Así, Flores *y col.* (2001) observaron que en plantas de tomate crecidas en diferentes combinaciones de NO₃⁻ y NH₄⁺ y posteriormente salinizadas, el efecto de la salinidad se hizo más deletéreo conforme se aumentó la concentración del NH₄⁺ respecto al NO₃⁻.

Uno de los resultados más destacados fue el efecto del NH_4^+ en la distribución del sodio en la parte aérea en condiciones salinas en comparación con los diferentes tratamientos de NO_3^- o de NH_4^+ a baja concentración (Figuras 86, 87, 88). A nivel radicular no observamos diferencias significativas en los niveles de sodio de los diferentes genotipos. Sin embargo, en la parte aérea, tanto a nivel foliar como en el

tallo se observó una importante reducción de la concentración del sodio en las plantas crecidas en 2 mM de NH_4^+ al compararlo con los tratamientos con NO_3^- . Por otro lado, a nivel foliar, esta reducción fue mucho mayor en wt y *gib3*, siendo de un 250% y 200% respectivamente, mientras que en el mutante *pro* la reducción fue de aproximadamente un 65%, por tanto los niveles de sodio en el mutante *pro* fueron de aproximadamente el doble en comparación con wt y *gib3*.

Como vimos en el apartado anterior, el mayor efecto negativo en el crecimiento y biomasa se observó en el mutante *pro* crecido en 0.2 mM de NH_4^+ y en condiciones salinas. Estas plantas mostraron los mayores niveles de acumulación de sodio en la parte aérea (tallo y hoja). Esto podría explicar, al menos en parte, la mayor reducción de crecimiento en estas plantas.

Se ha propuesto que el NH_4^+ podría actuar de dos formas, bien inhibiendo la absorción de sodio por la competición iónica NH4⁺/Na⁺ y/o por una inhibición del transporte de sodio a la parte aérea, disminuvendo de esta forma su toxicidad (Sagi v col., 1997; Kant v col., 2007). Como hemos dicho anteriormente, las raíces no mostraron diferencias en los niveles de sodio, lo cual nos estaría indicando la no diferencia entre los genotipos en su capacidad de absorción de este ion. Sin embargo, dado que si se observaron diferencias en los niveles en la parte aérea, es posible que se esté produciendo un descenso del transporte de sodio de la raíz a la parte aérea, posiblemente por una inhibición mediada por el NH₄⁺. Esta hipótesis ha sido sugerida en otras especies como Lolium multiflorum y cebada (Sagi y col., 1997; Kant y col., 2007), donde los autores estudiaron diferentes combinaciones de NO_3^- y NH_4^+ , observando que el incremento en la concentración de NH₄⁺ redujo los niveles de sodio en la parte aérea. Recientemente, Ghanem v col. (2011) observaron en tomate, que al comparar diferentes ratios de NO_3^-/NH_4^+ , la presencia de NH_4^+ disminuía significativamente los niveles de sodio en la parte aérea durante los primeros 15 días de cultivo.

Una posible causa de la disminución del transporte de sodio a la parte aérea podría ser debida al papel que juegan los transportadores HKT en la tolerancia al estrés salino (Ren *y col.*, 2005). Así, en especies como el trigo y el arroz, al comparar diferentes variedades, aquellas más tolerantes al estrés salino mostraban un menor nivel de Na⁺ foliar y un mejor ratio Na⁺/K⁺, lo cual se correlaciono con una mayor

expresión de los genes *HKT1* (Ren *y col.*, 2005; Huang *y col.*, 2006). En estudios realizados en tomate, Asin *y col.* (2013) propusieron que estos transportadores HKT1 podrían estar descargando Na⁺ del xilema a las células parenquimáticas de la raíz, por tanto disminuyendo el transporte de Na⁺ a la parte aérea. Estos autores han descrito en tomate la presencia de dos isoformas de HKT1, HKT1;1 y HKT1;2 donde HKT1;2 tendría una mayor relevancia que HKT1;1 en el transporte de Na⁺ a la parte aérea en condiciones salinas. Por tanto, sería interesante estudiar en un futuro el posible papel de estos transportadores en los diferentes mutantes de giberelinas y ver si están regulados de forma directa por ellas. Así, nuestra hipótesis sería que en wt y el mutante *gib3*, el gen *HKT1;2* estaría regulado de forma positiva, mientras que en el mutante *pro* no estaría inducido o su inducción sería a un menor nivel.

3. La nutrición con NH₄⁺ induce un efecto inhibidor del PSII en todos los genotipos aunque fue mas intenso en el mutante *gib3*. La combinación de salinidad y alto NH₄⁺ indujo importantes daños en el PSII de *gib3*.

Como hemos mencionado anteriormente el NH_4^+ redujo de forma considerable el crecimiento y biomasa de los diferentes genotipos. Diversos autores han considerado que este efecto negativo puede deberse, al menos en parte, a un posible daño del PSII. Así, una de las primeras hipótesis (Magalhaes y Huber, 1989) propuso que la acumulación de NH_4^+ podía producir un desacoplamiento de la fotofosforilación, tal y como se observó en estudios realizados en cloroplastos aislados (Krause y col., 1982). Sin embargo, Gerendás y col. (1995) sólo observó un proceso de desacoplamiento de la fotosíntesis en hojas de maíz que fueron crecidas en altos niveles de NH_4^+ v bajo contenido en K⁺ (20 mM de NH_4^+ v 0.1 mM de K⁺). Recientemente, diferentes estudios realizados in vitro con tilacoides aislados han mostrado que el NH_4^+ tiene un efecto inhibidor del OEC (oxygen evolving center), inhibiendo así la producción de oxígeno. Se ha propuesto que el NH_4^+ , que es un posible análogo del agua, podría interaccionar con los grupos carboxilato acoplados en el clúster de Mn del PSII, actuando como un ligando directo o bien como mediador de la transferencia de protones, causando por tanto una inhibición de la producción de O₂ en el centro de reacción (Tsuno y col., 2011).

El análisis del rendimiento cuántico efectivo del PSII (Y(II)) en el proceso de adaptación a luz, mostró claramente que el NH_4^+ en alta concentración redujo de

forma significativa sus valores, siendo siempre menor en el mutante *gib3*. Igualmente, el análisis de Y(NPQ) y Y(NO) mostraron que el PSII podría estar sufriendo daños. Por otro lado, el análisis de las curvas de luz mostró igualmente que NH_4^+ produjo una importante reducción de ETR_{max} en todos los genotipos, aunque esta fue más marcada en wt y *gib3*. Este efecto nos mostró una inhibición del proceso de transferencia de electrones entre PSII y PSI, que en última instancia debería tener un fuerte efecto sobre la fotosíntesis neta. Desafortunadamente, no hemos podido validar este efecto dado que no fue posible medir la fotosíntesis en *gib3* debido al reducido tamaño de sus hojas.

El estrés salino, como cabía esperar incrementó de forma significativa los daños en el PSII en todos los genotipos, siendo más claros estos daños cuando la fuente de N utilizada era NH_4^+ . Con la fuente de NO_3^- a 2 mM, la respuesta fue muy parecida a lo observado en nuestro capitulo anterior. Sin embargo, la combinación de NH_4^+ y salinidad, tuvo un efecto más drástico sobre todo en el mutante *gib3*. Este mutante mostró una fuerte reducción de Y(II) y de ETR_{max} sugiriendo que la combinación de ambos estreses, alto NH_4^+ y salinidad, producen una fuerte inhibición de la conversión fotoquímica de energía del PSII en *gib3*.

En base a los resultados obtenidos no resulta posible explicar el mecanismo fisiológico por el cual el mutante *gib3* mostró un sistema fotosintético con una mayor sensibilidad al NH_4^+ y al estrés salino en comparación con wt y *pro*. Por tanto, sería interesante conocer en un futuro los mecanismos moleculares que hacen más sensible al mutante *gib3* crecido en NH_4^+ y en presencia de estrés salino.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- El estudio de los parámetros fisiológicos de crecimiento y desarrollo vegetal mostraron claramente que el mutante *pro* fue más sensible que wt y que el mutante *gib3*, a la aplicación del estrés salino. A pesar de que *gib3* mostró las menores alteraciones en estos parámetros, debido a su pequeño tamaño e inhibición de su crecimiento posiblemente causado por los bajos niveles de giberelinas que posee, no podemos concluir que sea más tolerante al estrés salino que el cultivar wt.
- 2. La aplicación del estrés salino indujo un mayor daño del sistema fotosintético en el mutante *pro* crecido en condiciones salinas. Esta conclusión se basa, en la fuerte inhibición que el mutante *pro* mostró en los valores de fotosíntesis neta y sus menores niveles de proteína RuBisCo, en comparación con wt. Igualmente, al analizar los parámetros de fluorescencia, el mutante *pro* demostró una mayor sensibilidad al estrés salino. El análisis transcriptómico también nos confirmó que el mutante *pro* tenía una importante inhibición de las proteínas que forman parte del complejo del fotosistema II. Sin embargo, vimos una fuerte inducción del gen *PTOX* que está implicado en el proceso de clororespiración. Decir que el mutante *gib3* no mostró ninguna alteración significativa en estos genes.
- 3. El estudio de la ultraestructura de wt, *gib3* y *pro* mostró que los efectos de la salinidad fueron muy parecidos entre wt y *gib3*, mostrando ambos una dilatación de los tilacoides en condiciones salinas, hecho que podría estar afectando a su capacidad fotosintética. Sin embargo, el mutante *pro* mostró una importante reducción del tamaño del cloroplasto que se vio acompañado de un menor número de tilacoides por grana y un importante incremento en el tamaño del plastoglóbulo. Sugerimos que este incremento del plastoglóbulo podría tener una posible función en reutilización de sus lípidos como fuente de energía.
- 4. El análisis y distribución de cationes Na⁺ y K⁺ mostró, que el mutante *pro* acumulaba en la parte aérea altos niveles de Na⁺ y bajos de K⁺, dando lugar a un mayor ratio Na⁺/K⁺. Al analizar el transcriptoma, a diferencia de wt y *gib3*,

pudimos observar en *pro* la inducción de un gen *SlSKOR*, el cual podría estar descargando K^+ al apoplasto y por tanto reduciendo los niveles celulares de K^+ .

- 5. El estudio de la localización subcelular de Na⁺ realizado en wt, *pro* y *gib3* mostró la posible formación de pequeñas vesículas que contenían Na⁺ y que podrían estar participando en su transporte desde el apoplasto a la vacuola, no observándose diferencias entre los tres genotipos. Este resultado se vería apoyado por los resultados obtenidos al cuantificar los niveles de sodio total en raíz, en los cuales tampoco se observaron diferencias significativas entre los diferencias en los mecanismos de acumulación de sodio a nivel radicular entre wt, *pro* y *gib3*.
- 6. Los niveles basales de las hormonas giberelinas detectados, fueron diferentes entre wt y los mutantes *pro* y *gib3*. Nuestro estudio ha demostrado que en el mutante *pro* se produjo una importante reducción en la concentración de las giberelinas bioactivas, posiblemente debido a la inducción, de forma constitutiva, de la vía de señalización de esta hormona. Por otro lado, a nivel radicular el mutante *gib3* mostró unos niveles casi nulos de giberelinas bioactivas. Sin embargo, a nivel foliar mientras que se obtuvieron unos niveles de GA₄ muy superiores a lo esperado, los valores de GA₁ no pudieron ser cuantificados. Este resultado necesitaría ser estudiado en mayor profundidad, ya que la mutación de *gib3* no ha sido clonada y podría ser que no fuera totalmente nula y permitiera cierta activación diferencial del gen.
- 7. En plantas wt, el estrés salino indujo niveles bajos de giberelinas bioactivas, en *pro* pudimos observar su acumulación, mientras que en el mutante *gib3* no se produjeron cambios significativos. Por tanto, nuestros resultados en wt darían lugar a una acumulación de la proteína SIDELLA, que promovería la reducción de tamaño y la posible activación de los mecanismos de tolerancia al estrés salino mediados por las proteínas DELLA.
- El análisis de expresión de genes en la síntesis y catabolismo de giberelinas nos mostró que el descenso de los niveles de giberelinas bioactivas en wt podría ser debido por un lado a la inducción del gen 20x3, en combinación con un descenso

en la síntesis mediada por las familias génicas 20oxs y 3oxs. El incremento observado en el mutante *pro* de los niveles de la hormona GA₄ podría deberse a un proceso de fuerte inhibición de todas las 2oxs, permitiendo por tanto un incremento neto de los niveles de GA₄.

- 9. El ácido salicílico fue la hormona que mostró una mayor respuesta al estrés salino, tanto en raíz como en hoja. El ácido salicílico se acumuló principalmente en hojas salinizadas del cultivar wt y *pro*. Sin embargo, pocas variaciones fueron observadas en el mutante *gib3*. Sugerimos que esta acumulación podría estar regulando la inducción de los sistemas antioxidantes, entre ellos la expresión de diferentes glutatión-S-transferasas y de los complejos enzimáticos del ciclo glutatión-ascorbato.
- 10. En base al estudio realizado del transcriptoma y en la expresión diferencial de las familias génicas de los factores de transcripción, junto con el análisis del metabolismo de las giberelinas y de las hormonas ácido salicílico y jasmónico, hemos propuesto un modelo de interacción de la proteína SIDELLA con el factor de transcripción SINAC1 que podría estar regulando la expresión de genes implicados en la tolerancia al estrés salino. Igualmente, en este modelo la expresión del gen *SINAC1* podría estar regulada por los factores de transcripción Dof3 y WRKY39. Proponemos que, al menos en parte, en el mutante *pro* este mecanismo podría encontrarse inhibido y por tanto podría ser una posible explicación a su mayor sensibilidad al estrés salino.
- 11. Entre las diferentes familias génicas analizadas en el microarray que mostraron una fuerte alteración se encontraban las proteínas de choque térmico. Destacar que en el mutante *pro* se produjo una fuerte inducción de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSPs) que se caracterizan por participar en la estabilización de otras proteínas en situaciones de estrés. Sin embargo, las chaperoninas tipo GroE (familia HSP60) se encontraban fuertemente inhibidas en este mutante. Estas chaperonas están localizadas en diferentes orgánulos celulares, entre ellos el cloroplasto, participando en el correcto plegamiento de otras proteínas. Por tanto, en el mutante *pro* esta disminución de chaperoninas, podría indicar una menor capacidad de protección del cloroplasto frente al estrés salino.

- 12. El crecimiento de las plantas con altos niveles de NH₄⁺ produjo una reducción importante de la biomasa total en condiciones control en los diferentes genotipos estudiados. Nuestros resultados muestran que la presencia de NH₄⁺ en el medio, reducía siempre de forma importante, los niveles de Mg²⁺ y Ca²⁺, creando una posible deficiencia de estos cationes. Por tanto, de forma general podemos concluir que la nutrición con NH₄⁺ como única fuente de nitrógeno resulto ser tóxica para todos los genotipos estudiados.
- 13. Cuando las plantas crecieron en niveles bajos de NH4⁺ como única fuente de N se indujo una fuerte reducción del crecimiento en el mutante *pro* en comparación con wt y *gib3*. Esto podría ser debido a una menor capacidad del mutante *pro* a utilizar el NH4⁺ como fuente de N a bajas concentraciones de nitrógeno total.
- 14. La presencia de diferentes combinaciones de fuente de N (NO₃⁻ y NH₄⁺) y salinidad (75 mM de NaCl) demostraron que la nutrición con NH₄⁺ favoreció el crecimiento vegetal en condiciones salinas, posiblemente debido a un reducción de los niveles de Na⁺ en la parte aérea. Esta reducción fue mucho menor en el mutante *pro*, por lo que permitió una mayor acumulación de Na⁺ en la parte aérea. Esta reducción de Na⁺ en la parte aérea. Esta reducción de Na⁺ en la parte aérea. Esta reducción de los niveles de sodio puede ser debida a una competición iónica NH₄⁺/Na⁺ y/o por una inhibición del transporte de Na⁺ a la parte aérea mediado por los transportadores HKT1.
- 15. La nutrición con NH₄⁺ produjo un efecto inhibidor del PSII en todos los genotipos aunque fue más intenso en el mutante *gib3*. La combinación de salinidad y altos niveles de NH₄⁺ indujo importantes daños en el PSII de *gib3*.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Achard, P. and 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. and Harberd, N. P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. Science 311: 91-94.
- Achard, P., Renou, J. P., Berthomé, R., Harberd, N. P., and Genschik, P. (2008). Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. Current Biology 18 656-660.
- Aghaei, K., Ehsanpour, A. A. and Komatsu, S. (2008). Proteome analysis of potato under salt stress. Journal of Proteome Research 7: 4858-4868.
- 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.
- Albacete, A., Ghanem, M. E., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Sánchez-Bravo,
 J., Martínez, V., Lutts, S., Dodd, I. C. and Pérez-Alfocea, F. (2008).
 Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. Journal of Experimental Botany 59: 4119-4131.
- Ali, Z., Park, H. C., Ali, A., Oh, D. H., Aman, R., Kropornicka, A., Hong, H., Choi, W., Chung, W. S., Kim, W. Y., Bressan, R. A., Bohnert, H. J., Lee, S. Y. and Yun, D. J. (2012). TsHKT1;2, a HKT1 homolog from the extremophile Arabidopsis relative *Thellungiella salsuginea*, shows K⁺ specificity in the presence of NaCl. Plant Physiology 158: 1463-1474.
- Amber, L. H., Tohru, A. and Camille, M. S. (2012). Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression. Plant Physiology 160: 83-92.
- Amjad, M., Akhtar, J., Anwar-ul-Haq, M., Ahmad, R. and Zaid, M. (2014). Characterization of comparative response of fifteen tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) genotypes to NaCl stress. Journal of Agricultural Science and Technology 16 (4): 851-862.

- An, F., Zhang, X., Zhu, Z., Ji, Y., He, W., Jiang, Z., Li, M. and Guo, H. (2012). Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated Arabidopsis seedlings. Cell Research 22: 915–927.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55: 373-399.
- Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A. and Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in Arabidopsis. Science 258: 1256-1258.
- Apse, M. P., Sottosanto, J. B. and Blumwald, E. (2003). Vacuolar cation/H+ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the Arabidopsis vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. Plant Journal 36: 229-239.
- Aragues, R., Playán, E., Ortiz, R. and Royo A. (1999). A new drip-injection irrigation system (DIS) for crop salt tolerance evaluation. Soil Science Society of America Journal.
- Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, T. A., Lawrenson, T., Sablowski, R. and Ostergaard L. (2010). Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. Genes and Development, 24: 2127–2132.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology 141: 391–396.
- Asch, F., Dingkuhn, M., Dorffling, K. and Miezan, K. (2000). Leaf K/Na ratio predicts salinity induced yield loss in irrigated rice. Euphytica 113: 109-118.
- Ashraf, M. (1999). Interactive effect of salt (NaCl) and nitrogen form on growth, water relations and photosynthetic capacity of sunflower (*Helianthus annum* L.). Annals of Applied Biology 135: 509-513.
- Ashraf, M. and Sultana, R. (2000). Combination effect of NaCl salinity and nitrogen form on mineral composition of sunflower plants. Biologia Plantarum 43 (4): 615-619.
- Asins, J. M., Villalta, I., Aly, M. M., Olias, R., Alvarez, M. P., Huertas, R., Li, J., Jaime-Perez, N., Haro, R., Raga, V., Carbonell, E. A. and Belver, A. (2012). Two closely linked tomato HKT coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in Na⁺/H⁺ homeostasis. Plant Cell and Environment 36: 1171–1191.

- Asins, M. J., Villalta, I., Aly, M. M., Olias, R., De Morales, P. A., Huertas, R., Li, J., Jaime-Perez, N., Haro, R., Raga, V., Carbonell, E. A. and Belver, A. (2013). Two closely linked tomato HKT coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in Na⁺/K⁺ homeostasis. Plant Cell and Environment. 36: 1171-1191.
- Aslam, M., Huffaker, R. C., Rains, D. W. (1984). Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. Plant Physiology 76 (2): 321-325.
- Austin II, J. R., Frost, E., Vidi, P-A., Kessler, F. and Staehelin, L. A. (2006). Plastoglobules Are Lipoprotein Subcompartments of the Chloroplast That Are Permanently Coupled to Thylakoid Membranes and Contain Biosynthetic Enzymes. The Plant Cell 18: 1693-1703.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Capítulo
 29: Fisiología de las plantas y el estrés (2nd ed.). Interamericana Mc Graw Hill.
 Madrid, España. 577-597.
- Bai, M. Y., Shang, J. X., Oh, E., Fan, M., Bai, Y., Zentella, R., Sun, T. P. and Wang, Z. Y. (2012). Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. Nat. Cell Biology 14: 810-817.
- Balazadeh, S., Siddiqui, H., Allu, A. D., Matallana-Ramirez, L. P., Caldana, C., Mehrnia, M., Zanor, M-I., Köhler, B. and Mueller-Roeber, B. (2010). Gene regulatory network controlled by NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. Plant Journal 62: 250-264.
- Balibrea1, M. E., Dell'Amico, J., Maríaa C. Bolarín, M. C. and Pérez-Alfocea, F. (2000). Carbon partitioning and sucrose metabolism in tomato plants growing under salinity. Physiologia Plantarum 110 (4): 503-511.
- Barhoumi, Z., Djebali, W., Chaibi, W., Abdelly, C. and Smaoui, A. (2007). Salt impact on photosynthesis and leaf ultrastructure of *Aeluropus littoralis*. Journal of Plant Research 120: 529-537.
- **Barrs, H. D. and Weatherley, P. E. (1962)**. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. Australian Journal of Biological Sciences 15: 413-428.

- Bartoli, C. G., Casalogue, C. A., Simontacchi, M., Marquez-Garcia, B. and Foyer C. H. (2013). Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. Environmental and Experimental Botany 94: 73-88.
- **Bassel, G. W., Mullen, R. T. and Bewley, J. D. (2008).** Procera is a putative DELLA mutant in tomato (Solanum lycopersicum): effects on the seed and vegetative plant. Journal of Experimental Botany 59: 585-593.
- **Bassil, E. and Blumwald, E. (2014).** The ins and outs of intracellular ion homeostasis: NHX-type cation/H⁺ transporters. Current Opinion in Plant Biology 22: 1-6.
- **Bassil, E., Coku, A. and Blumwald, E. (2012).** Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na⁺/H⁺ antiporters in plant growth and development. Journal of Experimental Botany 63: 5727-5740.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing, Journal of the Royal Statistical Society, Series B 57: 289-300.
- Bennoun, P. (1994). Chlororespiration revisited- mitochondrial-plastid interactions in Chlamydomonas. Biochimica and Biophysica Acta- Bioenergetics 1186: 59– 66.
- Bensen, R. J. and Zeevaart JAD. (1990). Comparison of ent-kaurene synthetase Aactivity and B-activity in cell-free-extracts from young tomato fruits of wildtype and gib-1, gib-2, and gib3 tomato plants. Journal of Plant Growth Regulation 9: 237-242.
- **Bernstein L. (1963).** Osmotic adjustment of plants to saline media II. Dynamic phase. American Journal of Botany 50: 360-370.
- Berthomieu, P., Conejero, G., Nublat, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Cellier, F., Gosti, F., Simonneau, T., Essa, P. A., Tester, M., Very, A. A., Sentenac, H. and Casse, F. (2003). Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na+ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. EMBO Journal 22: 2004 2014.
- **Bhattachrjee, S. (2005).** Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plant. Current Science 89: 1113-1121.

- Bittsanszky, A., Pilinszky, K., Gyulai, G. and Komives, T. (2015). Overcoming ammonium toxicity. Plant Science 231: 184-190.
- Bloom, A. J. (2015). The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources. Current Opinion in Plant Biology 25: 10-16.
- Bloom, A. J., Sukrapanna, S. S. and Warner, R. L. (1992). Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by Barley. Plant Physiology 99: 1294-1301.
- Boot, R. G. A, Schildwacht, P. M. and Lambers, H. (1992). Partitioning of nitrogen and biomass at a range of N-addition rates and their consequences for growth and gas exchange in two perennial grasses from inland dunes. Physiologia. Plantarum 86: 152-160.
- Borgognone, D., Colla, G., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Rea, E. and Schwarz, D. (2014). Effect of nitrogen form and nutrient solution pH on growth and mineral composition of self-grafted and grafted tomatoes. Scientia Horticulturae 149: 61-69.
- Botella, M. A., Martinez, V., Nieves, M. and Cerda, A. (1997). Effect of salinity on the growth and nitrogen uptake by wheat seedlings. Journal of Plant Nutrition 20: 793-804.
- Boudsocq, S., Niboyet, A., Lata, J. C., Raynaud, X., Loeuille, N., Mathieu, J., Blouin, M., Abbadie, L. and Barot, S. (2012). Plant preference for ammonium versus nitrate: A neglected determinant of ecosystem functioning? American Naturalist 180: 60-69.
- **Bourgeais-Chaillou, P. Perez-Alfocea, F. and Guerrier, G. (1992).** Comparative effects of N-sources on growth and physiological responses of soybean exposed to NaCl-stress. Journal of Experimental Botany 43: 1225–1233.
- 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.
- Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, G. A. and Masmoudi, K. (2007). Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter TNHX1 and H⁺- pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. Journal of Experimental Botany 58: 301-308.
- **Britto, D. T. and Kronzucker, H. J. (2002).** NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. Journal of Plant Physiology 159: 567-584.

- Britto, D. T. and Kronzucker, H. J. (2013). Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. Annals of Botany 112: 957-963.
- Britto, D. T., Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M. and Kronzucker, H. J. (2001). Futile transmembrane NH₄⁺ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 98(7): 4255-4258.
- Brouwer, R. (1963). Some aspects of the equilibrium between overground and underground parts. Jaarb. I.B.S. Wageningen 1963, pp. 31-39.
- **Brugnoli, E. and Björkman, O. (1992).** Growth of cotton under continuous salinity stress: Influence on allocation pattern, stomatal and non-stomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. Planta 187: 335-347.
- Cadahía, C. (1968). El análisis de la savia como índice de la influencia de los Cl⁻ en la nutrición de las tomateras. II Coloquio Europeo y Mediterráneo sobre el control de la fertilización de las plantas cultivadas. Sevilla: 717-732.
- **Carden, D. E., Walker, D. J., Flowers, T. J. and Miller, A. J. (2003).** Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance. Plant Physiology 131: 676-683.
- Carillo, P., Annunziata, M. G., Pontecorvo, G., Fuggi, A. and Woodrow, P.
 (2011). Salinity stress and salt tolerance. En Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations. In Tech. Editado por Shanker, A. 21-38.
- Carrera, J., Fernandez del Carmen, A., Fernandez-Muñoz, R., Rambla, J. L., Pons, C., Jaramillo, A., Elena, S. F. and Granell, T. (2012). Fine-tuning tomato agronomic properties by computational genome redesign. PLoS Computational Biology 8 (6): e1002528.
- Caruso, G., Cavaliere, C., Guarino, C., Gubbiotti, R., Foglia, P. and Lagana, A. (2008). Identification of changes in Triticum durum L. leaf proteome in response to salt stress by two.dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. Analytical and Bionalytical Chemistry 391: 381-390.
- Carvalho, R. F., Campos, M. L., Pino, L. E., Crestana, S. L., Zsögön, A., Lima, J.
 E., Benedito, V. A. and Peres, L. E. (2011). Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. Plant Methods 29: 7(1): 18.

- Castrillo, G., Turck, F., Leveugle, M., Lecharny, A., Carbonero, P., Coupland, G., Paz-Ares, J. and Oñate-Sánchez, L. (2011). Speeding cis-trans regulation discovery by phylogenomic analyses coupled with screenings of an arrayed library of Arabidopsis transcription factors. PLoS ONE 6 (6).
- Castro, P. H., Tavares, R. M., Bejarano, E. R., and Azevedo, H. (2012). SUMO, a heavyweight player in plant abiotic stress responses. Cellular and Molecular Life Sciences 69: 3269-3283.
- **Centritto, M., Loreto, F. and Chartzoulakis, K. (2003).** The use of low [CO₂] to estimate diffusional and non-diffusional limitations of photosynthetic capacity of salt-stressed olive saplings. Plant, Cell and Environment 26: 585-594.
- Chanroj, S., Wang, G., Venema, K., Zhang, M. W., Delwiche, C. F. and Sze, H. (2012). Conserved and diversified gene families of monovalent cation/H⁺ antiporters from algae to flowering plants. Frontiers in Plant Science 3: 1-18.
- Chaves, M. M., Flexas, J., and Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Annals of Botany 103: 551-556.
- Chen, J. H., Jiang, H. W., Hsieh, E. J., Chen, H. Y., Chien, C. T., Hsieh, H. L. and Lin, T. P. (2012). Drought and salt stress tolerance of an Arabidopsis glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. Plant Physiology 158: 340-351.
- Chen, J., Cheng, T., Wang, P., Liu, W., Xiao, J., Yang, Y., Hu, X., Jiang, Z., Zhang, S. and Shi, J. (2012). Salinity-induced changes in protein expression in the halophytic plant *Nitraria sphaerocarpa*. Journal of Proteomics 75: 5226-5243.
- Chen, Z. H. and Chen, Z. X. (2000). Isolation and characterization of two pathogenand salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. Plant Molecular Biology 42: 387-396.
- Chen, Z., Silva, H. and Klessig, D. F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science 262: 1883-1886.
- Colebrook, E. H., Thomas, S. G., Phillips, A. L. and Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. Journal of Experimental Botany 217: 67-75.

- Conrath, U., Chen, Z., Ricigliano, J. R. and Klessig, D. F. (1995). Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloisonicotinec acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in obacco. PNAS USA 92: 7143-7147.
- Conti, L., Nelis, S., Zhang, C., Woodcock, A., Swarup, R., Galbiati, M., Tonelli, C., Napier, R., Hedden, P., Bennett, M. and Sadanandom, A. (2014). Small Ubiquitin-like Modifier Protein SUMO Enables Plants to Control Growth Independently of the Phytohormone Gibberellin. Developmental Cell 28 (1): 102-110.
- Conti, L., Price, G., O'Donnell, E., Schwessinger, B., Dominy, P., and Sadanandom, A. (2008). Small ubiquitin-like modifier proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and -2 regulate salt stress responses in Arabidopsis. Plant Cell 20: 2894-2908.
- Corrales, A-R., Nebauer, S. G., Carrillo, L., Fernández-Nohales, P., Marqués, J., Renau-Morata, B. et al. (2014). Characterization of tomato Cycling Dof Factors reveals conserved and new functions in the control of flowering time and abiotic stress responses. Journal of Experimental Botany 65 (4): 995-1012.
- Cramer, M. D. and Lyps, L. H. (1995). Enriched rhizosphere CO₂ concentration can ameliorate the influence of salinity on hydroponically grown tomato plants. Physiologia Plantarum 94: 425-432.
- Csiszar, J., Horvath, E., Vary, Z., Galle, A., Bela, K. and Brunner, S. (2014). Glutathione transferase supergene family in tomato: Salt stress-regulated expression of representative genes from distinct GST classes in plants primed with salicylic acid. Plant Physiology and Biochemistry 78: 15-26.
- Cuartero, J., and Fernandez-Munoz, R. (1999). Tomato and salinity. Scientia Horticulturae 78: 83-125.
- DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Nemann, D. S., Finazzi, G., Joliot, P., Barbato, R. and Leister, D. (2008). A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in Arabidopsis. Cell132: 273-285.
- Davenport, R. J., Munoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P. A., Rus, A. and Tester, M.
 (2007). The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in Arabidopsis. Plant Cell and Environment 30: 497-507.

- Davière, J. M., Wild, M., Regnault, T., Baumberger, N., Eister, H., Genschik, P. and Achard, P. (2014). Class I TCP-DELLA interactions in inflorescence shoot apex determine plant height. Current Biology 24: 1923-1928.
- **De Gara, L., De Pinto, M. C. and Tommasi, F. (2003).** The antioxidant systems visà-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. Plant Physiology and Biochemistry 41: 863-870.
- De Lucas, M., Daviere, J. M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M. A., Titarenko, E. and Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. Nature 451: 480-484.
- **Deak, K. I. and Malamy, J. (2005).** Osmotic regulation of root system architecture. Plant Journal 43: 17-28.
- Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G. and Schroeder J. I. (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. Trends in Plant Science 19: 371-379.
- Del Río, L. A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M. and Barroso, J. B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. Plant Physiology 141: 330-335.
- Delauney, A. J. and Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The Plant Journal 4: 215-223.
- **Delfine, S., Alvino, A., Villani, M. C. and Loreto, F. (1999).** Restrictions to carbon dioxide conductance and photosynthesis in spinach leaves recovering from salt stress. Plant Physiology 119: 1101-1106.
- **Delfine, S., Alvino, A., Zacchini, M. and Loreto, F. (1998).** Consequences of salt stress on conductance to CO2 diffusion, Rubisco characteristics and anatomy of spinach leaves. Australian Journal of Plant Physiology 25: 395-402.
- Demidchik, V., Cuin, T. A., Svistunenko, D., Smith S. J., Miller, A. J., Shabala, S., Sokolik, A. and Yurin, V. (2010). Arabidopsis root K⁺-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.

- **Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S. S., Pozhvanov, G. A., Sokolik, A. and Yurin, V. (2014).** Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. Journal of Experimental Botany 65: 1259-1270.
- Dempsey, D. A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C. and Klessig, D. F. (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. Arabidopsis Book 9:e0156.
- **Desnos, T. (2008).** Root branching responses to phosphate and nitrate. Current Opinion in Plant Biology 11: 82-87.
- Doane, T. A. and Horwath, W. R. (2003). Spectrophotometric determination of nitrate with a single reagent. Analytical Letters 36: 2713–22.
- Duan, Y., Jiang, Y. Z., Ye, S. L., Karim, A., Ling, Z. Y., He, Y. Q., Yang, S. Q. and Luo, K. M. (2015). PtrWRKY73, a salicylic acid-inducible poplar WRKY transcription factor, is involved in disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports 34: 831-841.
- Durner, J. and Klessig, D. F. (1995). Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. PNAS USA 92: 11312-11316.
- Ehleringer, J. R., Hall, A. E. and Farquhar, G. D. (1993). Stable isotopes and plant carbon–water relations. New York: Academic Press.
- Ehlting, B., Dluzniewska, P., Dietrich, H., Selle, A., Teuber, M., Haensch, R., Nehls, U., Polle, A., Schnitzler, J. P., Rennenberg, H. and Gessler, A. (2007). Interaction of nitrogen nutrition and salinity in Grey poplar (*Populus tremula* x *alba*). Plant Cell and Environment. 30: 796-811.
- **Epstein, E. and Bloom, A. J. (2005).** Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives 2ed edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Everard, J. D., Gucci, R., Kann, S. C., Flore, J. A. and Loescher, W. H. (1994). Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. Plant Physiology 106: 281-292.
- Fairbairn, D. J., Liu, W. H., Schachtman, D. P., Gomez-Gallego, S., Day, S. R. and Teasdale, R. D. (2000). Characterisation of two distinct HKT1-like potassium transporters from Eucalyptus camaldulensis. Plant Molecular Biology 43: 515-525.

- FAOSTAT (2009). High Level Expert Forum-How to Feed the World in 2050, Economic and Social Development, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- **FAOSTAT (2010).** Statistics division of the food and agricultura organization of the United Nations. <u>http://faostat.fao.org/</u>.
- **FAOSTAT (2013).** Statistics division of the food and agricultura organization of the United Nations. <u>http://faostat.fao.org/</u>.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J. M., Kircher, S., et al. (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. Nature 451: 475-479.
- Fernández-García, N., Olmos, E., Bardisi, E., García-De la Garma. J., López-Berenguer, C and Rubio-Asensio, J. S. (2014). Intrinsic water use efficiency controls the adaptation to high salinity in a semi-arid adapted plant, henna (*Lawsonia inermis* L.). Journal of Plant Physiology 171: 64-75.
- Fidalgo, F., Santos, A., Santos, I. and Salema, R. (2004). Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. Annals of Applied Biology 145: 185-192.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G. and Sharkey, T. D. (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. Plant Biology 6: 269-279.
- Flexas, J., Diaz-Espejo, A., Galme's, J., Kaldenhoff, R., Medrano, H. and Ribas-Carbo, M. (2007). Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. Plant Cell and Environment 30: 1284-1298.
- Flores, A., Galvez, V., Hernandez, O., Lopez, G., Obregon, A., Orellana, R., Otero, L. y Valdez, M. (1996). Salinidad un nuevo concepto. Edit Colima, México; 137 pp.
- Flores, P., Carvajal, M., Cerda, A. and Martinez, V. (2001). Salinity and ammonium/nitrate interactions on tomato plant development, nutrition, and metabolites. Journal of Plant Nutrition. 24: 1561-1573.
- Flowers, T. (2006). Preface. Journal of Experimental Botany 57, p. iv.
- Flowers, T. J. (2004). Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany 55 (396): 307-319.

- Foyer, C. H. and Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. Physiologia Plantarum 119: 355-364.
- Foyer, C. H. and 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. and Noctor, G. (2009).** Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. Antioxid Redox Signal 11: 861–905.
- Foyer, C. H. and Noctor, G. (2012). Managing the cellular redox hub in photosynthetic organisms. Plant Cell and Environment. 35: 199-201.
- Fragkostefanakis, S., Simm, S., Paul, P., Bublak, D., Scharf, K. D. and Schleiff, E. (2015). Chaperone network composition in Solanum lycopersicum explored by transcriptome profiling and microarray meta-analysis. Plant Cell and Environment 38: 693-709.
- Frechilla, S., Lasa, B., Ibarretxe, L., Lamsfus, C. and Aparicio-Tejo, P. (2001). Pea responses to saline stress is affected by the source of nitrogen nutrition (ammonium or nitrate). Plant Growth Regulation 35 (2): 171-179.
- Fricke, W., Akhiyarova, G., Wei, W., Alexandersson, E., Miller, A., Kjellbom, P.
 O., Richardson, A., Wojciechowski, T., Schreiber, L., Veselov, D.,
 Kudoyarova, G. and Volkov, V. (2006). The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. Journal of Experimental Botany 57: 1079-1095.
- Fridovich, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. Archives of Biochemistry and Biophysics 247: 1-11.
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E. G., Marín, J. A., Prat, S., Blázquez, M. A. and Alabadí, D. (2010). Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in Arabidopsis. Molecular Biology and Evolution 27: 1247-1256.
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E., G., Grau Enguix, Abbas, M., Locascio, A., Thomas, S. G. Alabadí, D. and Blázquez, M. A. (2012). Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in Arabidopsis. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA 109: 13446-13451.

- Galvez, F. J., Baghour, M., Hao, G., Cagnac, O., Rodriguez-Rosales, M. P. and Venema, K. (2012). Expression of LeNHX isoforms in response to salt stress in salt sensitive and salt tolerant tomato species. Plant Physiology and Biochemistry 51: 109-115.
- Gao, H. J., Yang, H. Y., Bai, J. P., Liang, X. Y., Lou, Y., Zhang, J. L., Wang, D.,
 Zhang, J. L., Niu, S. Q. and Chen, Y. L. (2015). Ultrastructural and physiological responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets to gradient saline stress. Frontiers in Plant Science 5: 787.
- García-Garma, J., Fernández-García, N., Bardisi, E., Pallol, B., Asensio-Rubio, J. S., Bru, R. and Olmos, E. (2015). New insights into plant salt acclimation: the roles of vesicle trafficking and reactive oxygen species signalling in mitochondria and the endomembrane system. New Phytologist 205: 216-239.
- Garnett, T., Conn, V. and Kaiser, B. N. (2009). Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. Plant Cell and Environment 32: 1272-1283.
- Gaxiola, R., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L. and Fink, G. R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98: 11444-11449.
- Gaxiola, R., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S. L. and Fink, G. R. (1999). The Arabidopsis thaliana proton transporters, AtNHX1 and AVP1, can function in cation detoxification in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 96: 1480-1485.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J-B. and Sentenac, H. (1998). Identification and disruption of a plant Shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. Cell 94: 647–655.
- Genty, B., Briantais, J. M. and Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochimica et Biophysica Acta 990: 87–92.
- Gerendás J., Zhu Z., Bendixen R., Ratcliffe R.G. and Sattelmacher B. (1997). Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. Z Pflanzenernaehr Bodenkd 160: 239–251.

- Gerendás, J., Ratcliffe, R. G. and Sattelmacher, B. (1995). The influence of nitrogen and potassium supply on the ammonium content of maize (*Zea-mays* L.) leaves including a comparison of measurements made *in-vivo* and *in-vitro*. Plant and Soil. 173: 11-20.
- Ghanem, M. E., Martinez-Andujar, C., Albacete, A., Pospisilova, H., Dodd, I. C., Perez-Alfocea, F. and Lutts, S. (2011). Nitrogen form alters hormonal balance in salt-treated tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Journal of Plant Growth Regulation. 30: 144-157.
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H. and Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. Frontiers in Plant Science 5: 151.
- Gomez, I., Pedreno, J. N., Moral, R., Iborra, M. R., Palacios, G. and Mataix, J. (1996). Salinity and nitrogen fertilization affecting the macronutrient content and yield of sweet pepper plants. Journal of Plant Nutrition 19: 353-359.
- Good, A. G., Shrawat, A. K. and Muench, D. G. (2004). Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? Trends in Plant Science 9: 597-605.
- Greenway, H. and Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. Annual Review of Plant Physioly 31:149-190.
- Halfter, U., Ishitani, M. and 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 Academy of Sciences of the USA 97: 3735-3740.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, Plant Physiology 141: 312-322.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2001). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. Oxford, UK. 936 pp.
- 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., HaraNishimura, I., Maeshima, M., Fukaki, H. and Mimura, T. (2009). Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in Arabidopsis.
 Plant and Cell Physiology 50: 2023-2033.

- Hamilton, E. W. III and Heckathorn, S. A. (2001). Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by antioxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. Plant Physiology 126: 1266-1274.
- Harbaugh, B. K. and J. W. Scott. (1999). 'Florida Pink' and 'Florida Light Blue' Semi-dwarf heat-tolerant cultivars of lisianthus. HortScience 34: 364-365.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. and Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 51: 463-499.
- He, L., Su, C., Wang, Y. and Wei, Z. (2015). ATDOF5.8 is the up-stream regulator of ANAC069. Biochemie; doi:10.1016/j.biochi.2014.12.017.
- Hedden, P. (2012). Gibberellin biosynthesis. En eLS John Wiley and Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0023720.
- Hedden, P. and Phillips, A. L. (2000). Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. Trends in Plant Science 5: 523–530.
- Hedden, P. and Thomas, S. G. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. Biochemical Journal 444: 11-25.
- Helal, H. M. and Mengel, K. (1979). Nitrogen metabolism of young barley plants as affected by NaCl-salinity and potassium. Plant and Soil 51: 457–62.
- Hemmingsen, S. M., Woolford, C., Vandervies, S. M., Tilly, K., Dennis, D. T., Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W. and Ellis, R. J. (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. Nature 333: 330-334.
- Heo, J-O., Chang, K. S., Kim, I. A., Lee, M-H., Lee, S. A., Song, S-K., Lee, M. M. and Lim, J. (2011). Funneling of gibberellin signaling by the GRAS transcription regulator scarecrow-like 3 in the Arabidopsis root. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 108: 2166-2171.
- Hermans, C., Hammond, J. P., White, P. J. and Verbruggen, N. (2006). How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? Trends in Plant Science 11: 610-617.
- Hermle, S., Vollenweider, P., Günthardt-Goerg, M. S., McQuattie, C. J., and Matyssek, R. (2007).Leaf responsiveness of Populus tremula and Salix viminalis to soil contaminated with heavy metals and acidic rainwater. Tree Physiology 27: 1517–1531.

- Hernandez, A., Jiang, X. Y., Cubero, B., Nieto, P. M., Bressan, R. A., Hasegawa,
 P. M. and Pardo, J. M. (2009). Mutants of the *Arabidopsis thaliana* cation/H+ antiporter AtNHX1 conferring increased salt tolerance in yeast. The endosome/prevacuolar compartment is a target for salt toxicity. Journal of Biological Chemistry 284:14276-14285.
- Hernandez, J. A., Olmos, E., Corpas, F. J., Sevilla, F. and del Rio, L. A. (1995) Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. Plant Science 105: 151-167.
- Hernández, M., Fernández-García, N., Díaz-Vivancos, P. and 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.
- Hiatt, A. J. and Evans, H. J. (1960). Influence of salts on activity of malic dehydrogenase from spinach leaves. Plant Physiology 35(5): 673-677.
- Hiorns, W. D., Hastings, R. C., Head, I. M., McCarthy, A. J., Saunders, J. R., Pickup, R. W. and Hall, G. H. (1995). Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrosospiras in the environment. Microbiology 141: 2793-2800.
- Hopkins, M., McNamara, L., Taylor, C., Wang T. W. and Thompson, J. (2007).Membrane dynamics and regulation of subcellular changes during senescence.Edited by: Susheng Gan. In: Senescence Processes in Plants.
- Horie, T. y Schroeder, J. I. (2004). Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. Plant Physiology. 136: 2457-2462.
- Horie, T., Hauserand, F. and Schroeder, J. I. (2009). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. Trends in Plant Science 14: 660-668.
- Hou, X., Lee, L. Y., Xia, K., Yan, Y. and Yu, H. (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. Developmental Cell 19: 884–894.
- Hu, L., Xiang, L., Zhang, L., Zhou, X., Zou, Z. and Hu, X. (2014). The photoprotective role of spermidine in tomato seedlings under salinityalkalinity stress. PlosOne 9(10): e110855.

- Hu, T. Z., Cao, K.-M., Xia, M. and Wang, X. P. (2006). Functional characterization of a putative nitrate transporter gene promoter from rice. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 38: 795–802.
- Huang, D., Wang, S., Zhang, B., Shang-Guan, K., Shi, Y., Zhang, D., Liu, X., Wu, K., Xu, Z., Fu, X. and Zhou, Y. (2015a). A gibberellin-mediated DELLA-NAC signaling cascade regulates cellulose synthesis in rice. The Plant Cell 27: 1681-1696.
- Huang, Q., Wang, Y., Li, B., Chang, J., Chen, M., Li, K., Yang, G. and He, G. (2015b). TaNAC29, a NAC transcription factor from wheat, enhances salt and drought tolerance in transgenic Arabidopsis. BMC Plant Biology. 15: 268.
- Huang, S. B., Spielmeyer, W., Lagudah, E. S., James, R. A., Platten, J. D., Dennis, E. S. and Munns, R. (2006). A sodium transporter (HKT7) is a candidate for Nax1, a gene for salt tolerance in durum wheat. Plant Physiology 142: 1718-1727.
- Huang, W., Miao, M., Kud, J., Niu, X., Ouyang, B., Zhang, J., Ye, Z., Kuhl, J. C., Liu, Y. and Xiao, F. (2013). SINAC1, a stress-related transcription factor, is fine-tuned on both the transcriptional and the post-translational level. New Phytologist 197: 1214–1224.
- Huertas, R., Olias, R., Eljakaoui, Z., Galvez, F. J., Li, J., De Morales, P. A., Belver, A. and Rodriguez-Rosales, M. P. (2012). Overexpression of SISOS2 (SICIPK24) confers salt tolerance to transgenic tomato. Plant Cell and Environment 35: 1467-1482.
- Huppe, H. C. and Turpin, D. H. (1994). Integration of carbon and nitrogenmetabolism in plant and algal cells. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 45: 577-607.
- Imlay, J. A. and Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. Science 240: 1302-1309.
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sato, Y., Ashikari, M. and Matsuoka, M. (2002). The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. Plant Cell 14: 57-70.
- Jackson, L. E., Burger, M. and Cavagnaro, T. R. (2008). Roots nitrogen transformations, and ecosystem services. Annual Review of Plant Biology 59: 341-363.

- James, R. A., Rivelli, A. R., Munns, R. and Von Caemmerer, S. (2002). Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. Functional Plant Biology 29: 1393-403.
- Jayakannan, M., Bose, J., Babourina, O., Rengel, Z. and Shabala, S. (2015). Salicylic acid in plant salinity stress signaling and tolerance. Plant Growth Regulators 76: 25-40.
- Jeong, J. S., Kim, Y. S., Baek, K. H., Jung, H., Ha, S. H., Do-Choi, Y., Kim, M., Reuzeau, C. and Kim, J. K. (2010). Root-specific expression of *OsNAC10* improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. Plant Physiollogy 153: 185-197.
- Jha, D., Shirley, N., Tester, M. and Roy, S. J. (2010). Variation in salinity tolerance and shoot sodium accumulation in Arabidopsis ecotypes linked to differences in the natural expression levels of transporters involved in sodium transport. Plant Cell and Environment 33: 793 –804.
- Joliot, P. and Johnson, G. N. (2001). Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants. PNAS USA 108: 13317-13322.
- Jones, M. G. (1987). Gibberellins and the procera mutant of tomato. Planta 172: 280-284.
- Jordan, E. T., Hatfield, P. M., Hondred, D., Talon, M., Zeevaart, A. D. and 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.
- Josse, E. M., Gan, Y., Bou-Torrent, J., Stewart, K. L., Gilday, A. D., Jeffree, C.
 E., Vaistij, F. E., Martínez-García, J. F., Nagy, F., Graham, I. A. et al.
 (2011). A DELLA in disguise: SPATULA restrains the growth of the developing Arabidopsis seedling. Plant Cell 23: 1337-1351.
- Juan, M., Rosa, M., Rivero, L. R. and Juan, M. R. (2005). Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. Environmental and Experimental Botany 54:193-201.
- Kafkafi, U., Siddiqi, M. Y., Ritchie, R. J., Glass, A. D. M. and Ruth, T. J. (1992). Reduction of nitrate (¹³NO₃) influx and nitrogen (¹³N) translocation by tomato and melon varieties after short exposure to calcium and potassium chloride salts. Journal of Plant Nutrition 15 (6 & 7): 959-975.

- Kafkafi, U., Valoras, N. and Letey, J. (1982). Chloride interaction with nitrate and phosphate nutrition in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Journal of Plant Nutrition 5: 1369-1385.
- Kamiya, Y. and García-Martínez, J. (1999). Regulation of gibberellin biosynthesis by light. Curr. Opin. Plant Biololy 2: 398-403.
- Kant S. and Kafkafi U. (2003). Ammonium and nitrate as a nitrogen source for plants. Advances in Plant Physiology 5: 463-478.
- **Kant S., Kant P., Lips H. and Barak S. (2007).** Partial substitution of NO₃⁻by NH₄⁺ fertilization increases ammonium assimilating enzyme activities and reduces the deleterious effects of salinity on the growth of barley. Journal of Plant Physiology 164:303–311.
- Keskitalo, J., Bergquist, P., Gardestrom, P. and Jansson, S. (2005). A cellular timetable of autumn senescence. Plant Physiology 139: 1635–1648.
- Khan, N., Syeed, S., Masood, A., Nazar, R. and Iqbal, N. (2010). Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. International Journal of Plant Biology 1:e1.
- Kiba, T., Kudo, T., Kojima, M. and Sakakibara, H. (2011). Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. Journal of Experimental Botany 62:1399-1409.
- Kim, C., Meskauskiene, R., Apel, K., and Laloi, C. (2008). No single way to understand singlet oxygen signaling in plants. EMBO Reports 9: 435-439.
- Kim, D. W., Rakwal, R., Agrawal, G. K., Jung, Y. H., Shibato, J., Jwa, N. S., Iwahashi, Y., Iwahashi H., Kim, D. H., Shim, I. S. and Usui, K. (2005). A hydroponic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf. Electrophoresis 26: 4521-4539.
- Klughammer C. and Schreider U. (2008). Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the saturation pulse method. PAM Application Notes 1: 27-35.
- Kobayashi, M., MacMillan, J., Phinney, B., Gaskin, P., Spray, C. R. and Hedden,
 P. (2000). Gibberellin biosynthesis: metabolic evidence for three steps in the early 13-hydroxylation pathway of rice. Phytochemistry 55: 317-321.

- Koornneef, M. and 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.
- Koornneef, M., Bosma, T. D. G., Hanhart, C. J., Vanderveen, J. H. and Zeevaart,J. A. D. (1990). The isolation and characterization of gibberellin-deficient mutants in tomato. Theoretical and Applied Genetics 80:852-857.
- Kramer, D. M., Johnson, G., Kiirats, O. and Edwards, G. E. (2004). New fluorescence parameters for the determination of Q(A) redox state and excitation energy fluxes. Photosynthesis Research 79: 209–18.
- Krause, G. H., Vernotte, C. and Briantais, J. M. (1982). Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae – Resolution into 2 components. Biochimica et Biophysica Acta. 679: 116-124.
- Krebs, M., Beyhl, D., Gorlich, E., Al-Rasheid, K. A. S., Marten, I., Stierhof, Y. D., Hedrich, R. and Schumacher, K. (2010). Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 107: 3251-3256.
- Kumar, S., Asif, M. H., Chakrabarty, D., Trpathi, R. D., Dubey, R. S. and Trivedi, P. K. (2013). Differential expression of rice lambda class GST gene family members during plant growth, development, and in response to stress conditins. Plant Molecular Biology Reports 31: 569-580.
- Kuntz, M. (2004). Plastid terminal oxidase and its biological significance. Planta 218: 896-899.
- Langdale, G. W., Thomas, J. R. and Littleton, T. G. (1973). Nitrogen metabolism on stargrass as affected by nitrogen and soil salinity. Agronomy Journal 65: 468–70.
- Lange, T. (1998). Molecular biology of gibberellin synthesis. Planta 204: 409–419.
- Lauchli, A. and Grattan, S. R. (2007). Plant growth and development under salinity stress.
- Lauter, F. R., Ninnemann, O., Bucher, M., Riesmeier, J. and Frommer, W. B. (1996). Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93: 8139-8144.

- Lawlor, D. W. and Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. Plant Cell and Environment 25: 275-294.
- 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. and Pardo, J. M. (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. The Plant Journal 61: 495-506.
- Leigh, R. A. (2001). Potassium homeostasis and membrane transport. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 164: 193-198.
- Leopold, A. C. and Kriedemann, P. E. (1975). Plant growth and development. McGraw-Hill Inc., New York.
- Levitt, J. (1972). Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, New York, xiv, 698 pp.
- Levitt, J. (1980). Responses of plant to environmental stresses. Vol. I. Academic Press, New York.
- Lewis, O. A. M., Leidi, E. O. and Lips, S. H. (1989). Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maize and wheat. New Phytologist 111: 155–160.
- Li, Q. F., Wang, C., Jiang, L., Li, S., Sun, S. S. and He, J. X. (2012). An interaction between BZR1 and DELLAs mediates direct signaling crosstalk between brassinosteroids and gibberellins in Arabidopsis. Science Signaling 5: ra72.
- 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.
- Lima, J. E., Kojima, S., Takahashi, H. and Von Wirén, N. (2010). Ammonium Triggers Lateral Root Branching in Arabidopsis in an AMMONIUM TRANSPORTER1; 3-Dependent Manner. The Plant Cell 22: 3621-3633.
- Lindemose, S., O'Shea, C., Jensen, M. K. and Skriver, K. (2013). Structure, function and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses. International Journal of Molecular Sciences 14 (3): 5842-5878.

- Ling, Q. H., Huang, W. H. and Jarvis, P. (2011). Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. Photosynthesis Research 107 (2): 209-214.
- Little. D. Y., Rao, H., Oliva, S., Daniel-Vedele, F., Krapp, A. and Malamy, J. E. (2005). The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 102: 13693–13698.
- Liu, H., Wang, Q., Yu, M., Zhang, Y., Wu, Y. and Zhang, H. (2008). Transgenic salt tolerant sugar beet Beta vulgaris constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na+ /H+ antiporter gene, AtNHX3, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots. Plant Cell and Environment 31: 1325-1334.
- Liu, J. G., You, L. Z., Amini, M., Obersteiner, M., Herrero, M., Zehnder, A. J. B. and Yang, H. (2010). A high-resolution assessment on global nitrogen flows in cropland. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107: 8035-8040.
- Liu, Y., Borchert, G. L., Surazynski, A., Hu, C. A. and 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.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2\Delta\Delta C$ (T) Method. METHODS 25 (4): 402-408.
- Livne S., Lor, V. S., Nir, I., Eliaz, N., Aharoni, A. and Olszewski, N. E. (2015). Uncovering DELLA-independent gibberellin responses by characterizing new tomato procera mutants. The Plant Cell 27: 1579-1594.
- Locascio, A., Blázquez, M. A. and Alabadí D. (2013). Genomic Analysis of DELLA Protein Activity. Plant Cell Physiology 0 (0): 1-9.
- Lundquist, P. K., Poliakov, A., Bhuiyan, N. H., Zybailov, B., Sun, Q and Klaas J.
 W. (2012). The Functional Network of the Arabidopsis Plastoglobule Proteome Based on Quantitative Proteomics and Genome-Wide Coexpression Analysis. Plant Physiology 158: 1172–1192.
- Luque, A. A. and Bingham, R. T. (1981). The effect of the osmotic potential and specific ion concentration of the nutrient solution on the uptake and reduction of nitrate by barley seedlings. Plant and Soil 63: 227-237.
- Ma, N. N., Zuo, Y. Q., Liang, X. Q., Yin, B., Wang, G. D., Meng, Q. W. (2013). The multiple stress responsive transcription factor SINAC1 improves the chilling tolerance of tomato. Physiologia Plantarum 149: 474-486.
- Maas, E.V. (1986). Salt tolerance of plants. Applied Agricultural Research, 1: 12-26.
- MacMillan, J. (1997). Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. Natural Product Reports 14: 221-244.
- Magalhaes J. R. and Huber D. M. (1989). Maize growth and ammonium assimilation on enzyme-activity in response to nitrogen forms and pH control. Journal of Plant Nutrition 12: 985-996.
- Magalhaes J. S. and Wilcox G. E. (1983). Tomato growth and mineral composition as influenced by nitrogen form and light intensity. Journal of Plant Nutrition 6: 847–862.
- Maggio, A., Raimondi, G., Martino, A. and De Pascale, S. (2007). Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. Environmental and Experimental Botany 59: 276–282.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y. and 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. and Oda, K. (2008). The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellins deactivating gene, GA20x7, 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.
- Mamayun, M., Hussain A., Khan S. A., Irshad M., Khan A. L., Waqas M., Shahzad R., Iqbal A., Ullah N., Rehman G., Kim H. Y. and Lee I. I. (2015). Kinetin modulates physio-hormonal attributes and isoflavone contents of soybean grown under salinity stress. Frontiers in Plant Science 6:377.

- Marín-de la Rosa, N., Sotillo, B., Miskolczi, P., Gibbs, D. J., Vicente, J., Carbonero, P., Oñate-Sánchez, L., Holdsworth, M. J., Bhalerao, R., Alabadí, D., and Blázquez, M. A. (2014). Large-scale identification of gibberellin-related transcription factors defines group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as functional DELLA partners. Plant Physiology 166: 1022–1032.
- Marschner, H. (1986). Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd edn. Academic Press, London.
- Marschner, H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.
- Marti, E., Gisbert, C., Bishop, G. J., Dixon, M. S. and Garcia-Martinez, J. L. (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. Journal of Experimental Botany 57: 2037-2047.
- Masojidek, J. and Hall, D. O. (1992). Salinity and drought stresses are amplified by high irradiance in sorghum. Photosynthetica 27: 159-171.
- Matson, P. A., Naylor, R. and Ortiz-Monasterio, I. (1998). Integration of environmental, agronomic, and economic aspects of fertilizer management. Science 280: 112-115.
- Maxwell, D. P., Wang, Y., and McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 96: 8271–8276.
- Maxwell, K. and Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence a practical guide. Journal of Experimental Botany 51: 659-68.
- Mazel, A., Leshem, Y., Tiwari, B. S. and 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.
- Meisner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatun, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y. and Levy, A. (1997). A new model system for tomato genetics. Plant Journal 12: 1465-1472.
- Mengel, K. and Kirkby, E. A. (1987). Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute, IPI, Bern, Switzerland.
- Mian, A., Oomen, R. J., Isayenkov, S., Sentenac, H., Maathuis, F. J. and Very, A.
 A. (2011). Overexpression of a Na+ and K+-permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance. The Plant Journal 68: 468-479.

- Miller G. W. and Evans H. J. (1956). The influence of salts on the activity of particulate cytochrome oxidase from roots of higher plants. Plant Physiology 35 (5): 357-364.
- Miller, A. J. and Cramer, M. D. (2005). Root nitrogen acquisition and assimilation. Plant and Soil 274: 1-36.
- Miller, A. J. and Smith, S. J. (2008). Cytosolic Nitrate Ion Homeostasis: Could it Have a Role in Sensing Nitrogen Status? Annals of Botany 101: 485-489.
- Miller, G., Honig, A., Stein, H., Suzuki, N., Mittler, R. and 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.
- Mishra, S. K., Subrahmanyam, D. and Singhal, G. S. (1991). Interactionship between salt and light stress on the primary process of photosynthesis. Journal of Plant Physiology 138: 92-96.
- Miura, K. and Yasuomi, T. (2014). Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. Frontiers in Plant Science 5: 4.
- Miyake, H., Matsumura, H., Fujinuma Y. and Totsuka, T. (1989). Effects of low concentrations of ozone on the fine structure of radish leaves. New Phytologist 111(2): 187-195.
- Moll, R. H., Kamprath, E. J. and Jackson, W. A. (1982). Analysis and Interpretation of Factors Which Contribute to Efficiency of Nitrogen Utilization. Agronomy Journal 74: 562-564.
- 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.
- Moller, I. M., Jensen, P. E. and Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. Annual Review of Plant Biology 58: 459-481.
- Moller, I. S., Gilliham, M., Jha, D., Mayo, G., Roy, S. J., Coates, J. C., Haseloff,
 J. and Tester, M. (2009). Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity
 tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in
 Arabidopsis. The Plant Cell 21: 2163-2178.

- Morales, M. A., Olmos, E., Torrecillas, A., Sanchez-Blanco, M. J. and Alarcon J. J. (2001). Differences in water relations, leaf ion accumulation and excretion rates between cultivated and wild species of *Limonium sp.* grown in conditions of saline stress.
- Morgan, J. A. (1984). Interaction of water supply and n in wheat. Plant Physiology 76: 112-117.
- Mulisch M. and Krupinska B. (2013). Ultrastructural analyses of senescence associated dismantling of chloroplasts revisited. Edited by: B. Biswal, K. Krupinska and U.C. Biswal. In: Plastid development in leaves during growth and senescence, Advances in Photosynthesis and Respiration 36: 307–335.
- Muneer, S., Park, Y. G., Manivannan, A., Soundararajan, P. and Jeong, B. R. (2014). Physiological and Proteomic Analysis in Chloroplasts of *Solanum lycopersicum* L. under Silicon Efficiency and Salinity Stress. International Journal of Molecular Sciences, 15: 21803-21824.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ. 25: 239-250.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. New Phytologist 167 (3): 645-663.
- Munns, R. and Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology 59: 651–681.
- Munns, R., Greenway, H. and 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., Husain, S., Rivelli, A. R., James, R. A., Condon, A. G., Lindsay, M. P., Lagudah, E. S., Schachtman, D. P. and 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., James, R. A. and Lauchli, A. (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. J. Exp. Bot. 57: 1025–1043.
- Nacir H and Bréhélin C. (2013). When proteomics reveals unsuspected roles: the plastoglobule example. Frontiers in Plant Science 4: 114.

- Nagel, O. W. and Lambers, H. (2002). Changes in the acquisition and partitioning of carbon and nitrogen in the gibberellin-deficient mutants A70 and W335 of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Plant Cell and Environment 25 (7): 883-891.
- Nagel, O. W., Konings, H. and Lambers, H. (2001b). Growth rate and biomass partitioning of wildtype and low-gibberellin tomato (*Solanum lycopersicum*) plants growing at high and low nitrogen supply. Physiologia Plantarum 11 (1): 33-39.
- Nagel, O. W., Konings, H. and Lambers, H. (2001b). The influence of a reduced gibberellin biosynthesis and nitrogen supply on the morphology and anatomy of leaves and roots of tomato (*Solanum lycopersicum*). Physiologia Plantarum 111 (1): 40-45.
- Nakaminaki, K., Sawada, Y., Suzuki, M., Kenmoku, H., Kawaide, H., Mitsuhashi, W., Sassa, T., Inoue, Y., Kamiya, Y. and Toyomasui, T. (2003). Deactivation of Gibberellin by 2-Oxidation during Germination of Photoblastic Lettuce Seeds. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 67 (7): 1551–1558.
- Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki,
 K. (2012). NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochimica et Biophysica Acta 1819 (2): 97-103.
- Nasraoui, H. A., Bouthour, D., Hfaidh, R. Gouia, H., Pageau, K. and Chaffei, H. C. (2013). The role of nitrogen availability for the salt-tolerance of two different varieties of durum wheat. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 91: 711-717.
- Navarro, A., Bañon, S., Olmos, E. and Sánchez-Blanco, M. J. (2007). Effects of sodium chloride on water potential components, hydraulic conductivity, gas exchange and leaf ultrastructure of *Arbutus unedo* plants. Plant Science 172: 473-480.
- Nawrocki, W. J., Tourasse, N. J., Taly, A., and Rappaport, F. (2015). The plastid terminal oxidase: its elusive function points to multiple contributions to plastid physiology. Annual Review of Plant Biology 66: 1-26.

- Nazar, R., Iqbal, N., Syeed, S. and Khan, N. A. (2011). Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mung-bean cultivars. Journal of Plant Physiology 168: 807-815.
- Neil, S. J., Desikan, R. and Hancock, J. T. (2002). Hidrogen peroxide signaling, Curr. Opin. Plant Biology 5: 388-395.
- Nemeth, M., Janda, T., Horvath, E., Paldi, E. and Szalai, G. (2002). Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. Plant Science 162: 569-574.
- Nishiyama, R., Le, D. T., Watanabe, Y., Matsui, A., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. and Tran, L. S. P. (2012). Transcriptome analysis of a salt-tolerant cytokinin-deficient mutant reveal differential regulation of salt stress response by cytokinin deficiency. PlosOne 7(2): e32124.
- O'Neill, D. P. and Ross, J. J. (2002). Auxin regulation of the gibberellin pathway in pea. Plant Physiology 130: 1974-82.
- **Oaks, A. (1992).** A reevaluation of nitrogen assimilation in roots. Bioscience 42: 103-111.
- Ogawa, D., Nakajima, N., Sano, T., Tamaoki, M., Aono, M., Kubo, A., Kanna, M., Ioki, M., Kamada, H., and Saji, H. (2005). Salicylic acid accumulation under O₃ exposure is regulated by ethylene in tobacco plants. Plant and Cell Physiology 46: 1062-1072.
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U. and 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 of the USA 100: 11771-11776.
- **Ohta, M., Hayashi, Y., Nakashima, A., Hamada, A., Tanaka, A., Nakamura, T. and Hayakawa, T. (2002).** Introduction of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from Atriplex gmelini confers salt tolerance to rice. FEBS Letters 532: 279-282.
- Olsen, A. N., Ernst, H. A., Lo Leggio, L. and Skriver, K. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. Trends in Plant Science 10 (2): 1360-1385.

- Olszewski, N., Sun, T. P. and Gubler, F. (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. Plant Cell 14 (Suppl.): S61-80.
- Ort, D. R. (2001). When there is too much light. Plant Physiology 125: 29-32.
- **Osmond, C. B., Bjorkman, O. and Anderson, D. J. (1980).** Physiological processes in plant ecology: Toward and Synthesis with Atriplex. Springer, Berlin.
- Ouyang, B., Yang, T., Li, H., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, J., Fei, Z., and Ye, 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.
- Paramonova, N. V., Shevyakova, N. I. and Kuznetsov, V. V. (2004). Ultrastructure of Chloroplasts and Their Storage Inclusions in the Primary Leaves of Mesembryanthemum crystallinum Affected by Putrescine and NaCl. Russian Journal of Plant Physiology 51(1): 86–96.
- Parida, A. K. and Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety 60:324–349.
- Parker, R., Flowers, T., Moore, A. and Harpham, N. (2006). An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. Journal of Experimental Botany 57: 1109-1118.
- Parry, M. L., Rosenzweig, C. and Livermore, M. (2005). Climate change, global food supply and risk of hunger. Physiological Transcriptions of the Royal Society B 360: 2125-2136.
- Pearcy, R. W. and Ustin S. L.. (1984). Effects of salinity on growth and photosynthesis of three California tidal marsh species. Oecologia 62: 68-73.
- Pellny, T. K., O. Van Aken, C. Dutilleul, T. Wolff, K. Groten, M. Bor, R. De Paepe, A. Reyss, F. Van Breusegem, G. Noctor, and Foyer, C. H. (2008). Mitochondrial respiratory pathways modulate nitrate sensing and nitrogendependent regulation of plant architecture in *Nicotiana sylvestris*. The Plant Journal 54: 976-992.
- Peltier, G. and Cournac, L. (2002). Chlororespiration. Annual Review of Plant Biology 53: 523-550.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P. et al. (1997). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. Genes and Development 11: 3194-3205.

- Perez-Alfocea, E., Estan, M. T., Cruz, A. S. and Bolarin M. C. (1993). Effects of salinity on nitrate, total nitrogen, soluble protein and free amino acid levels in tomato plants. Journal of Horticulture Science and Biotechnology 68: 1021-1027.
- Pérez-Martínez, L. and Melgarejo, L. M. (2012). Caracterización ecofisiológica de gulupa (Passiflora edulis Sims) bajo tres condiciones ambientales en el departamento de Cundinamarca. pp. 11-32. En: Melgarejo, L.M. (ed.). Ecofisiología del cultivo de gulupa (Passiflora edulis Sims). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Pérez-Salamó, I., Papdi, C., Rigó, G., Zsigmond, L., Vilela, B., Lumbreras, V., Nagy, I., Horváth, B., Domoki, M., Darula, Z., Medzihradszky, K., Bögre, L., Koncz, C. and Szabados, L. (2014). The Heat shock factor A4A confers salt tolerance and is regulated by oxidative stress and the mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6. Plant Physiology 165: 319-334.
- Pesaresi, P., Masiero, S., Eubel, H., Braun, H. P., Bhushan, S., Glaser, E., Salamini, F. and 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.
- Pnueli, L., Carmel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J., Ganal, M., Zamir, D. and Lifschitz, E. (1998). The Self-pruning gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of cen and tfl1. Development 125: 1979-1989.
- Popova, O. V., Dietz, K. J. and Golldack D. (2003). Salt-dependent expression of a nitrate transporter and two amino acid transporter genes in *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Molecular Biology 52: 569–578.
- Puranik, S., Sahu, P. P., Srivastava, P. S. and Prasad, M. (2012). NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. Trends in Plant Science 17 (6): 369-381.
- Pysh, L. D., Wysocka-Diller, J. W., Camilleri, C., Bouchez, D., and 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.
- Qiu, Q., Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Zhu, J. K. and Schumaker, K. S. (2003). Na⁺/H⁺ exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 132: 1041-1050.

- Qiu, Q., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S. and Zhu, J. K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 99: 8436-8441.
- Quintero, F. J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J. K. and Pardo, J. M. (2002). Reconstitution of the SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 99: 9061-9066.
- Raghothama, K. G. (1999). Phosphate acquisition. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50: 665–693.
- Razavizadeh R., Ehsanpour A. A., Ahsan N. and Komatsu S. (2009). Proteome analysis of tobacco leaves under salt stress. Peptides 30: 1651-1659.
- Redondo-Gómez1, S., Mateos-Naranjo1, E., Figueroa1, M. E. and Davy, A. J. (2010). Salt stimulation of growth and photosynthesis in an extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*. Plant Biology 12 (1): 79-87.
- Ren, Z. H., Gao, J. P., Gao, J. P., Li, L. G., Cai, X. L., Huang, W., Chao, D. Y., Zhu, M. Z., Wang, Z. Y., Luan, S. and Lin, H. X. (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. Nature Genetics 37: 1141–1146.
- Ren, Z. H., Gao, J. P., Li, L. G., Cai, X. L., Huang, W., Chao, D. Y., Zhu, M. Z., Wang, Z. Y., Luan, S. and Lin, H. X. (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. Nature Genetics 37: 1141-1146.
- **Reynolds, H. L. and Dantonio, C. (1996).** The ecological significance of plasticity in root weight ratio in response to nitrogen: Opinion. Plant and Soil 185: 75-97.
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S. J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benlloch, R., Nilsson, O., Thomas, S. G., Hedden, P. *et al.* (2008). Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. Plant Cell 20: 2420-2436.
- Ritchie, R. J. and Bunthawin, S. (2010). The use of pulse amplitude modulation (PAM) fluorometry to measure photosynthesis in a CAM Orchid, *Dendrobium* spp. (D. cv. Viravuth Pink). International Journal of Plant Science 171: 575-585.
- Rodriguez-Navarro, A. and Rubio, F. (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. Journal of Experimental Botany 57: 1149-1160.

- Rodriguez-Rosales, M. P., Jiang, X. Y., Galvez, F. J., Aranda, M. N., Cubero, B. and Venema, K. (2008). Overexpression of the tomato K⁺ /H⁺ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. New Phytologist 179: 366-377.
- Ross, J. J., O' Neill, D. P., Smith, J. J., Kerckhoffs, L. H.and Elliott, R. C. (2000). Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. Plant Journal 21: 547-52.
- Ross, J. J., Reid, J. B. and 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. and Willis, C. (1995). Genetic regulation of gibberellin deactivation in Pisum. Plant Journal 7: 513-523.
- Rubio, L., Rosado, A., Linares-Rueda, A., Borsani, O., Garcia-Sanchez, M. J., Valpuesta, V., Fernandez, J.A. and Botella, M. A. (2004). Regulation of K⁺ transport in tomato roots by the TSS1 locus. Implications in salt tolerance. Plant Physiology 134: 452-459.
- Ruibal, C., Castro, A., Carballo, V., Szabados, L. and Vidal, S. (2013). Recovery from heat, salt and osmotic stress in Physcomitrella patens requires a functional small heat shock protein PpHsp16.4. BMC Plant Biology 13: 174.
- Rus, A., Lee, Bh., Muñoz-Mayor, A., Sharkhuu, A., Miura, K., *et al.* (2004). AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition *in planta*. Plant Physiology 136: 2500–2511.
- Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P., Shen, Q. J. (2010). WRKY transcription factors. Trends in Plant Science; 15 (5): 247–258.
- Sagi, M., Dovrat, A., Kipnis, T. and Lips, H. (1997). Ionic balance, biomass production, and organic nitrogen as affected by salinity and nitrogen source in annual ryegrass. Journal of Plant Nutrition 20: 1291-1316.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and coldinducible gene expression. Biochemical and Biophysical Research Communications 290: 998-1009.

- Sanchez-Barrena, M. J. (2005). Estructura y mecanismo de acción del regulador SOS3: respuesta al estrés salino en la ruta SOS. Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid.
- Sánchez-Fernández, R. O., Avalos, J. and Cerdá-Olmedo, E. (1997). Inhibition of gibberellin biosynthesis by nitrate in *Gibberella fujikuroi*. Febs Letters 413: 35-39.
- Saranga, Y., Zamir, D., Marani, A. and Rudich, J. (1993). Breeding tomatoes for salt tolerance: variation in ion concentration associated with response to salinity. Journal of the American Society for Horticultural Science 118: 405-408.
- Sawada, H., Shim, I. S. and Usui, K. (2006). Induction of benzoic acid 2hydroxylase and salicylic acid biosynthesis-modulation by salt stress in rice seedlings. Plant Science 171: 263-270.
- Schmidt, R., Mieulet, D., Hubberten, H., Obata, T., Hoefgen, R., Fernie, A. R., et al. (2013). SALTRESPONSIVE ERF1 regulates reactive oxygen species– dependent signaling during the initial response to salt stress in rice. Plant Cell 25: 2115-2131.
- Scott, J. W., Harbaugh, B. K. (1989). Micro-Tom. A miniature dwarf tomato. Florida Agricultural Experimental Station Circular S-370: 1-6.
- Segura, M. V. and Quiles, M. J. (2015). Involvement of chlororespiration in chilling stress in the tropical species *Spathiphyllum wallisii*. Plant Cell and Environment 38: 525-533.
- Seo, M., Jikumaru, Y. and Kamiya, Y. (2011). Profiling of Hormones and Related Metabolites in Seed Dormancy and Germination Studies. Methods in Molecular Biology 773: 99-111.
- Serrano, R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. International Review of Cytology 165: 1-52.
- Seskar, M., Shulaev, V. and Raskin, I. (1998). Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. Plant Physiology 116: 387-392.
- Shabala, S. and Cuin, T. A. (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. Physiologia Plantarum 133: 651-669.

- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T. A., Smith, S. J., Miller, A. J., Davies, J. M. and Newman, I. A. (2006). Extracellular Ca²⁺ ameliorates NaCl-induced K⁺ loss from Arabidopsis root and leaf cells by controlling plasma membrane K⁺-permeable channels. Plant Physiology 141: 1653-1665.
- Sharma, P. and 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.
- Shi, H. Z., Quintero, F. J., Pardo, J. M. and 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., Ishitani, M., Kim, C. and Zhu, J. K. (2000). The Arabidopsis thaliana salt tolerance gen SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 97: 6896-6901.
- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M. and 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, W. N. Hao, L. L., Li, J., Liu, D. D., Guo, X. Q. and Li, H. (2014). The Gossypium hirsutum WRKY gene GhWRKY39-1 promotes pathogen infection defense responses and mediates salt stress tolerance in transgenic Nicotiana benthamiana. Plant Cell Reports 33: 483-498.
- Shu, S., Yuan, L. Y., Guo, S. R., Sun, J. and Yuan, Y. H. (2013). Effects of exogenous spermine on chlorophyll fluorescence, antioxidant system and ultrastructure of chloroplasts in Cucumis sativus L. under salt stress. Plant Physiology and Biochemistry 63: 209-216.
- Siddiqi M. Y., Malhotra B., Min X. and Glass A. D. M. (2002). Effects of ammonium and inorganic carbon enrichment on growth and yield of a hydroponic tomato crop. Journal of Plant Nutrition and Soil Sciences 165: 191-197.
- Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N. and Sun, T. (1998). The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. Plant Cell 10: 155-169.
- Singh, A. K. and Dubey, R. S. (1995). Changes in chlorophyll a and b contents and activities of photosystems I and II in rice seedlings induced by NaCl. Photosynthetica 31: 489-499.

- Slaymaker, D. H., Navarre, D. A., Clark, D., DelPozo, O., Martin, G. B. and Klessig, D. F. (2002). The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. PNAS USA 99: 11640-11645.
- Sobhanian, H., Aghaei, K. and Komatsu, S. (2011). Changes in the plant proteome resulting from salt stress: Toward the creation of salt-tolerant crops?. Journal of Proteomics 74: 1323-1337.
- Song, N. H. and Ahn, Y. J. (2011). DcHsp17.7, a small heat shock protein in carrot, is tissue-specifically expressed under salt stress and confers tolerance to salinity. New Biotechnology 6: 698-704.
- Soto A., Olmos E., Quiles M.J., Lopez-Diaz, I, Rubio-Asensio, J.S. and Fernandez-Garcia, N. (2015). The role of gibberellin metabolism in tobacco mutants under salt stress. Current Research in Plant Physiology. Book of Abstract. Congreso de la SEFV 2015, pag 307.
- Speer, M. and Kaiser, W. M. (1994). Replacement of nitrate by ammonium as the nitrogen source increases the salt sensitivity of pea plants. II. Inter- and intracellular solute compartmentation in leaflets. Plant Cell Environment 17: 1223–1231
- Spurr, A. R. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Journal of Ultrastructure Research 26: 31-43.
- Stefanić, P. P., Koffler, T., Adler, G. and Bar-Zvi, D. (2013). Chloroplasts of salt-Grown arabidopsis seedlings are impaired in structure, genome copy number and transcript levels. PlosOne 8(12): e82548.
- Stepien, P. and Johnson, G. N. (2009). Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte Arabidopsis and the halophyte *Thellungiella*: role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. Plant Physiology 149: 1154-1165.
- Stitt, M. and Krapp, A. (1999). The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. Plant Cell and Environment 22: 583-621.
- Stitt, M., Muller, C., Matt, P., Gibon, Y., Carillo, P., Morcuende, R., Scheible, W.
 R. and Krapp, A. (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. Journal of Experimental Botany 53: 959–970.

- Sun, T. P. and Gubler, F. (2004). Molecular mechanisms of gibberellin signalling in plants. Annual Review of Plant Biology, 55: 197–223.
- Sun, W., Xu, X., Zhu, H., Liu, A., Liu, L., Li, J. and Hua, X. (2010). Comparative transcriptomic profiling of a salt-tolerant wild tomato species and a saltsensitive tomato cultivar. Plant and Cell Physiology 51 (6): 997-1006.
- Sunarpi, Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W. Y., Leung, H. Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J. I. and Uozumi, N. (2005). Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. The Plant Journal 44: 928-938.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. and Miller, G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. Plant, Cell and Environment. 35: 259-270.
- Swanson, S. J., Choi, W. G., Chanoca, A. and Gilroy, S. (2011). In vivo imaging of Ca²⁺, pH, and reactive oxygen species using fluorescent probes in plants. Annual Review of Plant Biology 62: 273-297.
- Szabados, L. and 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⁺ pumping ATPases: regulation and biosynthesis. The Plant Cell 11: 677-689.
- Szepesi, A., Csiszar, J., Gemes, K., Horvath, E., Horvath, F., Simon, M. L. and Tari, I. (2009). Salicylic acid improves acclimation to salt stress by atimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na+ content in leaves without toxicity symtoms in Solanum lycopersicum L. Journal of Plant Physiology 166: 914-925.
- Talón, M. (2000). Giberelinas. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcón-Bieto,J. y Talón, M. (eds). Interamericana Mc Graw Hill, España, pp. 325-341.
- Tattini, M., Gucci, R., Coradeschi, M. A., Ponzio, C. and Everard, J. D. (1995). Growth, gas-exchange and ion content in *Olea europaea* plants during salinity stress and subsequent relief. Physiol. Plantarum 95: 203-210.

- **Tester, M. and Davenport, R. (2003).** Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. Annals of Botany 91: 503-527.
- Thimm, O., Blasing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Kruger, P., Selbig, J., Muller, L. A., Rhee, S.Y., and Stitt, M. (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. Plant Journal 37: 914-939.
- Thomas, S. G., Rieu, I., and Steber, C. M. (2005). Gibberellin metabolism and signaling. En Vitamins and Hormones. Elsevier, London. Editado por Litwack, G. 289-337.
- **Torres, B. C. and Bingham, F. T. (1973).** Salt tolerance of Mexican wheat. I. Effect of NO₃ and NaCl on mineral nutrition, growth and grain production of four wheats. Soil Science society of America Proceedings, 37: 711-715.
- **Torres, M. A. (2010).** ROS in biotic interactions. Physiologia Plantarum. 138: 414-429.
- Torres, M. A., Jones, J. D. and Dangl, J. L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. Plant Physiology 141: 373-378.
- Tsuno, M., Suzuki, H., Kondo, T., Mino, H. and Noguchi, T. (2011). Interaction and Inhibitory Effect of Ammonium Cation in the Oxygen Evolving Center of Photosytem II. Biochemistry 50: 2506-2514.
- Tujeta, N. (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants. Methods in Enzymology. 428: 419-438.
- 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.
- Valpuesta, V., Berteli, F., Pérez-Prat, E., Ccrrales, E., Narasimham, M., Botella, M. A., Bressan, R. A., Pliego, F. and Hasegawa, P. M. (1992). Cambios metabólicos y de expresión génica en plantas superiores en respuesta al estrés salino. AGRISCIENTIA 1: 55-63.
- Van der Werf, A., Van Nuenen, M., Visser, A. and Lambers H. (1993). Contribution of physiological and morphological traits to a species' competitive ability at high and low nitrogen supply. A hypothesis for inherently fast- and slow-growing monocotyledonous species. Oecologia, 94: 434-440.

- Van Verk, M. C., Pappaioannou, D., Neeleman, L., Bol, J. F. and Linthorst, H. J. M. (2008). A novel WRKY transcription factor is required for induction of PR-1a gene expression by salicylic acid and bacterial elicitors. Plant Physiology 146: 1983-1995.
- Venema, K., Belver, A., Marin-Manzano, M. C., Rodriguez-Rosales, M. P. and Donaire, J. P. (2003). A novel intracellular K⁺/H⁺ antiporter related to Na⁺ /H⁺ antiporters is important for K⁺ ion homeostasis in plants. Journal of Biological Chemistry 278: 22453-22459.
- Venema, K., Quintero, F. J., Pardo, J. M. and Donaire, J. P. (2002). The Arabidopsis Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na+ and K+ transport in reconstituted liposomes. Journal of Biological Chemistry 277: 2413-2418.
- Vidal, A. M., Gisbert, C., Talón, M., Primo-Millo, E., López-Díaz, I. and García-Martínez, J. L. (2001). The ectopic over-expression of a citrus gibberellin 20oxidase enhances the non-13-hydroxylation pathway of gibberellins biosynthesis and induces an extremely elongated phenotype in tobacco. Physiology Plantarum. 112: 251-260.
- Vierling E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42, 579–620.
- Villalta, I., Reina-Sanchez, A., Bolarin, M. C., Cuartero, J., Belver, A., Venema, K., Carbonell, E. A. and Asins, M. J. (2008). Genetic analysis of Na⁺ and K⁺ concentrations in leaf and stem as physiological components of salt tolerance in tomato. Theoretical and Applied Genetics 116: 869-880.
- Vinocur, B. and Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. Current Opinion in Biotechnology. 16: 123-132.
- Walch-Liu, P., Filleur, S. Gan, Y. and Forde, B. G. (2005). Signaling mechanisms integrating root and shoot responses to changes in the nitrogen supply. Photosynthesis Research 83: 239-250.
- Walker, D. J., Leigh, R. A. and Miller, A. J. (1996). Potassium homeostasis in vacuolated plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93: 10510-10514.

- Wang M. C., Peng Z. Y., Li C. L., Li F., Liu C and Xia G. M. (2008). Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum/Thinopyrum ponticum*. Proteomics 8: 1470-1489.
- Wang, J., Meng, Y., Li, B., Ma, X., Lai, Y., Si, E., Yang, K., Xu, X., Shang, X., Wang, H. and Wang, D. (2015). Physiological and proteomic analyses of salt stress response in the halophyte *Halogeton glomeratus*. Plant Cell and Environment 38: 655-669.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. (2004). Role of plant heatshock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends in Plant Science 9(5): 244-252.
- Wargent, J. J, Pickup, D. A., Paul, N. D. and Roberts, M. R. (2013). Reduction of photosynthetic sensitivity in response to abiotic stress in tomato is mediated by a new generation plant activator. BMC Plant Biology 13: 108.
- Wasti, S., Mimouni, H., Smiti, S., Zid, E. and Ben Ahmed, H. (2012). Enhanced salt tolerance of tomatoes by exogenous salicylic acid applied through rooting medium. OMICS 16: 200-207.
- Werner, T., Nehnevajova, E., Köllmer, I., Novák, O., Strnad, M., Krämer, U. and Schmülling, T. (2010). Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in Arabidopsis and tobacco. Plant Cell 22: 3905–3920.
- Wiciarz, M., Gubernator, B., Kruk, J. and Niewiadomska, E. (2015). Enhanced chloroplastic generation of H₂O₂ in stress-resistant *Thellungiella salsuginea* in comparison to *Arabidopsis thaliana*. Physiologia Plantarum 153: 467-476.
- Wild, M., Daviere, J. M., Cheminant, S., Regnault, T., Baumberger, N., Heintz, D., Baltz, R., Genschik, P. and Achard, P. (2012). The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. Plant Cell 24: 3307-3319.
- Wise R. R. (2006). The diversity of plastid form and function. Chapter 1. Edited by: Robert R. Wise and J. Kenneth Hoober. In: The Structure and Function of Plastids. Published by Springer.
- Wise, R. R. and Naylor A. W. (1987). Chilling-enhanced photooxidation. The peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. Plant Physiology 83: 272-277.

- Wolbang, C. M. and Ross, J. J. (2001). Auxin promotes gibberellin biosynthesis in decapitated tobacco plants. Planta 214: 153-157.
- Woodson, J. D. and Chory, J. (2008). Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. Nature Reviews Genetics 9: 383-395.
- Wu, Y., Deng, Z., Lai, J., Zhang, Y., Yang, C., Yin, B., Zhao, Q., Zhang, L., Li, Y., Yang, C. and Xie, Q. (2009). Dual function of Arabidopsis ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. Cell Research 19:1279-1290.
- Xu, G., Fan, X. and Miller, A. J. (2012). Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. Annual Review of Plant Biology 63: 153-182.
- Xue, G. P., Way, H. M., Richardson, T., Drenth, J., Joyce, P. A. and McIntyre, C.
 L. (2011). Overexpression of TaNAC69 leads to enhanced transcript levels of stress up-regulated genes and dehydration tolerance in bread wheat. Molecular Plant 4: 697-712.
- Yabuta, T. and Y. Sumiki. (1938). On the Crystal of Gibberellin, a Substance to Promote Plant Growth. Journal of the Agricultural Chemical Society Japan 14: 1526.
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. Annual Review of Plant Biology 59: 225-251.
- Yamaguchi, S. and Kamiya, Y. (2000). Gibberellin Biosynthesis: Its regulation by endogenous and environmental signals. Plant Cell Physiology 41: 251-257.
- Yamane, K., Rahman, S., Kawasaki, M., Taniguchi, M. and Miyake, H. (2004). Pretreatment with antioxidants decrease the effects of salt-stress on chloroplast ultrastructure in rice leaf segments. Plant Production Science 7(3): 292-300.
- Yamane, K., Taniguchi, M. and Miyake, H. (2012). Salinity-induced subcellular accumulation of H₂O₂ in leaves of rice. Protoplasma 249: 301-308.
- Yan, H. R., Jia, H. H., Chen, X. B., Hao, L. L., An, H. L. and Guo, X. Q. (2014). The Cotton WRKY Transcription Factor GhWRKY17 Functions in Drought and Salt Stress in Transgenic *Nicotiana benthamiana* Through ABA Signaling and the Modulation of Reactive Oxygen Species Production. Plant and Cell Physiology 55: 2060-2076.

- Yang, D. L., Yao, J., Mei, C. S., Tong, X. H., Zeng, L. J., Li, Q., Xiao, L. T., Sun, T. P., Li, J., Deng, X. W. et al. (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 109: E1192-E1200.
- Yang, S. D., Seo, P. J., Yoon, H. K. and Park, C. M. (2011) The Arabidopsis NAC transcription factor VN12 integrates abscisic acid signals into elaf senescence via the COR/RD genes. The Plant Cell 23: 2155-2168.
- Yanga, C., Zhaoa, L., Zhanga, H., Yanga, Z., Wangb, H., Wena, S., Zhanga, C., Rustgic, S., Von Wettsteinc, D. and Liu, B. (2014). Evolution of physiological responses to salt stress in hexaploid wheat. PNAS 111 (32): 11882-11887.
- Yao, D., Zhang, X., Zhao, X., Liu, C., Wang, C. et al. (2011). Transcriptome analysis reveals salt-stress-regulated biological processes and key pathways in roots of cotton (*Gossypium hirsutum*. p.L.). Genomics 98: 47-55.
- Yao, J., Shi, W. M. and Xu, W. F. (2008). Effects of Salt Stress on Expression of Nitrate Transporter and Assimilation-Related Genes in Tomato Roots. Russian Journal of Plant Physiology 55 (2): 232-240.
- Yao, X., Horie, T., Xue, S., Leung, H. Y., Katsuhara, M., Brodsky, D. E., Wu, Y. and Schroeder, J. I. (2010). Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice OsHKT2;1 and OsHKT2;2 transporters in plant cells. Plant Physiology 152: 341-355.
- Yeo A. R. (1983). Salinity resistance: Physiologies and prices. Physiologia Plantarum 58 (2): 214-222.
- Yoshidaa, H., Hiranoa, K., Satoa, T., Mitsudab, N., Nomotoc, M., Maeod, K., Koketsua, E., Mitania, R., Kawamuraa, M., Ishigurod, S., Tadae, Y., Ohme-Takagib, M., Matsuokaa, M. and Ueguchi-Tanakaa, M. (2014).
 DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the INDETERMINATE DOMAIN family proteins. PNAS 111 (21): 7861-7866.
- Zahra, J., Nazim, H., Cai, S., Han, Y., Wu, D., Zhang, Haider, S. I. and Zhang, G. (2014). The influence of salinity on cell ultrastructures and photosynthetic apparatus of barley genotypes differing in salt stress tolerance. Acta Physiologia Plantarum 36: 1261-1269.

- Zebarth, B. J., Tai, H., Luo, S. N., Millard, P., De Koeyer, D., Li, X. Q. and Xiong, X. Y. (2012). Effect of nitrogen form on gene expression in leaf tissue of greenhouse grown potatoes during three stages of growth. American Journal of Potato Research 89: 315-327.
- Zhang, H. M., Jennings, A., Barlow, P. W. and Forde, B. G. (1999). Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96: 6529-6534.
- Zhang, H. X. and Blumwald, E. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. Nature Biotechnology 19: 765-768.
- Zhang, H. X., Hodson, J., Williams, J. P. and Blumwald, E. (2001). Engineering salt tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98: 12832-12836.
- Zhang, H., Han, B., Wang, T., Chen, S., Li, H., Zhang, Y. and Dai, S. (2012). Mechanisms of plant salt response: Insinghts from proteomics. Journal of Proteome Research 11: 49-67.
- Zhang, N., Kallis R. P., Ewy, R. G. and Portis A. R. Jr. (2002). Light modulation of Rubisco in Arabidopsis requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoform. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 3330-3334.
- Zhang, Y. Y., Lai, J. B., Sun, S. H., Li, Y., Liu, Y. Y., Liang, L. M., Chen, M. S. and Xie, Q. (2008). Comparison analysis of transcripts from the halophyte *Thellungiella halophila*. Journal of Integrative Plant Biology 50: 1327-1335.
- Zhao, F. Y., Zhang, X. J., Li, P. H., Zhao, Y. X. and Zhang, H. (2006). Coexpression of the Sueda salsa SsNHX1 and Arabidopsis AVP1 confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single SsNHX1. Molecular Breeding 17: 341-353.
- Zhu Z., Gerendás J., Bendixen R., Schinner K., Tabrizi H., Sattelmacher B., Hansen U. P. (2000). Different tolerance to light stress in NO₃⁻ and NH₄⁺ grown Phaseolus vulgaris. Plant Biology 2: 558-570.
- Zhu, J-K. (2001). Plant salt tolerance. Trends in Plant Science 6 (2): 66-71.

- **Zhu, J-K. (2002).** Salt and drought signal transduction in plants. Annual Review of Plant Biology 53: 247-273.
- Zhu, M., Chen, G., Zhang, J., Zhang, Y., Xie, Q., Zhao, Z., et al. (2014). The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor SINAC4 regulates salt and drought tolerance and stress-related genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). Plant Cell Reports 33: 1851-1863.

VIII. REFERENCIA ANEXO

VIII. REFERENCIA ANEXO

1. Figura anexa S1.





Figura S1. Analisis del ratio NPQ/NO del PSII a partir de los datos de cinetica de la fluorescencia. El gráfico muestra (A) el efecto de la salinidad; 0 (control) y 150 mM NaCl, en tres genotipos de microtomate; wt, *pro* y *gib3*. (B) Porcentanje de descenso del ratio NPQ/NO en los diferentes genotipos. Los datos representan los valores medios \pm error estándar, n = 15.

- 2. Tablas anexas.
- Experimentos de salinidad.
- 1. Producción de biomasa y su distribución.
- 1.1. Biomasa expresada en peso fresco.

Tabla 1. Efecto del genotipo (wt, *pro* y *gib3*), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción genotipo x salinidad en la producción de biomasa fresca y su distribución entre parte aérea y raíz (PA/R).

Factor	Nivel	PA	Raíz	Total	Hojas	Tallo	PA/R
				g _{pf} planta ⁻¹			
Genotipo	wt	15.79 a	5.87 a	21.66 a	4.89 a	3.57 a	2.81 a
	pro	14.21 a	5.80 a	20.02 a	4.04 a	3.99 a	2.52 b
	gib3	3.98 b	2.18 b	6.16 b	2.39 b	0.90 b	1.95 c
Salinidad	0	14.98 a	5.87 a	20.86 a	4.71 a	3.675 a	2.37 b
	75	12.36 b	5.59 a	17.95 b	4.86 a	3.189 a	2.12 b
	150	6.64 c	2.39 b	9.03 c	1.75 b	1.607 b	2.80 a
Gen x Sal	wt x 0	20.32 ab	6.73 a	27.05 ab	6.58	4.71 ab	3.14 a
	wt x 75	16.87 bc	7.30 a	24.16 bc	5.40	3.58 bc	2.35 cde
	wt x 150	10.18 cd	3.59 b	13.77 cd	2.68	2.42 cd	2.96 abc
	pro x 0	20.21 a	8.23 a	28.43 a	5.21	5.42 a	2.34 abcd
	pro x 75	15.94 abc	7.01 a	22.94 ab	5.62	4.76 ab	2.24 de
	pro x 150	6.50 de	2.18 bc	8.68 de	1.30	1.81 de	2.98 ab
	gib3 x 0	4.42 de	2.67 bc	7.09 de	2.35	0.90 de	1.64 f
	gib3 x 75	4.27 de	2.46 bc	6.73 de	3.56	1.23 de	1.76 ef
	gib3 x 150	3.25 de	1.41 c	4.66 e	1.27	0.59 f	2.45 bcd
Genotipo		***	***	***	***	***	***
Salinidad		***	***	***	***	***	***
Gen x Sal		***	***	***	N.S.	***	*

1.2. Biomasa expresada en peso seco.

Factor	Nivel	PA	Raíz	Total	Hojas	Tallo	PARaíz
				g _{ps} planta ⁻¹			
Genotipo	wt	1.59 a	0.39 a	1.98 a	0.56 a	0.30 a	4.20 a
	pro	1.37 a	0.45 a	1.83 a	0.43 a	0.34 a	3.21 b
	gib3	0.44 b	0.15 b	0.59 b	0.27 b	0.09 b	3.12 b
Salinidad	0	1.46 a	0.48 a	1.93 a	0.589 a	0.33 a	3.08 b
	75	1.25 a	0.34 b	1.58 a	0.46 a	0.23 b	3.38 b
	150	0.70 b	0.18 c	0.88 b	0.21 b	0.16 c	4.07 a
Gen x Sal	wt x 0	1.98 a	0.52 b	2.50 a	0.81	0.40 ab	3.99 ab
	wt x 75	1.72 ab	0.38 bcd	2.10 ab	0.58	0.27 cd	4.57 a
	wt x 150	1.07 bcd	0.27 cde	1.34 bc	0.30	0.22 cde	4.04 ab
	<i>pro</i> x 0	1.89 a	0.74 a	2.63 a	0.62	0.51 a	2.28 d
	<i>pro</i> x 75	1.54 ab	0.45 bc	1.99 ab	0.49	0.34 bc	2.75 cd
	<i>pro</i> x 150	0.69 cde	0.16 de	0.85 cd	0.20	0.17 def	4.60 a
	<i>gib3</i> x 0	0.50 de	0.17 de	0.67 cd	0.33	0.09 ef	2.99 cd
	<i>gib3</i> x 75	0.48 de	0.17 de	0.65 cd	0.33	0.10 ef	2.82 cd
	<i>gib3</i> x 150	0.35 e	0.11 e	0.46 d	0.14	0.08 f	3.56 bc
Genotipo		***	***	***	***	***	***
Salinidad		***	***	***	***	***	***
Gen x Sal		*	***	*	N.S.	**	***

Tabla 2. Efecto del genotipo (wt, *pro* y *gib3*), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción genotipo x salinidad en la producción de biomasa seca y su distribución entre parte aérea y raíz. (PA/R).

2. Peso específico de la hoja.

Factor	Nivel	LSM	LSM	
		$(\mathrm{mg}_{\mathrm{fw}}\mathrm{cm}^{-2})$	$(\text{mg}_{dw} \text{ cm}^{-2})$	
Genotipo	wt	66.44 a	4.16	
	pro	55.66 b	4.29	
	gib3	67.32 a	4.36	
Salinidad	0	52.20 c	6.09 a	
	75	64.38 b	2.88 c	
	150	72.84 a	3.85 b	
Gen x Sal	wt x 0	53.39	5.07 b	
	wt x 75	68.45	3.38 cd	
	wt x 150	77.47	4.05 c	
	pro x 0	43.06	6.44 a	
	pro x 75	56.83	2.68 d	
	<i>pro</i> x 150	67.10	3.76 c	
	<i>gib3</i> x 0	60.15	6.76 a	
	<i>gib3</i> x 75	67.85	2.59 d	
	<i>gib3</i> x 150	73.95	3.73 c	
Genotipo		***	N.S.	
Salinidad		***	***	
Gen x Sal		N.S.	***	

Tabla 3. Efecto del genotipo (wt, *pro* y *gib3*), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción genotipo x salinidad en el peso específico de la hoja (LSM).

3. Longitud del tallo.

Factor	Nivel	Longitud de tallo			
		(cm)			
Genotipo	wt	8.14 b			
	pro	11.07 a			
	gib3	4.50 c			
Salinidad	0	8.61 a			
	75	7.96 b			
	150	7.41 c			
Gen x Sal	wt x 0	8.93 cd			
	wt x 75	8.37 de			
	wt x 150	7.94 e			
	pro x 0	12.17 a			
	<i>pro</i> x 75	11.11 b			
	<i>pro</i> x 150	9.93 c			
	<i>gib3</i> x 0	4.72 f			
	<i>gib3</i> x 75	4.40 f			
	<i>gib3</i> x 150	4.38 f			
Genotipo		***			
Salinidad		***			
Gen x Sal		**			

Tabla 4. Efecto del genotipo (wt, *pro* y *gib3*), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción genotipo x salinidad en la longitud del tallo.

4. Estado nutricional en las plantas.

4.2.1. Concentración de los iones Na+ y Cl-.

Tabla 5. Efecto del genotipo (wt, *pro* y *gib3*), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción genotipo x salinidad en la concentración de los iones Na⁺ y Cl⁻ en raíz, hoja y tallo.

		R	aíz	Н	oja	Т	allo
Factor	Nivel	Na ⁺	Cl ⁻	Na ⁺	Cl ⁻	Na ⁺	Cl ⁻
				(mg	g_{ps}^{-1})		
Genotipo	wt	18.57	71.04 b	32.83 b	71.04 b	20.27 c	48.27 c
	pro	18.42	103.32 a	45.33 a	103.32 a	41.74 a	79.78 a
	gib3	19.71	76.43 b	34.00 b	76.43 b	29.17 b	57.83 b
Salinidad	0	0.59 c	11.85 c	0.45 c	11.85 c	1.04 c	17.28 c
	75	24.07 b	91.24 b	42.71 b	91.24 b	36.81 b	66.83 b
	150	32.03 a	147.70 a	68.99 a	147.70 a	53.32 a	101.76 a
Gen x Sal	wt x 0	0.69 e	12.31 e	0.43 e	12.31 e	1.17 d	23.22 e
	wt x 75	25.83 c	92.36 c	39.81 c	92.36 c	30.99 c	50.42 d
	wt x 150	29.18 b	108.45 c	58.24 b	108.45 c	28.64 c	71.17 с
	<i>pro</i> x 0	0.43 e	7.30 e	0.50 e	7.30 e	0.86 d	9.34 e
	<i>pro</i> x 75	21.48 d	112.87 c	57.95 b	112.87 c	46.62 b	90.65 b
	<i>pro</i> x 150	33.35 a	189.81 a	77.54 a	189.81 a	77.76 a	139.35 a
	<i>gib3</i> x 0	0.64 e	15.95 e	0.43 e	15.95 e	1.10 d	19.29 e
	<i>gib3</i> x 75	24.92 c	68.50 d	30.37 d	68.50 d	32.83 c	59.42 c
	<i>gib3</i> x 150	33.58 a	144.85 b	71.18 a	144.85 b	53.58 b	94.77 b
Genotipo		N.S.	***	***	***	***	***
Salinidad		***	***	***	***	***	***
Gen x Sal		*	***	***	***	***	***

4.3. Concentración de los cationes K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y el ratio Na⁺/K⁺.

4.3.1. Raíz.

Tabla 6. Efecto del genotipo (wt, *pro* y *gib3*), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción genotipo x salinidad en la concentración de los cationes K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y el ratio Na^+/K^+ en raíz.

Factor	Nivel	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺ / K ⁺			
		$(mg g_{ps}^{-1})$						
Genotipo	wt	29.11 b	3.48	3.11 b	8.44 b			
	pro	21.73 c	3.38	3.08 b	18.24 a			
	gib3	33.68 a	3.12	3.71 a	7.86 b			
Salinidad	0	41.84 a	4.22 a	3.86 a	0.14 c			
	75	26.14 b	3.40 b	3.66 a	10.16 b			
	150	16.54 c	2.37 c	2.38 b	24.24 a			
Gen x Sal	wt x 0	39.96	4.29	3.33 b	0.17 d			
	wt x 75	29.60	3.92	3.52 ab	8.76 bc			
	wt x 150	17.78	2.24	2.48 c	16.41 b			
	pro x 0	39.29	3.81	4.20 a	0.12 d			
	pro x 75	16.00	3.60	3.26 b	14.02 bc			
	<i>pro</i> x 150	9.91	2.74	1.77 d	40.59 a			
	<i>gib3</i> x 0	46.28	4.55	4.04 a	0.15 d			
	<i>gib3</i> x 75	32.81	2.66	4.21 a	7.69 c			
	<i>gib3</i> x 150	21.94	2.14	2.88 bc	15.73 bc			
Genotipo		***	N.S.	***	***			
Salinidad		***	***	***	***			
Gen x Sal		N.S.	N.S.	*	****			

4.3.2. Hoja.

Factor	Nivel	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺ / K ⁺
			(mg	$g g_{ps}^{-1}$)	
Genotipo	wt	14.53	9.04 b	4.18 b	45.50 b
	pro	14.78	10.35 a	4.61 a	66.68 a
	gib3	14.24	9.48 ab	4.70 a	36.62 c
Salinidad	0	25.91 a	17.95 a	8.14 a	0.18 c
	75	10.55 b	7.16 b	3.20 b	41.93 b
	150	7.09 c	3.77 с	2.14 c	106.70 a
Gen x Sal	wt x 0	28.13 a	16.57 b	7.35 b	0.15 e
	wt x 75	9.13 de	7.53 c	3.27 с	43.64 d
	wt x 150	6.34 e	3.03 f	1.91 e	92.73 b
	pro x 0	25.57 ab	21.48 a	9.32 a	0.19 e
	pro x 75	13.39 c	6.20 cd	2.62 d	48.60 d
	<i>pro</i> x 150	5.38 f	3.37 ef	1.88 e	151.24 a
	<i>gib3</i> x 0	24.04 b	15.79 b	7.74 b	0.18 e
	<i>gib3</i> x 75	9.14 de	7.75 c	3.72 c	33.55 d
	<i>gib3</i> x 150	9.55 d	4.89 de	2.63 d	76.14 c
Genotipo		N.S.	*	*	***
Salinidad		***	***	***	***
Gen x Sal		***	***	***	***

Tabla 7. Efecto del genotipo (wt, *pro* y *gib3*), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción genotipo x salinidad en la concentración de los cationes K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y el ratio Na^+/K^+ en hoja.

4.3.3. Tallo.

Factor	Nivel	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺ / K ⁺		
		$(\mathrm{mg} \mathrm{g}_{\mathrm{ps}}^{-1})$					
Genotipo	wt	30.57 a	5.17 b	3.14 b	9.43 b		
	pro	24.73 b	5.16 b	3.14 b	31.51 a		
	gib3	22.25 b	6.12 a	3.74 a	26.44 a		
Salinidad	0	46.79 a	9.38 a	5.02 a	0.23 c		
	75	15.35 b	4.24 b	2.74 b	26.30 b		
	150	15.41 b	2.83 c	2.26 c	40.84 a		
Gen x Sal	wt x 0	49.03	9.13	4.49	0.26 e		
	wt x 75	21.09	4.26	2.64	14.79 d		
	wt x 150	21.59	2.13	2.29	13.24 d		
	pro x 0	46.74	8.67	5.17	0.18 e		
	pro x 75	14.07	4.03	2.34	33.11 c		
	<i>pro</i> x 150	13.39	2.78	1.89	61.24 a		
	<i>gib3</i> x 0	44.60	10.34	5.39	0.25 e		
	<i>gib3</i> x 75	10.90	4.43	3.23	31.01 c		
	<i>gib3</i> x 150	11.26	3.58	2.60	48.05 b		
Genotipo	Genotipo		*	**	***		
Salinidad		***	***	***	***		
Gen x Sal		N.S.	N.S.	N.S.	***		

Tabla 8. Efecto del genotipo (wt, *pro* y *gib3*), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción genotipo x salinidad en la concentración de los cationes K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y el ratio Na^+/K^+ en tallo.

4.4. Balance de nitrógeno y carbono.

4.4.1. Raíz.

Tabla 9. Efecto del genotipo (wt, *pro* y *gib3*), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción genotipo x salinidad en la concentración de N total, NO₃⁻, N orgánico, C total y el ratio C/N en raíz.

Factor	Nivel	N total	NO ₃ -	N orgánico	C total	C/N		
		$(\mathrm{mg}\mathrm{g}_{\mathrm{ps}}^{-1})$						
Genotipo	wt	39.68 a	13.63 b	25.99 a	400.80 a	10.26 b		
	pro	34.45 b	20.94 a	17.20 b	406.78 a	12.07 a		
	gib3	34.85 b	23.39 a	13.54 c	383.56 b	11.13 ab		
Salinidad	0	39.24 a	38.13 a	5.71 c	392.20 b	10.13 b		
	75	33.09 b	11.93 b	21.78 b	390.58 b	11.90 a		
	150	36.66 a	7.90 c	29.24 a	408.35 a	11.43 a		
Gen x Sal	wt x 0	40.52	29.37 c	11.11 c	399.50	9.93		
	wt x 75	34.40	7.35 fg	26.91 b	392.06	11.46		
	wt x 150	44.13	4.18 g	39.95 a	410.83	9.40		
	pro x 0	38.50	46.39 a	1.17 d	395.65	10.49		
	<i>pro</i> x 75	32.85	9.75 ef	25.13 b	406.95	12.58		
	<i>pro</i> x 150	32.01	6.69 fg	25.29 b	417.73	13.14		
	<i>gib3</i> x 0	38.71	38.64b	4.84 d	381.46	9.97		
	<i>gib3</i> x 75	32.02	18.67 d	13.30 c	372.73	11.67		
	<i>gib3</i> x 150	33.83	12.84 e	22.47 b	396.48	11.75		
Genotipo		**	***	***	***	**		
Salinidad		***	***	***	**	**		
Gen x Sal		N.S.	***	**	N.S.	N.S.		

4.4.2. Hoja.

Factor	Nivel	N total	NO ₃ ⁻	N orgánico	C total	C/N
			(mg	$g g_{ps}^{-1}$)		
Genotipo	wt	52.14 a	6.51 a	45.75 a	366.33 b	7.07 c
	pro	39.80 b	4.94 c	35.08 b	347.89 c	9.04 a
	gib3	51.72 a	5.19 b	45.97 a	387.71 a	7.66 b
Salinidad	0	57.70 a	14.17 a	43.06 b	405.58 a	7.05 c
	75	48.12 b	1.58 b	46.73 a	363.03 b	7.71 b
	150	37.84 c	0.90 c	37.00 c	333.31 c	9.01 a
Gen x Sal	wt x 0	59.25 a	18.36 a	41.68 de	397.14 b	6.71 e
	wt x 75	52.17 c	0.61 d	51.15 ab	358.31 c	6.87 de
	wt x 150	45.00 d	0.57 d	44.43 cd	343.53 cd	7.64 c
	<i>pro</i> x 0	52.83 c	12.85 b	39.81 ef	395.31 b	7.48 c
	<i>pro</i> x 75	36.18 e	1.15 d	35.72 g	326.45 de	9.03 b
	<i>pro</i> x 150	30.40 f	0.84 d	29.70 h	321.90 e	10.61 a
	<i>gib3</i> x 0	61.02 a	11.30b	47.70 bc	424.30 a	6.96 de
	<i>gib3</i> x 75	56.02 b	2.98 c	53.32 a	404.32 b	7.22 cd
	<i>gib3</i> x 150	38.12 e	1.30 d	36.88 fg	334.50 de	8.80 b
Genotipo		***	***	***	***	***
Salinidad		***	***	***	***	***
Gen x Sal		***	***	***	***	***

Tabla 10. Efecto del genotipo (wt, *pro* y *gib3*), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción genotipo x salinidad en la concentración de N total, NO₃⁻, N orgánico, C total y el ratio C/N en hoja.

4.4.3. Tallo.

Tabla 11. Efecto del genotipo (wt, pro y gib3), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción
genotipo x salinidad en la concentración de N total, NO3, N orgánico, C total y el ratio C/N en el
tallo.

Factor	Nivel	N total	NO ₃ -	N orgánico	C total	C/N
			(mg	$g g_{ps}^{-1}$)		
Genotipo	wt	47.13 a	5.66 b	45.98 a	385.49 a	8.24 c
	pro	31.62 c	12.69 a	31.90 c	346.88 b	11.36 a
	gib3	38.31 b	12.63 a	38.75 b	375.57 a	9.93 b
Salinidad	0	41.65 a	23.29 a	41.94 a	381.12 a	9.27
	75	36.78 b	4.97 b	36.13 b	368.50 b	10.24
	150	38.62 b	2.72 с	38.56 b	358.33 b	10.01
Gen x Sal	wt x 0	44.23 bc	12.77 c	42.33 b	384.27 ab	8.71 de
	wt x 75	44.73 b	2.98 ef	43.22 b	377.00 ab	8.45 de
	wt x 150	52.43 a	1.22 f	52.40 a	395.20 a	7.55 e
	pro x 0	39.40 bcd	30.84 a	40.58 b	382.98 ab	9.93 bcd
	<i>pro</i> x 75	30.83 e	4.81 de	30.57 d	348.93 c	11.32 b
	<i>pro</i> x 150	24.62 f	2.42 ef	24.54 e	308.73 f	12.83 a
	<i>gib3</i> x 0	41.32 bc	26.26 b	42.91 b	376.10 ab	9.17 d
	<i>gib3</i> x 75	34.78 de	7.13 d	34.60 cd	379.56 ab	10.96 bc
	<i>gib3</i> x 150	38.82 cd	4.52 de	38.74 bc	371.06 b	9.65 cd
Genotipo		***	***	***	***	***
Salinidad		**	***	**	***	N.S.
Gen x Sal		***	***	***	***	**
5. Parámetros de fluorescencia de las clorofilas.

5.1. Contenido de clorofila (SPAD).

Tabla 12. Efecto del genotipo (wt, *pro* y *gib3*), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción genotipo x salinidad en el contenido de clorofila.

Factor	Nivel	Contenido de clorofila
		SPAD
Genotipo	wt	60.76 b
	pro	44.81 c
	gib3	67.84 a
Salinidad	0	68.05 a
	75	60.54 b
	150	44.81 c
Gen x Sal	wt x 0	69.78
	wt x 75	61.92
	wt x 150	50.57
	pro x 0	57.78
	<i>pro</i> x 75	49.53
	<i>pro</i> x 150	27.10
	<i>gib3</i> x 0	76.60
	<i>gib3</i> x 75	70.16
	<i>gib3</i> x 150	56.75
Genotipo		***
Salinidad		***
Gen x Sal		N.S.

5.2. Fluorescencia máxima.

Factor	Nivel	Y (II) máxima				
		Día 0 (control)	24 hora	7 días		
Genotipo	wt	0.79	0.76 a	0.79 a		
	pro	0.78	0.74 b	0.76 b		
	gib3	0.78	0.76 a	0.79 a		
Salinidad	0	0.78	0.75	0.81 a		
	75		0.76	0.79 b		
	150		0.76	0.74 c		
Gen x Sal	wt x 0	0.79	0.75	0.81 ab		
	wt x 75		0.76	0.79 bc		
	wt x 150		0.77	0.76 de		
	<i>pro</i> x 0	0.78	0.74	0.81 ab		
	<i>pro</i> x 75		0.75	0.77 cd		
	<i>pro</i> x 150		0.73	0.70 f		
	<i>gib3</i> x 0	0.78	0.76	0.82 a		
	<i>gib3</i> x 75		0.76	0.80 ab		
	<i>gib3</i> x 150		0.77	0.74 e		
Genotipo		N.S.	***	***		
Salinidad			N.S.	***		
Gen x Sal			N.S.	*		

Tabla 13. Efecto del genotipo (wt, *pro* y *gib3*), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción genotipo x salinidad en el rendimiento de fluorescencia máxima.

6. Parámetros de intercambio gaseoso.

Tabla 14. Efecto del genotipo (wt y pro), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción
genotipo x salinidad en los diferentes parámetros fotosintéticos; tasa de fotosíntesis neta (Pn),
conductancia estomática (gs) y la eficiencia en el uso del agua (iWUE).

Factor	Nivel	Pn	Gs	iWUE	
		μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹	mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹	µmol CO2 mol H2O-1	
Genotipo	wt	7.77 a	198.50 a	41.66	
	pro	5.90 b	157.21 b	38.49	
Salinidad	0	8.50 a	232.43 a	36.84 b	
	75	7.00 b	185.19 b	39.50 b	
	150	4.59 c	102.30 c	44.69 a	
Tiempo	0	11.12 a	298.53 a	37.96 b	
	2	8.65 b	186.47 b	52.41 a	
	4	7.02 c	201.07 b	36.64 b	
	6	5.11 d	152.27 с	34.38 b	
	8	5.12 d	131.39 с	37.58 b	
Gen x Sal	wt x 0	9.20 a	244.15	38.40 b	
	wt x 75	7.71 bc	211.24	38.22 b	
	wt x 150	6.05 d	128.70	49.18 a	
	pro x 0	7.80 ab	220.71	35.29 b	
	pro x 75	6.29 cd	159.14	40.77 ab	
	<i>pro</i> x 150	3.13 e	75.90	40.21 b	
Gen x Tiempo	wt x 0	11.19 a	303.98	37.44	
	wt x 2	9.44 b	205.60	52.10	
	wt x 4	7.90 c	230.91	36.37	
	wt x 6	6.18 d	166.01	38.10	
	wt x 8	6.41 cd	156.32	41.47	
	<i>pro</i> x 0	11.06 a	293.08	38.49	
	pro x 2	7.85 c	167.34	52.71	
	pro x 4	6.14 d	171.22	36.90	
	<i>pro</i> x 6	4.04 e	138.54	30.66	
	pro x 8	3.84 e	106.45	33.69	
Gen x Sal x	wt x 0 x 0	11.19	303.98	37.44	
Tiempo	wt x 0 x 2	11.46	294.27	38.92	
	wt x 0 x 4	8.89	268.17	33.40	
	wt x 0 x 6	6.42	185.03	34.83	
	wt x 0 x 8	8.02	169.29	47.39	
	wt x 75 x 0				
	wt x 75 x 2	9.03	195.23	49.43	
	wt x 75 x 4	8.37	270.22	31.54	
	wt x 75 x 6	6.66	189.96	35.37	
	wt x 75 x 8	6.77	189.55	36.53	
	wt x 150 x 0				
	wt x 150 x 2	7.84	127.31	67.96	
	wt x 150 x 4	6.44	154.35	44.17	

	wt x 150 x 6	5.46	123.03	44.10
	wt x 150 x 8	4.45	110.12	40.49
	<i>pro</i> x 0 x 0	11.06	293.08	38.49
	<i>pro</i> x 0 x 2	9.58	229.35	41.93
	<i>pro</i> x 0 x 4	7.45	215.49	34.64
	<i>pro</i> x 0 x 6	4.45	193.23	22.70
	<i>pro</i> x 0 x 8	6.44	172.39	38.68
	<i>pro</i> x 75 x 0		•	•
	<i>pro</i> x 75 x 2	9.01	195.30	46.48
	<i>pro</i> x 75 x 4	6.74	198.14	34.35
	<i>pro</i> x 75 x 6	5.24	144.30	38.63
	<i>pro</i> x 75 x 8	4.17	98.83	43.64
	<i>pro</i> x 150 x 0			
	<i>pro</i> x 150 x 2	4.96	77.36	69.72
	<i>pro</i> x 150 x 4	4.23	100.03	41.71
	<i>pro</i> x 150 x 6	2.43	78.09	30.66
	<i>pro</i> x 150 x 8	0.90	48.13	18.74
Genotipo		***	***	N.S.
Salinidad		***	***	***
Tiempo		***	***	***
Gen x Sal		*	N.S.	*
Gen x Tiempo		*	N.S.	N.S.
Gen x Sal x Tier	mpo	N.S.	N.S.	N.S.

7. Estado hídrico de las plantas.

Factor	Nivel	Contenido de H ₂ O	CRA
		(%)	(%)
Genotipo	wt	93.37 a	87.90
	pro	91.58 b	89.37
	gib3	93.28 a	89.98
Salinidad	0	88.05 b	83.14 b
	75	95.50 a	90.24 a
	150	94.69 a	93.86 a
Gen x Sal	wt x 0	90.32 b	83.76
	wt x 75	95.02 a	87.55
	wt x 150	94.77 a	92.39
	pro x 0	85.06 c	80.45
	<i>pro</i> x 75	95.30 a	93.26
	<i>pro</i> x 150	94.39 a	94.39
	<i>gib3</i> x 0	88.76 b	85.22
	<i>gib3</i> x 75	96.18 a	89.91
	<i>gib3</i> x 150	94.90 a	94.80
Genotipo		***	N.S.
Salinidad		***	***
Gen x Sal		***	N.S.

Tabla 15. Efecto del genotipo (wt, *pro* y *gib3*), la salinidad (0, 75 y 150 mM NaCl) y la interacción genotipo x salinidad en el estado hídrico; contenido y contenido relativo de agua .

• Experimentos de interacción fuente de nitrógeno y salinidad.

1. Producción de biomasa y su distribución.

1.1. Biomasa expresada en peso fresco.

Tabla 16. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH₄⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en la producción de biomasa fresca y su distribución entre parte aérea y raíz (PA/R).

Factor	Nivel	PA	Raíz	Total	PA/R	Hojas	Tallo
				g _{ps} p	lanta ⁻¹		
Genotipo	wt	8.96 a	4.41 a	13.37 a	2.25 a	4.85 a	4.07 a
-	pro	7.07 b	3.69 b	11.46 b	1.86 b	3.48 b	4.27 a
	gib3	3.38 c	1.43 c	3.38 c	1.47 c	1.34 c	0.58 b
Salinidad	0	6.26 a	3.52 a	10.02 a	1.71 b	3.18	3.29 a
	75	5.73 b	2.82 b	8.79 b	2.01 a	3.29	2.66 b
N Fuente	NO ₃ -	6.70 a	3.62 a	10.74 a	1.74 b	3.43 a	3.67 a
	NH4 ⁺	5.29 b	2.73 b	8.07 b	1.98 a	3.04 b	2.28 b
N Conc.	2 mM	8.26 a	3.44 a	12.02 a	2.41 a	4.56 a	3.98 a
	0.2 mM	3.74 b	2.91 b	6.79 b	1.31 b	1.91 b	1.96 b
Gen x Fuente	wt x NO ₃	9.61 a	4.69 a	14.30 a	2.13	4.79 ab	4.79 b
	wt x NH ₄ ⁺	8.31 a	4.13 a	12.45 a	2.37	3.36 c	3.36 c
	pro x NO ₃	8.31 a	4.46 a	14.03 a	1.77	5.53 a	5.53 a
	pro x NH_4^+	5.84 b	2.91 b	8.90 b	1.95	3.01 c	3.01 c
	gib3 x NO ₃	2.18 c	1.70 c	3.89 c	1.31	0.68 d	0.68 d
	gib3 x NH_4^+	1.73 c	1.15 c	2.88 c	1.62	0.48 d	0.48 d
Gen x Conc.	wt x 2	11.50 a	4.00 b	15.50 a	3.08 a	6.40 a	5.05 a
	wt x 0.2	6.43 c	4.82 a	11.24 b	1.42 c	3.31 c	3.10 b
	pro x 2	10.74 b	4.93 ab	16.62 a	2.21 b	5.48 b	6.19 a
	$pro \ge 0.2$	3.41 d	2.44 c	6.30 c	1.51 c	1.49 d	2.35 c
	gib3 x 2	2.53 d	1.39 d	3.92 d	1.94 b	1.81 d	0.72 d
	glb3 X 0.2	1.38 e	1.46 d	2.84 d	1.00 e	0.94 e	0.44 d
C C 1		0.20 -	4.07.	14.10	2.00	4 77	4.50 -1
Gen x Sal	wt x 0	9.30 a	4.8/a	14.18 a	2.09	4.//	4.50 ab
	wt x /S	7.67 hc	3.93 U	12.37 a	2.41	4.94	3.03 U
	$pro \ge 75$	6.47 c	4.21 au	12.39 a	2.02	3.52	4.05 a
	pio x + 3 qib3 x = 0	1.81 d	1.49 d	3 31 c	1.34	1.27	0.55 c
	$gib3 \times 0$	2 10 d	1.47 u	3.45 c	1.54	1.27	0.55 C
	g105 x 15	2.10 u	1.50 u	5.150	1.00	1.10	0.02 0
Gen y Fuente	wt x $NO_2^{-1} x 2$	13 05 a	4 88 b	17 93 b	2.81	6 71 a	6 30 b
y Conc	wt x NO_3 x 2 wt x NO_2 x 0.2	6 16 de	4 50 hc	10.66 de	1 44	2.87 d	3.27 de
л сопс.	wt x NH_4^+ x 2	9.94 bc	3.13 d	13.08 c	3.35	6.08 a	3.80 d
	wt x NH_4^+ x 0.2	6.69 d	5.13 b	11.83 cd	1.40	3.75 c	2.92 e
	$pro \times NO_3 \times 2$	11.95 b	5.73 a	19.59 a	2.07	6.09 a	7.73 a
	pro x NO_3 x 0.2	4.67 e	3.19 d	8.47 e	1.47	1.95 e	3.32 de
	pro x NH_4^+ x 2	9.53 c	4.12 c	13.65 c	2.35	4.87 b	4.64 c
	pro x NH_4^+ x 0.2	2.14 fg	1.70 e	4.13 fg	1.56	1.04 f	1.38 f

	gib3 x NO ₃ x 2	2.75 f	1.73 e	4.48 f	1.61	1.92 e	0.84 fg
	<i>gib3</i> x NO ₃ x 0.2	1.61 fg	1.68 e	3.29 fg	1.02	1.08 f	0.53 g
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 2$	2.30 fg	1.06 e	3.36 fg	2.27	1.71 e	0.60 g
	<i>gib3</i> x NH ₄ ⁺ x 0.2	1.15 g	1.24 e	2.39 g	0.98	0.79 f	0.36g
Gen x Fuente	wt x $NO_3 x 0$	10.33 a	5.02 ab	15.35 ab	2.13 bcd	4.85ab	5.45 b
x Sal	wt x NO_3^- x 75	8.89 a	4.35 bc	13.24 b	2.12 bc	4.73 ab	4.13 bcd
	wt x NH ₄ ⁺ x 0	8.27 ab	4.72 ab	13.00 b	2.05 cd	4.68 a	3.55 cde
	wt x NH_4^+ x 75	8.35 ab	3.54 cd	11.90 b	2.69 ab	5.15 a	3.17 de
	pro x $NO_3^- x 0$	9.71 a	5.23 a	16.26 a	1.73 def	4.48 abc	6.51 a
	pro x NO_3^- x 75	6.91 bc	3.69 cd	11.80 b	1.81 de	3.55 bc	4.54 bc
	pro x NH_4^+ x 0	5.64 c	3.19 de	8.91 c	1.67 def	2.55 de	3.15 de
	pro x NH_4^+ x 75	6.04 c	2.64 ef	8.88 c	2.24 ab	3.36 cd	2.87 e
	$gib3 \times NO_3 \times 0$	2.19 d	1.89 fg	4.08 d	1.20 f	1.51 ef	0.68 f
	<i>gib3</i> x NO ₃ ⁻ x 75	2.17 d	1.52 g	3.69 d	1.43 ef	1.49 ef	0.68 f
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0$	1.44 d	1.10 g	2.54 d	1.48 ef	1.03 f	0.41 f
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 75$	2.02 d	1.20 g	3.21 d	1.77 bcde	1.47 ef	0.55 f
Gen x Conc.x	wt x 2 x 0	12.58 a	4.20 b	16.80 b	3.07	6.62 a	5.91 b
Sal	wt x 2 x 75	10.41 de	3.80 bc	14.21 de	3.09	6.17 d	4.20 de
	wt x 0.2 x 0	6.02 bc	5.54 d	11.56 c	1.12	2.91 a	3.09 d
	wt x 0.2 x 75	6.84 d	4.10 b	10.93 cd	1.72	3.71 c	3.10 e
	<i>pro</i> x 2 x 0	11.84 b	5.49 a	18.34 a	2.15	5.68 a	7.13 a
	pro x 2 x 75	9.64 e	4.36 d	14.90 e	2.26	5.27 e	5.24 de
	pro x 0.2 x 0	3.50 c	2.93 c	6.83 c	1.24	1.36 b	2.53 c
	<i>pro</i> x 0.2 x 75	3.31 fg	1.96 e	5.77 fg	1.79	1.63 f	2.17 f
	<i>gib3</i> x 2 x 0	2.47 f	1.34 e	3.81 f	1.97	1.77 e	0.70 fg
	<i>gib3</i> x 2 x 75	2.59 fg	1.45 e	4.03 fg	1.91	1.86 f	0.73 g
	<i>gib3</i> x 0.2 x 0	1.16 fg	1.65 e	2.81 fg	0.70	0.77 e	0.39 g
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	1.60 g	1.27 e	2.87 g	1.29	1.10 f	0.50 g
Genotipo		***	***	***	***	***	***
Salinidad		**	***	***	***	N.S.	***
N Fuente		***	***	***	***	***	***
N Conc.		***	***	***	***	***	***
Gen x Fuente		***	***	***	N.S.	***	***
Gen x Conc.		***	***	***	***	***	***
Gen x Sal		**	**	**	N.S.	N.S.	***
Gen x Fuente x	Conc.	***	***	***	N.S.	*	***
Gen x Fuente x	x Sal	*	*	*	*	*	**
Gen x Conc. x	Sal	*	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	***
Gen x Sal x Fu	ente x Conc.	**	N.S.	*	N.S.	***	N.S.

1.2. Biomasa expresada en peso seco.

Tabla 17. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH₄⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en la producción de biomasa seca y su distribución entre parte aérea y raíz (PA/R).

Factor	Nivel	PA Raíz Total PA/R Hojas Ta					Tallo
				g _{ns} t	olanta ⁻¹		
Genotino	wt	1.00 a	0.26 a	1.27 a	4.24 a	0.60 a	0.40 b
Senoupo	pro	0.89 b	0.28 a	1.17 b	3.21 b	0.44 b	0.45 a
	gib3	0.25 c	0.09 b	0.34 c	2.92 c	0.18 c	0.07 c
	0						
Salinidad	0	0.81 a	0.25 a	1.06 a	3.33 b	0.46 a	0.35 a
Samilaau	75	0.61 h	0.17 h	0.79 h	3 58 a	0.35 b	0.26 h
N Fuente	NO -	0.78 a	0.25 a	1.02.0	2 10 h	0.42	
	1103	0.78 a	0.25 a	1.05 a	5.100	0.42	0.36 a
	$\mathrm{NH_4}^+$	0.64 b	0.18 b	0.82 b	3.81 a	0.40	0.25 b
N Conc.	2 mM	0.95 a	0.22 a	1.17 a	4.51 a	0.56 a	0.39 a
	0.2 mM	0.48 b	0.20 b	0.68 b	2.39 b	0.26 b	0.22 b
Gen x Fuente	wt x NO ₃ -	1.03 a	0.29 b	1.32 a	3.64 b	0.57 ab	0.46 b
	wt x NH4 ⁺	0.98 a	0.24 c	1.21 a	4.83 a	0.64 a	0.34 c
	pro x NO ₃	1.04 a	0.34 a	1.38 a	3.09 bc	0.49 bc	0.55 a
	pro x NH_4^+	0.73 b	0.22 c	0.95 b	3.32 b	0.39 c	0.35 c
	gib3 x NO ₃ ⁻	0.28 d	0.11 d	0.39 c	2.57 c	0.20 d	0.08 d
	gib3 x NH4 ⁺	0.22 d	0.07 d	0.21 c	3.26 b	0.16 d	0.06 d
Gen x Conc.	wt x 2	1.26 a	0.23 c	1.50 a	5.87 a	0.78 a	0.48 b
	wt x 0.2	0.75 b	0.30 b	1.04 b	2.60 c	043 c	0.32 c
	pro x 2	1.27 a	0.35 a	1.62 a	3.72 b	0.66 b	0.62 a
	pro x 0.2	0.50 c	0.21 c	0.71 c	2.69 c	0.22 d	0.28 c
	<i>gib3</i> x 2	0.31 d	0.0 d	0.40 d	3.95 b	0.24 d	0.08 d
	<i>gib3</i> x 0.2	0.18 e	0.10 d	0.28 d	1.89 d	0.13 e	0.06 d
Gen x Sal	wt x 0	1.13 a	0.30 a	1.43 a	4.17 ab	0.68 a	0.45 b
	wt x 75	0.88 bc	0.23 b	1.11 b	4.30 a	0.53 b	0.35 c
	pro x 0	1.05 ab	0.35 a	1.40 a	2.91 c	0.52 b	0.53 a
	pro x 75	0.72 c	0.21 b	0.93 b	3.51 bc	0.36 c	0.36 bc
	<i>gib3</i> x 0	0.26 d	0.10 c	0.36 c	2.90 c	0.19 d	0.07 d
	<i>gib3</i> x 75	0.24 d	0.08 c	0.32 c	2.93 c	0.17 d	0.07 d
Gen x Fuente	wt x NO_3 x 2	1,36 a	0.29 b	1,66 b	4,76 b	0.77	0.59 b
x Conc.	wt x NO_3 x 0.2	0.70 c	0.29 b	0.99 e	2,52 efg	0.37	0.33 d
	wt x NH_4^+ x 2	1,16 b	0.17 c	1,33 cd	6,98 a	0.79	0.37 d
	wt x NH_4^+ x 0.2	0.79 c	0.30 b	1,10 de	2,68 de	0.49	0.30 d
	$pro \times NO_3^- \times 2$	1,42 a	0.40 a	1,82 a	3,65 c	0.70	0.72 a
	$pro \times NO_3 \times 0.2$	0.65 c	0.28 b	0.93 e	2,54 ef	0.28	0.37 d
	pro x NH_4^+ x 2	1,13 b	0.30 b	1,42 c	3,80 c	0.62	0.51 c
	$pro \times NH_4 \times 0.2$	0.34 d	0.14 cd	0.48 f	2,85 de	0.16	0.18 e
	$gib3 \times NO_3 \times 2$	0.34 de	0.11 de	0.44 fg	3,21 cd	0.25	0.09 f
	$glb3 \times NO_3 \times 0.2$	0.22 de	0.12 de	0.33 fg	1,93 fg	0.15	0.07 f
	$glb3 \times NH_4 \times 2$	0.29 de	0.07 e	0.36 fg	4,68 b	0.22	0.07 f
	$glb3 \times NH_4 \times 0.2$	0.15 e	0.08 e	0.23 g	1,84 g	0.10	0.05 f
		1.00	0.051		1055	0.63	0.55
Gen x Fuente	wt x NO ₃ x 0	1,22 ab	0.32 b	1,55 ab	4,06 bc	0.69 a	0.53
	wt x NO ₃ x 75	0.84 cd	0.26 c	1,10 cd	3,22 bcd	0.45 b	0.40

x Sal	wt x NH_4^+ x 0	1,03 bc	0.28 bc	1,31 bc	4,29 b	0.66 a	0.37
	wt x NH_4^+ x 75	0.92 cd	0.20 de	1,12 cd	5,38 a	0.62 a	0.30
	pro x $NO_3^- x 0$	1,30 a	0.44 a	1,74 a	2,91 cd	0.63 a	0.67
	pro x NO_3^- x 75	0.77 cd	0.24 cd	1,01 cd	3,27 bcd	0.35 bc	0.42
	pro x NH_4^+ x 0	0.79 cd	0.26 c	1,05 cd	2,91 cd	0.40 b	0.39
	pro x NH_4^+ x 75	0.68 d	0.18 e	0.85 d	3,74 bc	0.38 b	0.30
	$gib3 \times NO_3 \times 0$	0.32 e	0.13 f	0.45 e	2,54 d	0.23 cd	0.08
	<i>gib3</i> x NO ₃ ⁻ x 75	0.24 e	0.09 f	0.33 e	2,60 d	0.16 d	0.08
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0$	0.20 e	0.07 f	0.27 e	3,26 bcd	0.15 d	0.05
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 75$	0.23 e	0.08 f	0.31 e	3,26 bcd	0.17 d	0.06
Gen x Conc. x	wt x 2 x 0	1,44	0.25	1,69	5,96	0.88	0.56 b
Sal	wt x 2 x 75	1,08	0.21	1,30	5,78	0.68	0.40 c
	wt x 0.2 x 0	0.81	0.35	1,16	2,38	0.47	0.34 cd
	wt x 0.2 x 75	0.68	0.24	0.92	2,82	0.38	0.30 cd
	<i>pro</i> x 2 x 0	1,52	0.43	1,95	3,64	0.78	0.74 a
	pro x 2 x 75	1,03	0.27	1,30	3,81	0.53	0.49 b
	pro x 0.2 x 0	0.57	0.27	0.85	2,19	0.25	0.32 cd
	pro x 0.2 x 75	0.42	0.15	0.57	3,20	0.19	0.23 d
	<i>gib3</i> x 2 x 0	0.34	0.09	0.43	4,17	0.26	0.08 e
	<i>gib3</i> x 2 x 75	0.29	0.08	0.37	3,73	0.21	0.08 e
	<i>gib3</i> x 0.2 x 0	0.18	0.11	0.29	1,64	0.13	0.06 e
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	0.18	0.09	0.27	2,13	0.13	0.06 e
Genotipo		***	***	***	***	***	***
Salinidad		***	***	***	**	***	***
N Fuente		***	***	***	***	N.S.	***
N Conc.		***	*	***	***	***	***
Gen x Fuente		***	***	***	***	***	***
Gen x Conc.		***	***	***	***	***	***
Gen x Sal		***	***	***	*	***	***
Gen x Fuente x	Conc.	**	***	**	***	N.S.	**
Gen x Fuente x	x Sal	*	**	*	***	*	N.S.
Gen x Conc. x	Sal	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	*
Gen x Sal x Fu	ente x Conc.	N.S.	N.S.	N.S.	***	N.S.	N.S.

2. Peso específico de la hoja.

Tabla 18. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH₄⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en el peso específico de la hoja (LSM) en plantas.

Factor	Nivel	LSM	LSM	
		$(mg_{nf} cm^2)$	$(mg_{ns} cm^2)$	
Genotipo	wt	26.67 b	3.43 b	
F -	pro	23.19 с	3.15 c	
	gib3	38.29 a	3.71 a	
Salinidad	0	25.16 b	3.79 a	
~	75	30.73 a	2.99 b	
N Fuente	NO ₃ -	28.85 a	3.28 b	
	NH4 ⁺	26.98 b	3.49 a	
N Conc.	2 mM	27.10 b	3.23 b	
	0.2 mM	28.85 a	3.55 a	
Gen x Fuente	wt x NO ₃ ⁻	28.69 c	3.37 a	
	wt x NH ₄ ⁺	24.64 d	3.49 a	
	pro x NO ₃	22.97 d	2.89 b	
	pro x NH_4^+	23.40 d	3.41 ab	
	gib3 x NO ₃	37.93 b	3.75 a	
	$gib3 \times NH_4^+$	38.78 a	3.66 a	
Gen x Conc.	wt x 2	25.50	3.17	
	wt x 0.2	27.83	3.69	
	pro x 2	22.39	3.00	
	pro x 0.2	23.99	3.31	
	gib3 x 2	36.57	3.69	
	gib3 x 0.2	40.58	3.73	
Gen x Sal	wt x 0	24.42	3.78 a	
	wt x 75	28.91	3.08 c	
	pro x 0	20.05	3.50 b	
	pro x 75	26.33	2.80 d	
	<i>gib3</i> x 0	35.19	4.27 a	
	gib3 x 75	41.40	3.15 cd	
Gen x Fuente x Conc.	wt x NO ₃ x 2	27.81	3.07 bcde	
	wt x NO_3^- x 0.2	29.56	3.67 bc	
	wt x NH_4^+ x 2	23.18	3.26 bcde	
	wt x NH_4^+ x 0.2	26.11	3.72 ab	
	$pro \times NO_3 \times 2$	22.46	2.63 e	
	$pro \times NO_3^- \times 0.2$	23.49	3.15 cde	
	pro x NH ₄ x 2	22.31	3.37 de	
	$pro \times NH_4 \times 0.2$	24.50	3.46 bcd	
	$glb3 \times NO_3 \times 2$	38.16	3.91 bcd	
	$glb3 \times NO_3 \times 0.2$	37.70	3.59 bcde	
	$glb3 \times NH_4 \times 2$	34.99	3.48 bcde	
	$glb3 \times NH_4 \times 0.2$	46.35	4.03 a	
a b		2 () (2.02	
Gen x Fuente x Sal	wt x $NO_3 \times 0$	26.04	3.92 a	
	wt x NO ₃ x 75	31.34	2.82 cd	
	wt x NH_4 x 0	22.81	3.65 a	

	wt x NH_4^+ x 75	26.48	3.33 bc
	$pro \times NO_3 \times 0$	19.59	3.13 bc
	$pro \times NO_3 \times 75$	26.35	2.65 d
	$pro \ge NH_4^+ \ge 0$	20.51	3.88 ab
	$pro \times NH_4^+ \times 75$	26.30	2.95 cd
	$gib3 \times NO_3 \times 0$	35.46	4.45 a
	$gib3 \ge NO_3^- \ge 75$	40.39	3.04 d
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0$	34.82	4.04 ab
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 75$	42.74	3.28 cd
Gen x Conc. x Sal	wt x 2 x 0	23.72	3.28
	wt x 2 x 75	27.27	3.06
	wt x 0.2 x 0	25.12	4.29
	wt x 0.2 x 75	30.55	3.10
	<i>pro</i> x 2 x 0	20.08	3.25
	pro x 2 x 75	24.69	2.75
	pro x 0.2 x 0	20.02	3.76
	pro x 0.2 x 75	27.96	2.86
	<i>gib3</i> x 2 x 0	34.90	4.14
	<i>gib3</i> x 2 x 75	38.25	3.25
	<i>gib3</i> x 0.2 x 0	35.57	4.46
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	45.59	3.01
Genotipo		***	***
Salinidad		***	**
N Fuente		***	***
N Conc.		***	***
Gen x Fuente		***	***
Gen x Conc.		N.S.	*
Gen x Sal		N.S.	N.S.
Gen x Fuente x Conc.		N.S.	**
Gen x Fuente x Sal		N.S.	***
Gen x Conc. x Sal		N.S.	N.S.
Gen x Sal x Fuente x	Conc.	N.S.	***

3. Longitud de tallo.

Tabla 19. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH_4^+) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en la longitud del tallo.

Factor	Nivel	Longitud de tallo
		(cm)
Genotino	wt	7.552 b
Genetipo	pro	11.151 a
	gib3	4.655 c
Salinidad	0	8.053 a
Sumu	75	7.519 b
N Fuente	NO ₂ -	8 331 a
	NH4 ⁺	7.241 b
N Conc	2 mM	7 924
N Conc.	0.2 mM	7 648
	0.2 miti	7.010
Can y Fuanta	wt x NO ₂	8 042 c
Gen x Fuente	wt x NH ⁺	7.062 d
	$\frac{1}{1000}$ $\frac{1}{1000}$	12 177 a
	$\frac{pro \times NO_3}{pro \times NH_4^+}$	10.125 b
	$gih3 \times NO_2^-$	4 775 e
	$gib3 \times NH_4^+$	4.535 e
	3	
Gen x Conc	wt x 2	7 583 c
den x conc.	$\frac{1}{2}$ wt x 0.2	7 521 c
	$pro \ge 2$	11.615 a
	$pro \ge 0.2$	10.688 b
	gib3 x 2	4.575 d
	gib3 x 0.2	4.735 d
Gen x Sal	wt x 0	7.917 c
	wt x 75	7.187 d
	pro x 0	11.656 a
	pro x 75	10.646 b
	<i>gib3</i> x 0	4.585 e
	<i>gib3</i> x 75	4.725 e
Gen x Fuente x Conc.	wt x NO ₃ x 2	8.542 d
	wt x NO_3 x 0.2	7.542 e
	wt x NH ₄ ⁺ x 2	6.625 f
	wt x NH_4^+ x 0.2	7.500 e
	$pro \times NO_3 \times 2$	12.521 a
	$pro \times NO_3^- \times 0.2$	11.833 a
	$pro \times NH_4^+ \times 2$	10.708 b
	$pro \times NH_4^+ \times 0.2$	9.542 c
	gib3 x NO ₃ x 2	4.650 g
	$gib3 \times NO_3 \times 0.2$	4.900 g
	$gib3 \times NH_4 \times 2$	4.500 g
	$gib3 \times NH_4 \times 0.2$	4.570 g
Gen x Fuente x Sal	wt x NO ₃ x 0	8.375
	wt x NO ₃ x 75	7.708
	wt x NH ₄ x 0	7.458

	wt x NH ₄ ⁺ x 75	6.667
	pro x NO_3^- x 0	12.771
	$pro \times NO_3^- \times 75$	11.583
	pro x NH_4^+ x 0	10.542
	pro x NH_4^+ x 75	9.708
	$gib3 \times NO_3 \times 0$	4.700
	<i>gib3</i> x NO ₃ x 75	4.850
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0$	4.470
	<i>gib3</i> x NH ₄ ⁺ x 75	4.600
Gen x Conc. x Sal	wt x 2 x 0	8.167
	wt x 2 x 75	7.000
	wt x 0.2 x 0	7.667
	wt x 0.2 x 75	7.375
	<i>pro</i> x 2 x 0	12.229
	pro x 2 x 75	11.000
	pro x 0.2 x 0	11.083
	pro x 0.2 x 75	10.292
	<i>gib3</i> x 2 x 0	4.500
	<i>gib3</i> x 2 x 75	4.650
	<i>gib3</i> x 0.2 x 0	4.670
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	4.800
Genotipo		***
Salinidad		***
N Fuente		N.S.
N Conc.		***
Gen x Fuente		***
Gen x Conc.		**
Gen x Sal		**
Gen x Fuente x Conc.		**
Gen x Fuente x Sal		N.S.
Gen x Conc. x Sal		N.S.
Gen x Sal x Fuente x C	Conc.	*

4. Estado nutricional de las plantas.

4.1. Concentración de los iones Na⁺ y Cl⁻.

4.1.1. Raíz.

Tabla 20. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH₄⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en la concentración de los iones Na⁺ y Cl⁻, en raíz.

Factor	Nivel	Na ⁺	Cl -
		mg	gps ⁻¹
Genotipo	wt	12.80	16.79 a
	pro	14.10	13.16 b
	gib3	13.27	16.84 a
Salinidad	0	0.35 b	8.64 b
	75	26.44 a	22.55 a
N Fuente	NO ₃	13.64	15.23
ппиние	NH4 ⁺	13.15	15.96
N Conc.	2 mM	13.57	15.93
	0.2 mM	13 21	15.26
Gen x Fuente	wt x NO ₂ ⁻	13.70	12.53
Sen A Fuchte	wt x NH ₄ ⁺	11.91	21.05
	pro x NO ₃	14.46	16.80
	pro x NH_4^+	13.74	9.52
	gib3 x NO ₃	12.75	16.37
	$gib3 \times NH_4^+$	13.80	17.32
Gen x Conc.	wt x 2	13.33	19.76
	wt x 0.2	12.28	13.82
	pro x 2	14.42	10.54
	pro x 0.2	13.78	15.77
	gib3 x 2	12.97	17.49
	gib3 x 0.2	13.57	16.19
Gen x Sal	wt x 0	0.32	9.11 c
	wt x 75	25.28	24.47 a
	pro x 0	0.35	5.84 c
	pro x 75	27.85	20.48 a
	<i>gib3</i> x 0	0.37	10.97 c
	<i>gib3</i> x 75	26.18	22.71 b
Gen x Fuente x Conc.	wt x NO ₃ x 2	14.26	14.86
	wt x NO_3 x 0.2	13.14	10.21
	wt x NH ₄ ⁺ x 2	12.40	24.66
	wt x NH_4^+ x 0.2	11.42	17.44
	$pro \times NO_3 \times 2$	14.65	4.46
	$pro \times NO_3^- \times 0.2$	14.28	14.58
	$pro \times NH_4 \times 2$	14.20	16.63
	$pro \times NH_4 \times 0.2$	13.29	16.97
	$gib3 \times NO_3 \times 2$	12.65	15.56
	$gib3 \times NO_3 \times 0.2$	12.85	17.17
	gib3 x NH ₄ ⁺ x 2	13.30	19.43

	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0.2$	14.30	15.20
Gen x Fuente x Sal	wt x $NO_3 x 0$	0.27	4.81
	wt x NO ₃ x 75	27.13	20.26
	wt x NH_4^+ x 0	0.38	13.42
	wt x NH_4^+ x 75	23.44	28.69
	$pro \times NO_3 \times 0$	0.25	5.34
	$pro \times NO_3 \times 75$	28.67	28.25
	$pro \times NH_4^+ \times 0$	0.46	6.33
	<i>pro</i> x NH_4^+ x 75	27.03	12.71
	$gib3 \ge NO_3 \ge 0$	0.28	7.33
	$gib3 \times NO_3^- \times 75$	25.21	25.41
	$gib3 \times NH_4 \times 0$	0.45	14.62
	$gib3 \ge NH_4 \ge 75$	27.14	20.01
Gen x Conc. x Sal	wt x 2 x 0	0.30	8.95
	wt x 2 x 75	26.36	30.58
	wt x 0.2 x 0	0.34	9.28
	wt x 0.2 x 75	24.21	18.37
	<i>pro</i> x 2 x 0	0.35	3.54
	pro x 2 x 75	28.49	17.55
	pro x 0.2 x 0	0.36	8.13
	pro x 0.2 x 75	27.21	23.41
	<i>gib3</i> x 2 x 0	0.38	10.07
	<i>gib3</i> x 2 x 75	25.56	24.92 11.88
	<i>gib3</i> x 0.2 x 0	0.35	
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	26.79	20.49
Genotipo		N.S.	***
Salinidad		***	***
N Fuente		N.S.	N.S.
N Conc.		N.S.	N.S.
Gen x Fuente		N.S.	*
Gen x Conc.		N.S.	N.S.
Gen x Sal		N.S.	***
Gen x Fuente x Conc.		N.S.	***
Gen x Fuente x Sal		N.S.	N.S.
Gen x Conc. x Sal		N.S.	N.S.
Gen x Sal x Fuente x (Conc.	N.S.	*

4.1.2. Hoja.

Tabla 21. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH₄⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en la concentración de los iones Na⁺ y Cl⁻, en hoja.

Factor	Nivel	Na ⁺	Cl ⁻
		mg	g _{ps} ⁻¹
Genotipo	wt	20.25 b	12.50 c
	pro	31.96 a	26.02 a
	gib3	21.18 b	20.27 b
Salinidad	0	0.27 b	4.55 b
~	75	48.66 a	34.65 a
N Fuente	NO ₃ -	29.63 a	19.99
	NH4 ⁺	19.30 b	19.21
N Conc	2 mM	21.37 b	17 41 b
	0.2 mM	27.57 0	21.70 a
	0.2 mivi	21.31 a	21./9 a
Con r Everte	ut v NO -	26.65	13.55
Gen x Fuente	wt x NU ₃	12.86	13.33
		15.60	22.21
	$pro \times NO_3$	26.21	23.21
	$pio \times NI_4$ $gib3 \times NO^-$	20.21	23.19
	$gib3 \times NO_3$	17.84	17.35
		17.04	17.55
Con a Con o	wt v 2	17.91	<u> </u>
Gen x Conc.	wt x 0.2	22.70	16.61
		22.70	27.05
	$pro \times 0.2$	34.50	25.00
	$pi0 \times 0.2$ $gib3 \times 2$	16.86	16 79
	$gib3 \times 0.2$	25.50	23.75
	gi05 x 0.2	23.30	25.15
Con y Sol	wt y 0	0.20 c	4 86 d
Geli x Sai	wt x 75	40.31 b	20.15 c
	$pro \ge 0$	0.33 c	3 79 d
	$pro \times 75$	63.60 a	48.26 a
	$gib3 \ge 0$	0.27 c	5.00 d
	gib3 x 75	42.09 b	35.54 b
Gen x Fuente x Conc.	wt x NO ₃ x 2	25.72	1.70 b
	wt x NO_3 x 0.2	27.58	25.40 ab
	wt x NH ₄ ⁺ x 2	9.89	15.07 ab
	wt x NH ₄ ⁺ x 0.2	17.82	7.82 ab
	pro x NO ₃ x 2	36.26	29.16 a
	$pro \times NO_3 \times 0.2$	39.18	28.51 ab
	$pro \times NH_4^+ \times 2$	22.59	24.94 ab
	$pro \times NH_4^+ \times 0.2$	29.82	21.49 ab
	gib3 x NO ₃ x 2	22.87	22.06 ab
	$gib3 \times NO_3 \times 0.2$	26.16	24.32 ab
	$gib3 \times NH_4^+ \times 2$	10.85	11.52 ab
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0.2$	24.83	23.18 ab
Gen x Fuente x Sal	wt x NO ₃ x 0	0.23	3.08
	wt x NO_3^- x 75	53.07	24.03
	wt x NH ₄ ⁺ x 0	0.17	6.64

	wt x NH ₄ ⁺ x 75	27.55	16.26
	pro x NO ₃ x 0	0.29	2.72
	$pro \times NO_3 \times 75$	75.15	43.70
	$pro \ge NH_4^+ \ge 0$	0.37	4.86
	$pro \ge NH_4^+ \ge 75$	52.04	52.81
	$gib3 \times NO_3 \times 0$	0.28	4.73
	<i>gib3</i> x NO ₃ x 75	48.76	41.66
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0$	0.27	5.27
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 75$	35.42	29.42
Gen x Conc. x Sal	wt x 2 x 0	0.19	5.49
	wt x 2 x 75	35.42	11.29
	wt x 0.2 x 0	0.20	4.22
	wt x 0.2 x 75	45.20	29.01
	<i>pro</i> x 2 x 0	0.26	4.70
	pro x 2 x 75	58.60	49.40
	pro x 0.2 x 0	0.40	2.88
	pro x 0.2 x 75	68.59	47.12
	<i>gib3</i> x 2 x 0	0.26	4.50
	<i>gib3</i> x 2 x 75	33.46	29.08
	<i>gib3</i> x 0.2 x 0	0.29	5.51
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	50.71	42.00
Genotipo		***	***
Salinidad		***	***
N Fuente		***	N.S.
N Conc.		***	***
Gen x Fuente		N.S.	***
Gen x Conc.		N.S.	***
Gen x Sal		***	***
Gen x Fuente x Conc.		N.S.	***
Gen x Fuente x Sal		N.S.	***
Gen x Conc. x Sal		N.S.	***
Gen x Sal x Fuente x Conc.		N.S.	***

4.1.3. Tallo.

Tabla 22. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH₄⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en la concentración de los iones Na⁺ y Cl⁻, en tallo.

Factor	Nivel	Na ⁺	Cl ⁻
		mg g	-1 >s
Genotipo	wt	15.54 b	31.69 a
Senethe	pro	21.14 a	19.89 b
	gih3	19.54 a	21.87 b
	8		
Salinidad	0	0.84 b	7 79 b
Saminuau	75	36 64 a	41 17 a
	10	50.014	11.1 <i>/</i> w
N Euonto	NO ₂ ⁻	19.32	23 31 h
IV Fuence	NH ⁺	18.16	25.51 0 25.65 a
	11114	10.10	23.05 u
N Cone	$2 \mathrm{mM}$	17.75	22.45 h
		10.72	25.45 0
	0.2 11111	19.73	25.52 a
C E	ant a NO -	16.00	20.16
Gen x Fuente	wt x NO ₃	16.90	29.16
	wt x NH ₄	14.17	34.22
	$pro \times NO_3$	20.02	18.03
	$pro \times NH_4$	22.26	21.75
	$glos \times NO_3$	21.03	22.74
	<i>glb3</i> X NH ₄	18.05	20.99
		14.50	20.01
Gen x Conc.	wt x 2	14.59	30.91
	wt x 0.2	16.49	32.47
	pro x 2	20.28	18.78
	$pro \ge 0.2$	19.29	21.00
	$glos \times 2$	18.58	20.65
	glos x 0.2	20.70	23.08
Com - Col	with will be	0.42 a	11.54 a
Gen x Sal	wt x 0	0.42 C	51.94 c
	wt x /3	50.05 0 1.26 c	31.04 a
	pro x 75	1.20 C	36.41 h
	$pi0 \times 75$	0.83 c	8.46 c
	$gib3 \times 75$	38.26.2	35.27 h
		50.20 a	55.270
Con y Evente y Cone	$\mathbf{w} \mathbf{t} \mathbf{x} \mathbf{N} \mathbf{O}_{\mathbf{x}}^{-} \mathbf{x} 2$	16.84	27.90
Gen x Fuente x Conc.	wt x NO_2 x 0.2	16.97	30.42
	wt x NH_{+}^{+} x 2	12.33	33.93
	wt x NH_4^+ x 0.2	16.01	34.52
	$pro_{\rm X} NO_{\rm 2} \times 2$	20.99	20.35
	$pro \times NO_2^- \times 0.2$	19.06	23.15
	$pro \times NH_4^+ \times 2$	19.58	17.20
	$pro \times NH_4^+ \times 0.2$	24.93	18.86
	$gib3 \times NO_3 \times 2$	20.79	22.48
	$gib3 \ge NO_3 \ge 0.2$	21.27	23.00
	$gib3 \times NH_4^+ \times 2$	15.98	18.82
	<i>gib3</i> x NH ₄ ⁺ x 0.2	20.13	23.16
Gen x Fuente x Sal	wt x $NO_3^- x 0$	0.45	6.01 de
	wt x NO_3^- x 75	33.36	52.31 a
	wt x NH ₄ ⁺ x 0	0.40	17.07 c

	wt x NH ₄ ⁺ x 75	27.94	51.38 a
	pro x NO_3^- x 0	0.61	2.35 e
	$pro \times NO_3^- \times 75$	39.43	33.71 b
	$pro \ge NH_4^+ \ge 0$	1.90	4.39 de
	<i>pro</i> x NH_4^+ x 75	42.61	39.11 b
	$gib3 \times NO_3 \times 0$	0.66	7.52 de
	<i>gib3</i> x NO ₃ ⁻ x 75	41.39	37.97 b
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0$	0.99	9.41 d
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 75$	35.12	32.57 b
Gen x Conc. x Sal	wt x 2 x 0	0.43	12.87
	wt x 2 x 75	28.74	48.96
	wt x 0.2 x 0	0.42	10.21
	wt x 0.2 x 75	32.57	54.73
	pro x 2 x 0	0.49	1.90
	pro x 2 x 75	40.08	35.66
	pro x 0.2 x 0	2.03	4.84
	pro x 0.2 x 75	41.96	37.16
	<i>gib3</i> x 2 x 0	0.77	8.30
	<i>gib3</i> x 2 x 75	35.99	33.00
	<i>gib3</i> x 0.2 x 0	0.88	8.62
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	40.52	37.54
Genotipo		***	***
Salinidad		***	***
N Fuente		N.S.	*
N Conc.		N.S.	*
Gen x Fuente		N.S.	*
Gen x Conc.		N.S.	N.S.
Gen x Sal		**	***
Gen x Fuente x Conc.		N.S.	N.S.
Gen x Fuente x Sal		N.S.	**
Gen x Conc. x Sal		N.S.	N.S.
Gen x Sal x Fuente x	Conc.	N.S.	**

4.2. Concentración de los cationes K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y el ratio Na⁺/K⁺.

4.2.1. Raíz.

Tabla 23. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH₄⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en la concentración de los cationes K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y el ratio Na⁺/K⁺, en raíz.

Factor	Nivel	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺ / K ⁺
			(mg	g ⁻¹)	
Genotipo	wt	41.14 b	2.90	4.46 b	0.36 b
F -	pro	32.92 c	2.91	4.02 c	0.53 a
	gib3	47.83 a	3.04	5.08 a	0.32 c
Salinidad	0	45.87 a	3.51 a	5.00 a	0.01 b
	75	35.39 b	2.39 b	4.04 b	0.80 a
N Fuente	NO ₃ -	42.55 a	3.59 a	6.34 a	0.41
it i utilite	NH4 ⁺	38.71 b	2.31 b	2.69 b	0.39
N Conc	2 mM	38 45 h	2.72 h	3 71 b	0.40
it conc.	0.2 mM	42.81 a	3 19 a	5 32 a	0.40
	0.2 111/1	12.01 4	5.17 u	0.02 4	0.10
Gen y Fuente	wt x NO ₂ -	42.61 h	3.65	6 56 a	0 39 ab
Gen x ruente	wt x NH ⁺	39.67 h	2.16	2 35 c	0.37 ab
	pro x NO ⁻	33.41 c	3.40	5.48 h	0.57 a
	$pro x NH^+$	32.44 c	2 42	2.55 c	0.37 d
	$aib_3 \times NO_2^-$	51.63.9	3 72	6 99 a	0.48 db
	$gib3 \times NO_3$	44 02 h	2 35	3.17 c	0.26 b
	gi05 x 1114	44.02.0	2.33	5.170	0.55 40
Con y Cono	wty?	37.24 h	2 70	3 73	0.38
Gen x Conc.	wt x 0.2	45.04 a	2.70	5.18	0.38
	$mro \times 2$	32.36 h	2.63	3 32	0.55
	$pro \times 0.2$	32.30 b	2.03	4.71	0.54
	$pro \times 0.2$	45 75 p	2.82	4.71	0.34
	$gib3 \times 0.2$	49.75 a	3.26	6.07	0.31
	gius x 0.2	49.90 a	5.20	0.07	0.32
Con y Sol	wt v 0	15.83	3 11 2	5.01	0.01.d
Gen x Sai	wt x 0	45.85	2.44 a	3.01	0.01 u
	wt x /J	38.00	2.30 0	4.31	0.72 0
	$pro \times 0$	26.90	2.51 h	4.31	1.04 a
	gib2 x 0	52.94	2.510	5.67	0.01 d
	glos = 0	<u> </u>	2.20 h	3.07	0.62 a
	gius x 75	42.79	2.30 0	4.49	0.02 C
Con y Fuonto y	wt x NO_{2} x 2	40.68	3.89	6 00 b	0.40
Gen x ruente x	wt x $NO_3 \times 2$	44.53	3.40	7 12 a	0.40
Conc.	wt x NH_{c}^{+} x 2	33.80	1.50	1.12 d	0.36
	wt x NH_4^+ x 0.2	45 54	2.81	3.24 e	0.30
	$r_{14} \times 0.2$	34 73	3.63	5.38 bc	0.52
	$pro \times NO_3 \times 2$	32.08	3.18	5.58 bc	0.50
	$pro x NH^+ x 2$	29.98	1.64	1.26 f	0.35
	$pro \times NH_4^+ \times 0.2$	34.90	3 21	3.84 de	0.50
	$aih3 \times NO^{-1} \times 2$	52 39	3.83	6.43 ab	0.26
	$gih3 \times NO_{2} \times 0.2$	50.86	3.62	7 55 a	0.20
	$gib3 \times NH^+ \times 2$	39.10	1.80	1 74 f	0.35
	$gib3 \times NH^+ \times 0.2$	48 94	2.90	4 59 cd	0.35
	5105 A 11114 A 0.2		2.70	ч.57 Cu	0.50
Con y Fuonto y	wt x NO ₂ x 0	50.08	4 45 ah	7 55 2	0.01 f
Gen x ruente x	WEA 1103 A 0	50.00	а. т. ја ао	1.55 a	0.011

Sal	wt x NO ₃ x 75	35.14	2.84 c	5.58 b	0.77 c
	wt x NH ₄ ⁺ x 0	41.59	2.42 cdef	2.47 c	0.01 f
	wt x NH ₄ ⁺ x 75	37.75	1.89 f	2.23 c	0.66 d
	pro x $NO_3^- x 0$	41.43	3.90 b	5.85 b	0.01 f
	$pro \times NO_3^- \times 75$	25.38	2.91 c	5.11 b	1.14 a
	$pro x NH_4^+ x 0$	36.37	2.74 cd	2.78 с	0.01 f
	<i>pro</i> x NH_4^+ x 75	28.51	2.10 def	2.32 c	0.95 b
	$gib3 \ge NO_3 \ge 0$	56.76	4.77 a	7.83 a	0.01 f
	$gib3 \ge NO_3 \ge 75$	46.50	2.68 cde	6.15 b	0.55 e
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0$	48.97	2.77 с	3.51 c	0.01 f
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 75$	39.08	1.93 ef	2.82 c	0.70 cd
Gen x Conc. x	wt x 2 x 0	39.25	3.33	4.01	0.01
Sal	wt x 2 x 75	35.23	2.07	3.45	0.75
	wt x 0.2 x 0	52.41	3.55	6.01	0.01
	wt x 0.2 x 75	37.66	2.66	4.35	0.69
	pro x 2 x 0	36.28	3.01	3.36	0.01
	pro x 2 x 75	28.43	2.26	3.28	1.01
	pro x 0.2 x 0	41.53	3.63	5.27	0.01
	pro x 0.2 x 75	25.46	2.76	4.15	1.08
	<i>gib3</i> x 2 x 0	48.11	3.48	4.13	0.01
	gib3 x 2 x 75	43.39	2.15	4.04	0.60
	<i>gib3</i> x 0.2 x 0	57.61	4.06	7.21	0.01
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	42.19	2.46	4.94	0.64
Genotipo		***	N.S.	***	***
Salinidad		***	***	***	***
N Fuente		***	***	***	N.S.
N Conc.		***	***	***	N.S.
Gen x Fuente		*	N.S.	***	***
Gen x Conc.		*	N.S.	N.S.	N.S.
Gen x Sal		N.S.	***	N.S.	***
Gen x Fuente x (Conc.	N.S.	N.S.	**	N.S.
Gen x Fuente x	Sal	N.S.	**	*	***
Gen x Conc. x S	al	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Gen x Sal x Fuer	ite x Conc.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

4.2.2. Hoja.

Tabla 24. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH₄⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en la concentración de los cationes K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y el ratio Na⁺/K⁺, en hoja.

Factor	Nivel	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺ / K ⁺
			(mg g	-1)	
Genotipo	wt	21.30 a	16.05 b	7.66	1.29 c
1	pro	19.30 b	18.16 a	8.03	2.83 a
	gib3	18.77 b	15.34 b	7.79	1.78 b
Salinidad	0	25.33 a	21.82 a	9.90 a	0.01 b
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~	75	14.25 b	11.21 b	5.75 b	3.92 a
N Fuente	NO ₃ ⁻	19.86	19.58 a	9.10 a	2.57 a
i i u unice	NH4 ⁺	19.72	13.45 b	6.55 b	1.36 b
N Conc	2 mM	21.96 a	16.01 b	8.11 a	1.54 b
it cone.	0.2 mM	17.62 b	17.02 a	7 54 b	2.40 a
		11.02 0	17:02 4	,	2.10 4
Gen y Fuente	wt x NO ₂	22.42	20.80 a	9 87 a	1 69 h
Och x Fuchte	wt x NH4 ⁺	20.12	11 29 d	5 44 c	0.90 b
	$\frac{1}{100} \times NO_2^{-1}$	17.85	20.42 ab	8 76 ab	3 87 a
	$pro x NH_4^+$	20.75	15.90 bc	7 30 h	1 78 h
	$gih3 \times NO_2^-$	19.31	17.53 abc	8 67 ab	2.15 b
	$gib3 \times NH_4^+$	18.23	13.16 cd	6.90 bc	1.41 b
	0,000 00004				
Gen y Conc	wt x 2	25.01 a	15.80	8 11	0.91
Gen x Conc.	$\frac{\text{wt x } 2}{\text{wt x } 0.2}$	17 59 h	16.29	7.21	1.68
	$pro \ge 2$	20.54 ab	17.95	8.19	2 36
	$pro \times 0.2$	18.05 h	18.37	7.88	3 29
	$gib3 \ge 2$	20.31 ab	14.28	8.04	1.34
	gib3 x 0.2	17.23 b	16.40	7.54	2.23
	8				
Gen v Sal	wt x 0	25.60	20 24 b	9 27 a	0 01 d
Gen x Sur	wt x 75	17.00	11.86 c	6.05 b	2.58 c
	pro x 0	25.68	25.16 a	10.79 a	0.01 d
	pro x 75	12.92	11.16 a	5.27 b	5.64 a
	<i>gib3</i> x 0	24.71	20.06 b	9.65 a	0.01 d
	gib3 x 75	12.84	10.63 c	5.93 b	3.55 b
Gen x Fuente x	wt x $NO_3^-$ x 2	27.60 a	23.44 a	11.52 a	1.35
Conc.	wt x NO ₃ x 0.2	17.24 b	18.17 abc	8.22 b	2.02
	wt x NH ₄ ⁺ x 2	22.42 ab	8.16 e	4.69 c	0.47
	wt x NH ₄ ⁺ x 0.2	17.93 b	14.42 cde	6.20 c	1.33
	pro x NO ₃ ⁻ x 2	20.85 ab	22.09 ab	9.11 b	3.30
	$pro \times NO_3^- \times 0.2$	14.84 b	18.74 abc	8.42 b	4.45
	$pro \times NH_4^+ \times 2$	20.24 ab	13.82 cde	7.27 bc	1.43
	$pro \times NH_4^+ \times 0.2$	21.26 ab	17.99 abc	7.33 bc	2.13
	$gib3 \times NO_3 \times 2$	20.29 b	17.84 abc	9.40 b	1.92
	$gib3 \ge NO_3 \ge 0.2$	18.34 b	17.22 bcd	7.95 b	2.39
	$gib3 \times NH_4^+ \times 2$	20.33 a	10.73 de	6.67 bc	0.76
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0.2$	16.13 b	15.59 bcd	7.13 bc	2.06
Gen x Fuente x	wt x NO ₃ x 0	28.12	26.21	12.35	0.01 e
Sal	wt x $NO_3$ x 75	16.73	15.40	7.40	3.37 bc
	wt x NH ₄ ⁺ x 0	23.08	14.26	6.19	0.01 e

	wt x NH ₄ ⁺ x 75	17.27	8.31	4.70	1.80 d
	pro x $NO_3$ x 0	25.24	28.70	12.03	0.01 e
	$pro \times NO_3 \times 75$	10.46	12.14	5.50	7.74 a
	$pro x NH_4^+ x 0$	26.12	21.63	9.55	0.01 e
	$pro \times NH_4^+ \times 75$	15.38	10.18	5.05	3.54 bc
	gib3 x NO ₃ x 0	26.40	24.43	11.61	0.01 e
	<i>gib3</i> x NO ₃ ⁻ x 75	12.23	10.63	5.74	4.30 b
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0$	23.02	15.69	7.68	0.01 e
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 75$	13.45	10.63	6.12	2.81 cd
Gen x Conc. x	wt x 2 x 0	30.12	18.66	9.28	0.01
Sal	wt x 2 x 75	19.91	12.93	6.93	1.82
	wt x 0.2 x 0	21.08	21.81	9.26	0.01
	wt x 0.2 x 75	14.09	10.78	5.16	3.34
	<i>pro</i> x 2 x 0	27.05	24.07	10.36	0.01
	pro x 2 x 75	14.04	11.84	6.02	4.72
	pro x 0.2 x 0	24.30	26.25	11.22	0.02
	pro x 0.2 x 75	11.80	10.48	4.53	6.56
	<i>gib3</i> x 2 x 0	27.18	17.75	9.47	0.01
	<i>gib3</i> x 2 x 75	13.45	10.82	6.60	2.67
	<i>gib3</i> x 0.2 x 0	22.24	22.37	9.82	0.01
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	12.22	10.44	5.26	4.44
Genotipo		*	***	N.S.	***
Salinidad		***	***	***	***
N Fuente		N.S.	***	***	***
N Conc.		***	*	*	***
Gen x Fuente		*	***	***	***
Gen x Conc.		*	N.S.	N.S.	N.S.
Gen x Sal		N.S.	***	***	***
Gen x Fuente x C	onc.	*	*	**	N.S.
Gen x Fuente x S	al	NS	NS	NS	***
Gen y Conc y Sa	1	N S	N S	N S	NS
Con y Sol y Fuon	i cono	N.S.	N.S.	*	N.S.
Gen a Sal a ruen		IN.O.	IN.D.		IN.O.

# 4.2.3. Tallo.

Tabla 25. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH₄⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en la concentración de los cationes K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y el ratio Na⁺/K⁺, en tallo.

Factor	Nivel	<b>K</b> ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺ / K ⁺
			(mg	g ⁻¹ )	
Genotino	wt	42.63 a	7.19 b	4.58 b	0.59 c
ounoupo	pro	37.15 b	6.80 b	4.32 b	1.01 b
	gib3	34.24 b	8.73 a	6.01 a	1.34 a
	8				
Salinidad	0	53.80 a	9.46 a	5.72 a	0.01 b
Summunu	75	22.21 b	5.68 b	4.22 b	1.95 a
N Fuente	NO ₂ -	36.60	9 32 a	5 99 a	1 07 a
iv i ucnte	NH4 ⁺	39.42	5.82 h	3 95 h	0.89 b
	1114	07.12	0.020	0.500	0.03 0
N Conc	2 mM	40 10 a	7.06 b	4 48 h	0.78 h
IV COIL.	0.2 mM	35.91 h	8 08 a	5 46 a	1 18 a
	0.2 min	55.910	0.00 u	5.10 u	1.10 u
Con y Fuonto	wt x NO ₂ ⁻	41.18	9.22 ab	5.63	0.67
Gen x Fuence	wt x $NH_4^+$	44 09	5.16 d	3.52	0.51
	$pro_{\rm X} NO_{\rm 2}$	34.72	7.91 hc	5 30	1.03
	$pro \times NH_4^+$	39.58	5 68 d	3 35	1.00
	$gih3 \times NO_2^-$	33.90	10.85 a	7.03	1.50
	$gib3 \times NH_4^+$	34.58	6.61 cd	4.99	1.16
	8.ec			,	
Gen x Conc	wt x 2	46.87 a	6.84	4.23 b	0.49 b
	wt x 0.2	38.39 ab	7.54	4.92 b	0.70 b
	pro x 2	35.44 b	6.14	4.15 b	0.89 b
	pro x 0.2	38.86 ab	7.46	4.50 b	1.14 ab
	gib3 x 2	37.99 ab	8.20	5.07 b	0.98 b
	gib3 x 0.2	30.49 b	9.26	6.95 a	1.70 a
Gen x Sal	wt x 0	56.45	8.54 b	5.09	0.01 d
	wt x 75	28.82	5.83 c	4.06	1.18 c
	pro x 0	52.73	8.38 b	5.11	0.02 d
	pro x 75	21.57	5.21 c	3.54	2.01 b
	<i>gib3</i> x 0	52.23	11.46 a	6.97	0.02 d
	<i>gib3</i> x 75	16.25	6.00 c	5.05	2.66 a
Gen x Fuente x	wt x $NO_3^{-}$ x 2	44.59	9.31 abc	5.54	0.64
Conc.	wt x $NO_3^-$ x 0.2	37.78	9.12 abc	5.72	0.71
	wt x NH ₄ ⁺ x 2	49.16	4.36 f	2.93	0.33
	wt x $NH_4^+$ x 0.2	39.01	5.96 def	4.12	0.69
	pro x $NO_3^-$ x 2	34.26	8.46 bcd	5.75	1.04
	$pro \times NO_3 \times 0.2$	35.18	7.35 cde	4.85	1.02
	$pro x NH_4^+ x 2$	36.63	3.81 f	2.54	0.73
	$pro \times NH_4^+ \times 0.2$	42.53	7.56 bcd	4.15	1.27
	$gib3 \times NO_3 \times 2$	36.37	11.58 a	6.74	1.33
	<i>gib3</i> x NO ₃ x 0.2	31.43	10.13 ab	7.33	1.69
	$gib3 \times NH_4^+ \times 2$	39.61	4.82 ef	3.40	0.62
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0.2$	29.55	8.39 bcd	6.57	1.70
Gen x Fuente x	wt x $NO_3$ x 0	57.18	11.60 b	6.75	0.01
Sal	wt x $NO_3$ x 75	25.19	6.84 de	4.50	1.34
	wt x $NH_4^{+}$ x 0	55.71	5.49 ef	3.42	0.01

	wt x $NH_4^+$ x 75	32.46	4.83 f	3.62	1.02
	pro x $NO_3^- x 0$	49.79	9.71 c	6.64	0.01
	pro x $NO_3^-$ x 75	19.65	6.10 def	3.97	2.05
	pro x $NH_4^+$ x 0	55.68	7.04 de	3.58	0.02
	pro x $NH_4^+$ x 75	23.49	4.33 f	3.11	1.97
	$gib3 \times NO_3 \times 0$	53.76	14.84 a	8.72	0.01
	$gib3 \ge NO_3^2 \ge 75$	14.04	6.86 de	5.34	3.01
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0$	50.70	8.07 d	5.22	0.02
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 75$	18.46	5.14 ef	4.75	2.31
Gen x Conc. x	wt x 2 x 0	59.77	8.03	4.60	0.01 f
Sal	wt x 2 x 75	33.98	5.64	3.86	0.97 e
	wt x 0.2 x 0	53.12	9.05	5.58	0.01 f
	wt x 0.2 x 75	23.66	6.03	4.26	1.39 d
	pro x 2 x 0	47.17	7.55	5.04	0.01 f
	pro x 2 x 75	23.72	4.72	3.25	1.76 cd
	pro x 0.2 x 0	58.30	9.20	5.18	0.03 f
	pro x 0.2 x 75	19.42	5.71	3.82	2.26 b
	<i>gib3</i> x 2 x 0	55.69	11.27	5.99	0.01 f
	<i>gib3</i> x 2 x 75	20.28	5.13	4.15	1.94 bc
	gib3 x 0.2 x 0	48.77	11.65	7.95	0.02 f
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	12.22	6.87	5.94	3.37 a
Genotipo		***	***	***	***
Salinidad		***	***	***	***
N Fuente		N.S.	***	***	*
N Conc.		**	***	***	***
Gen x Fuente		N.S.	**	N.S.	N.S.
Gen x Conc.		**	N.S.	***	**
Gen x Sal		N.S.	***	N.S.	***
Gen x Fuente x (	Conc.	N.S.	*	N.S.	N.S.
Gen y Fuente y	Sal	NS	**	NS	NS
Gen y Conc y	al	N S	NS	N S	**
Con y Sol y Euon	ai ato y Cono	N.S.	N.S.	N.S.	NS
Gell A Sal A Fuel	Gen x Sal x Fuente x Conc.		IN.D.	IN.D.	IN.D.

# 4.3. Balance de nitrógeno y carbono.

# 4.3.1. Raíz.

Tabla 26. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH₄⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en la concentración de N total, NO₃⁻, C total y el ratio C/N, en raíz.

Factor	Nivel	N total	NO ₃ -	C total	C/N
			(mg	g ⁻¹ )	
Genotipo	wt	32.38 a	7.19 b	366.10 c	12.25 b
p	pro	28.51 c	7.54 b	384.86 a	14.59 a
	gib3	30.02 b	10.29 a	376.67 b	12.29 b
	0				
Salinidad	0	30.95	10.49 a	382.55 a	13.42 a
	75	29.66	6.19 b	369.21 b	12.69 b
N Fuente	NO ₃ ⁻	30.43	15.15 a	367.08 b	12.72 b
	NH4 ⁺	30.18	1.53 b	384.68 a	13.43 a
N Conc.	2 mM	36.88 a	12.29 a	378.02 a	10.46 b
i conce	0.2 mM	23.72 b	4.39 b	373.74 b	15.93 a
Gen x Fuente	wt x NO ₃	31.20	13.42	357.99	12.34 b
	wt x NH ₄ ⁺	33.56	0.95	374.22	12.15 b
	pro x NO ₃	28.93	13.99	374.03	13.83 ab
	$pro \times NH_4^+$	28.09	1.10	395.69	15.35 a
	gib3 x NO ₃	31.15	18.03	369.23	11.88 b
	$gib3 \times NH_4^+$	28.89	2.55	384.12	12.70 b
Gen x Conc.	wt x 2	40.60 a	11.43	368.20	9.16 e
	wt x 0.2	24.17 cd	2.95	364.01	15.33 b
	pro x 2	34.66 b	11.88	385.68	11.36 d
	pro x 0.2	22.36 d	3.20	384.05	17.82 a
	gib3 x 2	35.39 b	13.56	380.19	10.85 d
	gib3 x 0.2	24.65 c	7.02	373.16	14.20 c
Gen x Sal	wt x 0	33.79 a	9.99	371.65	12.27 b
	wt x 75	30.97 ab	4.39	360.56	12.22 b
	pro x 0	28.27 b	8.70	393.62	15.50 a
	pro x 75	28.74 ab	6.39	376.11	13.67ab
	<i>gib3</i> x 0	30.78 ab	12.78	382.38	12.49 b
	gib3 x 75	29.25 ab	7.80	370.96	12.02 b
Gen x Fuente x	wt x NO ₃ x 2	38.60	21.89	353.24	9.26
Conc.	wt x NO ₃ x 0.2	23.80	4.96	362.74	15.43
	wt x NH ₄ ⁺ x 2	42.59	0.98	383.15	9.07
	wt x $NH_4^+$ x 0.2	24.53	0.93	365.28	15.23
	$pro \times NO_3 \times 2$	34.12	0.93	368.44	11.23
	pro x $NO_3^-$ x 0.2	23.73	1.27	379.63	16.42
	$pro \times NH_4^+ \times 2$	35.20	22.84	402.92	11.48
	pro x $NH_4^+$ x 0.2	20.98	5.14	388.47	19.22
	$gib3 \times NO_3 \times 2$	34.90	24.48	370.65	10.82
	$gib3 \ge NO_3 \ge 0.2$	27.41	11.59	367.80	13.28
	<i>gib3</i> x NH ₄ ⁺ x 2	35.88	2.63	389.72	10.89
	<i>gib3</i> x NH ₄ ⁺ x 0.2	21.89	2.46	378.52	15.12
Gen x Fuente x	wt x NO ₃ x 0	32.51	19.04	359.18	12.32
	wt x NO ₃ x 75	29.89	7.81	356.80	12.37

Sal	wt x NH ₄ ⁺ x 0	35.07	0.93	384.11	12.23
	wt x NH ₄ ⁺ x 75	32.06	0.98	364.33	12.07
	$pro \times NO_3 \times 0$	29.06	16.42	379.17	14.67
	$pro \times NO_3^- \times 75$	28.80	11.55	368.90	12.98
	$pro x NH_4^+ x 0$	27.49	0.99	408.07	16.34
	$pro \times NH_4^+ \times 75$	28.69	1.22	383.32	14.36
	$gib3 \times NO_3 \times 0$	31.80	23.08	369.92	12.27
	<i>gib3</i> x NO ₃ ⁻ x 75	30.51	12.99	368.53	11.36
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0$	29.77	2.48	394.85	12.72
	<i>gib3</i> x NH ₄ ⁺ x 75	28.00	2.61	373.39	12.68
Gen x Conc. x Sal	wt x 2 x 0	44.56	16.28	376.53	8.47
	wt x 2 x 75	36.63	6.59	359.86	9.86
	wt x 0.2 x 0	23.02	3.70	366.76	16.08
	wt x 0.2 x 75	25.23	2.20	359.92	14.58
	pro x 2 x 0	35.87	14.74	401.22	11.24
	pro x 2 x 75	32.75	9.03	371.82	11.47
	pro x 0.2 x 0	19.97	2.67	387.66	19.77
	pro x 0.2 x 75	24.74	3.74	380.40	15.87
	<i>gib3</i> x 2 x 0	37.34	16.27	390.88	10.51
	<i>gib3</i> x 2 x 75	33.25	10.84	370.05	11.20
	<i>gib3</i> x 0.2 x 0	25.84	9.28	369.16	14.47
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	27.62	4.76	364.28	13.66
Genotipo		***	***	***	***
Salinidad		N.S.	***	***	***
N Fuente		N.S.	***	***	*
N Conc.		***	***	***	***
Gen x Fuente		*	***	N.S.	*
Gen x Conc.		***	**	N.S.	***
Gen x Sal		**	***	N.S.	*
Gen x Fuente x Cor	nc.	N.S.	**	N.S.	N.S.
Gen x Fuente x Sal	l	N.S.	***	N.S.	N.S.
Gen x Conc. x Sal		N.S.	***	N.S.	N.S.
Gen x Sal x Fuente	x Conc.	N.S.	***	N.S.	N.S.

# 4.3.2. Ноја.

Tabla 27. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH₄⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en la concentración de N total, NO₃⁻, C total y el ratio C/N, en hoja.

Factor	Nivel	N total	NO ₃ ⁻	C total	C/N
			(mg	g ⁻¹ )	
Genotipo	wt	45.63 a	1.25 c	381.99 a	9.78 b
p-	pro	33.23 c	2.24 b	357.43 b	12.65 a
	gib3	43.09 b	2.64 a	383.86 a	9.09 b
	0				
Salinidad	0	39.92 b	2.58 a	397.77 a	11.71 a
Sannaau	75	41.38 a	1.50 b	351.08 b	9.33 b
					,
N Fuente	NO ₂ ⁻	38 14 h	3 08 a	363 13 h	10.62
IV Fuchte	NH4 ⁺	43 16 a	1 01 b	385 73 a	10.52
	11114	15.10 u	1.01 0	505.75 u	10.52
N Cone	2 mM	52 63 a	2 68 a	383 20 a	7 48 h
IN COIL.	0.2  mM	28.66 h	1.40 h	365.66 h	13 94 a
	0.2 mivi	20.00 0	1.40 0	505.00 0	15.74 a
Con y Evente	wt y NO -	38.34 hc	1.62	364.44.0	10.07 ab
Gen x ruente	wt x NU ⁺	52.02 0	0.80	300.54 s	8 50 h
	nro x NO ⁻	32.92 a	3 50	346 02 d	0.590
	$pro \times NO_3$	33.30 C	0.07	340.02 u	12.62 0
	$pro x NH_4$	32.09 C	4.11	278 01 ha	0.01 h
	$gib3 \times NO_3$	42.51 U	4.11	378.91 UC	9.01 D
	gibb x NH ₄	43.07 0	1.10	300.01 a0	9.170
Care Care		60.27 a	1.10	202.61	6.66.0
Gen x Conc.	wt x 2	00.37 a	1.19	392.01	0.00 C
	wt x 0.2	30.89 d	1.32	3/1.3/	12.91 b
	pro x 2	44.61 C	3.41	365.38	8.33 C
	pro x 0.2	21.85 e	1.07	349.49	16.98 a
	glb3 x 2	52.92 0	3.45	391.62	/.40 C
	gibs x 0.2	33.25 d	1.85	3/0.11	11.20 0
		42.12	1 40 1	200.07	11.20
Gen x Sal	wt x 0	43.12 a	1.40 b	398.97 a	0.10
	wt x /5	48.14 a	1.11 D	305.01 D	8.18
	pro x 0	32.790 22.66 h	2.04 au	390.23 a	14.57
	$pro \times 75$	33.00 U	2.51 a	324.03 C	0.27
	glos = x = 0	43.04 a	3.31 a	404.12 a	9.37
	glus x / s	42.34 a	1.// 0	303.00 0	0.72
Con a Exonto a	$wt = NO^{-} x^{2}$	40.82 a	1.40	266 28 ad	7 27 f
Gen x Fuente x	wt x $NO_3$ x 2	49.02 C	1.49	262.61 ada	1457h
Conc.	wt x $NO_3 \times 0.2$	20.80 lg	0.00	418 04 a	14.370
	wt x $NH_4^+$ x 0.2	70.92 a	0.90	$\frac{410.94}{280}$ a	11.24 cd
	$\frac{1}{1}$ wt x $\frac{1}{14}$ x $\frac{1}{2}$	13 84 d	0.87	352.84 de	8 16 of
	$pro \times NO_3 \times 2$	23.29 g	1.07	330.21 e	15 20 h
	$pro \times NO_3 \times 0.2$	45.38 cd	5.94	377.01 bed	13.200 8.40 def
	$pro \times NH_4 \times 2$	20.41 g	1.06	350.76 cde	18 76 2
	$pro x NH_4 x 0.2$	20.41 g	5.97	385.31 bc	7.02 f
	$gib3 \times NO_{-} \times 0.2$	36.13	2.27	372 51 bod	10.48 cde
	$gib3 \times NH^+ \times 2$	56.06 h	0.02	307 02 ah	7 01 f
	$gib3 \times NH^+ \times 0.2$	30.38 ef	1.40	379.70  hc	12.05 bc
	5105 A 1114 A 0.2	50.50 CI	1.40	577.70 00	12.05 00
Con y Everte -	$\mathbf{w} \mathbf{t} \mathbf{v} \mathbf{N} \mathbf{O}^{-} \mathbf{v} \mathbf{O}$	36.90	1.01	202.00	12.01
Gen x ruente x	wt x $NO_3 \times U$	30.80	1.91	345.00	8.02
Sal	wt x $NU_3 \times IJ$	37.87 /0.42	0.80	<u> </u>	0.95
	wt x $NH_4 \times 0$	+7.43 56.40	0.09	385.02	9.13
	WLA 1114 A / J	30.40	0.07	202.03	/.44

	$pro \times NO_3 \times 0$	35.48	4.67	381.48	13.20
	$pro \times NO_3 \times 75$	31.64	2.33	310.57	10.16
	$pro \times NH_4^+ \times 0$	30.11	1.01	398.98	15.54
	$pro \times NH_4^+ \times 75$	35.68	0.94	338.69	11.71
	$gib3 \times NO_3 \times 0$	43.27	5.81	394.50	9.35
	<i>gib3</i> x NO ₃ ⁻ x 75	41.74	2.42	363.33	8.56
	$gib3 \times NH_4^+ \times 0$	44.40	1.20	413.75	9.39
	<i>gib3</i> x NH ₄ ⁺ x 75	42.93	1.12	363.87	8.88
Gen x Conc. x	wt x 2 x 0	60.80	1.49	412.87	6.89
Sal	wt x 2 x 75	59.94	0.89	372.34	6.43
	wt x 0.2 x 0	25.44	1.31	385.06	15.87
	wt x 0.2 x 75	36.29	1.32	354.81	9.94
	pro x 2 x 0	46.23	4.61	400.33	8.79
	pro x 2 x 75	42.99	2.20	330.42	7.86
	pro x 0.2 x 0	20.04	1.07	380.30	19.96
	pro x 0.2 x 75	24.33	1.06	318.85	14.00
	<i>gib3</i> x 2 x 0	53.40	4.97	408.92	7.70
	<i>gib3</i> x 2 x 75	52.27	1.92	374.25	7.22
	<i>gib3</i> x 0.2 x 0	37.48	2.04	402.11	11.04
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	29.64	1.61	339.42	11.71
Genotipo		***	***	***	***
Salinidad		*	***	***	***
N Fuente		***	***	***	N.S.
N Conc.		***	***	***	***
Gen x Fuente		***	***	**	***
Gen x Conc.		***	***	N.S.	***
Gen x Sal		***	***	***	N.S.
Gen x Fuente x Co	onc.	*	***	**	***
Gen x Fuente x Sa	al	N.S.	***	N.S.	N.S.
Gen x Conc. x Sa	l	N.S.	***	N.S.	N.S.
Gen x Sal x Fuent	e x Conc.	N.S.	***	N.S.	N.S.

### 4.3.3. Tallo.

Tabla 28. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH₄⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en la concentración de N total, NO₃⁻, C total y e ratio C/N, en tallo.

Factor	Nivel	N total	$NO_3^-$	C total	C/N
			(mg	g ⁻¹ )	
Genotipo	wt	32.17 a	5.99	364.90 b	12.07 b
p-	pro	22.04 b	4.97	354.79 c	18.57 a
	gib3	31.50 a	5.54	370.93 a	13.14 b
Salinidad	0	27.31 b	8.87 a	369.42 a	16.14 a
Saminuau	75	29.68 a	2.13 b	356.45 b	13.04 b
N Fuente	NO ²	28.62	10.11 a	358 54 h	13.91 h
IV Fucilite	NH ⁺	28.02	0.89 h	367.90 a	15.91 0
		20.27	0.09 0	501.50 <b>u</b>	10.10 u
N Cone	2 mM	34 86 a	9 27 a	361 19 h	10.91 b
IN COIL.	0.2  mM	21.45 h	1.73 h	365 43 a	18 75 a
	0.2 mivi	21.45 0	1.75 0	505. <del>4</del> 5 a	10.75 d
Con y Fuonto	wt y NO. ⁻	30.57.2	11.00	357 10	12.59 bc
Gen x ruente	wt x NO ₃	33.78 a	0.00	372.62	11.56 c
		24.71 b	0.00	3/2.02	16.10 b
	$pro \times NO_3$	10 37 c	9.50	361 75	20.96 a
	$pio \times NII_4$	30.87 a	8.07	301.75	20.90 a
	$gib3 \times NO_3$	30.87 a	2.10	372.33	12.83 C
		52.15 d	2.10	507.52	13.44 0
Con y Cono	wt x 2	38.75	11.08	362.26	945 d
Gen x Conc.	$wt \ge 0.2$	25.60	0.90	367.55	14.70 bc
	$mr_{\rm A} = 0.2$	25.00	0.70	351.27	13.45 c
	$pro \ge 0.2$	16.39	0.50	358.31	23 70 a
	$aih3 \times 2$	38.14	7 30	370.05	9.82 d
	$gib3 \times 0.2$	22.65	3.78	372.09	17.55 h
	gi05 x 0.2	22.05	5.76	512.07	17.550
Con y Sol	wt y 0	31.37	11.75 a	360 55 a	12.92 bc
Gell X Sal	wt x 75	32.08	0.24 b	360.25 a	11.22 oc
	nro x 0	20.84	8.06.ab	367.83 a	21.03.2
	$pro \times 0$	23.24	1.87 h	341 75 h	16.12 h
	$\frac{pi0 \times 10}{qib3 \times 0}$	29.71	6 79 ab	370.87 a	14 47 bc
	$gib3 \times 75$	33.89	4 28 ab	371.00 a	11.17 SC
	gios x rs	55.69	1.20 00	571.00 u	11.57 0
Con y Fuonto y	wt x $NO^{-1}$ x 2	37.29 ab	22.17	348 53	9.50
Gen x Fuente x	wt x $NO_{2}$ x 0.2	23.85 de	1.81	365.84	15.68
Conc.	wt x $NH_{*}^{+}$ x 2	40.20 ab	0.00	375.98	9.40
	wt x $NH_4^+$ x 0.2	27.36 d	0.00	369.25	13 72
	$r_{1} = r_{1} + r_{1$	31.91 c	0.00	342.56	10.87
	$pro \times NO_3 \times 2$	17 50 f	0.15	353.10	21.50
	$pro \times NO_3 \times 0.2$	23.47 e	18.37	350.08	16.02
	$pro \times NH_4^+ \times 0.2$	15 28 f	0.35	363.52	25.90
	$gih3 \ge NO_2^- \ge 2$	36.02 h	12.97	368 54	10.30
	$gib3 \times NO_2 \times 0.2$	24 02 de	4 97	377 38	16.20
	$gib3 \times NH_4^+ \times 2$	40.27 a	1.62	371 57	9 35
	$gih3 \times NH_4^+ \times 0.2$	21.28 e	2.58	366.80	18.91
	5/00 A 1114 A 0.2	21.200	2.50	200.00	10.71
Con y Fuonto y	wt x $NO_{2}$ x 0	31.03 abc	23.40	358.61	13.21
Sel x ruente x	wt x $NO_3 \times 0$	30.11 abc	0.48	355.01	11.21
541	wt x $NH^+$ x 0	31.71 ab	0.40	380.50	12.63
	wt x $NH_4^+$ x 75	35.85 a	0.00	364 74	10.49
		55.05 u	0.00	JU 1./ T	10.77

	pro x $NO_3^- x 0$	25.21 bcd	15.83	357.57	17.91
	$pro \times NO_3^- \times 75$	24.21 cd	2.88	338.08	14.47
	$pro \times NH_4^+ \times 0$	16.48 e	0.29	378.08	24.16
	$pro \ge NH_4^+ \ge 75$	22.27 de	0.86	345.41	17.76
	$gib3 \times NO_3 \times 0$	29.01 abc	11.46	374.16	14.03
	$gib3 \times NO_3^- \times 75$	33.37 a	6.48	369.89	11.23
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0$	30.42 a	2.12	367.59	14.90
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 75$	34.41 a	2.08	372.11	11.50
Gen x Conc. x	wt x 2 x 0	39.88	22.09	364.86	9.20
Sal	wt x 2 x 75	37.61	0.08	359.65	9.69
	wt x 0.2 x 0	22.85	1.40	374.25	16.64
	wt x 0.2 x 75	28.35	0.41	360.85	12.77
	<i>pro</i> x 2 x 0	27.61	15.68	363.98	14.64
	pro x 2 x 75	27.78	3.18	338.55	12.26
	pro x 0.2 x 0	14.08	0.44	371.68	27.43
	pro x 0.2 x 75	18.70	0.56	344.94	19.98
	<i>gib3</i> x 2 x 0	39.03	10.01	373.80	9.72
	<i>gib3</i> x 2 x 75	37.26	4.59	366.31	9.93
	<i>gib3</i> x 0.2 x 0	20.40	3.58	383.93	19.21
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	27.15	3.97	380.37	14.24
Genotipo		***	N.S.	***	***
Salinidad		***	***	***	*
N Fuente		N.S.	***	***	***
N Conc.		***	***	**	***
Gen x Fuente		***	**	N.S.	***
Gen x Conc.		N.S.	***	N.S.	***
Gen x Sal		N.S.	***	***	*
Gen x Fuente x Co	onc.	***	***	N.S.	N.S.
Gen x Fuente x Sa	ıl	*	***	N.S.	N.S.
Gen x Conc. x Sal		N.S.	***	N.S.	N.S.
Gen x Sal x Fuento	e x Conc.	*	***	N.S.	*

# 5. Parámetros de fluorescencia de las clorofilas.

# 5.1. Contenido de clorofilas (SPAD).

Tabla 29. Efecto del genotipo (wt y *pro*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente ( $NO_3^-$  y  $NH_4^+$ ) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en el contenido de clorofilas.

Factor	Nivel	Contenido de clorofilas		
		SPAD		
Genotipo	wt	54.58 a		
	pro	39.08 b		
Salinidad	0	48.20 a		
	75	45.46 b		
N Fuente	NO ₃	43.01 b		
	NH4 ⁺	50.64 c		
N Conc.	2 mM	50.27 a		
	0.2 mM	43.39 b		
Gen x Fuente	wt x NO ₃	48.45 b		
	wt x NH ₄ ⁺	60.71 a		
	pro x NO ₃	37.58 с		
	pro x $NH_4^+$	40.58 c		
~ ~				
Gen x Conc.	wt x 2	57.17		
	wt x 0.2	51.99		
	pro x 2	43.37		
	pro x 0.2	34.78		
Con a Sal	0	F2.04 -		
Gen x Sai	wt x 0	53.84 a		
	wt x /S	55.32 d		
	<i>pro</i> x 0	42.55 b		
	pro x / S	35.00 C		
Gen x Fuente x Conc	wt x $NO_{2}$ x 2	47.67		
Gen x I uente x Cone.	wt x $NO_3^-$ x 0.2	49.23		
	wt x $NH_4^+$ x 2	66 67		
	wt x $NH_4^+$ x 0 2	54 75		
	$pro \times NO_3 \times 2$	37.29		
	$pro \ge NO_3^- \ge 0.2$	37.86		
	$pro \times NH_4^+ \times 2$	49.45		
	pro x $NH_4^+$ x 0.2	31.70		
	T T			
Gen x Fuente x Sal	wt x $NO_3^- x 0$	50.92 bc		
	wt x NO ₃ x 75	45.98 cd		
	wt x NH ₄ ⁺ x 0	56.77 ab		
	wt x NH ₄ ⁺ x 75	64.65 a		
	pro x NO ₃ x 0	41.00 def		
	pro x $NO_3^-$ x 75	34.15 f		
	$pro \ge NH_4^+ \ge 0$	44.10 cde		

	pro x $NH_4^+$ x 75	37.05 ef
	1 7	
Gen x Conc. x Sal	wt x 2 x 0	56.90
	wt x 2 x 75	57.43
	wt x 0.2 x 0	50.78
	wt x 0.2 x 75	53.20
	<i>pro</i> x 2 x 0	45.71
	pro x 2 x 75	41.03
	pro x 0.2 x 0	39.39
	pro x 0.2 x 75	30.18
Genotipo		***
Salinidad		*
N Fuente		***
N Conc.		***
Gen x Fuente		***
Gen x Conc.		N.S.
Gen x Sal		**
Gen x Fuente x Conc.		N.S.
Gen x Fuente x Sal		*
Gen x Conc. x Sal		N.S.
Gen x Sal x Fuente x C	Conc.	N.S.

# 5.2. Fluorescencia máxima.

# Tabla 30. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH₄⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en el rendimiento de fluorescencia máxima.

Factor	Nivel	Y (II) máxima
Constinu		0.7(0.1
Genotipo	wt	0.754
	pro	0.754 c
	g1b3	0.786 a
		0.771
Salinidad	0	0.774 a
	75	0.765 b
N Fuente	NO ₃	0.756 b
	NH4 ⁺	0.783 a
N Conc.	2 mM	0.787 a
	0.2 mM	0.753 b
Gen x Fuente	wt x NO ₃	0.749 c
	wt x NH ₄ ⁺	0.789 a
	pro x NO ₃	0.736 c
	$pro \times NH_4^+$	0.773 b
	gib3 x NO ₃	0.784 ab
	$gib3 \times NH_4^+$	0.789 a
Gen y Conc	wt x 2	0.781 b
Gen a Cone.	wt x 0.2	0.756 c
	pro x 2	0.781 b
	$pro \ge 0.2$	0.727 d
	gib3 x 2	0.798 a
	gib3 x 0.2	0.775 b
Gen x Sal	wt x 0	0.77 bc
	wt x 75	0.768 c
	<i>pro</i> x 0	0.765 c
	pro x 75	0.743 d
	<i>gib3</i> x 0	0.788 a
	<i>gib3</i> x 75	0.785 ab
Gen x Fuente x Conc.	wt x NO ₃ x 2	0.767 de
	wt x NO ₃ x 0.2	0.731 f
	wt x NH ₄ ⁺ x 2	0.795 a
	wt x $NH_4^+$ x 0.2	0.782 bc
	pro x NO ₃ x 2	0.773 cd
	$pro \times NO_3 \times 0.2$	0.698 g
	$pro \times NH_4^+ \times 2$	0.789 ab
	$pro \times NH_4^+ \times 0.2$	0.756 e
	gib3 x NO ₃ x 2	0.797 a
	<i>gib3</i> x NO ₃ x 0.2	0.77 cd
	$gib3 \times NH_4^+ \times 2$	0.798 a
	$gib3 \times NH_4^+ \times 0.2$	0.78 bc
Gen x Fuente x Sal	wt x NO ₃ x 0	0.751
	wt x $NO_3^-$ x 75	0.746
	wt x NH ₄ ⁺ x 0	0.788
	. · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

	wt x NH ₄ ⁺ x 75	0.789
	pro x NO ₃ x 0	0.75
	<i>pro</i> x NO ₃ ⁻ x 75	0.722
	$pro x NH_4^+ x 0$	0.78
	$pro \times NH_4^+ \times 75$	0.765
	$gib3 \times NO_3 \times 0$	0.785
	$gib3 \ge NO_3^- \ge 75$	0.782
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0$	0.79
	<i>gib3</i> x NH ₄ ⁺ x 75	0.788
Gen x Conc. x Sal	wt x 2 x 0	0.784 ab
	wt x 2 x 75	0.778 b
	wt x 0.2 x 0	0.755 cd
	wt x 0.2 x 75	0.758 cd
	<i>pro</i> x 2 x 0	0.787 ab
	pro x 2 x 75	0.776 b
	pro x 0.2 x 0	0.743 d
	pro x 0.2 x 75	0.711 e
	<i>gib3</i> x 2 x 0	0.797 a
	<i>gib3</i> x 2 x 75	0.798 a
	<i>gib3</i> x 0.2 x 0	0.778 b
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	0.772 bc
Genotipo		***
Salinidad		***
N Fuente		***
N Conc.		***
Gen x Fuente		***
Gen x Conc.		***
Gen x Sal		***
Gen x Fuente x Conc.		**
Gen x Fuente x Sal		N.S.
Gen x Conc. x Sal		***
Gen x Sal x Fuente x C	onc.	N.S.

# 6. Parámetros de intercambio gaseoso.

Tabla 31. Efecto del genotipo (wt y *pro*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO₃⁻ y NH₄⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en los diferentes parámetros fotosintéticos; tasa de fotosíntesis neta (Pn) y la conductancia estomática (gs).

Factor	Nivel	Pn	Gs
		μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹	mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹
Genotipo	wt	7,616 a	146,890 a
	pro	6,351 b	118,533 b
Salinidad	0	7,464 a	147,643 a
	75	6,503 b	117,780 b
N Fuente	NO ₃ -	6,849	135,601
	NH4 ⁺	7,118	129,822
N Conc.	2 mM	7,460 a	147,291 a
	0.2 mM	6,507 b	118,132 b
Tiempo	0 d	9,927 a	211,040 a
	4 d	6,936 b	115,676 b
	10 d	5,514 c	97,339 c
	14 d	5,557 c	106,791 bc
Gen x Fuente	wt x NO ₃ -	7,243 ab	143,225 a
	wt x NH4 ⁺	7,990 a	150,555 a
	pro x NO ₃ ⁻	6,455 b	127,978 ab
	pro x $NH_4^+$	6,246 b	109,088 b
Gen x Sal	wt x 0	7,866 a	156,853
	wt x 75	7,366 a	136,927
	<i>pro</i> x 0	7,063 a	138,433
	<i>pro</i> x 75	5,639 b	98,634
Gen x Fuente x	wt x $NO_3^- x 2$	7,737 a	153,926
Conc.	wt x $NO_3^- x 0.2$	6,748 abc	132,523
	wt x NH ₄ ⁺ x 2	8,100 a	167,920
	wt x $NH_4^+$ x 0.2	7,880 a	133,190
	pro x $NO_3^-$ x 2	6,906 ab	141,326
	pro x $NO_3^-$ x 0.2	6,004 bc	114,630
	pro x $NH_4^+$ x 2	7,096 ab	125,993
	pro x $NH_4^+$ x 0.2	5,397 c	92,184
Gen x Fuente x	wt x $NO_3$ x 0	7.81 a	163.42 a
Sal	wt x NO ₃ ⁻ x 75	6.68 ab	123.03 abc
	wt x $NH_4^+ \ge 0$	7.93 a	150.28 ab
	wt x $NH_4^+$ x 75	8.06 a	150.83 ab
	pro x $NO_3^- x 0$	6.88 ab	146.15 ab
	pro x $NO_3^-$ x 75	6.03 b	109.81 bc
	<i>pro</i> x $NH_4^+$ x 0	7.25 ab	130.72 ab
	<i>pro</i> x $NH_4^+$ x 75	5.25 c	87.46 c
Genotipo		***	***
Salinidad	***	***	
-------------------------------------	------	------	
N Fuente	N.S.	N.S.	
N Conc.	***	***	
Tiempo	***	***	
Gen x Fuente	*	*	
Gen x Conc.	N.S.	N.S.	
Gen x Sal	*	N.S.	
Gen x Tiempo	N.S.	N.S.	
Gen x Fuente x Conc.	*	N.S.	
Gen x Fuente x Sal	**	*	
Gen x Fuente x Tiempo	N.S.	N.S.	
Gen x Conc. x Sal	N.S.	N.S.	
Gen x Conc. x Tiempo	N.S.	N.S.	
Gen x Conc. x Sal	N.S.	N.S.	
Gen x Fuente x Conc. x Sal	N.S.	N.S.	
Gen x Fuente x Conc. x Tiempo	N.S.	N.S.	
Gen x Fuente x Sal x Tiempo	N.S.	N.S.	
Gen x Conc. x Sal x Tiempo	N.S.	N.S.	
Gen x Sal x Fuente x Conc. x Tiempo	N.S.	N.S.	

Los valores representan las medias de 3 repeticiones. Las medias seguidas de letras diferentes son significativamente diferentes según el test de rango múltiple de Duncan (p < 0.05), *, **, *** indica diferencias significativas entre medias al nivel de probabilidad de  $0.01 , <math>0.001 y p <math>\le 0.001$ , respectivamente. N.S. indica que no hay diferencias significativas.

## 7. Estado hídrico de las plantas.

Tabla 32. Efecto del genotipo (wt. *pro* y *gib3*), la salinidad (0 y 75 mM NaCl), la fuente (NO3⁻ y NH4⁺) y concentración (Conc.) (2 y 0.2 mM) de nitrógeno y sus interacciones en el estado hídrico; contenido y contenido relativo de agua (CRA)

Factor	Nivel	Contenido de H ₂ O	CRA
		(%)	(%)
Genotipo	wt	86.87 b	83.91 b
-	pro	85.88 c	84.63 b
	gib3	90.12 a	89.06 a
Salinidad	0	84.46 b	85.05
	75	89.98 a	85.65
N Fuente	NO ₃ -	88.05 a	87.28 a
	NH4 ⁺	86.34 b	83.29 b
N Conc.	2 mM	87.59 a	83.66 b
	0.2 mM	86.82 b	87.16 a
Gen x Fuente	wt x NO ₂ -	87.98	87,10
	wt x NH4 ⁺	85.76	80.71
	$pro \propto NO_2^{-1}$	86.85	85.77
	$pro \times NH_4^+$	84.92	83.49
	$\sigma ih_3^2 \times NO_2^-$	89.96	89.81
	$gib3 \times NO_3$	90.33	88.05
	Stop A 14114	70.55	00.05
Gen x Conc	wt x 2	87.36	82.09
Gen x cone.	$\frac{\text{wt x } 2}{\text{wt x } 0.2}$	86.37	85.72
	$\frac{1}{100} \times \frac{2}{100}$	86.25	82.40
	$pro \ge 0.2$	85.51	86.86
	$gih3 \ge 2$	89.95	87.88
	$gib3 \times 0.2$	90.34	90.62
	S105 A 0.2	50.51	50.02
Gen x Sal	wt x 0	84 53 d	85.11 c
Gen a Sur	wt x 75	89.20 b	82.70 c
	$\frac{nro \times 0}{2}$	82.49 e	83 77 c
	$pro \times 75$	89.28 h	85.49 h
	$aih3 \times 0$	87.71 c	87.12 hc
	$gib3 \times 0$ $gib3 \times 75$	92 53 a	90.99.a
	5105 A 15	72.35 u	
Gen x Fuente x	wt x $NO_2^-$ x 2	88.85	85.41
Conc.	wt x $NO_2^- x 0.2$	87.11	88.80
	wt x $NH_4^+$ x 2	85.88	78 78
	wt x $NH_4^+$ x 0.2	85.64	82.64
	$mc \times NO^{-} \times 2$	87.75	83.59
	$pro \times 1003 \times 2$	85.94	87.96
	$pro \times 1003 \times 0.2$	84 75	81.22
	$pro \times NH^+ \times 0.2$	85.08	85.76
	pio x 1014 x 0.2 qih3 x NO x 2	80.85	88.00
	$gib3 \times NO_3 \times 2$	07.03	00.90
	$gibs x NU_3 X 0.2$	90.00	90.72
	$gibs x INH_4 X Z$	90.00	00.41
	$g_{105} \times InH_4 \times 0.2$	90.90	90.41

Gen x Fuente x	wt x $NO_3$ x 0	84.98 ef	87.01
Sal	wt x $NO_3$ x 75	90.97 bc	87.20
	wt x $NH_4^+$ x 0	84.09 fg	83.22
	wt x $NH_4^+$ x 75	87.43 d	78.20
	pro x $NO_3^- x 0$	83.74 fg	84.46
	pro x $NO_3^-$ x 75	89.95 bc	87.09
	pro x $NH_4^+ \times 0$	81.24 g	83.08
	pro x $NH_4^+$ x 75	88.60 c	83.89
	$gib3 \ge NO_3 \ge 0$	87.17 e	87.88
	<i>gib3</i> x NO ₃ ⁻ x 75	92.74 a	91.75
	$gib3 \ge NH_4^+ \ge 0$	88.42 d	86.10
	<i>gib3</i> x $NH_4^+$ x 75	92.24 ab	89.99
Gen x Conc. x Sal	wt x 2 x 0	86.07	83.180
	wt x 2 x 75	88.65	81.01
	wt x 0.2 x 0	83.00	87.05
	wt x 0.2 x 75	89.75	84.40
	<i>pro</i> x 2 x 0	83.67	82.33
	pro x 2 x 75	88.83	82.47
	pro x 0.2 x 0	81.30	85.21
	pro x 0.2 x 75	89.72	88.50
	<i>gib3</i> x 2 x 0	88.10	85.93
	<i>gib3</i> x 2 x 75	91.80	89.84
	<i>gib3</i> x 0.2 x 0	87.19	88.71
	<i>gib3</i> x 0.2 x 75	93.50	92.53
Genotipo		***	***
Salinidad		***	N.S.
N Fuente		*	***
N Conc.		***	***
Gen x Fuente		N.S.	N.S.
Gen x Conc.		N.S.	N.S.
Gen x Sal		***	*
Gen x Fuente x Conc.		N.S.	N.S.
Gen x Fuente x Sal		**	N.S.
Gen x Conc. x Sal		N.S.	N.S.
Gen x Sal x Fuente x Conc		NS	NS

Los valores representan las medias de 20 repeticiones. Las medias seguidas de letras diferentes son significativamente diferentes según el test de rango múltiple de Duncan (p < 0.05), *, **, *** indica diferencias significativas entre medias al nivel de probabilidad de  $0.01 , <math>0.001 y p <math>\le 0.001$ , respectivamente. N.S. indica que no hay diferencias significativas.