



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO FIN DE GRADO

ADAPTACIÓN Y RESPUESTA DE *A. THALIANA* A LA SALINIDAD EN EL MEDIO DE CULTIVO

Sebastià J. Barceló García

**Grado de Bioquímica.
Facultad de Ciencias.**

Año Académico 2019-20

ADAPTACIÓN Y RESPUESTA DE *A. THALIANA* A LA SALINIDAD EN EL MEDIO DE CULTIVO

Sebastià J. Barceló Garcia

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de ciencias

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2019-20

Palabras clave del trabajo:

Salinidad, efecto osmótico, toxicidad y desequilibrio iónico, auxinas, ácido indolacético

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: Catalina Cabot bibiloni

Nombre Tutor/Tutora (si procede)

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Índice

	<u>Página</u>
1. Introducción	1
1.1. Suelos salinos	1
1.2. Entrada de Na ⁺ en la planta	2
1.3. Estrés salino	3
1.3.1. Estrés osmótico	4
1.3.2. Toxicidad iónica	5
1.3.3. Desequilibrio iónico	6
1.4. Mecanismos de adaptación al sustrato salino	6
1.4.1. Tolerancia de tejido o exclusión de ion	7
1.4.2. Acumulación de solutos compatibles	8
1.5. Hormonas vegetales y estrés salino	10
2. Objetivos	11
3. Materiales y métodos	11
3.1. Cultivo de plantas y tratamiento salino	11
3.2. Determinación del área foliar	12
3.3. Determinación del peso fresco y seco	13
3.4. Determinaciones bioquímicas	13
3.4.1 Proteína soluble	13
3.4.2. Pigmentos fotosintéticos	12
3.5. Análisis estadístico	14
4. Resultados y Discusión	14
5. Conclusiones	19
6. Referencias bibliográficas	20

1. Introducción

1.1. Suelos salinos.

Los suelos salinos abundan en regiones áridas y semiáridas, donde la cantidad de precipitación es insuficiente para dar lugar a una lixiviación adecuada de las sales presentes en el suelo. El drenaje del suelo además de eliminar el exceso de agua es necesario para evitar la salinización.

Las sales proceden de la meteorización de minerales y rocas, fertilizantes inorgánicos, materiales de enmienda del suelo, compost, estiércol y aguas de riego (Kotuby-Amacher *et al.*, 2000).

Los problemas de salinidad en áreas no irrigadas se dan a causa de la evaporación y transpiración de agua procedente de un acuífero salinizado o por el aporte de sales que hace la lluvia. Sin embargo, en zonas irrigadas el aporte de sales es constante ya que incluso el agua de buena calidad puede contener entre 100 -1000 g sal m⁻³. Con una aplicación anual de 1000 m³ ha⁻¹ entre 1 y 100 t de sal son añadidas al suelo (Marschner, 1986). Como resultado de los procesos de transpiración y evaporación del agua las sales solubles se acumulan en el suelo y éstas deben ser retiradas periódicamente mediante los procesos de lixiviación y drenaje. La salinización causada por una irrigación prolongada es casi inevitable y la mayoría de suelos no aptos para el cultivo se deben a este problema.

El agua de riego contiene Ca²⁺, Mg²⁺ y Na⁺, entre otras sales. Cuando el agua se evapora el Ca²⁺ y el Mg²⁺ suelen precipitar en forma de carbonatos quedando el Na⁺ como el catión mayoritariamente disponible en el suelo (Serrano *et al.*, 1999). Como resultado la concentración de Na⁺ sobrepasa la de otros macronutrientes en 1 o 2 órdenes de magnitud e incluso más para los micronutrientes. Esto puede reducir significativamente la actividad de los nutrientes en forma de iones además de acrecentar las ratios Na⁺/Ca²⁺ y Na⁺/K⁺ (Grattan y Grieve, 1999).



Fig. 1. Suelo salino. La elevada presencia de sales modifica las propiedades químicas y físicas del suelo.

Cuando la concentración de sal en un suelo impide el crecimiento de la mayoría de especies vegetales se le considera un suelo salino, aunque esto no es un criterio específico. Según la definición del “US Salinity Laboratory” se consideran suelos salinos aquellos cuyo extracto de saturación (solución tomada del suelo cuando está saturado de agua) supera los 4 dS m⁻¹ y el porcentaje de sodio intercambiable por encima de 15. Sin embargo, este parámetro no tiene en cuenta que la concentración de sales aumenta cuando disminuye el agua en el suelo y que la concentración en la rizosfera puede ser mayor (Marschner, 1986).

La salinidad del suelo es un problema que ha afectado a la duración de los sistemas agrícolas a lo largo de la historia hasta el punto de destruir antiguas sociedades agrarias. Los escritos más antiguos sobre “tierras saladas” se remontan al 2400 a.C. y se sitúan en la llanura aluvial situada entre el Tigris y el Éufrates en el actual Iraq (Russel *et al.*, 1965).

A nivel mundial más de 45 Mha de tierras de cultivo irrigadas son inadecuadas para el cultivo y cada año se pierden 1,5 Mha como resultado de los elevados niveles de salinidad en el suelo (Munns y Tester, 2008).

Las regiones mediterráneas están experimentando crecientes problemas de salinidad a causa de la intrusión marina en los acuíferos que abastecen el agua de riego (Rana y Katerji, 2000).

La creciente demanda de alimentos empuja la transformación de suelos marginales en tierras de cultivo y el uso de prácticas insostenibles agrícolas y de regadío.

Cabe añadir que el calentamiento global empeora la situación: la subida del nivel del mar hace especialmente vulnerables las zonas costeras a la intrusión de agua marina, inundaciones causadas por las mareas y pérdida de territorio. Además, el aumento de temperatura y la ascendente variabilidad en los patrones de precipitación estacionales aumentará la extensión de las regiones áridas y disminuirá el aporte de agua dulce empeorando la situación (Rahman *et al.*, 2018).

En la actualidad factores de estrés abiótico como la temperatura, sequía, estrés salino, etc. causan la disminución de la producción de alimentos a nivel mundial. Como resultado de estos cambios es necesario plantearse nuevas estrategias que garanticen el suministro de alimentos (Miflin, 2000).

1.2. Entrada de Na⁺ en la planta

Cuando la concentración de sodio en el suelo es elevada se origina un influjo unidireccional a causa del gradiente electroquímico y entra al citosol de forma pasiva a través de canales de cationes no-selectivos independientes de voltaje (NSCC) de los cuales se han propuesto dos familias candidatas a ejercer esta función: CNCG (cyclicnucleotide-gated channel) y GLR (glutamate-activated channels) y posiblemente otros miembros de la familia del transportador de potasio de alta afinidad (HKT) (Amtmann y Sanders, 1999).

Las bajas concentraciones de sodio en el citosol son mantenidas gracias a la acción de las proteínas localizadas en la membrana plasmática y en el tonoplasto SOS1 y NHX1 respectivamente. Dicha función es el antiporte Na^+/H^+ . El intercambiador catión/ H^+ CHX21 contribuye al movimiento del Na^+ de las células que forman la endodermis al apoplasto de la estela o cilindro vascular y es SOS1 quien finalmente carga el sodio en el xilema. En condiciones de elevada salinidad la carga de Na^+ en el xilema es posiblemente un proceso pasivo debido a la gran concentración del ión Na^+ en el parénquima xilemático y a la despolarización de las membranas que favorece la apertura de canales de cationes como es el ejemplo con el canal SKOR para el K^+ .

Por otra parte, el papel que desempeña SOS1 en la carga del sodio es respaldado por experimentos en los cuales la acidificación del xilema resultó en una mayor concentración de Na^+ en la savia xilemática.

La regulación de la concentración citosólica de Na^+ en la hoja depende también de SOS1 presente en la membrana plasmática y de NHX1 presente en la membrana de la vacuola (Wegner y De Boer, 1998; De Boer y Volkov, 2003; Apse y Blumwald, 2007).

Los iones que siguen el movimiento del agua desde el córtex hacia la estela son retirados de la corriente y secuestrados en vacuolas dentro de las células en la medida de lo posible por eso la concentración de iones Na^+ y Cl^- disminuye hacia el interior del córtex (Tester y Davenport, 2003). Es más, se puede llegar a conseguir una restricción del Na^+ en el xilema si se evita que las células de la endodermis carguen dicho ión en el cilindro vascular mediante una banda de Caspary selectiva y el eflujo del sodio presente en la parte externa del córtex. (Steudle, 2000).

1.3. Estrés salino.

La mayoría de la energía obtenida en la fotosíntesis es invertida en el mantenimiento general, en condiciones óptimas solo una pequeña parte puede ser invertida en el crecimiento de la planta. En términos de gasto energético, el estrés se considera como una disminución de la energía obtenida por fotosíntesis o una redistribución de ésta para defender a la planta del estrés (Munns y Gilligham, 2015).

El estrés por salinidad presenta dos fases distintas: una fase temprana marcada por el estrés osmótico del cual la planta se recupera rápidamente si se elimina la sal del medio y una fase tardía en la que

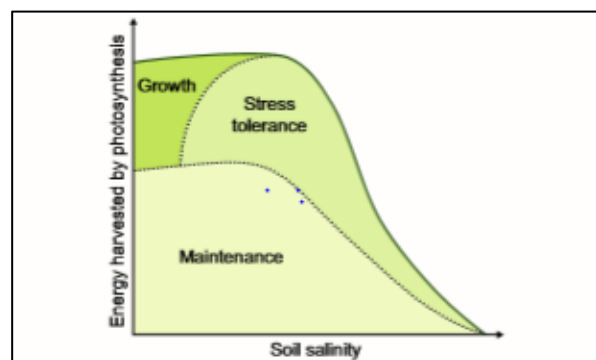


Fig. 2 Esquema que representa la inversión de la energía obtenida por fotosíntesis en distintos procesos metabólicos así como aumenta la salinidad del suelo. Adaptado de (Munns y Gilligham, 2015).

principalmente interviene la toxicidad iónica y el desequilibrio nutricional (Parida y Das, 2005).

Los principales efectos adversos que provocan las altas concentraciones de NaCl en el medio son: **(1)** estrés hídrico o efecto osmótico debido a la disminución del potencial hídrico del medio que disminuye la absorción y disponibilidad del agua; **(2)** toxicidad iónica causada por la captación excesiva de iones, sobretodo de Na⁺ y Cl⁻; **(3)** desequilibrio nutricional debido a una menor obtención de nutrientes y/o transporte hacia la parte aérea y el desequilibrio en la distribución interna de los nutrientes minerales, especialmente el Ca²⁺ (Marschner, 1986).

1.3.1. Estrés osmótico

El estrés osmótico, tras una breve exposición, reduce el crecimiento de las puntas de las raíces y hojas jóvenes además de causar el cierre estomático de las hojas maduras (Munns y Tester, 2008). Dicho cierre de estomas produce, a su vez, una menor asimilación de CO₂ y una disminución de la tasa fotosintética que también disminuye la actividad del ciclo de Calvin.

Un incremento repentino de la concentración de sal provoca que la célula

pierda agua, pero esta pérdida de volumen y turgencia puede ser transitoria gracias al ajuste osmótico; a pesar de ello la tasa de elongación y división celular se ve negativamente afectada causando una aparición más lenta de las hojas que presentan un tamaño final menor. Las células cambian también de dimensiones con una mayor reducción en área que en grosor de esta manera las hojas serán más gruesas y presentarán menor área (Cramer, 2002; Fricke y Peters, 2002; Passioura y Munns, 2000; Yeo *et al.*, 1991).

La reducción en el desarrollo foliar es causada por la disminución del potencial hídrico del medio y este hecho está respaldado por distintos experimentos: aplicando la solución Hoagland concentrada (conjunto de diferentes sales), usando KCl y con solutos no iónicos como el manitol o el polietilenglicol (PEG). Todos estos compuestos tienen efectos cuantitativos similares al NaCl en el desarrollo de nuevas hojas.

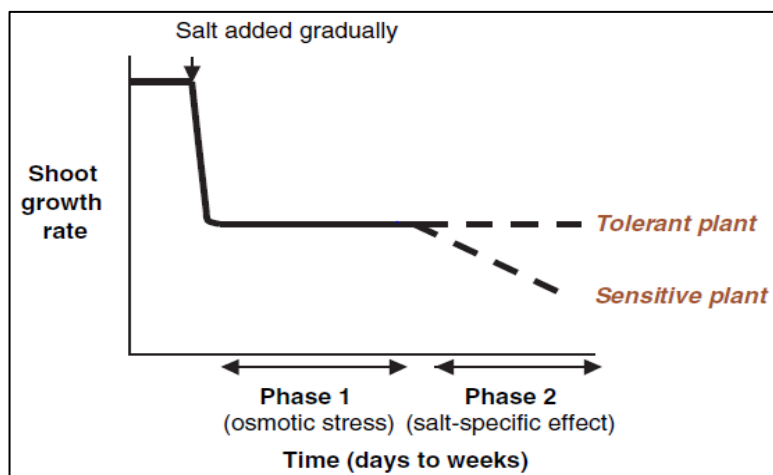


Fig. 3. Durante el estrés salino en primer lugar la planta debe hacer frente al déficit hídrico y al cabo del tiempo a la acumulación de iones en las hojas que llegan en la corriente que genera la transpiración. Adaptado de (Munns, 2005).

Sin embargo, la sal presente en el entorno de la raíz puede causar toxicidad por Na^+ en las primeras fases del estrés salino que se suma al estrés osmótico (Sümer *et al.*, 2004; Szabolcs, 1989).

También se ha propuesto un mensaje hormonal procedente de las raíces como alternativa ya que un aumento artificial de la presión radicular en plantas de trigo no mejoró la tasa de crecimiento del follaje (Munns y Termaat, 1986).

1.3.2. Toxicidad iónica

La toxicidad iónica se debe a la acumulación de iones, en particular Na^+ , que permanece en las hojas después de ser depositado en la corriente de transpiración sin alcanzar grandes concentraciones en la raíz. La toxicidad por efecto del sodio en el citosol aparece alrededor de 30 mM, sin embargo, cloroplastos y mitocondrias podrían resistir concentraciones de hasta 200 mM Na^+ i Cl^- (Munns, 2002; Munns y Tester, 2008)

Así como una menor tasa de aparición de hojas jóvenes se debe al efecto osmótico de la sal una senescencia acelerada de las hojas maduras se debe a la acumulación excesiva de iones ya que éstas se encuentran en la corriente de transpiración y reciben una mayor cantidad de iones que las hojas jóvenes que realizan una menor evapotranspiración.

Una planta transpira 50 veces más agua de la que retiene en las hojas (Munns *et al.*, 2005) y el movimiento de sodio de las hojas a las raíces a través del floema solo puede redistribuir una pequeña parte.

El Na^+ puede ejercer la función de generar presión osmótica sin apenas coste metabólico para así poder hacer frente a la elevada presión osmótica del exterior y mantener la turgencia celular siempre que se encuentre confinado en la vacuola ya que es tóxico en concentraciones citosólicas de 100 mM. Debido al elevado cociente carga/masa, en comparación con el K^+ . Por esta razón, desorganiza la estructura del agua y disminuye las interacciones hidrofóbicas que se dan entre proteínas sumándose estos efectos a la disminución de las interacciones hidrostáticas cuya causa es el aumento de la fuerza iónica en el citosol (Pollard y Wyn Jones, 1979; Wyn Jones y Pollard, 1983).

También la concentración de sodio en el apoplasto (hasta 500 mM) de la hoja puede generar problemas de deshidratación, pérdida de turgencia e incluso muerte celular y/o tisular (Flowers *et al.*, 1991).

El Cl^- afecta a la tasa fotosintética a causa de la degradación de la clorofila y la inhibición del enzima RuBisCo disminuyendo así la asimilación de CO_2 sin afectar la conductancia estomática. La menor disponibilidad de CO_2 disminuye la tasa del ciclo de Calvin-Benson causando una menor regeneración del NADP^+ compuesto aceptor de electrones y causa la sobrerreducción de la cadena de transporte de electrones facilitando la fotoinhibición del PSII. (Tavakkoli *et al.*, 2011).

1.3.3. Desequilibrio iónico

Los vegetales que sufren estrés salino presentan deficiencias o desequilibrios nutricionales y ven reducida significativamente su producción. Una disponibilidad reducida o una incorporación competitiva de dichos nutrientes con el Na^+ o el Cl^- podría explicar este desequilibrio que afecta tanto a macronutrientes como a micronutrientes (Parihar *et al.*, 2015).

Gran parte de la toxicidad metabólica del Na^+ resulta de su habilidad para competir con el K^+ por sitios de unión esenciales para la función celular. Más de 50 enzimas se activan mediante K^+ y el Na^+ es incapaz de realizar esta función. (Bhandal y Malik, 1988). Por lo tanto, un ratio Na^+/K^+ elevado interrumpe numerosos procesos enzimáticos del citoplasma. Es más, para la síntesis proteica son necesarias grandes concentraciones de K^+ debido al requerimiento de éste para la unión de los tRNA con los ribosomas (Blaha *et al.*, 2000). También altera la función fotosintética actuando sobre clorofila y carotenos además de enzimas (Davenport *et al.*, 2005). Además, el K^+ es necesario para la apertura estomática por lo que si el Na^+ lo reemplaza se reducirá la capacidad para abrir estomas que revierte en una menor asimilación de CO_2 .

El calcio (Ca^{2+}) ejerce en la planta funciones como el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática y la selectividad en la captación de iones; por lo tanto, es crucial para minimizar la captación de Na^+ durante el estrés salino.

Sin embargo, elevadas concentraciones de Na^+ en el sustrato inhiben la captación y transporte de Ca^{2+} . Sabiendo que un ratio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ controlado es importante para hacer frente al estrés salino ya que el Na^+ puede desplazar al Ca^{2+} en la unión a la membrana citoplasmática y/o membranas intracelulares, mermar la homeostasis intracelular del Ca^{2+} y su papel como segundo mensajero. De esta manera se pierde selectividad en la captación de iones agravándose el problema de la salinidad (Lynch y Läuchli, 1985; Rengel, 1992b).

1.4. Mecanismos de adaptación al sustrato salino

Las plantas desarrollan una plétora de mecanismos bioquímicos y moleculares para afrontar el estrés salino. Con mucha probabilidad estos procesos actúan aditivamente y de forma sinérgica. Los mecanismos menos complejos suelen ser cambios o diversificaciones en rutas metabólicas. Estos mecanismos sencillos se combinan de tal forma que dan lugar a complejos mecanismos que protegen procesos tan importantes como la fotosíntesis, respiración, uso eficiente del agua y otros que preservan importantes estructuras como el citoesqueleto, la pared celular, las interacciones membrana plasmática-pared celular; cambios en la estructura de la cromatina y protección del ADN (Botella *et al.*, 1994; Bohnert *et al.*, 1995; Iyengar y Reddy, 1996).

1.4.1. Tolerancia de tejido o exclusión de ión

A priori, las plantas pueden lograr tolerancia a la salinidad en el sustrato mediante dos estrategias.

- (1) Excluir los iones Na^+ y Cl^- especialmente en las hojas, de forma que se evitan concentraciones elevadas y tóxicas.
- (2) Tolerar altas concentraciones de estos iones en las hojas en compartimentos subcelulares.

En la práctica existe un espectro continuo de diferentes grados de inclusión/exclusión entre diferentes especies, órganos y tejidos (Marschner, 1986).

Ambas estrategias buscan alcanzar el ajuste osmótico necesario para que la planta mantenga la turgencia y asegurar la funcionalidad de la célula.

En general, las especies tolerantes a la salinidad tienen altas concentraciones de Na^+ y Cl^- en las hojas (más altas que las de la solución externa). Deben almacenar la gran mayoría de estos iones en la vacuola para mantener las concentraciones citosólicas por debajo de niveles tóxicos y usar osmolitos orgánicos y K^+ en el citosol para contrarrestar la presión osmótica (Shabala, 2013).

Arabidopsis thaliana, la planta en la cual se centra este estudio, es glicófita de igual manera que lo son la mayoría de especies de cultivo. Este tipo de plantas mantienen la concentración de Na^+ y Cl^- en las hojas baja, por eso dependen en mayor medida del uso de osmolitos orgánicos como azúcares o aminoácidos y/o K^+ para alcanzar el ajuste osmótico ya que son incapaces de almacenar cantidades significativas de Na^+ en la vacuola (Munns y Tester, 2008).

Las demandas energéticas de la síntesis de osmolitos son severas y pueden restringir la tasa de crecimiento. Inicialmente se suponía que la estrategia de “exclusión de ión” conllevaba un mayor gasto energético (Apse y Blumwald, 2007), sin embargo, recientes descubrimientos de (Chen *et al.*, 2005) indican que almacenar el Na^+ en compartimentos subcelulares también tiene un coste energético considerable derivado del transporte a través de membrana; por ende, reducir la concentración de Na^+ en las hojas puede tener ventajas especialmente una vez logrado el ajuste osmótico, pero los iones continúan llegando a las células a través de la corriente de transpiración (Munns y Gilligham, 2015).

En el caso de las plantas halófitas almacenan en la vacuola principalmente el Na^+ y también el Cl^- , esta estrategia es conocida como “tolerancia de tejido”. Sin embargo, también deben acumular solutos compatibles en el citosol, aunque no en tal cantidad como las plantas glicófitas (Marschner, 1986). Para que esto tenga lugar, el tonoplasto aumenta significativamente de tamaño para poder albergar un mayor volumen de iones en disolución. Este proceso se conoce como succulencia. El tonoplasto impide la entrada de iones en el lumen vacuolar por lo que el Na^+ entra a través de transportadores de antiporte Na^+/H^+ conocidos como NHX1 y NHX2. (Munns y Tester, 2008). La transcripción del transportador de tonoplasto NHX1 es inducida por ABA. Debido a la mayor concentración de iones dentro que fuera del tonoplasto

hay una pequeña fuga constante de iones que conlleva una mayor actividad de los transportadores para mantener a los iones confinados. Estos transportadores son secundarios, es decir, obtienen la energía necesaria para realizar el transporte en contra de gradiente acoplado éste a otro transporte a favor de gradiente en las plantas dicho gradiente es creado por la tonoplasto- H^+ -ATPasa y la tonoplasto- H^+ -pirofosfatasa en menor medida. A su vez, estas proteínas también pueden estar afectadas a la baja o ligeramente más activas en respuesta a la sal (Marschner, 1986).

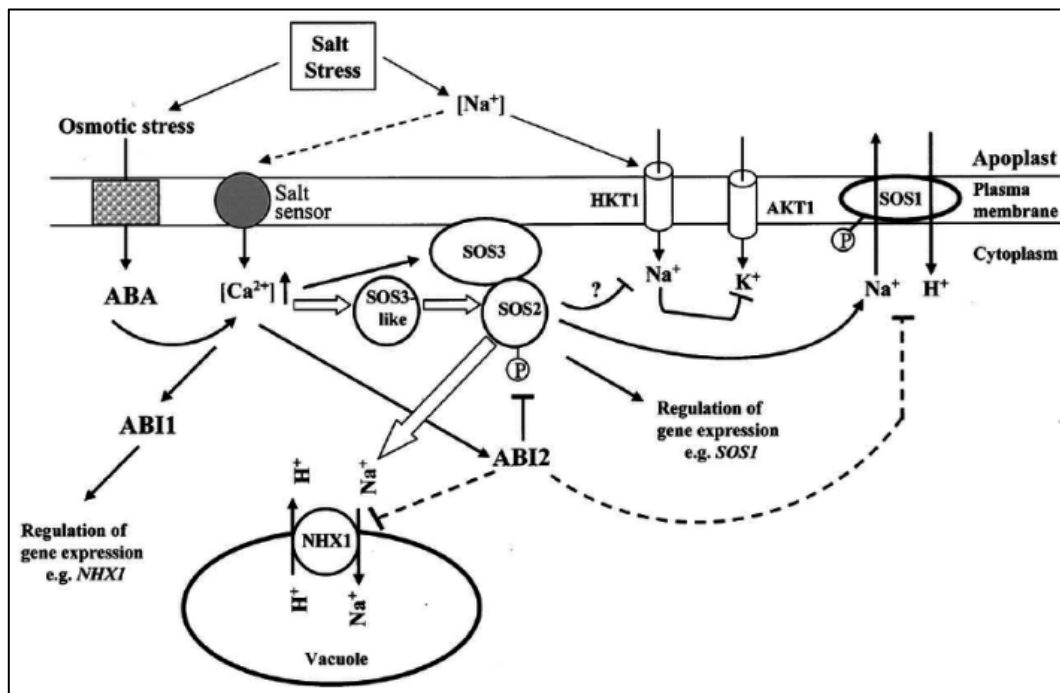


Fig. 4. Vía de señalización SOS en *A. thaliana* durante el estrés salino. Esta vía regula la homeostasis del Na^+ . Intervienen el ABA y el calcio, cuyo aumento en la concentración es percibido por SOS3 activando la vía de homeostasis del Na^+ y su eflujo. HKT1 está implicado en la entrada de Na^+ y posiblemente de su carga en el floema. Adaptado de (Chinnusamy et al., 2005)

La vía de señalización SOS regula la adaptación a la salinidad y los niveles citosólicos de Na^+ . En ella intervienen 3 proteínas además del Ca^{2+} , que permite la unión de SOS3 y SOS2. SOS3 es una proteína de unión que al elevarse los niveles de calcio intracelulares actúa sobre SOS2 liberándola de su inhibición y permitiendo que cumpla su función sobre SOS1. Esta proteína quinasa fosforila a SOS1 eliminando la auto-inhibición que experimentaba y activando el transporte a la membrana plasmática donde ejerce la función de transportador antiporte de Na^+/H^+ . De manera que se dé un eflujo de Na^+ . (Chinnusamy et al., 2005)

En la raíz de *Arabidopsis thaliana*, AtHKT1;1 está implicado en la retirada de Na^+ del xilema antes de que alcance el tallo además de la recirculación del Na^+ al floema (Sunarpi et al., 2005; Davenport et al., 2007). Cuando el sodio llega a las raíces puede ser transportado al exterior mediante SOS1, de esta manera se lleva a cabo la estrategia de "exclusión de ión". Para que la planta sobreviva es necesario que

synthetic a quantity of solutes compatible with the metabolism sufficient to avoid dehydration due to the decrease in external water potential and ensure the flow of water from the soil to the root (Marschner, 1986).

1.4.2. Acumulación de solutos compatibles

Plants that face osmotic stress, present during salt stress, accumulate osmotically active compounds with the purpose of facilitating water acquisition and avoiding volume loss. They are small molecules, polar and normally without net charge. They have a very extensive solvation shell, so they are stable in solution. These osmolytes are compatible metabolites because they do not interfere with normal metabolic reactions of the cell (Ahmad and Sharma, 2008).

It should be noted that their function during abiotic stress is as acceptors of free radicals that increase significantly during salt stress and also as a form of storage of photosynthates (assimilated carbon during photosynthesis). In addition, it has been proven that they act as chaperones of small molecular weight stabilizing macromolecules and/or structures such as proteins and lipid membranes and even can substitute water in certain enzymatic reactions (Diamant *et al.*, 2001).

Product group	Specific compound	Suggested function(s)
Ions	Sodium, chloride	Osmotic adjustment Potassium exclusion/Export
Proteins	Osmotin SOD/Catalase	Pathogenesis-related proteins Osmoprotection Radical detoxification
Amino acids	Proline Ectoine	Osmotic adjustment Osmoprotection
Sugars	Glucose, fructose, sucrose Fructans	Osmotic adjustment Osmoprotection, carbon storage
Polyols	Acyclic (e.g., manitol) Cyclic (e.g., pinitol)	Carbon storage, osmotic adjustment Osmoprotection, osmotic adjustment Retention of photochemical efficiency of PSII Radical scavenging
Polyamines	Spermine, spermidine	Ion balance, chromatin protection
Quaternary amines	Glycine betaine β -Alanine betaine, Dimethyl-sulfonio propionate, Choline- <i>o</i> -sulfate Trigonelline	Osmoprotection Preservation of thylakoid and plasma membrane integrity Osmoprotection Osmoprotection Osmoprotection
Pigments	Carotenoids, anthocyanins, betalains	Protection against photoinhibition

Fig. 5. Compuestos acumulados durante el estrés salino y su función en el desarrollo de tolerancia. Adaptado de Parida y Das (2005).

1.5. Hormonas vegetales y estrés salino

Para hacer frente a los cambios de su entorno, las plantas han desarrollado múltiples estrategias adaptativas las cuales incluyen la regulación hormonal, cambios del metabolismo redox y control epigenético de genes relacionados con el estrés, etc. (Ryu y Cho, 2015).

De manera similar a la respuesta de la planta a otros estreses abióticos, la tolerancia a la sal es el resultado de una compleja coordinación de muchas vías de señalización que incluyen proteínas que reconocen el estrés y actúan como sensores, transductores de señal, factores de transcripción, genes y metabolitos de respuesta al estrés (Zhu, 2002). Las vías de señalización se encuentran integradas entre sí con la finalidad de desencadenar las respuestas, tanto celulares como fisiológicas, adecuadas para hacer frente a las condiciones de estrés (Ryu y Cho, 2015).

Las hormonas juegan un papel relevante en las estrategias adaptativas de las plantas frente al estrés salino (Ryu y Cho, 2015). La mayoría de los estudios se centran en las denominadas hormonas del estrés entre las que destacan el ácido abscísico (ABA), el etileno (ET), el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA) (Kang et al., 2005; Cabot et al., 2009; Raghavendra et al., 2010 y Hernández y Díaz-Vivancos, 2011). Son menos los trabajos que se han centrado en hormonas cuyas funciones se centran de manera mayoritaria en facilitar el crecimiento y desarrollo de la planta, entre las cuales juegan un papel destacado las auxinas (AIA).

La acumulación de AIA, definida como “auxina máxima”, está correlacionado con la generación de órganos nuevos. Esencialmente contribuye a la elongación celular, del tejido vascular y a la organogénesis. Cabe añadir que la dominancia apical está regulada también por el “auxina máxima” (Lau *et al.*, 2008).

Dunlap y Binzel (1996) observaron una reducción de aproximadamente el 75% de los niveles de ácido indolacético de forma independiente del ABA en plantas sometidas a estrés salino.

De esta manera, parte de la causa en reducción del crecimiento en condiciones de estrés salino podría atribuirse a una acumulación y/o redistribución de las auxinas. De forma consecuente con estos hechos, la reducción en la tasa de germinación y el establecimiento de las plántulas fue significativamente mejorada con un pre- o post-tratamiento de las semillas con AIA o ANA (ácido naftalenacético) (Akbari *et al.*, 2007).

Uno de los efectos más negativos del estrés salino en los cultivos es la inducción de un proceso de senescencia prematura la cual disminuye la asimilación de carbono, impide el crecimiento normal de la planta y reduce su productividad (Gay y Thomas, 1995; Thomas y Howarth, 2000).

Un estudio desarrollado por Kim et al., (2011) mostró que hojas separadas de plantas del mutante de *Arabidopsis thaliana*, *yuc6-1D*, que presentan una mayor síntesis de AIA, experimentaban el proceso de senescencia más lentamente que la línea salvaje, en respuesta a un tratamiento de oscuridad. Esto se manifestó en una mayor retención de clorofila y un declive más paulatino del PSII así como una menor acumulación de genes asociados a la senescencia. Asimismo, la pérdida de eficiencia

de PSII y de clorofila causada por aplicación exógena de ABA y MeJA en plantas *yuc6-1D* fue menos severa que en las de la línea salvaje (Lim *et al.*, 2010).

2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es evaluar el papel del AIA en la respuesta de *Arabidopsis thaliana* al estrés salino utilizando el genotipo mutante de esta especie *yuc6-1D*, el cual sobreexpresa YUCCA6, una proteína que cataliza un paso limitante en la síntesis *de novo* del AIA.

Los objetivos específicos son cuantificar la biomasa, el área foliar, la concentración de pigmentos fotosintéticos y la concentración de proteína soluble en *yuc6-1D* en comparación con el genotipo salvaje Col-0(*gl1*) en condiciones de salinidad moderada, *in vitro*.

3. Materiales y métodos

3.1. Cultivo *in vitro* de las plantas y tratamiento salino

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col(*gl1*) y del mutante *yuc6-1D* han sido suministradas por el “European Arabidopsis Stock Centre”, Loughborough, UK.

Las semillas han sido esterilizadas sumergiéndolas durante 2 min en etanol 70% el cual ha sido eliminado mediante un lavado en agua corriente y, a continuación, se sumergieron 10 min en hipoclorito de sodio al 5% el cual se ha eliminado con varios lavados con agua estéril.

Después de la esterilización las semillas fueron estratificadas entre 2 y 4 días a 4 °C.

Las semillas se sembraron en placas de Petri (10 x 10 cm) que contenían 80 ml de medio Murashige and Skoog (4,3 g/L) en 0,8 % agar. En cada genotipo se establecieron dos tratamientos: 1 y 80 mM NaCl. La cantidad de sal correspondiente se añadió al agar durante la preparación del medio de cultivo antes de su esterilización en la autoclave.

Las plantas fueron cultivadas en una cámara de cultivo en las siguientes condiciones: PAR de 100 μ moles de fotones/m² s, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y 70 % de humedad relativa. Las placas se mantuvieron en posición horizontal durante todo el periodo de crecimiento.

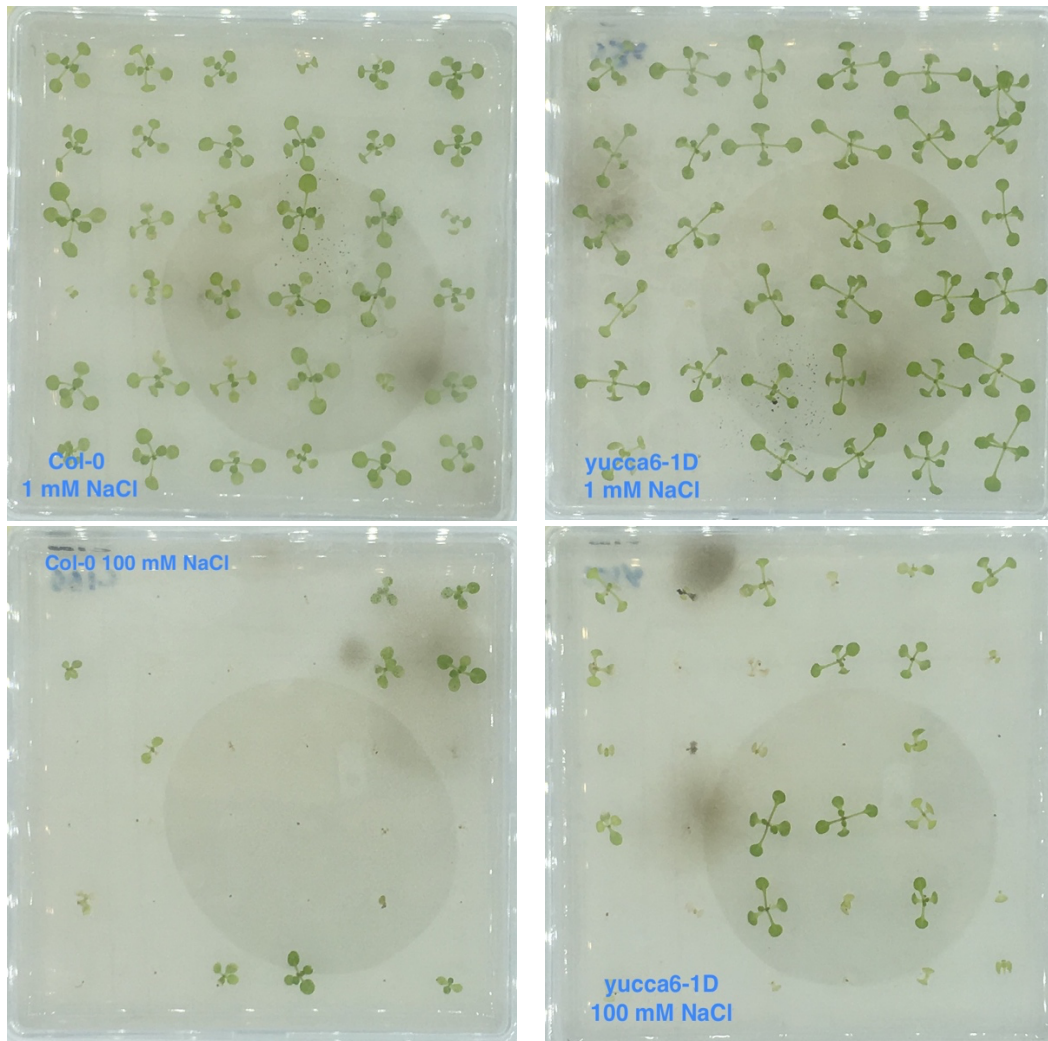


Fig. 6. Efecto de la salinidad (100 mM NaCl) sobre la germinación y el crecimiento de Col-0 y *yucca6-1D*.

3.2. Determinación del área foliar

Se utilizó el programa ImageJ (v.1.47) para determinar el área foliar de las plantas en distintas etapas del crecimiento como método no invasivo. Se obtuvieron dos medidas: la primera, en plantas de una semana, el día 04/02/2019.

Se midió el área foliar de 46 plantas del ecotipo Col(g1) y 53 del mutante *yuc6-1D*.

Se esperó hasta el 12/02/2019, es decir 8 días, para volver a medir el área foliar en este caso fueron 40 plantas del ecotipo Col0(g1) y 50 del mutante *yuc6-1D*.

3.3. Determinación del peso fresco y seco

A los 15 días después de la siembra, las rosetas de entre 4 y 35 plantas por tratamiento y genotipo han sido pesadas para determinar el valor de peso fresco. El número de plantas utilizadas depende en función del número de plantas que no han sobrevivido al tratamiento.

El peso seco de las rosetas ha sido obtenido después de permanecer 24 h en una estufa a 70°C.

3.4. Determinaciones bioquímicas

3.4.1. Proteína soluble

Para la extracción de la proteína soluble, se han utilizado las rosetas de 16 plantas con un peso aproximado de entre 4 y 15 mg. 4 plantas por tratamiento y genotipo y se homogenizaron en un 0,5 ml de tampón bicina pH 8. A continuación, se han centrifugado durante 2 min a 12.000 rpm.

Para la cuantificación de la proteína se ha utilizado el método de (Bradford, 1976). En una microplaca de 96 pocillos, se ha añadido 10 µl de sobrenadante a 200 µl de reactivo de Bradford 1:5. Después de 5 min se ha leído la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de placas KC Junior.

La concentración de proteína se calculó utilizando como patrón una disolución de albúmina bovina de 1 mg/ml.

3.4.2. Pigmentos fotosintéticos

Para la extracción de los pigmentos fotosintéticos han sido utilizados fragmentos representativos de hojas de peso comprendido entre 6 y 15 mg. Se han introducido en un tubo Eppendorf al que se añadió 1 ml de etanol 96%. Los tubos se mantuvieron en oscuridad a 4°C durante 24 h. Se ha pipeteado una alícuota de 300 µl del sobrenadante en una microplaca de 96 pocillos. Las medidas de absorbancia han sido tomadas en un espectrofotómetro de placas KC Junior. Se leyeron a las longitudes de onda de 665 nm (máximo de absorción de la clorofila a), 649 nm (máximo de absorción de la clorofila b) y 470 nm (máximo de absorción de los carotenoides). Los máximos de absorción para los pigmentos en dichas longitudes de onda corresponden al solvente: etanol 96%.

Para cuantificación de pigmentos se utilizaron las ecuaciones de (Lichtenthaler y Wellburn, 1983)

- Clorofila a (**Ca**) (µg/ml) = (13,95 x Abs 665) - (6,88 x Abs 646)
- Clorofila b (**Cb**) (µg/ml) = (24,96 x Abs 649) - (7,32 x Abs 665)
- **Carotenoides** (µg/ml) = [(1000 x Abs 470) - (2,05 x Ca) - (114,8 Cb)] / 245

3.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Las diferencias entre medias se determinaron utilizando la prueba de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$). Los resultados de los distintos ensayos se expresaron como media \pm error estándar de la media (S.E.M.).

4. Resultados y Discusión

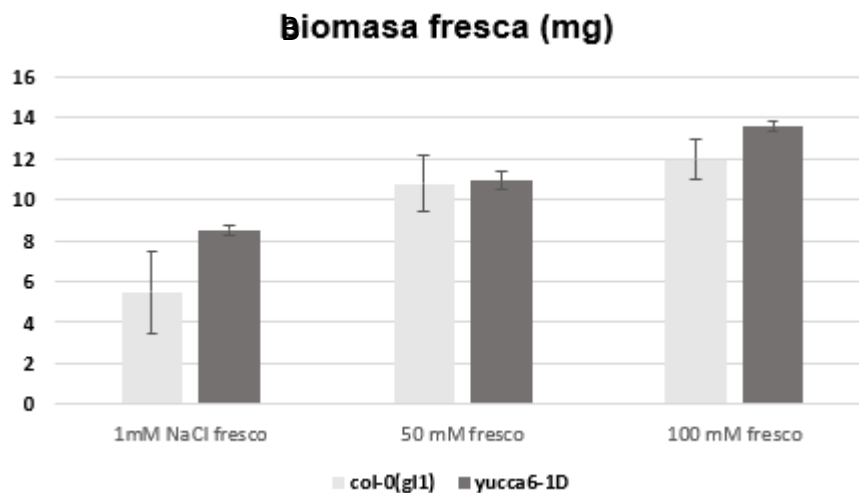


Fig. 7. Valores de biomasa fresca para los distintos tratamientos y genotipos. Están representados como media \pm S.E.M.

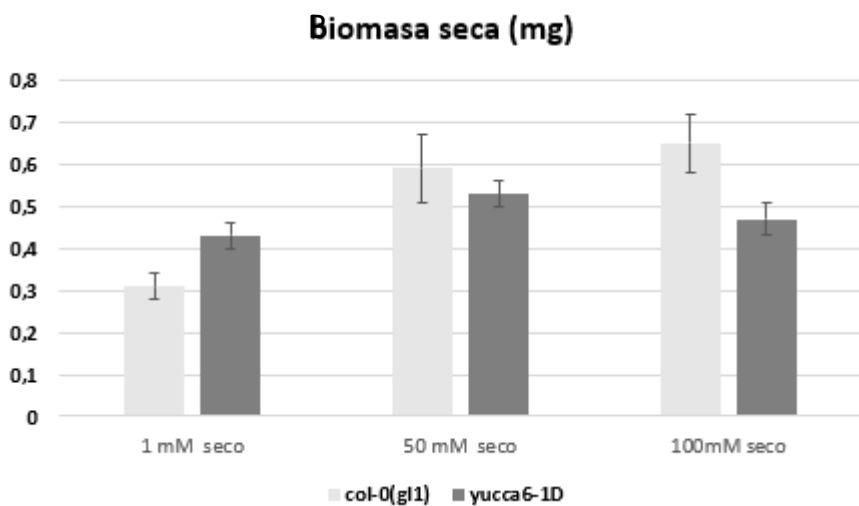


Fig. 8. Valores de biomasa seca para los distintos tratamientos y genotipos. Están representados como media \pm S.E.M.

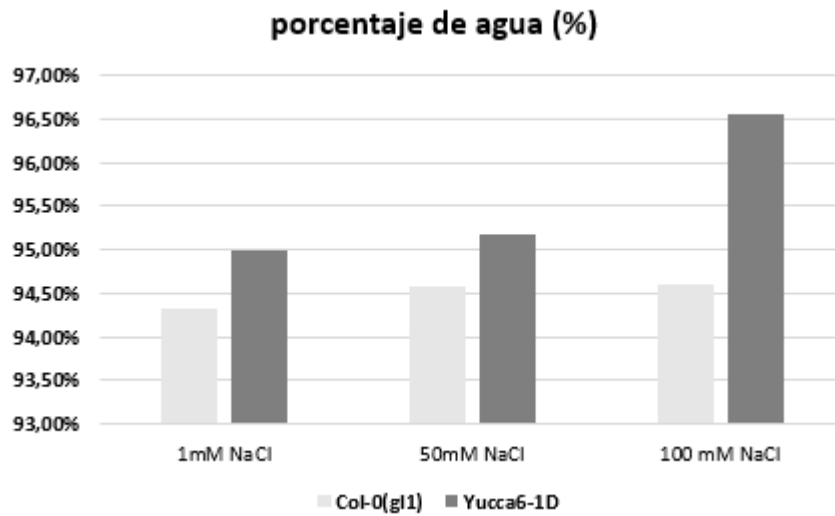


Fig. 9. Porcentaje de agua que presentan las plantas para los distintos tratamientos y genotipos.

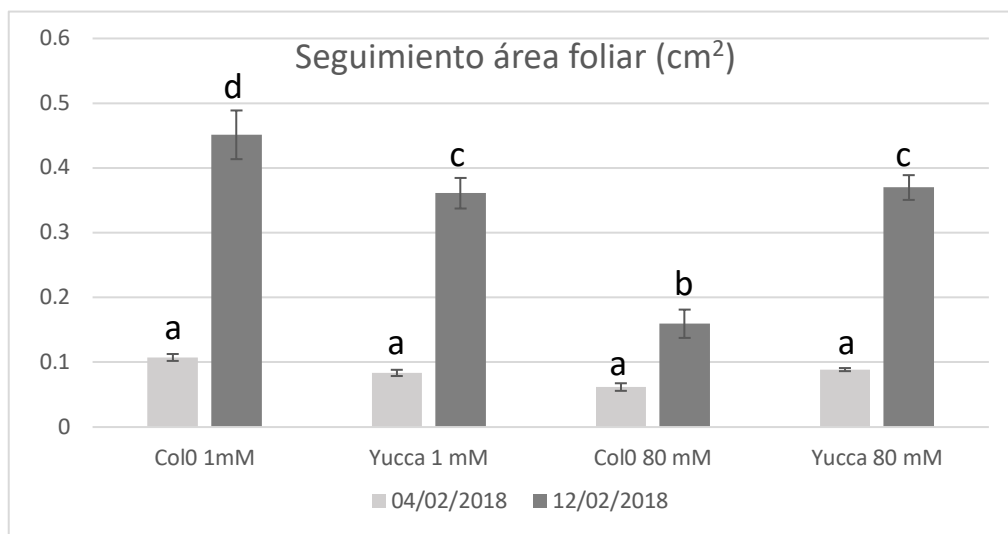


Fig. 10. Parámetros de seguimiento del área foliar expresado en cm² de los distintos tratamientos y genotipos. Están representados como media \pm S.E.M. Se considera significativamente diferentes cuando $p < 0,05$. Significativamente diferente cuando no tienen la misma letra.

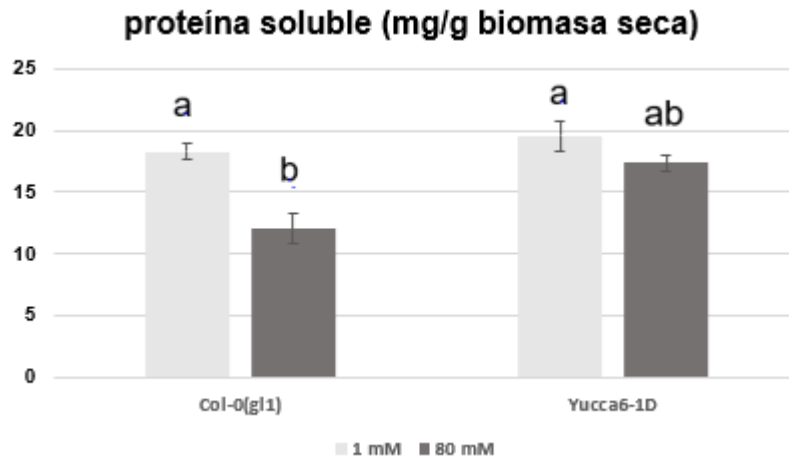


Fig. 11. Valores de proteína soluble (mg prot./g biomasa seca) de los distintos tratamientos y genotipos. Están representados como media \pm S.E.M. Se considera significativamente diferentes cuando $p < 0,05$. Significativamente diferente cuando no tienen la misma letra.

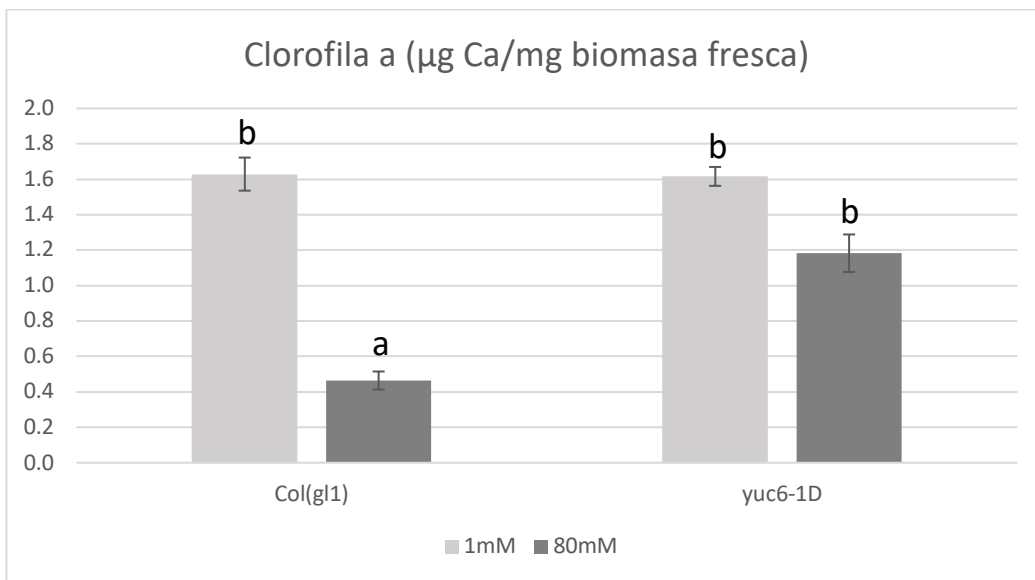


Fig. 12. Valores de clorofila a ($\mu\text{g Chl a/mg}$ biomasa fresca) de los distintos tratamientos y genotipos. Están representados como media \pm S.E.M. Se considera significativamente diferentes cuando $p < 0,05$. Significativamente diferente cuando no tienen la misma letra.

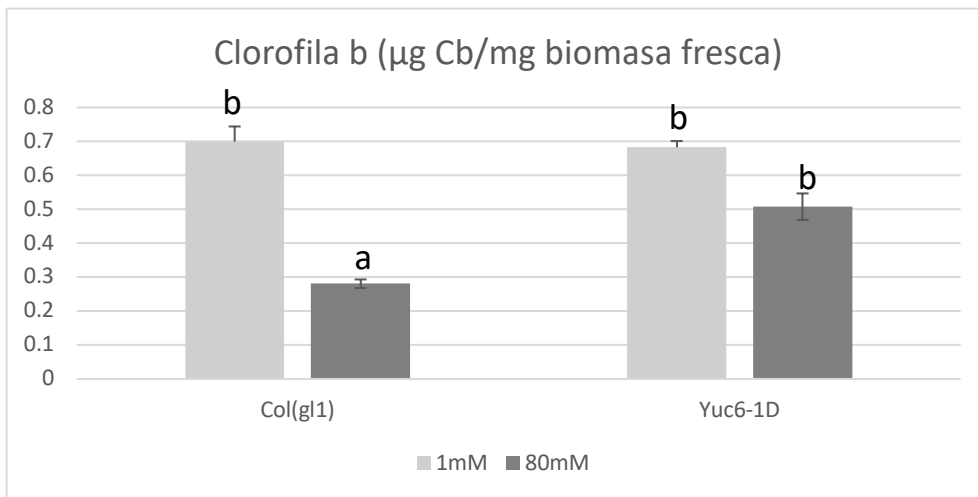


Fig. 13. Valores de clorofila b (μg Chl b/mg biomasa fresca) de los distintos tratamientos y genotipos. Están representados como media \pm S.E.M. Se considera significativamente diferentes cuando $p < 0,05$. Significativamente diferente cuando no tienen la misma letra.

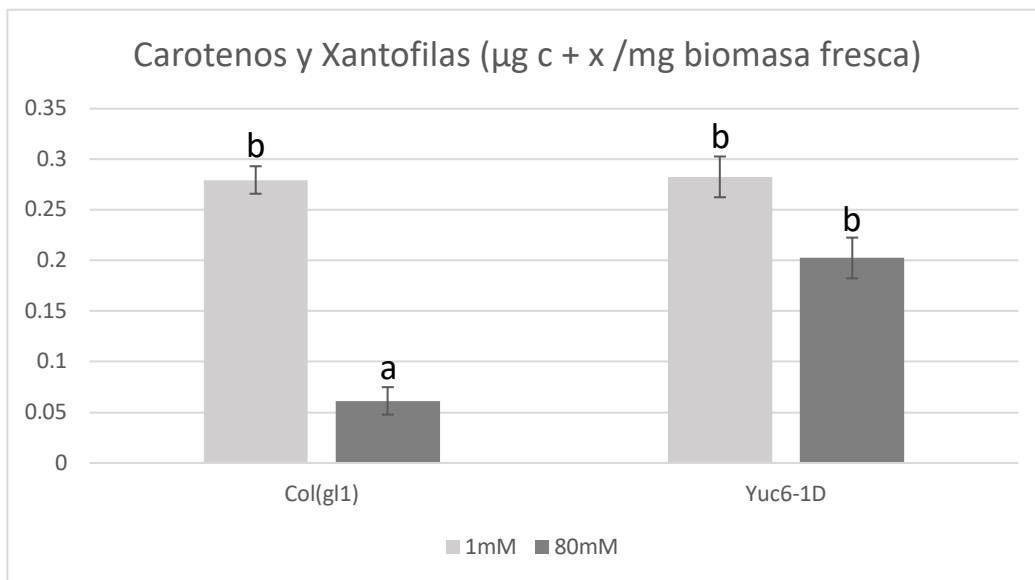


Fig. 14. Valores de carotenos y xantofilas (μg c+x/mg biomasa fresca) de los distintos tratamientos y genotipos. Están representados como media \pm S.E.M. Se considera significativamente diferentes cuando $p < 0,05$. Significativamente diferente cuando no tienen la misma letra.

El estrés salino es un factor de estrés abiótico a tener en cuenta, pues provoca estrés osmótico (déficit hídrico), toxicidad y desequilibrio iónico y estrés oxidativo en los vegetales expuestos a él (Parihar *et al.*, 2015). En este trabajo se llevó a cabo el cultivo "in vitro" en concentraciones moderadas de salinidad de la planta *Arabidopsis thaliana*: en concreto el mutante *yuc6-1D* (que exhibe una mayor producción de ácido indolacético, AIA comparándolo con el ecotipo salvaje Col-0(gl1) con el fin de arrojar luz en la adaptación y respuesta a la salinidad en el medio de cultivo y como afecta una mayor producción de auxinas al desarrollo en un medio salino.

A pesar del transcurso de más de medio siglo desde el primer artículo en el que señalaba el efecto de las auxinas de retrasar la caída y/o abscisión de las hojas, (Addicott *et al.*, 1955; Thimann, 2000), pocos detalles del funcionamiento de las auxinas han sido revelados. Al ser una hormona con un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo, la homeostasis de las auxinas está muy controlada.

Los datos presentados por Kim *et al.* (2011) aseguran claramente que los niveles de AIA están controlados durante la senescencia y un elevado nivel de auxinas retrasa el proceso de senescencia. En otro estudio de Kim *et al.* (2007) las hojas de la roseta de mutantes *yuc6-1D* también mostraron una senescencia más tardía. Esto podría ser explicado por la intervención del AIA en el cross-talk hormonal, permitiendo a la planta continuar en estado de crecimiento, activando genes que regulan directamente el crecimiento además de genes de estrés que permiten a la planta lidiar con una situación desfavorable.

Se evaluó el grado de estrés y el estado fisiológico de las plantas mediante el estudio de parámetros como la biomasa fresca y seca, el área foliar, la concentración de pigmentos fotosintéticos y la cantidad de proteína soluble en la parte aérea de la planta.

La media de biomasa húmeda para el ecotipo Col-0(gl1) y el tratamiento 50 mM NaCl aumenta un 196% mientras que para el tratamiento 100 mM NaCl el aumento es del 217% respecto del control el cual contenía 1mM NaCl. Para el mutante *yuc6-1D* la media de biomasa húmeda del tratamiento 50 mM NaCl aumentó en un 129% y la media del tratamiento 100 mM NaCl en un 159% (Fig. 7).

El aumento generalizado de la biomasa fresca a pesar de el aumento de la cantidad de sal en el medio de cultivo se debe en parte al efecto inhibitorio de la sal sobre la germinación de las semillas. En condiciones salinas la proporción de semillas viables fue muy inferior al de los tratamientos control (resultados no mostrados). En las condiciones más salinas tan sólo lograron sobrevivir las que tienen una mayor viabilidad y éstas pocas alcanzan finalmente un mayor tamaño.

Esta respuesta indicaría que la planta durante el proceso de germinación sería más sensible al componente osmótico de la salinidad y una vez superado este tendría más capacidad para gestionar una elevada presencia de Na⁺ en el medio.

Por lo que refiere a la biomasa seca para el ecotipo col-0(gl1) y el tratamiento 50 mM y 100 mM aumentan un 190% y un 209% respectivamente. Para el mutante *yuc6-1D* aumenta un 123% para el tratamiento 50 mM NaCl y un 109% para el tratamiento 100 mM (Fig. 8).

El menor incremento en la biomasa seca que presenta el mutante *yuc6-1D* es en gran parte debido a la mayor acumulación de agua en sus tejidos (Fig. 9). Éste es un efecto protector frente a la salinidad en el medio de cultivo conocido como succulencia. Al tener una mayor cantidad de agua en su interior la planta también puede albergar una mayor cantidad de iones sin que aumente drásticamente su concentración. Se puede observar como el mutante *yuc6-1D* sometido al tratamiento 100 mM NaCl es el que tiene un mayor porcentaje de agua. Por lo que respecta al área foliar si comparamos el crecimiento durante 12 días del ecotipo salvaje sometido a 80 mM NaCl su crecimiento cae a un 35% respecto del control y en cambio el mutante *yuc6-1D* ha aumentado su crecimiento en un 102% (Fig. 10).

En el caso de la proteína soluble las plantas de Col-0(gl1) sometidas al tratamiento de 80 mM NaCl su concentración disminuyó en un 35% mientras que para *yuc6-1D* tan sólo disminuyó un 12%. Para la síntesis proteica son necesarias grandes concentraciones de K⁺ debido al requerimiento de éste para la unión de los tRNA con los ribosomas (Blaha *et al.*, 2000) (Fig. 11).

La proteína soluble es en su mayor parte RuBisCo por lo tanto una disminución de ésta significa una menor asimilación de CO₂ por la planta y una menor tasa fotosintética.

También se estudiaron los pigmentos fotosintéticos directamente relacionados con la actividad fotosintética y la obtención de energía además de ser un buen indicador del estado fisiológico.

Las concentraciones de clorofila a, b y carotenos y xantofilas de las plantas Col-0(gl1) sometidas al tratamiento 80 mM NaCl disminuyeron un 72%, un 60% y un 78% respectivamente. Por otra parte, las plantas *yuc6-1D* sometidas al mismo tratamiento su disminución fue de 27% para la clorofila a, un 26% para la clorofila b y un 29% para los carotenos (Figuras 12, 13 y 14). Esto se relaciona con una mejor tasa fotosintética para *yuc6-1D* respecto de Col-0(gl1).

5. Conclusiones

Debido a la creciente aparición de zonas áridas (muchas veces debido al cambio climático) o de terrenos mal irrigados está aumentando dramáticamente la superficie de tierras de conreo salinizadas, por ello este estudio pretende desentrañar cuáles son los procesos que permiten a una planta germinar, crecer y producir rendimiento en un terreno salino.

En el presente estudio se ha puesto de manifiesto que el mutante *yucca6-1D* es capaz de mantener los parámetros de biomasa fresca y seca, área foliar, clorofila a, b y proteína soluble en la misma concentración o incluso superior en condiciones de salinidad moderada respecto del control; al contrario de lo que pasa con el ecotipo salvaje Col-0(gl1).

Esto podría estar relacionado con una mayor producción de AIA por parte de *yucca6-1D* que además de mejorar el rendimiento de estos parámetros también favorecía la supervivencia de las plantas.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a mi tutora Catalina Cabot Bibiloni por toda la ayuda recibida durante el transcurso de este trabajo de fin de grado, tanto a nivel intelectual como personal.

6. Referencias bibliográficas

- Addicott FT, Lynch RS, Carns HR. (1955). Auxin gradient theory of abscission regulation. *Science* 121, 644–645. DOI: 10.1126/science.121.3148.644
- Ahmad P, Sharma S. (2008). Salt stress and phyto-biochemical responses of plants. *Plant Soil Environ.* 54, 89-99, DOI 10.1015/K0576(03)10-94
- Akbari G, Sanavy SA, Yousefzadeh S. (2007). Effect of auxin and salt stress (NaCl) on seed germination of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan J. Biol. Sci.* 10,2557–2561. DOI: 10.3923/pjbs.2007.2557.2561
- Amtmann A, Sanders D. (1999). Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Adv. Bot. Res.* 29:75–112. DOI 10.1016/S0065-2296(08)60310-9
- Apse M, Blumwald E. (2007). Na⁺ transport in plants. *FEBS Let.* 581, 2247-54. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.04.014
- Bhandal I, Malik C. (1988). Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *Inter. Rev. Cytol.* 110, 205-254. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)61851-3
- Blaha G, Stelzl U, Spahn C, Agrawal R, Frank J, Nierhaus K. (2000). Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Meth. Enzymol.* 317, 292-309. DOI: 10.1016/S0076-6879(00)17021-1
- Bohnert H, Nelson D, Jensen R. (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7, 1099–1111. DOI: 10.1105/tpc.7.7.1099
- Botella M, Quesada M, Kononowicz A. *et al.* (1994) Characterization and *in situ* localization of a salt-induced tomato peroxidase mRNA. *Plant Mol Biol* 25, 105–114. DOI: 10.1007/BF00024202
- Bradford MM. (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Cabot C, Sibole JV, Barcelo J, Poschenrieder C. (2009). Abscisic Acid Decreases Leaf Na⁺ exclusion in salt-treated *Phaseolus vulgaris* L. *J Plant Growth Regul.* 28, 187–192. DOI: 10.1007/s00344-009-9088-5

Chen Z, Newman I, Zhou M, Mendham N, Zhang G., Shabala S. (2005). Screening plants for salt tolerance by measuring K⁺ flux: a case study for barley. *Plant Cell Environ.* 28, 1230–1246. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01364.x.

Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu J. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* 45, 437–448. DOI: 10.2135/cropsci2005.0437

Cramer G R. (2002). Response of abscisic acid mutants of *Arabidopsis* to salinity. *Funct. Plant Biol.* 29, 561–67. DOI: 10.1071/PP01132

Davenport R, James R, Zakrisson-Plogander A, Tester M, Munns R. (2005). Control of sodium transport in durum wheat. *Plant Physiol.* 137, 807-818. DOI: 10.1104/pp.104.057307

Davenport R, Muñoz-Mayor A, Jha D, Essah PA, Rus A, Tester, M. (2007). The Na⁺ transporter AtHKT1 controls xylem retrieval of Na⁺ in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 30, 497–507. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2007.01637.x

De Boer A, Volkov V. (2003). Logistics of water and salt transport through the plant: Structure and functioning of the xylem. *Plant Cell Environ.* 26, 87-101. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2003.00930.x.

Diamant S, Eliahu N, Rosenthal D, Goloubino P. (2001). Chemical chaperones regulate in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *J. Biol. Chem.* 276, 39586-39591. DOI: 10.1074/jbc.M103081200

Dunlap J, Binzel M. (1996). NaCl reduces indole-3-acetic acid levels in the roots of tomato plants independent of stress induced abscisic acid. *Plant Physiol.* 112, 379–384. DOI: 10.1104/pp.112.1.379

Flowers TJ, Hajibagheri MA, Yeo, AR. (1991). Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant Cell Environ.* 14, 319-325. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1991.tb01507.x

Fricke W, Peters WS. (2002). The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiol.* 129, 374–88. DOI: 10.1104/pp.001164

Gan S. (2007). Senescence process in plants. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 145–170.

Gay AP, Thomas H. (1995). Leaf development in *Lolium temulentum*: photosynthesis in relation to growth and senescence. *New Phytol.* 130, 159–168. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb03037.x

Hernandez JA, Diaz-Vivancos P. (2011). Salicylic acid negatively affects the response to salt stress in pea plants. *Plant Biol.* 13:909–917 DOI 10.1111/j.1438-8677.2011.00461.x

Grattana, S. R., y Grieveb, C. M. (1999). Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 78, 127-157, DOI 10.1016/S0304-4238(98)00192-7

Iyengar E, Reddy M. (1996). Photosynthesis in highly salt tolerant plants. In: Pesserkali, M. (Ed.), *Handbook of photosynthesis*. Marshal Dekar, Baten Rose, USA, pp. 897–909.

Kang D, Seo Y, Lee JD, Ishii R, Kim KU, Shin DH, Park SK, Lee I. (2005). Jasmonic acid differentially affects growth, ion uptake and abscisic acid concentration in salt tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *J. Agron. Crop Sci.* 191, 273–282. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.04.006

Kim J, Sharkhuu A, Jin JB, Li P, Jeong JC, Baek D, Lee SY, Blakeslee JJ, Murphy AS, Bohnert HJ, Hasegawa PM, Yun DJ, Bressan RA. (2007). *yucca6*, a Dominant Mutation in *Arabidopsis*, affects auxin accumulation and auxin-Related phenotypes. *Plant Physiol.* 145, 722–735. DOI: 10.1104/pp.107.104935

Kim JI, Murphy AS, Baek D, Lee SW, Yun DJ, Bressan RA, Narasimhan ML. (2011). YUCCA6 over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 62, 3981–3992. DOI: 10.1093/jxb/err094

Lau S, Jurgens G, De Smet I. (2008). The evolving complexity of the auxin pathway. *Plant Cell* 20, 1738–1746. DOI: 10.1105/tpc.108.060418

Lichtenthaler HK, Wellburn R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11, 591–592. DOI: 10.1042/bst0110591

Lim PO, Lee IC, Kim J, Kim HJ, Ryu JS, Woo, HR, Nam HG. (2010). Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin mediated leaf longevity. *J. Exp. Bot.* 61, 1419–1430. DOI: 10.1093/jxb/erq010

Lynch J, Läuchli A. (1985). Salt stress disturbs the calcium nutrition of barley (*Hordeum vulgare* L.). *New Phytol.* 99, 345-354. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1985.tb03662.x

Marschner H. (1986). Mineral nutrition of higher plants. (Second edition). San Diego, USA: Academic press INC.

Mifflin B. (2000). Crop improvement in the 21st century. *J. Exp. Bot.* 51, 1-8. DOI: 10.1093/jxb/51.342.1.

Munns R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167, 645–663. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2005.01487.x

Munns R, James RA, Läuchli A. (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 57, 1025–43 DOI:10.1093/jxb/erj100

Munns R, Termaat A. (1986). Whole plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 143-160. DOI: 10.1071/PP9860143

Munns R, Schachtman D, Condon A. (1995). The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Funct. Plant Biol.* 22, 561-569. DOI: 10.1071/PP9950561

Munns R, Tester M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59, 651-681. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911

Munns R, Gilligham M. (2015). Salinity tolerance of crops – what is the cost? *New phytol.* 208, 668-673. DOI: 10.1111/nph.13519

Parida AK, Das AB. (2005) Salt tolerance and salinity effect on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Sef.* 60, 324–349. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2004.06.010

Passioura JB, Munns R. (2000). Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Aust. J. Plant Physiol.* 27, 941–48. DOI: 10.1071/PP99207

Pollard A, Wyn Jones RG. (1979). Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta* 144, 291-298. DOI: 10.1007/BF00388772

Rahman S, Di L, Yu E, Tang J, Lin L, Zhang C, Yu Z, Gaigalas J. (2018). Impact of climate change on soil salinity: A remote sensing-based investigation in coastal Bangladesh. DOI: 10.1109/AgroGeoinformatics.2018.8476036

Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci.* 15, 395–401. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.04.006

Rana G, Katerji N. (2000). Measurement and estimation of actual evapotranspiration in the field under Mediterranean climate: a review. *Europ. J. Agron.* 13, 125-153. DOI: 10.1016/S1161-0301(00)00070-8

- Rengel Z. (1992b). The role of calcium in salt toxicity. *Plant Cell Environ.* 15, 625-632. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1992.tb01004.x
- Russel JC, Kadry L, Hanna AB. (1965). Sodic soils in Iraq. *Agrokomia ES Talajtan.* Tom 14(Suppl.), 91-97.
- Ryu H, Cho Y. (2015). Plant hormones in salt stress tolerance. *J. Plant Biol.* 58, 147–155. DOI: 10.1007/s12374-015-0103-z
- Serrano R, Culianz-Macia F, Moreno V. (1999). Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes. *Scient. Horticul.* 78, 261-269. DOI: 10.1016/S0304-4238(98)00196-4
- Shabala S. (2013). Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Ann. Bot.* 112, 1209–1221. DOI: 10.1093/aob/mct205
- Steudle E. (2000). Water uptake by roots: effects of water deficit. *J. Exp. Bot.* 51, 1531–1542. DOI: 10.1093/jexbot/51.350.1531
- Sunarpi HT, Motoda J, Kubo M, Yang H, Yoda K, et al. (2005). Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* 44, 928–38. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02595.x
- Sümer A, Zörb C, Yan F, Schubert S. (2004). Evidence of sodium toxicity for the vegetative growth of Maize (*Zea mays* L.) during the first phase of salt stress. *J. Appl. Bot.* 78, 135–39.
- Szabolcs I. (1989). *Salt-Affected Soils.* Boca Raton, FL: CRC Press
- Tavakkoli, E. et al. (2011). Additive effects of Na⁺ and Cl⁻ ions on barley growth under salinity stress. *J. Exp. Bot.* 62, 2189–2203. DOI: 10.1093/jxb/erq422.
- Tester M, Davenport RJ. (2003). Na⁺ transport and Na⁺ tolerance in higher plants. *Ann. Bot.* 91, 503–27. DOI: 10.1093/aob/mcg058.
- Thimann KV. (2000). *Senescence in plants.* Florida, USA: CRC Press, 85–109.
- Thomas H, Howarth CJ. (2000). Five ways to stay green. *J. Exp. Bot.* 51, 329–337. DOI: 10.1093/jexbot/51.suppl_1.329
- Wegner L, De Boer A. (1998). Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K⁺ homeostasis and long-distance signaling. *Plant Physiol.* 115, 1707-1719. DOI: 10.1104/pp.115.4.1707
- Wyn Jones RG, Pollard A. (1983). Proteins, enzymes and inorganic ions. In *Encyclopedia of Plant Physiology* (A. Lauchli and A. Pirson, eds) pp. 528-562. Springer, Berlin
- Yeo AR, Lee KS, Izzard P, Boursier PJ, Flowers TJ. (1991). Short- and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 42, 881–89. DOI: 10.1093/jxb/42.7.881
- Zhu JK. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53, 247–273. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329

