



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Estudi de l'efecte de la salinitat sobre l'activitat respiratòria en *Arabidopsis thaliana*.

David Alonso Forn

Grau de Biologia

Any acadèmic 2015-16

DNI de l'alumne: 43217707V

Treball tutelat per Miquel Ribas Carbó
Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
X		X	

Paraules clau del treball:
Salinitat, respiració, AOX, *Arabidopsis thaliana*, RWC.

Índex

Resum i Abstract	4
Introducció	6
Material i mètodes	10
Condicions de creixement	10
Mesures de fraccionament d'isòtops d'oxígen i la respiració	12
Mesures de la capacitat d'AOP	12
Estat hídric de les fulles	13
Càlcul de l'àrea de les mostres	14
Anàlisi estadística.....	14
Resultats	16
Capacitat de l'AOP.....	16
Activitat de l'AOP.....	17
RWC.....	17
Discussió	20
Conclusions	24
Agraïments	24
Bibliografia	26

Resum

La salinitat és un greu problema que afecta sòls de tot el món i per tant a les plantes de manera que redueix el creixement i la producció de molts cultius. Per créixer, la planta necessita tenir un bon estat hídric que es veu afectat per l'estrès salí. Un enzim clau durant l'estrès salí és l'oxidasa alternativa (AOX) que es troba a la cadena respiratòria. La hipòtesi d'aquest estudi és que l'activitat d'AOX estarà relacionada amb l'estat hídric de la planta. S'ha mesurat la capacitat, l'activitat (mitjançant la tècnica del fraccionament d'isòtops d'oxigen) i el contingut hídric relatiu a plantes d'*Arabidopsis thaliana* wild-type i mutants knockout del gen *aox1a* (SALK_084897), el qual codifica per AOX. S'ha sotmès a les plantes a una concentració 300 mmol de NaCl durant 24 hores. Com a resultat s'ha observat un augment en l'activitat d'AOX en condicions d'estrès salí i una reducció del contingut hídric relatiu i s'ha comprovat que la capacitat d'AOX no correlaciona amb la seva activitat.

Abstract

Salinity is a serious problem that affects soils around the world and therefore the plants, reducing the growth and yield of many crops. For growing, plants need a good hydric status that is affected by salt stress. An important enzyme in salt stress is the alternative oxidase (AOX) of respiration chain. The hypothesis of this study is that AOX activity is related to water status of the plant. AOX capacity, activity (using the oxygen isotope fractionation technique) and relative water content have been measured in *Arabidopsis thaliana* mutants and wild-type knockout *aox1a* gene (SALK_084897), which encodes for AOX. Plants have been exposed to a concentration of 300 mmol NaCl for 24 hours. Results show an increase in the activity of AOX in salt stress conditions, a reduction in relative water content and found that the capacity of AOX not correlated with their activity.

Introducció

La salinitat és un greu problema que segons estudis recents afecta més de 1.128 milions d'hectàrees de sòl a tot el món (Wicke et al. 2011). No només afecta els sòls de secà sinó que també pot afectar els de regadiu; aquests últims produeixen el 40% de l'aliment a nivell mundial i corren el perill de saturar-se de sal. En l'actualitat s'ha observat que es perd al voltant d'un 1-2% d'aquests sòls cada any a causa de la salinització (FAO, 2016) .

Existeixen dues causes que contribueixen a generar un elevat contingut en sals a terra: la primera causa és natural, ja sigui per la proximitat i/o l'alçada sobre el nivell del mar o a través de l'acumulació de sals. La salinitat es pot agreujar segons les propietats fisicoquímiques del sòl (estructura, textura, porositat, capacitat de retenció d'humitat, permeabilitat, etc.). Com a segona causa, les males pràctiques agrícoles i un ús inadequat de l'aigua de reg contribueixen a la mobilitat de les sals en el sòl i la consegüent contaminació d'aigües subterrànies (Lamz, 2013).

L'efecte més important de la salinitat sobre les plantes és la reducció del creixement i la producció de molts cultius. Per créixer, la planta necessita tenir un estat hídric i una turgència correctes, que es pot mesurar mitjançant el contingut relatiu d'aigua o RWC (Munns & Tester, 2008; Baslam & Goicoechea, 2011).

La respiració és un altre procés fisiològic que conjuntament amb la fotosíntesi determina el creixement de la planta, però els efectes de la salinitat sobre la respiració han estat menys estudiats. Ambdós processos fisiològics estan connectats a nivell de metabolisme. Posteriorment al cicle de Calvin, que té lloc al cloroplast, el metabolisme respiratori s'inicia al citoplasma, a través de la glicòlisi, per finalitzar a la mitocondria. A la matriu mitocondrial té lloc el cicle dels àcids tricarbòxílics (TCA), en el qual es genera poder reductor (NADH i

FADH₂), a partir del qual es produeix un flux d'electrons en la cadena de transport electrònica mitocondrial (mETC), situada a la membrana interna del mitocondri (Nelson et al., 2005; Vanlerberghe et al., 2013).

La mETC, està formada per diverses proteïnes redox que formen part de grans complexos proteics inserits en la membrana i alguns altres adjacents, els quals dirigeixen el flux electrònic. En base a això, s'han descrit dues vies que dirigeixen el flux d'electrons i consumeixen oxigen; són les anomenades vies de la citocrom c oxidasa (COP) i la via de l'oxidasa alternativa (AOP). La principal diferència entre les dues vies és que la COP està acoblada a la síntesi d'ATP a través de l'ATP-sintasa o complex V.

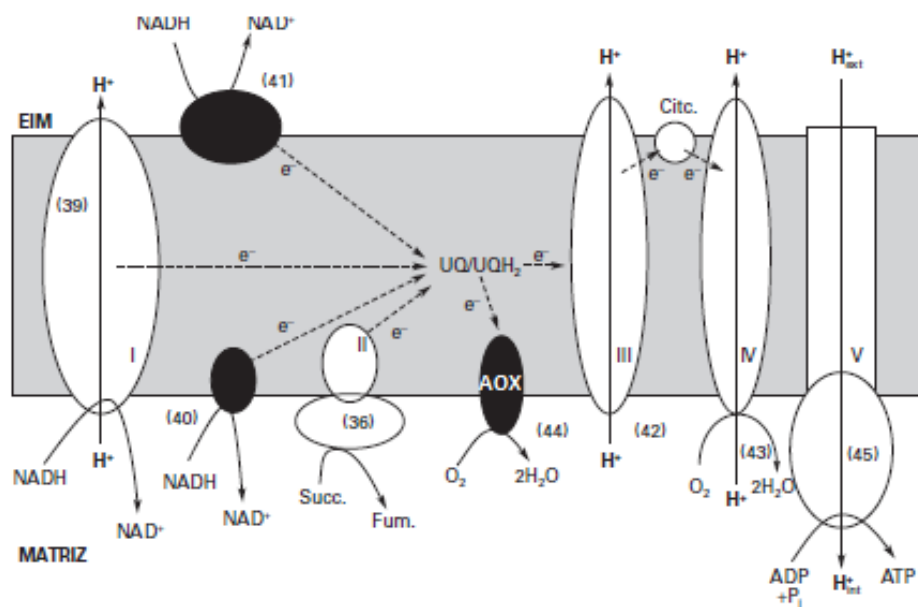


Figura 1. Esquema de la cadena de transport electrònic a la membrana interna mitocondrial dels vegetals, on es poden veure el complexos que la componen i el recorregut dels electrons de les vies AOP i COP. Les línies discontinúes representen el moviment d'electrons, i les línies contínues el moviment de protons. Els nombres de cada enzim corresponen als enumerats a continuació. La estequiometria del transport de protons a través dels diferents complexos proteics no es mostra a la figura (Ribas-Carbó, 2008).

Les dues vies comencen als complexos I (39) i II (36), i les NADH deshidrogenases (40-41) que redueixen la ubiquinona (UQ). Les molècules d'ubiquinona reduïda o ubiquinol (UQH₂) transfereixen els electrons a les oxidases terminals; la citocrom c oxidasa o COX (composta pels complexos III i IV), en el cas de la COP i a l'oxidasa alternativa o AOX, en el cas de AOP. Els dos enzims consumeixen oxigen transformant-lo en aigua (Ribas-Carbó, 2008). L'activitat de COP es pot inhibir amb cianur i l'activitat d'AOP amb àcid salicil hidroxàmic o SHAM (Ribas-Carbó, 2005).

Alguns estudis indiquen que AOX podria tenir un paper important en la tolerància a l'estrès salí ja que s'ha vist que la salinitat produeix un augment en la capacitat d'AOX (Hilal et al. 1998; Kreps et al. 2002; Rizhsky et al. 2002; Finnegan et al. 2004). La capacitat és una mesura del flux màxim d'electrons i per tant del consum màxim d'oxigen a través d'AOP (Guy & Vanlerverghe, 2005). Segons Martí et al. (2011), la quantitat de proteïna AOX està directament correlacionada amb la capacitat en condicions d'estrès salí. La mesura de la capacitat pot considerar-se com una estimació indirecta de l'absència o presència de proteïna, i es pot calcular usant KCN.

D'altra banda també cal tenir en compte, com s'ha demostrat en nombrosos estudis, que la capacitat no està correlacionada amb l'activitat de l'AOP. És a dir, un canvi en la capacitat d'AOX no es correspondria amb un canvi en l'activitat d'AOP (Guy & Vanlerverghe 2005; Ribas-Carbó et al., 2005; Florez-Sarasa et al., 2011).

L'única manera de mesurar correctament l'activitat és mitjançant la tècnica del fraccionament isotòpic de l'oxigen. Aquesta tècnica es basa en el fonament de que existeixen diversos isòtops d'oxigen en l'atmosfera; el més comú, és l'isòtop lleuger ¹⁶O i en una freqüència molt menor es troba l'isòtop ¹⁸O. L'AOX discrimina més contra l'isòtop pesat i COX discrimina menys contra l'isòtop pesat. Mesurant al mateix temps la discriminació isotòpica de l'oxigen i

la taxa de respiració es pot determinar l'activitat de cadascuna de les vies per separat (Ribas-Carbó, 2008). El consum total d'oxigen és la suma del consum d'oxigen de cadascuna de les dues vies.

La hipòtesi presentada en aquest estudi és que l'activitat d'AOX estarà relacionada amb l'estat hídric de la planta. L'objectiu principal és corroborar que l'AOX permet un millor estat hídric sota condicions salines. Per això s'han fet servir plantes d'*Arabidopsis thaliana* mutants knockout del gen *aox1a* (SALK_084897), el qual codifica per a l'AOX. En el present estudi s'ha aplicat un estrès sever, 300 mM de NaCl de curta durada (24 hores).

Material i mètodes

Condicions de creixement

Les plantes varen créixer en un substrat de vermiculita-perleta 3:1. El substrat es va autoclavar a 121°C durant 20 minuts per esterilitzar-lo i eliminar els possibles organismes que podria haver-hi, aquesta mescla estèril es va distribuir a uns planters amb 28 alvèols de 300 ml de volum cada un i aquests es situaren en una safata a la qual es va afegir aigua desionitzada fins a una alçada de 3 cm, de manera que per subirrigació les plantes poguessin captar l'aigua de la safata inferior. A continuació, es van distribuir unes 5 llavors d'*Arabidopsis thaliana* cada alvèol.

Es van utilitzar dues safates, a una se li van posar llavors d'*Arabidopsis thaliana* L. Heynh (Columbia-0) wild-type (és a dir salvatges, sense modificació en la seqüència *aox1a*) i en l'altra es van afegir llavors de plantes mutants, concretament una línia amb la inserció d'un T-DNA *aox1a* (SALK_084897). Aquestes plantes genèticament modificades tenen la peculiaritat que no expressen l'enzim Oxidasa Alternativa (AOX) ja que tenen la seqüència girada (Yoshida, 2011).

Un cop es van preparar les safates, aquestes es van deixar en un fitotró o cambra de creixement, es tracta d'un espai en el qual es poden controlar les condicions com són la temperatura, llum, humitat, etc. En aquesta cambra, aïllada de l'exterior, es segueixen les mesures adequades per prevenir que els organismes modificats genèticament (GMO) causin efectes adversos als éssers humans o al medi ambient. El creixement de les plantes s'aturà abans de l'aparició d'inflorescències, es va evitar el fluxe gènic horitzontal mitjançant un pla de prevenció i control de patògens i un cop acabat l'experiment es va procedir a autoclavar

totes les plantes, així com a desinfectar el material que havia estat en contacte amb els mutants. Dins la cambra es va utilitzar bata i guants.

Les condicions al llarg de tot l'experiment van ser:

- Fotoperíode: 12 hores de llum i 12 hores de foscor.
- Intensitat de la llum: $350 \text{ mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.
- Temperatura: de dia 25°C i de nit 20°C .
- Humitat relativa: aproximadament 50%.

Es va afegir aigua desionitzada a les safates perquè sempre hi hagués una mica d'humitat al substrat fins que les llavors van començar a germinar, al cap d'una setmana. A partir d'aquest moment es va procedir a regar les safates amb una solució nutritiva diluïda a la meitat amb aigua desionitzada.

La solució nutritiva que es va usar és també coneguda com a solució Hoagland (Hoagland, 1938) i és una de les més usades en el camp de la Fisiologia Vegetal, aquesta solució compta amb diferents concentracions de nitrats, sulfats, fosfats i micronutrients essencials que aporten a la planta els elements necessaris per créixer i poder desenvolupar-se correctament com són principalment el Nitrogen, Fòsfor, Potassi, Sofre, Calci, Ferro, etc. La solució es va realitzar amb les següents quantitats dels diferents components:

Macronutrients:

- Nitrat de Potassi (NO_3K)..... 102,0 g/l
- Nitrat de calci hidratat x4 ($(\text{NO}_3)_2\text{Ca} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 70,8 g/l
- Fosfat amònic ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$)..... 23,0 g/l
- Sulfat de magnesi hidratat x7 ($\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)..... 49,0 g/l

Micronutrients:

- Àcid bòric (BO_3H_3)..... 0,286 mg/ml
- Sulfat de zinc hidratat x2 ($\text{SO}_4\text{Zn } 7\text{H}_2\text{O}$)..... 0,022 mg/l
- Molibdat de sodi hidratat x2 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)..... 0,014 mg/l
- Sulfat de coure hidratat x5 ($\text{SO}_4\text{Cu } 5\text{H}_2\text{O}$)..... 0,008 mg/l
- Sulfat de manganès hidratat ($\text{SO}_4\text{Mn } \text{H}_2\text{O}$)..... 0.163 mg/l
- Ferro (Fe EDDHA, sequestrene 138 Fe G-100).....1,666 mg/l

Dues setmanes després de la germinació es va procedir a fer l'homogeneïtzació, és a dir es va deixar només una sola planta a cada alvèol de manera que totes tinguessin una mida molt semblant, per tant es van minimitzar les diferències entre elles i es va eliminar el factor de la competència .

Les plantes es van seguir regant normalment amb la solució nutritiva i a les sis setmanes es va iniciar el tractament salí (300 mM de NaCl), d'aquesta manera es van introduir les plantes en aquesta solució 24 hores abans de procedir a fer les mesures que s'expliquen a continuació.

Mesures de fraccionament d'isòtops d'oxigen i la respiració

Per mesurar el fraccionament d'isòtops d'oxigen es va usar un espectròmetre de masses. Per mesurar la respiració, es van posar les plantes en foscor durant 30 minuts abans de començar a mesurar. Després es van tallar uns trossos de fulla d'àrea desconeguda (que posteriorment es va calcular mitjançant un escàner) en una cubeta d'acer inoxidable tancada hermèticament i usant un bany termòstat es van mantenir les mostres a 25°C.

Per a mesurar l'activitat d'AOX es van quantificar per una part el consum d'oxigen 32 ($^{16}\text{O}^{16}\text{O}$), i els canvis en el quocient 34 ($^{18}\text{O}^{16}\text{O}$) / 32 ($^{16}\text{O}^{16}\text{O}$). Els valors presentats són la mitjana \pm SE de sis mesures (Ribas-Carbó, 2005).

Mesures de la capacitat d'AOP

Per tal de mesurar la capacitat es va utilitzar un elèctrode d'oxigen. En primer lloc, es van pesar dos discs de fulla d'1 cm² i es van incubar en una solució amb KCN 10 mM durant 30 min en foscor, de manera que s'inhibeix la via citocròmica i tot el consum d'oxigen passa a través d'AOP. La taxa de consum d'oxigen es va mesurar en foscor utilitzant un elèctrode d'oxigen de tipus Clark en fase líquida (Rank Brothers) i es va mantenir a una temperatura constant de 25°C mitjançant un bany termòstat que fa circular aigua a aquesta temperatura al voltant de la cubeta que conté la mostra. La cubeta contenia una solució 30 mM MES pH 6,2, CaCl₂ 0,2 mM (Florez-Sarasa et al. 2009). Es van preparar cada dia solucions noves. Es van dur a terme sis repeticions per tractament.

Estat hídric de les fulles

Per mesurar el contingut hídric de les fulles es van usar uns tubs Falcon amb 13 ml d'aigua destil·lada. En primer lloc es va tallar el material vegetal i immediatament es va pesar, d'aquesta manera es va obtenir el pes fresc (FW). Aquests tubs es van incubar a 4°C durant 48 hores en foscor (per minimitzar les pèrdues de pes per respiració) i després es van tornar a pesar obtenint així el pes turgent (TW). Posteriorment es van deixar els discos de fulla en una estufa a 70°C durant 72 hores i es van pesar per última vegada de manera que es va conèixer el pes sec (DW). Finalment, es va calcular el contingut hídric relatiu (RWC) de les fulles mitjançant la següent fórmula:

$$RWC = \frac{FW - DW}{TW - DW} \times 100$$

Es va mesurar el contingut hídric relatiu de 6 plantes per a cada tractament.

Càlcul de l'àrea de les mostres

Les mostres de fulles obtingudes anteriorment es van mesurar per tal de conèixer la seva àrea. Es va usar un escàner tipus HP Scanjet G3010 i el programa d'edició d'imatges Image J.

Anàlisi estadística

Dos experiments separats en el temps es van dur a terme amb diferents grups de plantes cultivades en condicions similars. Una anàlisi de variància d'una sola via (ANOVA) amb un nivell de significació de p -valor $<0,05$ es va realitzar seguit de t de Student per a totes les anàlisis. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant el programa JMP, versió 12.1.0 (SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Nord, 1989-2007).

Resultats

Capacitat de l'AOP

La capacitat de l'AOP o consum màxim d'oxigen a través d'AOP es va mesurar amb un elèctrode d'oxigen en presència de KNC, tal i com es descriu a l'apartat de materials i mètodes.

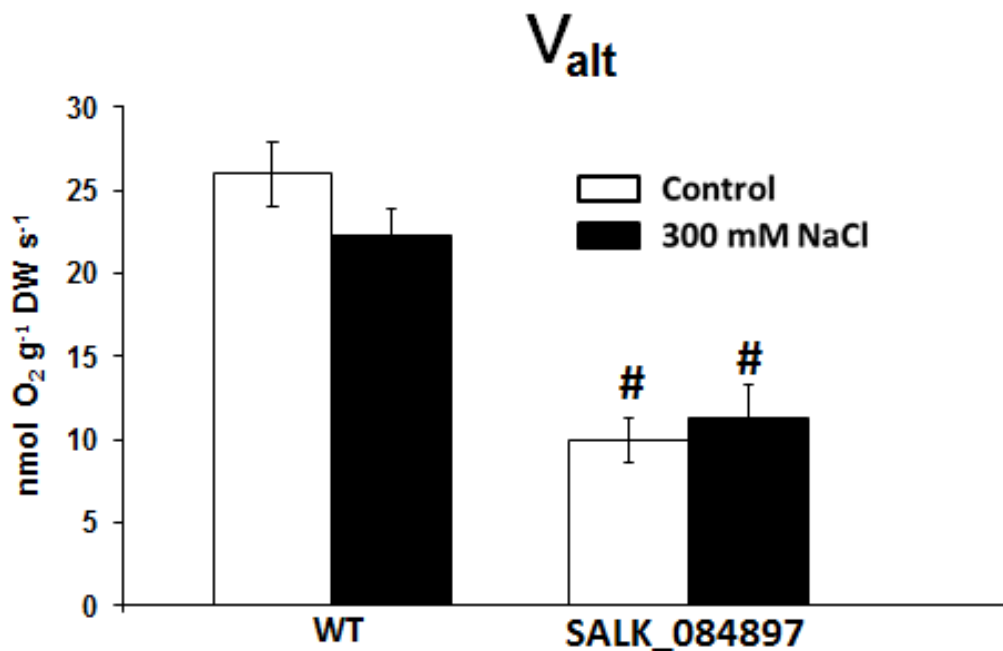


Figura 2. Efecte de la salinitat sobre la capacitat d'AOP (V_{alt}) en fulles d'*Arabidopsis thaliana*. Les barres blanques representen els grups control, regades només amb la solució nutritiva i les barres negres representen les plantes que van ser regades amb NaCl (300 mM) durant 24 hores abans de les determinacions. Les barres representen les mitjanes amb el seu respectiu error estàndard de 6 rèpliques. Els símbols # signifiquen diferències significatives entre WT i SALK_084897 (p-valor <0,05).

De les plantes control es va obtenir una mitjana de $26,00 \pm 1,96 \text{ nmol g O}_2^{-1} \text{DW s}^{-1}$ i del tractament, $22,24 \pm 1,63 \text{ nmol g O}_2^{-1} \text{DW s}^{-1}$. A les SALK_084897, es va obtenir $9,95 \pm 1,36 \text{ nmol g O}_2^{-1} \text{DW s}^{-1}$ al control i $11,32 \pm 1,94 \text{ nmol g O}_2^{-1} \text{DW s}^{-1}$ al tractament. Les diferències

només apareixen quan es comparen les plantes salvatges amb les mutants, ja que es va observar una baixada del 61,73% als controls i del 49,10% al tractament.

Activitat de l'AOP

L'activitat de l'AOP es va mesurar amb un espectròmetre de masses, i es va fer servir la tècnica del fraccionament d'isòtops d'oxigen, així com s'explica anteriorment a materials i mètodes.

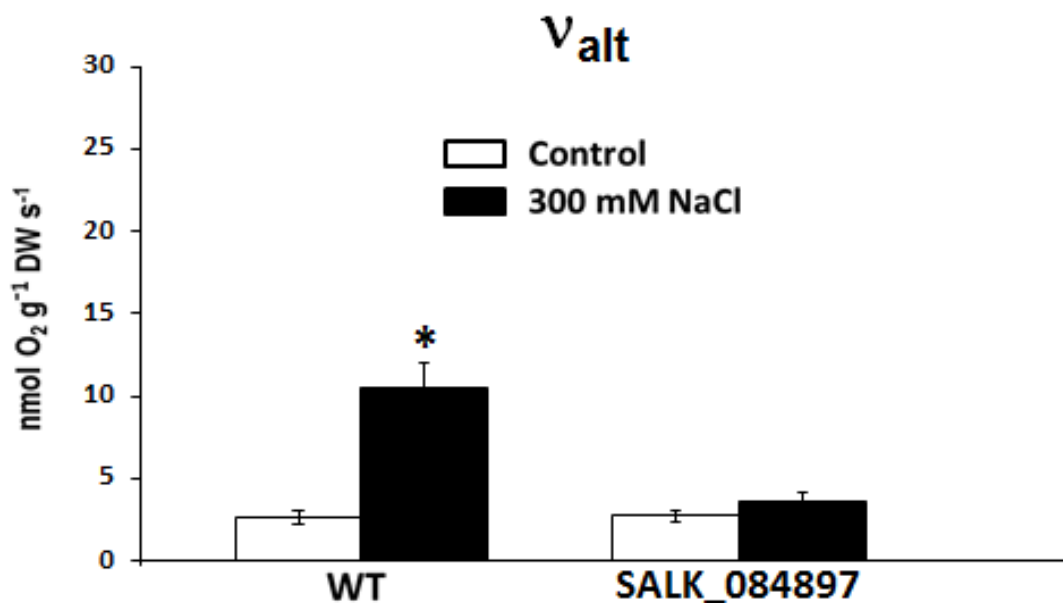


Figura 3. Efecte de la sal sobre l'activitat d'AOP (v_{alt}) en fulles d'*Arabidopsis thaliana*. Les barres blanques representen els grups control, regades només amb la solució Hoagland i les barres negres representen les plantes sotmeses al tractament NaCl (300 mM) durant 24 hores. Les barres representen les mitjanes i el seu error estàndard de 6 rèpliques. Els asteriscs representen diferències significatives entre control i sal (p-valor <0,05).

A les plantes WT Control es va obtenir un valor mitjà de l'activitat d'AOX de $2,68 \pm 0,42$ nmol O₂ g⁻¹DW s⁻¹ i a les plantes WT sotmeses a un tractament amb sal es va obtenir una mitjana de $10,52 \pm 1,44$ nmol O₂ g⁻¹DW s⁻¹. Això ens indica que hi ha hagut un increment del 293% més en l'activitat de AOX si comparem el WT Sal amb el seu control. A les *A. thaliana*

mutants els resultats han estat; $2,70 \pm 0,36 \text{ nmol O}_2 \text{ g}^{-1}\text{DW s}^{-1}$ en control i $3,53 \pm 0,55 \text{ nmol O}_2 \text{ g}^{-1}\text{DW s}^{-1}$ en Sal. Després d'un dia de tractament amb sal, v_{alt} no va mostrar canvis significatius a les plantes SALK_084897.

RWC

El contingut hídric relatiu de les fulles es va mesurar amb uns tubs Falcon amb aigua destil·lada per tal d'obtenir el pes fresc, pes turgent i pes sec i d'aquesta manera obtenir el RWC.

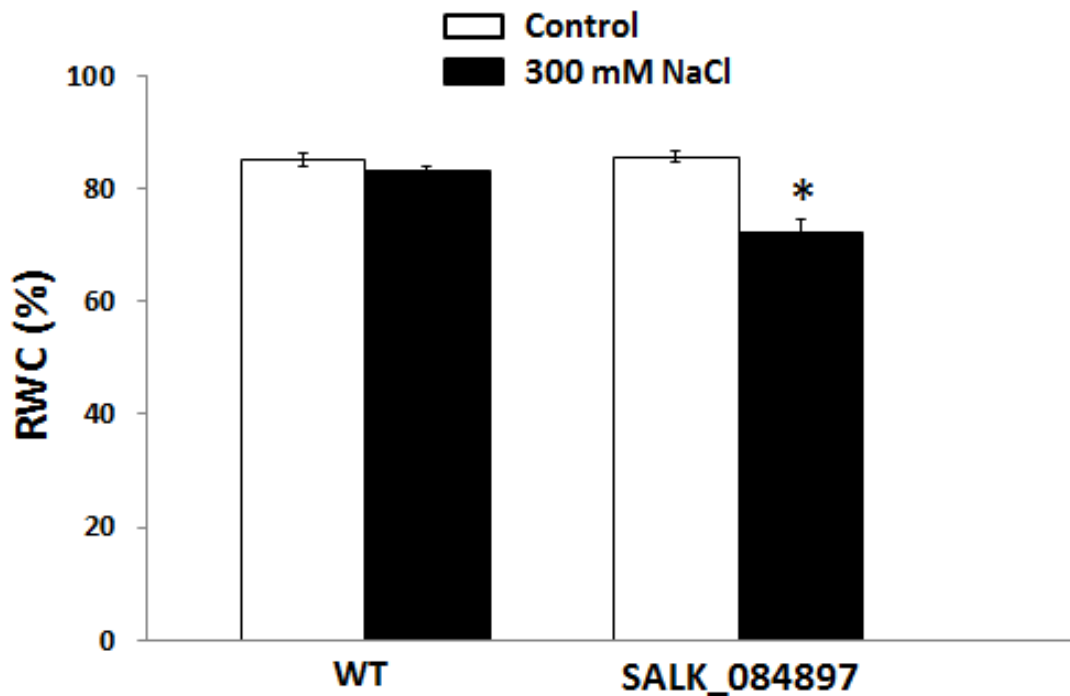


Figura 4. Efecte de la sal sobre el contingut hídric relatiu (RWC) en fulles d'*Arabidopsis thaliana*. Les barres blanques representen els grups control, regades només amb la solució nutritiva i les barres negres representen les plantes regades amb NaCl (300 mM) durant 24 hores. Les barres representen les mitjanes amb el seu respectiu error estàndard de 6 rèpliques. Els asteriscs signifiquen diferències significatives entre control i sal (p-valor <0,05).

Com s'observa, els valors del contingut hídric relatiu són molt semblants tant en WT i SALK_084897 en situació control (al voltant de 85%). En WT Sal es va obtenir un valor de

83,2%, que no representa una diferència significativa respecte del control. Les diferències apareixen als organismes mutants; s'observa que la sal redueix un 15,6% el RWC respecte del control.

Discussió

L'objectiu del present estudi és corroborar que l'activitat *in vivo* de l'enzim oxidasa alternativa (AOX) està relacionada amb el contingut hídric foliar sota condicions de sobtat i sever estrès salí (300 mM de NaCl 24 hores) en plantes d'*Arabidopsis thaliana* Wild type (WT) i mutants knockout del gen *aox1a* (SALK_084897), el qual codifica per l'enzim AOX (Yoshida, 2011).

En primer lloc, les mesures de capacitat d'AOX, definida com a flux màxim d'electrons i consum màxim d'oxigen a través de AOP (Guy & Vanlerverghé, 2005), demostren que les plantes SALK_084897 estudiades tenen realment afectades les quantitats d'AOX, ja que la seva capacitat és significativament menor respecte del WT (Fig. 2). Això confirma el que ha estat observat per Yoshida (2011); una manca de proteïna AOX en els mutants i una reduïda activitat respiratòria resistent a cianur potàssic, molt menor en els mutants respecte de WT.

A més, la nostra hipòtesi, que diu que l'activitat d'AOX (v_{alt}) estarà relacionada amb l'estat hídric de la planta es compleix ja que el resultat així ho demostren. Exactament, l'estrès salí va augmentar v_{alt} en un 293% a plantes WT respecte del Control, mentre que la salinitat no indueix cap canvi significatiu en el genotip mutant (Fig. 3). D'altra banda, l'estrès salí aplicat no afecta el RWC a WT i contràriament, indueix la pèrdua d'aigua en els GMO, ja que s'observa una baixada del 15,6% (Fig. 4).

Se sap molt bé que la salinitat redueix l'estat hídric de la planta, i una manera de mesurar-lo és amb el RWC, aquesta reducció ha estat descrita en nombrosos estudis, usant plantes, concentracions i temps diferents; Heidari (2011) en plantes d'*Helianthus annuus* sotmeses a una concentració 200 mmol NaCl mitjançant el sistema de cultiu hidropònic, va obtenir una reducció en el RWC del 12,8% respecte del control. En un altre estudi amb arbustos, s'ha observat que en exemplars de *Shepherdia argentea* exposades a diferents concentracions de

sal (0, 100, 200, 400, 600 nmol NaCl) durant 30 dies, les dues últimes concentracions han patit una disminució del RWC de 10,2% i 15,5% respectivament (Qin, 2010).

D'altra banda, es podria pensar que l'increment en v_{alt} és a causa d'un increment de la capacitat (V_{alt}), però hi ha una manca de relació entre V_{alt} i v_{alt} ; el notable increment de v_{alt} (Fig. 3) no és acompanyat per un increment de V_{alt} a les plantes WT (Fig. 2), per tant aquest increment no es pot explicar com un increment en V_{alt} . Aquesta manca de correlació és un fet molt important i ha estat observada en nombrosos estudis (Guy & Vanlerberghe 2005; Ribas-Carbo et al., 2005; Florez-Sarasa et al., 2011; Del Saz, 2016). Aquest fet descarta com ja s'ha observat prèviament, que la quantitat de proteïna AOX o la seva capacitat no determina l'activitat *in vivo* de l'enzim en absència d'inhibidors (KCN).

En els últims anys s'està intentant determinar com l'activitat *in vivo* és regulada, per a això s'estan realitzant estudis combinant l'activitat de l'enzim amb metabòlits del metabolisme primari, com els corresponents al TCA (Florez-Sarasa et. al. 2012, 2016 ; De la-Saz, 2016). En base a això, recentment s'ha vist una correlació entre l'activitat d'AOP i els metabòlits malat i fumarat, components del TCA i al seu torn, del complex II de la mETC. (Vanlerberghe, 2013; Del-Saz, 2016). Això suggereix que l'activitat *in vivo* d'AOX pot estar regulada per una sèrie de mecanismes diferents a la síntesi de proteïna o expressió gènica.

Per tant, un increment en l'activitat d'AOX, com passa en WT Sal, permetria una major activitat del TCA i un major flux d'electrons en la mETC la qual cosa permetria dissipar l'excés de poder reductor (NADH i FADH₂) originat com a conseqüència d'una elevada activitat del TCA. Aquest increment en l'activitat del TCA pot ser destinat a la síntesi d'intermediaris (o derivats) d'aquest cicle que han estat descrits tenir un paper important en la osmoregulació en situacions d'estrès salí o hídric (Nelson, 2005; Vanlerberghe, 2013; Flowers et. al. 2015; Munns, 2015).

Aquesta osmoregulació és duta a terme principalment pels soluts osmoprotectors, que són molècules petites que actuen com osmòlits i ajuden mantenir l'estat hídric i la turgència de la planta en situacions d'estrès salí. Aquestes molècules s'acumulen en les cèl·lules i equilibren les diferències de pressió osmòtica entre l'exterior de la cèl·lula i el citosol (Herrera, 2014).

De fet, recentment en estudis de metabolòmica realitzats en *Medicago truncatula*, s'ha observat que sota condicions d'estrès salí, certs metabòlits com aminoàcids; principalment la prolina, la serina i la glicina, àcids orgànics i altres metabòlits com el glicerol s'han incrementat notablement els seus nivells en fulles (Amini & Ehsanpour, 2005; Yancey, 2005; Widodo, 2009; Del-Saz, 2016).

Conclusions

Les conclusions a les que s'ha arribat a partir d'aquest estudi es poden concentrar en aquests tres punts:

- 1) En aquest estudi s'ha comprovat que no hi ha relació entre l'activitat i la capacitat d'AOX.
- 2) En condicions de salinitat l'activitat d'AOX s'incrementa en els WT.
- 3) Existeix una clara relació entre l'activitat d'AOX sota estrès salí i l'estat hídric de la planta.

Agraïments

M'agradaria donar les gràcies al Dr. Miquel Ribas Carbó i a en Néstor F. Del Saz per la seva gran ajuda i dedicació durant l'elaboració d'aquest estudi.

També voldria agrair al Dr. Biel Martorell i el personal dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de les Illes Balears per la seva ajuda tècnica en el IRMS i a en Miquel Truyols i els col·laboradors del camp experimental i hivernacles.

Bibliografia

Alam, M.Z., T. Stuchbury, R.E. Naylor and M.A. Rashid. (2004). *Effect of salinity on growth of some modern rice cultivars*. J. Agron., 3: 1-10.

Amini F. & Ehsanpour A.A. (2005) *Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na⁺ /K⁺ changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under in vitro salt stress*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 1, 204-208.

Baslam M, Goicoechea N. (2011). *Water deficit improved the capacity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of antioxidant compounds in lettuce leaves*. Mycorrhiza. 2012 Jul;22(5):347-59. PMID: 21894519

Del-Saz, N. et. al. (2016). *Salinity tolerance is related to cyanide-resistant alternative respiration in *Medicago truncatula**. Plant, Cell & Environment. Acceptat I pendent de publicar.

FAO. (2016). *La sal de la tierra: peligro para la producción de alimentos*. Cumbre mundial sobre la alimentación. Gen 2016. <http://www.fao.org/worldfoodsummit/spanish/newsroom/focus/focus1.htm> Consultada febrer de 2016.

Florez-Sarasa, I et. al. (2009). *Changes of alternative oxidase activity, capacity and protein content in leaves of *Cucumis sativus* wild-type and MSC16 mutant grown under different light intensities*. Physiologia Plantarum 137: 419–426.

Florez-Sarasa, I. et al. (2011). *In vivo cytochrome and alternative pathway respiration in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants with altered alternative oxidase under different light conditions*. Plant, Cell and Environment 34, 1373–1383.

Flowers T.J., Munns R. & Colmer T.D. (2015) *Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes*. *Annals of Botany* 115, 419-431.

Finnegan, P, Soole, K and Umbach, A. (2004). *Plant Mitochondria: From Genome to Function* (Chapter 9). *Alternative Mitochondrial Electron Transport Proteins in Higher Plants*. Pp. 163-230. Kluwer Academic Publishers.

Guy R.D. & Vanlerberghe G.C. (2005) *Partitioning of respiratory electrons in the dark in leaves of transgenic tobacco with modified levels of alternative oxidase*. *Physiologia Plantarum* 125, 171-180.

Heidari, A et. al. (2011) *Effect of NaCl Stress on Growth, Water Relations, Organic and Inorganic Osmolytes Accumulation in Sunflower (Helianthus annuus L.) Lines*. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*. Volume 1, Issue 3: 351-362.

Herrera, T. et. al. (2014). *Osmoprotectants content, ascorbic acid and ascorbate peroxidase on bean leaves under drought stress*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.5 Núm.5 30 de junio - 13 de agosto, 2014 p. 859-870.

Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1938). *The water-culture method for growing plants without soil*. Berkeley, Calif: University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station.

Hilal, M et al. (1998). *Saline stress alters the temporal patterns of xylem differentiation and alternative oxidase expression in developing soybean roots*. *Plant Physiol* 117: 695-701.

Kreps, JA et al. (2002). *Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic and cold stress*. *Plant Physiol* 130:2119-2114.

Lamz, A. y Gonzalez, M. (2013). *Salinity as a problem in agriculture: plant breeding an immediate solution. cultrop* [online]. vol.34, n.4 [cited 2016-04-01], pp. 31-42 Available en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025859362013000400005&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0258-5936.

Martí M.C., Florez-Sarasa I., Camejo D., Ribas-Carbo M., Lázaro J.J., Sevilla F. & Jiménez A. (2011) *Response of mitochondrial thioredoxin PsTrxo1, antioxidant enzymes, and respiration to salinity in pea (Pisum sativum, L.) leaves*. *Journal of Experimental Botany* 62, 3863-3874.

Munns and Tester. (2008). *Mechanisms of Salinity Tolerance*. *Annual Review of Plant Biology*. 59:651-81.

Munns R. & Gilliham M. (2015) *Salinity tolerance of crops – what is the cost?* *New Phytologist* 208, 668-673.

Nelson DL; Cox MM (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed edición)*. W. H. Freeman. ISBN 978-0716743392.

Qin, J. et. al. (2010). *NaCl salinity-induced changes in water status, ion contents and photosynthetic properties of Shepherdia argentea (Pursh) Nutt. Seedlings*. *Plant Soil Environment*, 56, 2010 (7): 325–332

Ribas-Carbó M., Robinson S.A. & Giles L. (2005). *The application of the oxygen-isotope technique to assess respiratory pathway partitioning*. *Plant Respiration: From Cell to Ecosystem* 18, 31-42.

Ribas-Carbó, M. et al. (2008). Capítulo de libro: *La respiración de las plantas. Libro: Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Editorial: Mc Graw Hill Interamericana. pp. 246-266. ISBN: 978-84-481-5168-3.

Rizhsky, L et al. (2002). *The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco*. Plant Physiol 130: 1143-1151.

Vanlerberghe, Greg C. (2013). *Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants*. International Journal of Molecular Sciences. 14, 6805-6847. ISSN 1422-0067.

Wicke B, Smeets E, Dornburg V, Vashev B., Gaiser T, Turkenburga W., Faaija A. (2011). *The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils*. Energy Environ. Sci. 4:2669-2681.

Widodo P.J.H., Newbiggin E., Tester M., Bacic A., & Roessner U. (2009). *Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance*. Journal of Experimental Botany 60, 4089-4103.

Yancey PH. (2005). *Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses*. Journal of Experimental Biology 208, 2819–2830.

Yoshida, K et al. (2011). *Distinct responses of the mitochondrial respiratory chain to long- and short-term high-light environments in *Arabidopsis thaliana**. Plant, Cell and Environment 34, 618–628.