



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SANTIAGO DEL ESTERO



FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERO NÉSTOR RENÉ LEDESMA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SANTIAGO DEL ESTERO

**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE PLÁNTULAS DE *Prosopis alba* G.
SOMETIDAS A ESTRÉS SALINO**

Nombre: Diego Ariel Meloni

Título: Ingeniero Forestal

Universidad: Universidad Nacional de Santiago del Estero, año 1994

Título: MSc. en Fisiología Vegetal

Universidad: Universidade Federal de Viçosa (Brasil) año 1998

Director de la Tesis: Prof. Dra. Graciela Bolzón de Muniz

Codirector de Tesis: Prof. Dra. Diolina Moura Silva

TESIS DOCTORAL



FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERO NÉSTOR RENÉ LEDESMA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SANTIAGO DEL ESTERO

TÍTULO DE TESIS: RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE PLÁNTULAS DE
Prosopis alba G. SOMETIDAS A ESTRÉS SALINO

Este trabajo:

Fue aceptado por la FCF el día:

Fue defendido el día:

Director: Prof. Dra. Graciela Bolzón de Muniz

Codirector: Prof. Dra. Diolina Moura Silva

Título de la tesis: Respuestas fisiológicas de plántulas de *Prosopis alba* G. sometidas a estrés salino

Comisión asesora de Tesis:

Director: Prof. Dra. Graciela Bolzón de Muniz
Codirector: Prof. Dra. Diolina Moura Silva

Asesores:

Prof. Dra. Sandra. J. Bravo
Prof. Dra. Paula Campanello

Tribunal Examinador:

Prof. Dra. Diolina Moura Silva
Prof. Dra. Sandra. J. Bravo
Prof. Dra. Paula Campanello
Presentación Formal Académica:

Fecha:

Lugar: Santiago del Estero

Universidad: Universidad Nacional de Santiago del Estero

A mis abuelos maternos, Luis y María

A mis padres, Duilio y Rina

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Duilio y Rina, por haberme transmitido desde niño valores de perseverancia, humildad, y pasión por el trabajo.

Al Prof. William M. Jacobo, de la Facultad de Agronomía y Agroindustrias de la UNSE, por haberme guiado en el maravilloso camino de la docencia; por su amistad y constante estímulo.

A las Autoridades de las Facultades de Agronomía y Agroindustrias, y Ciencias Forestales de la UNSE, por su apoyo y confianza.

Al Comité Académico del Doctorado en Ciencias Forestales de la UNSE, en particular a la Prof. Dra. Ana María Giménez, por su apoyo constante.

Al Ministerio de Educación de la Nación (Argentina) y CAPES (Brasil), por la beca que ha permitido desarrollar parte de los trabajos experimentales de esta tesis, en Universidades brasileñas.

A mi Directora, Prof. Dra. Graciela Bolzón de Muniz, por su generosidad, apoyo y amistad.

A mi Codirectora y gran amiga, Prof. Dra. Diolina Moura Silva, por su constante apoyo, su hospitalidad y dedicación durante mi estancia en Vitória, ES, Brasil.

A los integrantes del Núcleo de Estudios de Fotosíntesis de la Universidade Federal do Espírito Santo- UFES (Brasil), Pedro, Thais, Xismênia, Demetrio y Lorezo, por su colaboración y hospitalidad.

A las autoridades, profesores y personal no docente de la UFES, en especial al Sr. Fernando, por su generosidad y hospitalidad.

Al Prof. Dr. Alessandro Ríos, del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS (Brasil), por su amistad, generosidad, y asesoramiento en la cuantificación de carotenoides mediante HPLC.

A los estudiantes del Laboratorio de Compuestos Bioactivos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UFRGS, Camila, Carlos y Kleidson, por haber dedicado su valioso tiempo a mi adiestramiento en la cuantificación de carotenoides mediante HPLC.

A los docentes de la Universidade Federal do Paraná- UFPR, Brasil, por su apoyo y generosidad.

Al Prof. Dr. Marcos Bacarin, de la Universidade Federal de Pelotas- UFPEL (Brasil), por su asesoramiento en la interpretación de las variables de fluorescencia.

Al Ing. Alim. Ramón Ledesma, por su colaboración en la traducción del resumen de la tesis al inglés.

A la Sra. Elba Bravo, Jefa de Laboratorio del INSIMA (FCF-UNSE), por su colaboración incondicional en las actividades de docencia e investigación, que realizo en dicha Unidad Académica.

Al Sr. Fabián Zubrinic, por su colaboración en la formatación de la tesis

A mis colegas de las Facultades de Agronomía y Agroindustrias, y Ciencias Forestales de la UNSE, por su constante apoyo, comprensión, y amistad.

A mis compañeros del Doctorado en Ciencias Forestales de la UNSE.

A mis alumnos, que cada día demuestran que nos espera un futuro mejor, renovando mis esperanzas y espíritu de superación.

A todos aquellos que me acompañaron en esta etapa de mi vida.

INDICE GENERAL

Capítulo	Página	
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	El Género <i>Prosopis</i> : origen, distribución e importancia	3
2.2	Respuestas fisiológicas de los vegetales frente al estrés salino	4
2.3	Bibliografía	8
3	GERMINACIÓN, CRECIMIENTO Y AJUSTE OSMÓTICO	11
3.1	Introducción	11
3.2	Materiales y Métodos	12
3.2.1	Material vegetal	12
3.2.2	Germinación	12
3.2.3	Crecimiento	13
3.2.4	Relaciones hídricas	13
3.2.5	Cuantificación de solutos inorgánicos y orgánicos	14
3.2.6	Diseño experimental y análisis estadístico	14
3.3	Resultados	15
3.4	Discusión	21
3.5	Bibliografía	23
4	COMPOSICIÓN MINERAL Y ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA	26
4.1	Introducción	26
4.2	Materiales y Métodos	27
4.2.1	Material vegetal	27
4.2.2	Composición mineral	28
4.2.3	Actividad nitrato reductasa <i>in vivo</i>	28
4.2.4	Diseño experimental y análisis estadístico	28
4.3	Resultados	28
4.4	Discusión	34
4.5	Bibliografía	36
5	FLUORESCENCIA TRANSIENTE DE LA CLOROFILA <i>a</i> , CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES E INTERCAMBIO GASEOSO	40
5.1	Introducción	40
5.2	Materiales y Métodos	42
5.2.1	Mediciones de fluorescencia transiente de la clorofila <i>a</i>	42
5.2.2	Intercambio gaseoso y fotosíntesis neta	43
5.2.3	Extracción, separación y cuantificación de carotenoides	44
5.2.4	Diseño experimental y análisis estadístico	44
5.3	Resultados	44
5.4	Discusión	49
5.5	Bibliografía	52
6	CONSIDERACIONES FINALES	57

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Esquema representativo de los principales pasos en la etapa fotoquímica de la fotosíntesis	5
2.2	Esquema que resume las principales variables del test JIP	7
3.1	Porcentaje de germinación y tiempo medio de germinación (TMG) en semillas de <i>Prosopis alba</i> incubadas en soluciones de NaCl	15
3.2	Peso seco de raíz, parte aérea y relación raíz/parte aérea en plántulas de <i>Prosopis alba</i> incubadas en soluciones de NaCl	16
3.3	Potencial hídrico (Ψ_w), potencial osmótico (Ψ_s), potencial de presión (Ψ_p), y contenido relativo de agua (CRA) en plántulas de <i>Prosopis alba</i> incubadas en soluciones de NaCl	17
3.4	Ajuste osmótico en plántulas de <i>Prosopis alba</i> incubadas en soluciones de NaCl	18
3.5	Concentraciones de sodio (A), potasio (B), cloruro (C), prolina (D), azúcares solubles (E), glicinabetaína (F), en plántulas de <i>Prosopis alba</i> incubadas en soluciones de NaCl	19
3.6	Contribución de solutos inorgánicos (A) y orgánicos (B) a la osmolaridad, en plántulas de <i>Prosopis alba</i> incubadas en soluciones de NaCl	20
4.1	Concentraciones de Na^+ (A), K^+ (B), Ca^{+2} (C), Mg^{+2} (D), Cl^- (E), y NO_3^- (F), en raíces de <i>Prosopis alba</i> cultivadas durante 7 días en solución nutritiva de Hoagland al 25%, ó solución nutritiva de Hoagland al 25% suplementada con 500 mM NaCl	29
4.2	Concentraciones de Na^+ (A), K^+ (B), Ca^{+2} (C), Mg^{+2} (D), Cl^- (E), y NO_3^- (F), en hojas de <i>Prosopis alba</i> cultivadas durante 7 días en solución nutritiva de Hoagland al 25%, ó solución nutritiva de Hoagland al 25% suplementada con 500 mM NaCl	31
4.3	Actividad nitrato reductasa (NR), en raíces (A), y hojas (B) de plántulas de <i>Prosopis alba</i> cultivadas durante 7 días en solución nutritiva de Hoagland al 25%, ó solución nutritiva de Hoagland al 25% suplementada con 500 mM NaCl	32
4.4	Actividad nitrato reductasa (NR), en raíces de <i>Prosopis alba</i> incubadas durante períodos de hasta 60 minutos en solución nutritiva de Hoagland al 25% (Testigo), solución nutritiva de Hoagland al 25% suplementada con 500 mM NaCl (NaCl), ó con polietilenglicol 600 isosmóticas con el tratamiento salino (PEG)	33
4.5	Actividad nitrato reductasa (NR), en raíces de <i>Prosopis alba</i> incubadas durante 60 minutos en solución nutritiva de Hoagland al 25% (-NaCl), ó solución nutritiva de Hoagland al 25% suplementada con 500 mM NaCl (+ NaCl), con ó sin la suplementación de cantaridina 50 μM	34

5.1	Fluorescencia transiente de la clorofila a (OJIP) de hojas de <i>Prosopis alba</i> sometidas a estrés salino, adaptadas a la oscuridad, y representada en escala de tiempo logarítmica (A). Diferencias de fluorescencia variable relativa, normalizadas en función del testigo (B)	45
5.2	Variables de fluorescencia de la clorofila a, deducidos a partir del test JIP	46
5.3	Índices de desempeño en plantas de <i>P. alba</i> sometidas a estrés salino	47
5.4	Concentración de carotenoides en plantas de <i>P. alba</i> sometidas a estrés salino	48
5.5	Fotosíntesis neta (A), conductancia estomática (g_s), concentración interna de CO_2 (C_i), transpiración (E), eficiencia en el uso del agua (A/E), y eficiencia en la carboxilación (A/ C_i), en plantas de <i>P. alba</i> sometidas a estrés salino	49

DECLARACIÓN

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a saber y entender, original, y producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifiquen explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no ha sido presentado, en forma total o parcial, como una tesis en ésta u otra institución

Diego Ariel Meloni

RESUMEN

El estrés salino constituye una de las principales limitantes en la producción vegetal, y las especies del género *Prosopis* resultan de gran interés para la restauración de áreas salinizadas, debido a su rusticidad. *Prosopis alba*, es una especie nativa del Chaco Occidental, considerada tolerante a la salinidad, y de interés económico, debido a las propiedades de su madera, y frutos comestibles. Esta tesis tuvo como objetivo evaluar las respuestas fisiológicas de plántulas de *Prosopis alba* sometidas a estrés salino. Se estudió el efecto de la salinidad sobre la germinación, crecimiento de plántulas, relaciones hídricas, composición mineral, metabolismo del nitrógeno, fluorescencia transiente de la clorofila *a*, concentración de carotenoides e intercambio gaseoso. Se demostró que los umbrales para la germinación y crecimiento de plántulas fueron de 600 mM y 500 mM de NaCl, respectivamente. *P. alba* realizó ajuste osmótico, mediante la acumulación de Na⁺ y glicinabetaína en hojas. Pese a ello, se comportó como una especie excluyente de Na⁺ y Cl⁻, ya que sus concentraciones en la parte aérea fueron considerablemente menor que en las raíces. La actividad nitrato reductasa se incrementó durante los primeros días de estrés, por desfosforilación de la proteína, y luego fue inhibida debido a la disminución en las concentraciones de nitrato. El estrés salino inhibió la etapa fotoquímica de la fotosíntesis, registrándose una importante disminución en el índice de desempeño total (PI_{total}), principalmente en el umbral para el crecimiento. Los análisis de carotenoides mostraron que la especie posee un mecanismo de defensa, constituido por zeaxantina, β-caroteno y luteína. De los resultados obtenidos a partir del análisis de emisión de fluorescencia de la clorofila *a*, se concluye que el PI_{total} constituye una variable interesante para la selección de genotipos tolerantes a la salinidad, debido a su relación con la asimilación del CO₂, y el metabolismo del nitrógeno.

Palabras clave: salinidad, germinación, ajuste osmótico, nitrato reductasa, nutrición mineral, fotosíntesis, fluorescencia transiente la clorofila *a*.

ABSTRACT

Saline stress is one of the main restrictions to plant production and the species of the genus *Prosopis* are of high interest for the restoration of salinized areas due to its rusticity. *Prosopis alba* is a species native to the Western Chaco Park considered as saline-stress tolerant and of economic value because of its wood properties and edible fruits. This thesis aimed to evaluate the physiological responses of *Prosopis alba* seedlings subjected to saline stress. The effect of salinity upon germination, seedlings growth, water relationships, mineral composition, nitrogen metabolism, transient fluorescence of chlorophyll *a*, carotenoids concentration and gaseous exchange was studied. It was proved that the germination and growth threshold of the seedlings was of 600 mM and 500 mM of NaCl respectively. *P. alba* made osmotic adjustment by accumulating Na⁺ and glycinbetaine in leaves. Despite this, it acted as a Na⁺ and Cl⁻ excluding species since their concentration in the aerial section was significantly smaller than in the roots. The nitrate reductase activity increased during the first days of stress by protein desphosphorilation and was inhibited due to decreased nitrate concentrations afterwards. The saline stress inhibited the photochemical stage of photosynthesis resulting in an important diminution of the total performance index (PI_{total}) mainly of the growth threshold. The analyses of carotenoids show that the species possesses a protecting mechanism made up of zeaxantine, β-carotene and lutein. Out of the results obtained from the analysis of the fluorescence emission of chlorophyll *a* is concluded that the PI_{total} becomes an interesting variable for selecting sanitary-tolerant genotypes owing to its relation to CO₂ assimilation and nitrogen metabolism.

Key words: salinity, germination, osmotic adjustment, nitrate reductase, mineral nutrition, photosynthesis, transient fluorescence of chlorophyll *a*.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Entre los estreses abióticos, la salinidad constituye una de las principales limitantes en la producción vegetal, tanto en biomasa como en área foliar (BYBORDI y EBRAHINMIAN, 2011). Aproximadamente la quinta parte de las 2.800 millones de hectáreas cultivables del planeta están afectadas por la salinidad, situación que tiende a agravarse (BEN DKHIL y DENDEN, 2010).

En Argentina la tala indiscriminada de los bosques produjo un acentuado deterioro ambiental, que generó pobreza y migraciones (LÓPEZ, 2005).

El Gran Chaco es la región con bosque seco continuo más grande de Sudamérica y ocupa 500.000 km² (HUECK, 1966). Posee especies de gran importancia forestal, entre las que se destacan las del género *Prosopis* (LÓPEZ, 2005).

Las especies del Género *Prosopis* resultan muy interesantes para la restauración de áreas degradadas afectadas por procesos de salinización, ya que son altamente tolerantes al estrés salino, y presentan maderas con excelentes propiedades físicas y mecánicas (VELARDE *et al.*, 2003).

El algarrobo blanco (*Prosopis alba* G.) es una especie arbórea de importancia forestal del Chaco Occidental, empleada en mueblería y carpintería, que presenta frutos aptos para el consumo humano y como forraje. Habita las zonas bajas más húmedas en las sabanas con suelos arenosos, formando cinturones alrededor de las depresiones salinas (GIMÉNEZ y MOGLIA, 2003).

Si bien el algarrobo blanco es considerado tolerante al estrés salino, no se conocen los umbrales para su germinación, ni los mecanismos fisiológicos involucrados en su adaptación a dichas condiciones.

Hipótesis

- El umbral para la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de *Prosopis alba* se encuentra próximo a la concentración del agua de mar.
- *P. alba* responde al estrés salino incrementando la relación raíz/parte aérea.
- *P. alba* realiza ajuste osmótico, mediante la síntesis de solutos osmocompatibles.
- Altas concentraciones de NaCl disminuyen los niveles de Ca⁺² y K⁺ en raíces y hojas.
- El estrés salino disminuye la concentración de NO₃⁻ en hojas y la actividad de la enzima nitrato reductasa.
- El estrés salino produce alteraciones en la etapa fotoquímica de la fotosíntesis que pueden detectarse mediante cambios en las variables de fluorescencia transiente de la clorofila *a*.

- El estrés salino incrementa la concentración de carotenoides en hojas.
- El NaCl inhibe la asimilación de CO₂.

Objetivo general:

- Evaluar las respuestas fisiológicas de plántulas de *Prosopis alba* sometidas a estrés salino.

Objetivos específicos:

- Determinar el umbral de concentración de NaCl, para la germinación de semillas y crecimiento de plántulas.
- Evaluar el impacto del estrés salino sobre el crecimiento de plántulas.
- Determinar el efecto del estrés salino sobre la composición mineral y las relaciones hídricas.
- Evaluar el impacto de la salinidad sobre el metabolismo del nitrógeno.
- Caracterizar la respuesta de las etapas fotoquímica y bioquímica del proceso fotosintético, a la concentración salina del medio.

Bibliografía

BEN DKHIL, B., y DENDEN, M. 2010. Biochemical and mineral responses of okra seeds (*Abelmoschus esculentus* L. variety Marsaouia) to salt and thermal stresses. *Journal of Agronomy*, 9: 29-37.

BYBORDI, A.; y EBRAHIMIAN, E. 2011. Effect of salinity stress on activity of enzymes involved in nitrogen and phosphorous metabolism case study: Canola (*Brassica napus* L.). *Asian Journal of Agricultural Research*, 5:208-214.

GIMÉNEZ, A.M., y MOGLIA, J.G. 2003. Árboles del Chaco Argentino. Guía para el reconocimiento dendrológico. Editorial El Liberal, Santiago del Estero, Argentina. 307 p.

HUECK, K. 1966. Los bosques de Sudamérica. Stuttgart. G. Fisher, 422 p.

LÓPEZ, C. 2005. Evaluación de la variación genética en especies del género *Prosopis* de la Región Chaqueña Argentina para su conservación y manejo. En: Norverto, C.A. (Ed.). Mejores árboles para más forestadores: el programa de producción de material de propagación mejorado y el mejoramiento genético en el proyecto forestal de desarrollo. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (Argentina), pp. 195-203.

VELARDE, M., FELKER, P., y DEGANO, C. 2003. Evaluation of Argentine and Peruvian *Prosopis* germoplasm for growth at seawater salinities. *Journal of Arid Environments*, 55:515-531.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El Género *Prosopis*: origen, distribución e importancia

El Género *Prosopis* (*Fabacea*, *Mimosoideae*), incluye 44 especies distribuidas en regiones áridas y semiáridas de América, sudoeste de Asia, y norte de África; de éstas 28 son nativas de Argentina (VILLAGRA *et al.*, 2010). En nuestro país, *P. alba* crece espontáneamente en las provincias de Santiago del Estero, Córdoba, Tucumán, Chaco y Santa Fe (LÓPEZ, 2001).

Un análisis de la evolución de la familia Fabaceae, sugiere que las mimosoideas se originaron durante el Eoceno, hace 54 millones de años, cuando aún América del Norte y Europa estaban unidas (DOYLE y LUCKOW, 2003).

La gran diversidad de especies de este género nativas de América del Sur, sugiere que el principal centro de irradiación se encuentra en el Chaco argentino-paraguayo (ROIG, 1993). Esta región ocupa las planicies cálidas del norte argentino y Paraguay; con precipitaciones medias anuales de 550 a 1.300 mm y temperaturas medias anuales de 20 a 23°C (SARAVIA TOLEDO, 1993).

Todas las especies del género *Prosopis* poseen $2n=28$, excepto *P. juliflora* que es tetraploide ($4n=56$). Por otra parte el pequeño tamaño de su genoma (292 a 490 Mbp), constituye una evidencia a favor de la hipótesis que sugiere que sus especies son muy primitivas (HARRIS *et al.*, 2003).

Debido a la gran importancia económica, la mayoría de los estudios fisiológicos y genéticos se realizaron en la subfamilia de las papilonoideas, suponiendo que el comportamiento de las mimosoideas sería similar. Sin embargo, la evolución de leguminosas anuales, tales como *Pisum sativum*, *Glycine max*, y *Medicago sativa*, tuvo lugar en regiones templadas, con altos niveles de precipitaciones (LAVIN *et al.*, 2005). En contraste, según CATALANO *et al.* (2008) la evolución de *Prosopis* ocurrió en las regiones más cálidas (como el Valle de la Muerte, California, USA), y de menores precipitaciones (desierto de Atacama, Chile).

Por lo tanto la evolución del género *Prosopis* requirió la adaptación a estreses hídrico, salino y térmico. Así, mientras los géneros *Pisum*, *Phaseolus* y *Glycine* son poco tolerantes a niveles de salinidad de 2 a 3 dS m⁻¹, algunas especies del género *Prosopis* pueden desarrollarse en salinidades de 45 dS m⁻¹ (REGINATO *et al.*, 2012).

Otra diferencia sustancial entre la fisiología de ambos grupos taxonómicos es la susceptibilidad del proceso de fijación simbiótica del nitrógeno en condiciones de estrés. En especies de la subfamilia Papilionoideae se observó abscisión de nódulos radicales, ó una importante disminución en la fijación del N cuando el potencial hídrico alcanzó valores de -2,8 MPa. En *Prosopis* este proceso se realiza a tasas elevadas, incluso en potenciales hídricos de -3,5 MPa, y temperaturas de 45°C (FELKER, 2009).

Las especies del género *Prosopis* se desarrollan en regiones áridas y semiáridas, y forman parte de ecosistemas muy sensibles a la intervención

antrópica. Por ende cumplen un rol fundamental en la protección del suelo contra la erosión, y mejoran su calidad al aportar materia orgánica y nutrientes (FELKER, 2009).

La madera de *P. alba* posee características físicas muy interesantes, principalmente bajos valores de contracción radial y tangencial, de 1,8 y 2,9 respectivamente (TURK y CUTTER, 1984). Éstos son menores a los de especies citadas en el compendio de maderas tropicales (CHUDNOFF, 1984), incluyendo a la teca (*Tectona grandis*), caoba (*Swietenia macrophylla*) y palo santo de la india (*Dalbergia latifolia*). Debido a estas características, y a su color marrón rojizo, su madera es muy apta para ser utilizada en carpintería fina.

Los frutos de *Prosopis*, fueron una importante componente en la dieta de los pueblos originarios de América del Norte (FELKER, 1979), Sudamérica (D' ANTONI y SOLBRIG, 1977), y los primeros habitantes de India (MANN y SAXENA, 1980). En Argentina, las harinas elaboradas a partir del mesocarpo de frutos de *P. alba* poseen una concentración de sacarosa que oscila entre 48 y 59% (FELKER *et al.*, 2003).

En lo que respecta al mejoramiento genético, LÓPEZ *et al.* (2001) realizaron un ensayo de progenies de *P. alba* en la provincia de Santiago del Estero, con 57 familias de polinización abierta, de 8 diferentes orígenes de su área de distribución natural. Las estimaciones de parámetros genéticos y ganancias esperadas revelaron buenas perspectivas de mejoramiento por selección.

El potencial de *P. alba* para la recuperación de áreas degradadas, su importancia económica, y perspectivas para el mejoramiento genético por selección, justifica el estudio de sus respuestas fisiológicas en condiciones de estrés salino. Los resultados permitirían obtener variables fisiológicas asociadas a dicha tolerancia, constituyendo una herramienta importante en la selección de genotipos tolerantes.

2.2. Respuestas fisiológicas de los vegetales frente al estrés salino

Los efectos adversos de la salinidad sobre el crecimiento vegetal están asociados a la disminución del potencial hídrico del suelo, la toxicidad de los iones, el desbalance nutricional, o una combinación de estos factores (MUNNS y TESTER, 2008). Algunas plantas resistentes a estas condiciones pueden reaccionar produciendo una acumulación de solutos osmocompatibles, que contribuyen a disminuir el potencial hídrico celular y mantener la turgencia. Estos solutos incluyen carbohidratos, ácidos orgánicos, aminoácidos, glicinabetaína, etc. (ASHRAF y FOOLAD, 2007).

Las plantas que crecen en suelos salinos absorben grandes cantidades de Na^+ y Cl^- . Estos iones tienen efectos negativos sobre el metabolismo vegetal, de modo que en muchos casos la inhibición del crecimiento es causada principalmente por su toxicidad (MARCHNER, 1995). Estas alteraciones en la homeostasis de iones pueden alterar el metabolismo del nitrógeno, inhibiendo su absorción y su utilización, al interferir con la reducción del nitrato y la síntesis proteica (SIDDIQUI *et al.*, 2008). Su interferencia con la absorción de nitrógeno puede darse en dos niveles: competencia entre iones Cl^- y NO_3^- , y daños en la integridad de las membranas celulares (NEDJIMI y DAOUD, 2009).

La inhibición que produce el estrés salino sobre la tasa de crecimiento puede estar asociada a alteraciones en distintas etapas del proceso fotosintético. Entre ellas se destacan el cierre estomático, daños causados por iones tóxicos sobre el aparato fotosintético (una reducida eficiencia en la cadena transportadora de electrones, y daños en el complejo colector de luz), u otros procesos metabólicos (KAO *et al.* 2003). En la Figura 2.1, se resumen las principales componentes de dicha cadena transportadora de electrones, que se ubica en la membrana tilacoidal. Se destacan el fotosistema II (PSII), la feofitina (Phe), que corresponde al primer aceptor de electrones del PSII, las quinonas A y B (Q_A , Q_B), la hidroquinona (QH_2), el complejo citocromo b_6f (Cyt b_6f), la plastocianina (PC), fotosistema I (PSI), ferredoxina (Fd), y el complejo ATP sintasa.

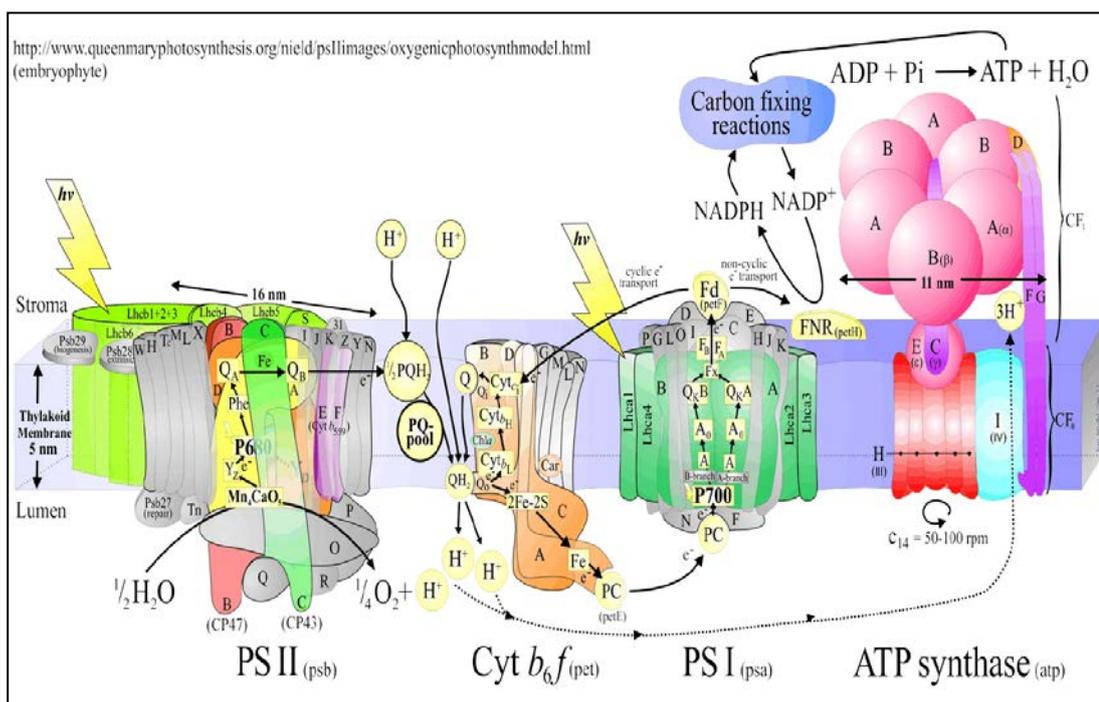


FIGURA 2.1. Esquema representativo de los principales pasos en la etapa fotoquímica de la fotosíntesis. PSII (Fotosistema II), Phe (feofitina), Q_A (quinona A), Q_B (quinona B), PQH_2 (plastoquinol, ó plastoquinona reducida), cyt b_6f (complejo citocromo b_6f), PC (plastocianina), PSI (fotosistema I), Fd (ferredoxina), ATP synthase (ATP sintasa). Imagen tomada de la URL: http://macromol.sbcs.qmul.ac.uk/resources/AllComplexes_25Nov2011_1800px.gif. Citada por GOVINDJEE (2013).

El test JIP, realizado a partir de las curvas de emisión de fluorescencia de la clorofila *a*, permite evaluar el funcionamiento de la etapa fotoquímica de la fotosíntesis (TSIMILLI- MICHAEL y STRASSER, 2008). Dicho test se basa en la teoría de los flujos de energía en biomembranas (STRASSER, 1981). Las definiciones y ecuaciones del test JIP se resumen en el esquema de la Figura 2.2 (Adaptado de YUSUF *et al.*, 2010), que consiste en el esquema z de la fotosíntesis, expresado mediante una secuencia de flujos (flechas anchas).

La cascada de energía comienza con la absorción de luz (ABS) en los pigmentos del complejo antena del FSII, y termina en la reducción de los aceptores finales de electrones del FSI (RE). Además suministran información relevante los flujos intermedios, como el flujo de captura, "trapping" (TP), que se define como el flujo de energía que conduce a la reducción de los aceptores de electrones del FSII (feofitina y quinona a), y el flujo de transporte (ET), que se refiere al transporte de electrones hacia los aceptores que se encuentran luego de la Q_A^- (o sea el intersistema).

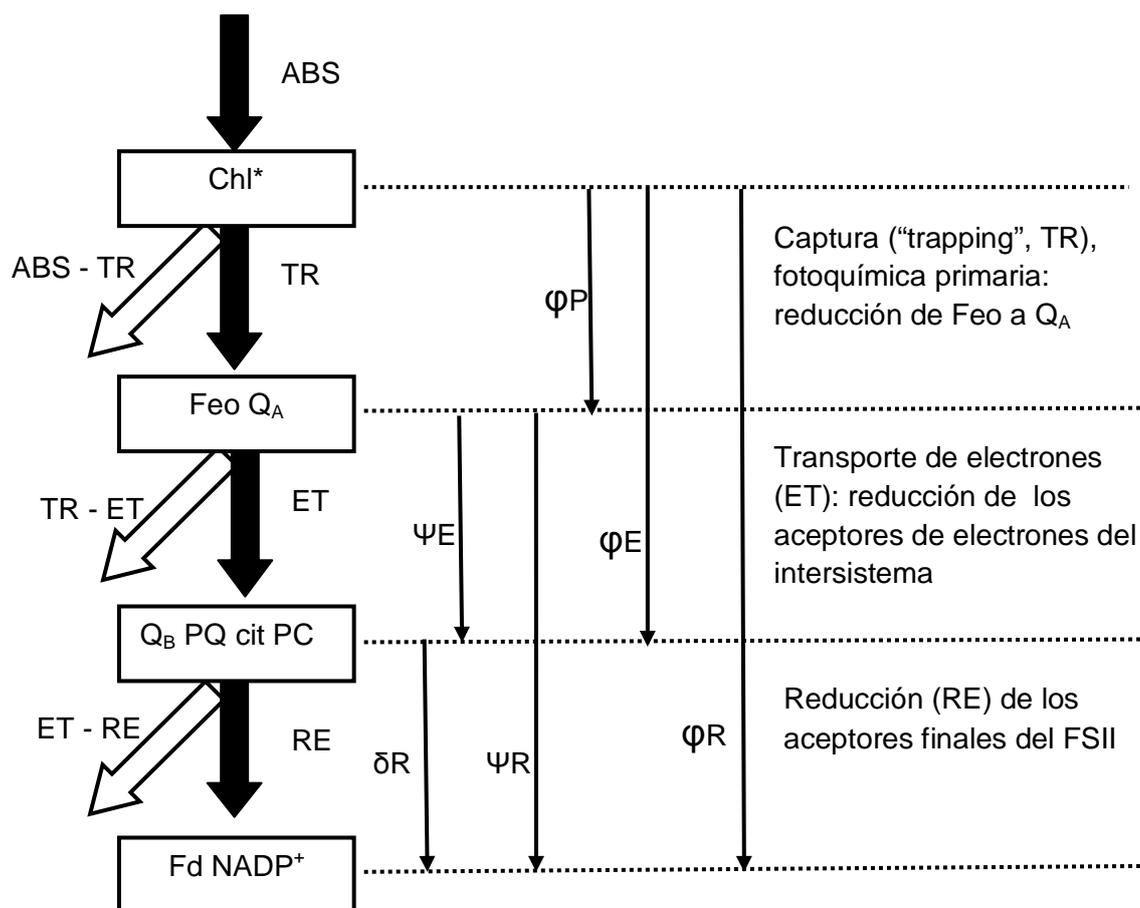
La afluencia de energía en cada uno de los pasos, es luego usada para la transferencia de electrones (flechas negras), y por los tanto conservada en las reacciones fotoquímicas, o disipada en las reacciones no fotoquímicas en forma de calor (flechas blancas).

En la Figura 2.2 también se indica la eficiencia en la conservación de la energía en cada paso (flechas que se ubican a la derecha de la cascada de energía), donde ϕ se refieren a los rendimientos cuánticos (eficiencias sobre la base de la absorción de luz, por ejemplo, flujos por ABS); Ψ eficiencia por TP, y δ , eficiencia por ET.

La Figura 2.2 incluye las ecuaciones a través de las cuales se definen los rendimientos cuánticos en el inicio de la iluminación, o sea cuando todos los centros de reacción están abiertos ($t=0$).

En algunas especies, los resultados obtenidos con el test JIP pueden tener aplicaciones prácticas en trabajos de selección de genotipos tolerantes a la salinidad, ya que permiten detectar alteraciones antes que se observe el daño en la planta (AKRAM *et al.*, 2006). Si bien la mayoría de los trabajos se realizaron sobre especies de importancia agronómica, ya se han efectuado algunos estudios en especies leñosas del hemisferio norte. Por ejemplo, PERCIVAL *et al.* (2003) seleccionaron genotipos de *Acer* tolerantes a altas concentraciones salinas, basándose en el grado de disminución del índice de performance obtenido a partir de mediciones de fluorescencia. SIXTO *et al.* (2006) correlacionaron los daños producidos por el NaCl en hojas de clones de *Populus alba*, con la relación F_v/F_M , obtenidas con fluorómetros portátiles.

De este modo, el estrés salino suele disminuir la capacidad de las plantas para fijar CO_2 , quedando expuestas a un exceso de energía, que en caso de no ser disipada adecuadamente, puede ser perjudicial para el fotosistema II, debido a la sobrerreducción de los centros de reacción. Por lo tanto, el estrés puede predisponer a las plantas a fotoinhibición y fotodaño del fotosistema II (LU *et al.*, 2002; LOUKEHAICH *et al.*, 2011). Algunos vegetales han desarrollado mecanismos fotoprotectores que permiten disipar el exceso de energía de excitación, protegiendo al aparato fotosintético. En ellos suelen participar carotenoides, como la zeaxantina, anteraxantina y luteína que son además componentes esenciales del complejo colector de luz y desactivan el oxígeno singlete, que frecuentemente se forma en condiciones de estrés abiótico (QIU *et al.*, 2003).



Donde:

$$\Phi_{E0} = \Phi_{P0} \cdot \Psi_{E0} = ET_0/ABS;$$

$$\Phi_{R0} = \Phi_{P0} \cdot \Psi_{E0} \cdot \delta_{R0};$$

$$\Psi_{E0} = ET_0/TR_0;$$

$$\delta_{R0} = RE_0/ET_0$$

FIGURA 2.2. Esquema que resume las principales variables del test JIP; con los flujos de energía (flechas gruesas), y sus bifurcaciones. Las eficiencias o rendimientos (flechas finas), se definen como relaciones de flujos de energía. ABS: energía absorbida, Feo: feofitina, Q_A: quinona A, Q_B: quinona B, cit: complejo citocromo b₆f, PC: plastocianina, Fd: ferredoxina, (Adaptado de Yusuf *et al.*, 2010).

2.3. Bibliografía

AKRAM, M.A., FAROOQ, S., AFZAAL, M., NAZ, F., y ARSHAD, R. 2006. Chlorophyll fluorescence in different wheat genotypes grown under salt stress. *Pakistan Journal of Botany*, 38:1739-1743.

ASHRAF, M., y FOOLAD, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59:206-216.

CATALANO, S.A., VILARDI, J.C., TOSTO, D., y SAIDMAN, B.O. 2008. Molecular phylogeny and diversification history of *Prosopis* (Fabaceae: Mimosoideae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 93:621-640.

CHUDNOFF, M. 1984. *Tropical Timbers of the World*. Agricultural Handbook 607. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington, D.C.

DOYLE, J.J., y LUCKOW, M.A. 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology*, 131: 900-910.

FELKER, P. 1979. Mesquite-An all purpose leguminous arid land tree. In: Ritchie GA (ed.) *New Agricultural Crops*. American Association for the Advancement of Science Symposium. Pp: 89-132.

FELKER, P., GRADOS, N., CRUZ, G., y PROKOPIUK, D. 2003. Economic assessment of production of flour from *Prosopis alba* and *P. pallida* pods for human food applications. *Journal of Arid Environments*, 53: 517-528.

FELKER, P. 2009. Unusual physiological properties of the arid adapted tree legume *Prosopis* and their applications in developing countries. En: De la Barrera, E. y W.K. Smith (Eds.). *Perspectives in Biophysical Plant Ecophysiology: a tribute to Park S. Nobel*. Universidad Autónoma de México, México.

FLEXAS, J., y MEDRANO, H. 2002. Energy dissipation in C3 plants under drought. *Functional Plant Biology*, 29: 1209–1215.

GOVINDJEE, L.A. 2013. Photosynthesis web resources. *Photosynthesis Research*, 115:179-214.

HARRIS, P.J.C., PASIECZNIK, N.M., SMITH, S.J., BILLINGTON, J.M., y RAMÍREZ, L. 2003. Differentiation of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC and *P. pallida* (H B. Ex. Willd.) H.B.K. using foliar characters and ploidy. *Forest Ecology and Management*, 180: 153-164.

KAO, W.Y., TSAI, T.T., y SHIH, C.N. 2003. Photosynthetic gas Exchange and chlorophyll a fluorescence of three wild soybean species in response to NaCl treatments. *Photosynthetica*, 41:415-419.

LAVIN, M., HERENDEEN, P.S., y WOJCIECHOWSKI, M.F. 2005. Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Systematic Biology*, 54:575-94.

LOUKEHAICH, R., ELYACHIOUI, M., BELHABIB, N., y DOUIRA, A. 2011. Identifying multiple physiological responses associated with salinity-tolerance for evaluating three tomato cultivars selected from Moroccan territory. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 10:1219-1231.

LÓPEZ, C., MALDONADO, A., y SALIM, V. 2001. Variación genética de los fenotipos de *P. alba*. *Investigación Agropecuaria: Sistemas y Recursos Forestales*, 10:59-68.

LU, C., QIU, N., LU, Q., WANG, L., y KUANG, T. 2002. Does salt stress lead to increased susceptibility of photosystem II to photoinhibition and changes in photosynthetic pigment composition in halophyte *Suaeda salsa* grown outdoors?. *Plant Science*, 163:1063-1068.

MANN, H.S., y SAXENA, S. 1980. *Prosopis cineraria* in the Indian Desert. Its role in Agroforestry. CAZRI monograph Vol 11, Central Arid Zone Research Institute, Jodhpur, India.

MARCHNER, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 3rd. Ed. Academic Press, London.

MUNNS, R., y TESTER, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 58: 651-681.

NEDJIMI, B., y DAOUD, Y. 2009. Effects of calcium chloride on growth, membrane permeability and root hydraulic conductivity in two *Atriplex* species grown at high (sodium chloride) salinity. *Journal of Plant Nutrition*, 32: 1818–1830.

PERCIVAL, G.C., FRASER, G.A., y OXENHAM, G. 2003. Foliar salt tolerance of *Acer* genotypes using chlorophyll fluorescence. *Journal of Arboriculture*, 29:61-65.

QIU, N., LU, Q., y LU, C. 2003. Photosynthesis, photosystem II efficiency and the xanthophyll cycle in the salt-adapted halophyte *Atriplex centralasiatica* *New Phytologist*, 159:479-486.

REGINATO, M., SGROY, M., LLANES, A., CASSÁN, F., y LUNA, V. 2012. The american halophyte *Prosopis strombulifera*, a new potential tool to confer salt tolerance to crops. En: ÖZTÜRK, M., AHMAD, M.S.A., y AKSOY, A. (Eds.). *Crop production for agricultural improvement*. Springer, Berlin, pp. 136-167.

ROIG, F.A. 1993. Informe nacional para la selección de germoplasma de especies de *Prosopis* de la República Argentina. *Contribuciones mendocinas a la Reunión Regional para América Latina y el Caribe de la Red de Forestación del CIID. Conservación y Mejoramiento de las especies del género *Prosopis**, pp. 1-36.

SARAVIA TOLEDO, C. 1993. The Chaco savannah lands of South America with particular reference to the process of degradation in their pastoral and forestry resources. p.86-90. In: *Grasslands for our World. Proceedings XVII International Grassland Congress*, Nueva Zelandia. Wellington: SIR Publishing.

SIDDIQUI, M.H., KHAN, M.N., MOHAMMAD, F., y KHAN, M.M.A. 2008. Role of nitrogen and gibberellin (GA₃) in the regulation of enzyme activities and in

osmoprotectant accumulation in *Brassica juncea* L. under salt stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194: 214–224.

SIXTO, H., ARANDA, I., y GRAU, J.M. 2006. Assessment of salt tolerance in *Populus alba* clones using chlorophyll fluorescence. *Photosynthetica*, 2:169-173.

STRASSER, R.J. 1980. The grouping model of plant photosynthesis: heterogeneity of photosynthetic units in thylakoids. En: AKOYUNOGLU, G. (Ed.), *Photosynthesis: Proceedings of the Vth international Congress of Photosynthesis, Halkidiki-Greece, vol.III, Structure and Molecular Organisation of the Photosynthetic Apparatus*, Balaban International Science Services, Philadelphia, pp. 727-737.

TSIMILLI-MICHAEL, M., y STRASSER, R.J. 2008. *In vivo* assessment of stress impact on plants' vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants. En: VARMA, A. (Ed.), *Mycorrhiza: state of the art, genetics and molecular biology, ecofunction, biotechnology, ecophysiology, structure and systematic*, vol. 3. Springer, England, pp. 679-703.

TURC, C.O.; y CUTTER, B.E. 1984. Sorption and shrinkage studies of six Argentine woods. *Wood and Fiber Science*, 16: 575-582.

YUSUF, M.A., KUMAR, D., RAJWANSHI, R., STRASSER, R.J., TSIMILLI-MICHAEL, M., y GOVINDJEE, S.N.B. 2010. Overexpression of gamma-tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797:1428-38.

VILLAGRA, P., VILELA, A., GIRODANO, C., y ÁLVAREZ, J. 2010. Ecophysiology of *Prosopis* species from de arids lands of Argentina: what do we know about adaptations to stressful environments?. En: RAMAWAT, K.G. (ed). *Desert plants*. Springer Verlag. Berlin Heidelberg, pp. 321-340.

CAPÍTULO 3. GERMINACIÓN, CRECIMIENTO Y AJUSTE OSMÓTICO

3.1 Introducción

El algarrobo blanco (*Prosopis alba* G.) es una especie arbórea de importancia forestal en la Región Fitogeográfica del Chaco Occidental, empleada en mueblería y carpintería, que presenta frutos aptos para el consumo humano y como forraje. Habita las zonas bajas más húmedas en las sabanas con suelos arenosos, formando cinturones alrededor de las depresiones salinas (GIMÉNEZ y MOGLIA, 2003).

Se ha sugerido que el género *Prosopis* tiene su centro de radiación en la Región del Chaco, y desde allí, por especiación, se habría difundido hacia territorios áridos del sur y oeste. Su expansión habría involucrado adaptaciones morfológicas y fisiológicas, que le permitieron ocupar diferentes nichos ecológicos en zonas áridas y semiáridas (VILLAGRA *et al.*, 2010). Estas regiones además de poseer un importante déficit hídrico suelen presentar suelos salinos sódicos (SOSA *et al.*, 2005).

Entre los procesos fisiológicos, la germinación y el establecimiento de las plántulas constituyen los períodos más críticos en el ciclo de vida de las plantas que se desarrollan en regiones áridas; por lo tanto la presencia de adaptaciones en estas etapas de la ontogenia, puede determinar su distribución natural (VILLAGRA y CAVAGNARO, 2005).

La salinidad puede inhibir la germinación y el crecimiento de plántulas, al impedir la absorción de agua debido al bajo potencial hídrico de la solución del suelo, o debido al efecto tóxico de los iones (GUMA *et al.*, 2010).

El género *Prosopis* presenta especies altamente tolerantes a la salinidad, habiéndose reportado umbrales superiores a 500 mM de NaCl para la germinación y crecimiento de plántulas en *P. strombulifera* (SOSA *et al.*, 2005; LUNA *et al.*, 2008), *P. juliflora* (EL-KEBLAWY y AL-RAWAI, 2005), *P. alpataco* y *P. argentina* (VILLAGRA, 1997), *P. ruscifolia* (GONZÁLEZ *et al.*, 2006). Aunque no se han encontrado registros del impacto de la salinidad sobre la germinación de *P. alba*, FELKER *et al.* (2008), han reportado la selección de individuos de esta especie capaces de tolerar 450 dS m⁻¹ de NaCl (aproximadamente 500 mM). Pese a ello, se desconocen los mecanismos fisiológicos involucrados en la tolerancia de *P. alba* a elevadas concentraciones de NaCl en el suelo.

El ajuste osmótico (AO) es un mecanismo de adaptación a los estreses hídrico y salino. Consiste en la acumulación de solutos osmóticamente activos, que disminuyen el potencial hídrico de los tejidos, manteniendo un gradiente con la solución del suelo, permitiendo la absorción de agua. Esto permite mantener la turgencia celular, y los procesos fisiológicos que dependen de ellas, como por ejemplo el crecimiento (GIMENO *et al.*, 2012).

El AO ha sido considerado como una importante adaptación fisiológica, asociada con la tolerancia al estrés salino y ha recibido mucha atención en los últimos años (GUO *et al.*, 2013).

Los solutos osmocompatibles, aquellos involucrados en el ajuste osmótico, pueden dividirse en tres grandes grupos: aminoácidos (principalmente prolina), aminas cuaternarias (glicinabetaina), y polialcoholes (manitol, pinito, etc.) (SILVA *et al.*, 2010).

Los solutos almacenados, y su contribución al AO varían ampliamente entre las especies. Así por ejemplo, en muchas quenopodiáceas el grado de tolerancia al estrés salino correlaciona con la concentración de glicinabetaina en el citoplasma (BOUCHENAK *et al.*, 2012), que además de contribuir al AO, puede también participar en el mantenimiento de la integridad de membranas, y estabilidad de otras estructuras celulares (SILVA *et al.*, 2010).

En *Prosopis strombulifera*, una halófito que coloniza una amplia región comprendida entre Arizona y la Patagonia argentina, la tolerancia al estrés salino ha sido atribuida a la síntesis de prolina, manitol y pinitol en el citoplasma (LLANES *et al.*, 2013).

En citrus, la tolerancia al estrés hídrico, correlacionó con los niveles de prolina, habiéndose demostrado que plantas transgénicas de citrumelo, que acumulan grandes concentraciones de este aminoácido, son más tolerantes al estrés hídrico (FREITAS DE CAMPOS *et al.*, 2011).

Los iones, principalmente K^+ , Na^+ y Cl^- también participan del AO, el primero es almacenado en el citoplasma, y los otros debido a su toxicidad en elevadas concentraciones, son compartimentalizados en la vacuola (CARILLO *et al.*, 2011). Al respecto, SUBBARAO *et al.* (2001) demostraron que el Na^+ , puede gatillar la síntesis de glicinabetaina, independientemente del estrés osmótico.

Este trabajo tuvo como objetivo poner a prueba la hipótesis de que *P. alba* posee umbrales para la germinación y crecimiento de plántulas superiores a 500 mM de NaCl, y que utiliza como estrategia el ajustarse osmótico mediante la síntesis de solutos osmocompatibles.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Material Vegetal

Los frutos se cosecharon al azar dentro de un bosque *P. alba* desarrollado al margen de lagunas temporales, en la localidad de Maco (27°51'20" S; 64°13'27"W), Provincia de Santiago del Estero, Argentina. Las semillas se extrajeron manualmente realizándose una incisión con ayuda de una pinza, para facilitar su imbibición durante la germinación.

3.2.2 Germinación

Se colocaron a germinar cuatro lotes de 25 semillas entre toallas de papel, humedecidas con 10 ml de soluciones de NaCl en concentraciones de 0, 100, 200, 300, 400, 500 600 y 700 mM. Las toallas de germinación se enrollaron, cubrieron con bolsas de polietileno para minimizar las pérdidas de agua por evaporación, y se dispusieron verticalmente en cámara de crecimiento, a 25°C, con un fotoperíodo de 12 hs (GONZÁLEZ *et al.*, 2006). Se consideraron germinadas aquellas semillas en las que emergieron los cotiledones. Se calculó el porcentaje

de germinación y el tiempo medio de germinación (TMG) según la ecuación propuesta por NICHOLS Y HEIDECKER (1996):

$$\text{TMG} = \frac{\sum(f \cdot x_i)}{\sum x_i}$$

Donde:

x_i : número de nuevas semillas germinadas cada 24 horas.

f : número de días desde que las semillas fueron colocadas a germinar.

3.2.3 Crecimiento

Se colocaron a germinar semillas en las condiciones descritas en el ítem anterior.

Posteriormente, se cultivaron hidropónicamente plántulas de dos semanas de edad, en recipientes de 5 litros conteniendo solución nutritiva de Hoagland al 25% con la adición de 0, 100, 200, 300, 400, 500 ó 600 mM de NaCl (20 plántulas por recipiente).

El ensayo se realizó en cámara de crecimiento (25°C, con un fotoperíodo de 12 horas).

Las pérdidas por transpiración se compensaron mediante el agregado de agua destilada, manteniendo constante el nivel de solución en los recipientes.

Luego de haber alcanzado la máxima concentración salina, las plántulas se mantuvieron en esas condiciones durante 7 días, y en ese material se determinó la materia seca, y se realizaron las mediciones las variables asociadas a las relaciones hídricas y las determinaciones químicas.

3.2.4 Relaciones hídricas

El potencial hídrico (Ψ_w), se midió mediante el uso de una cámara de presión (SCHÖLANDER *et al.*, 1965).

El contenido relativo de agua (CRA) se determinó utilizando la metodología descripta por SILVA *et al.* (2010), a través de la siguiente ecuación:

$$\text{CRA} = [(PF - PS) / (Psat - PS)] * 100$$

Donde:

PF: peso fresco

PS: peso del material secado a estufa a 65°C

Psat: peso del material saturado de agua destilada

Las hojas empleadas para determinar el potencial osmótico (Ψ_s), se congelaron en nitrógeno líquido, y posteriormente se almacenaron en freezer (-20°C), hasta su utilización. Luego se prensaron, y el líquido obtenido se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos, a 4 °C. En el sobrenadante se midió la osmolaridad, con un microosmómetro; y se calculó el Ψ_s mediante la ecuación de Van't Hoff (SILVA *et al.*, 2010):

$$\Psi_s = -c \text{ (mosmol kg}^{-1}\text{)} * 2,58 \times 10^{-3}$$

El potencial de presión Ψ_p se calculó mediante la diferencia entre Ψ_w y Ψ_s .

El ajuste osmótico se determinó de acuerdo a DÍAZ-LÓPEZ *et al.* (2012), para lo cual se midió el potencial osmótico en turgor máximo (Ψ_s^{100}) en hojas de los distintos tratamientos de estrés (Ψ_{ss}^{100}) y del testigo (Ψ_{sc}^{100}). Para ello, las hojas se hidrataron completamente en cajas de Petri, entre discos de papel de filtro humedecidos con agua destilada, durante un período de 24 horas, a 4 °C, en oscuridad. El AO se calculó como la diferencia entre Ψ_{sc}^{100} y Ψ_{ss}^{100} .

3.2.5 Cuantificación de solutos inorgánicos y orgánicos

Las concentraciones de Na^+ y K^+ , se cuantificaron mediante espectrofotometría de llama (JAMEEL AL-KAHAYRI, 2002). La concentración del ión Cl^- se determinó a través titulación con AgNO_3 (MALAVOLTA *et al.*, 1989).

La prolina, los azúcares solubles y la glicinabetaína se extrajeron y cuantificaron espectrofotométricamente de acuerdo a las técnicas descritas por BATES *et al.* (1973), DUBOIS *et al.* (1956), y GRIEVE Y GRATTAN (1983), respectivamente.

La concentración de cada soluto se expresó en mmol de soluto kg^{-1} de agua en el tejido. La contribución relativa (CR) de cada soluto al Ψ_s fue estimada como porcentaje de la osmolaridad, calculada mediante la siguiente relación: $\text{CR} = \text{concentración del soluto (mmol kg}^{-1}\text{ de agua)} / \text{osmolaridad (mmol kg}^{-1}\text{ de solvente)}$, de acuerdo a SILVA *et al.* (2010).

3.2.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental totalmente aleatorizado con cuatro repeticiones. Los resultados de germinación no cumplieron los supuestos del ANOVA, por lo que se analizaron con el test no paramétrico de Kuskal-Wallis. Los resultados de los ensayos de crecimiento y relaciones hídricas se analizaron con ANOVA y test de Tukey.

3.3 Resultados

La especie mostró una gran tolerancia a la salinidad durante la etapa de germinación (Figura 3.1). El porcentaje de germinación no fue afectado por concentraciones de 100, 200, 300 y 400 mM de NaCl, con respecto al testigo manteniéndose en el orden del 98%. En 500 mM de NaCl se produjo una pequeña, aunque significativa disminución, alcanzando una media del 86%. Posteriormente en 600 mM, se registró una importante inhibición de la germinación con una media del 12%. En mayores concentraciones de NaCl la germinación fue inhibida completamente, y aunque emergieron las radículas, no ocurrió lo mismo con los cotiledones. Por lo tanto el umbral de la especie, en la etapa de germinación fue de 600 mM de NaCl.

El tiempo medio de germinación (TMG) fue más sensible al NaCl que el porcentaje final de germinación, registrándose un incremento a partir de 400 mM de NaCl, probablemente debido a una imbibición más lenta de las semillas, como consecuencia del bajo potencial hídrico de la solución de incubación.

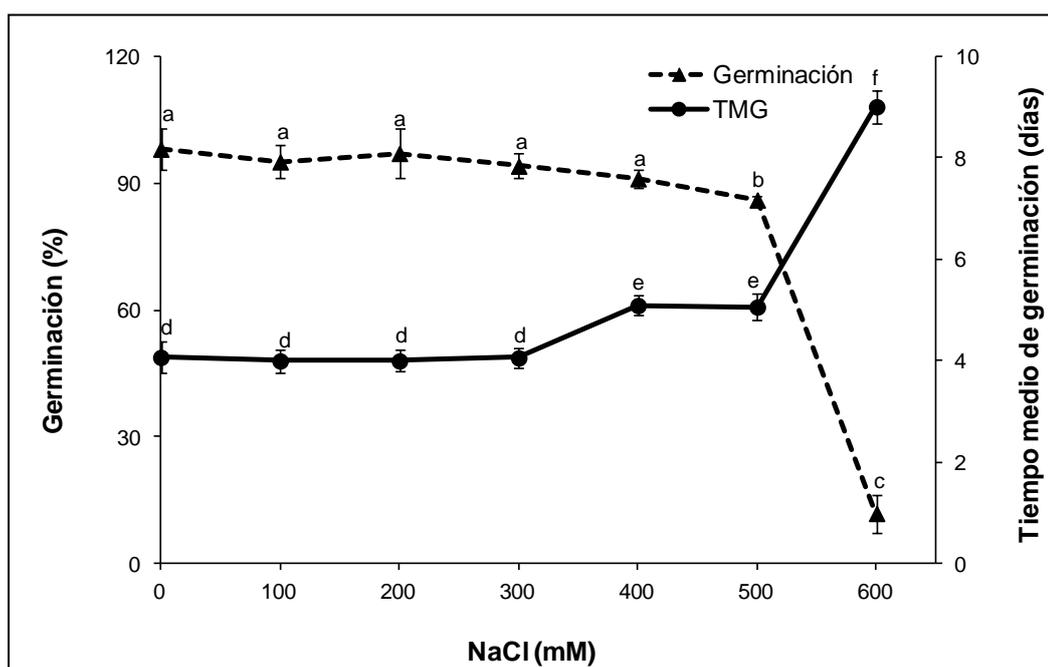


FIGURA 3.1. Porcentaje de germinación y tiempo medio de germinación (TMG) en semillas de *Prosopis alba* incubadas en soluciones de NaCl. Para cada variable, letras distintas indican diferencias significativas según el test de Kruskal-Wallis

El crecimiento de las plántulas cultivadas hidropónicamente fue más sensible al estrés salino, que el proceso de germinación (Figura 3.2), y se observó un comportamiento diferente en la parte aérea y raíces, respectivamente. En 400 mM de NaCl la biomasa aérea disminuyó un 34% con respecto al testigo, y en 500 mM un 46%. Por su parte, en 400 mM de NaCl la biomasa de raíces disminuyó un 30% con respecto al testigo, y luego se mantuvo constante. Como consecuencia de ello, se apreció un incremento significativo en la relación raíz/parte aérea a partir de 400 mM de NaCl.

Las plántulas crecidas en presencia de 600 mM de NaCl presentaron clorosis y necrosis, muriendo antes de concluir el ensayo. Por lo tanto el umbral para el crecimiento de plántulas algarrobo blanco es de 500 mM de NaCl.

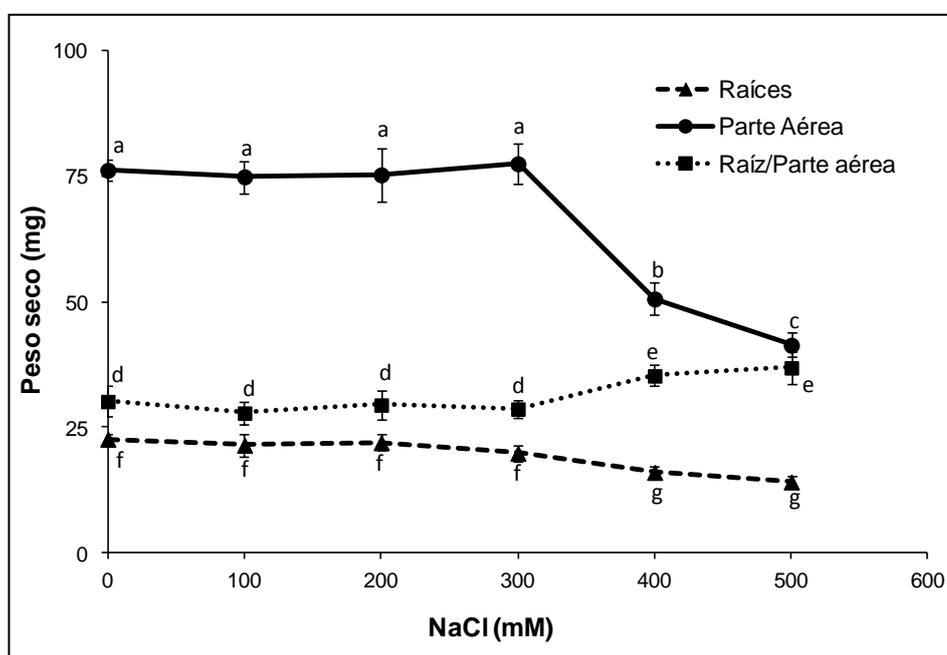


FIGURA 3.2. Peso seco de raíz, parte aérea y relación raíz/parte aérea en plántulas de *Prosopis alba* incubadas en soluciones de NaCl. Para cada variable, letras distintas indican diferencias significativas según el test de Tukey.

El potencial hídrico de las plántulas disminuyó gradualmente, a medida que se incrementó la concentración salina en la solución nutritiva, alcanzando valores de $-0,6$ MPa en el testigo y -3 MPa en las plantas crecidas en presencia de 500 mM de NaCl (Figura 3A). Una tendencia similar se observó en el potencial osmótico, con valores máximos de $-1,5$ MPa en el testigo, y $-3,9$ MPa en 500 mM de NaCl (Figura 3.3A). Como consecuencia de ello, las plántulas lograron mantener su turgencia celular, con valores de potencial de presión de $0,9$ MPa (Figura 3.3A).

La mantención de la turgencia celular, y los valores de CRA (Figura 3.3B), refuerzan la hipótesis de la presencia de un mecanismo de ajuste osmótico (AO), en algarrobo blanco, como respuesta al estrés salino.

Concordando con estos resultados, los valores de AO calculados a partir de la diferencia entre el potencial osmótico en turgencia máxima en el testigo y en los tratamientos salinos, se incrementó a medida que aumentó la concentración de NaCl (Figura 3.4). Se observaron valores elevados de AO, de 1,4 en el máximo nivel de salinidad.

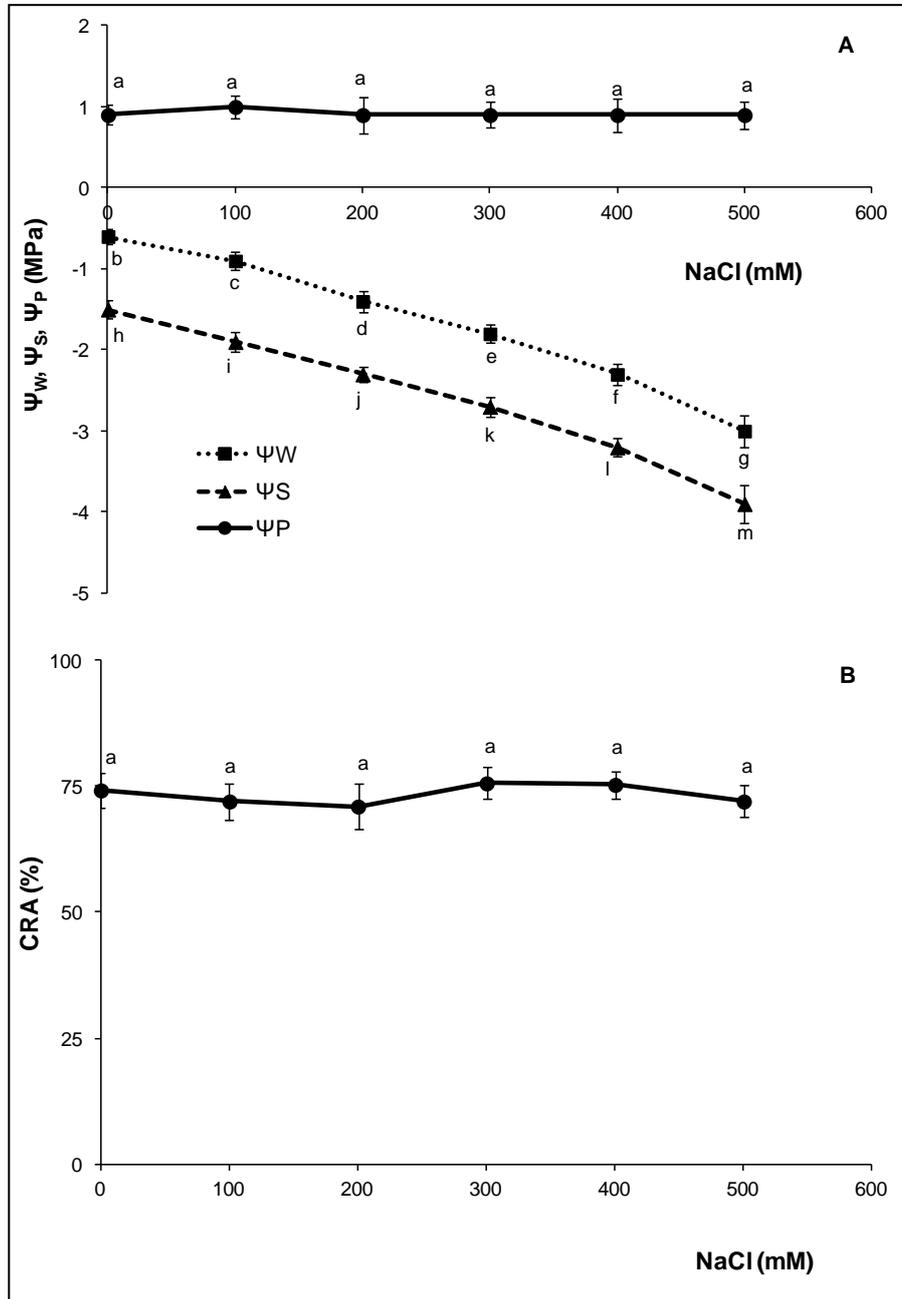


FIGURA 3.3. Potencial hídrico (Ψ_w), potencial osmótico (Ψ_s), potencial de presión (Ψ_p), y contenido relativo de agua (CRA) en plántulas de *Prosopis alba* incubadas en soluciones de NaCl. Para cada variable, letras distintas indican diferencias significativas según el test de Tukey.

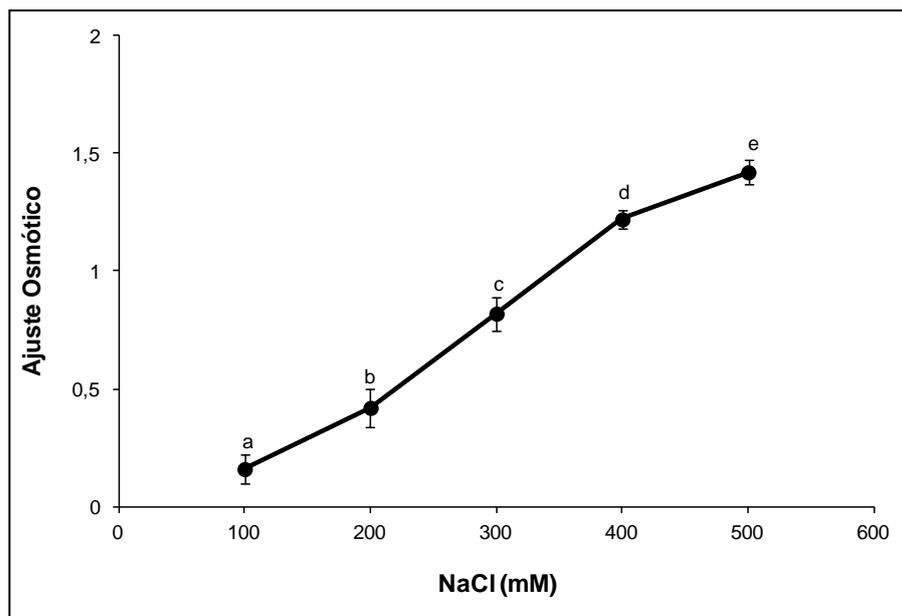


FIGURA 3.4. Ajuste osmótico en plántulas de *Prosopis alba* incubadas en soluciones de NaCl. Para cada variable, letras distintas indican diferencias significativas según el test de Tukey.

Una vez confirmada la hipótesis de trabajo, se cuantificaron las concentraciones de solutos inorgánicos y orgánicos, para determinar su contribución al ajuste osmótico (Figuras 3.5 y 3.6).

La concentración de iones, expresada en base al contenido de agua de los tejidos, fue afectada por el estrés salino. La concentración de Na^+ se incrementó de 9 mmol Kg^{-1} de agua en el testigo, a 36 mmol kg^{-1} de agua, en 500 mM de NaCl. Su respuesta, al igual que la GB, siguió una tendencia similar al AO (Figura 3.5 A).

Las hojas de *P. alba* presentaron elevadas concentraciones de K^+ ; estas no se modificaron en 100 mM de NaCl, y tuvieron disminuciones significativas en 200 y 300 mM de NaCl, permaneciendo luego constantes (Figura 3.5 B). Pese a ello, las concentraciones de este catión se mantuvieron elevadas en todos los tratamientos.

Si bien el estrés salino aumentó las concentraciones de Cl^- en hojas, este incremento fue de menor magnitud que el observado en Na^+ (Figura 3.5 C).

Las concentraciones foliares de prolina fueron bajas, y se mantuvieron constantes en todos los tratamientos (Figura 3.5 D).

Se observaron elevadas concentraciones de azúcares solubles, pero estas se mantuvieron constantes en los diferentes niveles de salinidad (Figura 3.5 E).

Las concentraciones de glicinabetaína (GB) se incrementaron como respuesta a la salinidad, en todos los tratamientos, siguiendo una tendencia similar al AO (Figura 3.5 F). En 100 mM de NaCl su concentración se duplicó con respecto al testigo, y en 500 mM de NaCl, alcanzó valores 10 veces superiores al testigo.

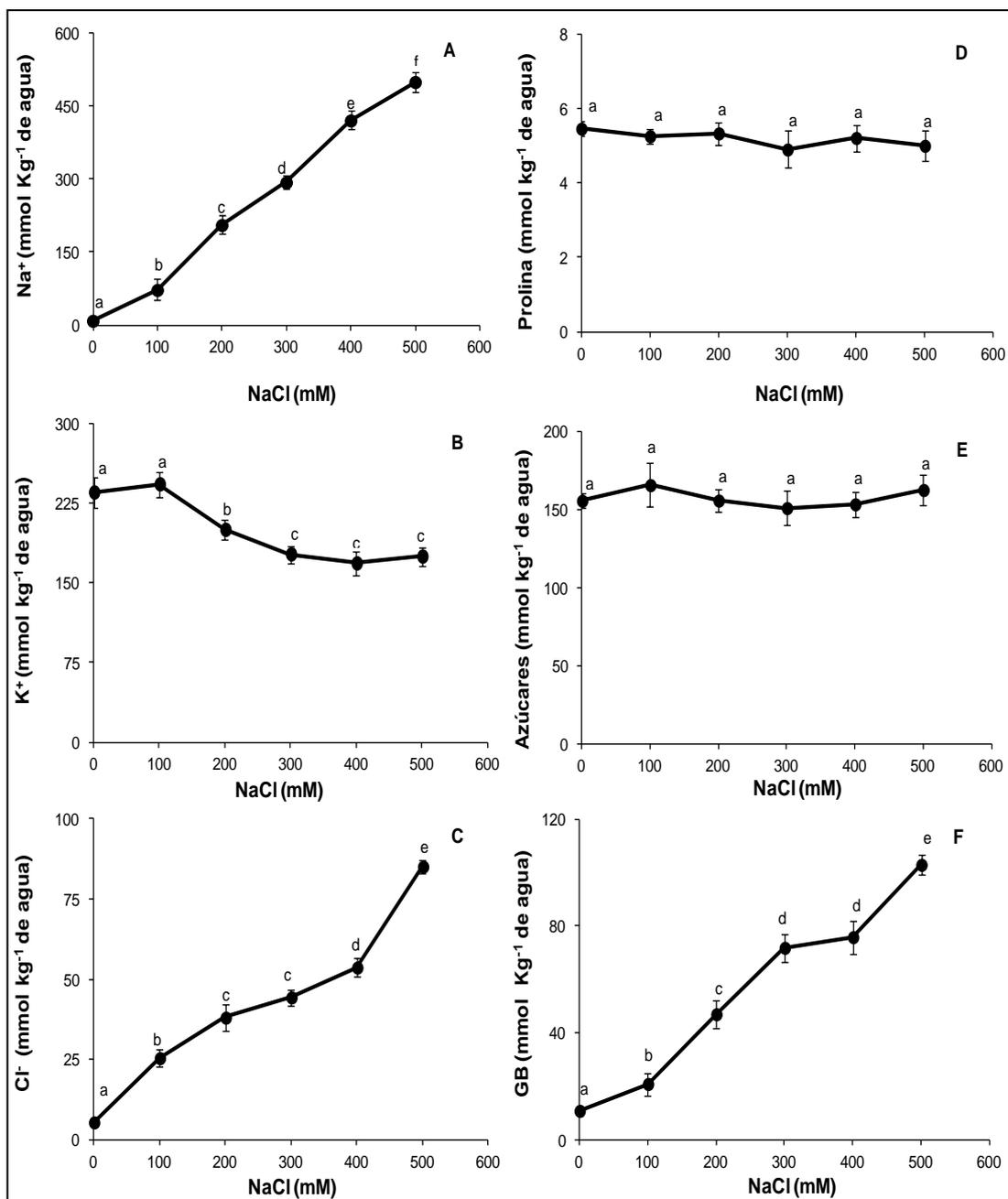


FIGURA 3.5. Concentraciones de sodio (A), potasio (B), cloruro (C), prolina (D), Azúcares solubles (E), Glicinabetaína (F), en plántulas de *Prosopis alba* incubadas en soluciones de NaCl. Para cada variable, letras distintas indican diferencias significativas según el test de Tukey.

La contribución del K⁺ al AO fue disminuyendo como consecuencia del estrés salino, pero siempre fue elevada, lo que muestra una importante selectividad de este catión, en relación al sodio (Figura 3.6 A).

A medida que disminuyó la contribución del K^+ , aumentó la del Na^+ , y la del Cl^- pero siempre fue mayor el aporte del catión, en relación al anión (Figura 3.6 A).

La contribución de la prolina a la osmolaridad fue muy baja, de 1% en el testigo, y 0,3% en el mayor nivel de salinidad (Figura 3.6 B).

Pese a las elevadas concentraciones de azúcares solubles (Figura 3.5 E), su contribución a la osmolaridad fue disminuyendo a medida que se incrementó la concentración de NaCl en el medio (Figura 3.6 B). En el testigo su contribución fue del 26%, y en 500 mM de NaCl, menos de la mitad.

Lo opuesto se observó con la GB, cuya contribución se triplicó en 500 mM de NaCl, con respecto al testigo (Figura 3.6 B).

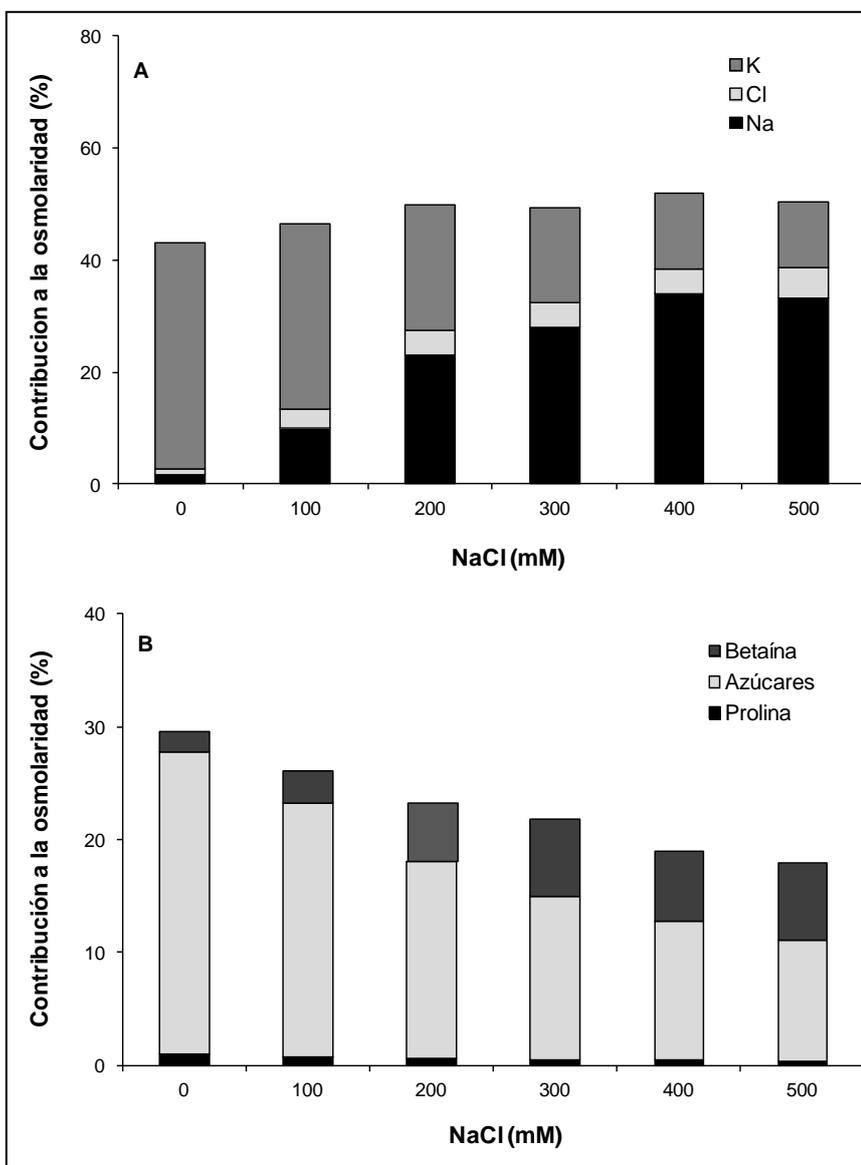


FIGURA 3.6. Contribución de solutos inorgánicos (A) y orgánicos (B) a la osmolaridad, en plántulas de *Prosopis alba* incubadas en soluciones de NaCl.

3.4 Discusión

P. alba fue más tolerante a la salinidad en la etapa de germinación, que en el crecimiento de plántulas (Figuras 3.1, 3.2).

El umbral para la germinación fue igual al reportado para *Prosopis ruscifolia*, una halófito pionera la región fitogeográfica del Chaco Occidental (GONZÁLEZ *et al.*, 2006) y superiores a los de *Schinopsis lorentzii*, una glicófito que forma parte de la comunidad climácica, junto con *P. alba*. En *S. lorentzii* el umbral fue de 300 mM, con un aumento en el TMG a partir de 100 mM de NaCl (MELONI *et al.*, 2008).

Concentraciones de 400 y 500 mM de NaCl no sólo inhibieron la producción de biomasa (Figura 3.2), sino que también incrementaron la relación raíz/parte aérea. Esta respuesta morfológica es considerada un indicador de tolerancia al los estreses hídrico y salino, ya que permite aumentar la superficie del suelo explorada por las raíces, y así incrementar la disponibilidad de agua (REGINATO *et al.*, 2012).

En el Chaco Occidental, las condiciones de semiaridez, con una elevada evapotranspiración, hacen que las sales se concentren en la superficie del suelo (MELONI *et al.*, 2008). Por tanto, el desarrollo de un gran sistema radical pivotante, le permite a las plántulas profundizar en el perfil, donde la concentración salina es menor.

El estrés salino puede alterar la fisiología de las plantas mediante un efecto osmótico, al disminuir el potencial hídrico de la solución del suelo, limitando así la absorción de agua por parte de las raíces, ó mediante un efecto tóxico específico de los iones (MUNNS y TESTER, 2008).

Mecanismos celulares adaptativos, tales como el AO, y la compartimentalización de iones tóxicos son vitales para la tolerancia de las plantas a la salinidad (YUE *et al.*, 2012).

Bajo condiciones de estrés salino severo, la especie fue capaz de disminuir su potencial osmótico, y así su potencial hídrico, manteniendo constante la turgencia (Figura 3.3). De esta manera el crecimiento no fue afectado como consecuencia de un déficit hídrico producido por el bajo potencial osmótico de la solución externa.

Los resultados de este trabajo demuestran que *P. alba*, tiene un eficiente mecanismo adaptativo, que le permite tolerar elevados niveles de salinidad a través de la mantención de un buen estado hídrico de sus hojas y un efectivo ajuste osmótico (Figuras 3.3, 3.4).

P. alba almacenó Na⁺ y Cl⁻ en las hojas, al aumentar la concentración salina en la solución nutritiva, y pese a que ese incremento fue acompañado por una disminución en la concentración de K⁺, los niveles de este nutriente esencial se mantuvieron elevados (Figura 3.5 A, B, C). Como se deduce de la Figura 3.6, la participación del K⁺ en la osmolaridad fue disminuyendo con el estrés salino, a medida que se incrementó la contribución del Na⁺, pero fue siempre superior a la del Cl⁻.

En especies que acumulan altas concentraciones de iones en las células, como *P. alba*, y las halófitas en general, las vacuolas desempeñan un rol central en el ajuste osmótico (WANG *et al.*, 2011), ya que permiten compartimentalizar iones tóxicos como el Na⁺ y el Cl⁻.

En el citoplasma, la salinidad puede inducir la acumulación de solutos orgánicos, compatibles con el metabolismo celular, que además de participar en el AO, actúan como protectores de macromoléculas (YUE, 2012). De este modo, la acumulación de iones en vacuola, y de moléculas orgánicas en el citoplasma permite mantener un equilibrio en el estado hídrico, dentro de la propia célula.

La concentración de prolina se mantuvo constante en las hojas, y su participación en el AO fue mínima (Figuras 3.3, 3.4). En contraste, pese a que la concentración de azúcares solubles también se mantuvo constante, en todos los tratamientos fue el soluto que más contribuyó al ajuste osmótico (Figuras 3.3, 3.4).

De los solutos orgánicos estudiados en este trabajo, la GB resultó el único que se incrementó como respuesta a la salinidad, aumentando su contribución en la osmolaridad (Figuras 3.5 y 3.6). Si se almacenó en el citoplasma, que normalmente ocupa el 10% del volumen celular, su concentración de 100 mmol kg^{-1} de agua, observada en la máxima concentración salina, se incrementaría 10 veces, alcanzando valores de 1000 mM.

En concordancia con estos resultados, SILVEIRA *et al.* (2009), estudiando las relaciones hídricas en la halófito *Atriplex nummularia*, demostraron la existencia de ajuste osmótico que alcanzó valores de 1,5, en concentraciones de 500 mM de NaCl. Ese AO fue generado principalmente por Na^+ y GB.

Se ha reportado que además de contribuir al AO, la GB puede estabilizar la estructura de las proteínas que conforman el fotosistema II, y prevenir daños en las membranas de plantas sometidas a estrés salino (HASSINE *et al.*, 2008). De este modo, la GB, no sólo contribuiría a mantener el estado hídrico de *P. alba* bajo estrés salino con NaCl, sino que también protegería los procesos metabólicos, entre ellos la fotosíntesis.

Estos resultados difieren de los observados en *Prosopis strombulifera* (LLANES *et al.*, 2013), que tolera hasta 700 mM de NaCl, y presentó un aumento significativo en las concentraciones foliares de prolina y azúcares solubles, mientras que la concentración de GB se mantuvo constante. Por otra parte, mientras que *P. alba* el Na^+ tuvo un rol fundamental en el AO, en comparación con el Cl^- , en *P. strombulifera*, se observó lo contrario (LLANES *et al.*, 2013).

Estos resultados sugieren que así como las especies del género *Prosopis* presentan diferentes niveles de tolerancia a la salinidad, también habrían desarrollado adaptaciones fisiológicas diferenciales durante el proceso de especiación.

En conclusión, *P. alba* tolera hasta 600 mM de NaCl durante la etapa de germinación, y 500 mM de NaCl, para el crecimiento de plántulas. Su elevada tolerancia al estrés salino está determinada por su capacidad de ajustarse osmóticamente, manteniendo la turgencia celular, mediante el almacenamiento de Na^+ y GB.

3.5 Bibliografía

BATES, L.S, WALDREN, R.P., y I.D. TEAR. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39:205-207.

BOUCHENAK, F., HENRI, P., BENREBIHA, F.Z., y REY, P. 2012. Differential responses to salinity of two *Atriplex halimus* populations in relation to organic solutes and antioxidant systems involving thiol reductases. *Journal of Plant Physiology*, 169:1445-1453.

CARILLO, P., ANNUNZIATA, M.G., y PONTECORVO, G. 2011. Salinity stress and salt tolerance. En: SHANKER, A Y VENKATESWARLU. *Abiotic stress in plants. Mechanisms and adaptations*, pp 21-38.

DÍAZ- LÓPEZ, L., GIMENO, V., LIDÓN, V., SIMÓN, I., y MARTÍNEZ, V. 2012. The tolerance of *Jatropha curcas* seedlings to NaCl: an ecophysiological analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 54:34-42.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., y SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.

FELKER, P., EWENS, M., VELARDE, M., y MEDINA, D. 2008 Initial Evaluation of *Prosopis alba* Griseb clones selected for growth at seawater salinities. *Arid Land Research and Management*, 22: 334-345.

FREITAS DE CAMPOS, M.K., CARVALHO, K., SOUZA, F.S., MARUR, C.J., PEREIRA, L.F.P., BESPALHOK FILHO, J.C., y VIEIRA, L.G.E. 2011. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic "Swingle" citrumelo plants over-accumulating proline. *Environmental and Experimental Botany*, 72:242-250.

GIMÉNEZ, A.M., y MOGLIA, J.G. 2003. Árboles del Chaco Argentino. Guía para el reconocimiento dendrológico. Editorial El Liberal.

GIMENO, V., SYVERTSEN, J.P., SIMÓN, I., NIEVES, M., DÍAZ-LÓPEZ, L., MARTÍNEZ, V., y GARCÍA-SÁNCHEZ, F. 2012. Physiological and morphological responses to flooding with fresh and saline water in *Jatropha curcas*. *Environmental and Experimental Botany*, 78:47-55.

GONZÁLEZ, D., PECE, M., ACOSTA, M., ABDALA, M., y MELONI, D. 2006. Germinación de vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) en soluciones isoosmóticas de NaCl Y Na₂SO₄. III Congreso Iberoamericano de Ambiente y Calidad de Vida. Catamarca, Argentina, 27 al 29 de septiembre de 2006.

GRIEVE, C.M., y GRATTAN, S.R. 1983. Rapid assay for determination of water-soluble quaternary ammonium-compounds. *Plant Soil*, 70:303-307.

GUO, R., ZHOU, J., REN, G., y HAN, W. 2013. Physiological responses of linseed seedlings to iso osmotic polyethylene glycol, salt, and alkali stresses *Agronomy Journal*, 105: 764–772.

GUMA, I.R., PADRÓN-MEDEROS, M.A., SANTOS-GUERRA, A., y REYES-BETANCORT, J.A. 2010. Effect of temperature and salinity on germination of *Salsola vermiculata* L. (Chenopodiaceae) from Canary Islands. *Journal of Arid Environments*, 74:708-711.

HASSINE, A.B., GHANEM, M.E., BOUZID, S., y LUTTS, S. 2008. An inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycinebetaine in response to salinity and water stress. *Journal of Experimental Botany*, 59:1315-1326.

JAMEEL AL-KAHAYRI, M. 2002. Growth, proline accumulation, and ion content in sodium chloride-stressed callus of date palm. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 38: 79-82.

LUNA, V.M., LLANES, A.S., SOSA, L.R., y REGINATO, M.A. 2008. Differential effects of sodium salts on germination of a native halophytic species from South America: *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth. En: ABDELLY, C., ÖZTÜRK, M., ASRAF, M., y GRIGNOM, C. (eds). 2008. Biosaline agriculture and high salinity tolerance. Springer Verlag. Berlin Heidelberg, pp. 81-90.

LLANES, A., BERTAZZA, G., PALACIO, G., y LUNA, V. 2013. Different sodium salts cause different solute accumulation in the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Plant Biology*, 15:118-125.

MALAVOLTA, E., VITTI, G.C., y OLIVEIRA, S.A. 1989. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba, Brasil.

MELONI, D.A., GULOTTA, M.R., y MARTÍNEZ, C.A. 2008. Salinity tolerance in *Schinopsis quebracho colorado*: seed germination, growth and metabolic responses. *Journal of Arid Environments*, 72: 1785-1792.

MUNNS, R., y TESTER, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59:651-681.

NICHOLS M.A., y HEIDECKER W. 1996. Two approaches to the study of germination data. *Proceeding of International Seed Testing Association*, 33:351-340.

REGINATO, M., SGROY, M., LLANES, A., CASSÁN, F., y LUNA, V. 2012. The american halophyte *Prosopis strombulifera*, a new potential tool to confer salt tolerance to crops. En: ÖZTÜRK, M., AHMAD, M.S.A., y AKSOY, A. (Eds.). *Crop production for agricultural improvement*. Springer, Berlin, pp. 136-167.

SCHÖLANDER, P.F., HAMMEL, H.T., BRADSTREET, E.D., y HEMMINBSEN, E.A. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science*, 148:339-346.

SILVA, E.N., SILVA, S.L., y VIÉGAS, R.A. 2010. The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. *Environmental and Experimental Botany*, 69:279-295.

SILVEIRA, J.A.G., ARAÚJO, S.A.M., LIMA, J.P.M., y VIÉGAS, R.A. 2009. Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in responses to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. *Environmental and Experimental Botany*, 66:1-8.

SOSA, L., LLANES, A., REINOSO, H., REGINATO, M., y LUNA, V. 2005. Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera*. *Annals of Botany*, 96:261-267.

VILLAGRA, P. 2009. Germination of *Prosopis argentina* and *P. alpataco* seeds under saline conditions. *Journal of Arid Environments*, 37:261-267.

VILLAGRA, P., VILELA, A., GIRODANO, C., y ÁLVAREZ, J. 2010. Ecophysiology of *Prosopis* species from de arids lands of Argentina: what do we know about adaptations to stressful environments?. En: Ramawat, K.G. (ed). *Desert plants*. Springer Verlag. Berlin Heidelberg, pp. 321-340.

VILLAGRA, P.E., y CAVAGNARO, J.B. 2005. Effects of salinity on the establishment and early growth of *Prosopis argentina* and *Prosopis alpataco* seedlings in two contrasting soils: implications for their ecological success. *Austral Ecology*, 30:325-335.

WANG, H., WU, Z., CHEN, Y., YANG, C., y SHI, D. 2011. Effects of salt and alkali stresses on growth and ion balance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil Environment*, 57:286-294.

YUE, L.J. 2012. Harnsessing salt woody biomass production. *Tree Physiology*, 32:1-3.

YUE, L.J., LI, S.X., MA, Q., ZHOU, X.R., WU, G.Q., BAO, A.K., ZHANG, J.L., y WANG, S.M. 2012. NaCl stimulates growth and alleviates water stress in xerophytes *Zygophyllum xanthoxylum*. *Journal of Arid Environments*, 87:153-160

CAPÍTULO 4. COMPOSICIÓN MINERAL Y ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA

4.1 Introducción

La disponibilidad de minerales es alterada en suelos salinos sódicos, ya que el Na^+ y el Cl^- compiten con la absorción de algunos nutrientes esenciales (CARILLO *et al.*, 2011).

En muchas especies, la salinidad causa una disminución en la absorción de K^+ , Ca^{+2} , NO_3^- , y P_i , aumentando las relaciones $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, Na^+/K^+ , $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ y $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ (ZANG *et al.*, 2011). Las alteraciones en las concentraciones y relaciones de iones, puede afectar procesos metabólicos, como la fotosíntesis, síntesis de ácidos nucleicos, balance hormonal, actividad de enzimas, respiración, absorción de iones, e incluso la actividad microbiana en las raíces (SIDDIQUI *et al.*, 2012; CARILLO *et al.*, 2011).

Los vegetales han desarrollado complejos mecanismos para mantener la homeostasis de los iones, entre los que se destacan la disminución de la traslocación de los iones tóxicos a la parte aérea, su compartimentalización en vacuolas, o la exclusión del Na^+ , mediante su exportación a través de la membrana plasmática (DIÁZ LÓPEZ *et al.*; 2012).

Generalmente el nitrógeno es el nutriente que más limita el crecimiento de las plantas en la mayoría de los suelos, y tanto su absorción como su metabolismo pueden ser afectados por el estrés salino (MIURA, 2013).

La nitrato reductasa (NR- EC 1.6.6.1.) es la primera enzima de la ruta de asimilación del nitrógeno en plantas superiores. Su actividad catalítica está sujeta a una compleja regulación, en respuesta a diferentes estímulos ambientales. Su modulación es muy rápida, e implica modificaciones en la proteína, mediante fosforilación ó desfosforilación (REDA y KLOBUS, 2006). La inactivación se produce mediante fosforilación, catalizada por una quinasa proteica específica, seguida por la asociación con una proteína 14-3-3, en la presencia de Mg^{+2} (REDA *et al.*, 2011). La activación tiene lugar luego de la desfosforilación de la proteína, mediada por fosfatasas, y la disociación de la proteína inhibidora (REDA y KLOBUS, 2008). También está regulada a nivel de transcripción y traducción en respuesta a cambios en los niveles de nitrato, azúcares y aminoácidos (CARILLO *et al.*, 2008).

El efecto de la salinidad sobre la actividad nitrato reductasa depende de muchos factores, tales como la especie, fuente de nitrógeno, edad de la planta, concentración salina, y tiempo de exposición al estrés. Se ha reportado una disminución significativa en la actividad NR en hojas de *Brassica juncea* (SIDDIQUI *et al.*, 2012), genotipos sensibles de trigo (Carilo *et al.*, 2008; Yousfi *et al.*, 2012), tomate (GONG *et al.*, 2013), algodón (KAWAKAMI *et al.*, 2013), girasol (EBRAHIMIAN y BYBORDI, 2011), *Vigna unguiculata* (MAGALÃES DE ARAGÃO, *et al.*, 2011) y hojas y raíces de álamo (EHLTING *et al.*, 2007) sometidas a estrés

con NaCl. Por el contrario, el estrés salino incrementó la actividad nitrato reductasa en raíces de pepino (REDA *et al.*, 2011) y tomate (DEBOUBA *et al.*, 2007).

La mayoría de los trabajos que abordan el impacto de la salinidad sobre el metabolismo del nitrógeno, describen los cambios en la actividad NR luego de someter las plantas a condiciones de estrés durante períodos superiores a 24 horas. En esos casos, la inhibición en la actividad NR ha sido atribuida a una disminución en la absorción de nitrato, la concentración de nitrato en los tejidos, y la expresión de los genes *Nia* bajo estrés salino (DEBOUBA *et al.*, 2007).

Son muy escasas las referencias bibliográficas sobre la dinámica de nutrientes en leguminosas leñosas bajo estrés salino, y su impacto sobre el metabolismo del nitrógeno.

Este trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la respuesta de la composición mineral y la asimilación del nitrógeno, en plántulas de *Prosopis alba* sometidas a estrés salino con NaCl.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Material Vegetal

Los frutos se cosecharon al azar dentro de un bosque *P. alba* desarrollado al margen de lagunas temporales, en la localidad de Maco (27°51'20" S; 64°13'27"W), Provincia de Santiago del Estero, Argentina. Las semillas se extrajeron manualmente realizándose una incisión con ayuda de una pinza, para facilitar su imbibición durante la germinación. La siembra se realizó empleando toallas de papel humedecidas con agua destilada, que se incubaron en cámara de crecimiento por un lapso de 15 días a 25° C y bajo un fotoperíodo de 12 horas.

Las plántulas así obtenidas, se cultivaron hidropónicamente en cámara de crecimiento, en recipientes de 5 litros conteniendo solución nutritiva de Hoagland al 25% con ó sin la suplementación de 500 mM de NaCl (20 plántulas por recipiente).

Las pérdidas por transpiración se compensaron mediante el agregado de agua destilada, manteniendo constante el nivel de solución en los recipientes. El pH se ajustó a 6,5 mediante la adición de KOH ó H₂SO₄ 0,1 N.

Diariamente se tomaron muestras de raíces y hojas, para determinar la actividad NR *in vivo*, y su composición mineral.

Para verificar si la respuesta inicial de la NR al estrés salino se debió a un efecto osmótico ó específico de los iones, se cortaron raíces, e incubaron en vasos de precipitado conteniendo solución nutritiva de Hoagland al 25%, con ó sin la suplementación de soluciones isosmóticas de NaCl 500 mM, ó polietilenglicol 6000 (PEG (500 mM NaCl = 31% p/v PEG, que corresponden a un potencial osmótico de - 1,9 MPa, medido con microosmómetro). Cada 15 minutos, durante un período de 1 hora, se tomaron muestras de raíces en las que se determinó la actividad NR *in vivo*.

Para dilucidar el mecanismo de control de la actividad NR, las raíces se incubaron durante 1 hora en vasos de precipitado conteniendo solución nutritiva de Hoagland al 25 %, con ó sin a la adición de 500 mM de NaCl. Cada tratamiento se

dividió en dos grupos, a uno de ellos se le adicionó cantaridina 50 μM , y a otro su solvente (dimetilsulfóxido, DMSO), conforme a Reda *et al.* (2011). Luego de transcurridos 60 minutos se determinó la actividad NR *in vivo*.

4.2.2 Composición mineral

Las concentraciones de Na^+ , K^+ se cuantificaron mediante espectrofotometría de llama (JAMEEL AL-KAHAYRI, 2002), Ca^{+2} y Mg^{+2} se a través de espectrofotometría de absorción atómica (WANG *et al.*, 2007). La concentración del ión Cl^- se determinó a través titulación con AgNO_3 (MALAVOLTA *et al.*, 1989). La concentración de NO_3^- se cuantificó mediante el método espectrofotométrico de CATALDO *et al.* (1975).

4.2.3 Actividad nitrato reductasa (NR) *in vivo*

La actividad nitrato reductasa se cuantificó según el método de KLEPPER *et al.* (1971), con algunas modificaciones. Aproximadamente 100 mg de material vegetal se infiltraron con bomba de vacío, en 2 mL de solución de incubación conteniendo: buffer fosfato 0,1 M pH 7,5 KNO_3 0,05 M y 1% v/v isopropanol. La incubación se realizó durante 1 hora, a 30°C en oscuridad. Para estimar la cantidad de nitrito formado, se adicionó 1 mL de sulfanilamide 1% en HCl 1N, y dicloruro de N (1-naftil) etilendiamina 0,02%; agitando los tubos de ensayo en vortex durante 1 minuto. Se leyó la absorbancia de la solución resultante, a 540 nm mediante el uso de un espectrofotómetro. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de BRADFORD (1976) utilizando albúmina sérica bovina como estándar, y la actividad NR se expresó como $\mu\text{mol NO}_2^- \text{mg}^{-1} \text{proteína h}^{-1}$.

4.2.4 Diseño experimental y análisis estadístico.

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, con 5 repeticiones. Los datos se analizaron con ANOVA y Test de Tukey.

4.3 Resultados

En las raíces, la concentración de Na^+ se incrementó significativamente con respecto al control, luego de 24 hs de incubación en solución salina, alcanzando un valor máximo de 3,6 $\text{mol Na}^+ \text{kg}^{-1} \text{PS}$, al cabo de 6 días (Figura 4.1 A). Pese a ello, el marcado incremento en la concentración de Na^+ , no inhibió la absorción de K^+ durante las primeras 72 hs, lo que demuestra que la especie posee una gran selectividad del K^+ en relación al Na^+ . A partir del cuarto día, la concentración de K^+ disminuyó lentamente, hasta alcanzar valores cercanos al 33% del testigo (Figura 4.1 B). Un comportamiento similar se observó con el Ca^{+2} (Figura 4.1 C), mientras que el Mg^{+2} fue más sensible, registrándose una disminución significativa, a partir del tercer día de incubación (Figura 4.1 D).

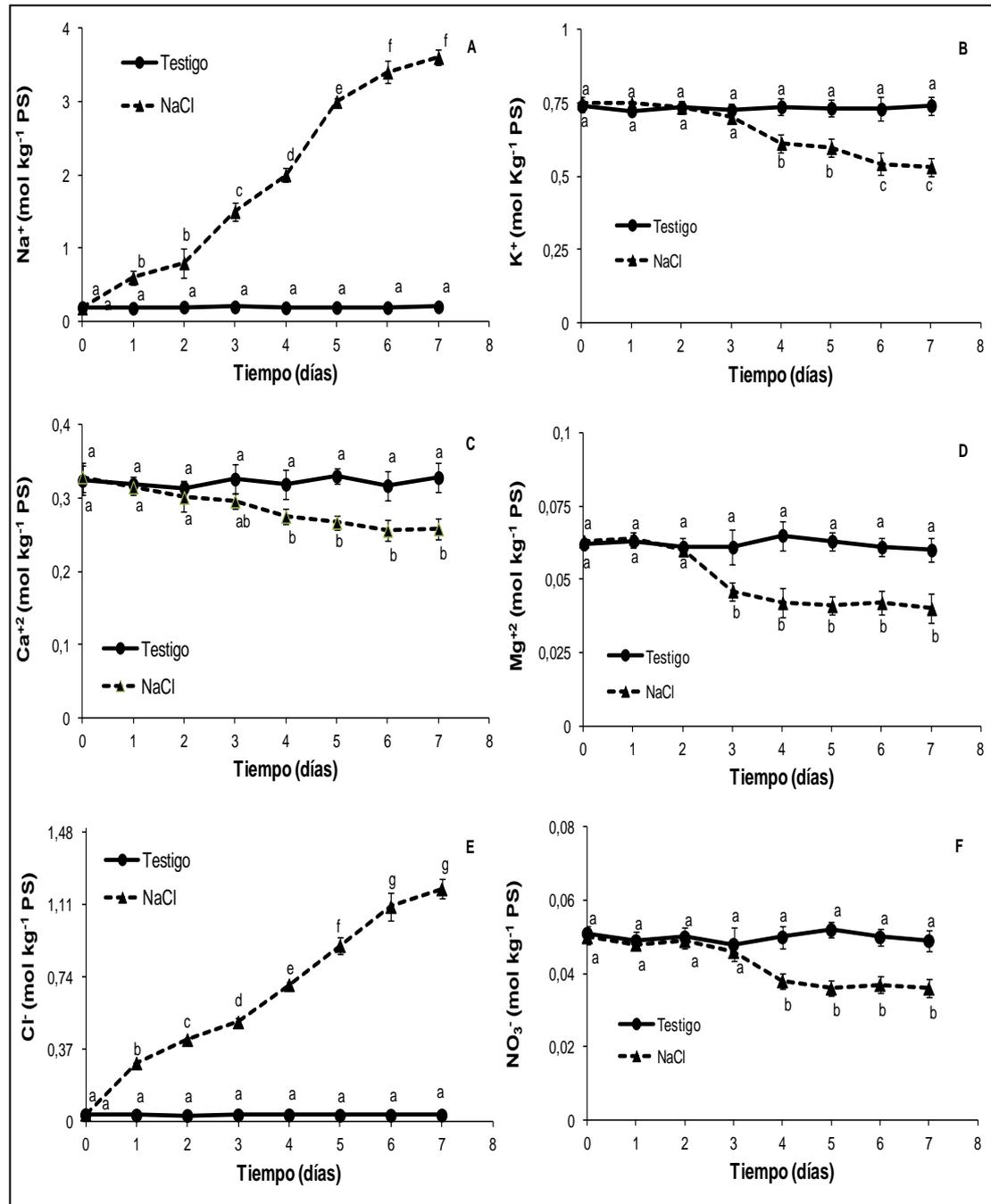


FIGURA 4.1. Concentraciones de Na^+ (A), K^+ (B), Ca^{+2} (C), Mg^{+2} (D), Cl^- (E), y NO_3^- (F), en raíces de *Prosopis alba* cultivadas durante 7 días en solución nutritiva de Hoagland al 25%, ó solución nutritiva de Hoagland al 25% suplementada con 500 mM NaCl. Los resultados son medias de 5 repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey al 5%.

La concentración Cl^- se incrementó significativamente 24 hs después de haber iniciado el tratamiento salino, alcanzando valores cercanos $1,2 \text{ mol Cl}^- \text{ kg}^{-1} \text{ PS}$, a partir del sexto día (Figura 4.1 E). No obstante, la concentración de NO_3^- en raíces no fue afectada por la salinidad durante los primeros tres días de tratamiento con NaCl. A partir del cuarto día su concentración disminuyó un 27% con respecto al testigo, y luego permaneció constante (Figura 4.1 F).

En todos los casos la concentración de Na^+ en las hojas fue menor que en las raíces, por lo que se deduce que fue excluido de la parte aérea. Al cabo de 7 días de tratamiento salino, su concentración pasó de $0,03$ a $1,7 \text{ mol Na}^+ \text{ kg}^{-1} \text{ PS}$ (Figura 4.2 A). Su acumulación en las hojas no inhibió la traslocación de K^+ hacia la parte aérea, que se mantuvo constante, e igual al testigo, hasta el tercer día de aplicado el estrés salino (Figura 4.2 B). A partir del cuarto día, se apreció una lenta disminución en la concentración foliar de K^+ , que al finalizar el ensayo fue 23% menor que el testigo.

P. alba mantuvo una intensa traslocación de Ca^{+2} desde las raíces hacia la parte aérea, ya que mientras que en órganos subterráneos se apreció una disminución en su concentración a partir del cuarto día de tratamiento salino, en las hojas esta disminución sólo se observó a partir del quinto día (Figura 4.2 C).

El transporte de Mg^{+2} fue más sensible que el de Ca^{+2} , registrándose una disminución significativa a partir del tercer día de tratamiento salino, permaneciendo posteriormente constante (Figura 4.2 D).

El Cl^- fue excluido también de las hojas, manteniendo siempre concentraciones menores que en las raíces (Figura 4.2 E). Así, mientras que las raíces acusaron un aumento importante en la concentración de este anión luego de 24 horas de incubación con NaCl, en la parte aérea su acumulación se observó recién a partir del tercer día.

Estos resultados demuestran que *P. alba* posee un eficiente mecanismo de exclusión de iones tóxicos en los órganos donde se produce la fotosíntesis, almacenándolos principalmente en las raíces.

La concentración foliar de NO_3^- disminuyó al cabo de 4 días de tratamiento, con una abrupta disminución del 50% con respecto al testigo (Figura 4.4 F).

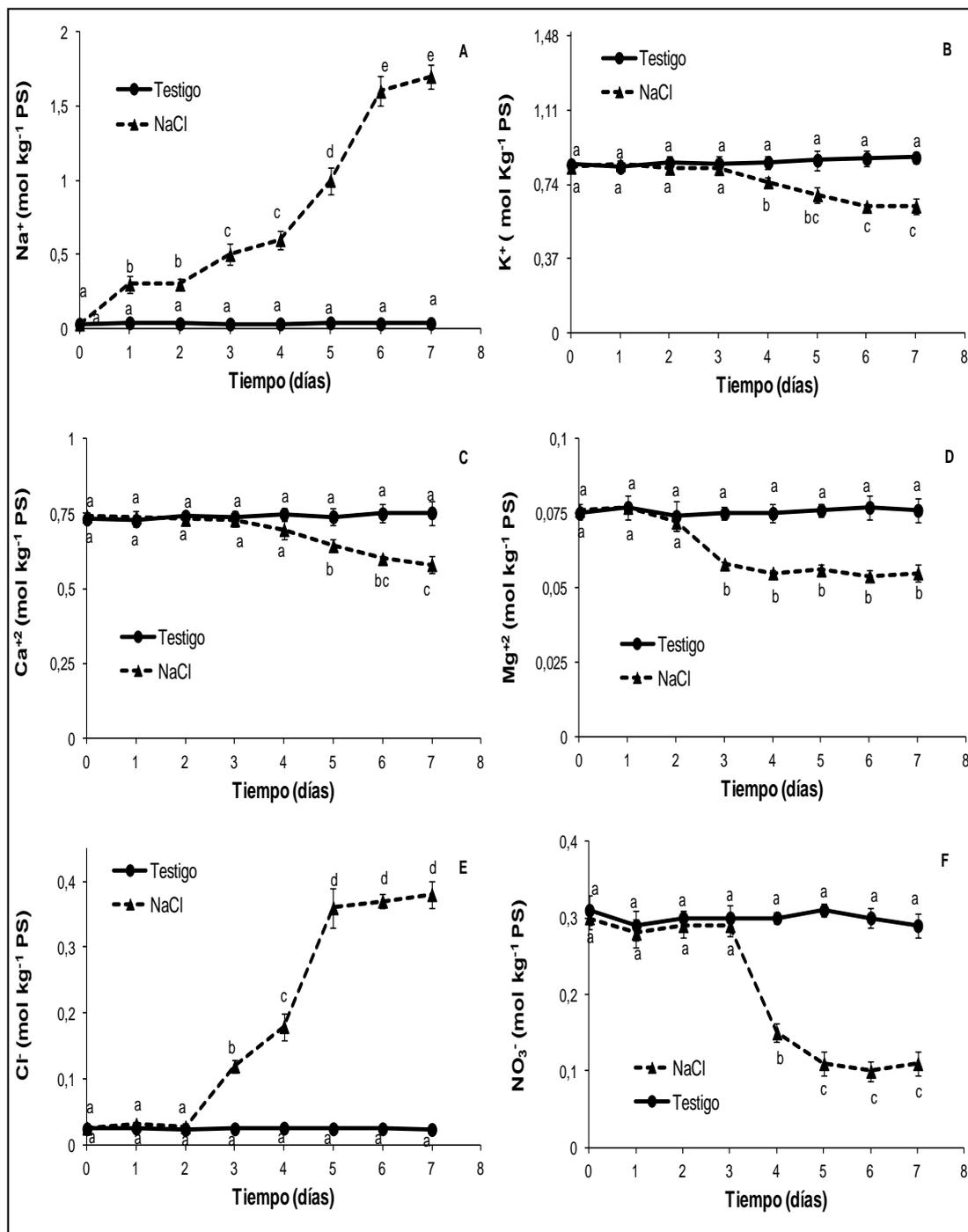


FIGURA 4.2. Concentraciones de Na⁺ (A), K⁺ (B), Ca⁺² (C), Mg⁺² (D), Cl⁻ (E), y NO₃⁻ (F), en hojas de *Prosopis alba* cultivadas durante 7 días en solución nutritiva de Hoagland al 25%, ó solución nutritiva de Hoagland al 25% suplementada con 500 mM NaCl. Los resultados son medias de 5 repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey al 5%.

La reducción del NO₃⁻ se realizó preferentemente en las hojas (Figura 4.3 A, B), donde las concentraciones de este ión también fueron superiores.

En ambos órganos, la actividad NR registró un importante incremento como respuesta al estrés salino, que se mantuvo hasta el tercer y segundo día de iniciado el ensayo, en raíces y hojas, respectivamente, registrándose luego una brusca disminución. Pese a que en las hojas la disminución se produjo antes que en las raíces, su concentración fue igual al testigo durante el tercer día de ensayo.

La disminución en la actividad NR, coincidió con una reducción en los niveles de su sustrato (Figuras 4.1 F y 4.2 F).

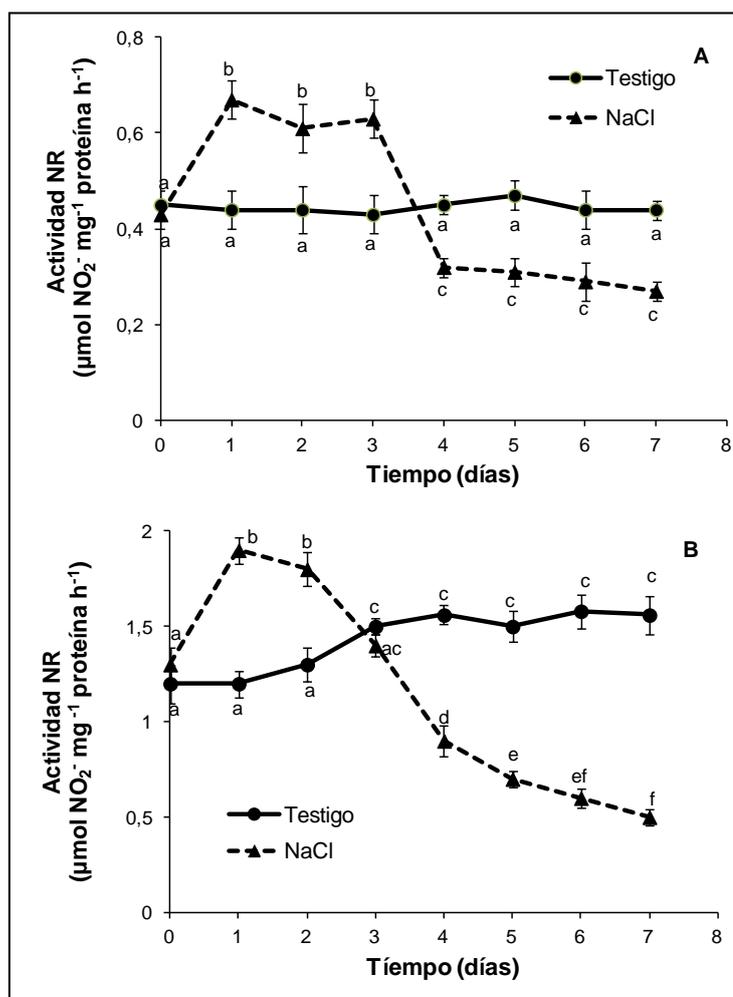


FIGURA 4.3. Actividad nitrato reductasa (NR), en raíces (A), y hojas (B) de plántulas de *Prosopis alba* cultivadas durante 7 días en solución nutritiva de Hoagland al 25%, ó solución nutritiva de Hoagland al 25% suplementada con 500 mM NaCl. Los resultados son medias de 5 repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey al 5%.

Para determinar si el incremento inicial en la actividad NR fue el consecuencia del efecto osmótico producido por altas concentraciones salinas, ó específico de los

iones tóxicos, se diseñó un experimento en el que se incubaron raíces en solución nutritiva de Hoagland al 25%, con o sin la suplementación NaCl 500 mM ó polietilenglicol 6000 (PEG) con el mismo potencial osmótico.

Mientras que la actividad NR permaneció constante en raíces incubadas en la solución nutritiva de Hoagland al 25%, y en PEG (Figura 4.4), en el tratamiento con NaCl se incrementó significativamente, a partir de los 15 minutos.

Estos resultados demuestran que el incremento en la actividad NR fue producido específicamente por la componente iónica del estrés, y no por el bajo potencial osmótico de la solución.

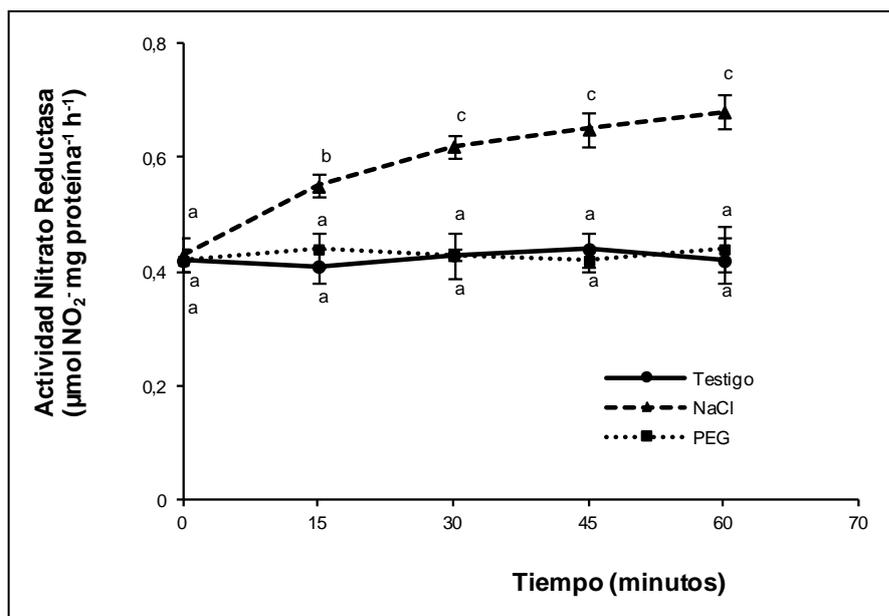


FIGURA 4.4. Actividad nitrato reductasa (NR), en raíces de *Prosopis alba* incubadas durante periodos de hasta 60 minutos en solución nutritiva de Hoagland al 25% (Testigo), solución nutritiva de Hoagland al 25% suplementada con 500 mM NaCl (NaCl), ó con polietilenglicol 600 isosmóticas con el tratamiento salino (PEG). Los resultados son medias de 5 repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey al 5%.

Ya que la respuesta de la actividad NR frente al estrés salino fue muy rápida (15 minutos), podría ser atribuida a una regulación postraducciona de la proteína, mediante desfosforilación. Para probar esta hipótesis las raíces se trataron con cantaridina 50 μM, un poderoso inhibidor de las fosfatasa proteicas, ó su solvente (dimetilsulfóxido, DMSO).

La cantaridina no afectó la actividad NR en el testigo (Figura 4.5), pero evitó el incremento observado en las raíces bajo estrés salino. Este resultado demuestra que el incremento inicial en la actividad NR, en plántulas crecidas en presencia de NaCl fue el resultado de la activación de la enzima mediante desfosforilación.

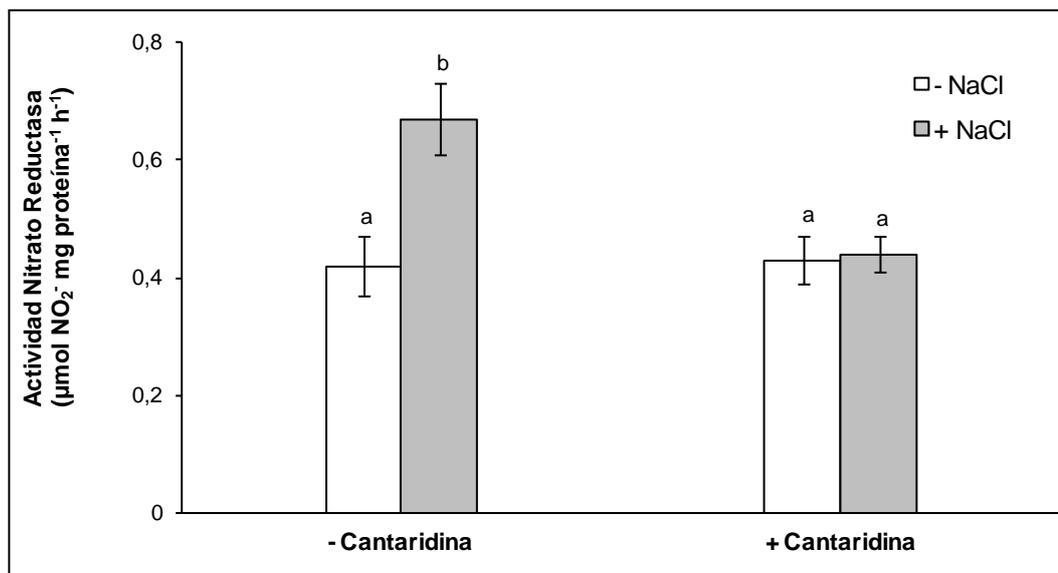


FIGURA 4.5. Actividad nitrato reductasa (NR), en raíces de *Prosopis alba* incubadas durante 60 minutos en solución nutritiva de Hoagland al 25% (-NaCl), ó solución nutritiva de Hoagland al 25% suplementada con 500 mM NaCl (+ NaCl), con ó sin la suplementación de cantaridina 50 µM. Los resultados son medias de 5 repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey al 5%.

4.4 Discusión

P. alba limitó la acumulación de Na⁺ en la parte aérea, almacenándolo principalmente en las raíces, que a lo largo de los 7 días de duración del ensayo presentaron concentraciones de Na⁺ muy superiores a las hojas (Figuras 4.1 A, 4.2 A).

La exclusión de iones tóxicos de la parte aérea ha sido considerada como un mecanismo de tolerancia al estrés salino (MUNNS y TESTER, 2008), y puede justificar el desarrollo de esta especie en suelos salinos sódicos. Un comportamiento similar ha sido reportado en *Prosopis ruscifolia*; una especie pionera en la sucesión vegetal del Chaco Occidental, capaz de tolerar concentraciones de NaCl equivalentes al agua de mar (MELONI y MARTÍNEZ, 2008).

Dentro del mismo género, REGINATO *et al.* (2012) calificaron a *P. strombulifera*, como una especie halófila que excluye al Na⁺ del aparte aérea, y asociaron ese comportamiento, con una precoz suberificación y lignificación de la endodermis.

La exclusión del Na⁺ de las hojas también puede lograrse mediante su secuestro en las vacuolas de la raíz, limitando su traslocación a la parte aérea, ó recuperándolo del xilema de la raíz, antes de alcanzar el tallo, a través de transportadores de alta afinidad por el K⁺ (HKT) (MUNNS y TESTER, 2008). Recientemente MUNNS *et al.* (2012) demostraron que en trigo, el gen TmHKT1; 5-A ubicado en el locus Nax2, codifica para un transportador con alta selectividad para el Na⁺, localizado en la membrana plasmática de las células de la raíz

circundantes a los vasos del xilema. Esa ubicación le permitiría retirar el Na^+ de los vasos del xilema y reducir su transporte hacia las hojas. Los ensayos a campo comprobaron que la presencia de ese gen disminuyó la concentración de Na^+ en las hojas e incrementó en 25% la producción de granos.

Pese a que el NaCl disminuyó las concentraciones de K^+ en raíces y hojas a partir del cuarto día de tratamiento (Figuras 4.1 B y 4.2 B), éstas se mantuvieron elevadas a cabo de los 7 días de ensayo. El K^+ juega un rol crucial en la activación de más de 50 enzimas, en el que no puede ser sustituido por el Na^+ (CHEN *et al.*, 2005). La manutención de la homeostasis Na^+/K^+ es crucial en la tolerancia al estrés salino y ha sido sugerida como un importante criterio de selección para la tolerancia a la salinidad (SIDDIQUI y MOHAMMAD, 2012; SIDDIQUI *et al.*, 2009).

El Na^+ puede disminuir la absorción de K^+ , e incrementar su salida; KOPITKE (2012) ha sugerido que la salida de K^+ es causada por el desplazamiento del Ca^{+2} de la membrana plasmática, y que la suplementación con Ca^{+2} disminuye la toxicidad de Na^+ , reduciendo la salida de K^+ . Los resultados obtenidos apoyan dicha hipótesis, ya que las concentraciones de K^+ y Ca^{+2} han seguido la misma tendencia durante el experimento, tanto en raíces como en hojas (Figuras 4.1 B, C; 4.2 B,C).

El calcio además tiene un rol protector sobre las membranas, y un papel fundamental en la regulación del metabolismo. Puede activar quinasas proteicas, que regulan la apertura y cierre de acuoporinas, o directamente mediante la activación de quinasas proteicas (NEDJIMI y DAOUD, 2009).

MELONI (2012) demostró que la acumulación de Na^+ en hojas y raíces de plántulas de *Prosopis ruscifolia* crecidas en presencia de 400 mM de NaCl puede revertirse mediante la suplementación de 5 mmol l^{-1} de CaSO_4 , permitiendo un incremento en las concentraciones de K^+ y en la biomasa.

De este modo, la manutención de altas concentraciones de K^+ en *P. alba* también corresponde a un mecanismo de tolerancia a la salinidad, y está asociada a homeostasis del Ca^{+2} en sus tejidos. Ésta podría ser una estrategia común en especies del género *Prosopis* en la región fitogeográfica del Chaco Occidental.

La exclusión del Cl^- fue más notoria en las hojas que en las raíces (Figuras 4.2 E, 4.1 E), alcanzando concentraciones menores que las de Na^+ (Figuras 4.1 A, 4.2 A). Pese a ello, existen discrepancias sobre la mayor toxicidad del Na^+ ó del Cl^- . Por ejemplo en trigo la variabilidad genética en la tolerancia a la salinidad correlaciona con la acumulación de Na^+ en las hojas, pero no con la concentración de Cl^- , mientras que lo opuesto ocurre en citrus (MUNNS y TESTER, 2008).

Si bien tanto en raíces como en hojas la concentración de NO_3^- se mantuvo constante hasta el tercer día de estrés salino, al cabo de 7 días de tratamiento su disminución fue mucho más acentuada en la parte aérea (Figuras 4.1 F y 4.2 F). CARILLO *et al.* (2005) obtuvieron resultados similares en plántulas de trigo bajo condiciones de estrés salino, sugiriendo que el Cl^- inhibe el ingreso del NO_3^- al xilema de la raíz. Alternativamente, el Cl^- y el NO_3^- podrían competir a nivel de plasmalema o tonoplasto en las células de la hoja.

Una vez que el nitrato es absorbido debe ser reducido, antes de ser asimilado. Este paso clave en la asimilación del nitrógeno, es catalizado por la NR, produciendo nitrito, que posteriormente es reducido a amonio (YOUSFI *et al.*, 2012). La respuesta de la actividad NR en raíces y hojas de plántulas crecidas en

presencia de NaCl, se caracterizó por un rápido incremento inicial, seguido por una importante inhibición a partir del cuarto día de tratamiento (Figura 4.3).

El estrés salino puede afectar la actividad NR a nivel transcripcional o postranscripcional (PLAZA *et al.*, 2009).

La estimulación inicial de la actividad NR en raíces de *P. alba* se debió al efecto específico de la componente iónica del NaCl, y no al efecto osmótico (Figura 4.4). En concordancia, Flores *et al.* (2000), estudiando la respuesta de la actividad NR *in vivo* en plántulas de tomate, incubadas en soluciones isosmóticas de PEG y diferentes sales, concluyeron que la misma no fue afectada por el estrés hídrico generado por el PEG. Sin embargo estos autores reportaron una inhibición en la actividad NR en los tratamientos salinos, que atribuyeron a un efecto específico de la componente iónica.

El mecanismo que permitió *P. alba* incrementar la actividad NR al comenzar el tratamiento salino, sería postraduccional, ya que se inició tan sólo luego de 15 minutos de incubación en NaCl (Figura 4.4), y estaría asociado a la actividad de fosfatasas, ya que la suplementación con cantaridina, un poderoso inhibidor de este grupo de enzimas, revirtió dicha respuesta (Figura 4.5). Resultados similares fueron reportados por REDA *et al.* (2011) en raíces de pepino, que atribuyeron dicha respuesta a una rápida acidificación del citoplasma, luego de iniciado el estrés salino, que inhibió la actividad de quinasas proteicas en mayor proporción que a las fosfatasas. La acidificación del citoplasma puede justificarse por la actividad de las proteínas transportadoras de Na^+ , que contribuyen a su exclusión, mediante un cotrasporte con iones H^+ , tales como SOS1 en plasmalema, y NHX1 en tonoplasto (CARILLO *et al.*, 2011).

La disminución en la actividad NR observada a partir de cuarto día de tratamiento coincidió con una disminución en las concentraciones de nitrato (Figuras 1F, 2F). La actividad NR depende fuertemente de la concentración de nitrato, ya que el propio sustrato induce su síntesis *de novo* (CARILLO, *et al.*, 2005). De este modo, las respuestas a largo plazo estarían mediadas por el suministro de nitrato, que a su vez depende de la transpiración y por ende de la apertura estomática, que puede disminuir como consecuencia del estrés salino (GONG *et al.*, 2013; KAWAKAMI *et al.*, 2013).

Se concluye que *P. alba* presenta un mecanismo de exclusión de Na^+ y Cl^- de la parte aérea, almacenándolos en mayores concentraciones en las raíces. La actividad NR se incrementa durante los primeros días de estrés, por desfosforilación de la proteína. En períodos mayores de exposición al estrés la NR es inhibida debido a la disminución en las concentraciones de nitrato.

4.5 Bibliografía

BRADFORD, M.N. 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.

CARILLO, P., MASTROLONARDO, G., NACCA, F., y FUGGI, A. 2005. Nitrate reductase in durum wheat as affected by nitrate reduction and salinity. *Functional Plant Biology*, 32:209-219.

CARILLO, P., MASTROLONARDO, G., NACCA, F., PARISI, D., VERLOTTA, A., y FUHHI, A. 2008. Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. *Functional Plant Biology*, 35: 412-426.

CARILLO, P., ANNUNZIATA, M.G., y PONTECORVO, G. 2011. Salinity stress and salt tolerance. En: Shanker, A y Venkateswarlu. *Abiotic stress in plants. Mechanisms and adaptations*, pp 21-38.

CHEN, Z., NEWMAN, L., ZHOU, M., MENDHAM, N., ZHANG, G., y SHABALA, S. 2005. Screening plants for salt tolerance by measuring K^+ flux: a case study for barley. *Plant Cell Environment*, 28:1230-1246.

CATALDO, D.A., HAROON, M., SCHRADER, L.E., y YOUNGS, V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6:71-80.

DEBOUBA, M., MAÂROUFI-DGHIMI, H., SUZUKI, A, GHORBEL M.H., y GOUIA, H. 2007. Changes in growth and activity of enzymes involved in nitrate reduction and ammonium assimilation in tomato seedlings in response to NaCl stress. *Annals of Botany*, 99:1143-1151.

DÍAZ-LÓPEZ, L., GIMENO, V., LIDÓN, V., SIMÓN, I., MARTÍNEZ, V., y GARCÍA-ZÁNCHER, F. 2012. The tolerance of *Jatropha curcas* seedlings to NaCl: an ecophysiological analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 54:34-42.

EBRAHIMIAN, E., y BYBORDI, A. 2011. Influence of different ratios of nitrate and ammonium and silicon on growth, nitrate reductase activity and fatty acid composition of sunflower under salt stress. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 9:438-443.

Ehltig, B., DLUZNIEWSKA, H., DIETRICH, H., SELLE, A., TEUBER, M., HÄNSCH, R., NEHLS, U., POLLE, A., SCHNITZLER, J.P., RENNENBERG, H., y GESSLER, A. 2007. Interaction of nitrogen nutrition and salinity in Grey poplar (*Populus tremula x alba*). *Plant, Cell and Environment*, 30:796-811.

FLORES, P., BOTELLA, M.A., MARTÍNEZ, V., y CERDÁ, A. 2000. Ionic and osmotic effects on nitrate reductase activity in tomato seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 156:52-557.

GONG, B., WEN, D., VANDENLANGENBERG, K., WEI, M., y YANG, F. 2013. Comparative effects of NaCl and $NaHCO_3$ stress on photosynthetic parameters, nutrient metabolism, and antioxidant system in tomato leaves. *Scientia Horticulturae*, 157:1-12.

JAMEEL AL-KAHAYRI, M. 2002. Growth, proline accumulation, and ion content in sodium chloride-stressed callus of date palm. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 38: 79-82.

KAWAKAMI, E.M., OOSTERHUIS, D.M., y SNIDER, J.L. 2013. Nitrogen assimilation and growth of cotton seedlings under NaCl salinity and in response to urea application with NBPT and DCD. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 199:106-117.

KOPITTKER, P. 2012. Interactions between Ca, Mg, Na and K: alleviation of toxicity in saline conditions. *Plant Soil*, 352:353-362.

KLEPPER L., FLESHER D., y HAGEMAN, R.H. 1971. Generation of reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant Physiology* 20:580-590.

MAGALHÃES DE ARAGÃO, R., SILVA, J.S., LIMA, C.S., y SILVEIRA, J.A.G. 2011. Salinidade modula negativamente a absorção e assimilação de NO_3^- em plantas de feijão de corda. *Revista Ciência Agronômica*, 42:382-389.

MALAVOLTA, E., VITTI, G.C., y OLIVEIRA, S.A. 1989. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba, Brasil.

MELONI, D.A., y MATÍNEZ, C.A. 2009. Glycinebetaine improves salt tolerance in vinal (*Prosopis ruscifolia* Griesbach) seedlings. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 21:233-241.

MELONI, D.A. 2012. Respuestas fisiológicas a la suplementación con calcio de plántulas de vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) estresadas con NaCl. *Revista de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo*, 44: 79-88.

MIURA, K. 2013. Nitrogen and phosphorous nutrition under salinity stress. En: AHMAD, P., AZOOZ, M.M., y PRASAD, M.N.V. (Eds.) *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*, pp. 425-441.

MUNNS, R., y TESTER, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59:651-681.

MUNNS, R., JAMES, R.A., XU, B., ATHMAN, A., CONN, S.J., JORDANS, C., BYRT, C.S., HARE, R.A., TYERMAN, S.D., TESTER, M., PLETT, D., y GILLIHAM, M. 2012. Eheat grain yield on saline soils is improved by na ancestral Na^+ transporter gene. *Nature*, 30:360-366.

NEDJIMI, B., y DAOUD, Y. 2009. Effects of calcium chloride on growth, membrane permeability and root hydraulic conductivity in two *Atriplex* species grown at high (sodium chloride) salinity. *Journal of Plant Nutrition*, 32:1818-1830.

PLAZA, B.S., JIMÉNEZ, S., SEGURA, M., CONTRERAS, J., y LAO, M. 2009. Influence of salinity on the nitrogen metabolism of *Cordyline fruticosa*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40:462-472.

REDA, M., y KLOBUS, G. 2006. Modifications of the activity of nitrate reductase from cucumber roots. *Biologia Plantarum*, 50:42-47.

REDA, M., MIGOCKA, M., y KLOBUS, G. 2011. Effect of short-term salinity on the nitrate reductase activity in cucumber roots. *Plant Science*, 180:783-788.

REDA, M., KLOBUS, G. 2008. Effect of different oxygen availability on the nitrate reductase activity in *Cucumis sativus* L. roots. *Biologia Plantarum*: 678-680.

REGINATO, M., SGROY, M., LLANES, A., CASSÁN, F., y LUNA, V. 2012. The american halophyte *Prosopis strombulifera*, a new potential tool to confer salt tolerance to crops. En: ÖZTÜRK, M.; AHMAD, M.S.A.; AKSOY, A. (Eds.). *Crop production for agricultural improvement*. Springer, Berlin, pp. 136-167.

SIDDIQUI, M.H., MOHAMMAD, F., y KHAN, M.N. 2009. Morphological and physio-biochemical characterization of *Brassica juncea* L. Ccem. & Coss, genotypes under salt stress. *Journal of Plant Interactions*, 4:67-80.

SIDDIQUI, M.H., MOHAMMAD, F., KHAN, M.M.A., MOHAMED, H., y AL-WHAIBI, H. 2012. Cumulative effect of nitrogen and sulphur on *Brassica juncea* L. genotypes under NaCl stress. *Protoplasma*, 249:139-253.

YOUSFI, S, SERRET, M.D., MÁRQUEZ, A.J., VOLTAS, J., y ARAUS, J.L. 2012. Combined use of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{15}\text{N}$ tracks nitrogen metabolism and genotypic adaptation of durum wheat to salinity and water deficit. *New Phytologist*, 194:230-244.

WANG, S.M., ZHANG, J.L., y FLOWERS, T.J. 2007. Low-affinity Na^+ uptake in the halophyte *Suaeda maritima*. *Plant Physiology*, 145: 559-571.

ZHANG, Y.F., WANG, P., YANG, Y.F., BI, Q., TIAN, S.Y., y SHI, X.W. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi improve reestablishment of *Leymus chinensis* in bare saline-alkaline soil: Implication on vegetation restoration of extremely degraded land. *Journal of Arid Environments*, 75:773-778.

CAPÍTULO 5. FLUORESCENCIA TRANSIENTE DE LA CLOROFILA *a*, CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES E INTERCAMBIO GASEOSO

5.1 Introducción

El cierre estomático, con la concomitante disminución en la fijación de CO₂, es una respuesta característica de las plantas sometidas a estrés salino (MUNNS y TESTER, 2008). Como consecuencia de ello, estas plantas suelen estar expuestas a un exceso de energía luminosa, que puede ocasionar daños en la etapa fotoquímica. De este modo, bajo condiciones naturales de crecimiento, el estrés salino es frecuentemente acompañado por estrés luminoso (ZANG *et al.*, 2012).

El aparato fotosintético puede dañarse, incluso bajo condiciones moderadas de luz, si el exceso de energía no se disipa adecuadamente; y como consecuencia de ello puede producirse un estrés oxidativo, generado por especies reactivas de oxígeno (ROS) (MATOS *et al.*, 2009).

En los cloroplastos las principales rutas de formación de ROS son: i) la transferencia de electrones al oxígeno molecular en el lado aceptor de los fotosistemas I y II, conduciendo a la formación de radical superóxido (O₂⁻), y en reacciones posteriores peróxido de hidrógeno (H₂O₂) ó radicales oxidrilos (·OH) (MUBARAKSHINA *et al.*, 2010) y ii) la transferencia de energía desde la clorofila triplete excitada (³Chl*) al oxígeno molecular, conduciendo a la formación de oxígeno singlete (¹O₂[.]) (TRIANANTAPHYLIDES y HAVAUX, 2009).

Las ROS pueden dañar directamente el fotosistema II (FSII), o inhibir la síntesis de D₁, una de sus principales proteínas. Dicha inhibición se produce en la etapa de elongación de la cadena polipeptídica (HIDEG *et al.*, 2007; POSPÍŠIL, 2009). De este modo también se impide la reparación del FSII (TAKAHASHI y BADGER, 2011). Esto puede disminuir la eficiencia fotoquímica, y la actividad fotosintética, y por ende el crecimiento y la productividad vegetal (CHEN *et al.*, 2011).

Las plantas han desarrollado estrategias para prevenir el fotodaño, y la inhibición de la reparación del FS II. Entre estos mecanismos se destacan aquellos que se conocen colectivamente con el nombre de “quenching no fotoquímico”, (NPQ), ya que no conducen al almacenamiento productivo de energía (ZAKS *et al.* 2013). Se han identificado mecanismos de NPQ en todos los organismos fotosintéticos que liberan oxígeno, incluyendo a cianobacterias, algas, musgos y plantas superiores (NIYOI y TRUONG, 2013).

Los mecanismos de NPQ se dividen en las siguientes componentes: dependientes de energía (qE), estados de transición (qT) (MINAGAWA, 2011), dependiente de zeaxantina (qZ) (NILKENS *et al.*, 2010) y fotoinhibición (qI) (MÜLLER *et al.*, 2001). Sin embargo, según NILKENS *et al.* (2010) en vegetales superiores qT no contribuye significativamente al NPQ.

La zeaxantina (Zx) cumple un papel fundamental en la desactivación de la $^1\text{Chl}^*$, y por lo tanto en el NPQ. Se sugiere además su participación en qE, qZ, y qI (JAHNS y HOLZWART, 2012).

La Zx se sintetiza en el ciclo de las xantofilas, en el que participan dos enzimas: violaxantina de-epoxidasa (VDE: EC1.10.99.3), y zeaxantina epoxidasa (ZE: EC1.14.13.90). Cuando la luz se encuentra en exceso, VDE cataliza la conversión de violaxantina en zeaxantina, y cuando esta situación ambiental desfavorable es superada, ZE cataliza la reacción inversa (DEMMIG-ADAMS y ADAMS, 2002).

Otro mecanismo de tolerancia a las ROS, consiste en la síntesis de moléculas antioxidantes, que secuestran los radicales libres, cuando éstos se producen. La Zx también está involucrada en este proceso (LI *et al.*, 2009).

El análisis de la fluorescencia de la clorofila *a*, constituye un método sensible y no destructivo para la detección y cuantificación de los cambios inducidos en la etapa fotoquímica de la fotosíntesis. Recientemente ha sido utilizado para evaluar el grado de daño del aparato fotosintético, bajo diferentes condiciones de estreses ambientales, tales como temperaturas extremas, sequía, salinidad, etc. (ZUSHI *et al.*, 2012, GOMES *et al.*, 2012, MEHTA *et al.*, 2010 a,b, DUARTE *et al.*, 2013).

La intensidad de la fluorescencia de la clorofila *a*, en organismos fotosintéticos adaptados a la oscuridad, se incrementa luego de su iluminación, fenómeno que ha sido denominado “efecto Kautsky” (MEHTA *et al.*, 2010 a). En la curva de inducción de la fluorescencia, en la fluorescencia mínima (F_0), todos los centros de reacción están abiertos, y en la fluorescencia máxima (F_M), éstos están cerrados. Todos los organismos fotosintéticos oxigénicos investigados, muestran una curva de fluorescencia polifásica, que consiste en una secuencia de fases denominadas O, J, I, P. Cada letra identifica a una etapa, definida por el tiempo de inducción: O corresponde a la fluorescencia inicial (20 μs), J (2 ms), I (30 ms), P (300 ms) (STRASSER *et al.*, 2005).

Con base en la teoría del flujo de energía en las membranas fotosintéticas, se ha desarrollado el test JIP, que consiste en el análisis de la emisión de fluorescencia en la curva OJIP (STRASSER *et al.*, 2005). Este test asocia las diferentes fases de la fluorescencia transiente, con los estados redox del fotosistema II, y por ende con la eficiencia del transporte de electrones a través del intersistema, hasta los aceptores finales en el fotosistema I (TSIMILLI- MICHAEL y STRASSER, 2008).

Numerosos estudios han sugerido que las características fotosintéticas son las más adecuadas, para ser utilizadas como marcadores indirectos en programas de mejoramiento genético, ya que responden rápidamente a los estreses ambientales (STEFANOV *et al.*, 2011, GAMA *et al.*, 2013; DUARTE *et al.*, 2013). Pese a ello, no existen referencias sobre la respuesta de la fotosíntesis al estrés salino, en especies de importancia forestal nativas de la la Región Fitogeográfica del Chaco Occidental.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la salinidad sobre la fotosíntesis de plántulas de *P. alba* sometidas a estrés salino con NaCl.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Material vegetal

Los frutos se cosecharon al azar dentro de un bosque *P. alba* desarrollado al margen de lagunas temporales, en la localidad de Maco (27°51'20" S; 64°13'27"W), Provincia de Santiago del Estero, Argentina. Las semillas se extrajeron manualmente realizándose una incisión con ayuda de una pinza, para facilitar su imbibición durante la germinación. La siembra se realizó empleando toallas de papel humedecidas con agua destilada, que se incubaron en cámara de crecimiento por un lapso de 15 días a 25° C y bajo un fotoperíodo de 12 horas.

Las plántulas así obtenidas colocaron en macetas plásticas de 3 litros de capacidad, conteniendo una mezcla de arena y vermiculita, en proporciones iguales (VELARDE *et al.*, 2003). La densidad inicial fue de 4 plántulas por maceta; dos semas después de realizado el repique, se efectuó un raleo, dejando sólo dos plántulas por maceta.

Las macetas se regaron 3 veces por semana con solución nutritiva de Hoagland al 25%, pH 6,5.

El ensayo se realizó en condiciones de invernáculo; la temperatura mínima fue de 21°C y la máxima de 27°C.

Treinta días después de haber realizado el repique de las plántulas a macetas, se inició la adición de NaCl, en concentraciones de 0, 100 y 500 mM.

5.2.2 Mediciones de fluorescencia transiente de la clorofila a

La fluorescencia de la clorofila a transiente se midió con un fluorímetro Handy PEA (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn Norfolk, UK). Las mediciones se realizaron en hojas verdaderas, por la mañana (entre 6:30 y 9:00 hs), luego de la aclimatación de las hojas en oscuridad, durante 30 minutos. La emisión de fluorescencia en hojas fue inducida por luz roja (650 nm), con una intensidad de 3.000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proveniente de una matriz conteniendo 3 diodos enfocados sobre un punto de 4 mm de diámetro, y registrada durante 1 segundo. La toma de datos se realizó cada 10 μs (de 10 μs a 0,3 ms), cada 0,1 ms (de 0,3 a 3 ms), cada 1 ms (de 3 a 30 ms), cada 10 ms (de 30 a 300 ms), y cada 100 ms (de 300 ms a 1 s).

A partir de los valores obtenidos en la curva OJIP, se calcularon los valores de fluorescencia variable relativa (V_t). Siendo $V_t = (F_t - F_0) / (F_M - F_0)$.

Para resaltar las diferencias entre cada una de las fases de la curva OJIP, se calcularon las diferencias cinéticas entre las curvas; $\Delta V_t = V_t \text{ del testigo} - V_t \text{ del tratamiento salino}$. (CHEN *et al.*, 2011).

Las variables biofísicas que caracterizan al flujo de energía en la etapa fotoquímica de la fotosíntesis, se analizaron de acuerdo al test JIP propuesto por STRASSER *et al.* (2005). De esta manera se obtuvieron los siguientes parámetros:

RC/ABS: flujo de absorción (ABS) de las moléculas de clorofila del complejo antena, por centro de reacción (RC). Esta variable representa una medida del tamaño del complejo antena.

$\phi P0 = TR0/ABS = F_v/F_M$: relación del flujo de energía capturada (TR0), que conduce a la reducción de la quinona A (Q_A), por flujo de absorción (ABS). También llamado rendimiento cuántico de la fotoquímica primaria.

$\phi E0 = ET0/ABS$: rendimiento cuántico para el transporte de electrones (ET), hacia el pool de plastoquinona (PQ).

$\phi R0 = RE0/ABS$: rendimiento cuántico de la reducción (RE) de los últimos aceptores de electrones del fotosistema I (ferredoxina, $NADP^+$).

$\Psi E0 = ET0/TR0$: eficiencia ó probabilidad de que un electrón se mueva desde Q_A hasta el intersistema.

$\delta R0 = RE0/ET0$: eficiencia ó probabilidad de que un electrón se mueva desde el intersistema, hasta los últimos aceptores del fotosistema I.

$\Psi R0$: eficiencia o probabilidad de que un electrón se mueva desde la quinona A reducida (Q_A^-) hasta los últimos aceptores del fotosistema I.

PI_{ABS} : índice de desempeño, que indica el potencial para la conservación de la energía desde el excitón, hasta la reducción de los aceptores de electrones del intersistema.

$$PI_{ABS} = \frac{\gamma RC}{1 - \gamma RC} * \frac{\phi P0}{1 - \phi P0} * \frac{\Psi E0}{1 - \Psi E0} =$$

$$= \frac{RC}{ABS} * \frac{TR0}{DIO} * \frac{ET0}{TR0 - ET0}$$

Donde $\gamma_{RC} = \frac{\text{Clorofilas del centro de reacción}}{\text{Clorofila total}}$

PI_{TOTAL} : Índice de desempeño total; refleja el potencial para la conservación de la energía desde el excitón, hasta los aceptores de electrones del fotosistema I.

$$PI_{total} = PI_{ABS} * \frac{\delta R0}{1 - \delta R0}$$

5.2.3 Intercambio gaseoso y fotosíntesis neta

Las mediciones de intercambio gaseoso y asimilación neta de CO_2 , se realizaron en las mismas hojas en las que se midieron las variables de fluorescencia. Para ello se utilizó un analizador de gases infrarrojo en un sistema abierto (IRGA-LCpro⁺ System ADC, BioScientific Ltd.), con cámara para hojas de *Arabidopsis*, en condiciones de luz artificial saturante ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y concentración de CO_2 ambiental. Se midieron las siguientes variables: fotosíntesis neta (A), transpiración (E), conductancia estomática (g_s), y concentración intercelular de CO_2 (C_i). A partir de estas variables se calculó la eficiencia de la carboxilación (A/C_i) y eficiencia en el uso del agua (A/E). Se realizaron 10

mediciones en cada hoja. Los valores obtenidos se normalizaron, asignándole el valor 1 al testigo.

5.2.4 Extracción, separación y cuantificación de carotenoides

La extracción de carotenoides se realizó de acuerdo al método descrito por MERCADANTE y RODRIGUEZ-AMAYA (1998). Los principales pasos fueron la extracción de pigmentos con acetona, saponificación con KOH 10% en metanol durante 12 hs a temperatura ambiente, remoción del álcali, y concentración en evaporador rotativo (Fisatom, Uberlandia, Minas Gerais, Brasil) a 32°C. Posteriormente se resuspendió con éter etílico, transfirió a frascos color ámbar, se secó con nitrógeno, y almacenó en freezer hasta su cuantificación, mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

Se utilizó una columna polimérica de fase reversa C₃₀ y como fase móvil agua/metanol/éter metil- tert-butílico (J. T. Baker–Mallinckrodt), comenzando con las proporciones 5:90:5 (v/v/v), alcanzando 0:95:5 (v/v/v) a los 12 minutos, 0:89:11(v/v/v) a los 25 min, 0:75:25 (v/v/v) a los 40 min, y finalizando con 0:50:50 (v/v/v) luego de 60 minutos, con un flujo de 1 mL/min, a 33 °C. (ZANATTA y MERCADANTE, 2007). Para su cuantificación se emplearon estándares Sigma-Aldrich.

5.2.5 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, con 5 repeticiones. Los datos se analizaron con ANOVA y Test de Tukey.

5.3 Resultados

Tanto el testigo como los tratamientos salinos, mostraron la típica cinética de emisión de fluorescencia en escala logarítmica, distinguiéndose en todos los casos las etapas O, J, I, P (Figura 5.1 A). Este resultado demuestra que todas las muestras estudiadas se encontraban fotosintéticamente activas.

Para analizar en detalle las curvas OJIP, a partir de ellas se calcularon los valores de fluorescencia variable relativa, y se graficaron las diferencias cinéticas entre las curvas de cada tratamiento, ΔV_t (Figura 5.1 B).

La cinética de ΔV_t mostró que el estrés salino incrementó la emisión de fluorescencia, con respecto al testigo (Figura 5.1 B).

En la Figura 5.2, se representan las variables obtenidas a partir del test JIP, normalizadas tomando el testigo como referencia.

En las plantas crecidas en presencia de 100 mM de NaCl se observó una disminución en el flujo de absorción por centro de reacción (RC/ABS), y en el rendimiento cuántico para el transporte de electrones hacia el pool de plastoquinona ($\phi E0$), mientras que la fotoquímica primaria ($\phi P0$) no fue afectada.

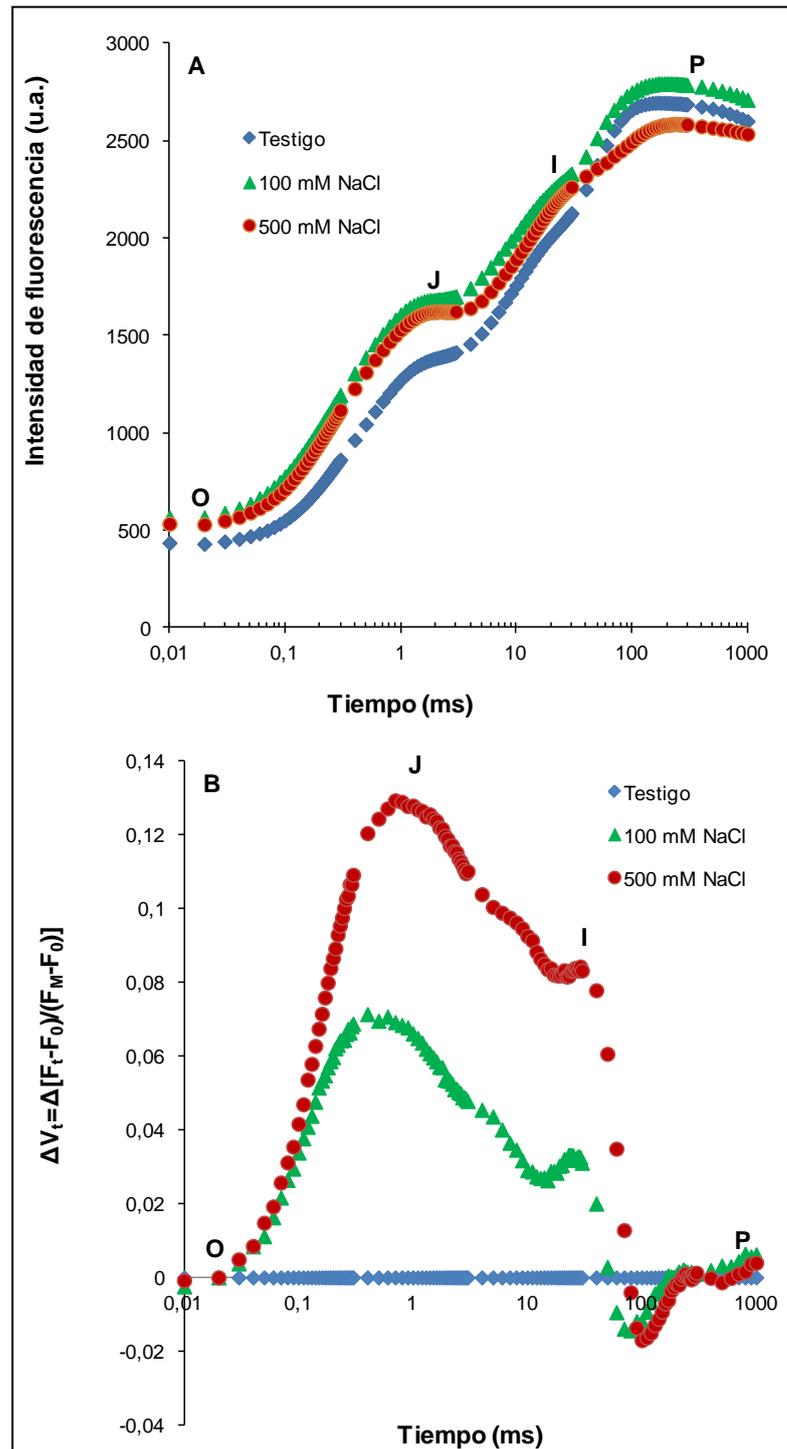


FIGURA 5.1. Fluorescencia transiente de la clorofila *a* (OJIP) de hojas de *Prosopis alba* sometidas a estrés salino, adaptadas a la oscuridad, y representada en escala de tiempo logarítmica (A). Diferencias de fluorescencia variable relativa, normalizadas en función del testigo (B).

La disminución en $\phi E0$ se debió a una caída en los valores de $\Psi E0$, que representa la eficiencia del transporte de electrones desde la quinona A reducida (Q_A^-), hasta el intersistema.

Estos resultados demuestran una inhibición en el transporte de electrones desde la Q_A^- hacia el intersistema.

También registró una disminución en rendimiento cuántico de la reducción de los últimos aceptores de electrones del fotosistema I (ferredoxina, $NADP^+$), $\phi R0$. Ésta se fue consecuencia de la disminución en $\phi E0$, ya que la eficiencia en el transporte de electrones desde el intersistema, hasta los últimos aceptores del fotosistema I ($\delta R0$) no fue afectada por el estrés.

Se observó una disminución en la eficiencia del transporte de electrones desde la Q_A^- hasta los últimos aceptores del fotosistema I ($\Psi R0$). Debido a que ($\delta R0$) no fue afectada por el estrés, dicha disminución se debió a los menores valores de $\Psi E0$.

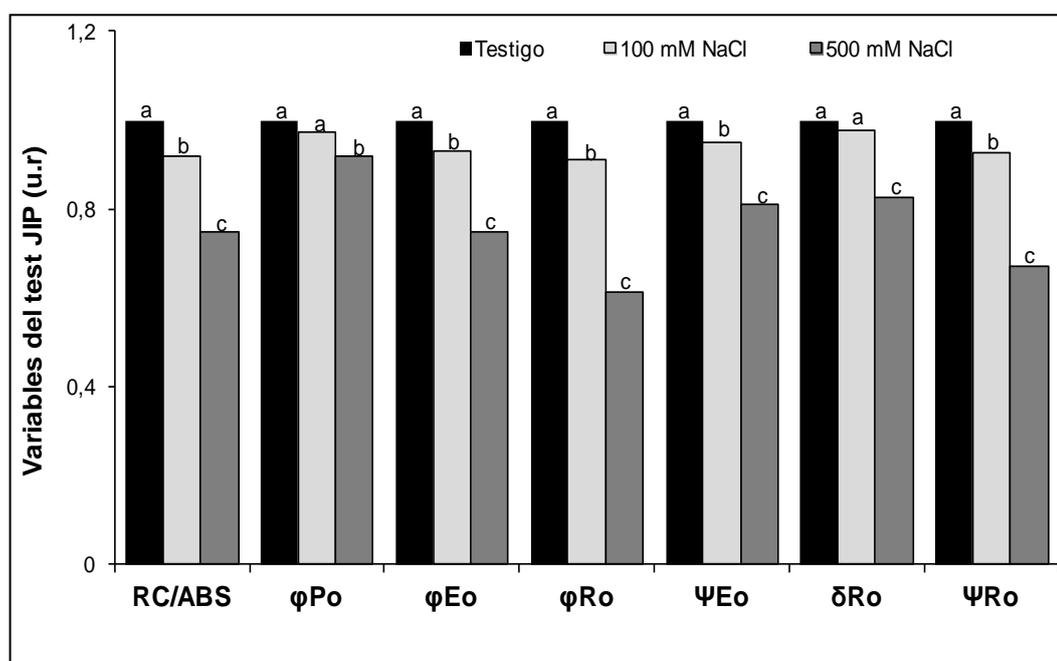


FIGURA 5.2. Variables de fluorescencia de la clorofila a, deducidos a partir del test JIP. Los valores se normalizaron con respecto al testigo, al que se le asignó un valor de 100 %=1. Para cada variable, letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey.

Como consecuencia del impacto negativo del estrés sobre RC/ABS y $\Psi E0$, se registró un menor índice de desempeño PI_{abs} para la conservación de la energía desde el excitón, hasta la reducción de aceptores de electrones del intersistema; o sea un menor índice de desempeño del FSII (Figura 5.3). Debido a que $\delta R0$ no fue afectado por la salinidad, los valores del índice de desempeño PI_{total} , fueron similares a los de PI_{abs} .

La etapa fotoquímica de la fotosíntesis fue drásticamente inhibida en las plantas de *P. alba* crecidas en 500 mM de NaCl (Figura 5.2).

Se observó una disminución en los valores de RC/ABS, ϕP_0 , ϕE_0 , y ΨE_0 . Estos resultados muestran una disminución en la conservación de la energía, desde el excitón hasta el intersistema (ϕE_0), como consecuencia de una inhibición en la fotoquímica primaria (ϕP_0) y en el transporte de electrones desde la Q_A^- , hasta el intersistema (ΨE_0).

ϕR_0 fue la componente de la cascada de energía que registró mayor disminución en 500 mM de NaCl. Esa respuesta se debió a los menores valores de ϕP_0 , ϕE_0 , y δR_0 , con respecto al testigo.

También se detectó una importante disminución en ΨR_0 , como consecuencia de los menores valores de ϕE_0 , y δR_0 , que demuestra una inhibición en el transporte de electrones desde la Q_A^- hasta el intersistema, y de desde éste hasta la ferredoxina y NADP⁺.

La acentuada disminución en δR_0 hizo que el índice de desempeño PI_{total} disminuya mucho más que el PI_{abs} (Figura 5.3)

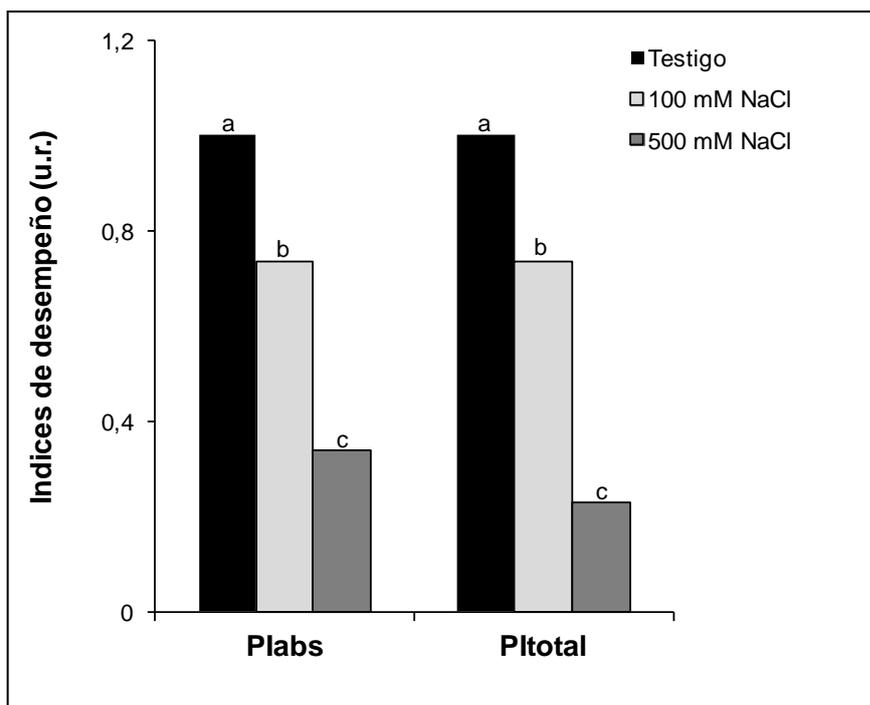


FIGURA 5.3. Índices de desempeño en plantas de *P. alba* sometidas a estrés salino. Los valores se normalizaron con respecto al testigo, al que se le asignó un valor de 100%=1. Para cada índice, letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey

El estrés salino incrementó la concentración de todos los carotenoides estudiados, en especial luteína y zeaxantina, que experimentaron incrementos cercanos al 250% en las plantas crecidas en presencia de 500 mM de NaCl, con respecto al testigo (Figura 5.4).

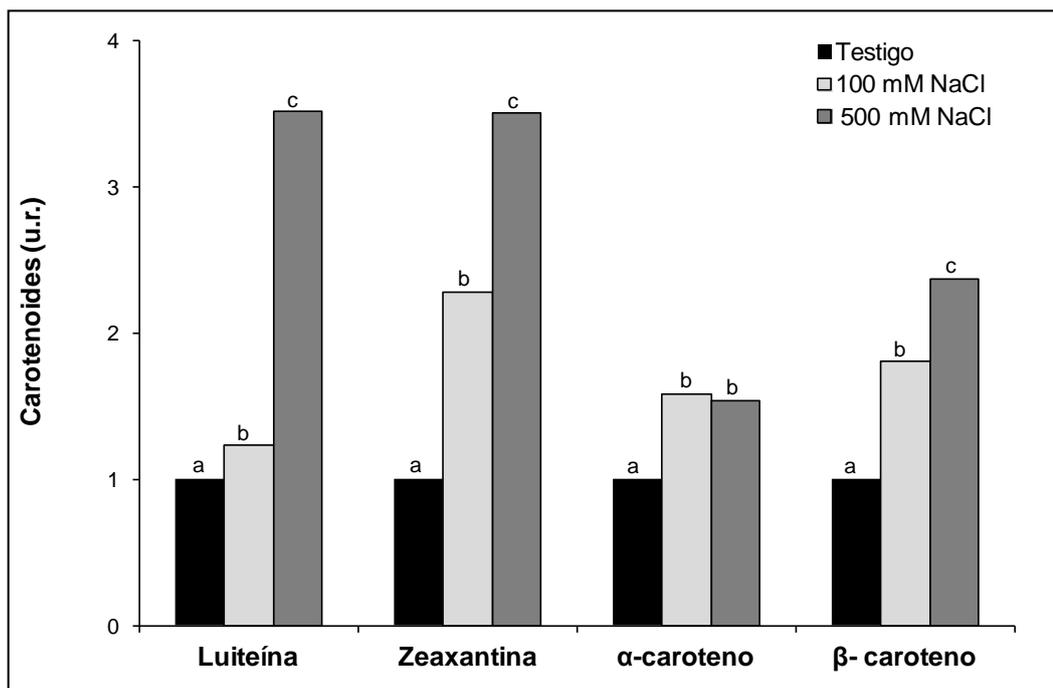


FIGURA 5.4. Concentración de carotenoides en plantas de *P. alba* sometidas a estrés salino. Los valores se normalizaron con respecto al testigo, al que se le asignó un valor de 100%=1. Para cada carotenoide, letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey.

En la Figura 5.5 se representa el efecto del estrés salino sobre las variables de intercambio gaseoso. La salinidad produjo una disminución en la fotosíntesis neta, y en la conductancia estomática; pese a ello la concentración interna de CO_2 se mantuvo constante. Estos resultados, y la disminución en la eficiencia de la carboxilación (A/C_i), demuestran que en condiciones de estrés salino, la fotosíntesis neta no estuvo limitada por la concentración interna de CO_2 . El comportamiento de la etapa fotoquímica sugiere que la inhibición de la fotosíntesis fue consecuencia de la menor producción de NADPH y ATP.

Como consecuencia del cierre estomático, se observó una menor transpiración en las plantas estresadas. Sin embargo, debido a que esta variable disminuyó en menor proporción que la asimilación del CO_2 , se registró una disminución en la eficiencia en el uso del agua.

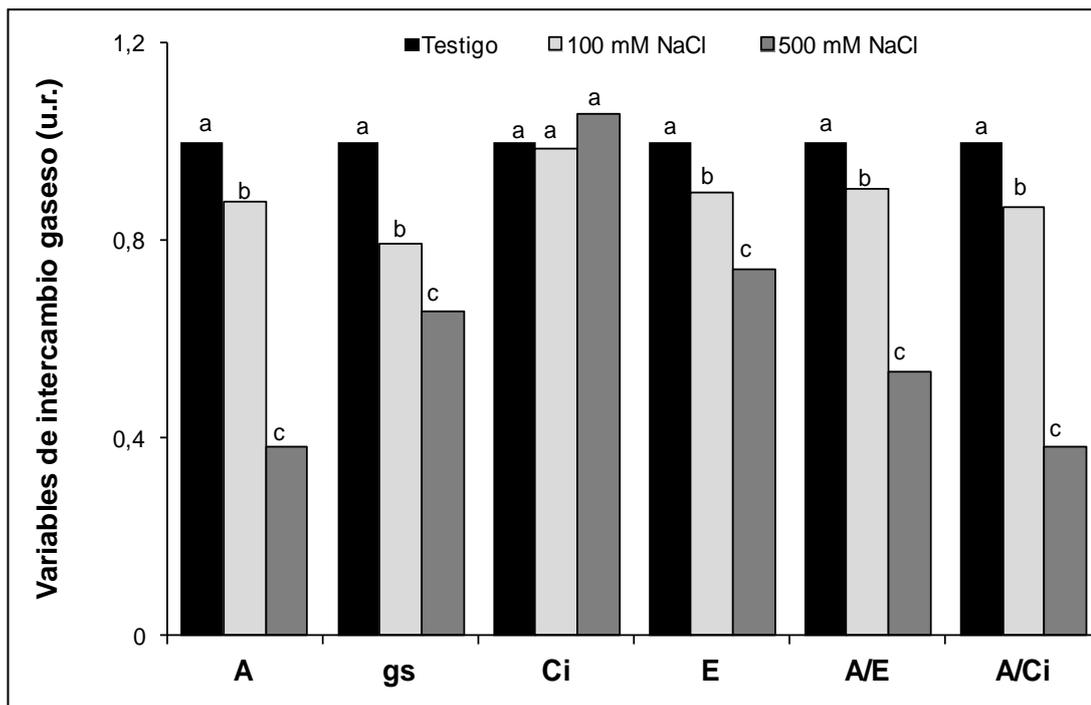


FIGURA 5.5. Fotosíntesis neta (A), conductancia estomática (g_s), concentración interna de CO_2 (C_i), transpiración (E), eficiencia en el uso del agua (A/E), y eficiencia en la carboxilación (A/ C_i), en plantas de *P. alba* sometidas a estrés salino. Los valores se normalizaron con respecto al testigo, al que se le asignó un valor de 100 %=1. Para cada variable, letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey.

5.4. Discusión

La cinética de emisión de fluorescencia, graficada en escala logarítmica, presentó perfiles similares en todos los tratamientos, distinguiéndose claramente las etapas O, J, I, P (Figura 5.1 A).

La curva OJIP representa la sucesiva reducción de los aceptores de electrones del FSII (STRASSER *et al.*, 2000). La fase J corresponde a la emisión de fluorescencia en 2 ms, y representa la acumulación de $Q_A^- Q_B^-$, I (30 ms) corresponde a $Q_A^- Q_B^-$, y P (300 ms) indica la formación de $Q_A^- Q_B^-$ (LAZÁR *et al.*, 2006).

La forma de la curva OJIP ha sido atribuida a cambios en el transporte de electrones (MATHUR *et al.*, 2011).

En las curvas de diferencias de fluorescencia relativa, normalizadas en función del testigo (ΔV_t), valores positivos representan inhibición de la etapa fotoquímica de la fotosíntesis, y valores positivos mayor eficiencia (CHEN *et al.*, 2011). Por lo tanto, como se observa en la Figura (5.1 B), el estrés salino disminuyó la eficiencia en ambas concentraciones de NaCl.

GAUTHIER *et al.* (2010), relacionaron la emisión de fluorescencia en la etapa O-J, con la acumulación de Q_A^- . El estrés salino incrementó la emisión de fluorescencia en la etapa O-J (Figura 5.1 B), y produjo una disminución en $\Psi E0$, o sea una inhibición en el transporte de electrones desde la Q_A^- hacia el intersistema, y como consecuencia la acumulación de Q_A^- (Figura 5.2).

Ambas concentraciones salinas disminuyeron el valor de RC/ABS (Figura 5.2). El impacto del estrés salino fue más acentuado en 500 mM de NaCl, verificándose además una disminución del 10% en $\phi P0$, en relación al testigo.

YUSUF *et al.* (2010) sugirieron que una reducción en los valores de RC/ABS, acompañada por una disminución en TR0/ABS ($\phi P0$), refleja la inactivación de parte de los centros de reacción del FSII. Este resultado coincide con lo observado por MEHTA *et al.* (2010 b), que estudiaron el efecto del estrés salino sobre la heterogeneidad del FSII en hojas de trigo. Estos autores demostraron que el estrés salino aumentó la población de FSII β y γ , y disminuyó la proporción de FSII α . Los FSII β y γ poseen una antena de menor tamaño, y no tienen conectividad (no pueden transferir su energía de excitación a centros de reacción abiertos). También demostraron que el NaCl disminuyó la proporción de FSII reductores de Q_B (capaces de transportar un electrón de Q_A^- a Q_B), y aumentó la población de FSII no reductores de Q_B , con el concomitante incremento en la concentración de Q_A^- .

Los pasos de la cascada de energía limitados por 100 mM de NaCl fueron la absorción de luz (RC/ABS), y la transferencia de electrones desde la Q_A^- hacia el intersistema ($\Psi E0$). Como consecuencia, se produjo una disminución en los valores de PI_{abs} y PI_{total} (Figura 5.3).

En 500 mM el impacto sobre RC/ABS y $\Psi E0$ fue más drástico, y además se inhibió la eficiencia cuántica máxima de la fotoquímica primaria ($\phi P0$), y la transferencia de electrones desde el intersistema hasta los aceptores finales del FSI ($\delta R0$). Como consecuencia de los bajos valores de $\delta R0$, PI_{total} fue menor que PI_{abs} (Figura 5.3)

Estos resultados coinciden con los obtenidos por MEHTA *et al.* (2010a) en trigo, quienes observaron que el PI_{abs} fue muy sensible al estrés salino, y su disminución se debió a una reducción en RC/ABS y $\Psi E0$, mientras que el aporte de $\phi P0$ sólo fue relevante en altas concentraciones de NaCl (500 mM).

La variable $\phi P0 = F_v/F_m = TR0/ABS$ representa el máximo rendimiento cuántico del FSII en hojas adaptadas a la oscuridad (PERBONI *et al.*, 2012). Este parámetro no fue afectado por 100 mM de NaCl, y si bien en plantas crecidas en 500 mM de NaCl disminuyó 10% con respecto al testigo, esa reducción fue inferior a la detectada en $\phi R0$ y $\delta R0$.

Este resultado puede estar asociado al alto contenido de zeaxantina en hojas de plantas de *P. alba* crecidas en presencia de NaCl (Figura 5.4). ZHANG *et al.* (2012) estudiaron el comportamiento de linajes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) transgénico en las que se suprimió la enzima zeaxantina epoxidasa mediante tecnología de RNAm antisentido. Dichas plantas poseían altas concentraciones constitutivas de zeaxantina, y cuando se sometieron a estrés con NaCl mostraron menores niveles disminución en $\phi P0$ (F_v/F_m), peroxidación de lípidos, y acumulación de H_2O_2 , y mayores concentraciones de proteína D1 del PSII, en relación a un linaje silvestre.

El mecanismo a través del cual la zeaxantina (Zx) protege los componentes de la membrana tilacoidal de la fotoinhibición y fotodaño, no ha sido completamente dilucidado. Sin embargo en los últimos años su función ha sido muy estudiada, y se produjeron hallazgos importantes.

La Zx participa directa ó indirectamente en todas las componentes del NPQ (JAHNS y HOLZWART, 2012).

La componente qE depende del pH del lumen del tilacoide; puede ser activada o desactivada rápidamente (1-2 minutos), y es modulada por la Zx (JOHNSON *et al.*, 2008). El qE requiere de cambios conformacionales en las proteínas del complejo antena del FSII, o en la interacción proteína/proteína, que son controlados por PsbS, y modulados por la Zx (JAHNS y HOLZWART, 2012). Se han propuesto dos roles para la zeaxantina: i) una función indirecta, como un modulador alostérico de qE, controlando su eficiencia, cinética y pK (JOHNSON *et al.*, 2009), y ii) un rol directo mediante la transferencia de energía desde la clorofila a la zeaxantina, o la transferencia de electrones a moléculas de clorofila vecinas, formando un estado de transferencia de carga Zx^+/chl^- (AHN *et al.*, 2008; AVENSON, 2009).

Se ha definido qZ como la componente del NPQ, que se desarrolla y relaja lentamente (10-30 minutos, y 10-60 minutos, respectivamente) (NILKENS *et al.*, 2010). Debido a que es dependiente de la Zx también lo es indirectamente del pH del lumen. Esto se debe a que la formación de Zx requiere de un bajo pH, y la epoxidación ocurre sólo en ausencia de altos gradientes de pH (ΔpH). Sin embargo, una vez establecido, qZ contribuye al NPQ aún en ausencia de ΔpH . En términos fisiológicos este mecanismo es considerado un "estado de memoria" del estrés, que le permite a la planta una respuesta rápida, si el estímulo que lo ocasionó se repite (JAHNS y HOLZWART, 2012).

La componente qI, comprende los estados del NPQ que se relajan más lentamente que qE y qZ. Tradicionalmente se ha definido como la componente que no se relaja, ó lo hace muy lentamente (GUADAGNO *et al.*, 2010). Al menos parte de los procesos que contribuyen a qI están relacionados con la inactivación de la proteína D₁, inducida por la luz, por lo que requiere la degradación de dicha proteína, y su síntesis. Si bien el rol de la Zx en qI no ha sido completamente dilucidado, estaría relacionado con la protección de los centros de reacción del FSII inactivados (JAHNS y HOLZWART, 2012).

A la Zx también se le ha atribuido un papel importante como antioxidante, en la fase lipídica de la membrana tilacoidal. La función de las moléculas de Zx, que no se encuentran asociadas a proteínas, se relaciona con la remoción del 1O_2 (TRIANANTAPHYLIDES *et al.*, 2008). Se ha demostrado que presenta un efecto sinérgico con el tocoferol, previniendo la peroxidación de lípidos de membrana, y que dicho efecto es independiente de su unión a las proteínas de la antena (DALL'OSTO, *et al.*, 2010). Por otra parte, debido a sus propiedades fisicoquímicas, la Zx presumiblemente ejerce un rol fotoprotectivo, relacionado con la estabilización de los lípidos de membrana (MCNULTY *et al.*, 2007)

El estrés salino también incrementó significativamente las concentraciones de luteína, y en menor grado las de β -caroteno (Figura 5.4).

La luteína es una xantofila que a diferencia de la violaxantina, no se encuentra en todas las plantas terrestres (ESTEBAN *et al.*, 2009).

El rol fotoprotectivo más importante de la luteína es la desactivación de la $^3\text{Chl}^*$, habiéndose demostrado que otros carotenoides como la violaxantina y neoxantina son mucho menos eficientes en dicho proceso (MOZZO *et al.*, 2008).

Por su parte, en el centro de reacción del FSII, el β -caroteno es responsable de la desactivación del $^1\text{O}_2^*$ (TELFER *et al.*, 2002).

Estos resultados demuestran que bajo estrés salino, *P. alba* posee un importante mecanismo de protección del aparato fotosintético, constituido por la síntesis de Zx, luteína y β -caroteno.

De acuerdo a BAKER (2008) y GAMA *et al.* (1013), a mayor eficiencia en la transferencia de energía desde los pigmentos fotosintéticos, hacia la formación de NADPH y ATP, corresponde una mayor capacidad de asimilación del CO_2 en la etapa bioquímica de la fotosíntesis. En concordancia con estos autores, el estrés salino produjo una disminución en los índices de desempeño P_{labs} y PI_{total} , y también una reducción en la eficiencia de la carboxilación, y en la fotosíntesis neta (Figuras 5.3, 5.5).

Estos resultados también coinciden con los obtenidos por DUARTE *et al.* (2013), que estudiando la ecofisiología de las halófitas *Halimione portulacoides* y *Sarcocornia fruticosa*, demostraron que bajo condiciones de estrés salino, la fotosíntesis neta estuvo principalmente limitada por daños en el FSII, más que por un cierre estomático.

Se concluye que en *P. alba* el estrés salino inhibe la etapa fotoquímica de la fotosíntesis. La especie posee un importante mecanismo de defensa, constituido por carotenoides, especialmente zeaxantina, β -caroteno y luteína. La inhibición en la etapa fotoquímica produjo una disminución en la eficiencia de la carboxilación, y por ende en la fotosíntesis neta.

5.5 Bibliografía

AHN, T.K., AVENSON, T.J., BALLOTTARI, M., CHENG, Y.C., NIYOGI, K.K., BASSI, R., y FLEMING, G.R. 2008. Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein. *Science*, 320:794-797.

AVENSON, T.J., AHN, T.K., NIYOGI, K.K., BALLOTTARI, M., BASSI, R., y FLEMING, G.R. 2009. Lutein can act as a switchable charge transfer quencher in the CP26 light-harvesting complex, *Journal of Biological Chemistry*, 284:2830-2835.

BAKER, B. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annual Review of Plant Biology*, 59:89-113.

CHEN, X., LI, W., LU, Q., WEN, X., LI, H., KUANG, T., LI, Z., y LU, C. 2011. The xanthophyll cycle and antioxidative defense system are enhanced in the wheat hybrid subjected to high light stress. *Journal of Plant Physiology*, 168:1828-1836.

DALL'OSTO, L., CAZZANIGA, S., HAVAUX, M., y BASSI, R. 2010. Enhanced photoprotection by protein-bound vs free xanthophyll pools: a comparative analysis of chlorophyll *b* and xanthophyll biosynthesis mutants. *Molecular Plant*, 3:576-593.

DEMMIG-ADAMS, B. y ADAMS, W.W. 2002. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*, 298:2149-2153.

DUARTE, B., SANTOS, D., MARQUES, J.C., y CAÇADOR, I. 2013. Ecophysiological adaptations of two halophytes to salt stress: photosynthesis, PSII photochemistry and anti-oxidant feedback- Implications for resilience in climate change. *Plant Physiology and Biochemistry*, 76:178-188.

ESTEBAN, R., OLANO, J.M., CASTRESANA, J., FERNANDEZ-MARIN, B., HERNANDEZ, A., BECERRIL, J.M., y GARCIA-PLAZAOLA, J.I. 2009. Distribution and evolutionary trends of photoprotective isoprenoids (xanthophylls and tocopherols) within the plant kingdom. *Physiologia Plantarum*, 135:379-389.

GAMA, V.N., CUNHA, J.T., LIMA, I.M., BACARIN, M.A., y SILVA, D.M. 2013. Photosynthetic characteristics and quality of five passion fruit varieties under field conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35:941-948.

GAUTHIER, A., JOLY, D., BOISVERT, S., y CARPENTIER, R. 2010. Period-four modulation of photosystem II primary quinone acceptor (QA) reduction/oxidation kinetics in thylakoid membranes. *Photochemistry and Photobiology*, 86:1064-1070.

GOMES, M.T.G., DA LUZ, A.C., DOS SANTOS, M.R., BATITUCCI, M.C.P., SILVA, D.M., FALQUETO, A.R. 2012. Drought tolerance of passion fruit plants assessed by the OJIP chlorophyll *a* fluorescence transient. *Scientia Horticulturae*, 142:49-56.

GUADAGNO, G.R., VIRZO DE SANTO, A., y D'AMBROSIO, N. 2010. A revised energy partitioning approach to assess the yields of non-photochemical quenching components. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797:525-530.

HIDEG, É., KÓS, P.B., y VASS, I. 2007. Photosystem II damage induced by chemically generated singlet oxygen in tobacco leaves. *Physiologia Plantarum*, 131: 33-40.

JAHNS, P., y HOLZWARTH, A.R. 2012. The role of the xanthophylls cycle and lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817:182-193.

JOHNSON, M.P., PEREZ-BUENO, M.L., ZIA, A., HORTON, P., y RUBAN, A.V. 2009. The zeaxanthin dependent and zeaxanthin-dependent q_e components of nonphotochemical quenching involve common conformational changes within the photosystem II antenna in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149:1061-1075.

JOHNSON, M.P., DAVISON, P.A., RUBAN, A.V., y HORTON, P. 2008. The xanthophyll cycle pool size controls the kinetics of non-photochemical quenching in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 582:259-263.

LAZÁR, D. 2006. The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Functional Plant Biology*, 33:9-30.

LI, Z.R., WAKAO, S., FISCHER, B.B., y NIYOGI, K.K. 2009. Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology*, 60:239-260.

MATHUR, S., JAJOO, A., MEHTA, P., y BHARTI, S. 2011. Analysis of elevated temperature-induced inhibition of photosystem II using chlorophyll *a* fluorescence induction kinetics in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Plant Biology*, 13:1-6.

MATOS, F.S., WOLFGRAMM, R., FÁBIO, V., GONÇALVES, F.V., y CAVATTE, P.C. 2009. Phenotypic plasticity in response to light in the coffee tree. *Environmental and Experimental Botany*, 67:421-427.

MCNULTY, H.P., BYUN, J., LOCKWOOD, S.F., JACOB, R.F., y MASON, R.P. 2007. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768:167-174.

MEHTA, P., ALLAKHVERDIEV, S.I; y JAJOO, A. 2010b. Characterization of photosystem II heterogeneity in response to high salt stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Photosynthesis Research*, 105:249-255.

MEHTA, P., JAJOO, A., MATHUR, S., y BHARTI, S. 2010a. Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of high salt stress on photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:16-20.

MERCADANTE, A. Z., y RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1998. Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:128-130.

MINAGAWA, J. 2011. State transitions-the molecular remodeling of photosynthetic supercomplexes that controls energy flow in the chloroplast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807:897-905.

MOZZO, M., DALL'OSTO, L., HIENERWADEL, R., BASSI, R. y CROCE, R. 2008. Photoprotection in the antenna complexes of photosystem II - role of individual xanthophylls in chlorophyll triplet quenching. *Journal of Biological Chemistry*, 283:6184-6192.

MUBARAKSHINA, M.M., IVANOV, B.N., NAYDOV, I.A., HILLIER, W., BADGER, M.R., y KRIEGER-LISZKAY, A. 2010. Production and diffusion of chloroplastic H₂O₂ and its implication to signalling. *Journal of Experimental Botany*, 61: 3577–3587.

MÜLLER, P., LI, X., y NIYOGI, K.K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125:1558-1566.

MUNNS, R., y TESTER, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology, 59:651-681.

NILKENS, M., KRESS, E., LAMBREV, P.H., MILOSLAVINA, Y., MÜLLER, M., y HOLZWARTH, A.R., JAHNS, P. 2010. Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady state conditions in *Arabidopsis*. Biochimica et Biophysica Acta, 1797: 466-475.

NIYOGI, K.K., y TRUONG, T.B. 2013. Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. Current Opinion in Plant Biology, 16:307-314.

PERBONI, A.T., CASSOL, D., SILVA, F.S.P., SILVA, D.M., y BACARIN, M.A. 2012. Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of flooding in canola hybrids. Biologia, 2:338-346.

POSPÍŠIL, P. 2009. Production of reactive oxygen species by photosystem II. Biochim Biophys Acta, 1787:1151-1160.

STEFANOV, D., PETKOVA, V., y DENEV, I.D. 2011. Screening for heat tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines and cultivars using JIP-test. Scientia Horticulturae, 128:1-6.

STRASSER, R.J., SRIVASTAVA, A., y TSIMILLI-MICHAEL, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize an screen photosynthetic samples, En: YUNAS, M., PATHRE, U., MOHANTY, P. (Eds.), Probing photosynthesis: mechanism, regulation and adaptation, pp. 443-480. Taylor and Francis, London, U.K.

STRASSER, R.J., TSIMILLI-MICHAEL, M., y SRIVASTAVA, A. 2005. Analysis of the fluorescence transient. En: Papageorgiou, G.C. (Ed.), Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis, Kluwer, pp. 321-362.

TAKAHASHI, S., y BADGER, M. R. 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. Trends in Plant Science, 16:1-1.

TELFER, A. 2002. What is beta-carotene doing in the photosystem II reaction centre?. Philosophical Transactions of the Royal Society B., 357: 1431-1439.

TRANTAPHYLIDES, C., KRISCHKE, M., HOEBERICHTS, F.A., KSAS, B., GRESSER, G., HAVAUX, M., VAN BREUSEGEM, F., y MUELLER, M.J. 2008. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. Plant Physiology, 148:960-968.

TRANTAPHYLIDES, C., y HAVAUX, M. 2009. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling, Trends in Plant Science, 14:219-228.

TSIMILLI-MICHAEL, M., y STRASSER, R.J. 2008. *In vivo* assessment of stress impact on plants' vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants. En: Varma, A. (Ed.), Mycorrhiza: state of the art,

genetics and molecular biology, ecofunction, biotechnology, ecophysiology, structure and systematic, vol. 3. Springer, England, pp.679-703.

VELARDE, M., FELKER, P., y DEGANO, C. 2003. Evaluation of argentine and peruvian *Prosopis* germplasm for growth at seawater salinities. *Journal of Arid Environments*, 55:515-531.

YUSUF, M.A., KUMAR, D., RAJWANSHI, R., STRASSER, R.J., y TSIMILLI-MICHAEL, M., GOVINDJEE SARIN, N.B. 2010. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and Chlorophyll *a* fluorescence measurements. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1797:1428-1438.

ZAKS, J., AMARNATH, K., SYLAK-GLASSMAN, E.J. y FLEMING, G.R. 2013. Models and measurements of energy-dependent quenching. *Photosynthesis Research*, DOI 10.1007/s11120-013-9857-7.

ZANATTA, C. F., y MERCADANTE, A. Z. 2007. Carotenoid composition from the bazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, 101: 1526-1532.

ZHANG, Q.Y., WANG, L.Y., KONG, F.Y., DENG, Y.S., LI, B., y MENG, .W. 2012. Constitutive accumulation of zeaxanthin in tomato alleviates salt stress-induced photoinhibition and photooxidation. *Physiologia Plantarum*, 146: 363-373.

ZUSHI, K., KAJIWARA, S., y NAOTAKA, M. 2012. Chlorophyll *a* fluorescence OJIP transient as a tool to characterize and evaluate response to heat and chilling stress in tomato leaf and fruit. *Scientia Horticulturae*, 148:39-46.

CAPÍTULO 6. CONSIDERACIONES FINALES

En esta tesis se ha demostrado que *P. alba* posee una elevada tolerancia al estrés salino, producido por NaCl, y se detallan algunos mecanismos involucrados en dicho comportamiento.

Se estudió la respuesta de la germinación, crecimiento, relaciones hídricas, composición mineral, metabolismo del N, y fotosíntesis. Para tener una visión más detallada de la fisiología de la especie bajo condiciones de estrés salino, resultaría interesante abordar otros aspectos, como la respuesta de hormonas. Especialmente el ácido abscísico (ABA), que está involucrado en el cierre estomático y el aumento de la relación raíz/parte aérea.

Para comprender la importancia de la salinidad en la distribución de esta especie en el Chaco Occidental, deberían realizarse ensayos que contemplen otros factores edáficos.

Si bien en dicha región la principal sal presente en los suelos es el NaCl, en algunas zonas también se registra la presencia de Na₂SO₄, y ambas sales se encuentran en diferentes proporciones. Por lo tanto en una próxima etapa, pueden realizarse experimentos en los que se evalúe la tolerancia de la especie al Na₂SO₄, solo y en combinación con NaCl.

Como se ha demostrado en esta tesis, *P. alba* realiza ajuste osmótico, mediante la acumulación de iones (especialmente Na⁺), y solutos osmocompatibles. Dicha estrategia le permite mantener constante su contenido relativo de agua y la turgencia celular; un requisito fundamental para mantener el crecimiento.

Del análisis de esta estrategia surge un nuevo interrogante: considerando que el Chaco Occidental es una zona semiárida ¿cuál es la tolerancia de *P. alba* al estrés hídrico en suelos no salinos, en los que no dispone de altas concentraciones de Na⁺ para hacer ajuste osmótico?. Para abordar este aspecto pueden realizarse ensayos en laboratorio, empleando polietilenglicol o manitol, solutos orgánicos de alto peso molecular, que no son absorbidos por las raíces. De este modo pueden incubarse las plantas en soluciones con diferentes potenciales hídricos, determinando umbrales para germinación, crecimiento, y estudiar aspectos bioquímicos, bajo condiciones controladas. También pueden realizarse ensayos en invernáculo, utilizando suelo u otros sustratos, e implementar diferentes regímenes de irrigación.

El algarrobo blanco es una especie noble, valorada en Santiago del Estero desde tiempos ancestrales, a tal punto que en áreas rurales se lo denomina "El Árbol". La ampliación de la frontera agropecuaria, ha generado deforestación de grandes superficies, degradación de suelos, conflictos por tenencia de la tierra, y el desplazamiento de sus habitantes.

En esta tesis se demostró que el NaCl inhibe la etapa fotoquímica de la fotosíntesis, y por ende la asimilación del CO₂ en el ciclo de Calvin. Debería investigarse si esa inhibición de la fotosíntesis en plantas que se desarrollan en suelos salinos, produce una menor concentración de sacarosa en frutos, disminuyendo su calidad. Por otra parte deberá evaluarse el impacto los metabolitos producidos por los mecanismos de tolerancia a la salinidad, sobre la palatabilidad de los frutos.

Atenta a esta problemática, en la Universidad Nacional de Santiago del Estero, se desarrollan proyectos de investigación que tienen como finalidad incrementar el valor agregado de los productos derivados de la especie. Entre ellos se destacan los que estudian las propiedades alimenticias de las harinas obtenidas de los frutos de algarrobo blanco. Si bien éstas son utilizadas por pobladores locales para su alimentación (poseen una alta concentración de sacarosa), la implementación de políticas que propicien el desarrollo de la región, debe contemplar su uso industrial.

Dicho Programa de Investigación, requerirá un trabajo interdisciplinario, con aportes de la Fisiología Vegetal, Botánica, Edafología, Bioquímica, Química de Alimentos, Operaciones Unitarias, etc.