



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**PARTICIPACIÓN DEL ANTIPTER VACUOLAR NHX1 DE *LOTUS TENUIS* EN
LA TOLERANCIA A SALINIDAD**

ING. AGR. MARÍA AGOSTINA AFFINITO

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR: Ing. Agr. Antonio Horacio Díaz Paleo

CO- DIRECTORA: Ing. Agr. PhD. Adriana Andrés

2020

**PARTICIPACIÓN DEL ANTIPTER VACUOLAR NHX1 DE *LOTUS TENUIS* EN
LA TOLERANCIA A SALINIDAD**

María Agustina Affinito

Ingeniera agrónoma

Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA)

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Unidad Integrada UNNOBA-INTA, durante el período comprendido entre Abril de 2015 y Noviembre de 2019, bajo la dirección del Ing. Agr. Antonio Díaz Paleo.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Ing. Agr. Antonio Díaz Paleo, por su confianza, apoyo, dedicación y paciencia. Por sus enseñanzas, buena predisposición y ayuda constante en la realización de este trabajo.

A mi codirectora, la Ing. Agr. PhD Adriana Andrés, por las enseñanzas brindadas durante el desarrollo de esta tesis y por acompañarme desde la realización de mi tesina de grado, dándome la oportunidad de crecer desde lo profesional.

A todos los grupos de trabajo que colaboraron con la realización de este trabajo. Al personal, becarios y pasantes del Laboratorio de Biotecnología de la EEA INTA Pergamino por su colaboración, paciencia y los ánimos que me dieron durante estos cinco años, especialmente a Dani, Vivi, Silvi, Lola, Ceci, Emilia, Luciano, Carla y Lorena. Al personal de la Sección Forrajeras de la EEA INTA Pergamino por su colaboración en los ensayos realizados en invernáculo, especialmente a Nati, Ivana, Emilce, Mariela, Nelson y Javier.

A la Dra Mariana del Vas del Instituto de Biotecnología (CICVyA, INTA) y a su grupo de trabajo, por la buena predisposición en cada una de mis visitas a su laboratorio.

A la Dra Fabiana Espasandín y el Dr Pedro Sansberro del Instituto de Botánica del Nordeste por la colaboración en la obtención de las plantas transgénicas de *Lotus tenuis*.

A la EEA INTA Pergamino por brindarme sus instalaciones para el desarrollo del trabajo.

A la Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires, por haberme formado y por el financiamiento otorgado para la realización de cursos de posgrado.

Al CONICET por la beca otorgada que me permitió llevar adelante este Doctorado.

A Luján, por el apoyo y las correcciones, y por ser mi compañera de aventuras en la realización de este posgrado. Al resto de los compañeros con los que cursé, compartí viajes, y que fueron de gran ayuda en todo momento.

A mis padres, por su apoyo incondicional, por su preocupación y buenos valores transmitidos.

A mis hermanos, cuñada, abuelos, tíos, primos y a la familia Doyen, por estar siempre.

A Andrés por su amor, por ser un compañero espectacular, por los viajes a INTA a regar las plantas y por aguantarme en los momentos más difíciles.

Y a todas aquellas personas que me animaron y se interesaron por mi trabajo.

A mis padres y abuelos

A. Andrés

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

- **Affinito, M. A.**, López Miró, D., Andrés, A., Díaz Paleo, A. (2019). Estudio de la concentración de iones en hoja, tallo y raíz de familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* bajo condiciones salinas. VI Congreso de la Red Argentina de Salinidad. Buenos Aires, Argentina.
- Franco Elisei, D., **Affinito, M. A.**, Andrés, A. (2019). Selección de familias de *Lotus tenuis* a través del Índice de Tolerancia a salinidad. VI Jornada de Jóvenes Investigadores de la UNNOBA. Pergamino, Argentina.
- Rudi, J., **Affinito, A.**, Lopez Miró, D., Decker, V., Maciel, M., Diaz Paleo, A. (2019). Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* portadoras del gen *LtNHX1*. VI Jornada de Jóvenes Investigadores de la UNNOBA. Pergamino, Argentina.
- **Affinito, M. A.**, Espasandín, F., del Vas, M., Andrés, A., Sansberro, P., Díaz Paleo, A. (2018). Localización subcelular del antiporter NHX1 de *Lotus tenuis*. XXXII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal y XVI Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal. Córdoba, Argentina.
- **Affinito, A.**, Decker, V., Díaz Paleo, A., Andrés, A. (2018). Efecto del estrés salino en el crecimiento vegetativo de familias de medios hermanos de *Lotus tenuis*. XXVI Jornadas de Jóvenes Investigadores de la AUGM. Mendoza, Argentina.
- Franco Elisei, D.; **Affinito, A.**; Saccoccia, M; Palacios, N.; Díaz Paleo, A.; Andrés, A. (2018). Estudio de la tolerancia a salinidad en etapas vegetativas tempranas de familias de *Lotus tenuis*. I Congreso Multidisciplinario de la UNNOBA. Junín, Argentina.
- **Affinito, A.**, Decker, V., Díaz Paleo, A., Andrés, A. (2017). Tolerancia a salinidad en etapas vegetativas tempranas de familias de medios hermanos de *Lotus tenuis*. *Journal of Basic & Applied Genetics*. 28(1), 151.
- Acuña, M.; Varea. I.; Maciel, M. A.; **Affinito, A.**; Palacios, N.; Andrés, A. N. (2016) Mejoramiento genético de agropiro alargado, festuca alta, *Lotus tenuis* y *Melilotus albus*. In: ¿Cómo mejorar la producción forrajera en suelos afectados por sales?

VI Jornada Temática del Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales (INBA). FAUBA, Buenos Aires, Argentina. p. 21-28.

- **Affinito, A.**; Ruiz, M. (2016) Estudio de la expresión transcripcional de genes relacionados con la tolerancia a salinidad en *Lotus tenuis*. V Jornada de Jóvenes Investigadores. UNNOBA, Pergamino, Argentina.
- **Affinito, A.** (2016) Participación del antiporter vacuolar NHX1 de *Lotus tenuis* en la tolerancia a salinidad. Jornada de Becarios de Posgrado. UNNOBA, Pergamino, Argentina.
- **Affinito, A.**; Diaz Paleo A.; Andrés, A. (2015) Expresión del gen del antiporter vacuolar NHX1 en familias de medios hermanos de *Lotus tenuis* en salinidad. IV Jornada de Jóvenes Investigadores. UNNOBA, Pergamino, Argentina.
- **Affinito, A.**, Franco, M., Andrés, A. (2015). Desarrollo de germoplasma de *Lotus tenuis* tolerante a salinidad. *Revista de Tecnología Agropecuaria*, INTA. ISSN 0328-7750. 10 (29), 51-55.
- **Affinito, M. A.**, Díaz Paleo, A., Andrés, A. (2015). Expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene in *Lotus tenuis* half-sibs families under salt stress. 5th International Symposium of Forage Breeding (ISFB 2015). Buenos Aires, Argentina.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	i
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	1
1. Problemática de la salinidad en la agricultura	2
2. Efecto del estrés salino en las plantas	4
3. Mecanismos de tolerancia a la salinidad	7
4. Bases genéticas de la tolerancia a la salinidad	10
5. La especie en estudio: <i>Lotus tenuis</i>	12
6. Tolerancia a la salinidad en <i>Lotus tenuis</i>	14
7. Hipótesis	16
8. Objetivos.....	16
CAPITULO 1: SELECCIÓN DE GERMOPLASMA DE <i>LOTUS TENUIS</i> TOLERANTE Y SUSCEPTIBLE A LA SALINIDAD	17
INTRODUCCIÓN.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1. Evaluación de la tolerancia a la salinidad de familias de medios hermanos (FMH) de <i>L. tenuis</i>	22
1.1. Material vegetal	22
1.2. Diseño experimental y parámetros de crecimiento evaluados.....	23
1.3. Determinación del contenido de iones Na ⁺ , K ⁺ y Cl ⁻ en hojas, tallos y raíces	25
1.4. Análisis de la información	26
2. Evaluación de la respuesta de clones de <i>L. tenuis</i> al estrés salino impuesto por <i>shock</i>	29
2.1. Material vegetal	29
2.2. Ensayos realizados con genotipos propagados de forma vegetativa	30
2.3. Análisis de la información	31
RESULTADOS	33
1. Tolerancia a la salinidad de familias de medios hermanos (FMH) de <i>L. tenuis</i>	33
1.1. Efecto de los tratamientos salinos sobre los parámetros de crecimiento.....	33
1.2. Ensayo 1: Respuesta de 15 FMH a la salinidad.....	37
1.2.1. Variabilidad en el crecimiento de las FMH.....	38
1.2.2. Tolerancia a la salinidad.....	43
1.2.3. Determinación de los contenidos de Na ⁺ , K ⁺ y Cl ⁻ y la relación K ⁺ /Na ⁺	46

1.3. Ensayo 2: Respuesta a la salinidad de cinco FMH seleccionadas en el ensayo 1 .	50
2. Respuesta de genotipos de <i>L. tenuis</i> al estrés salino impuesto por <i>shock</i>	53
2.1. Ensayo 3: Tolerancia a salinidad de genotipos provenientes de 5 FMH.....	53
2.2. Ensayo 4: Tolerancia a salinidad de 19 genotipos seleccionados en el ensayo 3 y 17 genotipos del cultivar Pampa INTA.....	55
2.3. Ensayo 5: Tolerancia a salinidad de 8 genotipos seleccionados a partir del ensayo 4	60
DISCUSIÓN	63
1. Tolerancia a la salinidad de germoplasma de <i>L. tenuis</i>	63
2. Correlación entre los contenidos de Na ⁺ , K ⁺ y Cl ⁻ y la tolerancia a la salinidad en FMH	66
CONCLUSIONES.....	71
CAPITULO 2: EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL TRANSPORTE DE SODIO EN DOS GENOTIPOS DE <i>LOTUS TENUIS</i> CON COMPORTAMIENTO CONTRASTANTE FRENTE A LA SALINIDAD.....	72
INTRODUCCIÓN.....	73
MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
1. Ensayo comparativo de dos genotipos con comportamiento contrastante frente a salinidad.....	78
1.1. Material vegetal	78
1.2. Condiciones de crecimiento.....	78
1.3. Parámetros fisiológicos y morfológicos evaluados	79
1.4. Evaluación de la expresión de genes relacionados con la tolerancia a la salinidad	79
1.4.1. Análisis bioinformático y diseño de cebadores	79
1.4.2. Análisis de la estabilidad de posibles genes de referencia frente a estrés salino	81
1.4.3. Extracciones de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	82
1.5. Análisis de la información	83
1.5.1. Parámetros fisiológicos y morfológicos.....	83
1.5.2. Análisis de la expresión génica	84
2. Comparación <i>in silico</i> de las regiones 5' del gen <i>LtNHX1</i> de dos genotipos.....	84
2.1. Identificación de la región 5' no codificante de <i>LtNHX1</i>	84
2.2. Subclonado de la región 5' no codificante de <i>LtNHX1</i>	87
2.3. Análisis <i>in silico</i> de la región 5' de <i>LtNHX1</i>	88
2.4. Amplificación y análisis <i>in silico</i> de la región 5' del gen <i>LtNHX1</i> de dos genotipos con comportamiento contrastante frente a la salinidad	88
RESULTADOS	90
1. Tolerancia al estrés salino y sobrevivencia de dos genotipos de <i>L. tenuis</i> frente a concentraciones crecientes de NaCl.....	90

2. Contenido de iones en hoja, raíz y tallo de dos genotipos de <i>L. tenuis</i> de comportamiento contrastante frente a NaCl.....	93
3. Evaluación de la expresión de genes relacionados con la tolerancia a la salinidad.....	99
3.1. Determinación de la estabilidad de posibles genes de referencia y de las eficiencias de amplificación de los cebadores.....	99
3.2. Expresión relativa de genes relacionados con la tolerancia a la salinidad.....	101
3.2.1. Expresión del gen del antiporter vacuolar NHX1	104
3.2.2. Expresión del gen de la pirofosfatasa vacuolar VP1	104
3.2.3. Expresión del gen del antiporter de la membrana plasmática SOS1	105
3.2.4. Expresión del gen del cotransportador CCC.....	106
3.2.5. Expresión del gen del transportador HKT1	107
3.2.6. Correlación en la expresión de los genes estudiados.....	107
4. Análisis <i>in silico</i> de la región 5' del gen <i>LtNHX1</i> en dos genotipos contrastantes frente a salinidad	109
4.1. Identificación y amplificación de la región 5' de <i>LtNHX1</i>	109
4.2. Análisis <i>in silico</i> la región 5' de <i>LtNHX1</i>	109
4.3. Análisis <i>in silico</i> comparativo de la región 5' del gen <i>LtNHX1</i> de dos genotipos con comportamiento contrastante frente a la salinidad.....	112
DISCUSIÓN	116
CONCLUSIONES.....	121
CAPITULO 3: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN DEL ANTIPORTER VACUOLAR NHX1 DE <i>LOTUS TENUIS</i>	122
INTRODUCCIÓN.....	123
MATERIALES Y MÉTODOS.....	126
1. Estudio de la localización subcelular de <i>LtNHX1</i>	126
1.1. Subclonado de <i>LtNHX1</i> en el vector p*7FWG2.....	126
1.2. Expresión transitoria de <i>LtNHX1-GFP</i> en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	129
1.2.1. Agroinfiltración y observación en microscopio confocal.....	129
1.2.2. Western blot.....	130
1.2.3. Análisis <i>in silico</i> de la proteína <i>LtNHX1</i>	130
1.3. Obtención de plantas transgénicas de <i>L. tenuis</i> portadoras de 35S:: <i>LtNHX1-GFP</i>	130
1.3.1. Transformación de <i>L. tenuis</i> con 35S:: <i>LtNHX1:GFP</i>	130
1.3.2. Evaluación de la expresión de <i>LtNHX1-GFP</i>	132
1.3.3. Observación de plantas transgénicas de <i>L. tenuis</i> en microscopio confocal.....	132
2. Estudio de la tolerancia a salinidad a partir de la expresión constitutiva de <i>LtNHX1</i> ...	133
2.1. Evaluación de la tolerancia a la salinidad de plantas de <i>L. tenuis</i> que sobreexpresan <i>LtNHX1</i>	133

2.2.	Evaluación de la tolerancia a la salinidad de plantas de <i>A. thaliana</i> con expresión constitutiva de <i>LtNHX1</i>	134
2.2.1.	Obtención de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	134
2.2.2.	Estudio de la tolerancia a la salinidad en fase de germinación.....	139
2.2.3.	Estudio de la tolerancia a la salinidad en etapa vegetativa.....	139
2.3.	Análisis de la información.....	140
2.3.1.	Ensayo con plantas transgénicas de <i>L. tenuis</i>	140
2.3.2.	Ensayos con plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	141
	RESULTADOS	142
1.	Ubicación subcelular de LtNHX1-GFP.....	142
1.1.	Ubicación subcelular del antiporter NHX1 en plantas de <i>N. benthamiana</i> con expresión transitoria de <i>LtNHX1-GFP</i>	142
1.2.	Ubicación subcelular del antiporter NHX1 en plantas transgénicas de <i>L. tenuis</i> con expresión constitutiva de <i>LtNHX1-GFP</i>	146
2.	Estudio de la tolerancia a salinidad a partir de la expresión constitutiva de <i>LtNHX1</i> ...	148
2.1.	Tolerancia a la salinidad de plantas transgénicas de <i>L. tenuis</i>	148
2.2.	Tolerancia a la salinidad de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	152
2.2.1.	Expresión constitutiva de <i>LtNHX1</i> en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	152
2.2.2.	Tolerancia a la salinidad de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> en etapa de germinación.....	155
2.2.3.	Tolerancia a la salinidad de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> en etapa vegetativa.....	159
	DISCUSIÓN	165
1.	Ubicación subcelular del antiporter NHX1 de <i>Lotus tenuis</i>	165
2.	Funcionalidad de LtNHX1 en la tolerancia a la salinidad.....	166
	CONCLUSIONES	170
	CONSIDERACIONES GENERALES	171
	BIBLIOGRAFÍA	175
	ANEXOS	203

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

μg : microgramo

μl : microlitro

μM : micromolar

ABA: ácido abscísico

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: primera hebra complementaria de ADN

ANOVA: análisis de la varianza

ARN: ácido ribonucleico

BSA: albúmina de suero bovino

C.V.: coeficiente de variación

Ca^{2+} : catión calcio

CCC: transportador *cation-chloride cotransporter*

Cl^- : anión cloruro

cm: centímetro

D.E.: desvío estándar

D: diámetro de planta

DBCA: diseño en bloques completos aleatorizados

DCA: diseño completamente aleatorizado

ddi: días desde inicio de los tratamientos

dNTP: desoxirribonucleótido

E.E.: error estándar

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ETP: longitud de entrenudos del tallo principal

FC: fluorescencia corregida

FMH: familia de medios hermanos

g: gramo

GFP: proteína verde fluorescente

H^+ : ion hidrógeno

HKT: transportador *High-affinity Potassium Transporter*

hs: horas

IG: índice de germinación

IgG: inmunoglobulina G
IntDen: densidad integrada
ITD: índice de tolerancia del diámetro de planta
ITETP: índice de tolerancia de la longitud de entrenudos del tallo principal
ITLR: índice de tolerancia de la longitud de raíz
ITLTP: índice de tolerancia de la longitud de tallo principal
ITNTV: índice de tolerancia del número de tallos vegetativos
ITPFA: índice de tolerancia del peso fresco aéreo
ITPSA: índice de tolerancia del peso seco aéreo
ITPSR: índice de tolerancia del peso seco radicular
ITPST: índice de tolerancia del peso seco total
IVSP: estructuras esféricas intravacuolares
K⁺: catión potasio
kDa: kilodálton
LB: medio Luria-Bertani
LR: longitud de raíz
LTP: longitud de tallo principal
M: molar
Máx: valor máximo
MES: ácido 2-morfolino etano sulfónico
mg: miligramo
Mg²⁺: catión magnesio
MgCl₂: cloruro de magnesio
min: minuto
Mín: valor mínimo
ml: mililitro
mM: milimolar
MS: medio Murashige y Skoog
n°: número
Na⁺: catión sodio
NaCl: cloruro de sodio
ng: nanogramo
NHX1: transportador Na⁺/H⁺ *exchange*

NTV: número de tallos vegetativos
OD₆₀₀: densidad óptica a 600 nanómetros
PAT: enzima fosfinotricina acetiltransferasa
pb: pares de bases
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFA: peso fresco aéreo
PG: porcentaje de germinación
pH: potencial de Hidrógeno
ppm: partes por millón
PSA: peso seco aéreo
PSR: peso seco radicular
PST: peso seco total
rpm: revoluciones por minuto
SDS: dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
seg: segundo
SOS: transportador *Salt Overly Sensitive*
T^a: temperatura
T_m: temperatura de fusión o *melting* del ADN
WT: línea *wild-type*

RESUMEN

La salinidad del suelo afecta a la producción agrícola limitando el crecimiento, el rendimiento y la calidad de los cultivos. La comprensión de los mecanismos de tolerancia a estrés salino es esencial para el mejoramiento genético de especies de interés destinadas a ambientes con dicha limitante. *Lotus tenuis* es una leguminosa forrajera perenne naturalizada en los campos bajos de la Pampa Deprimida argentina, considerada tolerante a la salinidad en estadios de germinación, plántula y planta adulta. Los mecanismos involucrados en la respuesta a estrés salino de la especie no han sido totalmente dilucidados. Se conoce que el antiporter vacuolar NHX1 es responsable de la compartimentalización de Na⁺ en vacuolas y, en numerosas especies, se considera fundamental en la tolerancia a la salinidad.

El objetivo de la presente tesis doctoral fue estudiar la participación del antiporter vacuolar NHX1 de *Lotus tenuis* en su tolerancia a salinidad. Para esto, se determinó la expresión transcripcional relativa del gen *LtNHX1* y de otros genes involucrados en el transporte y exclusión de sodio en genotipos contrastantes en su tolerancia al estrés, se determinó la localización subcelular del antiporter, y se estudiaron los cambios en la tolerancia a la salinidad de *L. tenuis* y de *Arabidopsis thaliana* a partir de la expresión constitutiva de la región codificante del gen.

Se inició la investigación con la selección de genotipos de *L. tenuis* con comportamiento contrastante a la salinidad en fase vegetativa juvenil. Para esto, se evaluó el crecimiento de familias de medios hermanos (FMH) del programa de mejoramiento genético de la Unidad Integrada UNNOBA-INTA bajo distintas concentraciones salinas alcanzadas por aclimatación, en dos ensayos hidropónicos en condiciones semi-controladas. Debido a las condiciones ambientales y a la variabilidad intrafamiliar existente, el comportamiento de las FMH no fue consistente en las distintas evaluaciones. Por esto, los siguientes ensayos se realizaron en condiciones controladas con genotipos propagados vegetativamente y sin aclimatación al estrés. Se estimó un índice de tolerancia relativo y se evaluó la sobrevivencia a lo largo de tres ensayos, para finalmente seleccionar un genotipo tolerante a la salinidad proveniente de una de las FMH evaluadas previamente, y un genotipo susceptible proveniente del cultivar Pampa INTA.

Posteriormente, con el fin de tener un conocimiento más acabado de los mecanismos de tolerancia a la salinidad de la especie, se compararon los contenidos de iones Na⁺, K⁺ y Cl⁻, y la expresión transcripcional relativa de genes codificadores de transportadores de membrana, en distintos tejidos de los dos genotipos contrastantes bajo distintas concentraciones salinas y en distintos momentos. El agregado de sal incrementó los niveles

de Na^+ y Cl^- en ambos genotipos. En raíz este incremento con respecto al control sin agregado de sal fue mayor en el genotipo tolerante. En parte aérea ocurrió lo contrario y fue el genotipo susceptible el que presentó mayores incrementos respecto al control sin sal. Esto podría indicar una exclusión de iones más eficiente, y un mayor secuestro de los mismos en las vacuolas de la raíz en el genotipo tolerante, contribuyendo a la mayor tolerancia mediante la reducción de la toxicidad iónica en la parte aérea. Los cambios en la expresión génica en las raíces apoyaron esta conjetura, debido a que el genotipo tolerante presentó un incremento en la expresión relativa de *NHX1* (responsable de la compartimentalización de Na^+), de *SOS1* (relacionado con su exclusión); y de *HKT1* (relacionado con la descarga de Na^+ del xilema para evitar su transporte a la parte aérea). También se incrementó la expresión del gen del cotransportador CCC, posiblemente relacionado con la exclusión de Cl^- . En el genotipo susceptible, el cloruro de sodio no produjo el incremento de los transcritos de estos genes en raíz, aunque incrementó la expresión de *NHX1* en hoja, lo cual resultó menos eficiente para disminuir los efectos tóxicos del Na^+ que la compartimentalización en raíces presumiblemente realizada por el genotipo tolerante. En los dos genotipos se analizaron *in silico* las regiones 5' de *LtNHX1*, hallando en ambos casos posibles elementos reguladores relacionados con la respuesta a estrés salino y otros tipos de estrés abiótico.

Se realizó el estudio de la ubicación subcelular de *LtNHX1* mediante la expresión constitutiva de la proteína de fusión *LtNHX1*-GFP tanto en forma transitoria en *Nicotiana benthamiana* como en plantas transgénicas de *L. tenuis*. Se determinó que se trata de un antiporter NHX del grupo I, ubicado en membrana vacuolar.

La expresión constitutiva de la región codificadora de *LtNHX1* incrementó la tolerancia a la salinidad de una línea transgénica de *A. thaliana* en fase de germinación y en etapa vegetativa, tanto cuando el estrés fue impuesto por *shock* como por aclimatación. También se incrementó la tolerancia a la salinidad en etapa vegetativa de una línea transgénica de *L. tenuis* con sobreexpresión de *LtNHX1*.

En conclusión, se confirmó que el antiporter NHX1 de *L. tenuis* se ubica en membrana vacuolar y participa en la tolerancia a la salinidad de la especie mediante la compartimentalización de Na^+ en las vacuolas de las raíces, complementando la actividad de otros transportadores que reducen o retrasan el transporte de Na^+ a la parte aérea de las plantas.

ABSTRACT

Lotus tenuis, commonly known as “lotus” or “narrow-leaf birdsfoot trefoil”, is a perennial, allogamous, diploid pasture legume that is naturalized in the Flooding Pampa region of Argentina. It is considered a salt tolerant species. It is known that the NHX1 vacuolar antiporter is responsible for the compartmentalization of Na⁺ in vacuoles and, in numerous species, is considered essential in salinity tolerance. The aim of this work was to study the contribution of *Lotus tenuis* NHX1 vacuolar antiporter to its salinity tolerance.

Two genotypes with contrasting level of tolerance were selected, and changes in ion contents and in the gene expression of NHX1 and other membrane transporters were studied. The tolerant genotype showed signs of greater exclusion and compartmentalization of Na⁺ in roots. The tolerant genotype showed an increase in the relative expression of *NHX1* (responsible for the compartmentalization of Na⁺); *SOS1* (related to its exclusion) and *HKT1* (related to the retrieval of Na⁺ from the xylem). The expression of the *CCC* cotransporter gene, possibly related to the exclusion of Cl⁻, was also increased. In the susceptible genotype, sodium chloride did not cause an increase in the transcripts of these genes in roots, but it increased the expression of *NHX1* in leaf, which was less efficient in reducing the toxic effects of Na⁺ than root compartmentalization present in the tolerant genotype.

The study of the subcellular location of LtNHX1 was performed by constitutive expression of the fusion protein LtNHX1-GFP. It was confirmed that it is a group I NHX antiporter, located in vacuolar membrane.

The constitutive expression of the coding region of LtNHX1 increased the salinity tolerance of *Arabidopsis thaliana* in germination and vegetative stage. The overexpression of LtNHX1 in *L. tenuis* also increased salinity tolerance in vegetative stage.

In conclusion, it was confirmed that the *Lotus tenuis* NHX1 vacuolar antiporter is located in vacuolar membrane and contributes to the salinity tolerance of the species through the compartmentalization of Na⁺ in root vacuoles, complementing the activity of other membrane transporters that reduce or delay Na⁺ accumulation in shoots.

INTRODUCCIÓN

1. Problemática de la salinidad en la agricultura

La salinidad del suelo es uno de los principales factores que afecta a la producción agrícola, limitando el crecimiento, el rendimiento y la calidad de los cultivos (Ashraf, 2009; FAO, s. f.; Munns & Gilliam, 2015; Yamaguchi & Blumwald, 2005). De acuerdo con estimaciones realizadas a partir del mapa de suelos de FAO/UNESCO (1970-1980), aproximadamente el 7 % de la superficie mundial se encuentra afectada por salinidad o sodicidad. De esta superficie, 77 millones de hectáreas son agrícolas (FAO, s. f.). La salinización del suelo puede tener causas primarias, es decir, naturales, o bien ser secundaria, generada por el hombre mediante el riego y la deforestación (Pankova *et al.*, 2018; Shabala & Munns, 2017).

Debido a la disminución en el rendimiento de las especies cultivadas producto del estrés, la salinidad del suelo impacta en la seguridad alimentaria y en las ganancias económicas de los productores, afectando su calidad de vida (Munns & Gilliam, 2015; Pankova *et al.*, 2018). Las pérdidas anuales mundiales se estiman en USD 31 millones (Pankova *et al.*, 2018). Incluso en casos extremos, los suelos salinizados no pueden volver a utilizarse para la producción agrícola (FAO, s. f.).

Argentina, con 85 millones de hectáreas salinas o sódicas, es el tercer país con mayor superficie de suelos afectados por halomorfismo en el mundo, después de Rusia y Australia (Abrol, Yadav, & Massoud, 1988). Esta superficie incluye zonas áridas y semi-áridas en las que las condiciones halomórficas se generaron en forma natural; zonas bajo riego, en las cuales existe una combinación de salinidad preexistente y salinización por razones antrópicas; y zonas húmedas con capas freáticas cercanas a la superficie, como la Pampa Deprimida en la provincia de Buenos Aires (Lavado, 2007).

Por otra parte, desde la segunda mitad del siglo XX, sobre todo desde la década del '90 con el proceso de "sojización", existe en el país una gran expansión agrícola, en desmedro de otras actividades agrarias (Coppi, 2010). Es por esto que en la Pampa Húmeda, la ganadería se desplazó a suelos con limitantes edafoclimáticas, como las zonas bajas e inundables con problemas de halomorfismo (Lavado, 2007). Por ejemplo, en la provincia de Buenos Aires, la mayor densidad bovina por hectárea se encuentra en la zona de la Pampa Deprimida, en la cuenca del Río Salado (Figura 1), región en la que al menos un 60 % de los suelos son halo-hidromórficos con drenaje deficiente y un exceso de sales y sodio (Taboada & Micucci, 2009). Es decir, presentan grandes dificultades para ser utilizados en la agricultura, por lo que se destinan al pastoreo (Lavado, 2007).

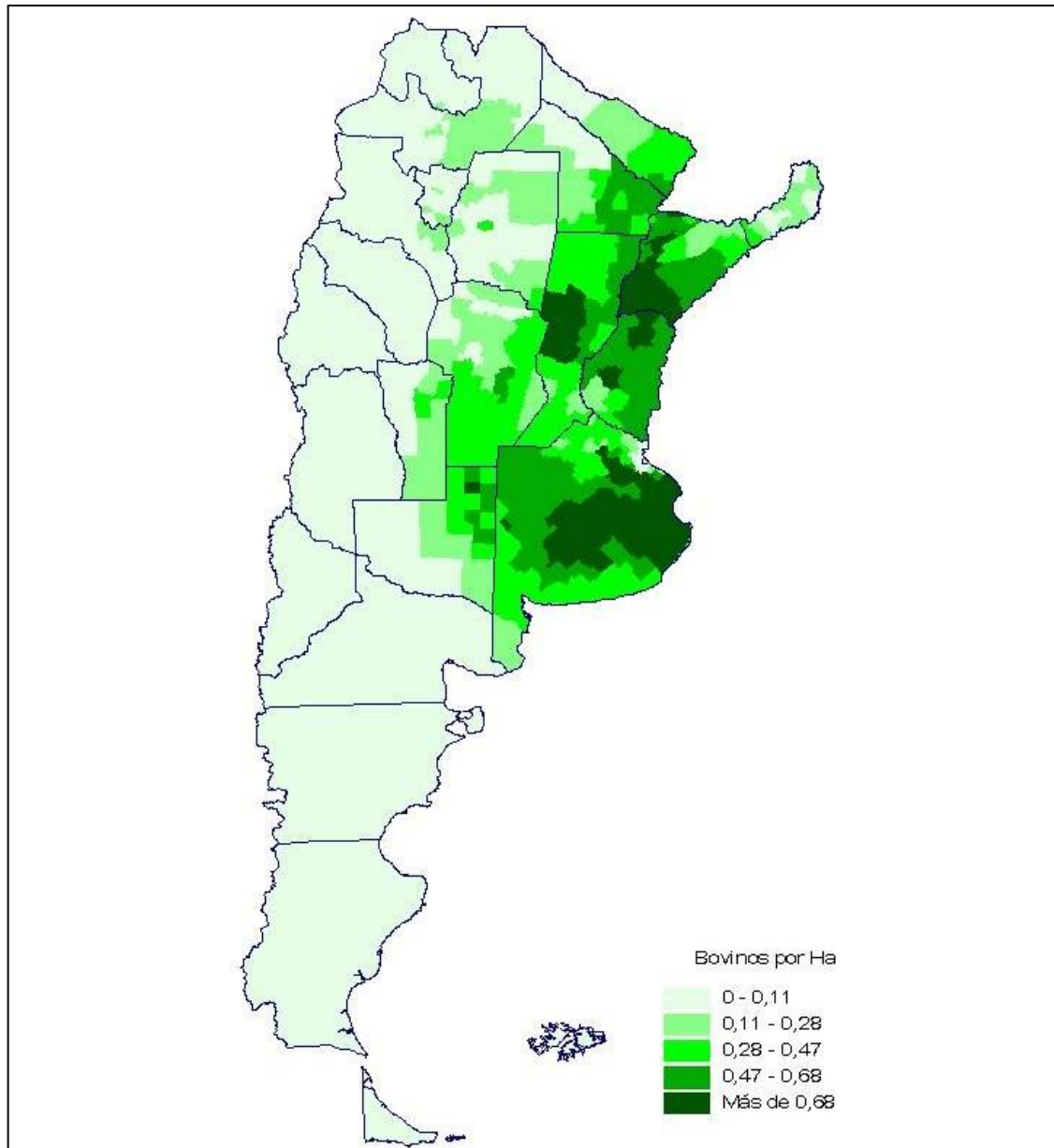


Figura 1: Densidad de bovinos calculada sobre la superficie total de cada departamento o partido en hectáreas en marzo de 2015. Fuente: Sistema de Gestión Sanitaria, Dirección Nacional de Sanidad Animal, SENASA, Argentina.

La salinidad del suelo genera un problema cuya solución no es sencilla. Cuando las causas de la misma son antrópicas, podría estimularse la modificación de las prácticas agrícolas. Cuando las causas son naturales, se debe recurrir al mejoramiento genético en búsqueda de variedades tolerantes.

Debido a la importancia de la problemática, desarrollar germoplasma tolerante a la salinidad es un objetivo central en los programas de mejoramiento genético a nivel mundial, ya sea en forma convencional o utilizando herramientas biotecnológicas (Flowers, 2004; Ismail &

Horie, 2017; Yamaguchi & Blumwald, 2005). Las actividades agrícolas están basadas mayormente en especies glicófitas, sensibles al estrés salino, y su mejoramiento ha sido lento debido a la complejidad de la tolerancia (Ismail & Horie, 2017). La comprensión de los mecanismos de tolerancia a estrés salino es esencial para el mejoramiento genético de especies cultivadas de interés (Munns & Gilliam, 2015; Schroeder *et al.*, 2013).

2. Efecto del estrés salino en las plantas

Se define al estrés como un factor externo, biótico o abiótico, que genera una influencia negativa en la planta, y se puede medir por la supervivencia, el crecimiento o el rendimiento (Taiz & Zeiger, 2002). El estrés salino limita el crecimiento y desarrollo vegetal, pudiendo ocasionar una amplia variedad de efectos, entre los que se destacan: reducción de la turgencia, deficiencia nutricional, desorganización de membranas, alteración de determinadas actividades enzimáticas, producción de radicales libres y disminución de la tasa fotosintética y de la tasa de división celular (Hasegawa, Bressan, Zhu, & Bohnert, 2000; Munns, 1993, 2002; Munns & Tester, 2008; Zhu, 2003).

La reducción del crecimiento y desarrollo producida por las sales es el resultado de la acción combinada de varios factores que impactan, esencialmente, a través de dos efectos: el efecto osmótico y el efecto específico (Greenway & Munns, 1980).

El efecto osmótico producido por la salinidad causa disminución en la capacidad de la planta para absorber agua, debido al bajo potencial hídrico en la solución del suelo con altas concentraciones de iones, principalmente sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-) (Greenway & Munns, 1980; Munns, 2002; Munns & Tester, 2008; Termaat & Munns, 1986; Zhu, 2003). La vía simplástica se ve afectada por la disminución progresiva de la diferencia de potencial hídrico entre el medio salino y el citosol. Cuando los potenciales se igualan, cesa la toma neta de agua por esta vía. La vía apoplástica no está directamente afectada por el medio salino y, probablemente, es capaz de continuar funcionando hasta que se detiene la transpiración. Sin embargo, en condiciones salinas la planta cierra los estomas para limitar la pérdida de agua, y su entrada por la vía del apoplasto también se ve disminuida. Con las vías de entrada de agua a la planta afectadas por la salinidad, las células pierden turgencia, disminuyendo su tasa de elongación, lo cual afecta su crecimiento y función (Fricke & Peters, 2002; Passioura & Munns, 2000; Taiz & Zeiger, 2002; Yeo, Lee, Izzard, Boursier, & Flowers, 1991). Cuando la turgencia es nula, las células colapsan y se produce el marchitamiento. El estrés osmótico reduce el crecimiento de las hojas y, en menor medida,

el crecimiento radicular. Además, disminuye la conductancia estomática y, por lo tanto, afecta la fotosíntesis (Munns, 1993).

El efecto específico producido por las sales se debe a la acumulación excesiva de iones salinos en los tejidos de la planta, que da lugar a toxicidad iónica, desequilibrios nutricionales y estrés oxidativo (Borsani, Valpuesta, & Botella, 2001; Munns, 2002; Munns & Tester, 2008).

La toxicidad iónica se asocia normalmente a la absorción excesiva de iones Na^+ y Cl^- , o a la baja tolerancia a la acumulación de los mismos, lo que genera daños a nivel celular (Munns *et al.*, 2016; Munns & Tester, 2008). Se manifiesta en la clorosis marginal de la hoja y, con ello, en una disminución del área fotosintética, lo cual reduce la fotosíntesis neta (Munns & Tester, 2008). Si bien el crecimiento de nuevas hojas no se inhibe directamente por la acumulación de sales en los tejidos, se produce un incremento en la senescencia de hojas viejas. El transporte continuo de sales en la hoja que está transpirando durante un largo período de tiempo, resulta en muy altas concentraciones de Na^+ y Cl^- , lo cual produce su muerte (Shabala & Munns, 2017). La capacidad fotosintética de la planta disminuye, lo que lleva a una reducción de la tasa de crecimiento. La tasa de muerte de las hojas es crucial para la supervivencia de la planta: si la misma excede la velocidad a la que se producen las hojas nuevas, la planta puede no sobrevivir (Munns, 2010). La toxicidad iónica también genera una disminución en la síntesis de proteínas, lo que afecta no solo la fotosíntesis sino otros procesos, como el metabolismo de producción de energía y de lípidos.

Otro efecto específico es el desequilibrio nutricional. El exceso de iones Na^+ y Cl^- afecta la absorción y el transporte de otros nutrientes, como el K^+ y el Ca^{2+} , influyendo de esta manera sobre la disponibilidad de los mismos (Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2002; Parida & Das, 2005). Debido a su gran similitud química, el Na^+ desplaza al K^+ en sus funciones, disminuye la relación K^+/Na^+ del citoplasma afectando negativamente a los procesos metabólicos que dependen del K^+ , y da lugar a una despolarización del potencial eléctrico de las membranas, disminuyendo la entrada de K^+ (Ghars *et al.*, 2008; Maathuis & Amtmann, 1999). En consecuencia, en condiciones salinas se pueden dar situaciones de deficiencia de K^+ , como se ha observado en plantas de maíz y de otras especies (Botella, Martínez, Pardines, & Cerdá, 1997).

Por último, la salinidad conlleva procesos de estrés oxidativo derivados de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies pro-oxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1986). Este desequilibrio genera un efecto tóxico sobre estructuras

biológicas. La salinidad induce el incremento en la tasa de producción de ROS tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^-) y el radical oxidrilo (OH^\cdot), los cuales pueden causar daño celular a través de daño oxidativo al ADN, oxidación de proteínas y lipoperoxidación de estructuras lipídicas (Ashraf, 2009; Ashraf & Foolad, 2012; Demidchik, 2015; Neill, Desikan, Clarke, Hurst, & Hancock, 2002).

El efecto osmótico y el efecto específico ocurren secuencialmente (Figura 2), dando lugar a un modelo bifásico de crecimiento como respuesta a la salinidad (Munns, 1993, 2002; Munns & Termaat, 1986; Munns & Tester, 2008). En la primera fase, se observa rápidamente una inhibición del crecimiento atribuida al efecto osmótico, que genera estrés hídrico. La segunda fase de inhibición del crecimiento es atribuida a la toxicidad iónica *per se* que afecta el metabolismo y la nutrición de la planta, es decir, el efecto específico. Las especies sensibles y las tolerantes serían igualmente afectadas por el efecto osmótico, evidenciándose la tolerancia diferencial a la salinidad durante la segunda fase. En efecto, aquellas plantas que no logren evitar la acumulación de iones y/o los compartimentalicen ineficientemente, estarán expuestas a sufrir daño más rápidamente y, por lo tanto, serán más sensibles a la salinidad.

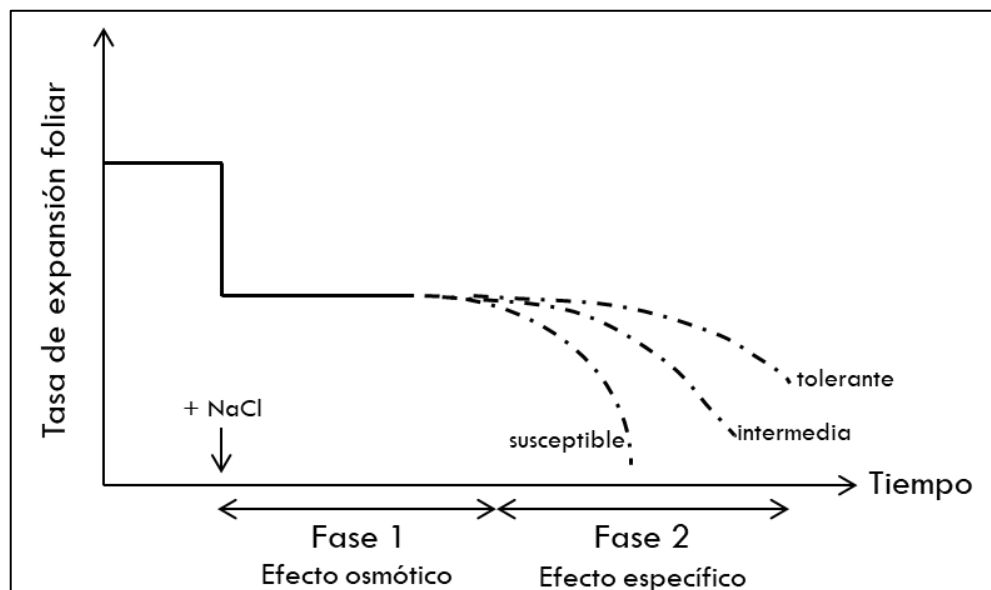


Figura 2: Modelo bifásico de crecimiento en respuesta al estrés salino. Se grafica el comportamiento de tres variedades de una especie frente al estrés (susceptible, intermedia y tolerante). En la primera fase luego de la adición de NaCl domina el efecto osmótico y todas las variedades son igualmente afectadas. En la segunda fase domina el efecto específico, y se manifiestan las diferencias entre las mismas. Ilustración adaptada a partir de la publicación de Munns (1993).

3. Mecanismos de tolerancia a la salinidad

La tolerancia de las plantas al estrés es su capacidad de hacer frente a un ambiente desfavorable (Taiz & Zeiger, 2002). Involucra respuestas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares, que permiten mantener los procesos de respiración, fotosíntesis y transporte de nutrientes (Díaz, Monza, & Márquez, 2005; Munns & Tester, 2008; Wang, Vinocur, & Altman, 2003).

La tolerancia a la salinidad se define como la habilidad de una planta para crecer y completar su ciclo de vida en un medio que contiene altas concentraciones de sal, y varía entre los sucesivos estadios de crecimiento (Bernstein & Hayward, 1958). Existe una gran variación en la tolerancia a la salinidad entre las distintas especies vegetales (Greenway & Munns, 1980; Munns & Tester, 2008). Según su respuesta a altas concentraciones salinas, las especies se han clasificado en halófitas y glicófitas, presentando diversos comportamientos y mecanismos de adaptación al estrés. Las halófitas son aquellas plantas nativas de suelos salinos con capacidad de cumplir todo su ciclo ontogénico en dicho ambiente, e incluso tener un mejor desempeño comparado con un control sin contenido de sales. Las glicófitas son aquellas plantas afectadas por la salinidad e incapaces de soportar altas concentraciones salinas como lo hacen las halófitas (Ismail & Horie, 2017; Taiz & Zeiger, 2002). La mayoría de las especies cultivadas son glicófitas (Flowers, 2004; Ismail & Horie, 2017).

Las plantas, en general, han desarrollado adaptaciones anatómicas y fisiológicas que les permiten sobrevivir y, en el caso de las halófitas, promover un mejor crecimiento bajo condiciones salinas (Acosta-Motos *et al.*, 2017). Por ejemplo, en las plantas afectadas por el estrés salino ocurren cambios anatómicos, como hojas más pequeñas y gruesas, que permiten mantener la tasa de fotosíntesis por unidad de área foliar, incluso aunque la conductancia estomática se vea reducida (Munns & Tester, 2008).

Los mecanismos por los cuales las plantas toleran la salinidad son complejos tanto desde el punto de vista genético como fisiológico (Flowers, 2004; Ismail & Horie, 2017; Munns *et al.*, 2016; Munns & Tester, 2008). Existen diversas estrategias tendientes a restaurar y mantener el equilibrio osmótico, evitar la toxicidad iónica y hacer frente al estrés oxidativo (Deinlein *et al.*, 2014; Munns & Tester, 2008; Shabala & Munns, 2017; Tang, Mu, Shao, Wang, & Brestic, 2015).

Frente al efecto osmótico producido por el exceso de sales en la solución del suelo, la estrategia para tolerar el estrés es el ajuste osmótico. Este implica la acumulación de

moléculas en el citoplasma, con el objetivo de contrarrestar la presión osmótica externa (Shabala & Munns, 2017). Puede realizarse mediante la absorción y acumulación de iones salinos procedentes del sustrato, la absorción de osmolitos orgánicos o su biosíntesis *de novo* (Blumwald, 2000; Blumwald, Aharon, & Apse, 2000; Chinnusamy, Jagendorf, & Zhu, 2005; Greenway & Munns, 1980; Hasegawa *et al.*, 2000; Shabala & Munns, 2017; Tester & Davenport, 2003). Si bien la mejor opción sería la absorción de solutos orgánicos (solutos compatibles), como azúcares, polioles, ácidos orgánicos o aminoácidos, estos no se encuentran en altas concentraciones en la solución del suelo (Munns & Tester, 2008; Shabala & Munns, 2017). Por esta razón, las plantas incrementan su síntesis, aunque este es un proceso lento y energéticamente costoso (Shabala & Munns, 2017). Los osmolitos más sintetizados son la prolina y la glicina betaína que, además de equilibrar los potenciales osmóticos, tienen función antioxidante y protectora (Deinlein *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2015). Un proceso menos costoso es la absorción de iones Na^+ y Cl^- que si bien son tóxicos, pueden compartimentalizarse en las vacuolas (Deinlein *et al.*, 2014; Munns *et al.*, 2016; Shabala & Munns, 2017; Tang *et al.*, 2015; H. Wu, 2018).

Además del ajuste osmótico, la tolerancia a estrés salino está determinada por respuestas tendientes a mantener la homeostasis celular (Munns & Tester, 2008). Los mecanismos utilizados para mantener una baja concentración de iones tóxicos, sobre todo Na^+ , en el citoplasma y de esta forma mantener una adecuada relación K^+/Na^+ , son la exclusión y la tolerancia tisular (Deinlein *et al.*, 2014; Munns *et al.*, 2016; Munns & Tester, 2008; Tang *et al.*, 2015).

La exclusión de Na^+ de la parte aérea, implica por un lado la devolución a la solución del suelo de los iones Na^+ que ingresan en forma pasiva a las raíces y, por el otro, a nivel celular, la exclusión de Na^+ del citosol y la “carga” del mismo en xilema (Deinlein *et al.*, 2014; Munns & Tester, 2008; Tang *et al.*, 2015). Para utilizar estas estrategias las plantas se valen de transportadores iónicos como el antiporter Na^+/H^+ SOS1 (*Salt Overly Sensitive 1*) de la membrana plasmática, que en forma activa elimina el Na^+ del citoplasma y permite su exclusión tanto de raíz como de hoja movilizándolo desde las células parenquimáticas a xilema (Ismail & Horie, 2017; Olías *et al.*, 2009; Shi, Quintero, Pardo, & Zhu, 2002). Los cotransportadores CCC (*cation-chloride cotransporters*) también se han propuesto como candidatos en la regulación de la concentración de iones en el xilema de las raíces (Colmenero-Flores *et al.*, 2007; Shabala, 2013). Se trata de transportadores activos que median el transporte de cationes K^+ y/o Na^+ acoplados a Cl^- en relación 1:1, por lo que, además de participar en el transporte de Cl^- , también son candidatos para la carga de Na^+ en el xilema (Shabala, 2013). Por otra parte, el transportador HKT (*High-affinity Potassium*

Transporters) actúa en forma contraria, realizando la “descarga” del xilema y restringiendo la llegada de Na^+ a las hojas (Davenport *et al.*, 2007; Rus *et al.*, 2004).

Como ya se mencionó, otra estrategia de las plantas para tolerar el estrés salino es la tolerancia tisular. Se define como la capacidad de mantener el funcionamiento de los órganos aunque existan altas concentraciones de iones salinos en los tejidos y células (Munns *et al.*, 2016). Los efectos tóxicos de los iones Na^+ y Cl^- en el metabolismo se evitan, sobre todo, mediante su secuestro o compartimentalización en las vacuolas, manteniendo bajas concentraciones en el citoplasma (Glenn, Brown, & Blumwald, 1999). De esta forma, a su vez, los iones participan en el ajuste osmótico (Shabala & Munns, 2017). El secuestro de Na^+ en la vacuola depende de la expresión y actividad del antiporter Na^+/H^+ del tonoplasto (NHX1, Na^+/H^+ eXchange) que permite intercambiar H^+ por Na^+ , utilizando gradientes de H^+ creados por las H^+ -ATPasas y las pirofosfatasa del tonoplasto (Blumwald *et al.*, 2000; Blumwald & Gelli, 1997; Chinnusamy *et al.*, 2005). Además de ser importante en la compartimentalización, NHX1 tiene un rol crucial en la regulación del pH y la homeostasis de K^+ , al que también transporta a la vacuola realizando el intercambio K^+/H^+ , y en condiciones salinas participa en la retención del K^+ intracelular (Bassil, Ohto, *et al.*, 2011; Leidi *et al.*, 2010; X. Liu *et al.*, 2017).

En la figura 3 se esquematizan los transportadores de Na^+ más importantes en la tolerancia a estrés salino.

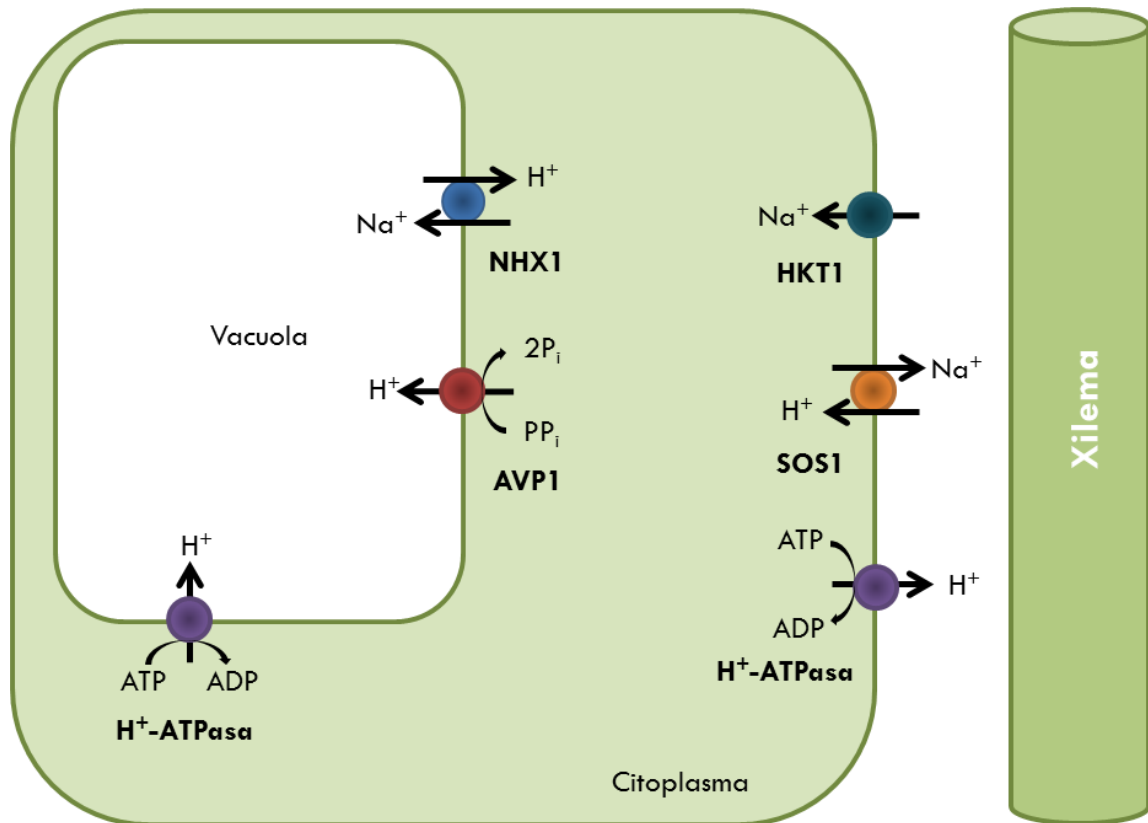


Figura 3: Esquema del transporte de sodio en plantas con estrés salino. HKT1 permite la descarga de Na^+ del xilema para evitar su ingreso en hojas jóvenes (Davenport *et al.*, 2007). SOS1 realiza lo contrario, la carga en xilema, permitiendo la exclusión valiéndose del gradiente de H^+ generado por las ATPasas de la membrana plasmática (Shi *et al.*, 2002). NHX1 se encuentra en tonoplasto y permite la compartimentalización de Na^+ en vacuola, utilizando los gradientes de H^+ generados por la ATPasa y la pirofosfatasa vacuolar (Blumwald *et al.*, 2000). Modificado del original publicado en Ismail & Horie (2017).

Además de los mecanismos mencionados existen otras estrategias que permiten que las plantas toleren la salinidad, como la detoxificación de ROS, el incremento de K^+ en el citoplasma para mejorar la relación K^+/Na^+ , y la tolerancia tisular relacionada con el Cl^- (Munns & Tester, 2008).

4. Bases genéticas de la tolerancia a la salinidad

Las adaptaciones de las plantas al estrés salino parten de procesos múltiples y complejos, que se han estudiado en numerosas especies. El conocimiento acerca de los genes que participan en la tolerancia a la salinidad es de interés para el mejoramiento genético de especies cultivadas. Sin embargo, el control genético de la tolerancia es complejo y es difícil distinguir genes críticos de aquellos relacionados con distintos estreses pero que no son responsables directos de la tolerancia a la salinidad (Munns, 2010). Sumado a esto, las

respuestas al estrés salino en plantas varían a lo largo del desarrollo y no siempre hay correlación entre las distintas etapas (Foolad, 2004; Mano & Takeda, 1997; Quesada, García-Martínez, Piqueras, Ponce, & Micol, 2002).

La identificación de genes importantes se ha realizado a través de diversas estrategias de genética directa o reversa, muchas de ellas complementarias: mapeo de QTL (*Quantitative Trait Loci*), mapeo de asociación, selección en poblaciones mutantes, transcriptómica, proteómica y metabolómica, e ingeniería genética (Arzani & Ashraf, 2016; Flowers, 2004; Munns, 2010). Los genes considerados candidatos se pueden agrupar en tres categorías: transportadores iónicos, osmolitos o solutos compatibles, y factores de transcripción (Munns, 2005, 2010).

Entre los solutos compatibles, uno de los más estudiados es la prolina. Se conoce que el gen de la enzima delta-1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa (*D5CS*), que participa en la síntesis de este osmolito, se induce en condiciones salinas en *Arabidopsis thaliana* y otras especies como arroz y colza (Hur, Jung, Lee, & An, 2004; Kubala *et al.*, 2015; Yoshida *et al.*, 1995).

También se han estudiado genes codificantes de factores de transcripción pertenecientes a distintas familias que participan en la regulación de la expresión de genes cuando existe estrés abiótico (Arzani & Ashraf, 2016), sobre todo las familias DREB/CBF y MYB (Dai *et al.*, 2007; Dubouzet *et al.*, 2003; Morran *et al.*, 2011; A. Yang, Dai, & Zhang, 2012).

Además de los mencionados anteriormente, otras secuencias génicas muy estudiadas son aquellas que codifican para transportadores iónicos, ya que participan en la exclusión, compartimentalización y movilización de iones en xilema (Arzani & Ashraf, 2016; Ismail & Horie, 2017; Munns, 2005). Entre ellos, el gen del antiporter vacuolar NHX1, cuya expresión se incrementa en condiciones salinas en diversas especies como alfalfa, maíz y cebada (Adem, Roy, Zhou, Bowman, & Shabala, 2014; Sandhu, Cornacchione, Ferreira, & Suarez, 2017; Zörb *et al.*, 2005). Asimismo, se conoce que su expresión constitutiva incrementa la tolerancia a la salinidad en *A. thaliana* (Apse, Aharon, Snedden, & Blumwald, 1999) y en numerosas especies glicófitas de interés agronómico como tomate (H. X. Zhang & Blumwald, 2001), arroz (H. Chen *et al.*, 2007), tabaco (Gouiaa, Khoudi, Leidi, Pardo, & Masmoudi, 2012), colza (H. X. Zhang, Hodson, Williams, & Blumwald, 2001) y trigo (Xue *et al.*, 2004), entre otras (referencias contenidas en P. Agarwal, Shukla, Gupta, & Jha, 2014).

Dado que NHX1 utiliza gradientes de H⁺ creados por la H⁺-ATPasa y la pirofosfatasa del tonoplasto, los genes codificadores de estas enzimas también han sido estudiados en relación a la tolerancia a la salinidad. Los niveles de transcritos de algunas subunidades de la ATPasa se incrementan con la salinidad y lo mismo ocurre con el gen de la pirofosfatasa

(Silva & Gerós, 2009). Además, la sobreexpresión de estos genes incrementa la tolerancia (Baisakh *et al.*, 2012; Gaxiola *et al.*, 2001; Schilling *et al.*, 2014; Undurraga *et al.*, 2012).

Los transportadores que participan en la exclusión de Na⁺ también se consideran determinantes. El gen *SOS1* se expresa principalmente en el ápice de la raíz y en las células parenquimáticas del xilema (Shi *et al.*, 2002) y su sobreexpresión en plantas transgénicas incrementa la tolerancia a la salinidad (Shi, Ishitani, Kim, & Zhu, 2000; Shi, Lee, Wu, & Zhu, 2003; Shi & Zhu, 2002; Q. Yang *et al.*, 2009; Yue, Zhang, Zhang, Duan, & Li, 2012). Se encontró que variedades de trigo con mayor tolerancia a la salinidad expresan este gen en mayor medida (Cuin *et al.*, 2011). Además, la pérdida de su función generó sensibilidad de las plantas en condiciones salinas no solo en especies glicófitas como tomate y arroz (El Mahi *et al.*, 2019; Olías *et al.*, 2009), sino también en la halófito *Thellungiella salsuginea* (Oh *et al.*, 2009), lo cual confirma su importancia en la tolerancia.

El transportador CCC (*cation-chloride cotransporter*) también se ha propuesto como candidato para la carga de Na⁺ en el xilema (Shabala, 2013). La expresión del gen fue identificada en las células parénquimáticas del xilema de *A. thaliana* y su silenciamiento generó una mayor acumulación de Na⁺ y Cl⁻ en parte aérea cuando las plantas se trataron con altas concentraciones de estos iones (Colmenero-Flores *et al.*, 2007).

En cuanto al transportador que realiza la descarga de Na⁺ del xilema, la funcionalidad del gen *HKT1* fue probada en arábidopsis utilizando mutantes que, en condiciones salinas, presentaron mayor sensibilidad y una alteración en el transporte de Na⁺ con acumulación del mismo en las hojas y una reducción en raíces (Davenport *et al.*, 2007; Deinlein *et al.*, 2014; Rus *et al.*, 2004). La sobreexpresión del gen en tejidos específicos de la raíz en arábidopsis generó un incremento del Na⁺ en raíz, menor transporte a parte aérea y mayor tolerancia a salinidad (Møller *et al.*, 2009; Plett *et al.*, 2010).

El conocimiento generado en las últimas décadas en relación a los mecanismos de tolerancia a la salinidad y los genes involucrados en la misma necesitan ser profundizados en relación a su regulación, a fin de que puedan aplicarse para mejorar la tolerancia a la salinidad de especies de interés agronómico.

5. La especie en estudio: *Lotus tenuis*

Lotus tenuis Waldst. & Kit. ex Willd, conocida vulgarmente como lotus, trébol pata de pájaro o lotus de hoja angosta, es una leguminosa herbácea, alógama, perenne y diploide (2n=2x=12), originaria de Europa y Asia Menor (Beuselinck, Ben Younes, & McGraw, 1986;

Falistocco & Piccirilli, 1989; Lambrechtsen, Wills, & Douglas, 1986; Miñón, Sevilla, Montes, & Fernandez, 1990; Vignolio, Fernández, & Maceira, 2002). Fue introducida en Argentina en el siglo XX. Se desconoce su forma de ingreso, pudiendo ser de manera voluntaria y no declarada a través de semillas, o involuntaria, junto con heces de animales provenientes de Europa o mezclada con semillas de otras forrajeras importadas (Montes, 1980). En el año 1980, la especie se encontraba establecida en una superficie considerable de los pastizales de la Pampa Deprimida (Montes, 1980), naturalizada en suelos heterogéneos con limitantes como salinidad, alcalinidad y baja infiltración de agua, además de inundaciones periódicas (León, 1975; León, Burkart, & Movia, 1979; Tricart, 1973).

Desde el punto de vista botánico, *L. tenuis* es una herbácea perenne que presenta crecimiento postrado sin órganos de propagación vegetativa, aunque los tallos pueden generar raíces adventicias (Beuselinck *et al.*, 1986; Miñón *et al.*, 1990; Vignolio & Fernández, 2006). A partir del primer año de crecimiento, el tallo principal forma una corona con numerosas yemas que producen ramas herbáceas de crecimiento indefinido de cuyas yemas axilares surgen ramificaciones secundarias y terciarias (Miñón *et al.*, 1990). Las hojas están formadas por cinco folíolos lanceolados, dos en la base del pecíolo y tres en la parte terminal (Miñón *et al.*, 1990; Vignolio & Fernández, 2006). La raíz es pivotante, con numerosas ramificaciones en los primeros centímetros del suelo, caracterizadas por la presencia de nódulos producidos por la infección de bacterias fijadoras de nitrógeno (Miñón *et al.*, 1990; Vignolio & Fernández, 2006).

L. tenuis presenta ciclo de crecimiento primavera-estivo-otoñal y floración indeterminada, con flores color amarillo que se agrupan de 1 a 6 en umbelas (Lambrechtsen *et al.*, 1986; Miñón *et al.*, 1990; Vignolio *et al.*, 2002). La fecundación es cruzada y entomófila, y presenta autoincompatibilidad (Lundqvist, 1993). Los frutos son vainas de color castaño oscuro, dehiscentes, y presentan un promedio de entre 12 y 16 semillas (Lambrechtsen *et al.*, 1986; Miñón *et al.*, 1990; Vignolio & Fernández, 2006; Vignolio *et al.*, 2002). Las semillas son pequeñas, lisas y de color marrón con una dureza de más de un 90 %, por lo que no germinan inmediatamente, constituyendo el banco de semillas del suelo (Miñón *et al.*, 1990).

L. tenuis es una especie con tolerancia a la salinidad y al anegamiento, que crece en un rango amplio de pH del suelo (4-9), utiliza en forma eficiente el fósforo y presenta buena calidad nutricional (Ayers, 1948; Kade, Pagani, Mendoza, Pagani, & Mendoza, 2003; Mendoza, Pagani, & Pomar, 2000; Stoffella, Posse, & Collantes, 1998; Teakle, Flowers, Real, & Colmer, 2007). En la Pampa Deprimida, es valorada por su aporte a la oferta forrajera de los sistemas ganaderos ya que presenta una buena adaptación en áreas donde

predominan gramíneas y no prosperan especies leguminosas más importantes como la alfalfa, convirtiéndola en una buena alternativa (Clua, Gimenez, & Fernandez, 1997; Pesqueira, 2008; Teakle, 2008).

6. Tolerancia a la salinidad en *Lotus tenuis*

Lotus tenuis es una especie glicófita considerada tolerante a la salinidad en estadios de germinación, plántula y planta adulta (Ayers, 1948; Grattan, Grieve, Poss, & Robinson, 2004; Rogers, Noble, & Pederick, 1997; Sanchez, Pieckenstain, Escaray, *et al.*, 2011; Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011; Schachtman & Kelman, 1991; Teakle *et al.*, 2007; Uchiya *et al.*, 2016; Vignolio & Fernández, 2006). Si bien la producción de biomasa de la especie disminuye con el aumento de la salinidad, los porcentajes de supervivencia y crecimiento de las plantas son mayores que en otras especies (Ayers, 1948; Sanchez, Pieckenstain, Escaray, *et al.*, 2011; Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011; Teakle *et al.*, 2007; Teakle, Real, & Colmer, 2006; Uchiya *et al.*, 2016). Incluso se ha encontrado un mayor crecimiento en plantas de la especie en 50 mM de NaCl respecto al control (Uchiya *et al.*, 2016), y se la ha caracterizado como halófita facultativa (Melečková, Dítě, Píš, & Galvánek, 2014).

Además, *L. tenuis* es más tolerante a la salinidad que otras especies del género *Lotus* (Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011; Uchiya *et al.*, 2016); y a la salinidad y al anegamiento que la más conocida *Lotus corniculatus* (Real, Warden, Sandral, & Colmer, 2008; Rogers *et al.*, 1997; Schachtman & Kelman, 1991; Teakle *et al.*, 2007, 2006).

Los mecanismos involucrados en la respuesta a estrés salino en la especie no están totalmente esclarecidos, aun cuando se conocen aspectos parciales. Por ejemplo: la exclusión de Cl⁻ en plantas creciendo en condiciones salinas (Pesqueira, 2008; Teakle *et al.*, 2007, 2006); la exclusión de Na⁺ y Cl⁻ en condiciones combinadas de anegamiento y salinidad (Teakle *et al.*, 2007, 2006); la acumulación de estos iones en tallos para evitar su llegada a las hojas (Escaray, Antonelli, Carrasco, & Ruiz, 2019); y la existencia de una correlación positiva entre la acumulación de Na⁺ en la parte aérea y el crecimiento, indicando un posible papel de este ion en la osmorregulación (Pesqueira, 2008). Además, se encontraron otros indicios de mecanismos de tolerancia como la selectividad para el movimiento de Na⁺ a nivel de las células corticales (Pesqueira, 2008); la acumulación de prolina, participante del ajuste osmótico, en la parte aérea (Paz *et al.*, 2012; Pesqueira, 2008) y la acumulación diferencial de glutatión reducido, indicador de la capacidad de mitigación del estrés oxidativo (Franco, 2014).

Se compararon las respuestas frente a la salinidad y a una combinación de salinidad y anegamiento de *L. tenuis* con las de la especie relacionada *L. corniculatus* (Teakle, 2008; Teakle, Amtmann, Real, & Colmer, 2010; Teakle *et al.*, 2007, 2006). Se encontró una mayor tolerancia en *L. tenuis*, que fue asociada a un menor transporte de Na^+ a parte aérea a partir de una menor carga al xilema, y a la mayor porosidad de la raíces por la formación constitutiva de aerénquima (Teakle *et al.*, 2007). En *L. tenuis*, los iones se acumularon en mayor medida en raíces respecto a la parte aérea. En el caso del Cl^- , se planteó que la restricción en el transporte de raíz a parte aérea podría ocurrir gracias a transportadores CCC. Se clonó el gen *LtCCC* (Genbank: EU727216.1) y se observó un incremento de los transcriptos en raíces bajo estrés salino (Teakle, 2008). Además, se presumió que el Na^+ se compartimentalizó en las vacuolas de las raíces a través del antiporter NHX1. En base a estos resultados, Teakle, Amtmann, *et al.* (2010) clonaron un gen del tipo NHX en *L. tenuis* (*LtNHX1*, GenBank: EU727217.1) que fue caracterizado, en base a características funcionales y moleculares, como un auténtico antiporter vacuolar de tipo 1. Se comparó la expresión de *NHX1* en *L. tenuis* y *L. corniculatus* confirmando el aumento de transcriptos en raíces de las dos especies en presencia de 200 mM de NaCl, y un aumento únicamente en *L. tenuis* en el tratamiento combinado de salinidad y anegamiento (Teakle, Amtmann, *et al.*, 2010). Se especuló que en *L. corniculatus*, el déficit de O_2 en raíces tendría por consecuencia la disminución en el contenido de ATP y, por lo tanto, impediría la actividad de las bombas H^+ -ATPasas y pirofosfatasa, disminuyendo los gradientes de protones a través de la membrana y entorpeciendo el funcionamiento eficaz del antiporter. Esto no ocurriría en *L. tenuis*, lo cual contribuiría en su tolerancia al estrés combinado.

Como se mencionó anteriormente, el antiporter vacuolar NHX1 fue ampliamente estudiado en *Arabidopsis* y otras especies. Asimismo se encontró que plantas de *L. tenuis* incrementaron la expresión del gen *NHX1* en raíces cuando fueron expuestas a una alta concentración de cloruro de sodio. Sin embargo, no existían trabajos que relacionaran la variabilidad en la tolerancia a salinidad en *L. tenuis* con variaciones en los niveles de transcriptos del antiporter, por lo que no existía información sobre la regulación de esta proteína en relación a la determinación de la tolerancia a salinidad en la especie. En este trabajo se propuso estudiar la expresión de *LtNHX1* en germoplasma de *L. tenuis* tolerante y susceptible a salinidad, en comparación con la expresión de otros genes candidatos relacionados con el transporte y la exclusión de sodio, participantes de los mecanismos de tolerancia a salinidad. También se estudiaron la ubicación subcelular y los cambios en la tolerancia al sobreexpresar el gen, con el fin de ganar conocimiento sobre las características de la secuencia *LtNHX1* y profundizar en las posibilidades de modificar su expresión para su

aplicación tecnológica en *L. tenuis* y otras especies.

7. Hipótesis

Los genotipos de *Lotus tenuis* con alta tolerancia a la salinidad basan la misma principalmente en la compartimentalización de sodio en vacuolas.

8. Objetivos

8.1. Objetivo general

Estudiar la participación del antiporter vacuolar NHX1 de *Lotus tenuis* en la tolerancia a salinidad de la especie.

8.2. Objetivos específicos

- 1) Detectar y seleccionar germoplasma de *L. tenuis* tolerante y susceptible a la salinidad en fase vegetativa juvenil.
- 2) Estudiar la expresión de *LtNHX1*, en relación a la tolerancia a salinidad de germoplasma previamente seleccionado, bajo distintas concentraciones de cloruro de sodio.
- 3) Estudiar la expresión de otros genes participantes de los mecanismos de tolerancia a salinidad relacionados con el transporte y la exclusión de sodio.
- 4) Identificar, secuenciar y realizar el análisis *in silico* de la región 5' de *LtNHX1* de un genotipo tolerante y uno susceptible a la salinidad.
- 5) Subclonar la secuencia codificante de *LtNHX1* y determinar su ubicación subcelular a través de la expresión de la proteína de fusión *LtNHX1-GFP*.
- 6) Estudiar los cambios en la tolerancia a la salinidad de *L. tenuis* y *Arabidopsis thaliana* a partir de la expresión constitutiva de la secuencia codificante de *LtNHX1*.

CAPITULO 1: SELECCIÓN DE GERMOPLASMA DE *LOTUS TENUIS* TOLERANTE Y SUSCEPTIBLE A LA SALINIDAD

INTRODUCCIÓN

La variabilidad genética se expresa en caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y fenológicos (Primack & Kang, 1989). Depende de factores ecológicos y geográficos relacionados con el lugar donde se distribuye la especie (Soule, 1973; Van Valen, 1965), así como también de su sistema reproductivo (Wright, 1949) y de la longevidad de la planta (Hamrick, 1979). El rango de variabilidad puede extenderse desde polimorfismos visibles hasta variaciones moleculares y puede detectarse entre poblaciones de una especie y entre individuos de una misma población (Briggs & Walters, 2016). La variabilidad fenotípica interpoblacional puede explicarse por factores ecológicos y geográficos (Van Valen, 1965), mientras que la variabilidad intrapoblacional puede surgir de dos fuentes principales: la plasticidad que presentan los individuos debido a pequeñas diferencias ambientales, y la divergencia genética que existe entre ellos, que depende del sistema reproductivo (Heslop-Harrison, 1964).

Lotus tenuis es una leguminosa forrajera perenne considerada tolerante a la salinidad en estadios de germinación, plántula y planta adulta (Ayers, 1948; Grattan *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 1997; Sanchez, Pieckenstain, Escaray, *et al.*, 2011; Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011; Schachtman & Kelman, 1991; Teakle *et al.*, 2007; Uchiya *et al.*, 2016; Vignolio & Fernández, 2006). Fue introducida en Argentina desde Europa en el siglo XX y está adaptada a los ambientes pastoriles de la Pampa Deprimida (Miñón *et al.*, 1990; Vignolio & Fernández, 2006). En su proceso de naturalización se generaron poblaciones y genotipos con distintos niveles de tolerancia a la alcalinidad y salinidad edáfica que caracterizan a dicha región (Pesqueira, 2008).

Numerosas evidencias demuestran la presencia de una alta variabilidad genética a distintos niveles en el germoplasma de *L. tenuis*. Se encontró variabilidad en caracteres morfofisiológicos entre y dentro de poblaciones naturales provenientes de distintos tipos de suelos de la provincia de Buenos Aires (Kade *et al.*, 2003; Mendoza *et al.*, 2000; Stoffella *et al.*, 1998), y variabilidad genética en caracteres relacionados con aspectos productivos y de establecimiento entre 35 poblaciones naturales provenientes de campos bajos de la provincia de Buenos Aires (Andrés & Rosso, 2007). Ixtáina & Mujica (2010a, 2010b) estudiaron poblaciones provenientes de diferentes sitios de la Pampa Deprimida y encontraron una mayor variabilidad fenotípica intrapoblacional que interpoblacional para caracteres relacionados con el vigor de plántula. Más recientemente, Entio & Mujica (2014) registraron la existencia de variabilidad entre y dentro de poblaciones naturales de *L. tenuis* para el carácter número de tallos en etapa vegetativa. También se encontró variabilidad en el peso seco y en caracteres relacionados con la producción de semillas entre 10 accesiones

provenientes de diferentes partes del mundo (Lane *et al.*, 2015).

Existe un número apreciable de trabajos que destacan la existencia de variabilidad en la tolerancia a la salinidad de *L. tenuis* en las etapas de germinación y crecimiento vegetativo (Franco, 2014; Ixtaina & Mujica, 2004; Paz *et al.*, 2005; Pesqueira, 2008; Schachtman & Kelman, 1991; Teakle *et al.*, 2006; Teakle, Snell, Real, Barrett-Lennard, & Colmer, 2010). La tolerancia a la salinidad puede evaluarse a través de la reducción de la producción, el rendimiento, los procesos de asimilación primaria (por ejemplo, de minerales) o la sobrevivencia (Shabala, 2017a; Taiz & Zeiger, 2002). El criterio que se utiliza depende de la especie y del nivel de estrés salino. En niveles bajos o medios se evalúa la producción, y en altos niveles, la sobrevivencia (Epstein *et al.*, 1980). En *L. tenuis*, la tolerancia se ha evaluado a nivel de genotipo y a nivel poblacional, utilizando algunos de los criterios mencionados previamente.

Ixtaina & Mujica (2004) realizaron un estudio de la tolerancia a la salinidad de 12 genotipos de la especie incrementando la concentración de NaCl semanalmente hasta llegar a 300 mM, y encontraron una disminución en el crecimiento de los mismos en el tratamiento salino respecto al control, pero sin que este afectara la sobrevivencia de las plantas. Además, determinaron que la variabilidad fue mayor bajo condiciones salinas. Pesqueira (2008) encontró una alta variabilidad en la capacidad de supervivencia a 300 mM NaCl en genotipos provenientes de una población mejorada por su capacidad para tolerar situaciones de estrés salino-alkalino (cultivar Pampa INTA). Paz *et al.* (2005) analizaron 105 genotipos en estadio de plántula provenientes de una población colectada en la Depresión del Salado y hallaron variabilidad en los días de sobrevivencia al exponerlos a 300 mM NaCl.

La variabilidad no se registró únicamente a nivel de genotipo, sino también entre poblaciones naturales, poblaciones mejoradas y cultivares. Pesqueira (2008) encontró variabilidad entre 19 accesiones de *L. tenuis* colectadas en distintos ambientes de la provincia de Buenos Aires, en relación con la disminución del crecimiento provocada por la salinidad. Teakle, Snell, *et al.* (2010), también encontraron variabilidad en la tolerancia a la salinidad entre 40 materiales provenientes de distintos lugares del mundo, con valores de C_{50} que fueron desde aproximadamente 100 a 320 mM, llamando C_{50} a la concentración de NaCl en la cual la disminución de materia seca aérea es igual al 50 % del control. También hallaron variabilidad en la tolerancia a la salinidad en la etapa de germinación, con materiales que presentaron desde 0 a 70 % de germinación después de la recuperación de una exposición a 800 mM de NaCl durante 15 días. En otro trabajo, se encontró variabilidad entre los cultivares Chajá, Larrañaga, Matrero y Angostura para la reducción del peso seco aéreo y de raíces cuando se impuso un estrés combinado de salinidad y anegamiento

(Teakle *et al.*, 2006).

Los mecanismos por los cuales *L. tenuis* tolera la salinidad no están del todo claros pero podrían estar relacionados con la exclusión de iones Na^+ y Cl^- , su compartimentalización o el ajuste osmótico, que también involucra la acumulación de iones y otros solutos en los tejidos (Pesqueira, 2008; Teakle, Amtmann, *et al.*, 2010; Teakle *et al.*, 2007; Teakle, Snell, *et al.*, 2010). La tolerancia a la salinidad es un carácter fenotípico complejo desde el punto de vista genético y fisiológico, por lo que es difícil identificar qué rasgos son los que contribuyen en mayor medida en la tolerancia (Flowers, 2004). Establecer correlaciones entre una medida de la tolerancia, por ejemplo un índice, y los caracteres que se consideran importantes, cómo el contenido de Na^+ , K^+ y Cl^- , o la relación K^+/Na^+ , puede ayudar a establecer asociaciones y a indicar qué caracteres son los más importantes en un sistema en particular (Negrão, Schmöckel, & Tester, 2017). En este sentido, estudiar el contenido de iones y la relación K^+/Na^+ en el germoplasma de *L. tenuis* evaluado en condiciones salinas permite caracterizarlo por sus respuestas fisiológicas frente al estrés y, también, establecer relaciones entre la acumulación o pérdida de iones en los distintos tejidos y la tolerancia a la salinidad. Estudios previos en la especie indicaron un incremento en los contenidos de Na^+ y Cl^- y una disminución en el de K^+ en plantas expuestas a altos contenidos de NaCl (Escaray *et al.*, 2019; Pesqueira, 2008; Sanchez, Cuevas, Chiesa, & Ruiz, 2005; Sanchez, Pieckenstain, Escaray, *et al.*, 2011; Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011; Teakle, Amtmann, *et al.*, 2010; Teakle *et al.*, 2007, 2006). Sin embargo, al analizar la correlación entre estas variables fisiológicas y la tolerancia a la salinidad los resultados resultaron contradictorios. Por ejemplo, Pesqueira (2008) encontró una correlación positiva entre la tolerancia y el contenido de Na^+ en hoja, mientras que Teakle, Snell, *et al.*, (2010) no hallaron correlación.

En los últimos años, la Unidad Integrada UNNOBA-INTA ha desarrollado diferentes investigaciones tendientes a la generación de conocimiento y a la selección de genotipos de *L. tenuis* tolerantes a la salinidad (Andrés & Rosso, 2007; Franco, 2014). Franco (2014) evaluó 23 familias de medios hermanos (FMH) del programa de mejoramiento de la especie en un estudio del comportamiento frente a la salinidad en fase vegetativa inicial y detectó variabilidad para el daño en el número de tallos vegetativos y para el daño en el peso seco aéreo. Algunas de esas FMH formaron parte de este trabajo y se estudiaron en forma más exhaustiva, considerando que el mejor parámetro para selección de germoplasma tolerante en especies forrajeras es la producción de materia seca y otros caracteres relacionados con la misma, tanto bajo condiciones control como bajo condiciones estresantes (Ixtaina & Mujica, 2004; Pesqueira, 2008).

Hipótesis

1. Existe variabilidad en la tolerancia a la salinidad en germoplasma de *Lotus tenuis* en la fase vegetativa juvenil.
2. La variabilidad fenotípica en la tolerancia a la salinidad se relaciona con la alteración de la acumulación de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ en raíz, tallo y hoja.

Objetivos

Objetivo general

Detectar y seleccionar germoplasma de *Lotus tenuis* tolerante y susceptible a la salinidad en fase vegetativa juvenil.

Objetivos específicos

- Evaluar la tolerancia a estrés salino en fase vegetativa juvenil de distintos tipos de materiales de *L. tenuis* a partir de parámetros de crecimiento.
- Determinar el contenido de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ en raíz, tallo y hoja en FMH de *L. tenuis* y relacionarlo con la tolerancia a la salinidad.
- Seleccionar germoplasma con comportamiento contrastante a la salinidad (tolerante y susceptible).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Evaluación de la tolerancia a la salinidad de familias de medios hermanos (FMH) de *L. tenuis*.

1.1. Material vegetal

Se evaluaron 15 familias de medios hermanos (FMH) de *L. tenuis* obtenidas por el programa de mejoramiento genético de la especie de la Unidad Integrada UNNOBA-INTA. Estas provienen de poblaciones naturalizadas colectadas entre los años 2004 y 2006 en campos bajos de la Provincia de Buenos Aires que fueron caracterizadas morfo-fisiológicamente y por su productividad (Andrés & Rosso, 2007). Algunas de estas poblaciones fueron evaluadas y luego seleccionadas por su respuesta al estrés salino, con el propósito de detectar germoplasma tolerante, de elevada productividad de forraje y de semilla (Pesqueira, 2008). A partir de dichos estudios se conformaron lotes de policruzamiento de poblaciones tolerantes y susceptibles a la salinidad y se obtuvieron FMH. Se seleccionaron 23 FMH por su producción de semilla que fueron evaluadas posteriormente en un estudio del comportamiento frente al estrés salino en fase vegetativa inicial y en germinación (Franco, 2014). En el ensayo 1 del presente trabajo, se estudiaron 15 de estas FMH en forma más exhaustiva (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: FMH seleccionadas para el estudio y su comportamiento previo frente a NaCl.

Identificación	FMH	Comportamiento en 150 mM NaCl según Franco (2014)
1	325	Tolerante
2	447	Susceptible
3	490	Susceptible
4	685	Susceptible
5	690	Tolerante
6	691	Tolerante
7	1146	Susceptible
8	1193	Tolerante
9	1195	Tolerante
10	1894	Susceptible
11	1897	Tolerante
12	2241	Susceptible
13	2243	Susceptible
14	2248	Susceptible
15	2297	Susceptible

Con el objetivo de confirmar los resultados del ensayo 1, se seleccionaron las FMH 325, 447, 1193, 1894 y 2248 por su comportamiento contrastante frente a salinidad y se volvieron a evaluar en el ensayo 2. Para los dos estudios se utilizó la misma metodología.

1.2. Diseño experimental y parámetros de crecimiento evaluados

Las FMH se evaluaron en invernáculo en condiciones semi-controladas mediante un sistema hidropónico (Figura 1.1) en un diseño en bloques completos aleatorizados (DBCA) con tres repeticiones, y fueron expuestas a tres tratamientos salinos: 0 (Control), 150 y 300 mM NaCl.

La temperatura media promedio durante el ensayo 1 fue de 20,2 °C, con una mínima de 13,3 °C y una máxima de 27,7 °C. En el ensayo 2 la temperatura media promedio fue de 17,7 °C, con una mínima de 9,7 °C y una máxima de 26 °C.

Cada FMH estuvo representada por 10 genotipos (plántulas) por cada tratamiento salino en cada repetición. Las semillas se escarificaron y se sembraron en tierra fértil en bandejas de germinación (*speedlings*). Cuando las raíces de las plántulas alcanzaron la longitud adecuada para alcanzar la solución, se encastraron en placas perforadas de poliestireno expandido ubicadas sobre macetas tipo jardinera que contenían seis litros de solución nutritiva Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). Una vez que las plántulas desarrollaron entre tres y cuatro hojas nuevas en la solución nutritiva, se agregó NaCl. Las concentraciones finales de NaCl en cada tratamiento se alcanzaron de forma gradual para evitar el *shock* osmótico y lograr una correcta aclimatación de las plantas al estrés. Las macetas correspondientes al tratamiento control se mantuvieron durante todo el ensayo con solución Hoagland sin agregado de NaCl.

Las soluciones nutritivas contenidas en las macetas fueron debidamente oxigenadas mediante aireadores marca Atman AT-702 y se controlaron las condiciones de evaporación, renovando las soluciones cada siete días.

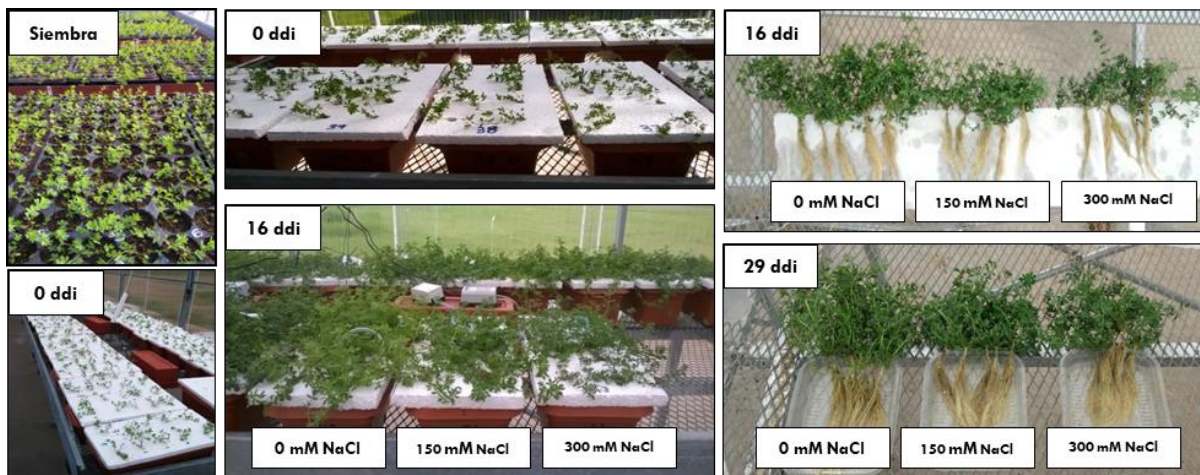


Figura 1.1: Ensayo hidropónico para evaluar la tolerancia a la salinidad de 15 FMH de *L. tenuis*. ddi: días de iniciados los tratamiento salinos.

Se muestrearon cinco plantas por maceta a los 16 y 29 días de iniciados los tratamientos salinos (ddi) y se evaluaron: número de tallos vegetativos (NTV), longitud de tallo principal (LTP, cm), longitud de entrenudos del tallo principal (ETP, cm), longitud de raíz (LR, cm), peso fresco aéreo (PFA, g), peso seco aéreo (PSA, g) y radicular (PSR, g) y peso seco total (PST, g).

Para cada variable se estimó la tolerancia a la salinidad a partir de la siguiente relación:

$$\text{Índice de tolerancia} = xi/Xc$$

Donde, xi= valor de cada plántula en solución salina; y Xc= media del control.

Una vez estimado el índice de tolerancia, las variables fueron definidas como: índice de tolerancia del número de tallos vegetativos (ITNTV), índice de tolerancia de la longitud de tallo principal (ITLTP), índice de tolerancia de la longitud de entrenudos del tallo principal (ITETP), índice de tolerancia de la longitud de raíz (ITLR), índice de tolerancia del peso fresco aéreo (ITPFA), índice de tolerancia del peso seco aéreo (ITPSA), índice de tolerancia del peso seco radicular (ITPSR) e índice de tolerancia del peso seco total (ITPST).

Además, se calculó la tasa de crecimiento relativo (RGR) para PST según lo publicado por Hoffman & Poorter (2002):

$$RGR = \frac{\overline{\ln PST2} - \overline{\ln PST1}}{t2 - t1}$$

Donde $\overline{\ln PST2}$ es la media de los logaritmos naturales de los pesos secos de las plantas en la segunda fecha de evaluación, $\overline{\ln PST1}$ es la media de los logaritmos naturales de los pesos secos en la primera fecha, t_2 corresponde a la segunda fecha expresada en días y t_1 a la primera fecha. Se consideró el día de inicio de los tratamientos salinos (0 ddi) como el

primer momento de evaluación, por lo que además de los datos a 16 y 29 ddi, se evaluó PST en cinco plantas por FMH y repetición previo al comienzo de los tratamientos.

1.3. Determinación del contenido de iones Na^+ , K^+ y Cl^- en hojas, tallos y raíces

Al finalizar el ensayo 1 se midió el contenido de Na^+ , K^+ y Cl^- ($\mu\text{Moles g}^{-1}$ Peso Seco) en muestras de raíces, tallos y hojas de las FMH 325, 447, 1193, 1894 y 2248 tomadas a los 0, 16 y 29 días desde el inicio de los tratamientos (0, 150 y 300 mM NaCl). Las raíces se enjuagaron mediante dos inmersiones de 10 segundos en solución de CaNO_3 10 mM con adición de sorbitol en concentraciones iso-osmóticas para cada tratamiento. Tallos y hojas se enjuagaron en agua bidestilada. Todas las muestras se secaron a 60 °C hasta peso constante. Para minimizar la variabilidad entre plantas, se combinaron las mediciones de 5 plantas por repetición y por fecha de corte para cada FMH y tratamiento salino.

Las determinaciones de K^+ y Na^+ se realizaron con un fotómetro de llama Corning M410 a partir de extractos de HNO_3 0,5 M que se prepararon adicionando 10 ml de ácido a aproximadamente 100 mg de tejido, cuyo peso exacto fue registrado, e incubando los mismos a 80 °C durante una hora. Sobre la misma extracción se determinó el contenido de Cl^- por colorimetría a través del método del “ferricianuro” (Munns, Wallace, Teakle, & Colmer, 2010) utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 (Figura 1.2).

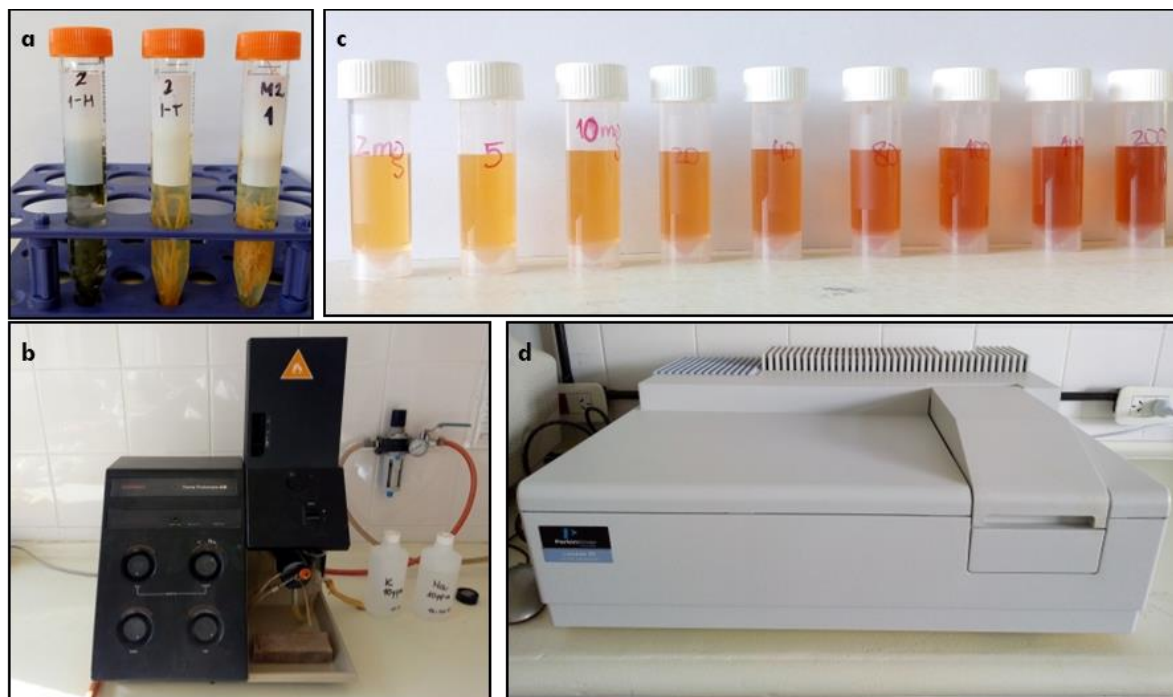


Figura 1.2: Determinación del contenido de iones en FMH de *L. tenuis* creciendo en condiciones salinas.

a. Extractos de HNO_3 0,5 M de muestras de hojas, raíces y tallos. **b.** Fotómetro de llama Corning M410 utilizado para realizar las determinaciones de Na^+ y K^+ . **c.** Curva colorimétrica de Cl^- . **d.** Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 utilizado para las determinaciones de Cl^- .

Los datos obtenidos se extrapolaron a curvas de dilución estándar y se obtuvo la concentración de cada ion ($\mu\text{g/ml}$) en los extractos realizados. Para obtener el contenido de cada ion en cada muestra expresado en μMoles por gramo de peso seco se realizó la siguiente conversión:

$$C (\mu\text{Moles g}^{-1}\text{Peso Seco}) = \frac{[I] * V}{P * M}$$

Donde $[I]$ es la concentración del ion en el extracto ($\mu\text{g/ml}$), V es el volumen del extracto (10 ml), P es el peso exacto registrado de la muestra (g) y M es la masa molar del ion evaluado (Na^+ : 22,990 g/mol; K^+ : 39,098 g/mol; Cl^- : 35,453 g/mol).

Además, se calcularon tasas de absorción de iones (T_a) entre 0 ddi y 16 ddi, y entre 0 ddi y 29 ddi, según lo publicado por Williams (1948):

$$T_a = \frac{\overline{\ln PSR_2} - \overline{\ln PSR_1}}{t_2 - t_1} \times \frac{[T]_2 - [T]_1}{PSR_2 - PSR_1}$$

Donde: $\overline{\ln PSR_2}$ es la media de los logaritmos naturales de los pesos secos de raíz de las plantas en la segunda fecha de evaluación (16 o 29 ddi), $\overline{\ln PSR_1}$ es la media de los logaritmos naturales de los pesos secos de raíz en la primera fecha (0 ddi), t_2 corresponde a la segunda fecha expresada en días, t_1 a la primera fecha, $[T]_2$ es el contenido total del ion evaluado en la segunda fecha, $[T]_1$ es el contenido total del ion evaluado en la primera fecha, PSR_2 es el peso seco de raíz en la segunda fecha y PSR_1 en la primera fecha.

También se calcularon las tasas de transporte de iones (T_t):

$$T_t = \frac{\overline{\ln PSR_2} - \overline{\ln PSR_1}}{t_2 - t_1} \times \frac{[PA]_2 - [PA]_1}{PSR_2 - PSR_1}$$

Donde: $\overline{\ln PSR_2}$ es la media de los logaritmos naturales de los pesos secos de raíz de las plantas en la segunda fecha de evaluación (16 o 29 ddi), $\overline{\ln PSR_1}$ es la media de los logaritmos naturales de los pesos secos de raíz en la primera fecha (0 ddi), t_2 corresponde a la segunda fecha expresada en días, t_1 a la primera fecha, $[PA]_2$ es el contenido del ion en parte aérea (tallo y hoja) evaluado en la segunda fecha, $[PA]_1$ es el contenido del ion en parte aérea evaluado en la primera fecha, PSR_2 es el peso seco de raíz en la segunda fecha y PSR_1 en la primera fecha.

1.4. Análisis de la información

Se utilizó el *software* InfoStat en su interfaz con R (Di Rienzo *et al.*, 2017). Se ajustaron modelos mediante los módulos de modelos lineales generales y mixtos (MLM) y de modelos lineales generalizados mixtos (MLGM) según la distribución de la variable analizada. Para

todas las variables se realizó la prueba estadística W de Shapiro-Wilk sobre los residuales. Se aplicó el *test* de Bartlett para comprobar la homogeneidad de las varianzas y el *test* de no-aditividad de Tukey para comprobar la aditividad del modelo. En los casos en los que fue necesario, se ajustaron modelos para heterogeneidad de varianzas. Se realizaron correlaciones fenotípicas y análisis de componentes principales utilizando la matriz de correlación de las variables.

1.4.1. Análisis de los parámetros de crecimiento

1.4.1.1. Variabilidad fenotípica

Para conocer y determinar la variabilidad presente entre las familias de *L. tenuis* se aplicó análisis de variancia (ANOVA) para todas las variables evaluadas. El modelo estadístico lineal utilizado fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + \beta_l + \tau_i + \delta_j + \gamma_k + (\tau\delta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\delta\gamma)_{jk} + (\tau\delta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde: Y_{ijkl} es la observación debido a la *i*-ésima FMH del *l*-ésimo bloque, en el *j*-ésimo tratamiento salino y en la *k*-ésima fecha de corte; μ representa la media general; β_l es el efecto del *l*-ésimo bloque y se considera aleatorio; τ_i es el efecto de la *i*-ésima FMH; δ_j es el efecto del *j*-ésimo tratamiento salino; γ_k es el efecto de la *k*-ésima fecha de corte; $(\tau\delta)_{ij}$ es el efecto de la interacción entre la *i*-ésima FMH y el *j*-ésimo tratamiento salino; $(\tau\gamma)_{ik}$ es el efecto de la interacción entre la *i*-ésima FMH y la *k*-ésima fecha de corte; $(\delta\gamma)_{jk}$ es el efecto de la interacción entre el *j*-ésimo tratamiento salino y la *k*-ésima fecha de corte; $(\tau\delta\gamma)_{ijk}$ es el efecto de la interacción entre la *i*-ésima FMH, el *j*-ésimo tratamiento salino y la *k*-ésima fecha de corte; y ε_{ijkl} es el término de error de la *ijkl* observación debido a la variación ambiental.

En los casos en los que se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$), se aplicó la prueba de comparaciones múltiples DGC (Di Rienzo, Guzmán, & Casanoves, 2002), con el objetivo de detectar aquellas familias, tratamientos o fechas que presentaran diferencias significativas en la media de los caracteres evaluados.

1.4.1.2. Asociación lineal

La asociación entre dos caracteres que pueden ser directamente observados es la correlación de valores fenotípicos o correlación fenotípica. Se estimaron los coeficientes de correlación de Pearson utilizando Infostat. Se trata de una medida de la magnitud de la asociación lineal entre dos variables que no depende de las unidades de medida de las mismas. Para las variables *j*-ésima y *k*-ésima se define como:

$$r_{jk} = \frac{S_{jk}}{\sqrt{S_j^2 S_k^2}}$$

Donde S_{jk} es la covariancia entre la variable j y la variable k , y S_j^2 y S_k^2 son las variancias de las variables j y k respectivamente.

1.4.1.3. Análisis de componentes principales

Con los datos obtenidos de las variables, se aplicó análisis de componentes principales (ACP) para condensar la información obtenida en unas pocas componentes principales que expliquen la mayor variabilidad posible. El mismo se realizó mediante el módulo Análisis de Componentes Principales del paquete estadístico InfoStat, utilizando la matriz de correlación de las variables.

1.4.2. Análisis del contenido de iones

Se analizó la variabilidad fenotípica para el contenido de Na^+ , K^+ y Cl^- en cada tejido (hoja, raíz y tallo) y para la relación K^+/Na^+ , que se considera un indicador de tolerancia a la salinidad (Shabala & Cuin, 2007; Tester & Davenport, 2003). Se realizó ANOVA de tres factores: familia, tejido y la combinación entre fechas de corte y tratamientos salinos, que constituyeron un único factor. El modelo lineal utilizado fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + \beta_l + \tau_i + \delta_j + \gamma_k + (\tau\delta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\delta\gamma)_{jk} + (\tau\delta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde: Y_{ijkl} es la observación debido a la i -ésima FMH del l -ésimo bloque, en la j -ésima combinación fecha-tratamiento salino y en el k -ésimo tejido; μ representa la media general; β_l es el efecto del l -ésimo bloque y se considera aleatorio; τ_i es el efecto de la i -ésima FMH; δ_j es el efecto de la j -ésima combinación fecha-tratamiento salino; γ_k es el efecto del k -ésimo tejido; $(\tau\delta)_{ij}$ es el efecto de la interacción entre la i -ésima FMH y la j -ésima combinación fecha-tratamiento salino; $(\tau\gamma)_{ik}$ es el efecto de la interacción entre la i -ésima FMH y el k -ésimo tejido; $(\delta\gamma)_{jk}$ es el efecto de la interacción entre la j -ésima combinación fecha-tratamiento salino y el k -ésimo tejido; $(\tau\delta\gamma)_{ijk}$ es el efecto de la interacción entre la i -ésima FMH, la j -ésima combinación fecha-tratamiento salino y el k -ésimo tejido; y ε_{ijkl} es el término de error de la $ijkl$ observación debido a la variación ambiental.

Se aplicó la prueba de comparaciones múltiples DGC cuando existieron diferencias significativas.

Mediante el coeficiente de correlación de Pearson, se analizó la posible correlación entre el contenido de cada ion y la relación K^+/Na^+ y el efecto de la salinidad sobre el peso seco de parte aérea y total en los distintos tratamientos salinos, estimado mediante los índices de

tolerancia (ITPSA, ITPST).

Para las tasas de absorción y transporte de iones, se realizó ANOVA de dos factores según el siguiente modelo lineal:

$$Y_{itk} = \mu + \beta_k + \tau_i + \gamma_t + (\gamma\tau)_{it} + \varepsilon_{itk}$$

Donde: Y_{itk} es la observación de la i -ésima FMH del k -ésimo bloque en el t -ésimo tratamiento, μ representa la media general, β_k es el efecto del k -ésimo bloque y se considera aleatorio; τ_i es el efecto de la i -ésima FMH, γ_t es el efecto del t -ésimo tratamiento, $(\gamma\tau)_{it}$ es el efecto de la interacción entre la i -ésima FMH y el t -ésimo tratamiento, y ε_{itk} es el término de error de la itk observación.

2. Evaluación de la respuesta de clones de *L. tenuis* al estrés salino impuesto por *shock*

2.1. Material vegetal

Se sembraron 20 genotipos de cada una de las cinco FMH que se habían seleccionado a partir del ensayo 1, y habían sido evaluadas en el ensayo 2. Posteriormente se incorporaron 17 genotipos del cultivar Pampa INTA con la finalidad de ampliar la base genética. Todos los genotipos se mantuvieron en invernáculo a fin de propagarlos vegetativamente mediante esquejes nodales (Figura 1.3), para las evaluaciones que se describen continuación.



Figura 1.3: Clones de un genotipo de *L. tenuis* propagado mediante esquejes nodales.

2.2. Ensayos realizados con genotipos propagados de forma vegetativa

2.2.1. Ensayo 3: Evaluación de la tolerancia a salinidad de genotipos provenientes de cinco FMH

Se evaluaron los 100 genotipos provenientes de las cinco FMH selectas, con la finalidad de realizar un cribado inicial de su tolerancia a salinidad. El ensayo se realizó en condiciones controladas en cámara de crecimiento ($T^a \cong 25 \text{ }^\circ\text{C}$) con un fotoperíodo de 16 horas de luz, en un DBCA con dos repeticiones y tres tratamientos: 0 (control), 200 y 400 mM NaCl. Cada genotipo estuvo representado por 12 clones, tres en cada tratamiento y repetición, que fueron trasplantados, luego de 21 días desde la propagación, a macetas conteniendo arena y perlita (1:1 V/V). Las plántulas se regaron por capilaridad adicionando NaCl a la solución nutritiva Hoagland, sin realizar aclimatación al estrés. A los 21 días de iniciados los tratamientos se evaluaron longitud del tallo principal (LTP, cm) y peso seco total (PST, mg) y se estimaron sus índices de tolerancia (ITLTP y ITPST respectivamente) utilizando la misma relación que para los ensayos con FMH. Se registró la sobrevivencia como el número de plantas vivas de cada genotipo a los 21 días de ensayo, considerando la muerte de las plantas cuando existió pérdida total de turgencia.

2.2.2. Ensayo 4: Evaluación de la tolerancia a salinidad de genotipos seleccionados y genotipos del cultivar Pampa INTA

Se evaluaron 19 genotipos seleccionados por destacarse en su tolerancia o susceptibilidad a la salinidad en el ensayo anterior y 17 genotipos del cultivar Pampa INTA. El ensayo se realizó en cámara de crecimiento en un diseño completamente aleatorizado (DCA) aplicando los mismos tratamientos que en el ensayo anterior. Cada genotipo estuvo representado por tres clones en cada tratamiento. Se evaluó PST (mg) a 28 días desde el inicio de los tratamientos y se estimó ITPST. Se registró diariamente la mortalidad, obteniendo la sobrevivencia de cada planta en días desde el inicio de los tratamientos salinos.

2.2.3. Ensayo 5: Evaluación de la tolerancia a salinidad de ocho genotipos seleccionados en el ensayo anterior

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos previos, se seleccionaron ocho genotipos (cinco pertenecientes a las distintas FMH y tres del cultivar Pampa INTA) con comportamiento contrastante en condiciones salinas. Se repitió la evaluación siguiendo la misma metodología que en el ensayo anterior, registrando la sobrevivencia (días), PST (mg) e ITPST a 28 días desde el inicio de los tratamientos. Cada genotipo estuvo representado por 5 clones por tratamiento.

2.3. Análisis de la información

Se utilizó el *software* InfoStat en su interfaz con R (Di Rienzo *et al.*, 2017). Se ajustaron modelos mediante los módulos de modelos lineales generales y mixtos (MLM) y de modelos lineales generalizados mixtos (MLGM) según la distribución de la variable analizada. Para todas las variables se realizó la prueba estadística W de Shapiro-Wilk sobre los residuales. Se aplicó el *test* de Bartlett para comprobar la homogeneidad de las varianzas y el *test* de no-aditividad de Tukey para comprobar la aditividad del modelo. En los casos en los que fue necesario, se ajustaron modelos para heterogeneidad de varianzas. Se realizaron análisis de componentes principales utilizando la matriz de correlación de las variables.

2.3.1. Análisis univariado

Para las variables PST, LTP, ITPST e ITLTP en el ensayo 3 se aplicó análisis de variancia (ANOVA) utilizando el siguiente modelo estadístico lineal:

$$Y_{itk} = \mu + \beta_k + \tau_i + \gamma_t + (\gamma\tau)_{it} + \varepsilon_{itk}$$

Donde: Y_{itk} es la observación del i -ésimo genotipo en el t -ésimo tratamiento, μ representa la media general, β_k es el efecto del k -ésimo bloque y se consideró aleatorio, τ_i es el efecto del i -ésimo genotipo, γ_t es el efecto del t -ésimo tratamiento, $(\gamma\tau)_{it}$ es el efecto de la interacción entre el i -ésimo genotipo y el t -ésimo tratamiento, y ε_{itk} es el término de error de la itk observación.

Para las variables en los ensayos 4 y 5, se realizó ANOVA según el siguiente modelo:

$$Y_{itk} = \mu + \tau_i + \gamma_t + (\gamma\tau)_{it} + \varepsilon_{itk}$$

Donde: Y_{itk} es la observación del i -ésimo genotipo en el t -ésimo tratamiento, μ representa la media general, τ_i es el efecto del i -ésimo genotipo, γ_t es el efecto del t -ésimo tratamiento, $(\gamma\tau)_{it}$ es el efecto de la interacción entre el i -ésimo genotipo y el t -ésimo tratamiento, y ε_{itk} es el término de error de la itk observación.

La Sobrevivencia se analizó en forma univariada en los ensayos 4 y 5, considerando únicamente los datos del tratamiento de 400 mM NaCl, por lo que se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ik} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ik}$$

Donde: Y_{ik} es la observación del i -ésimo genotipo, μ representa la media general, τ_i es el efecto del i -ésimo genotipo, y ε_{ik} es el término de error de la ik observación.

Adicionalmente, en el ensayo 4 se agruparon los genotipos por origen (FMH del programa

de mejoramiento de la especie o cultivar Pampa INTA) y se realizó la prueba Mann-Whitney U de diferencia entre dos medias para las variables ITPST y Supervivencia.

2.3.2. Análisis de componentes principales

Se realizaron análisis de componentes principales utilizando la matriz de correlación de ITLTP, ITPST y Supervivencia en el primer ensayo, y de ITPST y Supervivencia en los otros dos.

RESULTADOS

1. Tolerancia a la salinidad de familias de medios hermanos (FMH) de *L. tenuis*

1.1. Efecto de los tratamientos salinos sobre los parámetros de crecimiento

En los dos ensayos realizados con FMH, al considerar el comportamiento promedio de las mismas para cada una de las variables evaluadas, se observó que la salinidad produjo una reducción del crecimiento de las plantas (Tablas 1.2 y 1.3). Esta reducción respecto del control fue mayor cuando las plantas se expusieron a 300 mM NaCl que cuando se expusieron a 150 mM NaCl. Además, se registró interacción significativa Tratamiento*Fecha para todas las variables, existiendo una mayor reducción en la segunda fecha de corte.

En el Ensayo 1, las variables PSA, PSR y PST no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos salinos a los 16 ddi, pero sí existieron diferencias entre estos tratamientos y el control (Tabla 1.2). El resto de las variables presentaron diferencias entre los tres tratamientos. En la segunda fecha de evaluación todas las variables presentaron diferencias entre los tres tratamientos.

Tabla 1.2: Efecto de los tratamientos salinos sobre las variables evaluadas en el Ensayo 1 en 15 FMH de *Lotus tenuis*. Medias \pm errores estándar y porcentajes de reducción de las variables respecto del control por efecto de la concentración salina y del tiempo.

Variable (unidad)	Tiempo (ddi*)	Tratamientos (mM NaCl)			Reducción	
		0	150	300	R150 (%)	R300 (%)
NR (n°)	16	20,75 \pm 0,44 D	18,42 \pm 0,35 E	17,10 \pm 0,35 F	11,23	17,59
	29	41,91 \pm 0,85 A	31,86 \pm 0,67 B	27,68 \pm 0,61 C	23,98	33,95
LTP (cm)	16	25,79 \pm 0,48 C	21,83 \pm 0,39 E	20,25 \pm 0,37 F	15,35	21,48
	29	45,51 \pm 0,74 A	32,59 \pm 0,60 B	23,75 \pm 0,46 D	28,39	47,81
ETP (cm)	16	1,63 \pm 0,02 C	1,43 \pm 0,02 D	1,36 \pm 0,02 F	12,27	16,56
	29	2,34 \pm 0,03 A	1,76 \pm 0,03 B	1,42 \pm 0,02 D	24,79	39,32
LR (cm)	16	23,72 \pm 0,30 B	19,59 \pm 0,26 D	18,10 \pm 0,25 E	17,41	23,69
	29	27,35 \pm 0,33 A	20,90 \pm 0,29 C	17,42 \pm 0,23 F	23,58	36,31
PFA (g)	16	9,28 \pm 0,27 C	6,46 \pm 0,16 D	5,02 \pm 0,15 E	30,39	45,91
	29	24,35 \pm 0,66 A	15,45 \pm 0,45 B	9,37 \pm 0,28 C	36,55	61,52
PSA (g)	16	1,09 \pm 0,03 D	0,91 \pm 0,02 E	0,84 \pm 0,02 E	16,51	22,94
	29	3,24 \pm 0,08 A	2,21 \pm 0,06 B	1,58 \pm 0,05 C	31,79	51,23
PSR (g)	16	0,46 \pm 0,01 D	0,40 \pm 0,01 E	0,42 \pm 0,01 E	13,04	8,70
	29	0,99 \pm 0,02 A	0,65 \pm 0,02 B	0,53 \pm 0,02 C	34,34	46,46
PST (g)	16	1,55 \pm 0,04 D	1,31 \pm 0,03 E	1,26 \pm 0,03 E	15,48	18,71
	29	4,27 \pm 0,10 A	2,87 \pm 0,08 B	2,10 \pm 0,06 C	32,79	50,82

*días de iniciados los tratamientos; R150: Reducción en 150 mM NaCl respecto al control; R300: Reducción en 300 mM NaCl respecto al control. Letras distintas entre filas y entre columnas en cada variable indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el Ensayo 2 las plantas presentaron un menor crecimiento en comparación al ensayo anterior debido a que las condiciones ambientales fueron diferentes, con una temperatura media menor y una amplitud térmica mayor. Si bien también existió reducción del crecimiento debido a la salinidad, esta se observó en mayor medida a los 29 ddi (Tabla 1.3). La única variable que presentó diferencias entre los tres tratamientos en la primera fecha de evaluación fue LR. Para algunas de las variables (NR, PFA, PSR y PST), a los 16 ddi no existieron diferencias significativas entre el control y el tratamiento de 150 mM, pero sí existieron diferencias entre estos tratamientos y 300 mM. Por otro lado, para las variables LTP, ETP y PSA, solo se encontraron diferencias entre tratamientos a los 29 ddi.

Tabla 1.3: Efecto de los tratamientos salinos sobre las variables evaluadas en el Ensayo 2 en 5 FMH de *Lotus tenuis*. Medias \pm errores estándar y porcentajes de reducción de las variables respecto del control por efecto de la concentración salina y del tiempo.

Variable (unidad)	Tiempo (ddi*)	Tratamientos (mM NaCl)			Reducción	
		0	150	300	R150 (%)	R300 (%)
NR (n°)	16	8,82 \pm 0,35 D	8,76 \pm 0,31 D	7,01 \pm 0,24 E	0,68	20,52
	29	16,26 \pm 0,58 A	13,27 \pm 0,42 B	10,00 \pm 0,39 C	18,39	38,50
LTP (cm)	16	8,46 \pm 0,22 C	8,20 \pm 0,19 C	7,82 \pm 0,18 C	3,07	7,57
	29	11,33 \pm 0,44 A	9,34 \pm 0,32 B	7,91 \pm 0,19 C	17,56	30,19
ETP (cm)	16	0,90 \pm 0,02 A	0,90 \pm 0,02 A	0,95 \pm 0,02 A	0,00	-5,56
	29	0,92 \pm 0,03 A	0,80 \pm 0,02 B	0,88 \pm 0,03 A	13,04	4,35
LR (cm)	16	13,61 \pm 0,32 C	10,59 \pm 0,25 D	8,85 \pm 0,24 E	22,19	34,97
	29	24,05 \pm 0,53 A	16,16 \pm 0,29 B	9,63 \pm 0,22 D	32,81	59,96
PFA (g)	16	0,95 \pm 0,06 D	1,10 \pm 0,07 D	0,76 \pm 0,04 E	-15,79	20,00
	29	3,10 \pm 0,21 A	2,50 \pm 0,15 B	1,30 \pm 0,07 C	19,35	58,06
PSA (g)	16	0,15 \pm 0,01 D	0,17 \pm 0,01 D	0,14 \pm 0,01 D	-13,33	6,67
	29	0,45 \pm 0,03 A	0,37 \pm 0,02 B	0,24 \pm 0,01 C	17,78	46,67
PSR (g)	16	0,13 \pm 0,01 D	0,12 \pm 0,01 D	0,10 \pm 0,01 E	7,69	23,08
	29	0,40 \pm 0,02 A	0,25 \pm 0,01 B	0,16 \pm 0,01 C	37,50	60,00
PST (g)	16	0,28 \pm 0,02 D	0,29 \pm 0,02 D	0,24 \pm 0,01 E	-3,57	14,29
	29	0,85 \pm 0,05 A	0,62 \pm 0,03 B	0,39 \pm 0,02 C	27,06	54,12

*días de iniciados los tratamientos; R150: Reducción en 150 mM NaCl respecto al control; R300: Reducción en 300 mM NaCl respecto al control. Letras distintas entre filas y entre columnas en cada variable indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La disminución en el crecimiento con el incremento de la concentración salina también se observó al realizar análisis de componentes principales utilizando como criterios de clasificación las FMH y los tratamientos (Figuras 1.4 y 1.5).

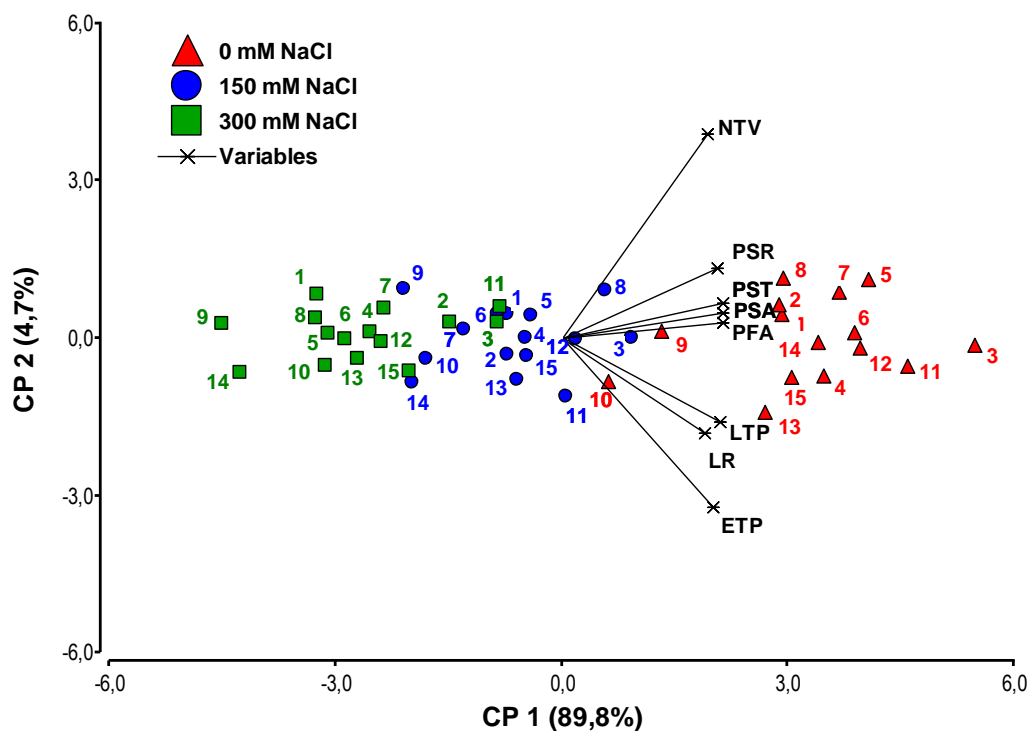


Figura 1.4: Análisis de componentes principales de los parámetros de crecimiento evaluados en el ensayo 1, utilizando como criterios de clasificación 15 FMH y tres tratamientos.

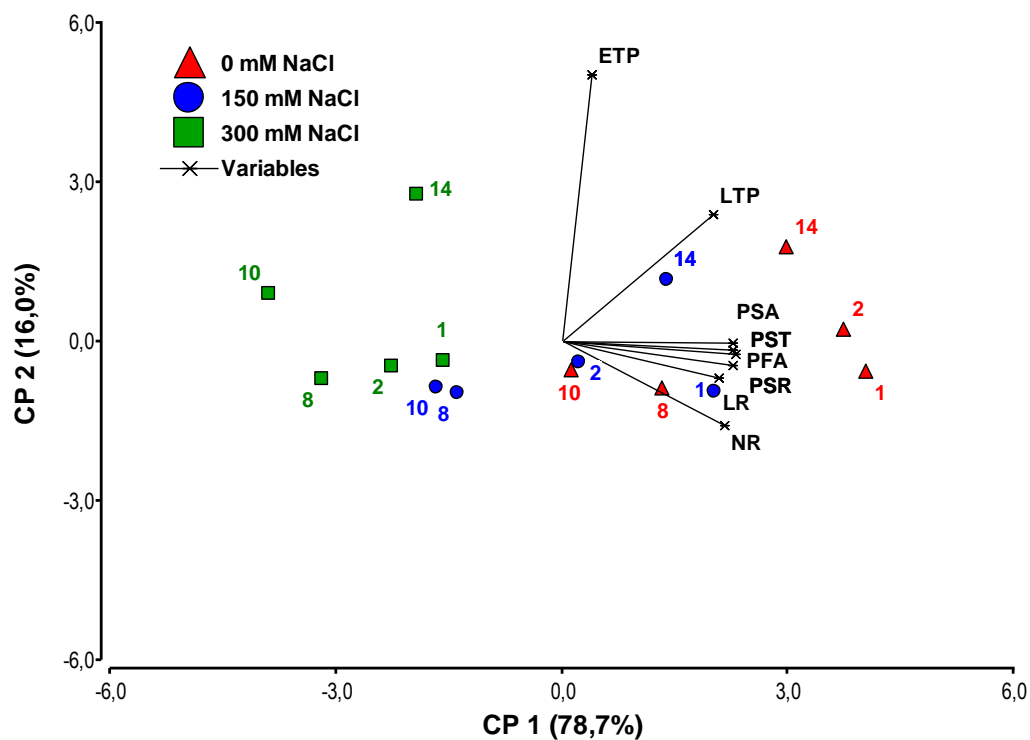


Figura 1.5: Análisis de componentes principales de los parámetros de crecimiento evaluados en el ensayo 2, utilizando como criterios de clasificación 5 FMH y tres tratamientos.

A pesar de las elevadas concentraciones salinas aplicadas, las plantas continuaron creciendo a través del tiempo, aunque a una tasa menor. El total de los genotipos evaluados sobrevivieron a las dos experiencias.

1.2. Ensayo 1: Respuesta de 15 FMH a la salinidad

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) y diferencias significativas entre FMH para todas las variables en estudio (Tabla 1.4). Existió interacción significativa entre FMH y tratamiento para número de tallos vegetativos (NTV), longitud de raíz (LR), peso fresco aéreo (PFA) y peso seco aéreo (PSA). También se encontró interacción significativa entre FMH y fecha de corte para los IT de todas las variables excepto ITPSR. La triple interacción (FMH*Fecha*Tratamiento) no resultó significativa en ningún caso.

Tabla 1.4: Comportamiento promedio de las FMH de *Lotus tenuis* evaluadas en el ensayo 1 para todas las variables estudiadas y sus índices de tolerancia (IT). Media, coeficiente de variación (C.V.), desvío estándar (D.E.), valores máximo y mínimo y p-valor para FMH, interacción FMH y Tratamiento e interacción FMH y Fecha de corte.

Variable (unidad)	Media	C.V.	D.E.	Mínimo	Máximo	p-valor	p-valor	p-valor
						FMH	FMH*Trat	FMH*Fecha
NTV (n°)	26,407	47,087	12,434	5,000	85,000	<0,0001	<0,0001	0,0703
LTP (cm)	28,261	41,379	11,694	7,100	79,100	<0,0001	0,1083	0,4451
ETP (cm)	1,658	30,162	0,500	0,592	4,013	<0,0001	0,2152	0,0969
LR (cm)	21,246	25,980	5,520	6,300	44,800	<0,0001	<0,0001	0,0743
PFA (g)	11,682	74,406	8,692	0,531	54,395	<0,0001	0,0202	0,4301
PSA (g)	1,652	71,027	1,173	0,127	7,723	<0,0001	0,0251	0,1437
PSR (g)	0,579	54,154	0,313	0,029	2,117	<0,0001	0,6817	0,2741
PST (g)	2,230	65,400	1,459	0,181	9,748	<0,0001	0,1257	0,2249
ITNTV	0,801	34,186	0,274	0,119	1,980	<0,0001	0,0528	0,0001
ITLTP	0,724	31,771	0,230	0,174	1,550	<0,0001	0,1512	<0,0001
ITETP	0,775	25,844	0,200	0,264	1,555	<0,0001	0,1490	<0,0001
ITLR	0,756	24,926	0,189	0,251	1,504	<0,0001	0,2389	0,0052
ITPFA	0,586	50,530	0,296	0,035	1,921	<0,0001	0,5897	0,0005
ITPSA	0,719	50,816	0,365	0,061	2,836	<0,0001	0,3507	0,0013
ITPSR	0,751	46,148	0,346	0,026	2,455	0,0074	0,6901	0,1287
ITPST	0,725	47,434	0,344	0,066	2,717	<0,0001	0,5770	0,0040

En color gris se indican los casos con diferencias significativas ($p < 0,05$).

1.2.1. Variabilidad en el crecimiento de las FMH

Se encontró variabilidad en el crecimiento de las FMH bajo las condiciones del ensayo. Para la variable NTV existió interacción, evidenciando un comportamiento diferencial de las FMH según el tratamiento (Figura 1.6). La familia 5 presentó mayor número de tallos vegetativos en el control, mientras que la familia 8 fue la de mejor comportamiento para esta variable en 150 mM NaCl. En 300 mM, la familia 14 fue la de peor comportamiento, presentando el mayor contraste respecto al control.

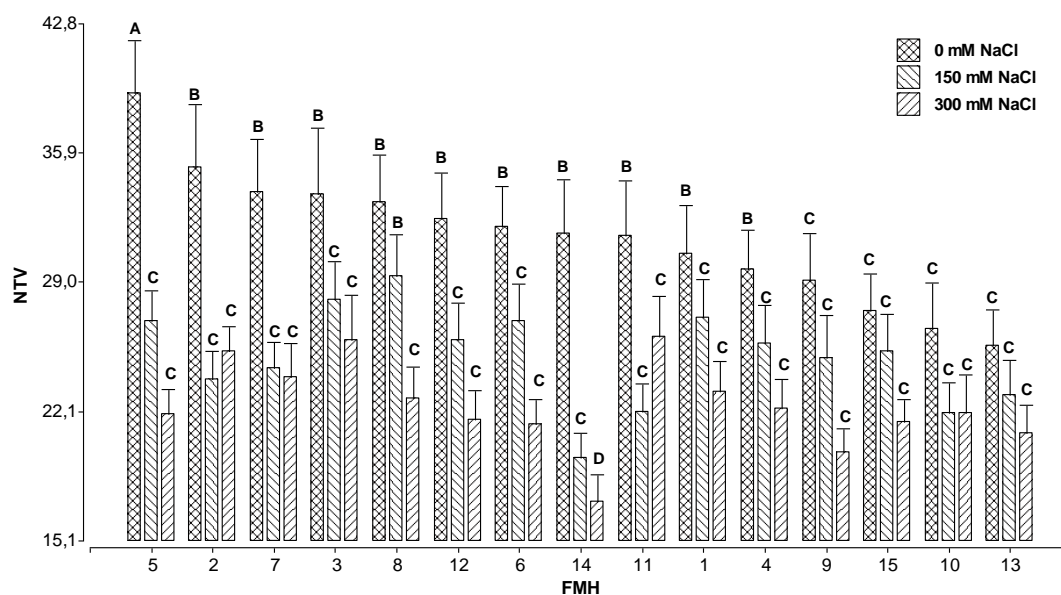


Figura 1.6: Número de tallos vegetativos de las 15 FMH evaluadas en control, 150 mM y 300 mM de NaCl. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Para LTP y ETP, no existió interacción FMH*Tratamiento. En los dos casos las familias 3, 11 y 15 se encontraron entre las que presentaron mayores medias, y la familia 9 fue la de peor comportamiento (Figuras 1.7 y 1.8).

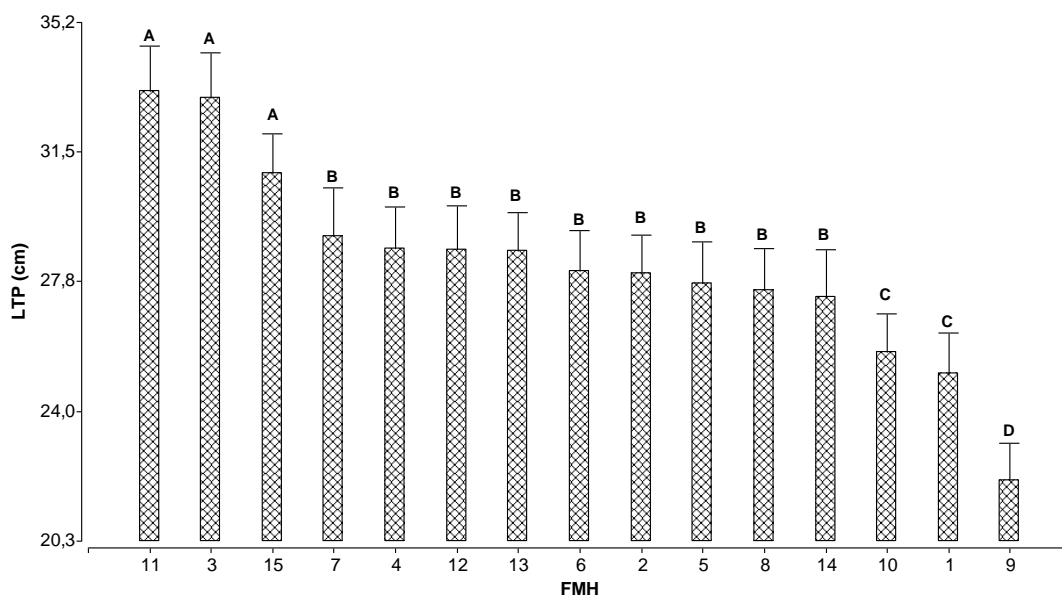


Figura 1.7: Longitud del tallo principal de las 15 FMH evaluadas en los tres tratamientos. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

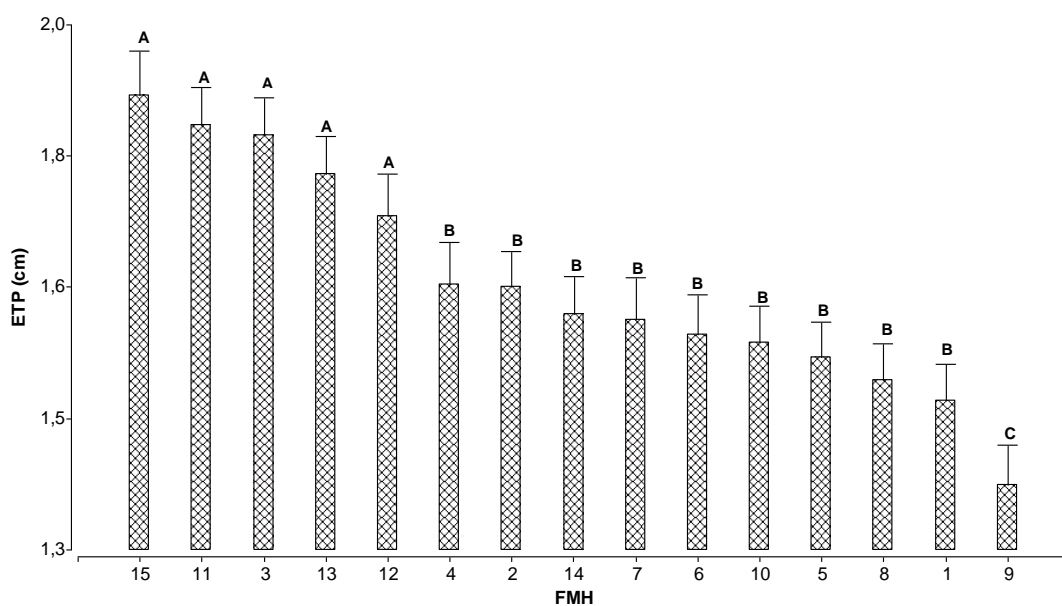


Figura 1.8: Longitud de entrenudos del tallo principal de las 15 FMH evaluadas en los tres tratamientos. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Las FMH 5, 4, 12 y 3 presentaron mayor longitud de raíz en el control (Figura 1.9). En 150 mM únicamente se diferenciaron las FMH 7, 9 y 15, que presentaron menores medias. En 300 mM las FMH 2 y 10 presentaron mayor longitud que las demás.

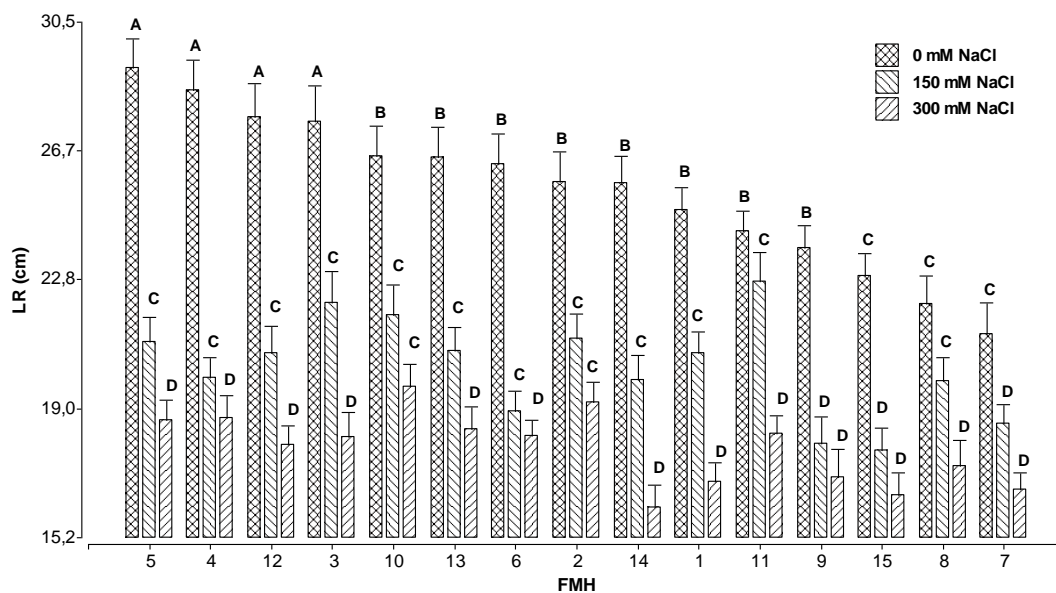


Figura 1.9: Longitud de raíz de las 15 FMH evaluadas en control, 150 mM y 300 mM de NaCl. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

En el tratamiento control, la familia 10 presentó menor PFA y PSA que las demás (Figuras 1.10 y 1.11). Sin embargo, esta familia no presentó diferencias en el peso fresco aéreo entre el tratamiento de 150 mM y el control. Lo mismo ocurrió para las familias 3 y 8 en las dos variables relacionadas con el peso de la parte aérea, destacándose en este tratamiento respecto de la demás familias. En 300 mM se destacaron las familias 3, 11 y 2 por su PFA (Figura 1.10); y 3, 11, 2, 15 y 12 por su PSA (Figura 1.11).

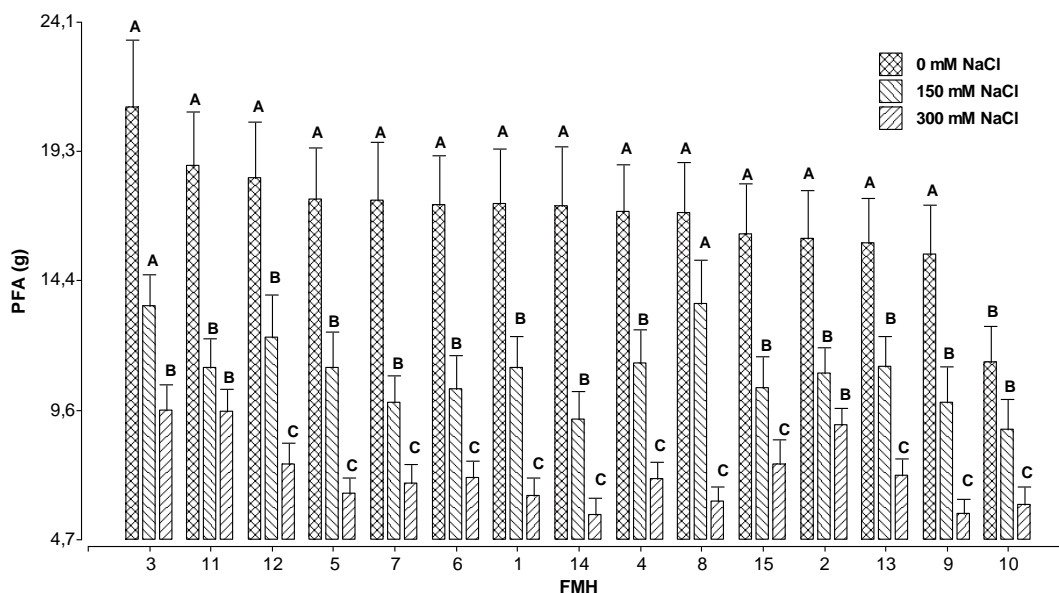


Figura 1.10: Peso fresco aéreo de las 15 FMH evaluadas en control, 150 mM y 300 mM de NaCl. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

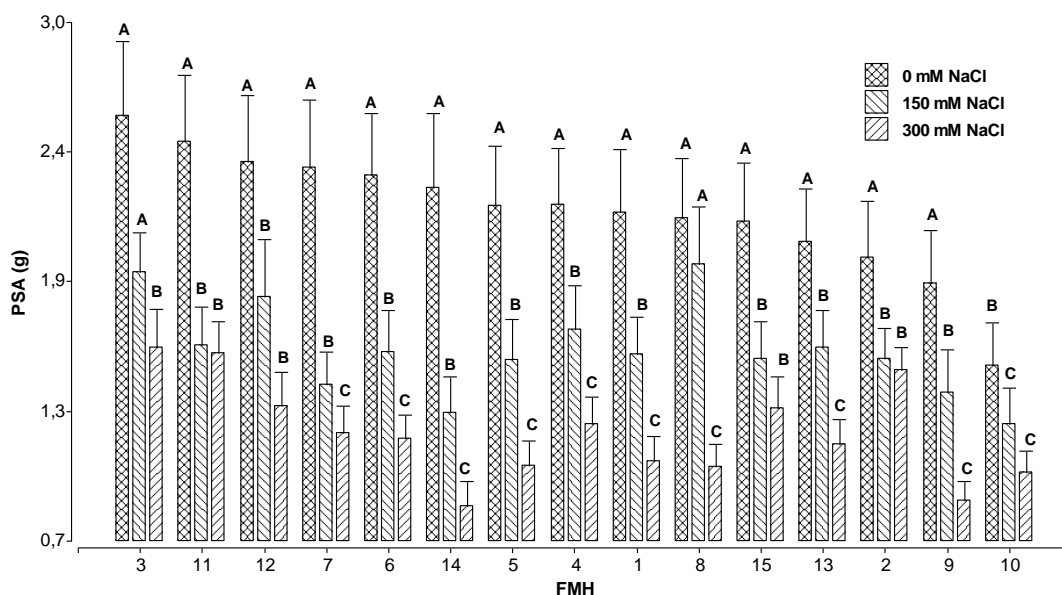


Figura 1.11: Peso seco aéreo de las 15 FMH evaluadas en control, 150 mM y 300 mM de NaCl. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Las familias 10, 9 y 14 fueron las que presentaron menor PST y PSR. En PSR, en conjunto con la familia 13 (Figuras 1.12 y 1.13). Ninguna de estas variables presentó interacción entre FMH y tratamiento.

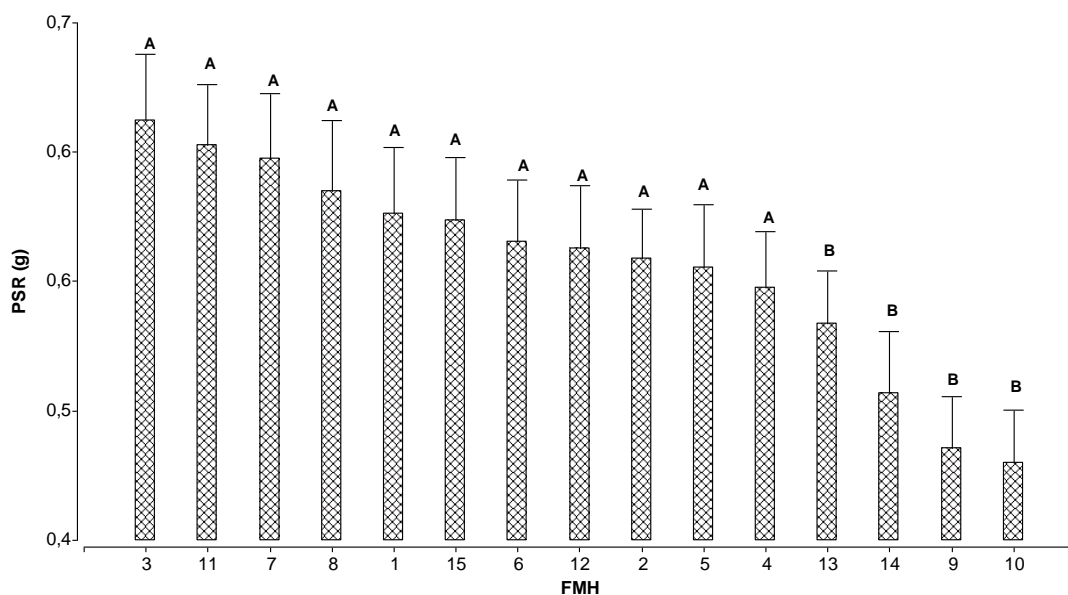


Figura 1.12: Peso seco de raíz de las 15 FMH evaluadas en los tres tratamientos. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

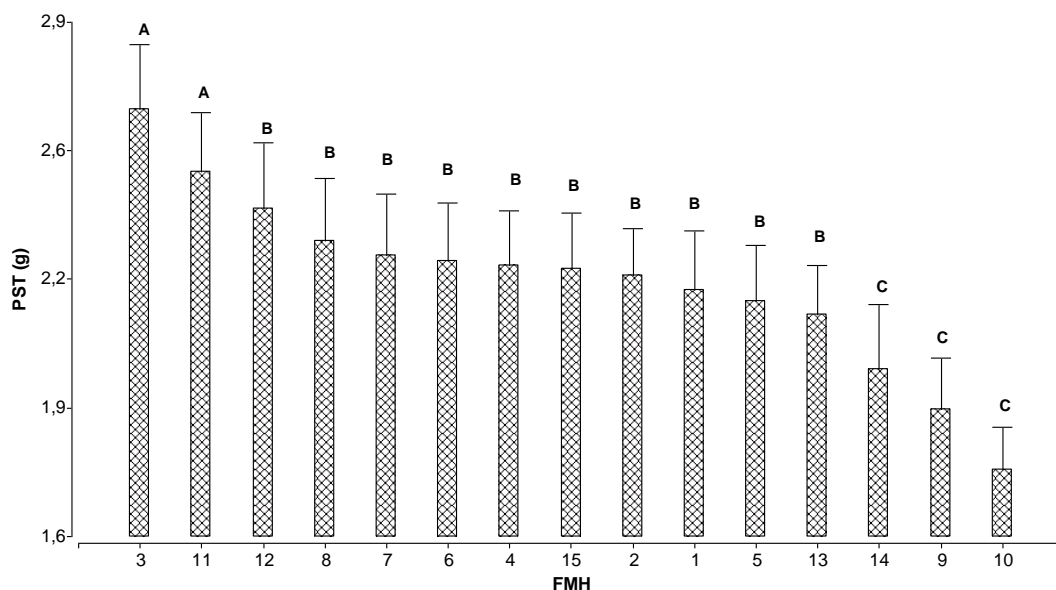


Figura 1.13: Peso seco total de las 15 FMH evaluadas en los tres tratamientos. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Las correlaciones fenotípicas entre caracteres fueron altamente significativas y positivas (Tabla 1.5). Los coeficientes más bajos se observaron en relación a la variable longitud de raíz.

Tabla 1.5: Coeficiente de correlación de Pearson entre los parámetros de crecimiento evaluados en el ensayo 1. En la primera fila se observa el coeficiente de correlación y en la segunda fila el nivel de significancia. En gris se observan las correlaciones mayores a 0,70.

	NTV	LTP	ETP	LR	PFA	PSA	PSR
LTP	0,63 <0,0001						
ETP	0,50 <0,0001	0,89 <0,0001					
LR	0,37 <0,0001	0,49 <0,0001	0,46 <0,0001				
PFA	0,75 <0,0001	0,84 <0,0001	0,72 <0,0001	0,48 <0,0001			
PSA	0,76 <0,0001	0,84 <0,0001	0,70 <0,0001	0,42 <0,0001	0,98 <0,0001		
PSR	0,72 <0,0001	0,74 <0,0001	0,62 <0,0001	0,47 <0,0001	0,88 <0,0001	0,89 <0,0001	
PST	0,76 <0,0001	0,83 <0,0001	0,70 <0,0001	0,44 <0,0001	0,98 <0,0001	0,99 <0,0001	0,93 <0,0001

Adicionalmente, se calcularon las tasas de crecimiento relativo (RGR) de las familias a los 16 y a los 29 días de iniciados los tratamientos y se encontraron diferencias significativas entre FMH, tratamientos y fechas, e interacción significativa FMH*Fecha. RGR disminuyó con el aumento de la concentración salina y con el paso del tiempo. Las familias con mayor tasa de crecimiento entre el inicio y 16 ddi fueron las FMH 5 y 4, y la que presentó la tasa más baja fue la 12 (Figura 1.14). Entre el inicio y los 29 días pudo observarse un grupo de familias con mayor RGR, entre las que se encuentran las FMH 5 y 4, y un grupo de familias con RGR más baja, entre las que se encuentra la FMH 12.

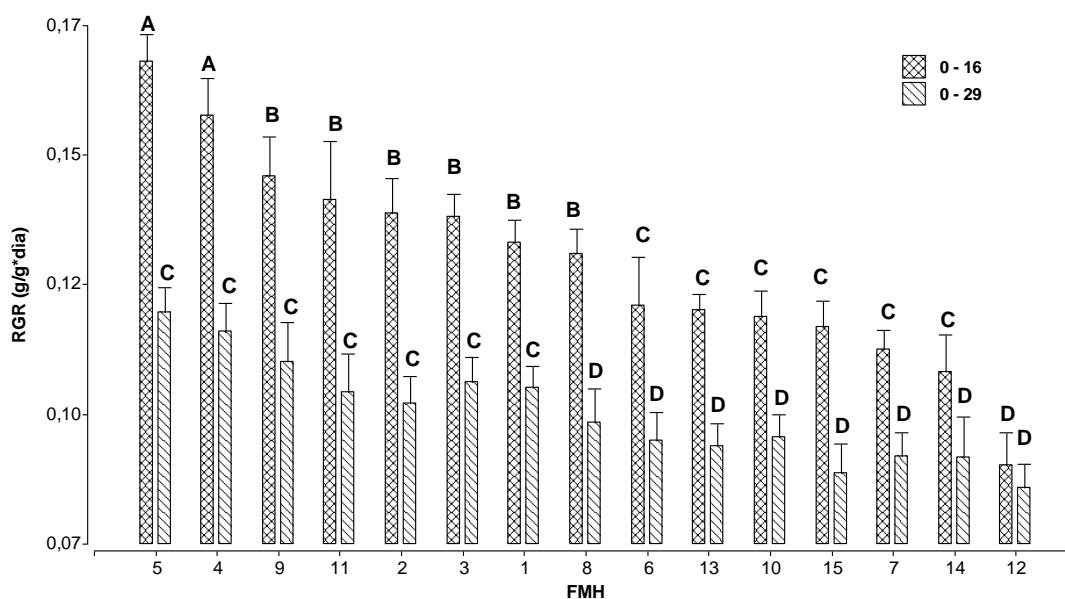


Figura 1.14: Tasa de crecimiento relativo a los 16 y 29 días de ensayo de las 15 FMH evaluadas. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Si bien no fueron las familias con tasas de crecimiento relativo más altas, las FMH 3 (490) y 11 (1897) presentaron un mayor crecimiento que las demás al considerar la mayor parte de los parámetros evaluados. Por el contrario, las FMH 9 (1195) y 10 (1894) fueron las menos destacadas.

1.2.2. Tolerancia a la salinidad

La tolerancia de las FMH se evaluó a partir de los índices (IT) y varió entre las fechas de corte (Tabla 1.4). Al evaluar a través de componentes principales los IT de las variables utilizando como criterios de clasificación las FMH y las fechas de corte, se observó una disminución de la tolerancia a la salinidad con el paso del tiempo para todos los genotipos (Figura 1.15).

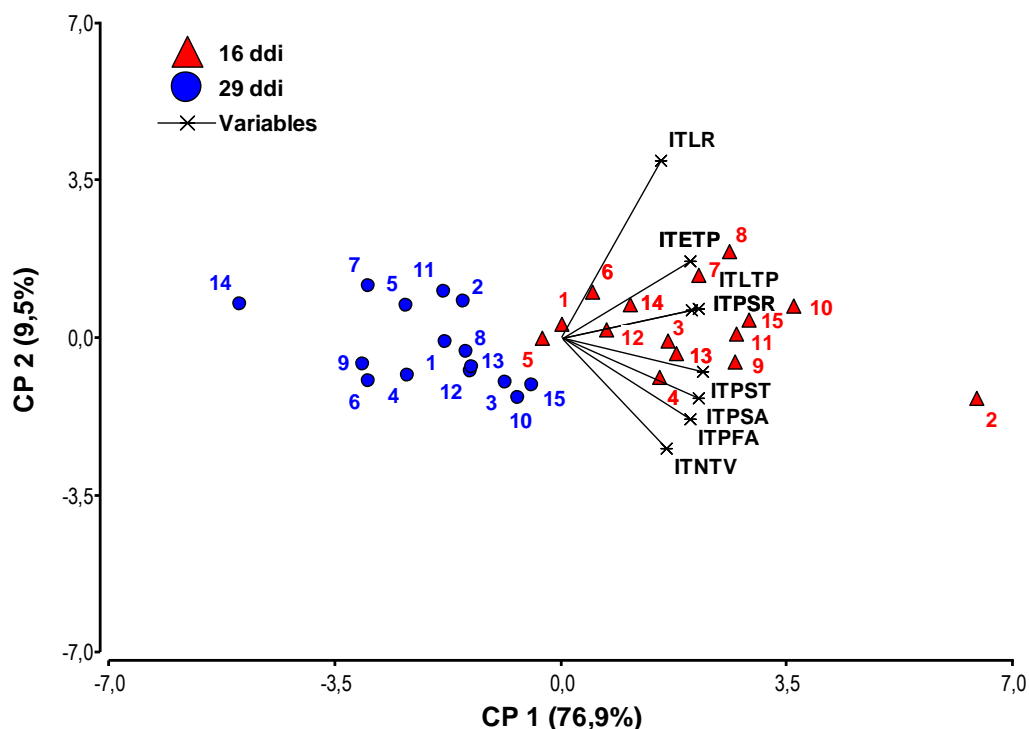


Figura 1.15: Análisis de componentes principales de los IT de las variables en el ensayo 1 utilizando como criterios de clasificación las FMH y las fechas de corte.

El análisis de componentes principales y el ITPST de las FMH en cada fecha (Tabla 1.6) permitieron observar que a los 16 ddi, la FMH 447 fue la de mayor tolerancia, y la FMH 325 la de menor. Este comportamiento no se mantuvo a los 29 ddi cuando únicamente la FMH 2248 se diferenció del resto presentando menor tolerancia.

Tabla 1.6: Efecto del NaCl sobre el peso seco total evaluado a partir de un índice para cada una de las 15 FMH evaluadas a los 16 y a los 29 días desde inicio de los tratamientos.

FMH	Identificación	ITPST	
		16 ddi	29 ddi
447	2	1,25 A	0,64 C
1195	9	0,91 B	0,57 C
1894	10	0,90 B	0,68 C
1897	11	0,89 B	0,59 C
2243	13	0,87 B	0,60 C
2297	15	0,87 B	0,68 C
685	4	0,85 B	0,60 C
1193	8	0,84 B	0,64 C
1146	7	0,84 B	0,51 C
490	3	0,83 B	0,67 C
2248	14	0,80 B	0,44 D
2241	12	0,77 B	0,66 C
690	5	0,73 B	0,57 C
691	6	0,73 B	0,54 C
325	1	0,68 C	0,62 C

Los valores representan la media ajustada de ITPST. Letras distintas indican diferencias significativas (P<0,05) según la prueba DGC.

La tasa de crecimiento relativo se correlacionó significativamente con ITPST en las dos fechas. A 16 ddi, el coeficiente de correlación de Pearson fue de 0,37 ($p=0,0003$), y a 29 ddi fue de 0,39 ($p=0,0001$). En la primera fecha, las FMH 325, 490, 685, 691 y 2248 presentaron una RGR inferior en los tratamientos salinos que en el control (Anexo 1.1). En la segunda fecha, todas las familias presentaron diferencias entre tratamientos, excepto las FMH 1894 y 2297. En la figura 1.16 se graficaron las RGR a 16 ddi de las FMH 447, 325 y 1193. Se observa que tanto la familia tolerante (447) como la de tolerancia intermedia (1193) mantuvieron su tasa de crecimiento a través de los tratamientos, mientras la familia 325, de menor tolerancia en esta fecha, presentó tasas más bajas en los tratamientos salinos que en el control.

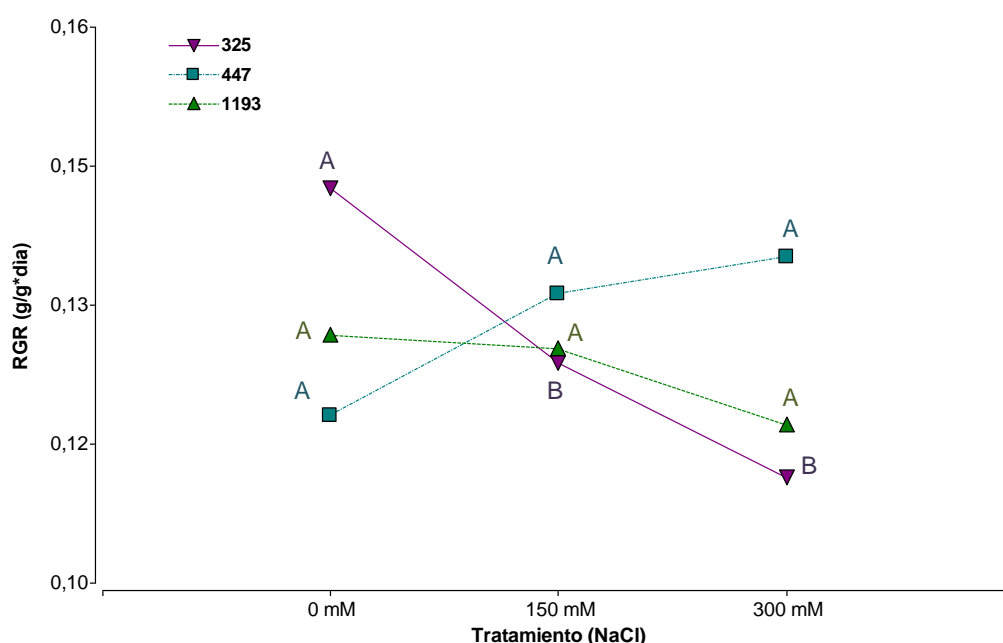


Figura 1.16: Tasas de crecimiento relativo a 16 días de iniciados los tratamientos de tres FMH evaluadas en el ensayo 1. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P<0,05$) para cada FMH según la prueba DGC.

En la figura 1.17 se graficaron las RGR a 29 ddi de las FMH 1894, 2248 y 1193. La familia 1894 no presentó diferencias en su tasa de crecimiento en los distintos tratamientos y se encontró entre las que tuvieron mayores ITPST. La familia 2248 fue la menos tolerante (Tabla 1.6) y presentó diferencias en la RGR entre los tres tratamientos. Si bien no existió interacción entre FMH y Tratamiento para ITPST, en las variables NTV, LR, PFA y PSA, en las que sí existió interacción, la familia 1193 presentó valores similares entre el control y 150 mM de NaCl. Además, su reducción en el PST en este tratamiento a los 29 días fue del 14 %, mientras que en 300 mM la reducción fue del 59 %. Esta tendencia también se observa en la RGR.

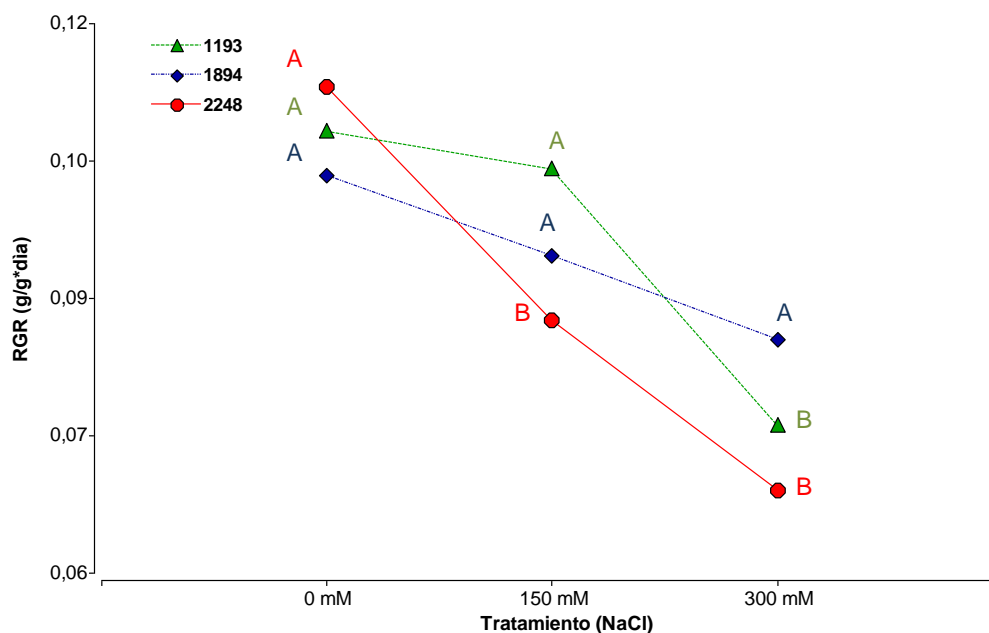


Figura 1.17: Tasas de crecimiento relativo a 29 días de iniciados los tratamientos de tres FMH evaluadas en el ensayo 1. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$) para cada FMH según la prueba DGC.

A partir de estos resultados se seleccionaron las FMH 447 (tolerante a 16 ddi), 1894 (tolerante a 29 ddi), 325 (susceptible a 16 ddi), 2248 (susceptible a 29 ddi) y 1193 (intermedia) para continuar con el estudio en el ensayo 2.

1.2.3. Determinación de los contenidos de Na^+ , K^+ y Cl^- y la relación K^+/Na^+

Se observó un incremento ($p < 0,05$) en el contenido ($\mu\text{Moles g}^{-1}$ Peso Seco) de Na^+ y de Cl^- , y una disminución en el contenido de K^+ en hojas, tallos y raíces tratadas con NaCl respecto al control (Figura 1.18). Las hojas de las plantas tratadas con 300 mM NaCl presentaron mayor contenido de Na^+ y de Cl^- que las tratadas con 150 mM en las dos fechas, y menor contenido de K^+ a 16 ddi, pero no al final del ensayo. En tallo, existieron diferencias entre tratamientos salinos en los contenidos de K^+ y Cl^- , y el de Na^+ a 16 ddi. En raíz, solo existieron diferencias entre tratamientos en el contenido de K^+ .

Por otra parte, los contenidos de iones se modificaron con el tiempo según el tratamiento considerado (Figura 1.18). En 150 mM, se produjo una acumulación de Na^+ en hoja. El contenido de Cl^- en los tres tejidos se incrementó a los 16 ddi respecto del inicio del ensayo, pero no existieron diferencias significativas entre 16 y 29 ddi. En 300 mM, los contenidos de Na^+ y Cl^- en hoja se incrementaron con el tiempo, mientras que en raíz y tallo no existieron diferencias entre 16 y 29 ddi. En el caso del K^+ , en los dos tratamientos salinos se produjo una reducción del contenido en hoja y tallo en la tercera fecha de medición. En raíz no se observó esta disminución.

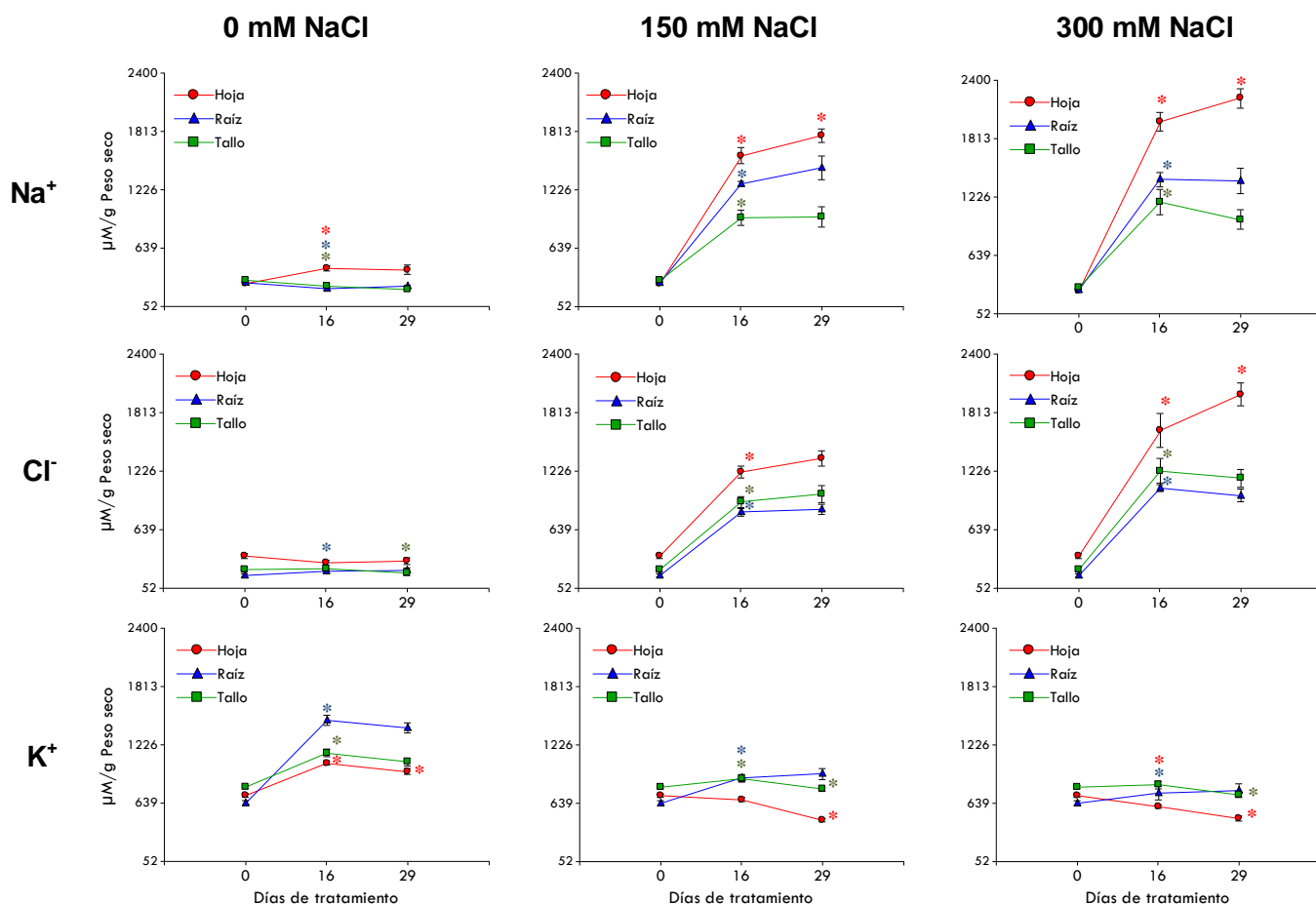


Figura 1.18: Contenido de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ (μMoles g⁻¹ Peso Seco) en muestras de hoja, raíz y tallo de plantas de *Lotus tenuis* sometidas a 0, 150 y 300 mM NaCl. Se tomaron muestras a los 0, 16 y 29 días de iniciados los tratamientos. Se grafican las medias ± E.E. Todos los ejes presentan la misma escala. (*) indica diferencias significativas con la fecha de muestreo anterior para cada tejido.

Se estimaron las tasas de absorción de iones por parte de las raíces y las tasas de transporte de los mismos desde raíces a la parte aérea. Existieron mayores tasas de absorción y transporte de Na⁺ y Cl⁻ y menores de K⁺ en las plantas que crecieron en condiciones salinas respecto al control a los 16 y 29 ddi (Tabla 1.7). No se hallaron diferencias significativas entre las FMH ni interacción FMH*Tratamiento.

Tabla 1.7: Tasas de transporte (μmol en la parte aérea por gramo de raíz por día) y de absorción de iones (μmol en toda la planta por gramo de raíz por día) promedio de plantas de *Lotus tenuis* sometidas a 0, 150 y 300 mM de NaCl. Se calcularon las tasas entre 0 y 16 y entre 0 y 29 días de tratamiento. Los valores representan a las medias \pm E.E. Para cada número de días de exposición, letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tratamiento (mM NaCl)	Días de exposición	Tasa de transporte a parte aérea ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PSR día $^{-1}$)			Tasa de absorción total ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PSR día $^{-1}$)		
		Na $^{+}$	K $^{+}$	Cl $^{-}$	Na $^{+}$	K $^{+}$	Cl $^{-}$
0	16	4,10 \pm 2,30 a	32,18 \pm 3,57 a	-4,29 \pm 3,23 a	0,83 \pm 2,52 a	73,33 \pm 7,66 a	-2,40 \pm 3,80 a
150	16	90,98 \pm 9,52 b	2,69 \pm 2,07 b	72,69 \pm 8,89 b	138,05 \pm 12,45 b	14,59 \pm 3,33 b	103,33 \pm 11,48 b
300	16	123,55 \pm 11,50 b	-4,38 \pm 2,79 c	107,74 \pm 13,56 c	177,95 \pm 13,91 b	1,07 \pm 5,35 c	151,23 \pm 15,50 c
0	29	1,51 \pm 2,80 a	22,90 \pm 2,66 a	-4,06 \pm 2,06 a	-0,38 \pm 2,20 a	57,99 \pm 5,46 a	-2,16 \pm 2,71 a
150	29	104,06 \pm 10,57 b	-13,75 \pm 2,68 b	93,40 \pm 9,42 b	161,41 \pm 14,10 b	0,27 \pm 4,73 b	125,78 \pm 11,26 b
300	29	127,18 \pm 14,54 b	-14,32 \pm 3,36 b	131,62 \pm 15,44 b	181,25 \pm 20,95 b	-9,48 \pm 5,08 b	169,72 \pm 17,78 b

Para determinar si existió relación entre la tolerancia a salinidad estimada a partir de ITPSA e ITPST, y los contenidos de iones en los distintos tejidos, se analizó la correlación a partir del coeficiente de correlación de Pearson. En la tabla 1.8 se muestran las correlaciones significativas entre los contenidos de iones y la relación K $^{+}$ /Na $^{+}$ en hoja y los índices de tolerancia mencionados. Los contenidos de iones se encuentran altamente correlacionados, en forma positiva en el caso de Na $^{+}$ y Cl $^{-}$, y en forma negativa entre ellos y K $^{+}$, y, por lo tanto, K $^{+}$ /Na $^{+}$.

Tabla 1.8: Correlaciones entre los parámetros analizados relacionados con el contenido de iones, y los índices de tolerancia en el ensayo 1. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson significativos ($p < 0,05$). En la primera fila se observa el coeficiente y en la segunda fila el nivel de significancia.

	Na $^{+}$ Hoja	K $^{+}$ Hoja	Cl $^{-}$ Hoja	K $^{+}$ /Na $^{+}$ Hoja	ITPSA
K $^{+}$ Hoja	-0,88 <0,0001				
Cl $^{-}$ Hoja	0,94 <0,0001	-0,82 <0,0001			
K $^{+}$ /Na $^{+}$ Hoja	-0,91 <0,0001	0,88 <0,0001	-0,80 <0,0001		
ITPSA		0,28 0,028	-0,34 0,008		
ITPST		0,33 0,009	-0,36 0,005	0,26 0,043	0,99 <0,0001

En naranja se indican las correlaciones entre el contenido de Na $^{+}$, K $^{+}$ y Cl $^{-}$ y la relación K $^{+}$ /Na $^{+}$ en hoja. En verde, las correlaciones entre iones y los IT. En rojo, la correlación entre los IT.

La relación K^+/Na^+ en hoja mostró correlación significativa y positiva con ITPST. La correlación entre el contenido de Cl^- en hoja y la tolerancia resultó significativa y negativa, y el contenido de K^+ en hoja presentó correlación positiva con la tolerancia. No se muestran las correlaciones entre los contenidos de iones en tallo y raíz y los IT, ya que no resultaron significativas, exceptuando el contenido de K^+ en tallo que presentó una correlación positiva con los dos índices.

Si bien algunas de las correlaciones resultaron significativas, los coeficientes fueron bajos, por lo que no siempre las familias que presentaron en promedio menor contenido de Cl^- , mayor relación K^+/Na^+ o mayor contenido de K^+ fueron las que mostraron mayor tolerancia a la salinidad en el ensayo. La FMH 2248, que había evidenciado menor tolerancia a la salinidad, fue consistente en este sentido, ya que si se excluye al control del análisis, fue la FMH que presentó en promedio más contenido de Na^+ y Cl^- , menos de K^+ y menor relación K^+/Na^+ (Figura 1.19).

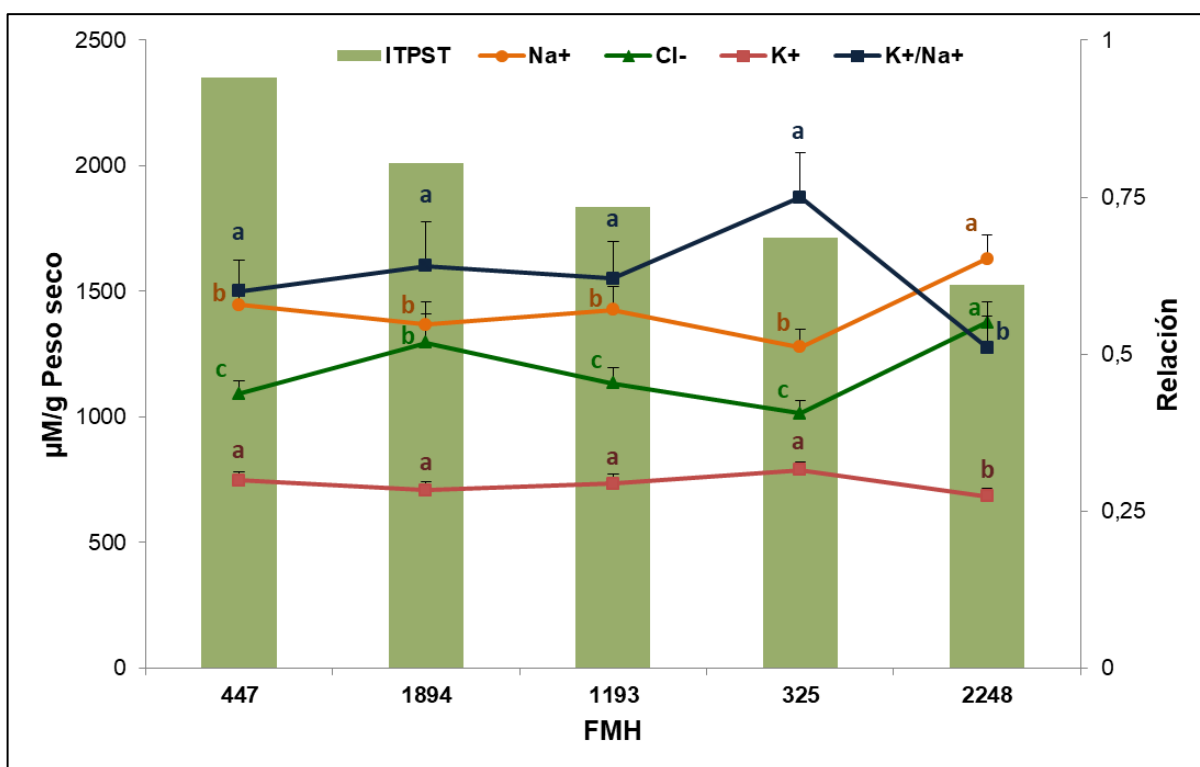


Figura 1.19: Promedio de la contenido de Na^+ y Cl^- (μ Moles g^{-1} Peso Seco) y la relación K^+/Na^+ en los tratamientos salinos (150 y 300 mM NaCl) e índice de tolerancia del peso seco total (ITPST) de cinco FMH. Letras distintas indican diferencias significativas entre las FMH ($p < 0,05$).

1.3. Ensayo 2: Respuesta a la salinidad de cinco FMH seleccionadas en el ensayo 1

Existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre FMH para todos los parámetros de crecimiento e interacción FMH*Fecha para algunos de ellos, pero no existieron diferencias entre las FMH para los índices de tolerancia de las variables relacionadas con la producción de materia seca (ITPFA, ITPSA, ITPSR, ITPST) (Tabla 1.9). Los restantes índices presentaron interacción FMH*Fecha.

Tabla 1.9: Comportamiento promedio de las cinco FMH de *Lotus tenuis* para todas las variables estudiadas en el ensayo 2 y sus índices de tolerancia (IT). Media, coeficiente de variación (C.V.), desvío estándar (D.E.), valores máximo y mínimo y p-valor para FMH, interacción FMH y Tratamiento e interacción FMH y Fecha de corte.

Variable (unidad)	Media	C.V.	D.E.	Mínimo	Máximo	p-valor	p-valor	p-valor
						FMH	FMH*Trat	FMH*Fecha
NTV (n°)	10,644	43,322	4,611	2,000	31,000	<0,0001	0,3854	0,0833
LTP (cm)	8,806	29,613	2,608	2,500	23,200	<0,0001	0,3231	0,1319
ETP (cm)	0,889	24,026	0,214	0,358	1,729	<0,0001	0,1399	0,0178
LR (cm)	13,735	42,656	5,859	5,500	37,200	<0,0001	0,0577	0,0114
PFA (g)	1,598	80,105	1,280	0,053	7,996	<0,0001	0,0623	0,0011
PSA (g)	0,249	71,729	0,178	0,021	1,054	<0,0001	0,7682	0,0253
PSR (g)	0,189	76,571	0,145	0,013	0,827	<0,0001	0,5392	0,3435
PST (g)	0,438	72,559	0,318	0,034	1,738	<0,0001	0,3559	0,0385
ITNTV	0,772	37,504	0,290	0,104	1,923	0,0256	0,7717	0,0059
ITLTP	0,836	27,889	0,233	0,249	1,862	0,0029	0,8242	<0,0001
ITETP	0,961	23,563	0,226	0,360	1,821	0,1615	0,1092	0,0017
ITLR	0,649	30,007	0,195	0,221	1,438	0,3053	0,1906	<0,0001
ITPFA	0,747	63,725	0,476	0,015	2,843	0,9840	0,4443	0,2314
ITPSA	0,805	60,217	0,485	0,041	3,412	0,7890	0,2279	0,1397
ITPSR	0,705	67,635	0,477	0,028	2,832	0,4323	0,1317	0,1340
ITPST	0,742	60,246	0,447	0,035	3,107	0,8214	0,1342	0,3173

En color gris se indican los casos con diferencias significativas ($p < 0,05$).

Las medias de los parámetros de crecimiento fueron inferiores a las del ensayo anterior (Tabla 1.4) debido a la menor temperatura y mayor amplitud térmica del momento en el que se desarrolló el ensayo, lo que propició un menor crecimiento en las plantas.

Se realizó análisis de correlación entre los ensayos 1 y 2, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson entre las variables y los IT a partir de las medias para cada FMH en cada tratamiento y fecha (Tabla 1.10).

Tabla 1.10: Correlación entre las mismas variables en los dos ensayos.

Se indican los coeficientes de correlación de Pearson significativos y los p-valores en todos los casos.

Variable	Coefficiente de correlación	p-valor
NTV	0,89	<0,0001
LTP	0,77	<0,0001
ETP		0,6574
LR	0,81	<0,0001
PFA	0,90	<0,0001
PSA	0,90	<0,0001
PSR	0,93	<0,0001
PST	0,92	<0,0001
ITNTV		0,0580
ITLTP	0,80	<0,0001
ITETP		0,1383
ITLR	0,65	0,0018
ITPFA	0,62	0,0039
ITPSA	0,48	0,0312
ITPSR	0,79	<0,0001
ITPST	0,55	0,0123

En gris se indican las correlaciones significativas.

Los parámetros de crecimiento presentaron correlaciones significativas entre los ensayos con excepción de ETP. Si bien en el ensayo 2 las medias fueron inferiores, existieron similitudes con el ensayo 1 respecto al comportamiento de las familias en cuanto al crecimiento. Por ejemplo, la FMH 10 presentó en promedio menor NR, LTP, PFA, PSA, PSR y PST (Figura 1.20), lo cual coincidió con lo ocurrido anteriormente.

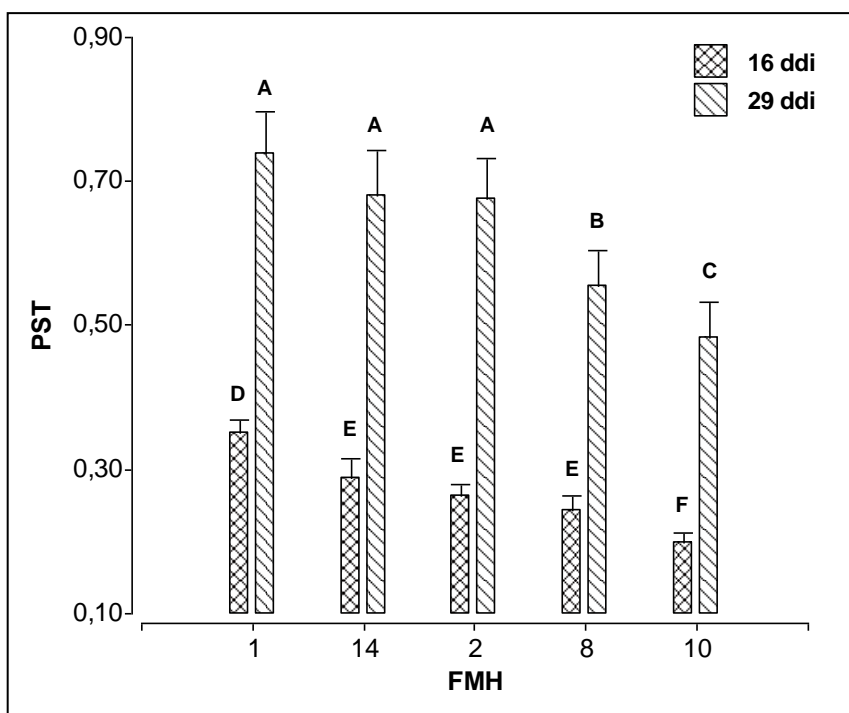


Figura 1.20: Peso seco total a los 16 y 29 días de ensayo de las cinco FMH evaluadas en el ensayo 2. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Las correlaciones de los IT entre los ensayos fueron significativas, excepto para ITNTV e ITETP (Tabla 1.10). Sin embargo, fueron más bajas que las del parámetro relacionado, con excepción de ITLTP que presentó mayor correlación que LTP. Por ejemplo, la dispersión de los datos de ITPST fue mayor a la de los datos de PST (Figura 1.21).

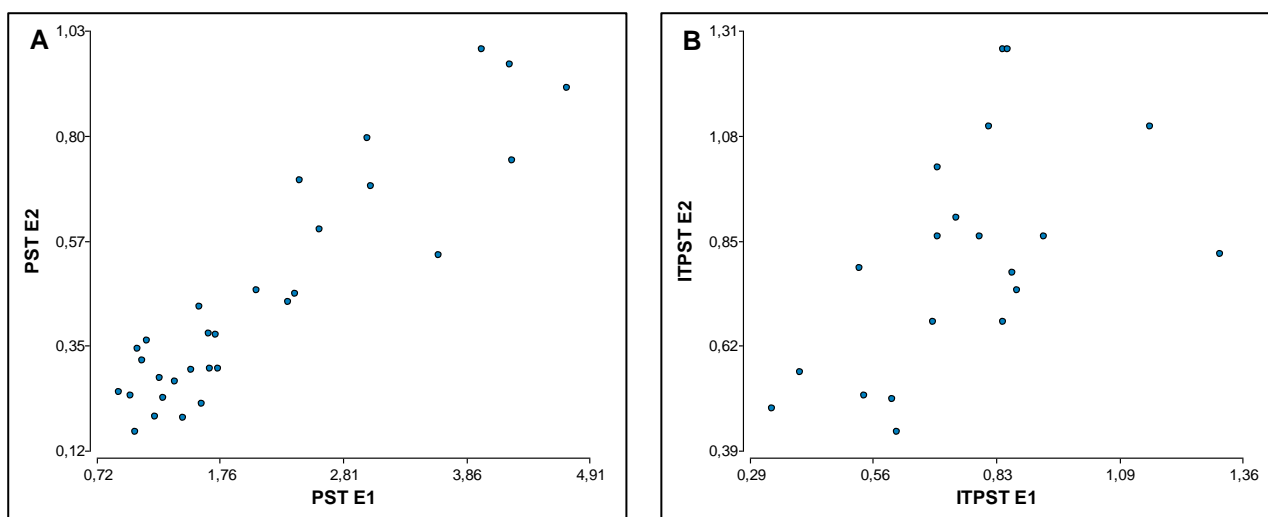


Figura 1.21: Diagrama de dispersión de PST (A) y de ITPST (B) entre los ensayos 1 y 2.

Además de la menor correlación, no existieron diferencias entre FMH para los índices más importantes (Tabla 1.9), y las diferencias detectadas para los índices de las otras variables

no fueron consistentes con los resultados del ensayo 1. Por ejemplo, la FMH 2248 que se encontraba entre las que peor comportamiento había presentado para ITNTV, ITLTP, ITETP e ITLR en las dos fechas de corte en el ensayo 1, en el ensayo 2 estuvo entre las que presentaron mayores IT (Figura 1.22).

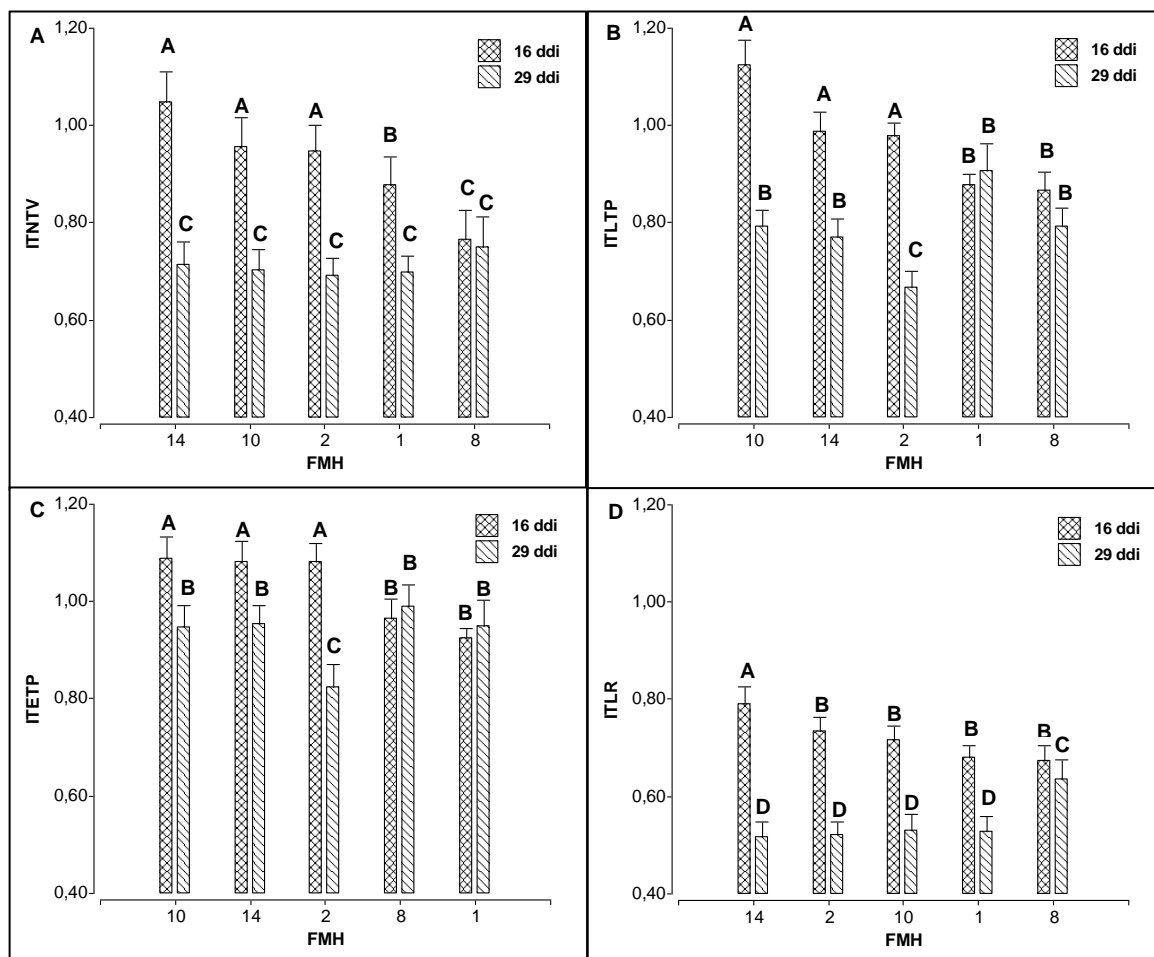


Figura 1.22: Índices de tolerancia para los que existieron diferencias significativas entre las FMH en el ensayo 2: ITNTV (A), ITLTP (B), ITETP (C), ITLR (D). Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Estas inconsistencias entre los ensayos llevaron a que posteriormente se trabajara en cámara de crecimiento, a nivel de genotipo y con material propagado de forma vegetativa.

2. Respuesta de genotipos de *L. tenuis* al estrés salino impuesto por shock

2.1. Ensayo 3: Tolerancia a salinidad de genotipos provenientes de 5 FMH

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos y tratamientos para las dos variables y sus IT (Tabla 1.11). La interacción entre genotipo y tratamiento no resultó significativa en ningún caso.

Tabla 1.11: Comportamiento promedio de los genotipos de *Lotus tenuis* para las variables estudiadas en el ensayo 3 y sus índices de tolerancia (IT). Media, coeficiente de variación (C.V.), desvío estándar (D.E.), valores máximo y mínimo y p-valor para Genotipo, Tratamiento e Interacción Genotipo*Tratamiento.

Variable (unidad)	Media	C.V.	D.E.	Mín.	Máx.	p-valor	p-valor	p-valor
						Genotipo	Tratamiento	Interacción
LTP (cm)	14,95	41,77	6,24	0,50	32,40	<0,0001	<0,0001	0,9830
PST (g)	69,27	57,2	39,62	3,31	247,80	<0,0001	<0,0001	0,1419
ITLTP	0,70	62,27	0,44	0,35	3,61	0,0008	0,0251	0,9897
ITPST	0,86	60,09	0,52	0,27	3,17	0,0054	0,0003	>0,9999

En color gris se indican los casos con diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la figura 1.23 se grafica el análisis de componentes principales realizado considerando los índices de tolerancia y la sobrevivencia. Un grupo de genotipos, indicados dentro de un círculo rojo, se diferenció del resto al presentar menor sobrevivencia, mientras dos genotipos (1-13 y 1-15, indicados con un círculo azul continuo) no presentaron plantas muertas a los 21 ddi en ningún tratamiento. Otro grupo, indicado con un círculo azul discontinuo, presentó una tolerancia significativamente superior al resto tanto para PST como para LTP, debido a que los IT se encuentran altamente correlacionados ($0,77$; $p < 0,0001$).

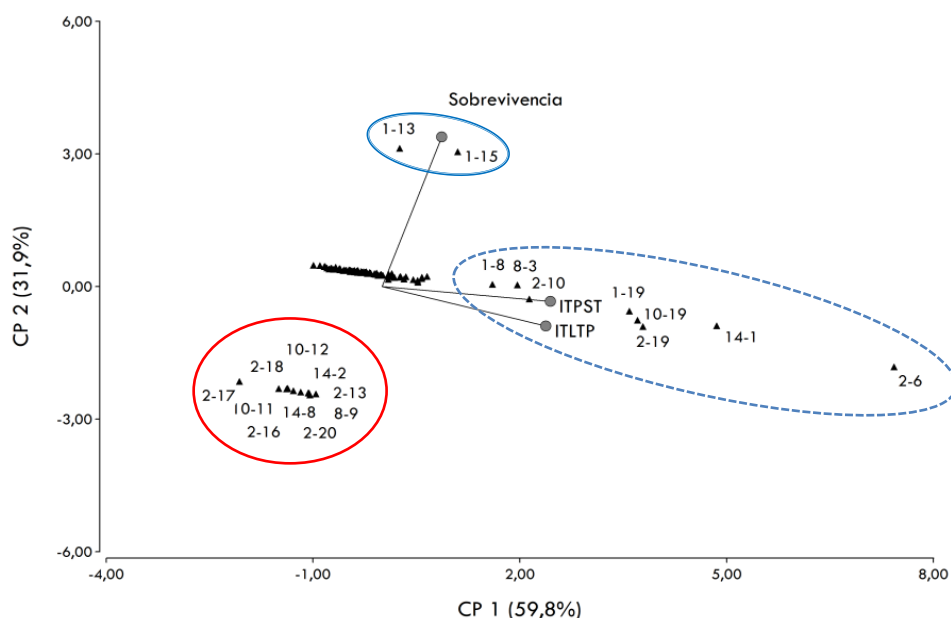


Figura 1.23: Análisis de componentes principales a partir de las variables del ensayo 3. Se analizaron las variables ITPST, ITLTP y Sobrevivencia utilizando a los genotipos como criterio de clasificación. Círculo rojo: genotipos de menor sobrevivencia. Círculo azul continuo: genotipos de mayor sobrevivencia. Círculo azul discontinuo: alto ITPST e ITLTP. Únicamente se indican las identificaciones numéricas de los genotipos que se seleccionaron posteriormente.

Se seleccionaron como “tolerantes” aquellos genotipos que presentaron mayores IT y los que no presentaron clones muertos en ninguno de los tratamientos al final del ensayo, y como “susceptibles” los que presentaron mayor cantidad de plantas muertas (Tabla 1.12). El genotipo 2-19 fue seleccionado pero finalmente no se utilizó en los ensayos posteriores porque no se obtuvo el número necesario de clones.

1.12: Genotipos seleccionados a partir del ensayo 3 para continuar con el estudio.

En color verde se indican los motivos relacionados con la tolerancia a la salinidad, y en rojo con la susceptibilidad.

Genotipo	Motivo de selección
1-8	Alta tolerancia
1-13	Alta sobrevivencia
1-15	Alta sobrevivencia
1-19	Alta tolerancia
2-6	Alta tolerancia
2-10	Alta tolerancia
2-19	Alta tolerancia
8-3	Alta tolerancia
10-19	Alta tolerancia
14-1	Alta tolerancia
2-13	Baja sobrevivencia
2-16	Baja sobrevivencia
2-17	Baja sobrevivencia
2-18	Baja sobrevivencia
2-20	Baja sobrevivencia
8-9	Baja sobrevivencia
10-11	Baja sobrevivencia
10-12	Baja sobrevivencia
14-2	Baja sobrevivencia
14-8	Baja sobrevivencia

2.2. Ensayo 4: Tolerancia a salinidad de 19 genotipos seleccionados en el ensayo 3 y 17 genotipos del cultivar Pampa INTA

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos y tratamientos para PST y para ITPST a 28 ddi, e interacción entre genotipo y tratamiento en el PST (Tabla 1.13). Los genotipos también presentaron diferencias significativas en la sobrevivencia en 400 mM NaCl.

Tabla 1.13: Comportamiento promedio de los genotipos de *Lotus tenuis* evaluados en el ensayo 4 para las variables estudiadas. Media, coeficiente de variación (C.V.), desvío estándar (D.E.), valores máximo y mínimo y p-valor para Genotipo, Tratamiento e Interacción Genotipo*Tratamiento.

Variable (unidad)	Media	C.V.	D.E.	Mín.	Máx.	p-valor Genotipo	p-valor Tratamiento	p-valor Interacción
PST (g)	72,82	57,88	42,14	5,40	244,90	<0,0001	<0,0001	<0,0001
ITPST	0,60	43,60	0,26	0,15	1,54	0,0005	<0,0001	0,9838
Sobrevivencia (días)	25,64	4,59	17,91	14,00	29,00	<0,0001	-	-

En color gris se indican los casos con diferencias significativas ($p < 0,05$).

Según su ITPST, los genotipos se separaron en dos grupos (Figura 1.24). Los genotipos pertenecientes al cultivar Pampa, se ubicaron mayoritariamente en el grupo menos tolerante.

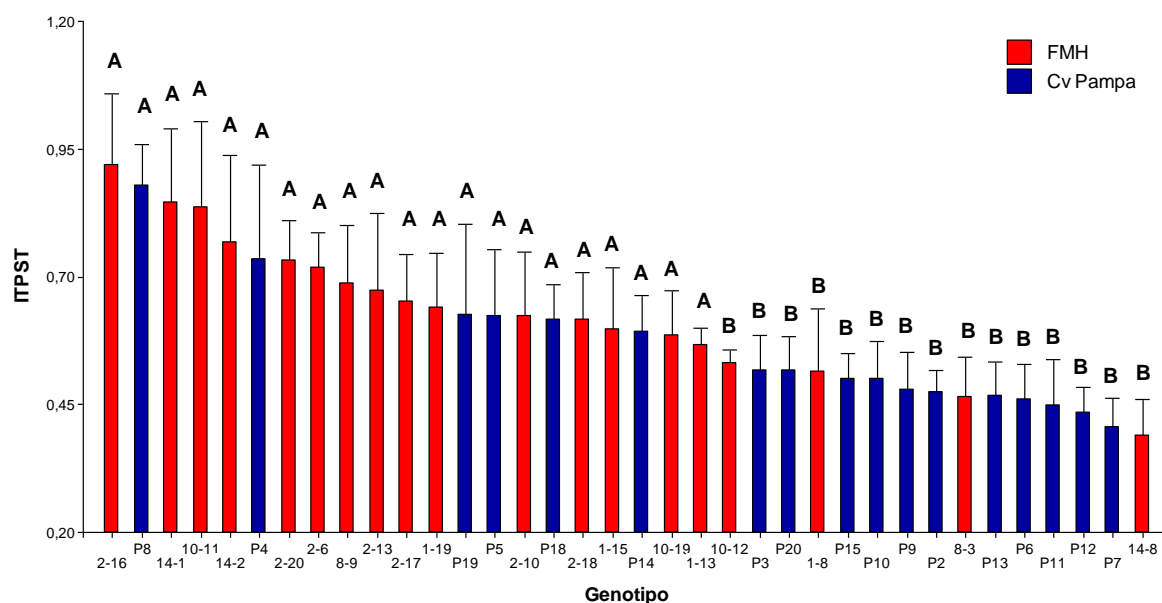


Figura 1.24: Índice de tolerancia del peso seco total de 36 genotipos en el ensayo 4. Se indica el origen de los genotipos: FMH del programa de mejoramiento de INTA Pergamino o cultivar Pampa INTA. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Por otra parte, ocho genotipos presentaron un promedio de días de sobrevivencia en 400 mM inferior al resto (Figura 1.25). La mayoría de los genotipos de baja sobrevivencia, también se encontraron en el grupo de bajo ITPST, con excepción del genotipo 14-1, que presentó baja sobrevivencia y alto índice de tolerancia.

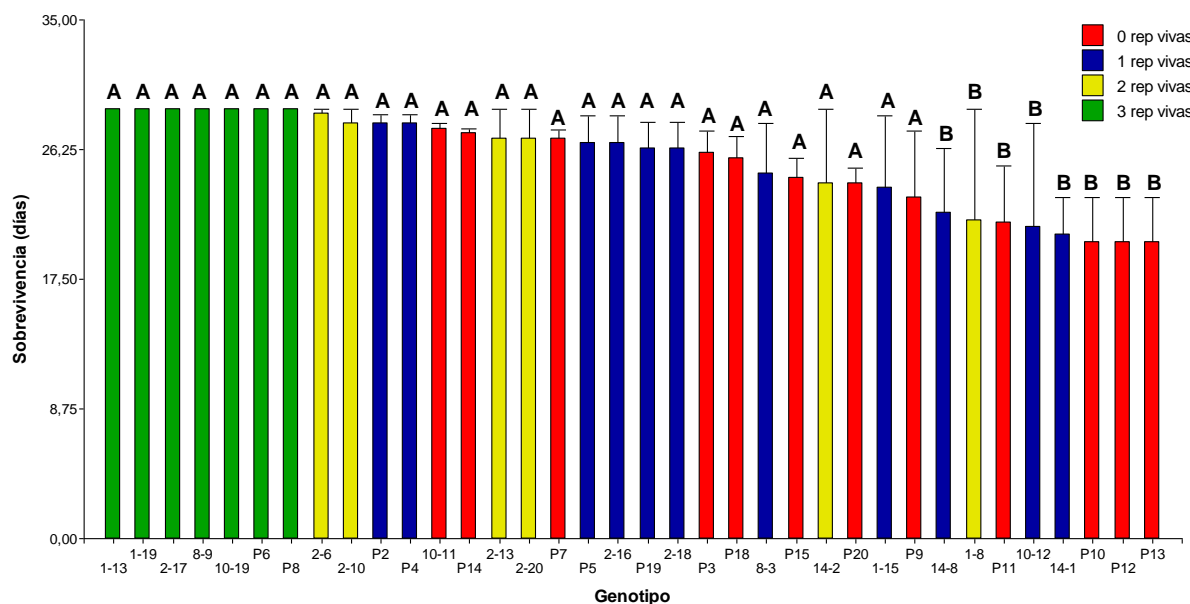


Figura 1.25: Sobrevivencia (días) en 400 mM NaCl de 36 genotipos en el ensayo 4. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC. Se asignaron distintos colores según la cantidad de repeticiones vivas en 400 mM al final del ensayo.

Todos los clones de los genotipos 10-11, P3, P7, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P18 y P20 murieron en 400 mM antes del final del ensayo (Figura 1.25). Además, P13 no presentó clones vivos en 200 mM. El genotipo 1-13 no había presentado plantas muertas en el ensayo anterior y mantuvo este comportamiento.

Debido a las tendencias observadas, se realizó la prueba Mann-Whitney U de diferencia entre dos medias agrupando a los genotipos según su origen. Se encontraron diferencias tanto para ITPST como para la Sobrevivencia en días, siendo mayores las medias de los genotipos provenientes de las FMH en ambos casos (Figura 1.26). También resultó significativa ($p = 0,0001$) la prueba de Chi-cuadrado considerando las frecuencias de plantas vivas y muertas en cada grupo al final del ensayo.

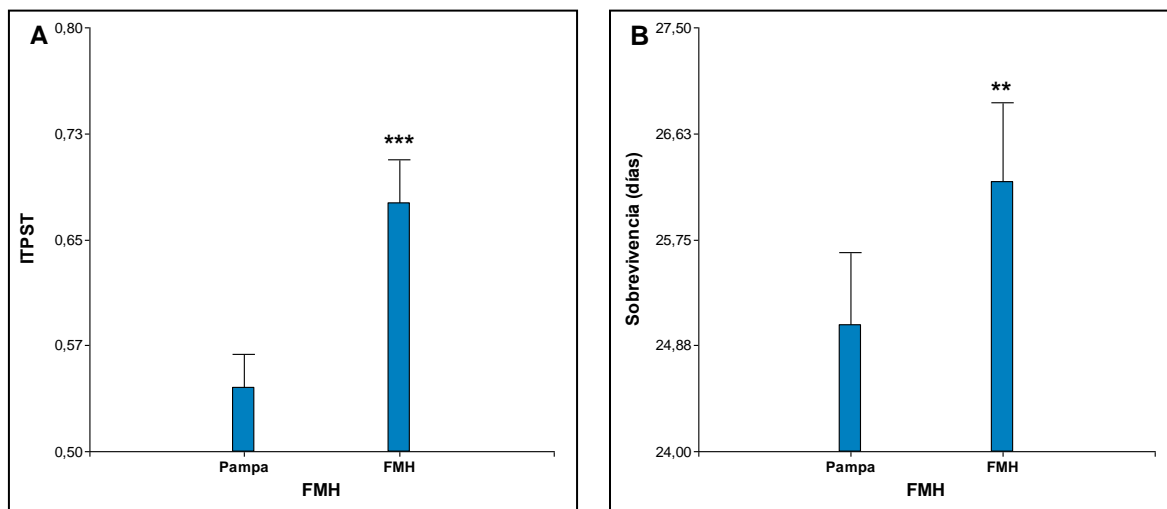


Figura 1.26: Peso seco total (A) y Sobrevivencia en 400 mM NaCl (B) de los genotipos evaluados en el ensayo 4 agrupados según su origen. Las barras indican medias y error estándar. (**) $P < 0,01$; (***) $P < 0,001$.

A partir de estos resultados, se seleccionaron tres genotipos provenientes del cultivar Pampa INTA y cinco provenientes de las FMH (Tabla 1.14). Para estos últimos, se tuvo en cuenta el comportamiento en el ensayo 3. Los genotipos 2-6 y 1-19 se seleccionaron por presentar alta tolerancia en los dos ensayos y buena sobrevivencia en el último. Por el contrario, el genotipo 14-8 presentó mala sobrevivencia en los dos ensayos y baja tolerancia en el ensayo 4. El genotipo 10-11 no tuvo clones sobrevivientes en 400 mM NaCl y su sobrevivencia en el ensayo anterior también fue mala. Sin embargo, su ITPST estuvo entre los más altos, por lo que se seleccionó por esta particularidad. El genotipo 1-13 presentó muy buena sobrevivencia en los dos ensayos, siendo el único que no presentó plantas muertas en ningún caso. Los genotipos del cultivar Pampa INTA se habían agregado con el objetivo de encontrar susceptibilidad, por lo que la selección se realizó con ese criterio.

Tabla 1.14: Resumen del comportamiento de los genotipos evaluados en el ensayo 4. Se especifica el origen, el comportamiento que motivó su selección en el ensayo 3, el ITPST, el número de repeticiones vivas en los dos tratamientos y la sobrevivencia en 400 mM NaCl y los genotipos seleccionados. En color verde se indican las características y valores relacionados con la tolerancia y en naranja los relacionados con la susceptibilidad.

Genotipo	Origen	Ensayo 3		Ensayo 4			Seleccionados
		Comportamiento general	ITPST	Repeticiones vivas		Sobrevivencia (días)	
				200 mM	400 mM	400 mM	
2-16	FMH	Baja sobrevivencia	0,92 A	3	1	26,67 A	
P8	Cv. Pampa	sd	0,88 A	3	3	29,00 A	
14-1	FMH	Alta tolerancia	0,85 A	3	1	20,50 B	
10-11	FMH	Baja sobrevivencia	0,82 A	2	0	27,67 A	x
14-2	FMH	Baja sobrevivencia	0,77 A	2	2	24,00 A	
2-20	FMH	Baja sobrevivencia	0,73 A	3	2	27,00 A	
P4	Cv. Pampa	sd	0,73 A	3	1	28,00 A	
2-6	FMH	Alta tolerancia	0,72 A	2	2	28,67 A	x
8-9	FMH	Baja sobrevivencia	0,69 A	3	3	29,00 A	
2-13	FMH	Baja sobrevivencia	0,67 A	1	2	27,00 A	
2-17	FMH	Baja sobrevivencia	0,65 A	1	3	29,00 A	
1-19	FMH	Alta tolerancia	0,64 A	3	3	29,00 A	x
P19	Cv. Pampa	sd	0,63 A	3	1	26,33 A	
2-10	FMH	Alta tolerancia	0,62 A	2	2	28,00 A	
P18	Cv. Pampa	sd	0,62 A	3	0	25,67 A	
P5	Cv. Pampa	sd	0,62 A	3	1	26,67 A	
2-18	FMH	Baja sobrevivencia	0,61 A	3	1	26,33 A	
1-15	FMH	Alta sobrevivencia	0,60 A	3	1	23,67 A	
10-19	FMH	Alta tolerancia	0,59 A	3	3	29,00 A	
P14	Cv. Pampa	sd	0,59 A	3	0	27,33 A	
1-13	FMH	Alta sobrevivencia	0,57 A	3	3	29,00 A	x
10-12	FMH	Baja sobrevivencia	0,53 B	3	1	21,00 B	
P20	Cv. Pampa	sd	0,52 B	2	0	24,00 A	
P3	Cv. Pampa	sd	0,52 B	3	0	26,00 A	
1-8	FMH	Alta tolerancia	0,51 B	3	2	21,50 B	
P10	Cv. Pampa	sd	0,50 B	3	0	20,00 B	
P15	Cv. Pampa	sd	0,50 B	3	0	24,33 A	
P9	Cv. Pampa	sd	0,48 B	3	0	23,00 A	
8-3	FMH	Alta tolerancia	0,47 B	3	1	24,67 A	
P13	Cv. Pampa	sd	0,47 B	0	0	20,00 B	x
P2	Cv. Pampa	sd	0,47 B	3	1	28,00 A	
P6	Cv. Pampa	sd	0,46 B	2	3	29,00 A	
P11	Cv. Pampa	sd	0,45 B	3	0	21,33 B	
P12	Cv. Pampa	sd	0,43 B	2	0	20,00 B	x
P7	Cv. Pampa	sd	0,41 B	3	0	27,00 A	x
14-8	FMH	Baja sobrevivencia	0,38 B	1	1	22,00 B	x

2.3. Ensayo 5: Tolerancia a salinidad de 8 genotipos seleccionados a partir del ensayo 4

Si bien existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos y tratamientos para PST, no se encontraron diferencias para ITPST (Tabla 1.15). Los genotipos presentaron diferencias significativas en la sobrevivencia en 400 mM NaCl.

Tabla 1.15: Comportamiento promedio de los genotipos de *Lotus tenuis* para las variables estudiadas y sus índices de tolerancia (IT) en el Ensayo 3. Media, coeficiente de variación (C.V.), desvío estándar (D.E.), valores máximo y mínimo y p-valor para Genotipo, Tratamiento e interacción Genotipo*Tratamiento.

Variable (unidad)	Media	C.V.	D.E.	Mín.	Máx.	p-valor Genotipo	p-valor Tratamiento	p-valor Interacción
PST (g)	86,75	94,00	81,54	3,20	405,4	<0,0001	<0,0001	0,2958
ITPST	0,32	67,24	0,22	0,02	0,83	0,3844	0,5892	0,6509
Sobrevivencia (días)	15,63	45,29	7,08	7,00	28,00	<0,0001	-	-

En color gris se indican los casos con diferencias significativas ($p < 0,05$).

El genotipo 1-13 se destacó por su sobrevivencia, presentando la mayor media en días (Figura 1.27).

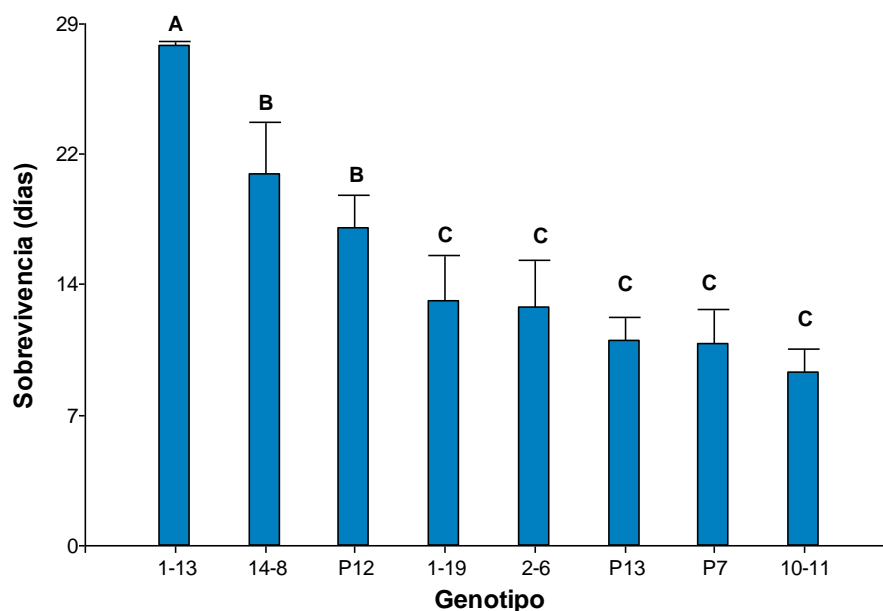


Figura 1.27: Sobrevivencia en 400 mM NaCl de 8 genotipos en el ensayo 5. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba DGC.

Además, mientras el resto de los genotipos no presentó plantas vivas en 400 mM al finalizar el ensayo, solo una repetición del genotipo 1-13 murió por causa de la salinidad. En 200 mM el 100 % de los clones de dicho genotipo sobrevivió a la experiencia (Tabla 1.16). Los genotipos que tuvieron peor comportamiento fueron P13 y 10-11, ya que en ambos casos ninguna planta tratada con NaCl sobrevivió al ensayo y estuvieron entre los que presentaron menor sobrevivencia en días.

Tabla 1.16: Efecto del NaCl sobre la sobrevivencia de los genotipos en el ensayo 5. En 200 mM NaCl únicamente se registró el porcentaje de plantas vivas al final del ensayo, mientras que en 400 mM también se registró la sobrevivencia en días. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Genotipo	200 mM NaCl	400 mM NaCl	
	% Plantas vivas	% Plantas vivas	Sobrevivencia (días)
1-13	100	80	27,8 A
14-8	100	0	20,6 B
P12	20	0	17,6 B
1-19	80	0	13,6 C
2-6	80	0	13,2 C
P13	0	0	11,4 C
P7	40	0	11,2 C
10-11	0	0	9,6 C

Se realizó un análisis de componentes principales a partir de las variables de los ensayos 4 y 5 (Figura 1.28), lo cual permitió observar que los tres genotipos pertenecientes al cultivar Pampa INTA fueron más susceptibles al estrés salino (menor ITPST y sobrevivencia) que los que provenientes de las FMH.

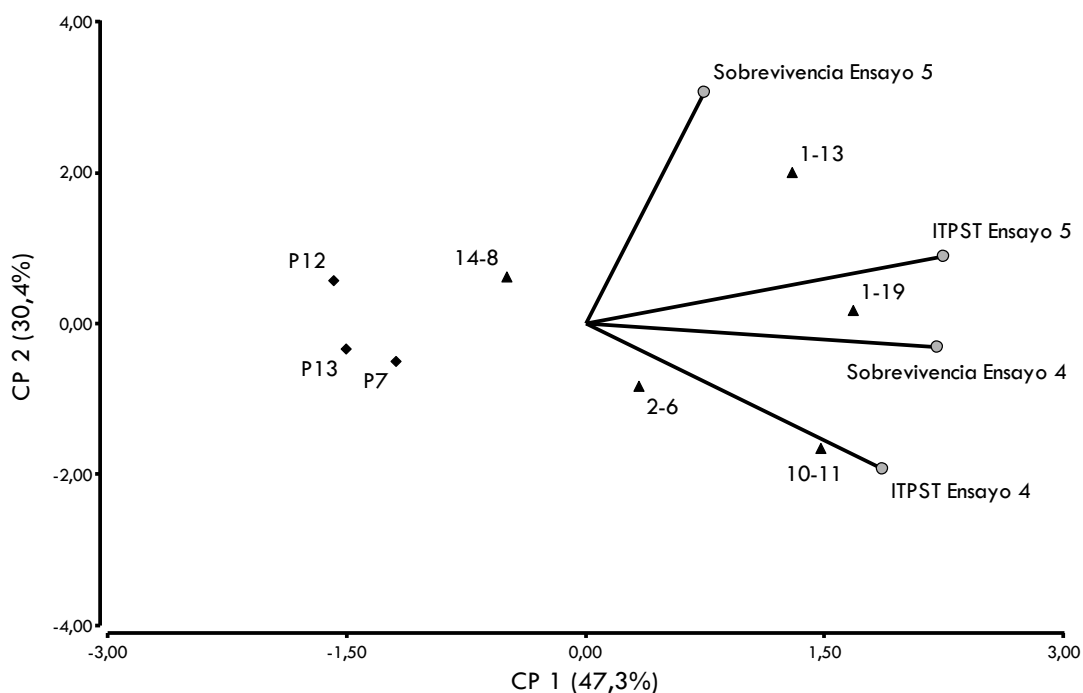


Figura 1.28: Análisis de componentes principales de las variables de los ensayos 4 y 5. Se analizaron las variables ITPST y Sobrevivencia en 400 mM NaCl de los ensayos 4 y 5 utilizando a los genotipos presentes en ambas evaluaciones como criterio de clasificación.

El genotipo 1-13 presentó una alta sobrevivencia en los tres ensayos en los que fue incluido y un ITPST aceptable, por lo que se seleccionó como genotipo tolerante para el posterior ensayo de expresión génica. El genotipo P13 presentó baja sobrevivencia y bajo ITPST por lo que se seleccionó como genotipo susceptible.

DISCUSIÓN

1. Tolerancia a la salinidad de germoplasma de *L. tenuis*

L. tenuis es considerada una especie tolerante a la salinidad en comparación con otras especies glicófitas relacionadas (Ayers, 1948; Sanchez, Pieckenstain, Escaray, *et al.*, 2011; Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011; Teakle, 2008; Uchiya *et al.*, 2016; Vignolio & Fernández, 2006), y se ha hallado variabilidad en la tolerancia a la salinidad en germoplasma de la especie (Ixtaina & Mujica, 2004; Pesqueira, 2008; Schachtman & Kelman, 1991; Teakle *et al.*, 2010). En base a esto, en el presente trabajo se realizaron evaluaciones de comportamiento frente a la salinidad de distintos tipos de materiales de *L. tenuis* con el objetivo de detectar y seleccionar germoplasma tolerante y susceptible al estrés salino en fase vegetativa juvenil para poder compararlo posteriormente en ensayos de expresión génica.

En primer lugar, se evaluó en dos ensayos el comportamiento de familias de medios hermanos (FMH), pertenecientes al Programa de Mejoramiento genético de la especie de la UI UNNOBA-INTA, ante tres concentraciones salinas (0, 150 y 300 mM de NaCl). Debido a que en los ensayos realizados con FMH todas las plantas sobrevivieron a la experiencia, el criterio elegido para evaluar la tolerancia al estrés fue la capacidad de producción de materia seca, considerada de suma importancia en la selección de germoplasma tolerante en especies forrajeras (Ixtaina & Mujica, 2004; Pesqueira, 2008).

En los dos ensayos existió una reducción del crecimiento de las FMH a medida que se incrementó la concentración salina (Figuras 1.4 y 1.5). Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros autores, que indicaron que a pesar de que *L. tenuis* se considera una especie tolerante a la salinidad, esta afecta el crecimiento de las plantas (Ayers, 1948; Ixtaina & Mujica, 2004; Rogers *et al.*, 1997; Schachtman & Kelman, 1991). Por otro lado, esta reducción en el crecimiento dependió del tiempo de exposición de las plantas a la salinidad (Tablas 1.2 y 1.3). Estudios realizados en *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare* y *Beta vulgaris* han demostrado que la disminución del crecimiento en situación de estrés salino está asociada a la reducción de la división o de la expansión celular (Hawker & Walker, 1978; Papp, Ball, & Terry, 1983; Termaat & Munns, 1986). En correspondencia con estos resultados, la manifestación de un mayor efecto de la salinidad en la segunda fecha de evaluación pudo deberse a que, al estar expuestas durante más tiempo al estrés, las plantas presentaron mayor daño en las células y menor división y expansión de las mismas. Sin embargo, también pudo deberse a que hasta la primera fecha de evaluación, los genotipos presentaron una alta tasa de crecimiento, lo cual puede reducir la tasa de

acumulación de iones tóxicos en las plantas haciendo que el crecimiento supere a la manifestación del daño producido por el NaCl (Munns, 2002).

La producción de biomasa en condiciones salinas respecto a condiciones control resulta uno de los parámetros que caracteriza la tolerancia y permite discriminar germoplasma tolerante del susceptible (Shabala, 2017a). En el presente trabajo, la tolerancia se estimó principalmente a partir del índice de tolerancia del peso seco total (ITPST). Los valores medios de ITPST fueron de 0,725 en el ensayo 1 (Tabla 1.4) y de 0,742 en el ensayo 2 (Tabla 1.9), lo cual indica una baja reducción en la producción de materia seca y una marcada tolerancia al comparar con trabajos realizados por otros autores con la especie utilizando igual o menor concentración de NaCl (Paz *et al.*, 2012; Sanchez, Pieckenstain, Escaray, *et al.*, 2011; Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011; Teakle, Snell, *et al.*, 2010; Uchiya *et al.*, 2016). Esto puede deberse a que el germoplasma utilizado en los ensayos proviene de poblaciones colectadas en ambientes marginales de la provincia de Buenos Aires que presentan condiciones salinas, y puede existir una adaptación previa a la presencia de sales. Es decir, es posible que a través de las generaciones se hayan seleccionado de forma natural genotipos con capacidad para sobrevivir a condiciones estresantes, generando tolerancia genética en las poblaciones y en las FMH derivadas de las mismas (Orcutt & Nilsen, 2000; Taiz & Zeiger, 2002).

Numerosas evidencias demuestran la existencia de variabilidad fenotípica en germoplasma de *Lotus tenuis* (Andrés & Rosso, 2007; Ixtaina & Mujica, 2010b, 2010a; Kade *et al.*, 2003; Mendoza *et al.*, 2000; Stoffella *et al.*, 1998) y de variabilidad en la tolerancia a la salinidad en esta especie (Ixtaina & Mujica, 2004; Pesqueira, 2008; Schachtman & Kelman, 1991; Teakle, Snell, *et al.*, 2010). En el presente trabajo, existió variabilidad entre FMH para los parámetros de crecimiento evaluados (Tablas 1.4 y 1.9). Sin embargo, al considerar los índices de tolerancia no se obtuvieron resultados consistentes. En el ensayo 1, existieron diferencias entre FMH para los índices de tolerancia estimados e interacción entre FMH y fecha de evaluación (Tablas 1.4 y 1.6). Sin embargo, en el ensayo 2, no existieron diferencias significativas entre las FMH para los índices de tolerancia de las variables relacionadas con la producción de biomasa (Tabla 1.9) y las diferencias detectadas para los índices de las otras variables no fueron consistentes con los resultados del ensayo 1 (Figura 1.22). Las plantas presentaron un menor crecimiento en el segundo ensayo, pero la reducción del mismo por efecto del NaCl fue menor, sobre todo en la primera fecha de evaluación (Tablas 1.2 y 1.3). Esto pudo deberse, en parte, a la variación ambiental, ya que si bien los ensayos se realizaron en el mismo invernáculo, las épocas del año no coincidieron, lo cual produjo un efecto en la temperatura media, la amplitud térmica, las horas de luz y, probablemente, la humedad del ambiente. Estas condiciones tienen efecto

sobre la tolerancia a la salinidad al afectar, por ejemplo, la tasa de transpiración y el potencial hídrico de las hojas (Flowers, 2004; Munns & Tester, 2008).

Por otra parte, en estudios anteriores con estas mismas FMH se había determinado una alta variabilidad dentro de las mismas manifestada por altos coeficientes de variación intrafamiliares al evaluar, a campo y sin restricciones, variables relacionadas con la producción de biomasa (Franco, 2014), y también al evaluar la variabilidad molecular utilizando marcadores microsatélites (Affinito, 2014). Se determinó que el 97,48 % de la variancia genética molecular se encontraba dentro de las FMH y el 2,52 % entre las mismas. Esta mayor variabilidad intrafamiliar se debe a la alogamia y autoincompatibilidad de la especie (Lundqvist, 1993) y está de acuerdo con lo encontrado en otras especies del género *Lotus* (Alem *et al.*, 2011; Savo Sardaro, Atallah, Tavakol, Russi, & Porceddu, 2008). La variabilidad existente entre genotipos de una misma FMH pudo generar un comportamiento inconsistente en la tolerancia a la salinidad entre las distintas evaluaciones.

Debido a la necesidad de encontrar genotipos que mantuvieran su comportamiento, se dejaron de lado las evaluaciones con FMH y se pasó a trabajar en cámara de crecimiento en condiciones controladas y a nivel de genotipo, realizando propagación vegetativa, para tener exactamente el mismo material evaluado bajo distintas concentraciones salinas. Además, se adicionó la concentración final del NaCl (0, 200 y 400 mM) desde el comienzo del ensayo, para evitar la aclimatación de las plantas al estrés, es decir, que incrementen su tolerancia debido a la exposición al mismo (Taiz & Zeiger, 2002). Debido al incremento en la concentración y a la forma en la que fue impuesto el estrés, algunas plantas no sobrevivieron. Por esto, además de ITPST, se evaluó la sobrevivencia tanto en el tiempo como en cantidad de clones vivos por genotipo al finalizar los ensayos.

Se trabajó con individuos pertenecientes a algunas FMH y, si bien en el cribado inicial realizado en el ensayo 3 se encontró variabilidad para la tolerancia a la salinidad, se añadieron genotipos pertenecientes al cultivar Pampa INTA considerando que alguno de ellos podía ser más sensible al estrés salino que aquellos estudiados previamente. Este cultivar fue obtenido sobre suelos de tipo natracuol de la Provincia de Buenos Aires con el objetivo de que presentara tolerancia a situaciones de estrés salino alcalino. Sin embargo Pesqueira (2008) determinó que presenta alta heterogeneidad morfofisiológica entre genotipos y, luego de someterlo a un tratamiento con 150 mM NaCl durante 15 días, presentó mayor reducción respecto al control en el peso fresco y peso seco que los cultivares comerciales Esmeralda y Chajá. En el presente trabajo, los genotipos del cultivar Pampa INTA presentaron en promedio menor ITPST y menor sobrevivencia que los provenientes de FMH (Figura 1.26) y uno de ellos fue elegido como genotipo susceptible para un posterior estudio de expresión génica.

La selección final de los genotipos contrastantes estuvo basada principalmente en la sobrevivencia. La variabilidad en la misma coincidió con la encontrada por Pesqueira (2008) al evaluar genotipos del cultivar Pampa INTA en 300 mM NaCl y con la encontrada por Paz *et al.* (2005) al analizar 105 genotipos provenientes de una población colectada en la Depresión del Salado en 300 mM NaCl.

A pesar de las dificultades encontradas para hallar materiales contrastantes en su comportamiento frente a salinidad en *L. tenuis*, finalmente se seleccionó un genotipo proveniente de una FMH del programa de mejoramiento genético como tolerante, y un genotipo proveniente del cultivar Pampa INTA como susceptible.

2. Correlación entre los contenidos de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ y la tolerancia a la salinidad en FMH

El estrés salino afecta a las plantas en dos fases: en la primera domina el efecto osmótico, y en la segunda, que es en la cual pueden diferenciarse especies y genotipos por su tolerancia, el efecto específico (Munns, 1993, 2002; Munns & Tester, 2008). Esta segunda fase ocurre debido a la absorción excesiva de iones sodio (Na⁺) y cloruro (Cl⁻), lo que genera daños a nivel celular. A su vez el exceso de estos iones afecta la absorción y el transporte de otros nutrientes, como el K⁺ y el Ca²⁺, influyendo sobre la disponibilidad de los mismos (Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2002; Parida & Das, 2005). Debido a su gran similitud química, el Na⁺ desplaza al K⁺ en sus funciones y disminuye la relación K⁺/Na⁺ del citoplasma afectando negativamente a los procesos metabólicos que dependen del K⁺. En coincidencia con esto, en este estudio, existieron diferencias entre el control (0 mM NaCl) y los tratamientos salinos en los contenidos de iones en todos los tejidos evaluados, con un incremento en los contenidos de Na⁺ y de Cl⁻ y una disminución en el de K⁺ (Figura 1.18). Esto fue reportado con anterioridad para la especie (Escaray *et al.*, 2019; Pesqueira, 2008; Sanchez *et al.*, 2005; Sanchez, Pieckenstain, Escaray, *et al.*, 2011; Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011; Teakle, Amtmann, *et al.*, 2010; Teakle *et al.*, 2007, 2006). Sánchez *et al.* (2005) observaron un aumento del contenido de Na⁺ y disminución del de K⁺ respecto al control tanto en plántulas de *L. tenuis* expuestas a 25, 50 y 75 mM de NaCl, como en plantas de un mes expuestas a 200 mM de NaCl durante 15 días. Pesqueira (2008) reportó un incremento en el contenido de Na⁺ en parte aérea y raíz y disminución de K⁺ en parte aérea en genotipos de un cultivar de *L. tenuis* tratados con 150 mM de NaCl durante 26 días, y un efecto similar en cultivares expuestos a 150 mM durante 15 días, que además manifestaron un incremento de Cl⁻ en parte aérea y raíz. Por otra parte, en un ensayo con poblaciones naturalizadas de la especie expuestas a 150 mM durante 35 días, encontró un aumento del contenido de Na⁺ y de Cl⁻ y una disminución de K⁺ en hojas. Recientemente,

Escaray *et al.* (2019) estudiaron las concentraciones de Na^+ , Cl^- y K^+ en hoja, tallo y raíz de plántulas de *L. tenuis* en una concentración final de 150 mM NaCl durante 21 días con resultados similares a los de este trabajo. Lo mismo fue hallado por otros estudios utilizando la misma concentración salina durante períodos similares (Sanchez, Pieckenstain, Escaray, *et al.*, 2011; Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011).

A pesar de lo expuesto anteriormente, en este trabajo no siempre existieron diferencias significativas entre los tratamientos de 150 y 300 mM NaCl. En hoja, existieron diferencias para el contenido de Na^+ y de Cl^- , y en tallo para el de Cl^- y el de Na^+ a 16 ddi (Figura 1.18). Esto coincide con lo hallado por Teakle *et al.* (2006) al evaluar el contenido de iones en parte aérea (sin diferenciar hoja de tallo) en un cultivar de la especie expuesto a las mismas concentraciones. En el caso del K^+ , en tallo existió menor contenido en las dos fechas, y en hoja a 16 ddi, lo cual difiere de lo hallado por con Teakle *et al.* (2006), quienes no detectaron diferencias en su contenido en parte aérea entre los tratamientos de 150 y 300 mM, a pesar de la disminución en el contenido de este catión respecto al control. Para las especies glicófitas es común que el contenido de K^+ disminuya a medida que se incrementa la concentración de NaCl.

En raíz, existió una disminución significativa del contenido de K^+ en el tratamiento de 300 mM de NaCl respecto del de 150 mM. No existen otros trabajos en la especie que comparen contenido de iones en raíz bajo estas concentraciones. En las especies forrajeras *Melilotus siculus*, *Trifolium michelianum* y *Medicago polimorfa* se evaluó el contenido de Na^+ , K^+ y Cl^- luego de 22 días de exponer a las plántulas a concentraciones entre 0 y 450 mM NaCl (Teakle, Bowman, Barrett-Lennard, Real, & Colmer, 2012). *M. siculus*, considerada tolerante a la salinidad, incrementó el contenido de Cl^- y mantuvo el contenido de Na^+ y K^+ en raíz en el tratamiento de 300 mM NaCl respecto al de 150 mM.

Por otra parte, en este estudio se evaluó el contenido de iones en tres momentos del ensayo: al inicio del mismo, a los 16 días de iniciados los tratamientos y a los 29 días. El incremento observado en el contenido de Na^+ y Cl^- en hoja con el paso del tiempo (Figura 1.18) puede estar relacionado con el hecho de que las especies glicófitas no regulan la concentración de sal en sus hojas como lo hacen las halófitas, y el Na^+ y Cl^- se acumulan (Flowers & Yeo, 1986; Munns & Termaat, 1986). Si bien en raíz se observó un incremento en el contenido de estos iones a los 16 ddi respecto al inicio del ensayo, no hubo diferencias significativas entre 16 y 29 ddi. Esto pudo deberse a que las raíces tienen mayor habilidad para controlar el contenido de Na^+ y Cl^- , evitando su acumulación con el tiempo, para incluso presentar concentraciones menores a las de la solución salina circundante (Munns, 2005). Así mismo, los contenidos de Na^+ y Cl^- en raíz suelen ser menores que en la parte aérea de la planta, tal como ocurrió en este estudio con FMH de *L. tenuis*.

En el caso del K^+ , se observó un menor contenido en hoja y tallo en la tercera fecha de medición respecto de la segunda. Esta disminución no ocurrió en raíz, debido a la habilidad para controlar el contenido de Na^+ que ya fue mencionada. Cuando existe exceso de Na^+ , este desplaza al K^+ en sus funciones debido a que presentan una estructura fisicoquímica similar, y también afecta su ingreso a la planta (Ghars *et al.*, 2008; Maathuis & Amtmann, 1999).

En el presente trabajo se evaluó la existencia de correlación entre la tolerancia a salinidad, estimada a partir de ITPSA e ITPST, y los contenidos de iones en los distintos tejidos (Tabla 1.8). Al comparar materiales de una misma especie suele encontrarse una correlación negativa entre la tolerancia a salinidad y la acumulación de Na^+ en hojas (Munns & Termaat, 1986; Munns & Tester, 2008). Sin embargo, Pesqueira (2008) había hallado una correlación positiva entre la tolerancia, estimada como el porcentaje del peso seco aéreo de poblaciones de *L. tenuis* bajo un tratamiento de 150 mM NaCl respecto al control, y el contenido de Na^+ en hoja. El resultado fue relacionado con la existencia de una eficiente acumulación del mismo en la vacuola. Sin embargo, en coincidencia con este trabajo, en un estudio con 40 materiales de *L. tenuis* provenientes de distintas partes del mundo sometidos a un tratamiento de 300 mM NaCl, no se encontró esta correlación (Teakle, Snell, *et al.*, 2010). En el presente trabajo existió una alta correlación entre los contenidos de Na^+ y Cl^- (Tabla 1.8) que ya había sido reportada anteriormente (Teakle, Snell, *et al.*, 2010) y una correlación significativa y negativa entre la tolerancia a salinidad y el contenido de Cl^- en hoja, lo cual podría indicar una mejor exclusión de este ion en plantas tolerantes. En este sentido, se probó que la exclusión de Cl^- bajo estrés salino y la de Na^+ y Cl^- en una combinación de salinidad y anegamiento son más eficientes en *L. tenuis* que en *L. corniculatus* (Teakle *et al.*, 2007), y Teakle *et al.* (2006) asociaron el mantenimiento de un bajo contenido de Na^+ y Cl^- en parte aérea con la tolerancia a la salinidad. Sin embargo otros estudios en *L. tenuis* no encontraron correlación entre el contenido de Cl^- y la tolerancia a salinidad (Pesqueira, 2008; Teakle, Snell, *et al.*, 2010).

En el caso del K^+ las correlaciones con la tolerancia resultaron significativas no solo para el contenido en hoja sino también en tallo. Es importante considerar que la salinidad afecta la absorción de K^+ debido a que la presencia de Na^+ en el suelo afecta la disponibilidad de K^+ a partir de la competencia por los transportadores catiónicos (Tester & Davenport, 2003). Además, se genera la despolarización de la membrana plasmática lo cual afecta la absorción pasiva de K^+ (Shabala & Cuin, 2007). Debido a la importancia que presenta el K^+ en las células, aquellas plantas que logran mantener su contenido lo más alto posible pueden presentar mejor comportamiento frente a la salinidad (Shabala & Pottosin, 2014), y se ha reportado una alta correlación entre el contenido de K^+ en parte aérea y la tolerancia

de las plantas en numerosas especies (Shabala, 2017b; Shabala & Pottosin, 2014). Sin embargo, esta asociación no se había informado previamente en *L. tenuis* (Pesqueira, 2008; Teakle, Snell, *et al.*, 2010).

En referencia al efecto que tiene el Na^+ en la homeostasis de K^+ , la relación K^+/Na^+ es considerada determinante para la tolerancia a la salinidad, e incluso más importante que mantener una baja concentración de Na^+ (Tester & Davenport, 2003). En el presente estudio existió correlación significativa y positiva entre dicha relación en hoja y la tolerancia a salinidad. Si bien Pesqueira (2008) había encontrado una correlación positiva entre la relación K^+/Na^+ en hojas apicales y la tolerancia a salinidad al evaluar distintas especies del género *Lotus*, no obtuvo los mismos resultados al evaluar poblaciones de *L. tenuis*. Así mismo, Teakle, Snell, *et al.* (2010) no encontraron la mencionada correlación al evaluar 40 materiales de la especie. Es importante destacar que en todos estos casos, incluyendo el presente trabajo, la relación K^+/Na^+ estudiada no fue la citosólica sino la del tejido, y es en el citosol donde efectivamente la homeostasis de K^+ tiene un papel crucial en la tolerancia al estrés salino (Shabala & Cuin, 2007).

Todas las FMH de *L. tenuis* evaluadas presentaron un incremento en el contenido de Cl^- y una disminución en el contenido de K^+ en hojas, tallos y raíces tratadas con NaCl respecto al control. Sin embargo, a pesar de las correlaciones encontradas, las diferencias entre las FMH para el contenido de iones y la relación K^+/Na^+ no permitieron realizar una clasificación de las mismas según su tolerancia que coincidiera con la clasificación que se les había dado según la reducción de su crecimiento en el ensayo 1. La FMH 2248, que había evidenciado menor tolerancia a la salinidad, presentó, en promedio, alto contenido de Na^+ y de Cl^- y menor contenido de K^+ y relación K^+/Na^+ (Figura 1.19). Esto podría indicar una mayor toxicidad iónica por la incapacidad de esta FMH para excluir iones de los tejidos o tolerarlos, lo que pudo explicar la reducción en su crecimiento respecto al control. Esto coincidiría con Teakle *et al.* (2006), quienes asociaron un mayor efecto del estrés salino en *L. tenuis* con una mayor acumulación de Na^+ y Cl^- en la parte aérea. Sin embargo, Pesqueira (2008) había encontrado que los genotipos y poblaciones más tolerantes eran también los que más Na^+ acumulaban en hoja. Esto puede explicarse por la existencia de “tolerancia tisular”, es decir, cuando a pesar de que existen altos contenidos de iones, estos no resultan tóxicos debido a mecanismos como la compartimentalización; o bien de “tolerancia osmótica”, es decir, que los iones tengan algún papel en la osmorregulación (Munns & Tester, 2008; Roy, Negrão, & Tester, 2014). Resultados anteriores en *L. tenuis* indicaron la existencia de distintos mecanismos de tolerancia, con materiales que excluyeron Na^+ y Cl^- de hojas y tallos, y otros que toleraron altas concentraciones en los tejidos (Teakle, Snell, *et al.*, 2010).

Los resultados de este trabajo y de otros estudios en la especie previamente mencionados,

indican que no siempre puede relacionarse la variabilidad en la tolerancia a la salinidad con la capacidad del germoplasma para excluir o acumular Na^+ o Cl^- en los tejidos, sino que puede haber otros mecanismos involucrados, o incluso una combinación de los mismos, y esto puede depender de cada genotipo en particular. El estudio del contenido de iones en los tejidos resultó complementario, pero los mejores parámetros para seleccionar germoplasma de *L. tenuis* por su tolerancia a estrés salino fueron la disminución en la producción de materia seca respecto al control, y la sobrevivencia en condiciones salinas.

CONCLUSIONES

- La salinidad produjo una reducción significativa en el crecimiento inicial respecto de la condición control en todas las FMH de *Lotus tenuis* evaluadas, sin afectar la sobrevivencia de las mismas.
- La reducción del crecimiento fue mayor con el incremento de la concentración salina y con el transcurso del tiempo.
- La variabilidad en la tolerancia a la salinidad entre las FMH estudiadas es estrecha y, en términos generales, todas se comportan como tolerantes.
- Existe variabilidad en la tolerancia a salinidad cuando se realizan evaluaciones a nivel de genotipo.
- Existe comportamiento diferencial en la tolerancia a salinidad entre genotipos selectos de FMH y genotipos del cultivar Pampa INTA.
- La determinación de los contenidos de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ en hoja raíz y tallo permitió la caracterización complementaria de las FMH evaluadas bajo condiciones salinas, pero estos no indican por sí mismos la existencia de un mecanismo en particular para mitigar el estrés salino.

CAPITULO 2: EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL TRANSPORTE DE SODIO EN DOS GENOTIPOS DE *LOTUS TENUIS* CON COMPORTAMIENTO CONTRASTANTE FRENTE A LA SALINIDAD

INTRODUCCIÓN

El estrés salino genera inhibición en el crecimiento de las plantas, lo cual ocurre en dos fases (Munns, 1993). En la primera domina el efecto osmótico, que causa una disminución en la capacidad de la planta para absorber agua, debido al bajo potencial hídrico de las soluciones con altas concentraciones de sales. En la segunda fase, la inhibición del crecimiento es atribuida al efecto específico, es decir, a la toxicidad iónica que afecta el metabolismo y la nutrición de la planta (Munns & Tester, 2008; Shabala & Munns, 2017). Las diferencias en la tolerancia entre especies y genotipos se evidencian en la segunda fase (Munns & Tester, 2008). Los mecanismos de tolerancia a la salinidad pueden clasificarse en tres categorías: tolerancia osmótica, regulada por señales a larga distancia; exclusión de iones, con el fin de evitar su acumulación tóxica en las hojas; y tolerancia tisular, que implica la compartimentalización de iones a nivel celular e intracelular (Roy *et al.*, 2014).

Lotus tenuis es una leguminosa forrajera considerada tolerante a la salinidad (Ayers, 1948; Grattan *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 1997; Sanchez, Pieckenstain, Escaray, *et al.*, 2011; Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011; Schachtman & Kelman, 1991; Teakle *et al.*, 2007; Uchiya *et al.*, 2016; Vignolio & Fernández, 2006). Los mecanismos involucrados en la respuesta de esta especie al estrés salino no están totalmente aclarados. Se hallaron indicios de la presencia de ajuste osmótico tanto en la existencia de correlación positiva entre el contenido de Na⁺ en parte aérea y el crecimiento en condiciones salinas (Pesqueira, 2008), como en la acumulación de prolina en la parte aérea al exponer a la especie a altas concentraciones de NaCl (Paz *et al.*, 2012; Pesqueira, 2008). Entre los demás mecanismos existentes, se propuso como importante la exclusión de iones Na⁺ y/o Cl⁻ en condiciones salinas (Pesqueira, 2008; Teakle *et al.*, 2007, 2006) y en condiciones combinadas de anegamiento y salinidad (Teakle *et al.*, 2007, 2006). También se encontró un alto contenido de Na⁺ y Cl⁻ en tallos, lo cual reduciría su llegada a las hojas (Escaray *et al.*, 2019), y de Na⁺ en raíces, lo que indicaría selectividad a nivel de las células corticales y/o la compartimentalización en vacuolas (Pesqueira, 2008; Teakle, Amtmann, *et al.*, 2010). La mitigación del estrés oxidativo también puede ser de importancia y, al respecto, se encontró una mayor acumulación de glutatión reducido en materiales de *L. tenuis* que mostraron menor daño en condiciones salinas (Franco, 2014).

Las adaptaciones de las plantas al estrés salino parten de procesos múltiples y complejos que se han estudiado en numerosas especies. Sin embargo, es difícil distinguir los genes críticos, que determinan la tolerancia o susceptibilidad de una planta en particular, de aquellos que se activan aguas abajo de la perturbación (Munns, 2010). Los genes que se

han identificado como importantes en la tolerancia a salinidad se pueden resumir en tres categorías: transportadores iónicos, osmolitos (solutos compatibles) y factores de transcripción (Munns, 2010). La exclusión y la compartimentalización de iones implican la actividad de transportadores de membrana, cuyos genes se consideran candidatos para la mejora de la tolerancia a la salinidad en los cultivos (Deinlein *et al.*, 2014; Munns, 2005, 2010; Roy *et al.*, 2014).

La compartimentalización de Na^+ en vacuolas ayuda a mantener su contenido en el citosol en niveles que no sean tóxicos y depende de la actividad del antiporter Na^+/H^+ del tonoplasto, *NHX1* (*Na/H eXchange*), que utiliza los gradientes de H^+ generados por las H^+ -ATPasas y pirofosfatasas vacuolares (Blumwald, 2000; Blumwald & Gelli, 1997). El gen que codifica para este antiporter es considerado de suma importancia en la tolerancia a la salinidad. El incremento en su expresión en condiciones salinas se demostró en numerosas especies de importancia económica, como maíz, alfalfa y cebada (Adem, Roy, Zhou, Bowman, & Shabala, 2014; Sandhu, Cornacchione, Ferreira, & Suarez, 2017; Zörb *et al.*, 2005). Por otra parte, se conoce que su expresión constitutiva mejora la tolerancia a la salinidad de *Arabidopsis thaliana* (Apse *et al.*, 1999) y de numerosas especies glicófitas de interés agropecuario, como tomate (H. X. Zhang & Blumwald, 2001), arroz (H. Chen *et al.*, 2007), tabaco (Gouiaa *et al.*, 2012), colza (H. X. Zhang *et al.*, 2001), trigo (Xue *et al.*, 2004), entre otras (P. Agarwal *et al.*, 2014). En algunas especies también se estudió la regulación del gen *NHX1*, lo cual es fundamental para conocer efectivamente su función. En *Arabidopsis*, se observó expresión del gen reportero *GUS* (β -glucuronidasa) bajo el control del promotor de *AtNHX1* en todos los tejidos excepto en la punta de la raíz. Además, su actividad se incrementó al aplicar ácido abscísico (ABA), NaCl y KCl (Shi & Zhu, 2002). En *Beta vulgaris*, la actividad del promotor no aumentó con el ABA pero sí con estrés osmótico y KCl. También creció con la salinidad, siendo mayor al aplicar un estrés salino moderado durante dos semanas, que bajo un estrés severo de corto plazo (Adler, Blumwald, & Bar-Zvi, 2010). En arroz la actividad del promotor de *NHX1* se incrementó con el NaCl y el ABA en raíces, pero no en parte aérea (Fukuda, Nakamura, Hara, Toki, & Tanaka, 2011). Especies halófitas también mostraron un aumento de la actividad con la salinidad (Kizhakkedath, Jegadeeson, Venkataraman, & Parida, 2015; Tiwari, Patel, Chaturvedi, Mishra, & Jha, 2019). Estos hallazgos conciben con la presencia de elementos reguladores en *cis* relacionados con la respuesta a estrés como ABRE, DRE, MYB, MYC o elementos ACGT relacionados con la respuesta a ABA (P. K. Agarwal, Dave, & Agarwal, 2018).

En *Lotus tenuis* se clonó un gen del tipo *NHX* (*LtNHX1*, Genbank: EU727217.1) que en base a características funcionales y moleculares se trataría de un auténtico antiporter vacuolar del

grupo I, en correspondencia con los dos grupos de transportadores NHX intracelulares identificados en *A. thaliana* (Teakle, Amtmann, *et al.*, 2010). Además, se estudió su expresión en raíces en condiciones salinas y en un tratamiento combinado de salinidad y anegamiento, confirmando un incremento de los transcritos de entre dos y tres veces respecto al control.

El gen de la pirofosfatasa vacuolar (*VP1*) también se considera candidato en el estudio de la tolerancia a la salinidad debido a la implicancia de esta bomba de protones en la actividad de NHX1 (Munns, 2005). Como se indicó previamente, conjuntamente con la ATPasa vacuolar genera el gradiente de H⁺ necesario para la compartimentalización de sodio en vacuolas (Apse *et al.*, 1999; Gaxiola *et al.*, 1999), por lo que su expresión se induciría en presencia de NaCl (Fukuda, Chiba, *et al.*, 2004; Silva & Gerós, 2009; Toranj, Aliabad, Abbaspour, & Saeedpour, 2019). Su sobreexpresión ha mejorado el comportamiento de distintas especies frente a la salinidad, por ejemplo *Arabidopsis* (Gaxiola *et al.*, 2001), tabaco (Graus *et al.*, 2018) y algodón (Pasapula *et al.*, 2011).

Para obtener una descripción más completa de la tolerancia a la salinidad en *L. tenuis* se consideró necesario estudiar la expresión de otros genes candidatos relacionados con los mecanismos de mitigación del estrés salino que ya han sido descritos. Por ejemplo, los transportadores que participan en la excusión de iones. Al respecto, se conoce el transportador Na⁺/H⁺ SOS1 (*Salt Overly Sensitive 1*), que facilita la exclusión de sodio del citoplasma. También se trata de un antiporter del tipo NHX, pero se ubica en la membrana plasmática. Controla la absorción de sodio en las raíces y su transporte a la parte aérea y mantiene la homeostasis (Oliás *et al.*, 2009). El gen que lo codifica fue clonado de *A. thaliana* y se probó que su sobreexpresión incrementa la tolerancia a la salinidad (Shi *et al.*, 2000, 2003; Shi & Zhu, 2002). Así como SOS1 participa en la “carga” de sodio en el xilema, los transportadores HKT (*High-affinity Potassium Transporters*) participan en la “descarga”, restringiendo su llegada a las hojas. De esta forma, la actividad concertada de estos transportadores determina la cantidad de sodio que se exporta de raíces a hojas (El Mahi *et al.*, 2019). El transportador HKT1 de trigo fue el primer transportador de K⁺ identificado en plantas y fue caracterizado originariamente como simporter K⁺/H⁺ mediador de la absorción de alta afinidad de K⁺ en raíces (Schachtman & Schroeder, 1994). Más tarde se encontró que cotransporta Na⁺ y K⁺ (Rubio, Gassmann, & Schroeder, 1995). A altas concentraciones de Na⁺, su transporte mediante HKT1 puede ser más importante que el de K⁺ (Rus *et al.*, 2004).

Además de la toxicidad del sodio, es importante considerar que los excesos de cloruros

generan efectos adversos en las plantas. Los mecanismos de transporte de Cl^- han sido menos estudiados que los de Na^+ debido a que genera toxicidad a mayores concentraciones, aunque para algunas especies resulta más tóxico que el Na^+ (Munns & Tester, 2008; Teakle & Tyerman, 2010). La carga de Cl^- al xilema ocurre probablemente en forma pasiva, mediada por canales aniónicos, por lo que su control implicaría una reducción de esa carga pasiva, y también su exclusión activa (Munns & Tester, 2008). El cotransportador CCC (*cation-chloride cotransporter*) se ha propuesto como candidato en la regulación de la concentración de iones en el xilema de las raíces (Colmenero-Flores *et al.*, 2007; Shabala, 2013). Se trata de un transportador activo que media el transporte de cationes K^+ y/o Na^+ acoplados a Cl^- en relación 1:1, por lo que también es candidato para la carga de Na^+ en el xilema (Shabala, 2013). Sin embargo, existen discrepancias en cuanto a su ubicación y función (Henderson, Wege, & Gilliam, 2018). El primer gen CCC encontrado en plantas fue el gen *AXI4* de tabaco (Harling, Czaja, Schell, & Waiden, 1997). Más recientemente, este gen fue identificado en las células parenquimáticas del xilema de *A. thaliana* y su silenciamiento generó una mayor acumulación de Na^+ y Cl^- en parte aérea cuando las plantas se trataron con altas concentraciones de estos iones (Colmenero-Flores *et al.*, 2007). En otro estudio se encontró que la ubicación de CCC en *Arabidopsis* y *Vitis vinifera* es el aparato de Golgi y la red del trans-Golgi, lo cual implica su participación en el transporte de iones a larga distancia, aunque no se relacionó su expresión con incrementos en las concentraciones de NaCl (Henderson *et al.*, 2015). En *L. tenuis*, este gen fue clonado por Teakle (2008) (*LtCCC*, Genbank: EU727216.1) y se observó una expresión dos veces mayor en raíces en condiciones salinas respecto al control.

El estudio de la expresión de genes considerados de importancia en la tolerancia en genotipos de *L. tenuis* con comportamiento contrastante frente a la salinidad permite profundizar en la participación de los mismos en la mitigación del estrés y generar conocimiento sobre los mecanismos de tolerancia a la salinidad de la especie.

Hipótesis

1. Existe expresión diferencial del gen *LtNHX1*, que codifica para el antiporter Na^+/H^+ del tonoplasto, en genotipos de *Lotus tenuis* con comportamiento contrastante frente a la salinidad cuando se los expone a distintas concentraciones de cloruro de sodio.
2. Existe expresión diferencial de otros genes involucrados en el transporte y exclusión de sodio (*SOS1*, *HKT1*, *CCC*, *VP1*) en los mismos genotipos expuestos a condiciones salinas.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la expresión relativa de genes relacionados con el transporte y la exclusión de sodio en genotipos de *Lotus tenuis* previamente seleccionados con comportamiento contrastante frente a la salinidad cuando se los expone a distintas concentraciones de cloruro de sodio.

Objetivos específicos

- Estudiar la expresión relativa de los genes *LtNHX1*, *SOS1*, *HKT*, *VP1* y *CCC* cuando se expone a dos genotipos de *L. tenuis* con comportamiento contrastante frente al estrés salino a 0, 100, 200 y 300 mM NaCl durante 48, 72 y 96 horas.
- Determinar el contenido de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ en raíz, tallo y hoja en los genotipos evaluados bajo distintas concentraciones de NaCl y relacionarlo con la tolerancia a la salinidad y la expresión génica.
- Comparar mediante el análisis *in silico* la región 5' del gen *LtNHX1* del genotipo tolerante con la del genotipo susceptible.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ensayo comparativo de dos genotipos con comportamiento contrastante frente a salinidad

1.1. Material vegetal

Se evaluaron dos genotipos de *L. tenuis* con comportamiento contrastante frente a la salinidad. El genotipo 1-13 (T) fue seleccionado por su tolerancia debido a su sobrevivencia y la baja reducción en su peso seco total al tratarlo con 200 y 400 mM NaCl durante 28 días. Este genotipo proviene de una familia de medios hermanos (FMH) del programa de mejoramiento de la Unidad Integrada UNNOBA-INTA.

El genotipo P13 (S), que proviene del cultivar Pampa INTA, se seleccionó como susceptible por presentar el comportamiento contrario, es decir, mayor cantidad de plantas muertas y alta reducción en su peso seco.

Los dos genotipos se mantuvieron en cámara de crecimiento ($T^a \cong 25\text{ }^\circ\text{C}$) con un fotoperíodo de 16 horas de luz, y fueron propagados vegetativamente mediante esquejes nodales para obtener la cantidad de clones necesaria para el ensayo (Figura 2.1).



Figura 2.1: Propagación de los genotipos de *L. tenuis* mediante esquejes nodales.

1.2. Condiciones de crecimiento

El ensayo se realizó en condiciones controladas en cámara de crecimiento ($T^a \cong 25\text{ }^\circ\text{C}$) con un fotoperíodo de 16 horas de luz en un diseño completamente aleatorizado (DCA) con cuatro tratamientos salinos: 0 (control), 100, 200 y 300 mM NaCl. Cada genotipo estuvo representado por 70 clones en cada tratamiento, que fueron trasplantados, luego de 21 días

desde la propagación vegetativa, a macetas conteniendo arena y perlita (1:1 v/v). Las plántulas se regaron por capilaridad adicionando NaCl a la solución nutritiva Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950), sin realizar aclimatación al estrés. Las macetas correspondientes al control se regaron con solución Hoagland sin adición de NaCl.

1.3. Parámetros fisiológicos y morfológicos evaluados

A las 24, 48, 72 y 96 horas de iniciados los tratamientos se midieron los contenidos de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ ($\mu\text{Moles g}^{-1}$ Peso Seco) en muestras de raíces, tallos y hojas de cada genotipo. Se evaluaron tres repeticiones de cada genotipo en cada tratamiento combinando las mediciones de 5 plantas por repetición. Las raíces se enjuagaron mediante dos inmersiones de 10 segundos en solución de CaNO₃ 10 mM con adición de sorbitol en concentraciones iso-osmóticas para cada tratamiento. Tallos y hojas se enjuagaron en agua bidestilada. Todas las muestras se secaron a 60 °C hasta peso constante. Las determinaciones de K⁺ y Na⁺ se realizaron con un fotómetro de llama Corning M410 a partir de extractos de HNO₃ 0,5 M que se prepararon adicionando 10 ml de ácido a aproximadamente 100 mg de tejido, cuyo peso exacto fue registrado, e incubando los mismos a 80 °C durante una hora. Sobre la misma extracción se determinó el contenido de Cl⁻ por colorimetría a través del método del “ferricianuro” (Munns *et al.*, 2010) utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25.

A los 28 días de iniciados los tratamientos se evaluó el peso seco total (PST, mg) en 10 clones por genotipo y tratamiento. Se estimó su índice de tolerancia (ITPST) como la relación entre cada plántula en sal y la media del control. Se registró la sobrevivencia, como el número de plantas vivas de cada genotipo a los 28 días de ensayo, considerando la muerte de las plantas cuando existió pérdida total de turgencia.

1.4. Evaluación de la expresión de genes relacionados con la tolerancia a la salinidad

Se estudió la expresión transcripcional de los genes *LtNHX1*, *SOS1*, *HKT*, *LtCCC* y *VP1* a lo largo del tiempo y bajo diferentes concentraciones de NaCl mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) en muestras de hoja y raíz de cada genotipo a las 48, 72 y 96 horas de iniciados los tratamientos. Para esto, se diseñaron cebadores específicos, se realizó la extracción de ARN total y síntesis de la primera hebra complementaria de ADN (ADNc).

1.4.1. Análisis bioinformático y diseño de cebadores

Se diseñaron los cebadores (*primers*) con la herramienta Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012) del

Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos de América (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a partir de información *in silico* de secuencias nucleotídicas de *L. tenuis* y especies relacionadas, publicadas en la bases de datos del NCBI, y de la especie modelo *Lotus japonicus*, cuya información genómica se encuentra disponible en la base de datos del Instituto Kazusa (*Kazusa DNA Research Institute*, <http://www.kazusa.or.jp/lotus/>).

Las secuencias de los genes *LtNHX1* y *LtCCC* ya habían sido publicadas por Teakle *et al.* (2008) por lo que los cebadores se diseñaron sobre las mismas. Sin embargo, no existe información del resto de las secuencias en la especie. Es por esto que se buscaron regiones conservadas de las mismas en las base de datos del NCBI utilizando la herramienta BLAST (Madden, 2013) a partir de las secuencias de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Posteriormente se realizaron alineamientos múltiples utilizando la herramienta Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011), y BLASTs en el sitio *web* del Instituto Kazusa (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/blast.html>) con el fin de diseñar los cebadores sobre secuencias de *L. japonicus* que, por tratarse de una especie emparentada (Tanaka *et al.*, 2016), podrían ser más similares a las de *L. tenuis*. En los casos en los que se encontraron secuencias de *Lotus corniculatus* en las base de datos del NCBI, las mismas se utilizaron como molde para el diseño de los cebadores.

Además de los genes relacionados con la tolerancia a la salinidad, se buscaron posibles genes de referencia utilizando la herramienta RefGenes (Hruz *et al.*, 2011) del *software* Geneinvestigator (Hruz *et al.*, 2008) considerando aquellos que presentaron alta estabilidad en estudios de estrés salino en *A. thaliana* y otras especies. Se seleccionaron los genes codificantes de las proteínas PXM16 (peptidasa), SEC-5A (participante del complejo exocitosis), SAP (proteína con dominio SAP), MOS1 (regulador de la estructura de la cromatina), UBQ (ubiquitina), UBC (UBQ-carrier) y β -Tubulina. Este último gen no presentó buena estabilidad en los estudios que nuclea RefGenes, pero había sido el gen de referencia utilizado por Teakle, Amtmann, *et al.*, (2010) en un estudio de la expresión de *LtNHX1*.

Luego de realizar el diseño de los cebadores específicos con Primer-BLAST, se analizaron con OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer/>), una herramienta gratuita de la empresa IDT (Coralville, Estados Unidos). Se eligieron únicamente aquellos cebadores que presentaron temperaturas de formación de estructuras secundarias inferiores a la temperatura de *annealing* (T_m) del cebador y ΔG para la formación de homodímeros y heterodímeros mayores a -9 kcal/mol.

En la tabla 2.1 se indican las secuencias de los cebadores, las secuencias sobre las que se diseñaron y la especie a las que pertenecen.

Tabla 2.1: Cebadores utilizados en el análisis de la expresión de genes relacionados con la tolerancia a la salinidad en *L. tenuis*. Se indica la identificación de la secuencia utilizada como molde, la especie a la que pertenece, la temperatura de *annealing* (Tm) y el tamaño del amplicón que genera el par de cebadores en pares de bases (pb).

Gen	Identificación (base de datos)	Especie	Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Amplicón (pb)
β -tubulina	No está en bases de datos	<i>Lotus tenuis</i>	TQF* TQR*	AGGAAGGCTTTCTTGCATTG TCCTCCTGAACTTCATCCTCA	54	170
PXM16	Lj0g3v0331639.1 (Kazusa)	<i>Lotus japonicus</i>	PXMF1 PXMR1	AACGGATGGTGGTTTCCAGG GAACCTGTCAGCTTTCACGC	58	112
SEC-5A	Lj5g3v1865580.1 (Kazusa)	<i>Lotus japonicus</i>	SECF1 SECR1	GCTGTGGACAATCCAGGACA TGCTGGGCAAGAGAAATGAGT	58	119
SAP	Lj4g3v1388310.2 (Kazusa)	<i>Lotus japonicus</i>	SAPF2 SAPR2	AGAGGTCTCTTCTCTTCCCGG GGTCTCTGGAGGTGAAGTC	58	91
MOS1	Lj0g3v0308689.1 (Kazusa)	<i>Lotus japonicus</i>	MOSF1 MOSR1	GTGTTTGGTTCAGGGGTCTT TGGCAATAGCATTAGGGGGC	58	120
UBQ	Lj5g3v2060710.1 (Kazusa)	<i>Lotus japonicus</i>	UBQF1 UBQR1	CTTTGCAGGGAAGCAGTTGG ACAGCACACACAGACAATCC	56	130
UBC	Lj1g3v2063210.1 (Kazusa)	<i>Lotus japonicus</i>	UBCF1 UBCR1	CGGCTCTTATCAAGGGACCA CCGCACTTGAGGTGGTTGTA	58	104
NHX1	EU727217.1 (NCBI)	<i>Lotus tenuis</i>	NHXF2 NHXR2	TAGTGGTGGTACAAGCTCGC TTTCACCTGAAACCCGGCAT	56	99
SOS1	Lj4g3v0153960.2 (Kazusa)	<i>Lotus japonicus</i>	SOSF3 SOSR3	AGCTGAAGGGGTGCTTAAAGA GCATCGAGACACCTGGACAT	58	97
CCC	EU727216.1 (NCBI)	<i>Lotus tenuis</i>	CCCF2 CCCR2	AGTACCGCCCTGTCTTAGCC AGATTGGGAGGGGGATCTGG	60	108
HKT1	Lj5g3v0196960.1 (Kazusa)	<i>Lotus japonicus</i>	HKTF9 HKTR9	TGCTAGACATGCTGGTGAATCT TGGTGGAAAGGTACATCATGACA	60	91
VP1	EF440187.1 (NCBI)	<i>Lotus corniculatus</i>	VPF2 VPR2	CGGATCTCTGGTGTCTGGTG AAGCACCAGCCTCAATGTACT	58	95

*Diseñados por Teakle, Amtmann, *et al.* (2010)

1.4.2. Análisis de la estabilidad de posibles genes de referencia frente a estrés salino

Para probar la estabilidad de los genes seleccionados utilizando la herramienta RefGenes, se tomaron muestras de hoja y raíz de plantas sometidas a 0, 150 y 300 mM NaCl durante 72 hs. Se realizó extracción de ARN total con Trizol (Invitrogen, USA) y se sintetizó el ADNc con SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) siguiendo las indicaciones del

fabricante. Se utilizó un equipo Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System (BioRad, USA) para la cuantificación de los transcritos a través de *Sybr Green*. Se probaron las eficiencias de amplificación de los cebadores con el programa LinRegPCR (Ruijter, Van Der Velden, & Ilgun, 2009) y se comparó la estabilidad de los genes con la herramienta RefFinder (Xie *et al.*, 2012) disponible en <https://www.heartcure.com.au/reffinder/>.

Se utilizaron las mismas muestras de ARN para obtener las eficiencias de amplificación de los genes de interés (GOI) utilizando LinRegPCR.

1.4.3. Extracciones de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

A las 48, 72 y 96 horas de iniciados los tratamientos salinos se tomaron muestras de hoja y raíz de plantas de los genotipos tolerante (T) y susceptible (S) teniendo especial cuidado en muestrear zonas semejantes de los órganos, de buena actividad metabólica. Se realizaron dos repeticiones biológicas por genotipo y tratamiento, cada una de ellas conformada por cinco plantas, cuyas muestras fueron inmediatamente colocadas en nitrógeno líquido. Posteriormente, se realizó la extracción del ARN total de hojas y raíces con Quick-Zol (Kalium Technologies, Argentina) siguiendo las indicaciones del fabricante y se cuantificó utilizando el *kit* Qubit RNA BR Assay (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos) en el equipo correspondiente. El ADN genómico contaminante se removió con RQ1 RNase-free DNase (Promega, Estados Unidos). Además, se verificó la integridad del ARN extraído en gel de agarosa 1,2 %, teñido con bromuro de etidio (0,5 g/ml) de acuerdo a lo publicado por Masek, Vopalensky, Suchomelova, & Pospisek (2005).

El ADNc se sintetizó a partir de 500 ng de ARN total con EasyScript[®] Reverse Transcriptase (TransGen Biotech, China) utilizando un cebador o *primer* oligo(dT)₁₈ siguiendo las indicaciones del fabricante. Se probó la viabilidad del ADNc obtenido mediante PCR. Lamentablemente, a pesar de que el ARN presentaba buena calidad, no se logró la retrotranscripción en las muestras de raíz obtenidas a las 96 hs. Por este motivo estas muestras no pudieron ser estudiadas.

Para la cuantificación relativa de los transcritos se utilizó un equipo Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System (BioRad, Estados Unidos) y la *master mix* FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) siguiendo instrucciones del fabricante en un volumen final de reacción de 20 μ l. Todas las reacciones se realizaron por duplicado y se incluyeron blancos sin ADNc para determinar la presencia de contaminación. Las condiciones de las PCR fueron: 10 min a 95 °C (activación enzimática), 40 ciclos de 15 seg a 95 °C (desnaturalización) y 1 min a la temperatura de *annealing* de cada par de cebadores

(*annealing*/extensión). Posteriormente se realizó el análisis de la curva de *melting* para confirmar la presencia de un único producto y la ausencia de dímeros de *primers*, que constó de 15 seg a 95 °C, 1 min a 60 °C e incrementos del 1 % hasta 95 °C.

1.5. Análisis de la información

1.5.1. Parámetros fisiológicos y morfológicos

Se utilizó el *software* InfoStat en su interfaz con R (Di Rienzo *et al.*, 2017). Se ajustaron modelos mediante los módulos de modelos lineales generales y mixtos (MLM) y de modelos lineales generalizados mixtos (MLGM) según la distribución de la variable analizada. Para todas las variables se realizó la prueba estadística W de Shapiro-Wilk sobre los residuales. Se aplicó el *test* de Bartlett para comprobar la homogeneidad de las varianzas y el *test* de no-aditividad de Tukey para comprobar la aditividad del modelo. En los casos en los que fue necesario, se ajustaron modelos para heterogeneidad de varianzas.

Las variables PST e ITPST se analizaron mediante ANOVA utilizando el siguiente modelo estadístico lineal:

$$Y_{itk} = \mu + \tau_i + \gamma_t + (\gamma\tau)_{it} + \varepsilon_{itk}$$

Donde: Y_{itk} es la observación debida al i -ésimo genotipo en el t -ésimo tratamiento, μ representa la media general, τ_i es el efecto del i -ésimo genotipo, γ_t es el efecto del t -ésimo tratamiento, $(\gamma\tau)_{it}$ es el efecto de la interacción entre el i -ésimo genotipo y el t -ésimo tratamiento, y ε_{itk} es el término de error de la itk observación.

Los contenidos de Na^+ , K^+ y Cl^- y la relación K^+/Na^+ , que se considera un indicador de tolerancia a la salinidad (Shabala & Cuin, 2007; Tester & Davenport, 2003), se analizaron según el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \delta_j + \gamma_k + (\tau\delta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\delta\gamma)_{jk} + (\tau\delta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde: Y_{ijkl} es la observación debida al i -ésimo genotipo, en la j -ésima combinación momento-tratamiento salino y en el k -ésimo tejido; μ representa la media general; τ_i es el efecto del i -ésimo genotipo; δ_j es el efecto de la j -ésima combinación momento-tratamiento salino; γ_k es el efecto del k -ésimo tejido; $(\tau\delta)_{ij}$ es el efecto de la interacción entre el i -ésimo genotipo y la j -ésima combinación momento-tratamiento salino; $(\tau\gamma)_{ik}$ es el efecto de la interacción entre el i -ésimo genotipo y el k -ésimo tejido; $(\delta\gamma)_{jk}$ es el efecto de la interacción entre la j -ésima combinación momento-tratamiento salino y el k -ésimo tejido; $(\tau\delta\gamma)_{ijk}$ es el efecto de la interacción entre el i -ésimo genotipo, la j -ésima combinación momento-

tratamiento salino y el k-ésimo tejido; y ε_{ijkl} es el término de error de la ijkl observación.

En los casos en que se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$), se aplicó la prueba de comparaciones múltiples DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002).

Para los datos de Supervivencia, se analizó la asociación entre la cantidad de plantas vivas en cada tratamiento a los 28 días de su inicio y el genotipo mediante la prueba exacta de Fisher, ya que se trató de dos variables dicotómicas (Genotipo y Supervivencia) y la cantidad de plantas evaluadas fue pequeña.

1.5.2. Análisis de la expresión génica

Para la cuantificación relativa de la expresión génica, los datos de amplificación se exportaron desde el programa 7500 Software v2.3, propio del equipo utilizado, al programa LinRegPCR para obtener los Ct y eficiencias de amplificación. Posteriormente, se realizó la comparación de la expresión relativa con el programa fgStatistics (Di Rienzo, 2009) utilizando el método $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl, 2001):

$$R = \frac{(E_{GOI})_{GOI}^{\Delta Ct}}{(E_{Ref})_{Ref}^{\Delta Ct}}$$

Donde R es la expresión relativa, E_{GOI} es la eficiencia del gen de interés, ΔCt_{GOI} es la diferencia entre las medias de los Ct del tratamiento control (0 mM NaCl) y las medias de los Ct de cada tratamiento salino para el gen de interés, E_{Ref} es la eficiencia del gen de referencia y ΔCt_{Ref} es la diferencia entre las medias de los Ct del tratamiento control (0 mM NaCl) y las medias de los Ct de cada tratamiento salino para el gen de referencia.

Los p-valores se calcularon a partir de un test de permutación con 5000 ciclos de remuestreo.

2. Comparación *in silico* de las regiones 5' del gen *LtNHX1* de dos genotipos

2.1. Identificación de la región 5' no codificante de *LtNHX1*

Se propuso identificar y secuenciar la región reguladora 5' no publicada del gen *NHX1* de *L. tenuis*. Debido a la falta de información sobre la secuencia, se utilizaron herramientas bioinformáticas a fin de identificar regiones conservadas aguas arriba del ATG inicial del gen *NHX1* de otras leguminosas con información genómica. Para esto, se realizó BLASTn (Madden, 2013) de la secuencia de ADNc disponible de *LtNHX1* (GenBank: EU727217.1) con el fin de encontrar en la base de datos GenBank del NCBI, genes *NHX1* de otras

especies, que presenten la secuencia completa y GeneID. Las secuencias nucleotídicas que presentaron mayor similitud con el ADNc de *LtNHX1* en base al BLAST realizado fueron las de *Glycine max*, *Cicer arietinum* y *Vigna radiata* (Tabla 2.2)

Tabla 2.2: Secuencias nucleotídicas que presentaron alineamientos significativos y mayor similitud con la secuencia GenBank: EU727217.1 (*LtNHX1*) en el análisis BLAST nucleotídico. Se indica la identificación de la secuencia, la especie a la que pertenece, la cobertura, el E-value, la identidad y la identificación (GeneID) de la secuencia completa del gen correspondiente.

Especie	Número de accesoión en GenBank de la secuencia nucleotídica	Cobertura (%)	E value	Identidad (%)	GeneID del gen completo
<i>Glycine max</i>	NM_001250237.2	98	0	88,92	732573
<i>Cicer arietinum</i>	NM_001278963.1	98	0	88,01	101515538
<i>Vigna radiata</i>	NM_001317328.1	98	0	86,80	106772217

Se realizaron alineamientos múltiples entre las secuencias (2300 pb) de regiones 5' de estos genes utilizando la herramienta Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011). La tabla 2.3 indica los porcentajes de identidad entre las secuencias.

Tabla 2.3: Identidad (%) entre las secuencias aguas arriba del ATG inicial del gen *NHX1* de tres especies vegetales según el análisis Clustal Omega.

	<i>Glycine max</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Cicer arietinum</i>	52,26	
<i>Vigna radiata</i>	58,16	48,83

Posteriormente se realizaron BLAST (*discontiguous megablast*) de cada una de estas secuencias ajustando la búsqueda únicamente al género *Lotus* (taxid: 3867). La secuencia de *V. radiata* no arrojó resultados. La de *C. arietinum* permitió encontrar una secuencia de *Lotus japonicus* (GenBank: AP004904.1) con un E-value de 1e-12 y un 66,67 % de identidad. Al realizar el BLAST con la secuencia de *G. max*, se encontró esta misma secuencia de *L. japonicus* con un E-value de 4e-12 y una identidad del 77,66 %. Esta entrada de GenBank corresponde a la secuencia completa del cromosoma 5 del clon LjT10C05 de la especie, por lo que podría considerarse que es el cromosoma en el que se encuentra el gen *LjNHX1*. Para confirmar esto, se realizó BLAST de la secuencia de *LtNHX1* en el sitio web del Instituto Kazusa. Se encontró la secuencia Lj5g3v1427750.2 del cromosoma 5 que se predice que codifica para un transportador Na⁺/H⁺ y que presenta un

99 % de identidad en una cobertura del 22 % con la secuencia de *LtNHX1*. La secuencia de la región 5' de Lj5g3v1427750.2 (aguas arriba del ATG inicial del gen predicho *LjNHX1*) coincide con la región de la secuencia AP004904.1 que presenta similitud con *C. arietinum* y *G. max*. En base a esto, se diseñaron cebadores directos sobre dicha región 5', y cebadores reversos sobre la secuencia de *LtNHX1* utilizando la herramienta Primer-BLAST del NCBI (Ye *et al.*, 2012). También se diseñó un cebador reverso inmediatamente antes de la secuencia *LjNHX1* con el fin de realizar reacciones de PCR anidadas. En la tabla 2.4 se indican las distintas combinaciones de cebadores utilizadas.

Tabla 2.4: Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de la región 5' del gen *LtNHX1*.

Se indica la secuencia, la temperatura de *annealing* (Tm) y el tamaño del amplicón que genera el par de cebadores en la especie modelo *L. japonicus* en pares de bases (pb).

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Amplicón (pb)
PrNHXF1 [#] NHXR7 [*]	CCGGGAATTCGAACAAGGGA GACTATGGAGGCATGGTCGG	58	683
PrNHXF10 [#] NHXR7 [*]	TCTTCCCCTCATTCTCGCTT GACTATGGAGGCATGGTCGG	58	857
PrNHXF11 [#] NHXR7 [*]	CGCACGCGTCGTACATTAAC GACTATGGAGGCATGGTCGG	58	912
PrNHXF12 [#] NHXR7 [*]	AACGAACCGATCCAAACCGT GACTATGGAGGCATGGTCGG	56	1393
PrNHXF13 [#] NHXR7 [*]	TGAATTGATGAACCAAACCGATG GACTATGGAGGCATGGTCGG	60	1730
PrNHXF1 [#] PrNHXR1 [#]	CCGGGAATTCGAACAAGGGA TTTGTCCACCCTCCACAATGA	58	611
PrNHXF10 [#] PrNHXR1 [#]	TCTTCCCCTCATTCTCGCTT TTTGTCCACCCTCCACAATGA	58	785
PrNHXF11 [#] PrNHXR1 [#]	CGCACGCGTCGTACATTAAC TTTGTCCACCCTCCACAATGA	58	840
PrNHXF12 [#] PrNHXR1 [#]	AACGAACCGATCCAAACCGT TTTGTCCACCCTCCACAATGA	56	1321
PrNHXF13 [#] PrNHXR1 [#]	TGAATTGATGAACCAAACCGATG TTTGTCCACCCTCCACAATGA	60	1658

*Diseñado sobre *LtNHX1* (EU727217.1). #Diseñado sobre Lj5g3v1427750.2.

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de 30 mg de tejido fresco de hoja de un genotipo de la familia 1193 del programa de mejoramiento genético de la Unidad Integrada UNNOBA-INTA. El tejido se molió e incubó con 600 µl de buffer de extracción (TrisHCl pH 8 100 mM, EDTA pH 8 50 mM, NaCl 700 mM y SDS 2 %) a 60 °C durante 30 min. Se centrifugó a 12000 rpm durante 3 min y se precipitó el ADN del sobrenadante con 300 µl de isopropanol. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se limpió el precipitado de ADN con 100 µl de etanol 70 %. El precipitado se resuspendió en agua y se

utilizó como templado para las reacciones de PCR.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de reacción de 12,5 μ l. En cada reacción se utilizó 0,13 μ l de cada dNTP 200 μ M, 1,67 μ l de *Buffer* Taq 10X, 0,67 μ l de Mg^{2+} 2,5 mM, 0,26 μ l de cada cebador 10 mM, 0,11 μ l de Platinum Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos) y 30 ng de ADN templado. Se llevaron a cabo en un termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (ThermoFisher, Estados Unidos), utilizando el siguiente perfil de PCR: 1 min a 95 °C; 35 ciclos de 15 seg a 95 °C, 30 seg a la T_m de cada par de cebadores y 30 seg a 72 °C; y una etapa final de extensión de 7 min a 72 °C. El producto de amplificación fue resuelto en gel de agarosa 0,8 %, teñido con bromuro de etidio (0,5 g/ml).

2.2. Subclonado de la región 5' no codificante de *LtNHX1*

Con el fin de realizar la secuenciación de la región 5' y contar con un plásmido que pueda ser utilizado en futuras investigaciones, se subclonó un fragmento de 1321 pb utilizando el sistema Gateway™ (Invitrogen, Estados Unidos). Para esto, el mismo se amplificó por PCR utilizando el cebador directo PrNHXF12 y el cebador reverso PrNHXR1 (Tabla 2.4), y la enzima USB® Fidelity™ DNA Polymerase (Affimetrix, Estados Unidos) en un volumen final de 25 μ l. Se utilizaron 60 ng de ADNc como templado, 0,5 μ l de cada oligonucleótido (cebador *forward* y *reverse*) en concentración 10 μ M, 2,5 μ l de Buffer 10X, 0,5 μ l de mezcla de dNTPs 10 mM y 5 unidades/ μ l de enzima USB® Fidelity™. El perfil de PCR fue: 3 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 56 °C (T_m) y 1 min 45 seg a 68 °C; y una etapa final de extensión de 10 min a 68 °C. El producto de amplificación fue resuelto en gel de agarosa 0,8 %, teñido con bromuro de etidio (0,5 g/ml) y se purificó mediante el kit QIAEX II (Qiagen, Alemania).

Posteriormente, se clonaron 60 ng del producto de PCR purificado en el vector pCR™8/GW/TOPO™ (Invitrogen, Estados Unidos) según indicaciones del fabricante. Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* cepa DH5 α mediante *shock* térmico. Para esto, se mezclaron 50 μ l de células competentes con 2 μ l del vector, se incubaron 30 min en hielo y se les realizó el *shock* térmico a 42 °C durante 1 min 30 seg. Se transfirieron a hielo durante 2 min, se adicionó 1 ml de medio Luria-Bertani (LB) y se incubó a 37 °C con agitación suave durante 45 min. Posteriormente se centrifugó 3 min a 3000 rpm, se descartó el sobrenadante y se distribuyeron las bacterias en placas de Petri con LB agar y espectinomicina (100 μ g/ml) como agente de selección. Se seleccionaron los clones positivos y se realizó extracción de ADN plasmídico según lo indicado por Green &

Sambrook (2016).

Se seleccionó un clon con la orientación correcta del inserto a partir de la digestión de 2 μ l de ADN con 0,3 μ l de la enzima PvuII (New England Biolabs, Estados Unidos) en un volumen final de 20 μ l incluyendo 2 μ l de NEBuffer™ 2.1 10X y 0,3 μ l de RNAsa (10 ng/ μ l). Las digestiones se resolvieron en gel de agarosa 0,8 %, teñido con bromuro de etidio (0,5 g/ml). Los clones con el inserto en la orientación correcta debían presentar luego de la digestión bandas de 611, 1341 y 2188 pb, mientras que los clones con el inserto en la orientación antisentido debían presentar bandas de 954, 998 y 2188 pb (Figura 2.2).

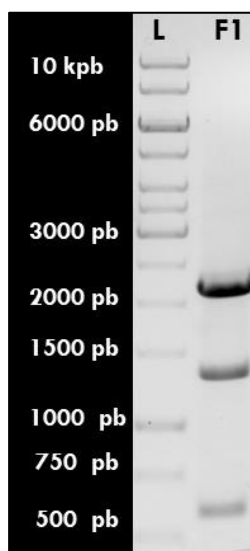


Figura 2.2: Clon de pCR™8/GW/TOPO™ con el inserto PrLtNHX1L resuelto en gel de agarosa 0,8 %. L: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Estados Unidos). F1: clon con inserto, orientación correcta.

2.3. Análisis *in silico* de la región 5' de *LtNHX1*

Se secuenció el clon positivo en la Unidad de Genómica de INTA, se realizaron alineamientos múltiples mediante Clustal Omega con las regiones 5' del gen *NHX1* de otras especies leguminosas, y se analizó la secuencia con las herramientas bioinformáticas PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002) y AtPAN (Y. A. Chen, Wen, & Chang, 2012) en búsqueda de posibles sitios de unión de factores de transcripción y elementos reguladores *in cis* relacionados con estreses abióticos.

2.4. Amplificación y análisis *in silico* de la región 5' del gen *LtNHX1* de dos genotipos con comportamiento contrastante frente a la salinidad

Siguiendo los protocolos antes mencionados, se realizó extracción de ADN genómico de muestras de hoja de los genotipos T y S, y PCR por duplicado utilizando el cebador directo PrNHXF12 y el cebador reverso PrNHXR1 (Tabla 2.4). Los productos de PCR fueron secuenciados en las dos direcciones utilizando dichos cebadores (Macrogen®, República de

Corea). Las secuencias se editaron y alinearon utilizando el *software* BioEdit y la herramienta Clustal Omega. Posteriormente, se analizaron con las herramientas PlantCare y AtPAN en búsqueda de posibles sitios de unión de factores de transcripción y elementos reguladores en *cis* relacionados con estreses abióticos.

RESULTADOS

1. Tolerancia al estrés salino y sobrevivencia de dos genotipos de *L. tenuis* frente a concentraciones crecientes de NaCl

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos y tratamientos para PST y para su índice de tolerancia (Tabla 2.5).

Tabla 2.5: Medidas resumen del carácter peso seco total (PST) y de su índice de tolerancia (ITPST) en dos genotipos de *Lotus tenuis* evaluados bajo distintas concentraciones de NaCl. Medias por genotipo, media general, coeficiente de variación (C.V.), desvío estándar (D.E.), valores máximo y mínimo y p-valor para Genotipo, Tratamiento y su Interacción.

	Variable	
	PST (mg)	ITPST
Genotipo T	263,32	0,91
Genotipo S	120,16	0,50
Media	190,73	0,70
C.V.	82,57	76,55
D.E.	157,49	0,54
Mínimo	20,3	0,11
Máximo	662,3	2,36
p-valor Genotipo	<0,0001	0,0013
p-valor Tratamiento	0,0032	0,0287
p-valor Interacción	0,3027	0,8715

En color gris se indican los casos con diferencias significativas ($p < 0,05$)

Si bien en el PST la interacción no resultó significativa, la prueba de comparaciones múltiples indicó que existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los genotipos en los tratamientos salinos, pero no en el tratamiento control (Figura 2.3). El genotipo tolerante (T) presentó mayor peso seco que el susceptible (S) en 100, 200 y 300 mM NaCl, y no presentó reducción significativa en el carácter en comparación con el control.

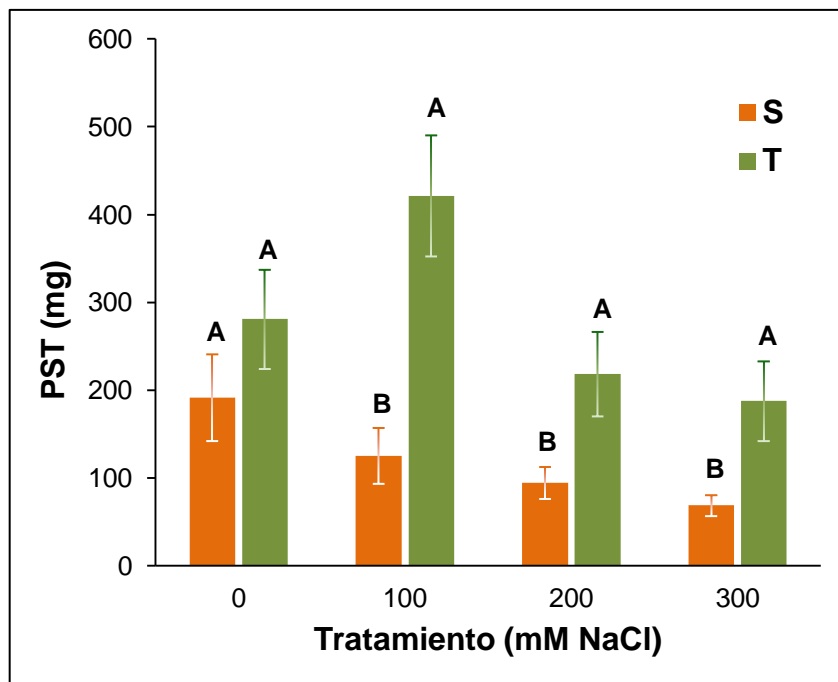


Figura 2.3: Peso seco total (PST) de los genotipos S y T a los 28 días de iniciados los cuatro tratamientos. Las barras verticales representan a las medias \pm E.E. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC ($p < 0,05$).

El índice de tolerancia ITPST promedio de los dos genotipos en el tratamiento de 100 mM se diferenció de aquellos con mayores concentraciones salinas, y presentó una media de 0,99. El ITPST promedio del genotipo S fue inferior al del genotipo T (Figura 2.4).

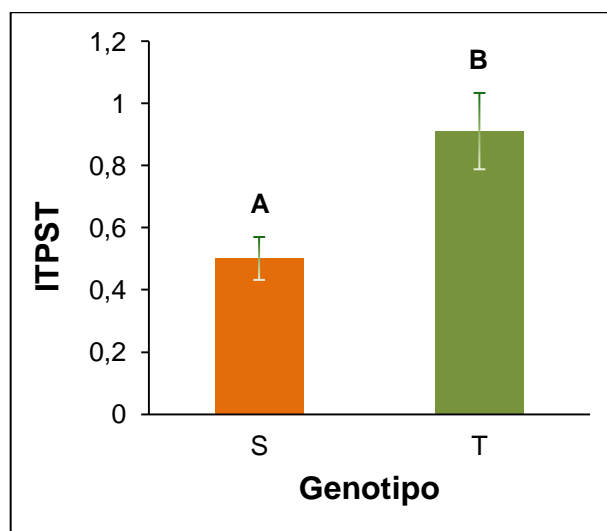


Figura 2.4: Índice de tolerancia del peso seco total (ITPST) de los genotipos S y T a los 28 días de iniciados los tratamientos salinos. Las barras verticales representan a las medias \pm E.E. Letras distintas indican diferencias significativas según el test DGC ($p < 0,05$).

Por otra parte, todas las plantas del genotipo S tratadas con 200 y 300 mM NaCl murieron antes de los 28 días de tratamiento (Figura 2.5).

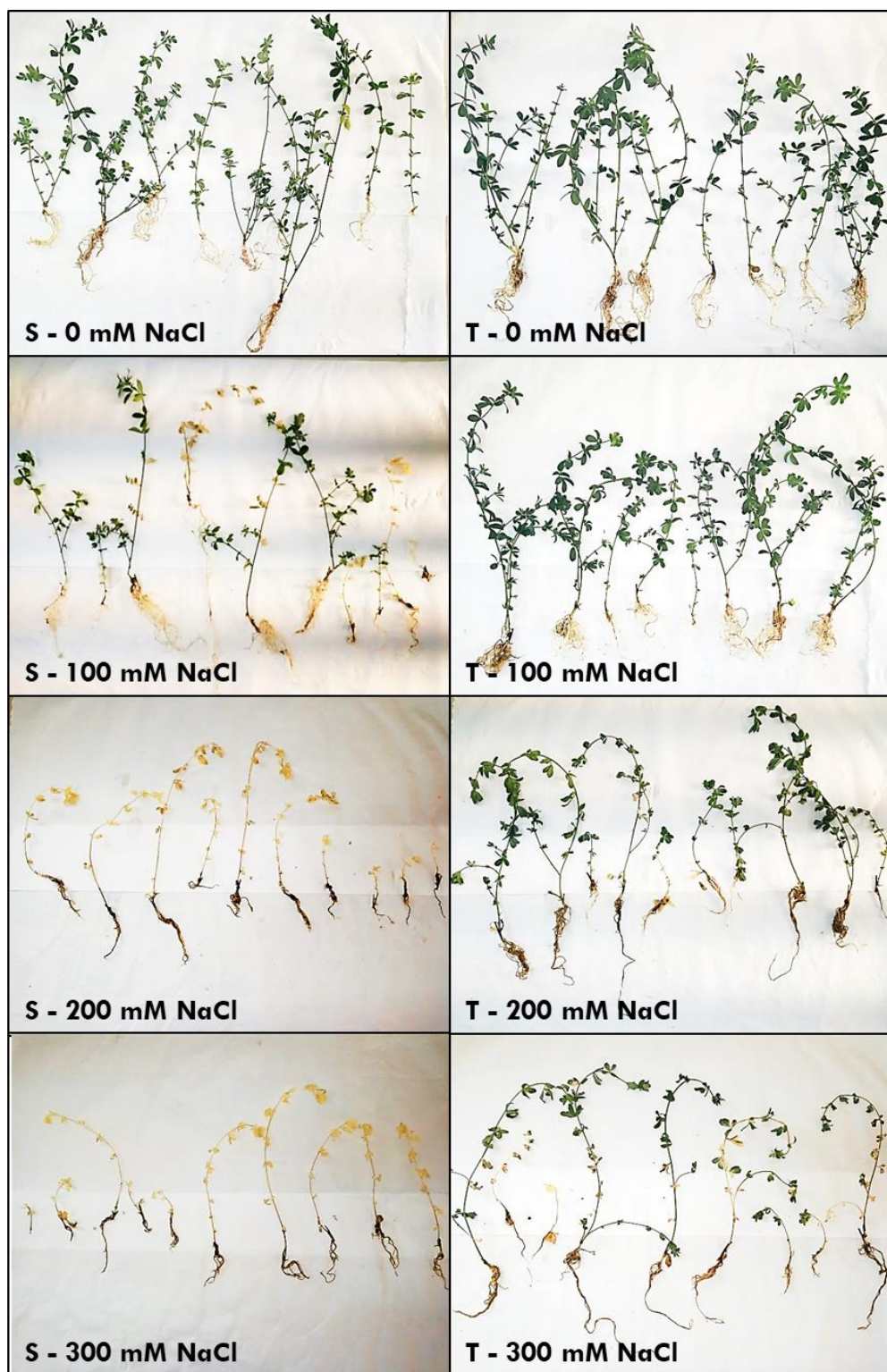


Figura 2.5: Imágenes de las plantas de cada genotipo (S o T) y tratamiento (0, 100, 200 y 300 mM NaCl) evaluadas a los 28 días del inicio de los mismos.

Debido a que se trató de una muestra pequeña de plantas, se evaluó la asociación entre el genotipo y la sobrevivencia al final del ensayo en cada tratamiento mediante la prueba exacta de Fisher. Esta indicó una asociación significativa en los tratamientos de 200 y 300 mM, con mayor sobrevivencia del genotipo T (Figura 2.6).

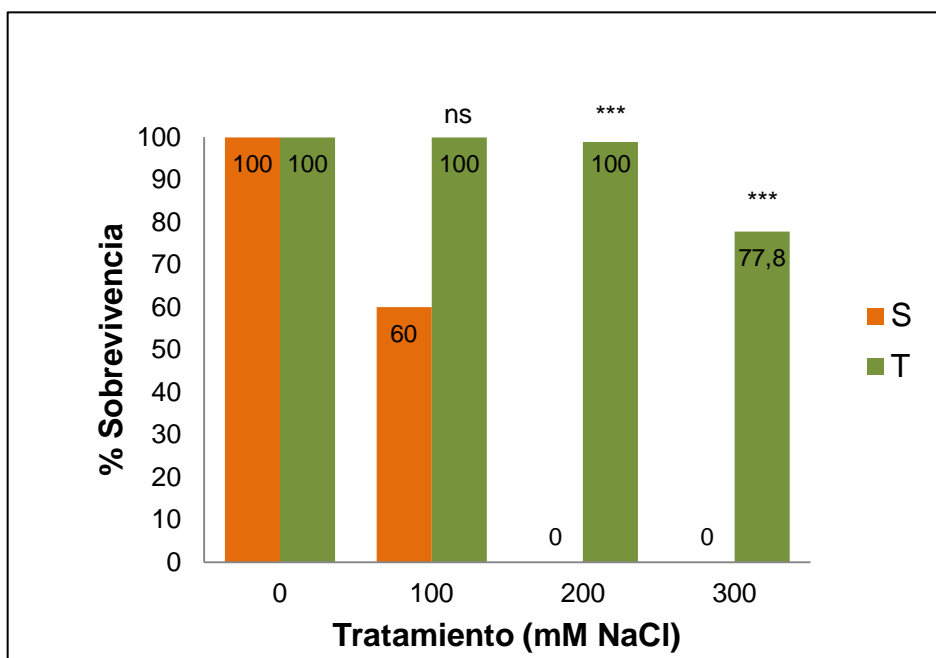


Figura 2.6: Porcentaje de plantas vivas de cada genotipo (S o T) y tratamiento (0, 100, 200 y 300 mM NaCl) a los 28 días del inicio de los mismos. Las barras y números dentro de las mismas indican los porcentajes. ns: sin asociación entre genotipos y sobrevivencia según la prueba exacta de Fisher. ***: asociación significativa ($p < 0,001$).

2. Contenido de iones en hoja, raíz y tallo de dos genotipos de *L. tenuis* de comportamiento contrastante frente a NaCl

Se encontraron diferencias significativas entre genotipos, tratamientos (considerados como las combinaciones de la concentración salina aplicada y el momento de muestreo) y tejidos para los contenidos de iones Na^+ , K^+ y Cl^- ($\mu\text{Moles g}^{-1}$ Peso Seco) y la relación K^+/Na^+ , y todas sus interacciones resultaron significativas (Tabla 2.6).

Tabla 2.6: Medidas resumen de los contenidos de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ (μMoles g⁻¹ Peso Seco) y la relación K⁺/Na⁺ en dos genotipos de *Lotus tenuis* evaluados bajo distintas concentraciones de NaCl. Medias por genotipo, media general, coeficiente de variación (C.V.), desvío estándar (D.E.), valores máximo y mínimo y p-valor para genotipo (Gen), tratamiento (Trat), tejido (Tejido) y sus interacciones.

	Variable			
	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	K ⁺ /Na ⁺
Genotipo T	569,34	795,25	367,75	1,70
Genotipo S	769,01	678,89	567,48	1,27
Media general	669,17	736,87	467,62	1,49
C.V.	52,79	27,95	73,7	67,06
D.E.	353,27	205,97	344,65	1,00
Mínimo	188,56	235,24	59,93	0,17
Máximo	2202,39	1228,33	1987,11	5,24
p-valor Gen	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
p-valor Trat	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
p-valor Tejido	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
p-valor Gen*Trat	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002
p-valor Gen*Tejido	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
p-valor Tejido*Trat	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
p-valor Gen*Trat*Tejido	<0,0001	0,0026	<0,0001	<0,0001

En promedio, las plantas presentaron mayores contenidos de Na⁺ y Cl⁻ en hoja que en los otros dos tejidos. En el caso de Na⁺, se encontró mayor acumulación en raíz que en tallo, mientras que para Cl⁻ ocurrió lo contrario. El K⁺ se acumuló de forma opuesta al Na⁺, existiendo mayor contenido en tallo respecto a raíz, y más en raíz que en hoja. La relación K⁺/Na⁺ siguió la misma tendencia que el contenido de K⁺, siendo mayor en tallo.

El genotipo tolerante (T) presentó en promedio menor contenido de Na⁺ y Cl⁻ y mayor de K⁺, y una mayor relación K⁺/Na⁺. El genotipo susceptible (S) presentó mayores contenidos de Na⁺ y Cl⁻ en raíz, hoja y tallo, y menor contenido de K⁺ y relación K⁺/Na⁺ en raíz y hoja que el tolerante. En la figura 2.7 se indican las diferencias entre genotipos para cada tiempo, tejido y concentración.

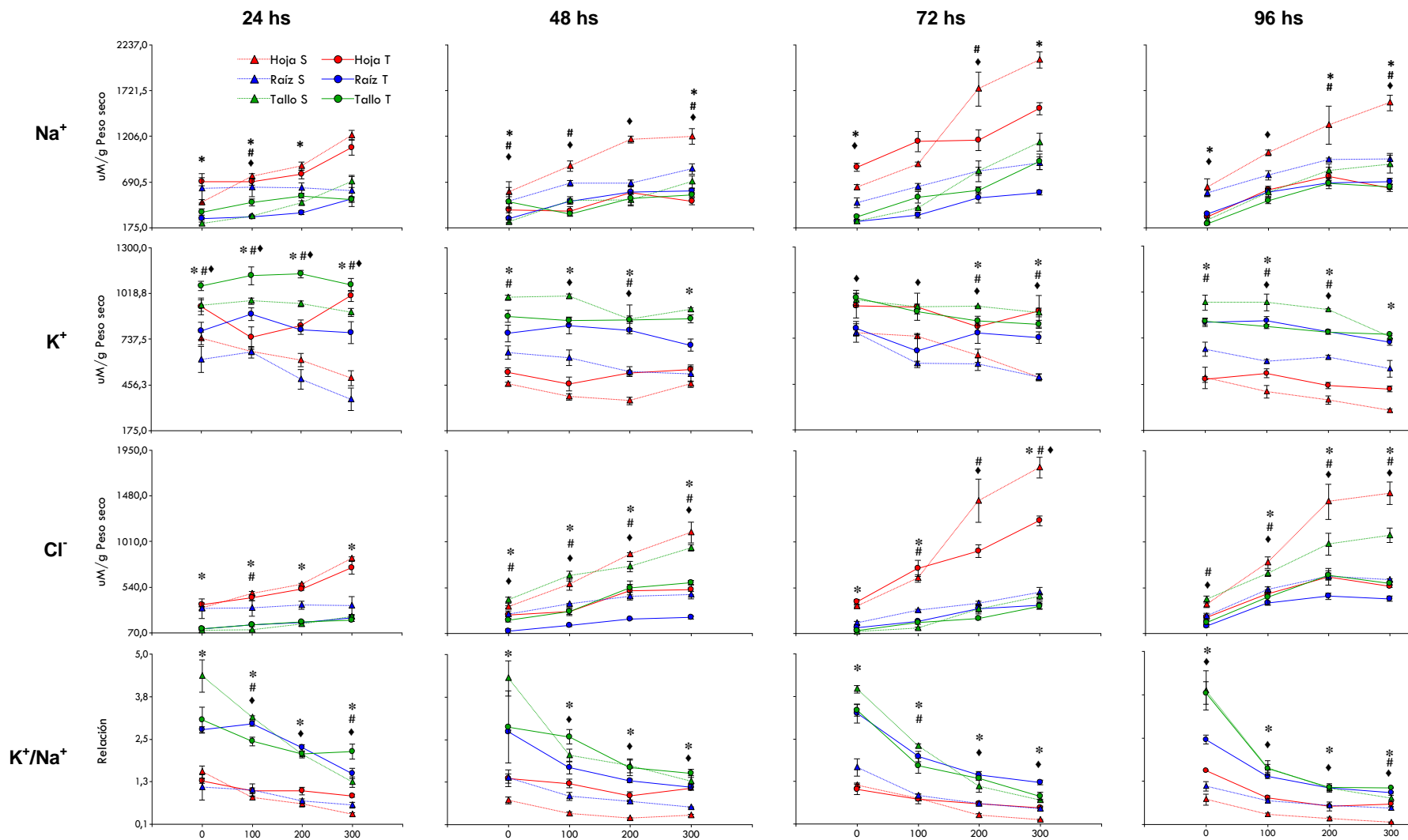


Figura 2.7: Contenido de Na^+ , K^+ y Cl^- ($\mu\text{Moles g}^{-1}$ Peso Seco) y relación K^+/Na^+ en muestras de hoja, raíz y tallo de dos genotipos de *Lotus tenuis*, uno tolerante (T) y uno susceptible (S) a la salinidad bajo cuatro concentraciones de NaCl. Se tomaron muestras a las 24, 48, 72 y 96 horas de iniciados los tratamientos. Se grafican las medias \pm E.E. * Indica diferencias significativas entre T y S en raíz. # Indica diferencias significativas entre T y S en tallo. ♦ Indica diferencias significativas entre T y S en hoja.

Por otra parte, en los tratamientos de 200 y 300 mM, el genotipo S incrementó el contenido de Na^+ con el tiempo, mientras que T lo mantuvo con excepción de un incremento a las 72 hs en el tratamiento con 300 mM. Además, en los tratamientos de 200 y 300 mM, el genotipo S presentó diferencias en el contenido de Cl^- entre el muestreo de las 24 hs y los posteriores. No existieron diferencias entre los momentos de muestreo en las plantas del genotipo T bajo el tratamiento con 100 mM. En el tratamiento con 200 mM, solo se diferenció el muestreo a las 96 horas, con contenidos de Cl^- superiores al resto, mientras que en el tratamiento con 300 mM el muestreo a las 24 hs presentó un contenido inferior que los demás.

El genotipo tolerante logró mantener la relación K^+/Na^+ entre las 24 y 96 hs bajo 100 mM, entre 24 y 72 hs bajo 200 mM, y entre las 24 y 48 hs bajo 300 mM. Luego, la relación se redujo. El genotipo susceptible presentó una mayor relación K^+/Na^+ a las 24 y 72 hs de iniciado el tratamiento de 100 mM respecto a las 48 y 96 hs. En los otros dos tratamientos salinos la relación se mantuvo constante, pero fue siempre inferior a la registrada en el genotipo tolerante, con excepción de los muestreos a las 96 hs que no presentaron diferencias significativas entre genotipos.

Se analizaron los cambios en el contenido de iones y la relación K^+/Na^+ respecto al control para los dos genotipos en todos los tejidos y tratamientos. En todos los casos existió interacción significativa entre todos los factores considerados (Anexo 2.1). En la figura 2.8 se grafican los promedios de los porcentajes respecto al control en cada tejido, considerando todos los tratamientos salinos y momentos de evaluación. En general, se observa un mayor incremento de Na^+ en tallo y hoja, y de Cl^- en hoja en el genotipo susceptible respecto al tolerante. Por el contrario, este último presenta mayores incrementos de estos iones en raíz. En el caso del K^+ , T logró mantener un contenido elevado respecto al control en todos los tejidos, mientras que S presentó mayores disminuciones en el contenido respecto al control en raíz y hoja. La relación K^+/Na^+ presentó mayores caídas respecto al control en tallo y hoja en el genotipo susceptible.

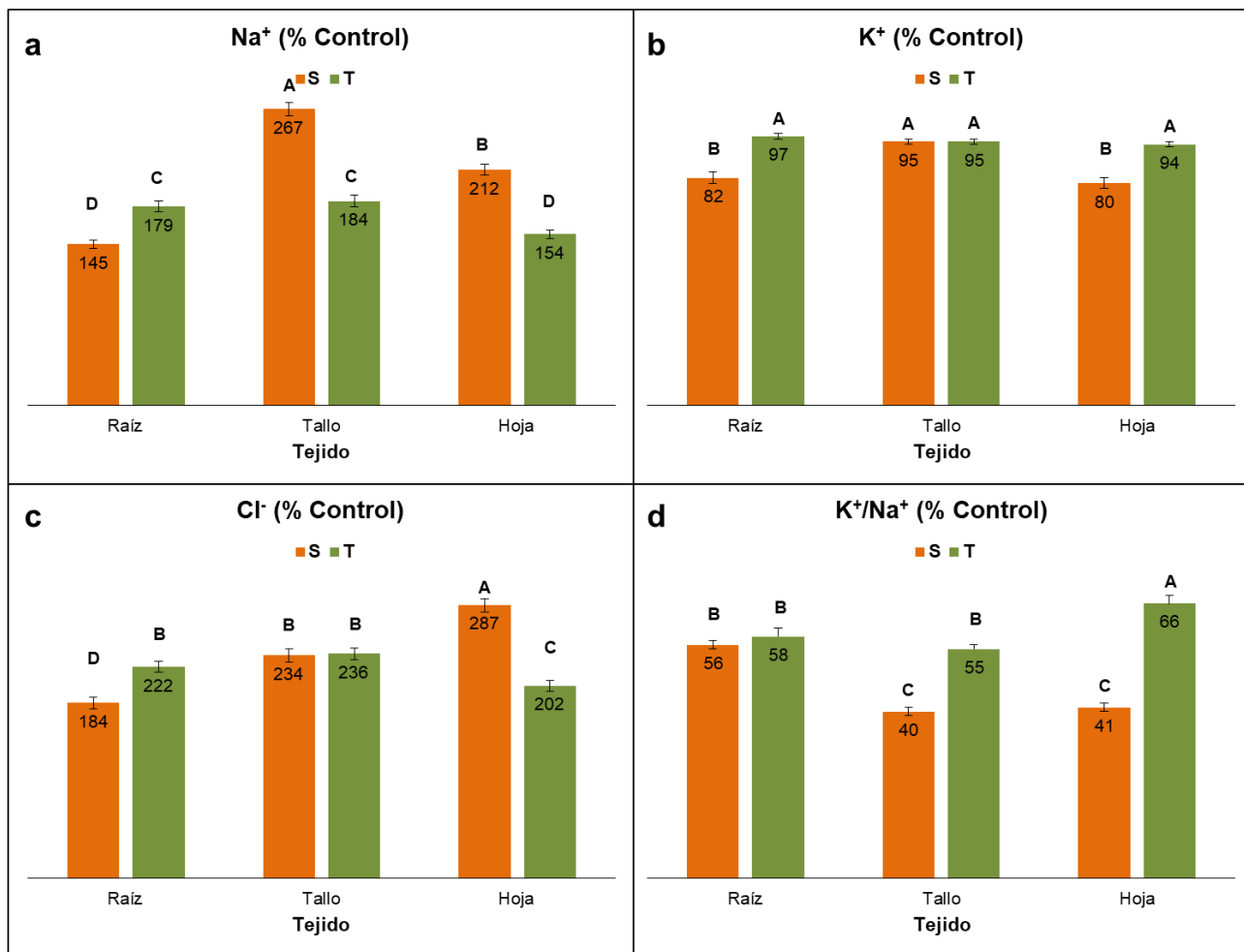


Figura 2.8: Contenido de iones respecto al control en tres tejidos de dos genotipos con comportamiento contrastante frente a la salinidad. a. Na⁺ b. K⁺ c. Cl⁻ d. Relación K⁺/Na⁺. Las barras indican las medias \pm E.E y los números dentro de las mismas indican el porcentaje respecto al control. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los contenidos de Na⁺ respecto al control considerados por momento de evaluación, tejido y concentración salina, indicaron que en raíz, el genotipo tolerante presentó mayores medias que el susceptible en 200 y 300 mM NaCl en todos los tiempos de evaluación, mientras que en el tratamiento menos severo no existieron diferencias (Figura 2.9). En hoja y tallo, el genotipo susceptible presentó porcentajes más elevados que el tolerante en las evaluaciones realizadas a las 24, 48 y 72 horas de iniciados los tratamientos, sobre todo en las dos mayores concentraciones. Por el contrario, en la evaluación realizada en hoja a las 96 horas, se invirtió la tendencia en 100 y 200 mM, siendo el genotipo tolerante el que presentó más contenido de Na⁺ respecto al control. En 300 mM el genotipo susceptible siguió presentando mayor porcentaje, pero la diferencia con el tolerante fue menor que en los momentos anteriores. En tallo no existieron diferencias entre los genotipos en ninguno de los tratamientos salinos a las 96 hs.

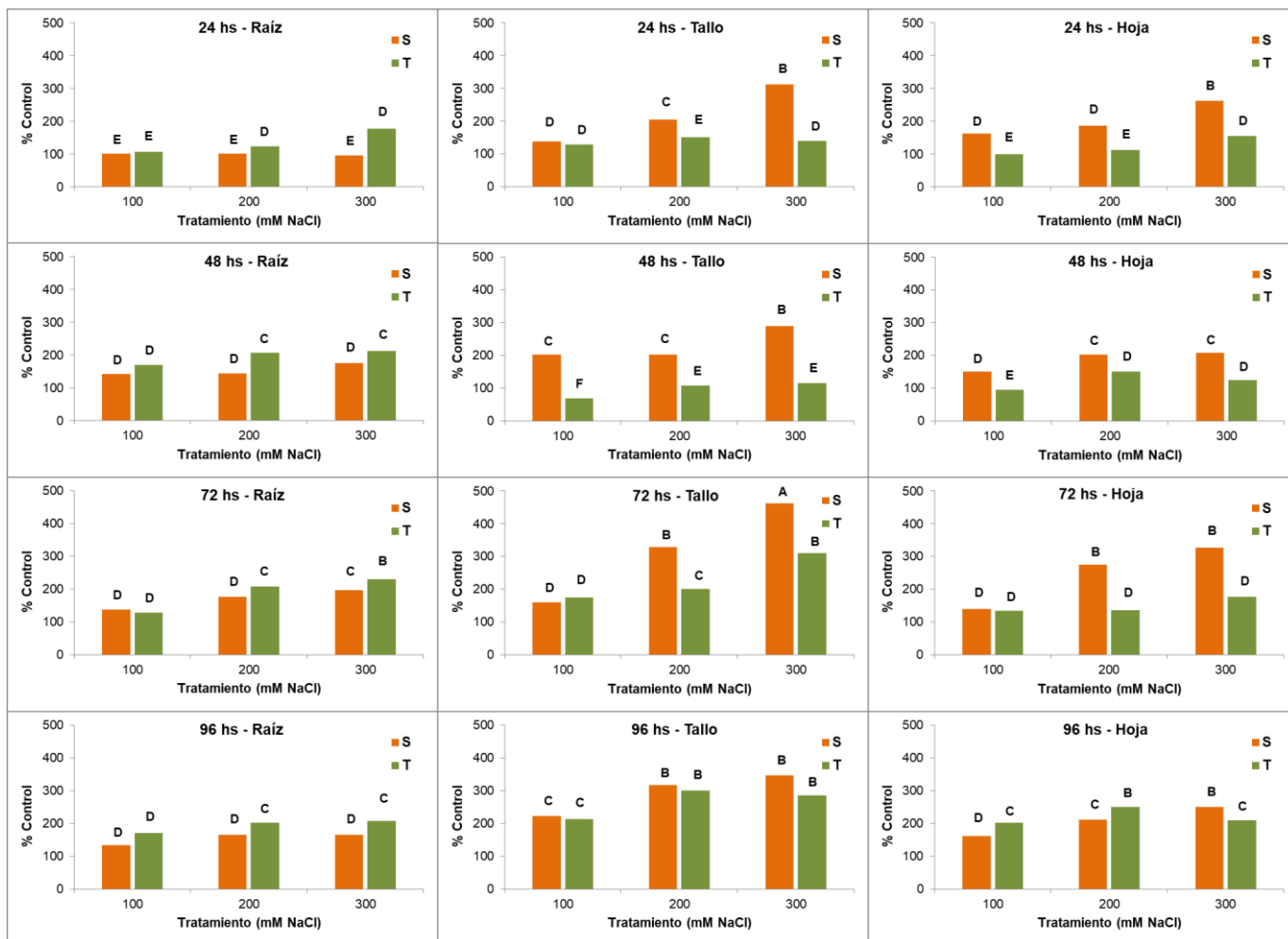


Figura 2.9: Contenido de Na⁺ respecto al control (%) de dos genotipos en raíz, tallo y hoja a 24, 48, 72 y 96 horas de iniciar tres tratamientos salinos: 100, 200 y 300 mM NaCl. Las barras indican las medias ajustadas de los porcentajes. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

Al considerar los contenidos de Cl⁻ respecto al control, los genotipos presentaron un comportamiento similar que en el caso del Na⁺. En raíz fueron mayores en el tolerante, y en hoja, mayores en el susceptible (Anexo 2.2). A las 96 hs, el genotipo susceptible continuó presentando mayores contenidos de Cl⁻ en hoja respecto al control, lo cual difirió de lo ocurrido con los contenidos relativos de Na⁺, para los que se invirtió la tendencia en este momento de evaluación. En tallo, las diferencias entre genotipos dependieron del momento de evaluación.

3. Evaluación de la expresión de genes relacionados con la tolerancia a la salinidad

3.1. Determinación de la estabilidad de posibles genes de referencia y de las eficiencias de amplificación de los cebadores

En primer lugar, se determinó la eficiencia de amplificación de los cebadores a utilizar, ya que en el método de análisis se realiza la corrección considerando la misma. Los cebadores seleccionados presentaron una eficiencia promedio superior a 1,9 (Tabla 2.7).

Tabla 2.7: Eficiencia determinada con LinRegPCR de los cebadores utilizados correspondientes a los genes de referencia (Ref) o de interés (GOI). Se indica el gen, la clasificación en este estudio y la eficiencia de amplificación de los cebadores correspondientes.

Gen	Clasificación	Eficiencia
β -tubulina (TQ)	Ref	1,914
PXM16 (PXM)	Ref	1,933
SEC-5A (SEC)	Ref	1,929
SAP	Ref	1,937
MOS1	Ref	1,929
UBQ	Ref	1,943
UBC	Ref	1,941
NHX1	GOI	1,915
SOS1	GOI	1,910
CCC1	GOI	1,902
HKT1	GOI	1,921
VP1	GOI	1,912

También se realizó la curva de *melting* de cada par de cebadores y en todos ellos existió un único producto de amplificación y no se observaron dímeros de primers, excepto en el caso de MOS1 (Figura 2.10)

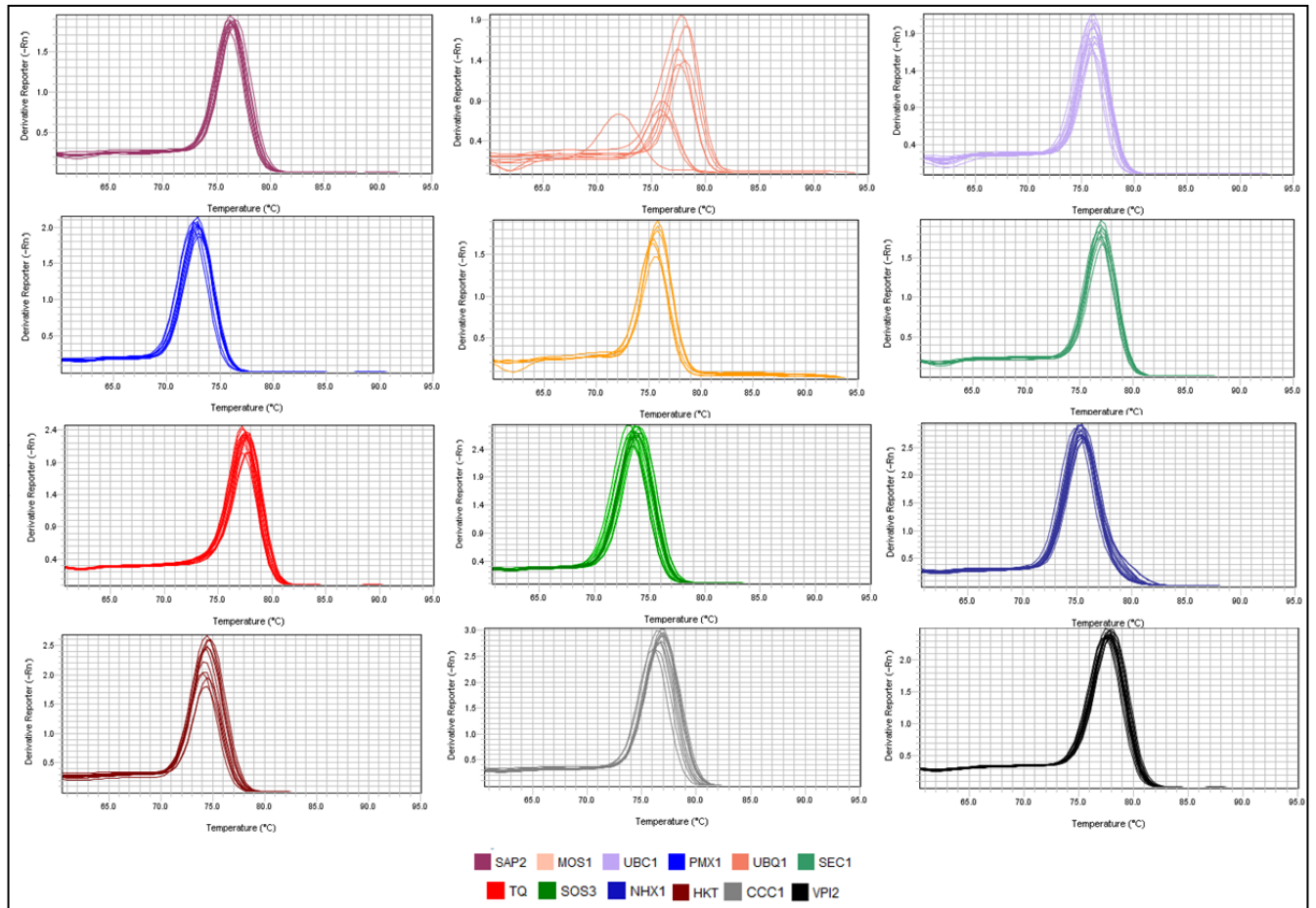


Figura 2.10: Curvas de melting de los cebadores de los posibles genes de referencia y de los genes de interés. Los gráficos fueron obtenidos con el software del equipo Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System.

Se realizaron estudios de la estabilidad de 7 posibles genes de referencia. Para muestras de hoja, los genes SEC-5A y PMX16 resultaron los de mayor estabilidad; para muestras de raíz, los genes más estables fueron SAP y SEC-5A (Figura 2.11). En base a esto, se decidió utilizar SEC-5A como gen de referencia.

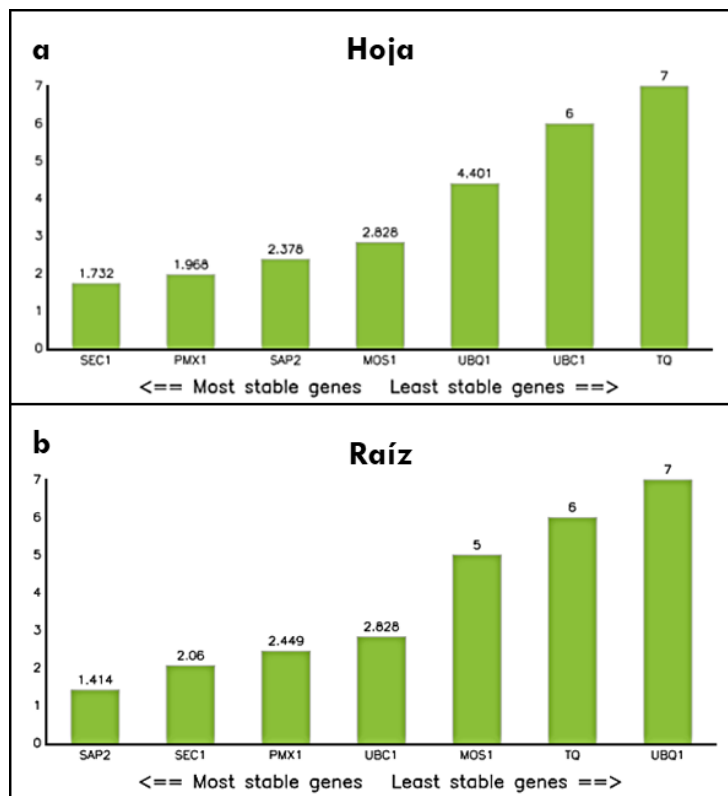


Figura 2.11: Análisis de la estabilidad de 7 posibles genes de referencia en plantas de *L. tenuis* bajo tres concentraciones de NaCl durante 72 horas, utilizando la herramienta RefFinder. a. Estabilidad en hoja. b. Estabilidad en raíz.

3.2. Expresión relativa de genes relacionados con la tolerancia a la salinidad

Se determinó la expresión de los genes *NHX1*, *SOS1*, *VP1*, *CCC* y *HKT1* en los genotipos S y T bajo a tres concentraciones salinas (100, 200 y 300 mM NaCl) en relación a su expresión en condición control. La expresión relativa se estudió en hoja a las 48, 72 y 96 horas de iniciados los tratamientos, y en raíz a las 48 y 72 horas. ,

El cambio en la expresión de los genes respecto a la condición control dependió del genotipo considerado, del tejido y del momento de evaluación (Figuras 2.12 y 2.13). En muchos casos, no existieron diferencias significativas.

Con el paso del tiempo, se observaron mayores efectos de las condiciones salinas en la expresión génica en hoja, aunque no siempre en el mismo sentido (Figura 2.12). A las 48 y 72 hs existió un incremento en la expresión de *NHX1* y *CCC* en el genotipo susceptible (Figura 2.12a-b). Los demás genes no presentaron cambios, o bien redujeron su expresión en alguno de los genotipos. A las 96 hs, los cambios en la expresión fueron más elevados, en su mayoría incrementos en la expresión de los genes respecto al control en el genotipo tolerante (Figura 2.12c).

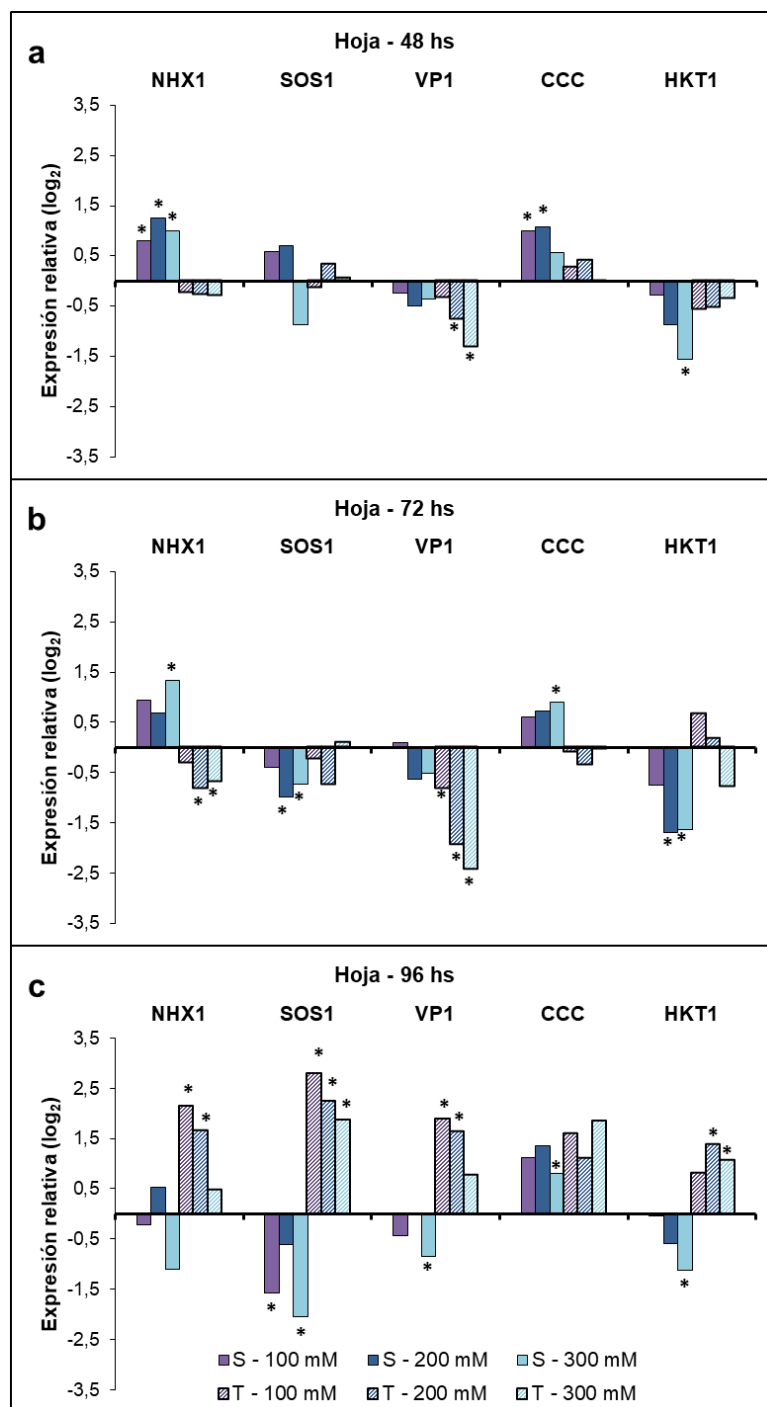


Figura 2.12: Expresión relativa en hoja de los genes *NHX1*, *SOS1*, *VP1*, *CCC* y *HKT1* de los genotipos S y T de *L. tenuis* en respuesta a 100, 200 y 300 mM NaCl. Las muestras fueron tomadas a 48 (a), 72 (b) y 96 hs (c) de iniciados los tratamientos y la expresión relativa fue analizada mediante PCR cuantitativa utilizando el gen SEC-5A como referencia. Las barras indican el log₂ de la expresión relativa calculada mediante el método $\Delta\Delta Ct$. (*) indica diferencias significativas entre el tratamiento salino considerado y el control ($p < 0,05$).

En raíz no pudo medirse la expresión relativa a las 96 hs. En forma global, al igual que en hoja, se observaron mayores cambios respecto al control a las 72 hs que a las 48 hs (Figura 2.13). En el primer momento, se incrementó en forma significativa la expresión de *CCC* y *HKT1* en el genotipo T. El genotipo S redujo en forma significativa la expresión de *NHX1*, *VP1* y *HKT1* en algunos de los tratamientos salinos (Figura 2.13a). A las 72 hs los genes *NHX1* y *SOS1* incrementaron en forma significativa su expresión en el genotipo T, mientras que los genes *CCC* y *HKT1* redujeron su expresión, mayormente en el genotipo S (Figura 2.13b).

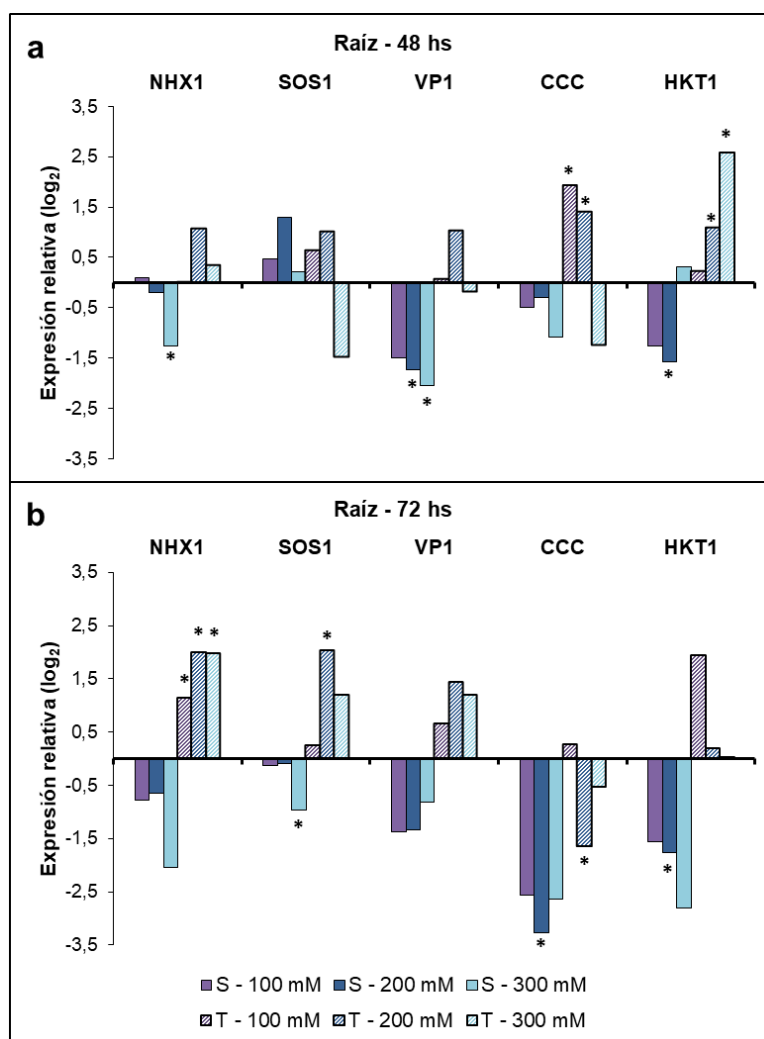


Figura 2.13: Expresión relativa en raíz de los genes *NHX1*, *SOS1*, *VP1*, *CCC* y *HKT1* de los genotipos S y T de *L. tenuis* en respuesta a 100, 200 y 300 mM NaCl. Las muestras fueron tomadas a 48 (a) y 72 hs (b) de iniciados los tratamientos y la expresión relativa fue analizada mediante PCR cuantitativa utilizando el gen SEC-5A como referencia. Las barras indican el log₂ de la expresión relativa calculada mediante el método $\Delta\Delta Ct$. (*) indica diferencias significativas entre el tratamiento salino considerado y el control ($p < 0,05$).

3.2.1. Expresión del gen del antiporter vacuolar NHX1


Se observó una tendencia a favor de la expresión del gen *NHX1* en el genotipo S en hoja en los dos primeros momentos de evaluación, mientras que en el tercer momento, el incremento en la expresión respecto al control fue en el genotipo T (Tabla 2.8). En raíz, el incremento también ocurrió en T y fue significativo a las 72 hs.

El incremento significativo en las hojas del genotipo S ocurrió en los tres tratamientos salinos a las 48 hs y en 300 mM NaCl a las 72 hs. El genotipo T mantuvo o redujo la expresión de *NHX1* en estos dos momentos de evaluación, mientras que a las 96 horas se incrementó la expresión 4,46 veces respecto al control en el tratamiento con 100 mM, y 3,18 veces en 200 mM.

En raíz también existió una expresión diferencial entre los genotipos. S mantuvo o redujo la expresión de *NHX1*, mientras T la incrementó significativamente a las 72 hs en todos los tratamientos salinos, con un máximo de 3,98 veces respecto al control.

Tabla 2.8: Mapa de calor de la expresión relativa del gen *NHX1* de los genotipos S y T de *L. tenuis* en distintos tratamientos salinos en dos tejidos y tres momentos. Los valores indican la expresión relativa calculada mediante el método $\Delta\Delta Ct$ en escala lineal, utilizando el gen SEC-5A como referencia.

Tratamiento (mM NaCl)	NHX1									
	Hoja						Raíz			
	48 hs		72 hs		96 hs		48 hs		72 hs	
	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
100	1,74*	0,85	1,93	0,81	0,87	4,46*	1,06	1,02	0,58	2,21*
200	2,39*	0,83	1,61	0,56*	1,44	3,18*	0,88	2,12	0,64	3,98*
300	2,00*	0,81	2,54*	0,62*	0,46	1,42	0,42*	1,29	0,24	3,96*



(*) diferencia significativa entre el tratamiento salino considerado y el control (p<0,05).


3.2.2. Expresión del gen de la pirofosfatasa vacuolar VP1

El gen *VP1* redujo significativamente su expresión respecto al control en las hojas del genotipo T a las 48 y 72 horas del comienzo de los tratamientos, pero la incrementó en un máximo de 3,73 veces en hojas a las 96 hs (Tabla 2.9). En raíz, si bien el cambio en la expresión respecto al control no resultó significativa, a las 72 hs los p-valores resultaron menores a 0,10 en los tres tratamientos, mostrando cierta tendencia al incremento. El

genotipo S redujo significativamente la expresión de *VP1* en raíz a las 48 hs.

Tabla 2.9: Mapa de calor de la expresión relativa del gen *VP1* de los genotipos S y T de *L. tenuis* en distintos tratamientos salinos en dos tejidos y tres momentos. Los valores indican la expresión relativa calculada mediante el método $\Delta\Delta C_t$ en escala lineal, utilizando el gen SEC-5A como referencia.

VP1										
Tratamiento (mM NaCl)	Hoja						Raíz			
	48 hs		72 hs		96 hs		48 hs		72 hs	
	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
100	0,84	0,80	1,06	0,57*	0,74	3,73*	0,35	1,07	0,38	1,57
200	0,71	0,59*	0,65	0,26*	0,99	3,15*	0,30*	2,05	0,4	2,72
300	0,78	0,40*	0,70	0,19*	0,55*	1,72	0,24*	0,89	0,57	2,29



(*) diferencia significativa entre el tratamiento salino considerado y el control ($p < 0,05$).


Al comparar los mapas de calor de *NHX1* y *VP1* (Tablas 2.8 y 2.9), se puede observar una clara relación entre los cambios de expresión de estos genes en el genotipo T. Esto no ocurrió en igual medida en el S.

3.2.3. Expresión del gen del antiporter de la membrana plasmática *SOS1*

El gen *SOS1* fue el que más incrementó su expresión respecto al control en las hojas del genotipo T a las 96 hs de iniciar los tres tratamientos salinos, y en raíz a las 72 horas de exponerlo a 200 mM NaCl (Tabla 2.10). Por otra parte, el genotipo S mantuvo o redujo la expresión de *SOS1* en los dos tejidos.

Tabla 2.10: Mapa de calor de la expresión relativa del gen *SOS1* de los genotipos S y T de *L. tenuis* en distintos tratamientos salinos en dos tejidos y tres momentos. Los valores indican la expresión relativa calculada mediante el método $\Delta\Delta Ct$ en escala lineal, utilizando el gen SEC-5A como referencia.

SOS1										
Tratamiento (mM NaCl)	Hoja						Raíz			
	48 hs		72 hs		96 hs		48 hs		72 hs	
	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
100	1,5	0,92	0,76	0,85	0,34*	7,04*	1,39	1,57	0,92	1,19
200	1,63	1,27	0,5*	0,60*	0,66	4,84*	2,47	2,03	0,94	4,10*
300	0,55	1,05	0,61*	1,07	0,24*	3,72*	1,16	0,36	0,51*	2,30




(*) diferencia significativa entre el tratamiento salino considerado y el control ($p < 0,05$).

3.2.4. Expresión del gen del cotransportador CCC

El gen CCC incrementó significativamente su expresión respecto al control en las hojas del genotipo S a las 48 hs en los tratamientos de 100 y 200 mM, y a las 72 horas en el de 300 mM NaCl (Tabla 2.11). Si bien se observó cierta tendencia en los dos genotipos a aumentar su expresión en hojas a las 96 hs de iniciados los tratamientos, solo resultó significativa en el genotipo S bajo 300 mM. El genotipo T presentó un pico de expresión en raíz a las 48 hs, pero esto no se observó en la siguiente medición.

Tabla 2.11: Mapa de calor de la expresión relativa del gen CCC de los genotipos S y T de *L. tenuis* en distintos tratamientos salinos en dos tejidos y tres momentos. Los valores indican la expresión relativa calculada mediante el método $\Delta\Delta Ct$ en escala lineal, utilizando el gen SEC-5A como referencia.

CCC										
Tratamiento (mM NaCl)	Hoja						Raíz			
	48 hs		72 hs		96 hs		48 hs		72 hs	
	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
100	1,99*	1,21	1,53	0,94	1,18	2,18	0,71	3,88*	0,17	1,2
200	2,12*	1,33	1,64	0,78	1,24	2,54	0,81	2,66*	0,1*	0,32*
300	1,48	1	1,88*	0,98	0,64*	1,75	0,47	0,42*	0,16	0,69




(*) diferencia significativa entre el tratamiento salino considerado y el control ($p < 0,05$).

3.2.5. Expresión del gen del transportador HKT1

El gen *HKT1* redujo significativamente su expresión respecto al control en las hojas del genotipo S a las 48 y 72 horas del comienzo de los tratamientos. En el genotipo T se incrementó más de dos veces la expresión en hoja a las 96 hs; y entre dos y seis veces en raíz al exponerlo a 100 y 200 mM NaCl durante 48 hs (Tabla 2.12).

Tabla 2.12: Mapa de calor de la expresión relativa del gen *HKT1* de los genotipos S y T de *L. tenuis* en distintos tratamientos salinos en dos tejidos y tres momentos. Los valores indican la expresión relativa calculada mediante el método $\Delta\Delta Ct$ en escala lineal, utilizando el gen SEC-5A como referencia.

HKT1										
Tratamiento (mM NaCl)	Hoja						Raíz			
	48 hs		72 hs		96 hs		48 hs		72 hs	
	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
100	0,82	0,68	0,6	1,59	0,97	1,76	0,42	1,17	0,34	3,83
200	0,55	0,69	0,31*	1,13	0,66	2,61*	0,34*	2,15*	0,29*	1,15
300	0,34*	0,78	0,32*	0,58	0,46*	2,13*	1,25	6,02*	0,14	1,01



(*) diferencia significativa entre el tratamiento salino considerado y el control ($p < 0,05$).

3.2.6. Correlación en la expresión de los genes estudiados

La expresión del gen *NHX1* y la de *VP1* presentaron correlación significativa y positiva con las de los demás genes. A su vez, la correlación entre estos dos genes fue la más alta (Tabla 2.13).

Tabla 2.13: Correlación en la expresión relativa en condiciones salinas de cinco genes relacionados con el transporte de Na^+ . Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson significativos ($p < 0,05$) calculados a partir de los \log_2 de la expresión relativa. En la primera fila se observa el coeficiente en negrita y en la segunda el nivel de significancia.

	NHX1	SOS1	VP1	CCC
SOS1	0,56 0,001			
VP1	0,79 <0,0001	0,54 0,002		
CCC	0,52 0,003		0,393 0,032	
HKT1	0,39 0,031		0,51 0,004	

Al calcular los coeficientes de correlación de la expresión de los genes para el genotipo T, se encontró correlación entre NHX1, SOS1 y VP1 (Tabla 2.14).

Tabla 2.14: Correlación en la expresión relativa en condiciones salinas de cinco genes relacionados con el transporte de Na⁺ en el genotipo T. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson significativos (p<0,05) calculados a partir de los log₂ de la expresión relativa. En la primera fila se observa el coeficiente en negrita y en la segunda el nivel de significancia.

	NHX1	SOS1
SOS1	0,75 <0,0001	
VP1	0,93 <0,0001	0,76 <0,0001
CCC		
HKT1		

En el caso del genotipo S, NHX1 se encontró correlacionado con VP1 y CCC, y este último con SOS1. A su vez, las correlaciones fueron menos significativas que las calculadas para T (Tabla 2.15).

Tabla 2.15: Correlaciones entre las expresiones relativas de cinco genes relacionados con el transporte de Na⁺ en el genotipo S. Los coeficientes se estimaron a partir de los log₂ de la expresión relativa. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson significativos (p<0,05). En la primera fila se observa el coeficiente en negrita y en la segunda fila el nivel de significancia.

	NHX1	SOS1
SOS1		
VP1	0,79 0,02	
CCC	0,82 <0,0001	0,59 0,02
HKT1		

4. Análisis *in silico* de la región 5' del gen *LtNHX1* en dos genotipos contrastantes frente a salinidad

4.1. Identificación y amplificación de la región 5' de *LtNHX1*

En base a herramientas bioinformáticas, se encontró la secuencia Lj5g3v1427750.2 de la base de datos de *L. japonicus* del Instituto Kazusa que presenta una región con un 99 % de identidad en una cobertura del 22 % con la secuencia de *LtNHX1*. Se diseñaron cebadores directos sobre la región 5' de la secuencia (aguas arriba del ATG inicial del gen predicho *LjNHX1*), y cebadores reversos sobre el final de la región 5' y la secuencia de *LtNHX1*. Se realizaron reacciones de PCR sobre ADN genómico de una planta de *L. tenuis*. Se lograron amplificaciones de fragmentos de entre 611 y 1658 pb de la región 5' (Figura 2.14).

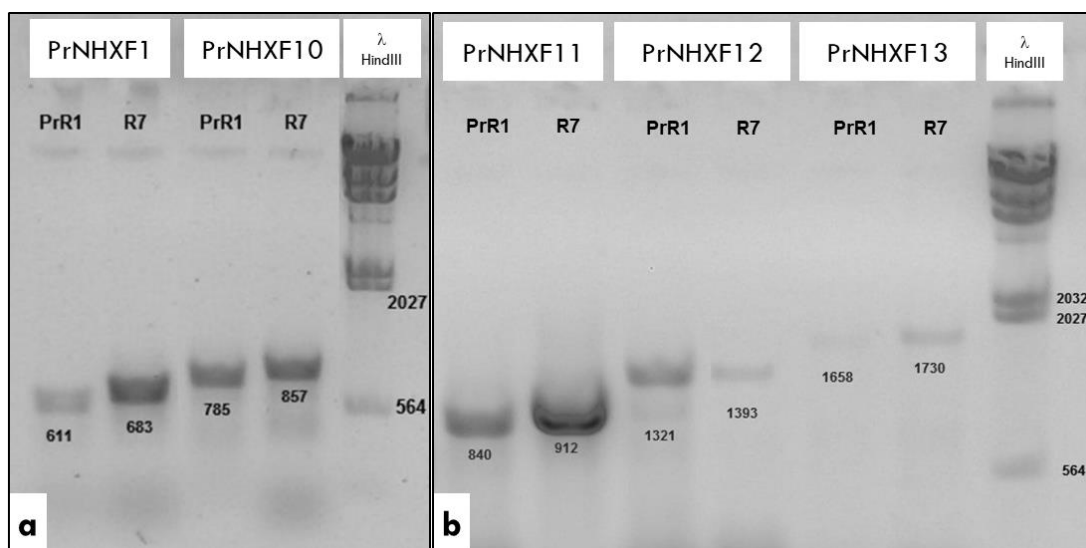


Figura 2.14: Amplificación de fragmentos de distinto tamaño de la región 5' aguas arriba del ATG inicial de *LtNHX1*. a. Amplificaciones con las combinaciones de los cebadores directos PrNHXF1 y PrNHXF10. b. Amplificaciones con las combinaciones de los cebadores directos PrNHXF11, PrNHXF12 y PrNHXF13. En el recuadro blanco se indica el cebador directo, y debajo el reverso. En los dos geles se utilizó el marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII (ThermoFisher, Estados Unidos).

4.2. Análisis *in silico* la región 5' de *LtNHX1*

El fragmento de 1321 pb de la región 5' se clonó en el vector pCR™8/GW/TOPO™ y se secuenció. Se realizó un análisis de alineamientos múltiples con la herramienta Clustal Omega entre el fragmento secuenciado y las regiones 5' de las secuencias *NHX1* de otras leguminosas (*C. arietinum*, *G. max*, *L. japonicus*, *V. radiata*, *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris*). Presentaron una similitud de entre 38,93 % y 54,79 %, con excepción de *L. japonicus*, que presentó un 93,55 % de similitud (Tabla 2.16).

Tabla 2.16: Identidad (%) entre el fragmento secuenciado de la región 5' de *LtNHX1* y las de genes *NHX1* de otras leguminosas, según el análisis Clustal Omega.

	<i>Lotus tenuis</i>
<i>Lotus japonicus</i>	93,55
<i>Glycine max</i>	54,79
<i>Vigna radiata</i>	49,91
<i>Medicago truncatula</i>	40,02
<i>Phaseolus vulgaris</i>	38,93

En la figura 2.15 se observa el alineamiento entre las dos secuencias del género *Lotus*.



Figura 2.15: Alineamiento de la región 5' secuenciada del gen *NHX1* de *L. tenuis* y la región 5' del posible gen *NHX1* de *L. japonicus*. (*) indica coincidencia de bases.

Se realizó el análisis de la secuencia mediante PlantCARE y AtPAN hallando posibles sitios de unión de factores de transcripción y elementos reguladores en *cis* de tipo MYC, MYB y ABRE, entre otros (Tabla 2.17 y Figura 2.16).

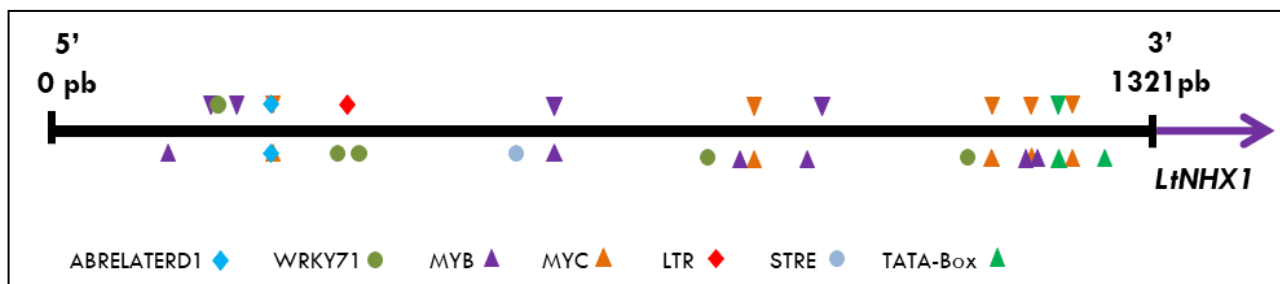


Figura 2.16: Predicción de elementos reguladores en *cis* relacionados con estreses abióticos de la región 5' de *LtNHX1* mediante las herramientas bioinformáticas PlantCare y AtPan.

4.3. Análisis in silico comparativo de la región 5' del gen *LtNHX1* de dos genotipos con comportamiento contrastante frente a la salinidad

Se amplificaron 1321 pb de las regiones 5' del gen *NHX1* de los genotipos S y T (Figura 2.17).

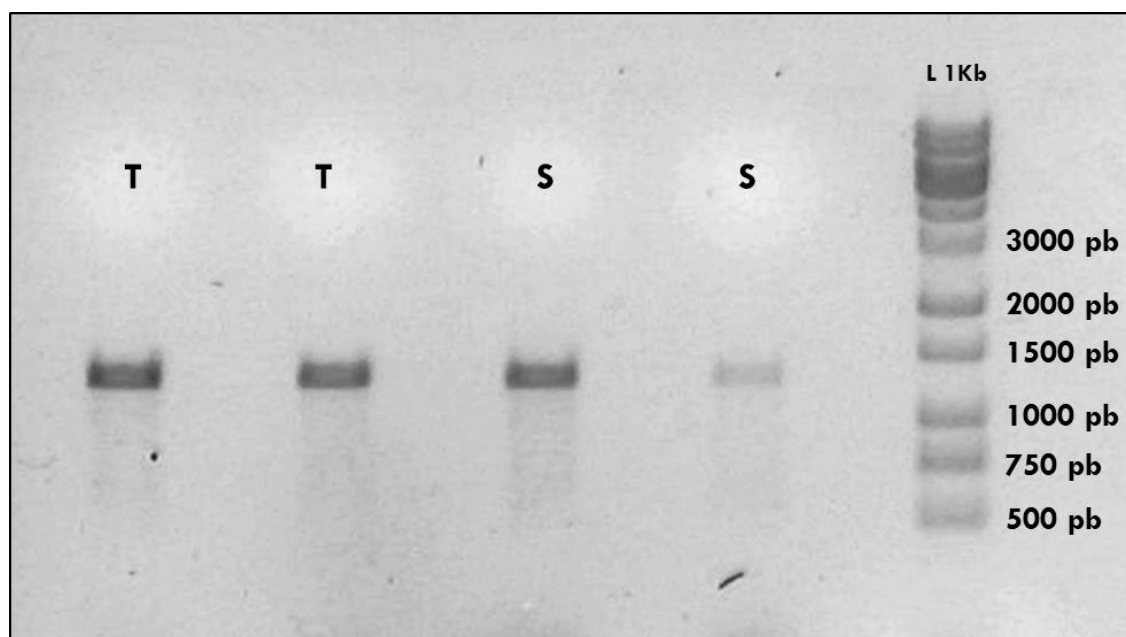


Figura 2.17: Amplificación de la región 5' de *LtNHX1* de los genotipos T y S. Se realizaron dos repeticiones de cada reacción de PCR y se resolvieron en gel de agarosa (0,8 %). L1Kb: marcador de peso molecular Ladder 1kpb plus (PB-L, Argentina).

Se lograron secuenciar en forma confiable 1192 pb en los dos casos y se realizó su análisis *in silico*. Para los alineamientos múltiples se incluyeron las secuencias del género *Lotus* analizadas en la sección anterior. Es de destacar que la región 5' del gen *NHX1* del genotipo S presentó mayor identidad con la secuencia de *L. japonicus* que con las otras dos, pertenecientes a su misma especie (Tabla 2.18). Las secuencias más similares fueron las

del genotipo T y la secuencia de *L. tenuis* secuenciada previamente, ambas provenientes de FMH del programa de mejoramiento genético de la UI UNNOBA-INTA, con lo cual pudieron presentar un origen común.

Tabla 2.18: Tabla 2.: Identidad (%) entre los fragmentos secuenciados de las regiones 5' de *LtNHX1* de los genotipos S y T de *L. tenuis*, la secuencia disponible de *L. japonicus* y de una secuencia de *L. tenuis* secuenciada con anterioridad.

	T - <i>L. tenuis</i>	<i>L. tenuis</i> anterior	<i>L. japonicus</i>
S - <i>L. tenuis</i>	94,68	95,70	96,56
T - <i>L. tenuis</i>		97,37	93,46
<i>L. tenuis</i> anterior			95,10

Si bien las secuencias de los genotipos S y T presentaron alta similitud, existieron algunas inserciones, deleciones y polimorfismos de nucleótidos únicos. Esto generó diferencias en la cantidad de elementos reguladores y sitios de unión de factores de transcripción predichos por las herramientas bioinformáticas (Tabla 2.). Las diferencias observadas no pueden por sí mismas relacionarse con la tolerancia o susceptibilidad del genotipo. Más aún, el genotipo susceptible presentó mayor cantidad de elementos predichos relacionados con estrés abiótico (Tabla 2.19 y Figura 2.18).

Tabla 2.19: Elementos reguladores predichos en la región 5' del gen *NHX1* de los genotipos S y T de *L. tenuis*. Se indica la función y la cantidad predicha de cada elemento según el análisis realizado con dos herramientas, PlantCARE y AtPAN. En gris se indica la mayor cantidad, si la hubo, en cada caso.

Función	Elemento	PlantCARE		AtPAN		
		S	T	S	T	
Estrés abiótico	Respuesta a ABA y deshidratación	ABRE	3	3	2	2
	Respuesta a deshidratación	ACGTATERD1			4	4
	Respuesta a estrés abiótico y otras	Myb	2	3	8	9
	Respuesta a estrés abiótico y otras	Myc	2	1	12	10
	Respuesta a estrés abiótico y otras	STRE	2	1		
	Respuesta a estrés abiótico y otras	Wrky71			5	3
	Anaerobiosis	ARE	3	4		
	Anoxia	GC	1	0		
	Baja temperatura	LTR	1	1		

Tabla 2.19: Elementos reguladores predichos en la región 5' del gen *NHX1* de los genotipos S y T de *L. tenuis*. Se indica la función y la cantidad predicha de cada elemento según el análisis realizado con dos herramientas, PlantCARE y AtPAN. En gris se indica la mayor cantidad, si la hubo, en cada caso.

	Función	Elemento	PlantCARE		AtPAN	
			S	T	S	T
Hormonas	Respuesta a etileno y estrés biótico	SR1			2	2
	Respuesta a auxina	ARF			1	1
	Respuesta a auxina y ácido salicílico	ASF-2			6	4
	Respuesta a citoquinina	ARR1			20	19
	Respuesta a etileno	ERE	0	1		
	Respuesta a giberelinas	GARE	1	1		
	Respuesta a metil-jasmonato	CGTCA	1	1		
	Respuesta a metil-jasmonato	TGACG	1	1		
Otros	Heridas	WUN	1	1		
	Respuesta a la luz	ATCT	0	1		
	Respuesta a la luz	GT1	4	4	21	28
	Respuesta a la luz	Sp1	1	0		
Participación en la transcripción	Unión de proteínas	F-Box	1	1		
	Unión de proteínas	G-Box	1	1		
	Frecuencia y eficiencia de transcripción	CAAT	24	24	14	15
	Inicio de transcripción	TATA Box	2	2	1	1

DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó con el fin de conocer de forma más acabada la relación entre la acumulación y transporte de iones y la tolerancia a la salinidad en *Lotus tenuis*. Para esto, se compararon en condiciones salinas el peso seco, la sobrevivencia, el contenido de iones y la expresión relativa de genes codificadores de transportadores de membrana de dos genotipos previamente seleccionados por su comportamiento contrastante frente al estrés salino.

Se confirmaron las diferencias existentes en la tolerancia a la salinidad entre los genotipos, tanto en la reducción del peso seco luego de 28 días de exposición a 100, 200 y 300 mM de NaCl, como en la sobrevivencia en los dos tratamientos más severos (Figuras 2.3, 2.4 y 2.6).

Se evaluó el contenido de iones en los distintos tejidos, con intención de determinar el mecanismo de tolerancia a la salinidad preponderante. El genotipo susceptible acumuló en promedio más Na^+ y Cl^- que el genotipo tolerante en todos los tejidos evaluados (Figura 2.7). En coincidencia, en un estudio con *L. tenuis*, Teakle *et al.* (2006) asociaron un mayor efecto del estrés salino con una mayor acumulación de Na^+ y Cl^- en la parte aérea. Debido a que la toxicidad de estos iones es mayor en hojas que en raíces, la eficiencia en la exclusión de los mismos por parte de las raíces, la carga en el xilema o la eliminación de los mismos en parte aérea es determinante en la tolerancia (Munns, 2002; Munns & Tester, 2008; Shabala, 2013; Tester & Davenport, 2003). Los resultados de este estudio sugieren que el genotipo susceptible fue menos eficiente en estos mecanismos que controlan los contenidos de iones en los tejidos.

La relación K^+/Na^+ se considera determinante en la tolerancia a salinidad debido a la importancia del K^+ en el metabolismo celular, y la tendencia del Na^+ a desplazarlo cuando se encuentra en altas concentraciones (Maathuis & Amtmann, 1999; Shabala & Cuin, 2007; Shabala & Pottosin, 2014). En concordancia con esto, el genotipo tolerante presentó en promedio mayores contenidos de K^+ y menor disminución respecto al control que el susceptible, con valores cercanos al 100 % (Figura 2.8b). El menor incremento en el contenido de Na^+ , y la menor disminución en el de K^+ , propiciaron una mayor relación K^+/Na^+ , cuya correlación con la tolerancia a la salinidad se encontró en diversas especies (Chakraborty, Bose, Shabala, Eyles, & Shabala, 2016).

En relación al control, el genotipo tolerante no solo presentó menores incrementos de Na^+ y Cl^- en hoja y tallo, sino que la acumulación de estos iones en raíz fue superior que en el caso

del genotipo susceptible (Figura 2.8). Esto podría indicar una mayor compartimentalización de iones en las vacuolas de las raíces, lo cual depende del antiporter *NHX1* (Munns & Tester, 2008). En este trabajo, el genotipo tolerante incrementó la expresión del gen *NHX1* en raíz en condiciones salinas hasta cuatro veces respecto al control, lo que indicaría la existencia de este mecanismo (Tabla 2.8). Si bien el mismo está descrito principalmente en las hojas (Apse *et al.*, 1999; Munns & Tester, 2008), recientemente en una comparación entre trigo duro y trigo pan se ha demostrado que el mayor secuestro de Na^+ en las vacuolas de las raíces puede conferir tolerancia diferencial a la salinidad (H. Wu *et al.*, 2018). En hoja, la expresión de *NHX1* dependió del momento de evaluación. A las 48 y 72 horas de exposición a los tratamientos salinos, el genotipo susceptible incrementó el número de transcritos respecto al control; mientras que a las 96 horas, fue el genotipo tolerante el que activó la expresión del gen (Tabla 2.8). En coincidencia con los cambios en la expresión de *NHX1*, el genotipo tolerante presentó menores contenidos de Na^+ respecto al control en los dos primeros momentos de evaluación, y mayores a las 96 horas en los tratamientos de 100 y 200 mM (Figura 2.9). El genotipo susceptible pudo haber activado la expresión de *NHX1* a las 48 y 72 horas como una forma de hacer frente a los crecientes contenidos de Na^+ , evitando su toxicidad en el citosol al compartimentalizarlo en la vacuola. Sin embargo, este mecanismo pudo resultar menos eficiente que la presumible acumulación en las vacuolas de las raíces realizada por el genotipo tolerante, con la consecuente toxicidad iónica que determinó una mayor reducción en el crecimiento y una mayor mortandad en las plantas del genotipo susceptible. Se había reportado con anterioridad que si bien *NHX1* incrementó su expresión en hojas de genotipos de alfalfa y de frutilla, la partición de Na^+ en las vacuolas de las raíces brindó una ventaja adicional para la tolerancia de algunos de ellos (Sandhu *et al.*, 2017, 2019). Lo mismo ocurrió en una comparación entre dos genotipos contrastantes de trigo pan, con un mayor incremento en la expresión de *TaNHX1* en raíces del genotipo tolerante (Singh, Mahajan, Singh Kumar, Kumar, & Kumar, 2019); y en genotipos de raigrás perenne (M. Liu, Song, & Jiang, 2018). En este último caso, no solo hubo un incremento de la expresión en raíces del genotipo tolerante sino también una reducción en la expresión de *NHX1* en raíces del susceptible, coincidiendo en parte con el presente trabajo.

Se realizó la secuenciación y posterior análisis de la región 5' de *LtNHX1* mediante las herramientas bioinformáticas PlantCARE y AtPAN hallando posibles sitios de unión de factores de transcripción y elementos reguladores en *cis* de tipo MYC, MYB y ABRE, entre otros (Tabla 2.17). Estos elementos están relacionados con la respuesta al estrés abiótico y fueron hallados en los promotores de genes relacionados con la respuesta al estrés salino (P. K. Agarwal *et al.*, 2018; Moghadam, Taghavi, Niazi, Djavaheeri, & Ebrahimie, 2012; Tuteja,

2007) y en promotores del gen *NHX1* en otras especies (Nawaz *et al.*, 2014; Tiwari *et al.*, 2019). Si bien se encontraron diferencias en las secuencias de las regiones 5' de *LtNHX1* de los genotipos con comportamiento contrastante frente a salinidad, el análisis *in silico* no indica por sí mismo que existan diferencias en la regulación de *LtNHX1* entre los mismos. Para complementar estos resultados se podrían realizar estudios funcionales con marcadores visualizables que profundizarían los conocimientos sobre la influencia de la región 5' en la expresión de *LtNHX1*, considerando además la posible acción reguladora de los intrones del gen (Rose, 2008).

El gen de la pirofosfatasa vacuolar, *VP1*, solo incrementó significativamente su expresión respecto al control en hojas del genotipo tolerante a 96 horas de iniciados los tratamientos (Tabla 2.9). Sin embargo, presentó una correlación altamente significativa con la expresión relativa de *NHX1* (Tabla 2.13). Esta correlación también se encontró en hojas y raíces de *Arabidopsis* (Jha, Shirley, Tester, & Roy, 2010) y está relacionada con su función, debido a que en conjunto con las ATPasas vacuolares, aportan el gradiente de H^+ necesario para el funcionamiento del antiporter *NHX1* (Munns, 2005).

Por otra parte, la mayor acumulación de Na^+ en raíces respecto al control en el genotipo tolerante, y su menor acumulación en parte aérea, puede indicar la presencia de otros mecanismos de tolerancia. La exclusión de Na^+ para controlar el transporte a la parte aérea es el principal mecanismo de tolerancia para diversas especies y depende de transportadores como *SOS1* o *HKT1* (Munns, 2005; Munns & Tester, 2008). El antiporter de la membrana plasmática *SOS1* permite la exclusión del Na^+ del citosol en raíces, retornándolo al medio o movilizándolo hacia el xilema que lo distribuye a parte aérea (Blumwald *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2011; Munns & Tester, 2008; Olías *et al.*, 2009). En este estudio, la expresión del gen *SOS1* se vio incrementada en las raíces del genotipo tolerante a las 72 horas de iniciado el tratamiento con 200 mM NaCl, a diferencia del genotipo susceptible, que no incrementó su expresión en ningún momento (Tabla 2.10). Esto coincide con lo hallado en ecotipos de *A. thaliana* con distinto comportamiento frente al estrés salino: *SOS1* incrementó su expresión únicamente en los ecotipos tolerantes y esto se correlacionó con el contenido total de sodio en la planta (Jha *et al.*, 2010). También se encontró expresión diferencial de este gen en raíces de alfalfa (Sandhu *et al.*, 2017) y en trigo, donde el incremento de los transcritos en los genotipos tolerantes ocurrió en raíces y hojas (Sathee, Sairam, Chinnusamy, & Jha, 2015).

En hojas, el genotipo tolerante incrementó hasta siete veces la expresión de *SOS1* a las 96 horas de iniciados los tratamientos, con cierta tendencia a disminuir la expresión con el

incremento de la concentración salina (Tabla 2.10). Esto puede indicar una mejor exclusión de Na^+ del citosol en las mismas, y mayor movilización hacia el xilema, lo que favorece su transporte (Ismail & Horie, 2017). El gen *HKT1* también incrementó la cantidad de transcritos en hojas del genotipo tolerante a las 96 horas, pero con una tendencia contraria a *SOS1*, ya que presentó incrementos significativos a mayores concentraciones salinas (Tabla 2.12). El transportador *HKT1* realiza la descarga de Na^+ del xilema y su carga en floema, permitiendo su recirculación desde parte aérea a raíz o de hojas jóvenes a hojas viejas (Davenport *et al.*, 2007; Jabnourne *et al.*, 2009). De esta forma, el transporte de Na^+ depende de la acción concertada de *SOS1* y *HKT1*. Es posible que a concentraciones moderadas, exista mayor actividad de *SOS1* con mayor exclusión en hojas y transporte por xilema, mientras que a concentraciones más severas haya mayor recirculación a raíz por medio de *HKT1*. Lamentablemente, no pudo contarse con resultados de expresión génica en raíces a las 96 horas de iniciados los tratamientos, lo cual permitiría explicar lo que ocurre en relación al transporte de forma más acabada.

Además de su aumento en hoja, los transcritos de *HKT1* se incrementaron en raíces del genotipo tolerante a las 48 horas de iniciados los tratamientos, con mayor expresión a altas concentraciones (Tabla 2.12). Si bien en este estudio los incrementos de la expresión de *SOS1* en raíz a las 48 horas no fueron significativos, se ha reportado una mayor expresión de *SOS1* en condiciones salinas moderadas, con la consiguiente exclusión y carga en el xilema que permite su llegada a las hojas (Guo *et al.*, 2012; W. D. Zhang *et al.*, 2017). Sin embargo, en condiciones salinas más severas, cuando la compartimentalización en vacuolas resulta insuficiente y el Na^+ que llega a las hojas debido a la actividad de *SOS1* necesita ser redistribuido, la actividad de *HKT1* sería mayor (Guo *et al.*, 2012; W. D. Zhang *et al.*, 2017). Los iones que llegan a raíz a partir de la carga del floema realizada por *HKT1* pueden compartimentalizarse o participar en la osmoregulación, lo que genera tolerancia osmótica (Munns & Tester, 2008; Roy *et al.*, 2014; H. Wu *et al.*, 2018). Los mecanismos de tolerancia mediados por *HKT1* y *SOS1* pueden ser complementarios a la compartimentalización en vacuolas, ya que el objetivo siempre es eliminar el Na^+ de donde produce mayores efectos tóxicos.

En síntesis, la exclusión del Na^+ en raíces por medio de *SOS1*, su compartimentalización gracias a la actividad de *NHX1*, y la descarga del xilema mediada por *HKT1* permiten reducir o retrasar su llegada a las hojas. Incluso cuando a las 96 horas de iniciados los tratamientos, el contenido de Na^+ en hojas respecto al control fue superior en el genotipo tolerante que en el susceptible, el tolerante incrementó la expresión de los tres genes relacionados con el transporte y acumulación de este ion, presumiblemente contribuyendo a la tolerancia. El

genotipo susceptible activó únicamente la transcripción del gen NHX1 en hoja a las 48 y 72 horas de iniciados los tratamientos, lo cual resultó insuficiente para disminuir los efectos tóxicos del Na⁺.

Si bien la exclusión de Cl⁻ ha sido menos estudiada, la correlación entre la misma y la tolerancia a salinidad fue reportada sobre todo en leguminosas, entre ellas *L. tenuis* (revisado por Teakle & Tyerman, 2010). Los cotransportadores CCC median el transporte de cationes K⁺ y/o Na⁺ acoplados a Cl⁻ y han sido considerados candidatos para la exclusión de Cl⁻, aunque existen discrepancias en cuanto a su ubicación, sus mecanismos de transporte y su importancia en la tolerancia a la salinidad (Henderson *et al.*, 2018). En el presente estudio, el genotipo tolerante presentó menor contenido de Cl⁻ en relación al control en hoja y mayor en raíz en comparación con el susceptible (Figura 2.8), e incrementó la expresión del gen CCC en este órgano en 100 y 200 mM NaCl a las 48 horas de aplicados los tratamientos (Tabla 2.11). Estos resultados coinciden con un estudio previo en *L. tenuis*, en el que una mayor expresión del gen CCC en raíz en condiciones salinas respecto al control, se relacionó con un bajo contenido de Cl⁻ en parte aérea y alto en raíz (Teakle, 2008). Lo contrario ocurrió en plantas de *arabidopsis* con el gen CCC silenciado: mayor acumulación de Cl⁻ en parte aérea y menor en raíz en relación a plantas *wild-type* cuando se trataron con 50 mM NaCl (Colmenero-Flores *et al.*, 2007). El genotipo susceptible incrementó la expresión de CCC en hoja en los dos primeros momentos de evaluación, aunque no en todas las concentraciones salinas (Tabla 2.11). Sin embargo, al no estar completamente estudiado el mecanismo de transporte de CCC, no se puede concluir si esto podría deberse a un mecanismo de acumulación o exclusión de cloruro.

Luego de la evaluación realizada, puede considerarse que existe una relación entre los contenidos de Na⁺ en dos genotipos de *L. tenuis* con comportamiento contrastante frente a la salinidad y la expresión de los genes estudiados relacionados con su transporte y compartimentalización, lo que influye en su crecimiento y sobrevivencia en dicha condición estresante.

CONCLUSIONES

- Se confirmó la diferencia existente en la tolerancia a la salinidad entre dos genotipos de *Lotus tenuis* previamente seleccionados, tanto si se considera la reducción del peso seco como la sobrevivencia en condiciones salinas.
- Existieron diferencias en los cambios en la expresión relativa de genes relacionados con la respuesta a estrés salino entre los genotipos evaluados. El genotipo tolerante presentó, en comparación con el control sin agregado de sales, incremento en la expresión de los genes *NHX1*, *SOS1*, *CCC* y *HKT1* en raíz, y de *NHX1*, *SOS1*, *VP1* y *HKT1* en hoja. El genotipo susceptible únicamente presentó incremento en la expresión de *NHX1* y *CCC* en hoja.
- El agregado de sal incrementó los niveles de Na^+ y Cl^- en ambos genotipos. En raíz el incremento con respecto al control sin agregado de sal fue mayor en el genotipo tolerante. En parte aérea ocurrió lo contrario y fue el genotipo susceptible el que presentó mayores incrementos respecto al control. Esto podría indicar una exclusión de iones más eficiente, y un mayor secuestro de los mismos en las vacuolas de la raíz en el genotipo tolerante. Ambos mecanismos propiciarían una reducción de la toxicidad iónica en parte aérea, influyendo en la tolerancia a la salinidad. Los cambios en la expresión génica apoyaron esta conjetura.
- La región 5' de *LtNHX1* presenta similitud con las regiones 5' de los genes *NHX1* de otras leguminosas y se predijeron posibles elementos reguladores relacionados con la respuesta a estrés abiótico.
- Los polimorfismos en las secuencias de las regiones 5' de *LtNHX1* de los genotipos con comportamiento contrastante frente a salinidad no indican por sí mismas diferencias en la regulación de los genes. Está abierta la posibilidad de profundizar los estudios mediante diferentes herramientas moleculares, por ejemplo, análisis del control transcripcional de secuencias marcadoras visualizables.

**CAPITULO 3: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN DEL ANTIPTER
VACUOLAR NHX1 DE *LOTUS TENUIS***

Este capítulo se realizó en colaboración con la Dra Mariana del Vas (Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA), la Dra Fabiana Espasandín (Instituto de Botánica del Nordeste) y el Dr Pedro Sansberro (Instituto de Botánica del Nordeste)

INTRODUCCIÓN

El estrés salino afecta el crecimiento de las plantas debido a la reducción de la capacidad de absorción de agua y a la acumulación excesiva de iones en los tejidos, especialmente Na^+ y Cl^- (Munns & Tester, 2008). Existen diversos mecanismos de tolerancia al estrés que se orientan a mantener el equilibrio osmótico y oxidativo, excluir iones tóxicos de células y tejidos, y/o tolerar la presencia de dichos iones, sin que esto afecte el funcionamiento de las células (Deinlein *et al.*, 2014; Munns & Tester, 2008; Shabala & Munns, 2017; Tang *et al.*, 2015).

Los antiporters de tipo NHX (Na^+/H^+ eXchange) pertenecen a la superfamilia de proteínas de transporte CPA (*Cation:Proton Antiporter*) y median el intercambio de Na^+ o K^+ por H^+ en las células vegetales, regulando la homeostasis iónica (Bassil, Zhang, Gong, Tajima, & Blumwald, 2019). En la especie modelo *Arabidopsis thaliana* se conocen ocho isoformas, dos en la membrana plasmática y seis intracelulares (Reguera, Bassil, & Blumwald, 2014). Estas últimas se dividen en dos grupos. El grupo I está conformado por los antiporters AtNHX1 a AtNHX4 que se ubican en la membrana vacuolar o tonoplasto (Bassil, Tajima, *et al.*, 2011; McCubbin *et al.*, 2014), mientras que los antiporters del grupo II, AtNHX5 y AtNHX6, se encuentran en la red del Golgi, el trans-Golgi y compartimentos endosomales (Bassil, Ohto, *et al.*, 2011).

El antiporter NHX1 ha sido muy estudiado en relación con la aclimatación y tolerancia a salinidad debido a que facilita la compartimentalización de los iones Na^+ en las vacuolas, lo cual constituye un mecanismo eficiente para prevenir sus efectos tóxicos en el citosol (Apse *et al.*, 1999; Bassil *et al.*, 2019; Blumwald, 2000; Blumwald & Gelli, 1997). Además, podría contribuir con la tolerancia al mantener la homeostasis de K^+ en condiciones salinas (Y. C. Ma, Aug, Dong, & Cheng, 2017). Se ha demostrado en diversas especies un incremento de los transcritos del gen codificador del antiporter NHX1 en condiciones salinas, y que la expresión constitutiva del mismo en plantas transgénicas incrementa la tolerancia (P. Agarwal *et al.*, 2014; H. Chen *et al.*, 2007; Gouiaa *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2004; H. X. Zhang & Blumwald, 2001; H. X. Zhang *et al.*, 2001).

Lotus tenuis es una leguminosa forrajera naturalizada en los campos bajos de la Pampa Deprimida Argentina, que posee alta plasticidad y capacidad de soportar condiciones de estrés abiótico (Ayers, 1948; Grattan *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 1997; Sanchez, Pieckenstain, Escaray, *et al.*, 2011; Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011; Schachtman & Kelman, 1991; Teakle *et al.*, 2007; Uchiya *et al.*, 2016; Vignolio & Fernández, 2006). Si bien se la considera una especie tolerante a la salinidad, los mecanismos

involucrados en la respuesta a estrés salino no están totalmente aclarados. No es sorprendente que, dada la evidencia previamente mencionada de la relación entre el antiporter NHX1 y la tolerancia a salinidad, los estudios a nivel molecular que pretenden determinar los mecanismos de tolerancia de *L. tenuis* se hayan dirigido en primera instancia a este antiporter.

Un grupo de investigación comparó las respuestas frente a la salinidad y a una combinación de salinidad y anegamiento de *L. tenuis* y de la especie relacionada *Lotus corniculatus* (Teakle, 2008; Teakle, Amtmann, *et al.*, 2010; Teakle *et al.*, 2007, 2006). En soluciones nutritivas bien aireadas con alto contenido de NaCl, no existieron diferencias entre las especies en el contenido de Na⁺ en tallo o en xilema (Teakle *et al.*, 2007, 2006). Sin embargo, en un tratamiento salino combinado con anegamiento simulado, el contenido de Na⁺ en los tallos de *L. tenuis* fue tres veces inferior al de *L. corniculatus* (Teakle *et al.*, 2007). La mayor tolerancia de *L. tenuis* a salinidad y deficiencia de O₂ se debería al menor transporte de iones a la parte aérea generado por una menor carga en xilema, y a la mayor porosidad de la raíces por la formación constitutiva de aerénquima (Teakle *et al.*, 2007). En *L. tenuis*, los iones se acumularon en mayor medida en raíces, limitando el transporte, y puede pensarse que el Na⁺ se compartimentalizó en vacuolas utilizando transportadores NHX (Teakle, Amtmann, *et al.*, 2010). A partir de estos resultados, se clonó un gen del tipo NHX de *L. tenuis* (*LtNHX1*, Genbank: EU727217.1) que en base a características moleculares y a su caracterización funcional en levaduras, se trataría de un auténtico antiporter vacuolar de la clase I (Teakle, Amtmann, *et al.*, 2010). Se confirmó el aumento de transcritos de *NHX1* en raíces de *L. tenuis* y *L. corniculatus* en presencia de 200 mM de NaCl, como así también, la disminución de los mismos en *L. corniculatus* en un tratamiento combinado de salinidad y anegamiento. Se especuló que en *L. corniculatus* el déficit de O₂ en raíces generado por el anegamiento tendría como consecuencia una disminución en el contenido de ATP y por lo tanto impediría la actividad de las bombas H⁺-ATPasas y pirofosfatasas, disminuyendo los gradientes de protones a través de la membrana y entorpeciendo el funcionamiento eficaz de los transportadores iónicos, entre ellos el antiporter Na⁺/H⁺. Esto no ocurriría en *L. tenuis*, contribuyendo en su tolerancia.

Si bien ya se había realizado el clonado de la región codificante de *LtNHX1*, quedaba por demostrar si la secuencia nucleotídica publicada (GenBank: EU727217.1) es efectivamente ortóloga a la secuencia de *NHX1* de *A. thaliana* (GenBank: NM_122597.3) y si además, como en otras especies, es un determinante fundamental de la tolerancia a salinidad. En este trabajo, se pretendió demostrar su importancia a través de dos estrategias: el estudio de su localización a través de la obtención de la proteína de fusión *LtNHX1*-GFP, y el estudio

de los cambios en la tolerancia a la salinidad de *L. tenuis* y *A. thaliana* a partir de su expresión constitutiva.

Hipótesis

La secuencia nucleotídica publicada del antiporter NHX1 de *Lotus tenuis* (GenBank: EU727217.1) es efectivamente ortóloga a la secuencia de NHX1 de *Arabidopsis thaliana* (GenBank: NM_122597.3) e incrementa la tolerancia a la salinidad cuando se expresa en forma constitutiva en *L. tenuis* o en sistemas vegetales heterólogos.

Objetivos

Objetivo general

Realizar la caracterización funcional de la secuencia codificante del gen *NHX1* de *Lotus tenuis* (*LtNHX1*) en respuesta a altas concentraciones salinas.

Objetivos específicos

- Determinar la localización subcelular del antiporter NHX1 de *Lotus tenuis*.
- Estudiar los cambios en la tolerancia a la salinidad de *Lotus tenuis* a partir de la sobreexpresión de la región codificante de *LtNHX1*.
- Estudiar los cambios en la tolerancia a la salinidad de *Arabidopsis thaliana* a partir de la expresión constitutiva de la región codificante de *LtNHX1*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estudio de la localización subcelular de LtNHX1

1.1. Subclonado de *LtNHX1* en el vector p*7FWG2

El subclonado de la secuencia codificante de *LtNHX1* se llevó a cabo utilizando el sistema Gateway™ (Invitrogen, Estados Unidos). Sobre la secuencia de *LtNHX1* (GenBank: EU727217.1) se diseñaron los cebadores necesarios para amplificar mediante PCR la secuencia completa sin codón de terminación de la transcripción (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen *LtNHX1* sin codón de terminación. Se indica la secuencia, la temperatura de *annealing* (Tm) y el tamaño del amplicón que genera el par de cebadores en pares de bases (pb).

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Amplicón (pb)
NHXcATG NHXsSTOP	ATGGGTCTTGGTCTTATTTCTGCT ATGCCATTGATGACCGTTGC	56	1629

Las reacciones de amplificación (PCR) se realizaron utilizando la enzima USB® Fidelity™ DNA Polymerase (Affimetrix, Estados Unidos) en un volumen final de 25 µl. Se utilizaron 10 ng de ADNc como templado, 0,5 µl de cada oligonucleótido (cebadores *forward* y *reverse*) en concentración 10 µM, 2,5 µl de Buffer 10X, 0,5 µl de mezcla de dNTPs 10 mM y 5 unidades/µl de enzima USB® Fidelity™. El perfil de PCR fue: 3 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 56 °C (Tm) y 1 min 45 seg a 68 °C; y una etapa final de extensión de 10 min a 68 °C. El producto de amplificación fue resuelto en gel de agarosa 0,8 %, teñido con bromuro de etidio (0,5 g/ml) (Figura 3.1) y se purificó mediante el kit QIAEX II (Qiagen, Alemania).

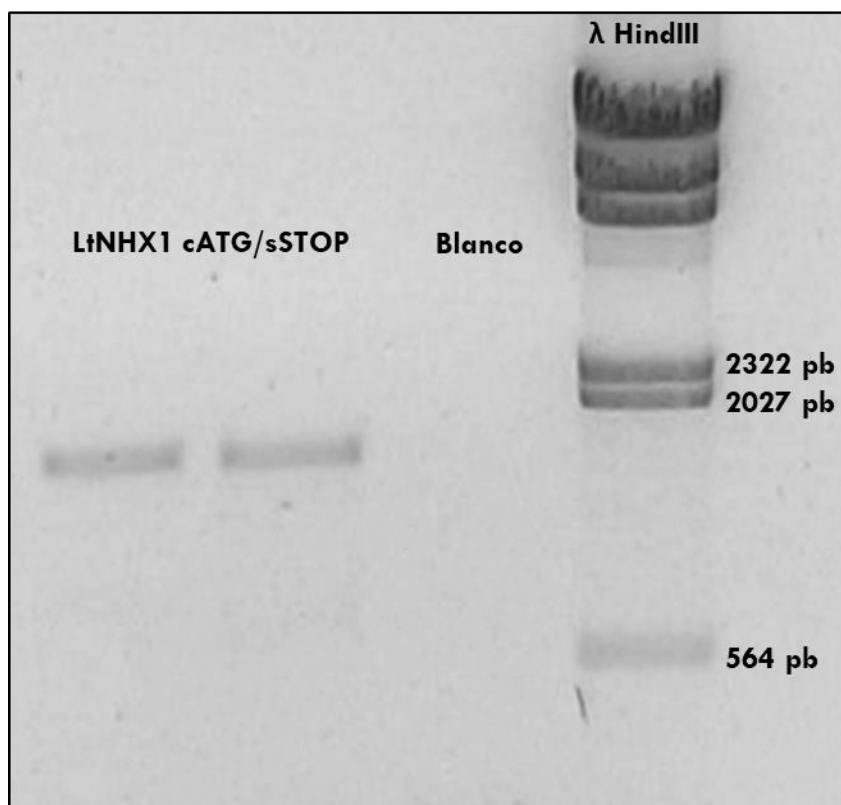


Figura 3.1: Amplificación de la secuencia codificante de *LtNHX1* resuelta en gel de agarosa 0,8 %. Calles 1 y 2: Repeticiones de la amplificación del gen con los cebadores NHXcATG y NHXsSTOP. Calle 3: Blanco sin ADNc. Calle 4: Marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII (ThermoFisher, Estados Unidos).

Posteriormente, se clonaron 60 ng del producto de PCR purificado en el vector pCR™8/GW/TOPO™ (Invitrogen, Estados Unidos) según indicaciones del fabricante. Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* cepa DH5α mediante *shock* térmico. Para esto, se mezclaron 50 μl de células competentes con 2 μl del vector, se incubaron 30 min en hielo y se les realizó el *shock* térmico a 42°C durante 1 min 30 seg. Se transfirieron a hielo durante 2 min, se adicionó 1 ml de medio Luria-Bertani (LB) y se incubó a 37 °C con agitación suave durante 45 min. Posteriormente se centrifugó 3 min a 3000 rpm, se descartó el sobrenadante y se distribuyeron las bacterias en placas de Petri con LB agar y espectinomicina (100 μg/ml) como agente de selección. Se seleccionaron los clones positivos y se realizó extracción de ADN plasmídico según lo indicado por Green & Sambrook (2016). Para comprobar el correcto clonado y orientación del inserto, se realizó la digestión de 2 μl de ADN de 12 clones con 0,3 μl de las enzimas HindIII y XbaI (New England Biolabs, Estados Unidos) en un volumen final de 20 μl incluyendo 2 μl de NEBuffer™ 2.1 (10X), 2 μl de albúmina de suero bovino (BSA, 10X) y 0,3 μl de RNAsa (10 ng/μl). Las digestiones se resolvieron en gel de agarosa 0,8 %, teñido con bromuro de etidio

(0,5 g/ml). Los clones con el inserto en la orientación correcta debían presentar luego de la digestión fragmentos de 2976, 1274 y 196 pb, mientras que los clones con el inserto en la orientación antisentido debían presentar fragmentos de 3603, 647 y 196 pb (Figura 3.2).

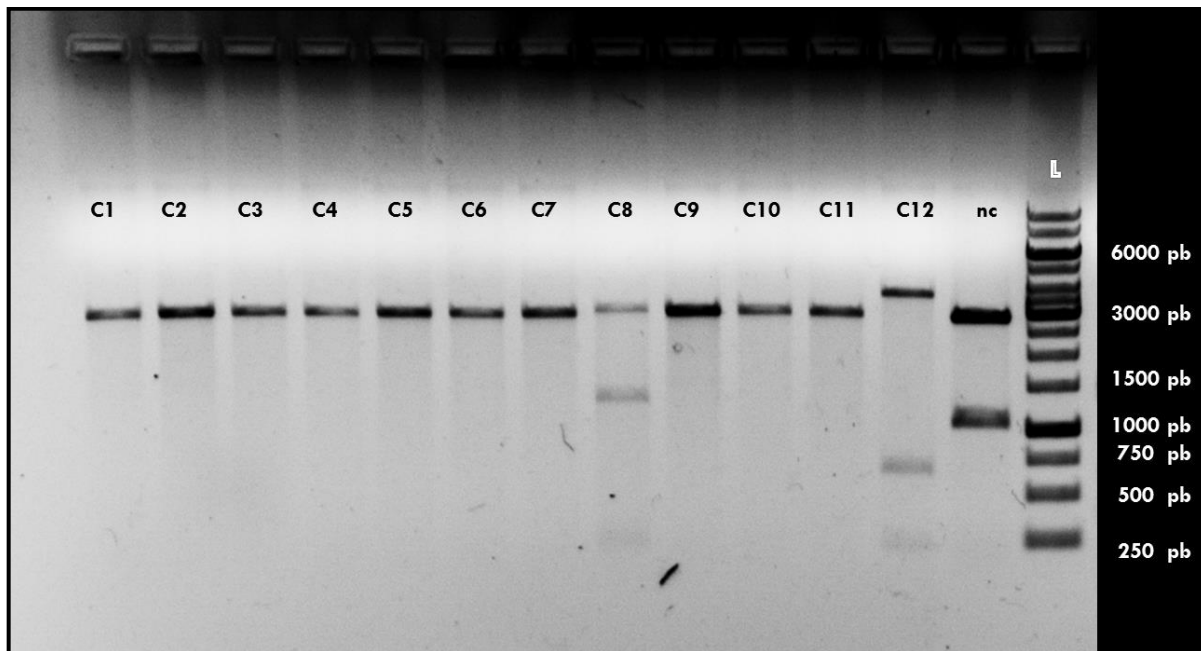


Figura 3.2: Clones de pCR™8/GW/TOPO™ con el inserto *LtNHX1* sin STOP resueltos en gel de agarosa 0,8 %. C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C9, C10, C11: sin inserto. C8: con inserto, orientación correcta. C12: con inserto, antisentido. nc: no corresponde a este estudio. L: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Estados Unidos).

Para confirmar el correcto clonado y orientación del inserto, se realizó la secuenciación de un clon positivo (pTg-NHX1-C8) en la Unidad de Genómica de INTA.

Se linealizaron 2 μ l de ADN del clon pTg-NHX1-C8 con 0,3 μ l de la enzima XbaI en un volumen final de 20 μ l, con 2 μ l de NEBuffer™ 4.1 (10X), 2 μ l de BSA (10X) y 0,3 μ l de RNAsa (10 ng/ μ l). Posteriormente, el fragmento de ADN conteniendo la secuencia de *LtNHX1* flanqueado por sitios de recombinación *attL*, se recombinó en el vector p*7FWG2 (Karimi, Inzé, & Depicker, 2002) utilizando Gateway™ LR Clonase™ II (ThermoFisher, Estados Unidos) según las indicaciones del fabricante. Este vector presenta el gen marcador de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control transcripcional del promotor CaMV35S. Además, presenta como marcador selectivo el gen *bar*, codificante de la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT), que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio. Se transformaron células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 con la construcción obtenida luego de la recombinación (35S::LtNHX1-GFP) y se seleccionaron las colonias positivas con los antibióticos rifampicina (25 μ g/ml), gentamicina

(50 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml). Se realizó extracción de ADN plasmídico de la misma forma que para *E. coli* pero con el agregado de 10 µl de lisozima (50 ng/µl), y la digestión de 2 µl del mismo con 0,3 µl de la enzima de restricción HindIII en un volumen final de 20 µl con 2 µl de NEBuffer™ 2.1 (10X) y 0,3 µl de RNAsa (10 ng/µl). Las recombinaciones correctas presentaron bandas de 9915, 1518 y 196 pb. Posteriormente, se realizó la secuenciación para comprobar la correcta recombinación entre el clon pTg-NHX1-C8 y el vector p*7FWG2.

1.2. Expresión transitoria de *LtNHX1-GFP* en plantas de *Nicotiana benthamiana*

1.2.1. Agroinfiltración y observación en microscopio confocal

La construcción 35S::LtNHX1-GFP fue expresada transitoriamente en plantas de *N. benthamiana* utilizando *A. tumefaciens* cepa GV3101 como vector. Para esto, se hicieron crecer las bacterias a 28 °C durante 24 horas en medio LB suplementado con rifampicina (25 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml). Se centrifugaron las células, se resuspendieron en solución de agroinfiltración (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM y acetosiringona 100 M) hasta una OD₆₀₀ de 0,8, y se infiltraron en la cara abaxial de las hojas de 5 plantas. Como control positivo de la agroinfiltración se utilizó la construcción 35S::cMyc-GFP, obtenida a partir del clonado del gen GFP en el vector Gateway™ pEarleyGate203, que también se agroinfiltró en hojas de 5 plantas. Pasadas 48 horas de la agroinfiltración, se cortaron discos de hojas agroinfiltradas y se observó la localización de la fluorescencia en el microscopio invertido confocal Leica SP5 AOBS del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar. Parte de estos discos fueron plasmolizados previo a su visualización sumergiéndolos en manitol 0,8 M durante 30 minutos para poder observar la membrana vacuolar de forma más clara (Ma *et al.*, 2012). Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia con el *software* ImageJ (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012) a partir de la medición de la densidad integrada (IntDen) que es el producto del área observada y la media del brillo de los píxeles de la misma en escala de grises. A su vez, IntDen fue corregida considerando la media del brillo (*Mean Gray Value*) de zonas cercanas al área de interés, que constituyeron el *background*. Esto se hizo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Fluorescencia corregida (FC)} = \text{IntDen} - \text{Area observada} * \text{Mean Gray Value Background}$$

Cuando se realizaron comparaciones, se utilizó la prueba t de Student mediante el *software* estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017).

1.2.2. Western blot

Se realizó la extracción de proteínas totales a partir de muestras de hojas agroinfiltradas (Isogai, Uyeda, & Lee, 1998). Las muestras obtenidas se calentaron a 99 °C durante 5 minutos en *cracking buffer* y se corrieron en SDS-PAGE 10 %. Luego, se realizó Western blot utilizando un anticuerpo primario policlonal de conejo anti-GFP (Abcam, Reino Unido) y un anticuerpo secundario Anti IgG de conejo obtenido en cabra, conjugado con fosfatasa alcalina (Bio-Rad, Estados Unidos). La detección se realizó utilizando reactivos NBT/BCIP (Promega, Estados Unidos).

1.2.3. Análisis *in silico* de la proteína LtNHX1

Se realizó el análisis *in silico* de la secuencia peptídica predicha del antiporter LtNHX1 (GenBank: ACE78322.1). Se utilizó la herramienta bioinformática SignalP (Petersen, Brunak, von Heijne, & Nielsen, 2011), para predecir la existencia de un péptido señal, y la herramienta EMBOSS ePESTfind (Palmenberg & Sgro, 2008), en búsqueda de secuencias PEST asociadas a proteínas de vida media celular corta (Rechsteiner & Rogers, 1996). También se predijeron sitios potenciales de glicosilación mediante la herramienta GlycoEP (Chauhan *et al.*, 2013).

1.3. Obtención de plantas transgénicas de *L. tenuis* portadoras de 35S::LtNHX1-GFP

1.3.1. Transformación de *L. tenuis* con 35S::LtNHX1:GFP

Se extrajeron fragmentos foliares de plantas de 30 días de *L. tenuis* cv. Pampa INTA obtenidas por germinación *in vitro*, y se inocularon con una suspensión de *A. tumefaciens* cepa GV3101 portadora de la construcción 35S::LtNHX1:GFP según lo publicado por Espasandín *et al.* (2010). Posteriormente, los discos foliares se colocaron durante tres días en oscuridad en medio de regeneración semi-sólido, compuesto por medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con ácido naftalenacético 0,5 µM y 6-benciladenina 20 µM. Luego se transfirieron a medio de regeneración fresco con los agentes de selección glufosinato de amonio (10 ppm) y cefotaxima (400 µg/ml), y se colocaron en cámara de crecimiento a 28 °C con un fotoperíodo de 14 hs de luz. Cada tres semanas se renovó el medio selectivo. Luego de 45 días los explantes se transfirieron a medio MS para el enraizamiento y elongación (Figura 3.3).

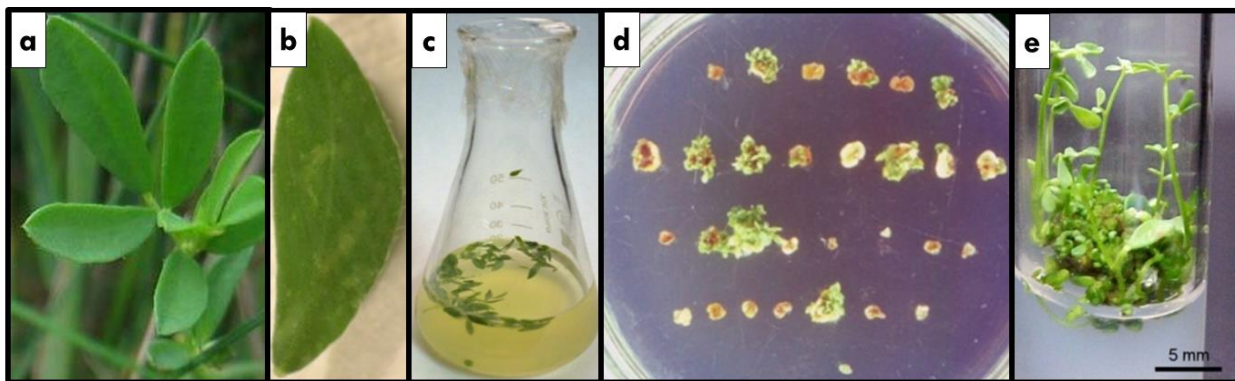


Figura 3.3: Obtención de plantas transgénicas de *L. tenuis* portadoras de 35S-LtNHX1-GFP. a. Foliolo de *L. tenuis* cv. Pampa INTA fuente de explante. b. Explante. c. Co-cultivo de explantes con *A. tumefaciens* portadora de 35S-LtNHX1-GFP. d. Explantes en medio de regeneración/selección. e. Micropropagación de plantas transgénicas.

Las plantas resistentes a glufosinato de amonio fueron analizadas para confirmar la presencia del transgén mediante PCR utilizando cebadores específicos (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Cebadores utilizados para la validación por PCR de la presencia de la construcción 35S::NHX1-GFP en plantas de *L. tenuis* transformadas. Se indica la secuencia, la temperatura de *annealing* (Tm) y el tamaño del amplicón que genera el par de cebadores en pares de bases (pb).

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Amplicón (pb)
35SF NHXR2	GACGTAAGGGATGACGCACAA TTTCACCTGAAACCCGGCAT	58	526

Las extracciones de ADN genómico se realizaron a partir de 30 mg de tejido fresco, que se molieron e incubaron con 600 µl de buffer de extracción (TrisHCl pH 8 100 mM, EDTA pH 8 50 mM, NaCl 700 mM y SDS 2 %) a 60 °C durante 30 min. Se centrifugó a 12000 rpm durante 3 min y se precipitó el ADN del sobrenadante con 300 µl de isopropanol. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se limpió el precipitado de ADN con 100 µl de etanol 70 %. Los precipitados de ADN se resuspendieron en agua y se utilizaron para el análisis de la presencia del transgén.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de reacción de 12,5 µl. En cada reacción se utilizó 0,13 µl de cada dNTP 200 µM, 1,67 µl de *Buffer* Taq 10X, 0,67 µl de Mg²⁺ 2,5 mM, 0,26 µl de cada cebador 10 mM, 0,11 µl de Taq ADN Polimerasa Pegasus (PB-L, Argentina) y 30 ng de ADN templado. Se llevaron a cabo en un termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (ThermoFisher, Estados Unidos), utilizando el siguiente perfil de PCR: 1 min a 95 °C; 35 ciclos de 15 seg a 95 °C, 30 seg a 58 °C (Tm) y 30 seg a 72 °C; y una etapa final de extensión de 7 min a 72 °C. El producto de amplificación fue resuelto en gel de agarosa 0,8 %, teñido con bromuro de etidio (0,5 g/ml).

1.3.2. Evaluación de la expresión de *LtNHX1-GFP*

Se estudió la expresión del transgén *LtNHX1-GFP* para constatar la regulación transcripcional constitutiva. Se tomaron muestras de hoja de plantas transgénicas y *wild-type*, con dos repeticiones biológicas por genotipo. Se realizó la extracción del ARN total con Quick-Zol (Kalium Technologies, Argentina) siguiendo las indicaciones del fabricante y se cuantificó utilizando el *kit* Qubit RNA BR Assay (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos) en el equipo correspondiente. El ADN genómico contaminante se removió con RQ1 RNase-free DNase (Promega, Estados Unidos). Además, se verificó la integridad del ARN extraído en gel de agarosa 1,2 %, teñido con bromuro de etidio (0,5 g/ml) de acuerdo a lo publicado por Masek *et al.*, (2005). El ADNc se sintetizó a partir de 500 ng de ARN total con EasyScript® Reverse Transcriptase (TransGen Biotech, China) utilizando un cebador o *primer* oligo(dT)₁₈ siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se realizó PCR con el protocolo anteriormente detallado, utilizando los cebadores indicados en la tabla 3.3. El gen SEC-5A se utilizó como control de amplificación.

Tabla 3.3: Cebadores utilizados en el análisis de la expresión de *LtNHX1-GFP* en plantas transgénicas de *L. tenuis*. Se indica la secuencia, la temperatura de *annealing* (T_m) y el tamaño del amplicón que genera el par de cebadores en pares de bases (pb).

Gen	Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	T _m (°C)	Amplicón (pb)
SEC-5A	SECF1	GCTGTGGACAATCCAGGACA	58	119
	SECR1	TGCTGGGCAAGAGAAATGAGT		
GFP	GFPF1	GGACGACGGCAACTACAAGA	60	95
	GFPR1	CCTCCTTGAAGTCGATGCCC		

Se determinó la presencia/ausencia del transgén en el ADNc del genotipo transgénico y del *wild-type* en gel de agarosa 2 % teñido con bromuro de etidio (0,5 g/ml).

1.3.3. Observación de plantas transgénicas de *L. tenuis* en microscopio confocal

Fragmentos foliares de las plantas transgénicas obtenidas fueron visualizados en el microscopio invertido confocal Leica SP5 AOBS del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar para determinar la localización de la fluorescencia, aplicando previamente un tratamiento de plasmólisis similar al realizado para las plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas. Como control positivo se utilizó una planta transgénica de *L. tenuis* portadora de la construcción 35S::cMyc-GFP, que había sido utilizada previamente como control positivo de la agroinfiltración.

2. Estudio de la tolerancia a salinidad a partir de la expresión constitutiva de *LtNHX1*

2.1. Evaluación de la tolerancia a la salinidad de plantas de *L. tenuis* que sobreexpresan *LtNHX1*

A partir de la línea transgénica de *L. tenuis* portadora de la construcción 35S::LtNHX1-GFP que se obtuvo para determinar la ubicación subcelular de LtNHX1, se realizaron ensayos para comparar su tolerancia a la salinidad con la de plantas *wild-type*. Para esto, tanto el genotipo transgénico obtenido (G5-2-1) como el genotipo *wild-type* del cual se derivó se propagaron vegetativamente a partir de esquejes nodales.

Posteriormente, se realizó un ensayo en condiciones controladas en cámara de crecimiento ($T^a \approx 25^\circ\text{C}$) con un fotoperíodo de 16 horas de luz, en un diseño completamente aleatorizado (DCA) con tres concentraciones salinas: 0, 100 y 200 mM NaCl. Cada genotipo estuvo representado por 27 clones, 9 en cada tratamiento, que fueron trasplantados a macetas conteniendo arena y perlita (1:1 v/v). Las plántulas se regaron por capilaridad adicionando NaCl a la solución nutritiva Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950), sin realizar aclimatación al estrés. Antes de iniciar los tratamientos se midió la longitud del tallo principal (LTP, cm) para utilizarla posteriormente como covariable, debido a la heterogeneidad en el enraizamiento y crecimiento de los clones. A los 18 días de iniciados los tratamientos se evaluaron LTP y el peso seco total (PST, mg) y se estimaron sus índices de tolerancia (ITLTP e ITPST) a partir de la relación entre el valor de las plantas regadas con NaCl y el promedio del control.

Se registró diariamente la muerte de las plantas cuando existió pérdida total de turgencia, obteniendo la sobrevivencia de cada clon en días desde el inicio de los tratamientos salinos.

Además, se determinó el contenido de Na^+ , K^+ y Cl^- ($\mu\text{Moles g}^{-1}$ Peso Seco) en muestras de hoja previamente secadas a 60°C de tres repeticiones por línea en los tratamientos de 0 y 100 mM, combinando tres plantas en cada repetición. No se utilizaron las muestras del tratamiento de 200 mM ya que varias de ellas no sobrevivieron al ensayo. Las determinaciones de K^+ y Na^+ se realizaron con un fotómetro de llama Corning M410 a partir de extractos de HNO_3 0,5 M que se prepararon adicionando 10 ml del ácido a aproximadamente 100 mg de tejido, cuyo peso exacto fue registrado, e incubando los mismos a 80°C durante una hora. Sobre la misma extracción se determinó el contenido de Cl^- por colorimetría a través del método del “ferricianuro” (Munns *et al.*, 2010) utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25.

2.2. Evaluación de la tolerancia a la salinidad de plantas de *A. thaliana* con expresión constitutiva de *LtNHX1*

2.2.1. Obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana*

2.2.1.1. Subclonado de *LtNHX1* en el vector pEarleyGate203

En este caso, debido al vector utilizado en la recombinación, se diseñaron cebadores sobre la secuencia codificante de *LtNHX1* para amplificarla en forma completa sin el codón de inicio de la transcripción (Tabla 3.4).

Tabla 3.4: Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen *LtNHX1* sin el ATG inicial. Se indica la secuencia, la temperatura de *annealing* (T_m) y el tamaño del amplicón que genera el par de cebadores en pares de bases (pb).

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	T_m (°C)	Amplicón (pb)
NHXsATG NHXcSTOP	GGTCTTGGTCTTATTCTGCTGTTT TCAATGCCATTGATGACCGTTGC	64	1629

Las reacciones de amplificación, purificación, clonado en pCR™8/GW/TOPO™ y transformación de *E. coli* cepa DH5 α se realizaron siguiendo los mismos protocolos que para el subclonado de *LtNHX1* sin codón de *stop* (sección 1.1). Los clones positivos se seleccionaron utilizando el antibiótico kanamicina (50 μ g/ml) como marcador de selección. Se realizó extracción de ADN plasmídico y se seleccionó un clon con la orientación correcta del inserto a partir de la digestión con las enzimas HindIII y XbaI (New England Biolabs, Estados Unidos) como se indicó en la sección 1.1. Los clones con el inserto en la orientación correcta presentaron luego de la digestión fragmentos de 2973, 1277 y 196 pb, mientras que los clones con el inserto en la orientación antisentido presentaron fragmentos de 3606, 644 y 196 pb (Figura 3.4).

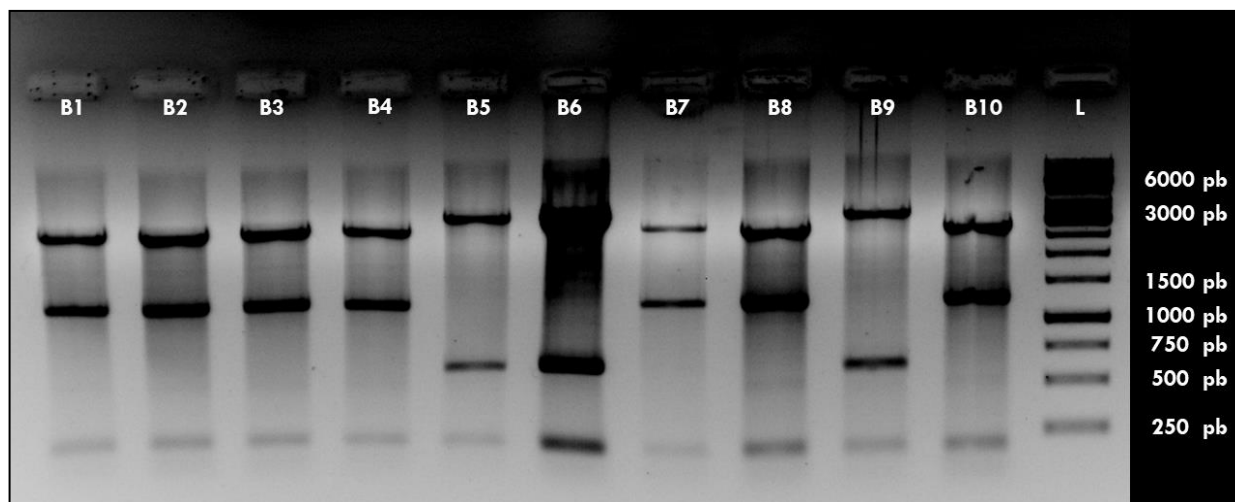


Figura 3.4: Clones de pCR™8/GW/TOPO™ con el inserto *LtNHX1* sin ATG resueltos en gel de agarosa 0,8 %. B1, B2, B3, B4, B7, B8, B10: con inserto, orientación correcta. B5, B6, B9: con inserto, antisentido. L: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Estados Unidos).

Para confirmar el correcto clonado y orientación del inserto, se realizó la secuenciación de un clon positivo (pTg-NHX1-B1) en la Unidad de Genómica de INTA.

Se linealizaron 2 μ l de ADN del clon pTg-NHX1-B1 con la enzima XbaI. Posteriormente, el fragmento de ADN conteniendo la secuencia de *LtNHX1* flanqueado por sitios de recombinación *attL*, se recombinó en el vector pEarleyGate203 (Earley *et al.*, 2006) utilizando Gateway™ LR Clonase™ II (ThermoFisher, Estados Unidos) según las indicaciones del fabricante. Este vector presenta el epítipo c-Myc bajo el control transcripcional del promotor CaMV35S, lo cual permite expresar c-Myc-LtNHX1 en forma constitutiva. Además, presenta el gen *bar*, codificante de la enzima fosfotricina acetiltransferasa (PAT) como marcador selectivo, que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio. Se transformaron células competentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101 con esta construcción (35S::cMyc-LtNHX1) y se seleccionaron las colonias positivas con los antibióticos rifampicina (25 μ g/ml), gentamicina (50 μ g/ml) y kanamicina (50 μ g/ml). Se realizó la extracción de ADN plasmídico y la digestión de 2 μ l del mismo con 0,3 μ l de la enzima de restricción HindIII en un volumen final de 20 μ l con 2 μ l de NEBuffer™ 2.1 10X y 0,3 μ l de RNAsa 10 ng/ μ l. Las recombinaciones correctas presentaron fragmentos de 9715, 1873 y 196 pb. Finalmente, se realizó la secuenciación para comprobar la correcta recombinación entre el clon pTg-NHX1-B1 y el vector pEarleyGate203.

2.2.1.2. Transformación de *A. thaliana* con 35S::cMyc-LtNHX1 por inmersión floral

La transformación de *A. thaliana* se realizó utilizando el método de inmersión floral descrito

por Clough & Bent (1998) con modificaciones (Figura 3.5). Para ello, se sembraron semillas de *A. thaliana* ecotipo Col 0 en macetas individuales usando como sustrato GrowMix® Multipro™ (Terraferil, Argentina). Se estratificaron durante 2 días a 4 °C. Luego de la germinación, se dejaron crecer durante 5 semanas en cámara de crecimiento a temperatura constante de 22 °C con fotoperiodo corto de 8 hs de luz. Posteriormente, se cambió el fotoperíodo a día largo, 16 hs de luz, para favorecer la floración. Al aparecer la primera vara floral se realizó la poda al ras para favorecer la proliferación de las varas axilares. Cuando las inflorescencias secundarias llegaron a aproximadamente 8 cm se realizó la infiltración con *A. tumefaciens* GV3101 portadora de la construcción 35::c-Myc-NHX1. Tres días antes de la misma se inoculó una colonia en 4 ml de medio LB con los antibióticos kanamicina (50 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y rifampicina (25 µg/ml) y se incubó el cultivo a 28 °C con agitación. Luego de 24 hs se realizó una dilución 1:50 del cultivo en 200 ml finales de medio LB con los antibióticos mencionados. Se incubó a 28 °C con agitación. Una vez crecido el cultivo hasta $OD_{600} = 0,8$, se precipitaron las bacterias por centrifugación a 4000 rpm durante 20 min y se resuspendió el *pellet* en 200 ml de sacarosa 5 % p/v, con adición del tensoactivo Tween-20 0,05 % v/v. Se sumergieron las varas florales en la solución durante 60 seg y se dejaron en cámara húmeda durante 24 hs. A partir de este momento las plantas continuaron su crecimiento en la cámara hasta su cosecha.



Figura 3.5: Transformación de *A. thaliana* por el método de inmersión floral. a: Siembra. b: Plántula. c: Desarrollo vegetativo. d: Preparación del cultivo de *A. tumefaciens*. e: Inmersión floral. f: Plantas mantenidas para cosecha. g: Cosecha y limpieza de semillas. h: Selección mediante aspersión con 250 ppm del herbicida glufosinato de amonio (las flechas blancas indican las plántulas sobrevivientes).

Con el objetivo de seleccionar plántulas que expresen el gen *bar*, que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio, las semillas cosechadas de las plantas transformadas (generación T0) se sembraron en sustrato y a los 8 días de la siembra comenzaron a asperjarse con 250 ppm de glufosinato de amonio, repitiendo el procedimiento dos veces por semana. Se seleccionaron aquellas plántulas que resistieron al herbicida y se trasplantaron a macetas individuales. Las plantas resistentes fueron analizadas mediante PCR utilizando cebadores específicos para el transgén (Tabla 3.5).

Tabla 3.5: Cebadores utilizados para la validación por PCR de la presencia de la construcción 35S::c-Myc-NHX1 en plantas de *A. thaliana* transformadas. Se indica la secuencia, la temperatura de *annealing* (Tm) y el tamaño del amplicón que genera el par de cebadores en pares de bases (pb).

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Amplicón (pb)
35SF NHXR2	GACGTAAGGGATGACGCACAA TTTCACCTGAAACCCGGCAT	58	547

Las extracciones de ADN genómico y las reacciones de PCR se realizaron utilizando el mismo protocolo que para las plantas transgénicas de *L. tenuis* (sección 1.3). El producto de amplificación fue resuelto en gel de agarosa 0,8 %, teñido con bromuro de etidio (0,5 g/ml).

2.2.1.3. Selección de eventos de transformación

Las plantas T0 se cosecharon individualmente y se analizó la segregación de la resistencia a glufosinato de amonio en las progenies T1. Se seleccionaron las plantas resistentes T1 y se realizó prueba de progenie en la generación T2, seleccionando aquellas homocigotas. Estas progenies fueron consideradas líneas portadoras de evento de transformación y se evaluó su comportamiento frente a condiciones salinas.

2.2.1.4. Evaluación de la expresión de *LtNHX1*

Se estudió la expresión del transgén *LtNHX1* para constatar la regulación transcripcional constitutiva. Se tomaron muestras de hoja de plantas transgénicas y *wild-type* (Col 0), con dos repeticiones biológicas por genotipo. La extracción de ARN, síntesis de ADNc y reacción de PCR se realizó según lo indicado para las muestras de *L. tenuis*. Se utilizaron los cebadores indicados en la tabla 3.6. El gen β -Tubulina se utilizó como control de amplificación.

Tabla 3.6: Cebadores utilizados en el análisis de la expresión de *LtNHX1* en plantas transgénicas de *A. thaliana*. Se indica la secuencia, la temperatura de *annealing* (Tm) y el tamaño del amplicón que genera el par de cebadores en pares de bases (pb).

Gen	Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Amplicón (pb)
β -Tubulina	TQF TQR	AGGAAGGCTTTCTTGCATTG TCCTGTTGGTATTACCTTCT	56	170
<i>LtNHX1</i>	NHXF2 NHXR2	TAGTGGTGGTACAAGCTCGC TTTCACCTGAAACCCGGCAT	56	99

Se determinó la presencia/ausencia del transgén en el ADNc del genotipo transgénico y del

wild-type en gel de agarosa 2 % teñido con bromuro de etidio (0,5 g/ml).

2.2.2. Estudio de la tolerancia a la salinidad en fase de germinación

Se comparó la germinación de semillas de una línea transgénica de *A. thaliana* con expresión constitutiva de *LtNHX1* con la de plantas *wild-type* (Col 0) bajo distintas concentraciones de NaCl: 0, 50, 100 y 150 mM. Para esto, las semillas de los dos genotipos se esterilizaron según lo indicado por Zhang *et al.* (2006) y se sembraron en placas de Petri con medio MS agar 0,5 % con adición de NaCl en la concentración indicada para cada tratamiento. Se estratificaron durante 2 días a 4 °C y posteriormente se colocaron en cámara de crecimiento con temperatura constante de 22 °C y fotoperiodo corto de 8 hs de luz, en un ensayo con diseño completamente aleatorizado (DCA) con dos repeticiones (placas) de cada genotipo por cada tratamiento. Al inicio del ensayo se realizó el recuento de semillas sembradas en cada placa.

Periódicamente, se realizó el recuento de semillas germinadas, considerándolas germinadas cuando se visualizó una radícula de 2 mm o más (Bewley, 1997). En base a estos datos se determinó el porcentaje de germinación (PG):

$$PG (\%) = \frac{\text{Semillas germinadas}}{\text{Semillas sembradas}} \times 100$$

También se estimó el índice de germinación (IG), como medida de la velocidad de germinación, utilizando el Índice de Timson modificado (M. A. Khan & Ungar, 1984):

$$IG = \frac{\sum G}{t}$$

Donde G es el porcentaje de semillas germinadas en cada recuento, y t es el período total del ensayo en días, en este caso, 25 días. Si todas las semillas germinan en un día, el IG es máximo, en este ensayo 20 debido a que se realizaron 5 recuentos (500/25=20). Un IG de 0 indica que ninguna semilla germinó.

2.2.3. Estudio de la tolerancia a la salinidad en etapa vegetativa

Se realizaron dos ensayos a fin de comparar el crecimiento vegetativo de las plantas transgénicas con el de plantas *wild-type* (Col 0) bajo distintas concentraciones de NaCl.

2.2.3.1. Aclimatación al estrés salino

Los dos genotipos de *A. thaliana* se sembraron en macetas en sustrato GrowMix® Multipro™ (Terrafertil, Argentina). Se estratificaron durante 2 días a 4 °C y posteriormente se

colocaron en cámara de crecimiento con temperatura constante de 22 °C y fotoperiodo corto de 8 hs de luz, en un diseño completamente aleatorizado (DCA). Se regaron por capilaridad durante una semana con solución nutritiva Hoagland. Posteriormente, se iniciaron los tratamientos salinos: 0, 100 y 200 mM NaCl. Cada genotipo estuvo representado por cinco plantas en cada tratamiento. El NaCl se adicionó en la solución nutritiva realizando incrementos de 50 mM cada dos días. Una vez alcanzada la concentración final, las macetas se regaron por capilaridad durante 30 días. Luego se dio por finalizado el ensayo y se evaluó diámetro de planta (D, cm) y peso seco aéreo (PSA, g). Se estimó el índice tolerancia de PSA (ITPSA) y de D (ITD) a partir de la relación entre el valor de las plantas regadas con NaCl y el promedio del control.

2.2.3.2. Estrés salino impuesto por *shock*

Se aplicaron dos tratamientos en un DCA: 0 y 200 mM NaCl. La siembra se realizó como se indicó previamente y cada genotipo estuvo representado por cinco plantas por tratamiento. La concentración final de NaCl se adicionó a la solución nutritiva de riego desde el primer día del ensayo, sin realizar aclimatación al estrés. Luego de 28 días se evaluaron las mismas variables morfológicas que en el ensayo anterior (sección 2.2.3.1). Además, se determinó el contenido de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ (μMoles g⁻¹ Peso Seco) en muestras de hoja previamente secadas a 60 °C de tres repeticiones por línea y tratamiento, siguiendo la misma metodología que la aplicada para *L. tenuis*.

2.3. Análisis de la información

Se utilizó el *software* InfoStat en su interfaz con R (Di Rienzo *et al.*, 2017). Se ajustaron modelos mediante los módulos de modelos lineales generales y mixtos (MLM) o modelos lineales generalizados mixtos (MLGM) de Infostat, según la distribución de la variable analizada. Se realizó la prueba estadística W de Shapiro-Wilk sobre los residuales y se comprobó la homogeneidad de las varianzas. En los casos en los que fue necesario, se ajustaron modelos para heterogeneidad de varianzas. Cuando se detectaron diferencias significativas (p<0,05), se aplicó la prueba de comparaciones múltiples DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002).

2.3.1. Ensayo con plantas transgénicas de *L. tenuis*

En el ensayo con *L. tenuis* se utilizó el siguiente modelo estadístico lineal:

$$Y_{itk} = \mu + \tau_i + \gamma_t + (\gamma\tau)_{it} + \beta X_{itk} + \varepsilon_{itk}$$

Donde: Y_{itk} es la observación debida al i -ésimo genotipo en el t -ésimo tratamiento, μ representa la media general, τ_i es el efecto del i -ésimo genotipo, γ_t es el efecto del t -ésimo tratamiento, $\gamma\tau_{(it)}$ es el efecto de la interacción entre el i -ésimo genotipo y el t -ésimo tratamiento, X_{itk} es la covariable LTP, β es el parámetro desconocido que representa las tasa de cambio en Y frente al cambio unitario de LTP y ε_{itk} es el término de error de la itk observación.

La sobrevivencia en días no se ajustó a una distribución normal ni a las distribuciones estadísticas del módulo MLGM, por lo que se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar los genotipos en cada tratamiento.

2.3.2. Ensayos con plantas transgénicas de *A. thaliana*

En los ensayos con *A. thaliana* el modelo estadístico lineal utilizado fue el siguiente:

$$Y_{itk} = \mu + \tau_i + \gamma_t + (\gamma\tau)_{it} + \varepsilon_{itk}$$

Donde: Y_{itk} es la observación debida al i -ésimo genotipo en el t -ésimo tratamiento, μ representa la media general, τ_i es el efecto del i -ésimo genotipo, γ_t es el efecto del t -ésimo tratamiento, $\gamma\tau_{(it)}$ es el efecto de la interacción entre el i -ésimo genotipo y el t -ésimo tratamiento, y ε_{itk} es el término de error de la itk observación.

Para el análisis de los índices de tolerancia ITPSA e ITD en el ensayo de aclimatación se utilizó el modelo indicado anteriormente. Sin embargo, en el ensayo de estrés impuesto por *shock* se utilizó un modelo lineal unifactorial, debido a que solo se contaba con datos de un tratamiento (200 mM NaCl):

$$Y_{ik} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ik}$$

Donde: Y_{ik} es la observación debida al i -ésimo genotipo, μ representa la media general, τ_i es el efecto del i -ésimo genotipo, y ε_{ik} es el término de error de la ik observación.

RESULTADOS

1. Ubicación subcelular de LtNHX1-GFP

1.1. Ubicación subcelular del antiporter NHX1 en plantas de *N. benthamiana* con expresión transitoria de *LtNHX1-GFP*

Se logró el clonado de la secuencia de *LtNHX1* sin codón de terminación de la transcripción en el vector p*7FWG2. Este vector presenta el gen marcador GFP, lo cual permitió generar una proteína de fusión con LtNHX1 y de esta forma determinar su localización *in vivo* (Figura 3.6).

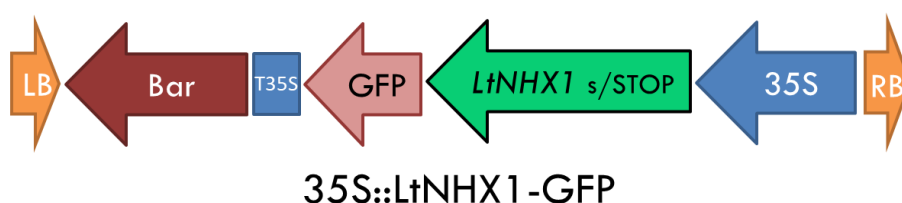


Figura 3.6: Vector de expresión 35S::LtNHX1-GFP. Bar: gen marcador selectivo que codifica para la enzima fosfotricina acetiltransferasa (PAT) y genera resistencia al herbicida glufosinato de amonio; GFP: gen de la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*); LtNHX1 s/STOP: Gen de interés; 35S: promotor CaMV35S; T35S: terminador; LB: borde izquierdo; RB: borde derecho.

Para realizar el estudio de la localización subcelular del antiporter LtNHX1 en plantas en *N. benthamiana*, el vector 35S:LtNHX1:GFP fue expresado transitoriamente mediante la infiltración de *A. tumefaciens* cepa GV3101. Como control positivo se utilizó la construcción 35S::c-Myc-GFP. Se observaron con microscopio confocal discos plasmolizados y no plasmolizados de hojas agroinfiltradas con ambas construcciones.

En las células epiteliales de las hojas agroinfiltradas con 35S:cMyc:GFP, pudo observarse fluorescencia en núcleo y citoplasma, tanto en las hojas no plasmolizadas como en las tratadas con manitol (Figura 3.7).

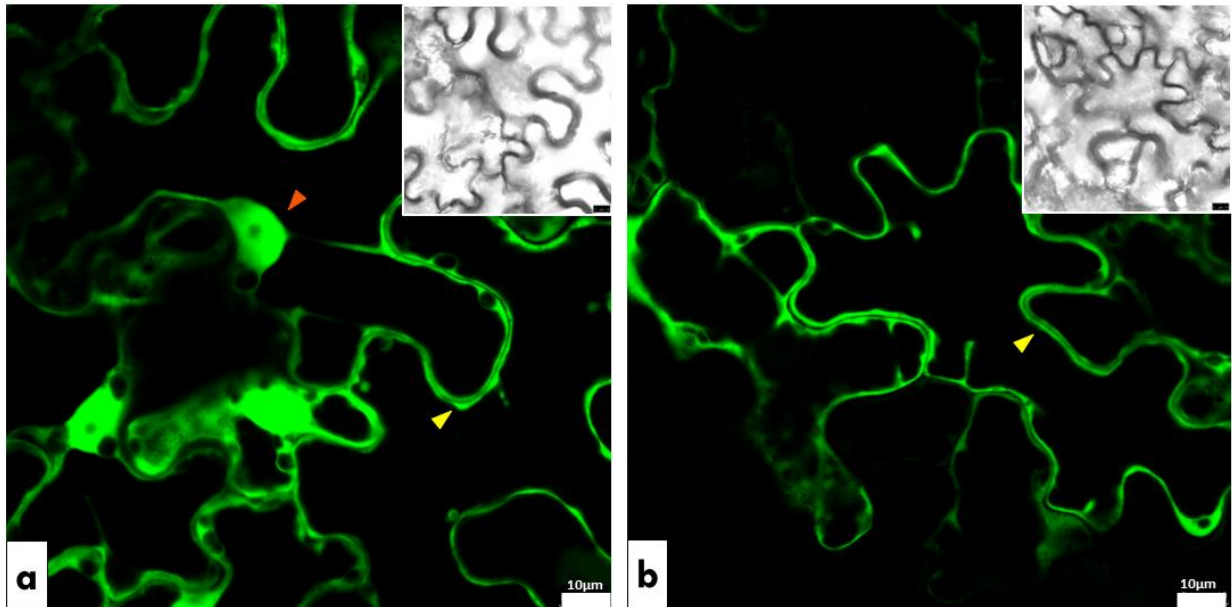


Figura 3.7: Localización subcelular de cMyc-GFP en células epidérmicas de *N. benthamiana*. **a:** Expresión transitoria de cMyc-GFP en hojas sin plasmolizar de *N. benthamiana*. **b:** Expresión transitoria de cMyc-GFP en hojas de *N. benthamiana* luego de tratamiento con manitol 0,8 M. La flecha naranja indica el núcleo y las amarillas regiones del citoplasma.

Cuando se expresó LtNHX1-GFP en hojas de *N. benthamiana*, la fluorescencia se visualizó en membrana vacuolar y hebras transvacuolares de células epidérmicas (Figura 3.8). Además, se observaron diferencias entre las células de los discos foliares tratados con manitol y las de aquellos no tratados. En las células de las hojas plasmolizadas pudo observarse la separación de las membranas, y por lo tanto, de la fluorescencia, debido a la pérdida de turgencia de las vacuolas (Figura 3.8b). Además, se identificaron estructuras esféricas dentro de las vacuolas. Se midió con ImageJ la fluorescencia corregida de las mismas en seis regiones distintas de la imagen y de alguna porción de la membrana vacuolar cercana a cada una de ellas, para poder realizar la comparación. En todas las mediciones, la fluorescencia de cada estructura fue superior a la del tonoplasto (Figura 3.9), y en promedio, la relación fue mayor a 2:1 según la prueba t de Student para la media ($p=0,03$).

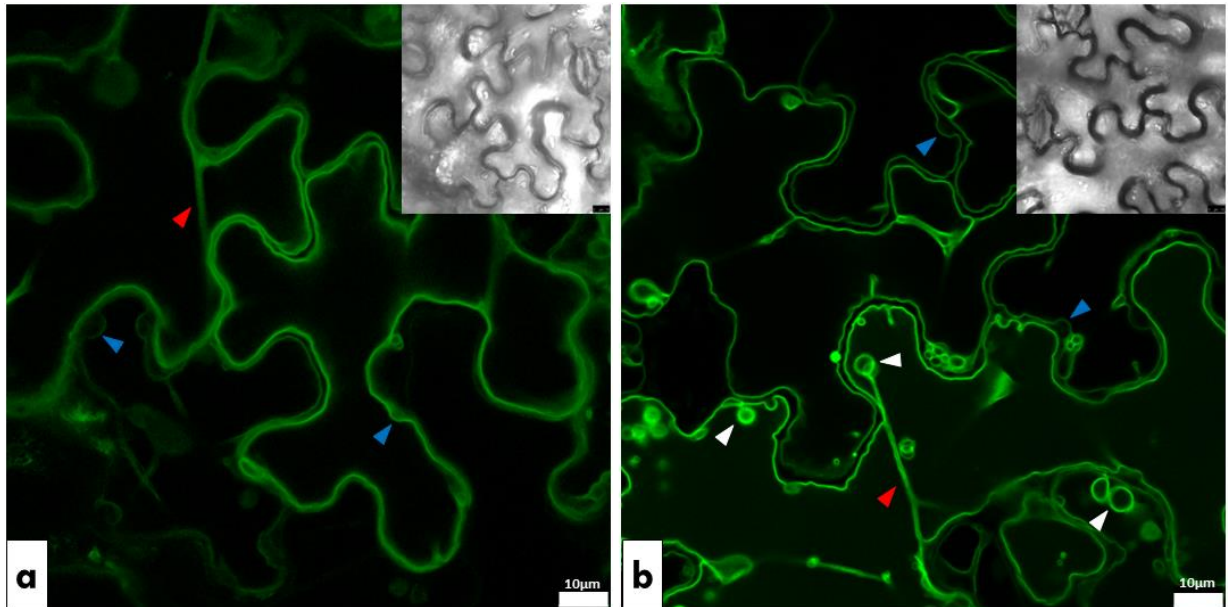


Figura 3.8: Localización subcelular de LtNHX1-GFP en células epidérmicas de *N. benthamiana*. a: Expresión transitoria de NHX1-GFP en hojas sin plasmolizar de *N. benthamiana*. b: Expresión transitoria de LtNHX1-GFP en hojas de *N. benthamiana* luego de tratamiento con manitol 0,8 M. Las flechas azules indican regiones donde el tonoplasto rodea organelas, las blancas indican estructuras esféricas y las rojas indican las hebras transvacuolares.

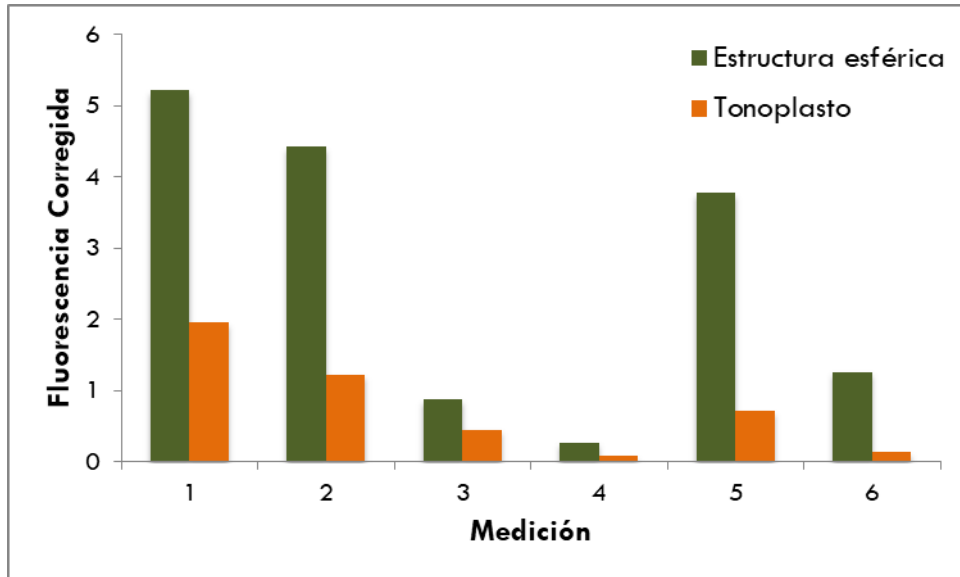


Figura 3.9: Fluorescencia corregida en unidades arbitrarias de las estructuras celulares esféricas halladas luego de la expresión transitoria de LtNHX1-GFP y del tonoplasto en regiones cercanas a ellas. Mediciones realizadas en seis regiones de la imagen tomada con microscopio confocal a partir de la expresión transitoria de LtNHX1-GFP en hojas de *N. benthamiana* luego de un tratamiento con manitol 0,8 M.

La proteína de fusión LtNHX1-GFP fue apenas detectada mediante Western blot (Figura 3.10), y las dos bandas tenues observadas presentaron un peso de aproximadamente 62,5 y 68 kDa, inferior al esperado (88 kDa).

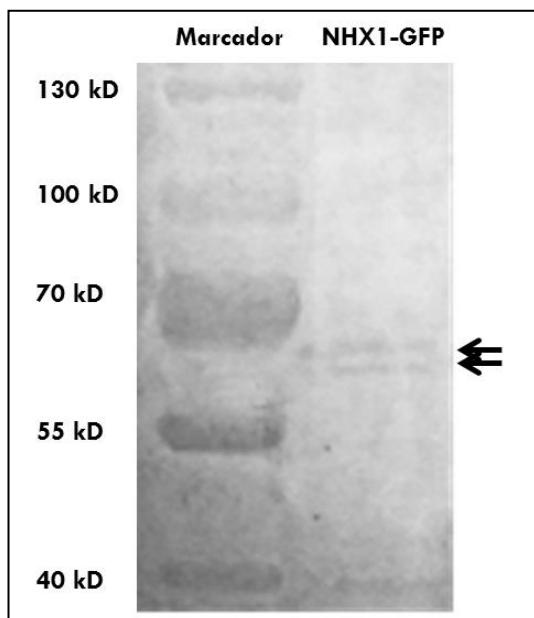


Figura 3.10: Western blot de NHX1-GFP a partir de muestras de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas. Calle 1: Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained 10 – 180 kDa Protein Ladder (ThermoFisher, Estados Unidos). Calle 2: Proteína de fusión LtNHX1-GFP. Las flechas indican la ubicación de las bandas observadas.

Mediante el análisis bioinformático de la secuencia peptídica predicha del antiporter LtNHX1 se determinó la existencia de una secuencia peptídica PEST rica en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) localizada entre los residuos 452 y 465 (Figura 3.11). Además se encontraron dos sitios potenciales de N-glicosilación en los residuos 50 y 293 de LtNHX1 (Anexo 3.1 y Figura 3.11). No se predijo péptido señal (Anexo 3.2).

```

MGLGLISAVSKLQMVSTSDHASIVSMNLFVALLCACIVLGHLLLENRWMNESITALVI GVCVGVVILLFS
GGTSSHILVFSDELFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFVNFMTITMFGAIGTLISCTIITLGATQAFKWM
VGPLEVGDLLAIGAI FAATDSVCTLQVLNQDETPLLYSLVFGEGVVDATSVVLFNAIQSFDLNQINSSI
ALHFLGNFLYLFIASTLLGVLTGLLSAYIIKKLYIGRHSTDREVALMMLMAYLSYMLAELAYLSGILT
VFCGIVMSHYTWHNVTESSRIITTKHAFATLSFVAETFIFLYVGM DALDIEKWK FVSDSPGTSVAVSSVLLG
LILLGRAAFVFPPLSFLSNLAKKSQNDKISFRQQVI IWWAGLMRGAVSMALAYNQFTMSGHTSLRSNAIMI
TSTITVVLVSTVVFVGM LTKPLIRLLPHDTDTKTDSMASLDPSTPR SFTVPLLGSAQDSVGD FDAHEIRRP
SSIRALLSTPHTVHRLWRKFDNSFMRPVFVGGRGFVPEPGSPSDRSNGHQWH
    
```

Figura 3.11: Secuencia peptídica predicha del antiporter LtNHX1 (GenBank: ACE78322.1). En verde se indica una potencial secuencia PEST (ePESTfind, PEST score: 6,02). En amarillo se indican dos potenciales sitios de N-glicosilación.

1.2. Ubicación subcelular del antiporter NHX1 en plantas transgénicas de *L. tenuis* con expresión constitutiva de *LtNHX1-GFP*

Una vez seleccionados los explantes de *L. tenuis* transformados con la construcción 35S::*LtNHX1-GFP* con glufosinato de amonio, y transcurridos 45 días de cultivo, se observó que el $56\pm 16\%$ de los explantes brindaron 2-3 yemas adventicias primarias/explante. Las características fenotípicas del material neoformado fueron similares a las de las plantas *wild type* (WT). Se validó una planta transgénica mediante la amplificación de una región de 547 pb del T-DNA del plásmido (Figura 3.12).

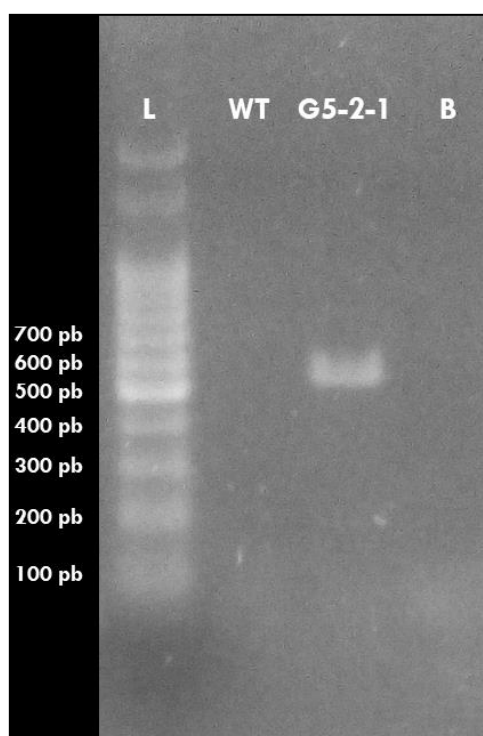


Figura 3.12: Validación de la transformación en plantas de *L. tenuis*. Amplificación utilizando cebadores específicos para el T-DNA (547 pb). WT: planta *wild-type*. G5-2-1: planta transformada. B: blanco (agua). L: marcador de peso molecular qLadder 100 pb Precision (PB-L, Argentina).

Se determinó la expresión del transgén *LtNHX1-GFP* mediante su amplificación utilizando ADNc como templado. Se observó la banda esperada de 95 pb correspondiente al producto de amplificación de GFP en las plantas transgénicas, y ausencia de la misma en las *wild-type* (Figura 3.13).

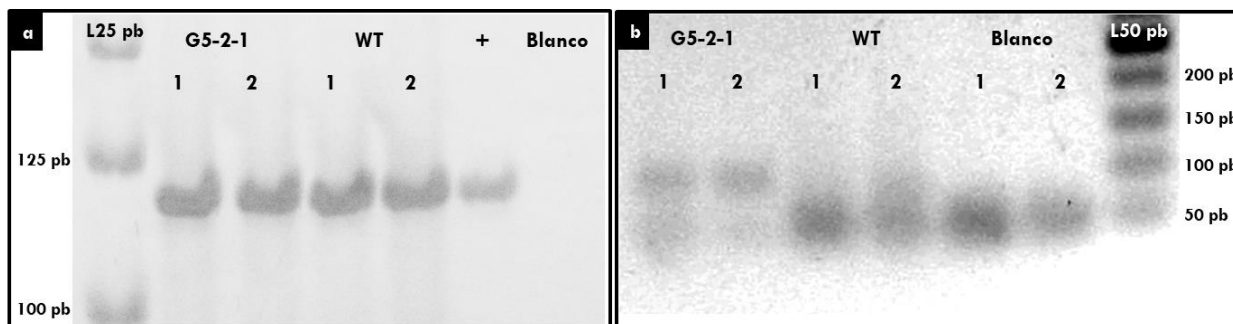


Figura 3.13: Expresión de *LtNHX1-GFP* en plantas transgénicas de *L. tenuis*. **a:** Amplificación de SEC-5A en gel de agarosa 2 %. **b:** Amplificación de GFP en gel de agarosa 2 %. *WT*: línea *wild-type* (dos repeticiones); *G5-2-1*: línea transgénica (dos repeticiones); \pm : control positivo; *Blanco*: reacciones de PCR sin ADNc; *L25 pb*: marcador de peso molecular 25bp DNA Step Ladder (Promega, Estados Unidos); *L50 pb*: marcador de peso molecular Ladder 50 pb (PB-L, Argentina).

Se tomaron fragmentos foliares de la planta transgénica obtenida y se trataron con manitol 0,8 M para generar plasmólisis en las células. Posteriormente, se visualizaron con microscopio confocal. No fue posible observar la fluorescencia de forma igualmente clara que en el estudio previo con hojas agroinfiltradas de *N. bethamiana*, ni se visualizaron *bulbs* o IVSP. Sin embargo, al comparar imágenes de células epiteliales de plantas con expresión constitutiva de *LtNHX1-GFP* con las de plantas con expresión constitutiva de *cMyc-GFP*, la fluorescencia de las primeras pareciera acotarse a una membrana (Figura 3.14a), mientras que en las segundas se observó en forma más difusa, correspondiéndose con el citoplasma (Figura 3.14b).

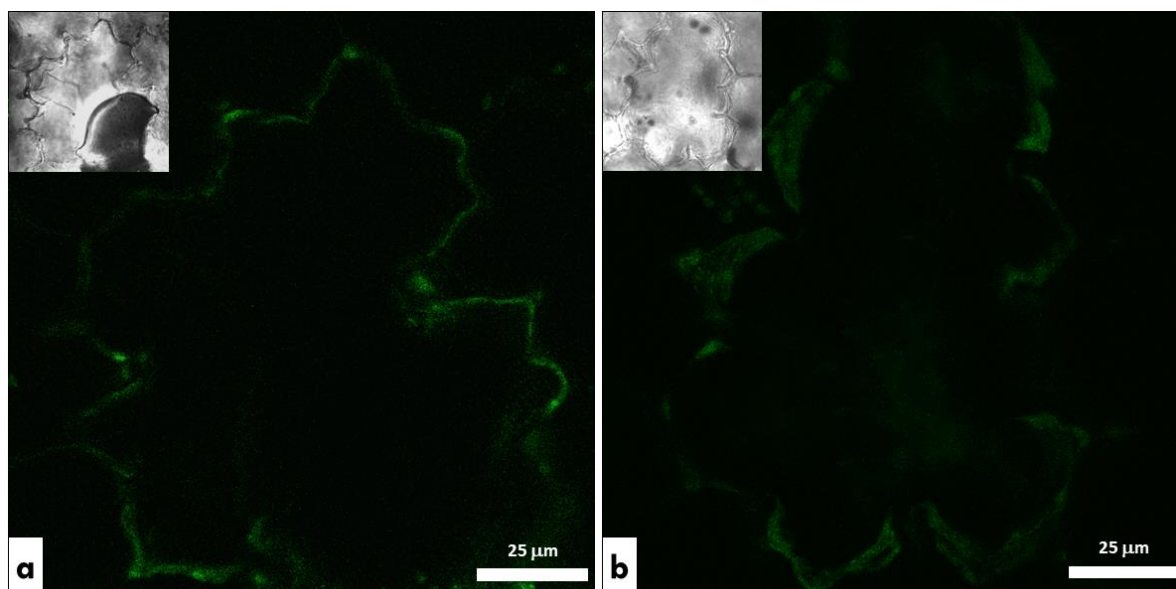


Figura 3.14: Localización subcelular de *LtNHX1-GFP* en células epidérmicas plasmolizadas de *L. tenuis*. **a:** Expresión de *NHX1-GFP*. **b:** Expresión de *cMyc-GFP*.

2. Estudio de la tolerancia a salinidad a partir de la expresión constitutiva de *LtNHX1*

2.1. Tolerancia a la salinidad de plantas transgénicas de *L. tenuis*

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la línea transgénica G5-2-1 que sobreexpresa *LtNHX1* y la *wild-type*, y entre tratamientos (0, 100 y 200 mM NaCl) en las variables e índices evaluados (Tabla 3.7).

Tabla 3.7: Comportamiento promedio de la línea transgénica G5-2-1 y la *wild-type* de *L. tenuis* evaluadas en etapa vegetativa en condiciones salinas. Media, coeficiente de variación (C.V.), desvío estándar (D.E.), valores máximo y mínimo y p-valor para Genotipo, Tratamiento e Interacción Genotipo*Tratamiento.

Variable (unidad)	Media	C.V.	D.E.	Mín.	Máx.	p-valor	p-valor	p-valor
						Genotipo	Tratamiento	Interacción
LTP (cm)	9,99	57,95	5,79	1,00	22,60	0,0004	<0,0001	0,6881
PST (mg)	75,23	59,04	44,41	20,30	194,90	0,0275	<0,0001	0,2813
ITLTP	0,48	48,35	0,23	0,08	1,11	0,0016	<0,0001	0,7315
ITPST	0,56	44,88	0,25	0,18	1,31	0,0002	0,0022	0,6737

En color gris se indican los casos con diferencias significativas ($p < 0,05$)

Si bien la interacción no fue significativa en ningún caso, probablemente debido a la potencia del *test* estadístico, las pruebas de comparaciones múltiples para las medias ajustadas de LTP y PST mostraron diferencias entre genotipos ($p < 0,05$) en el tratamiento con 100 mM NaCl, con un mayor crecimiento de la línea transgénica, pero no en el control (Figura 3.15). En el tratamiento con 200 mM, la línea G5-2-1 también presentó mayor longitud del tallo principal que la *wild-type* (Figura 3.15a). Además, no presentó diferencias en el PST entre el control y el tratamiento con 100 mM (Figura 3.15b).

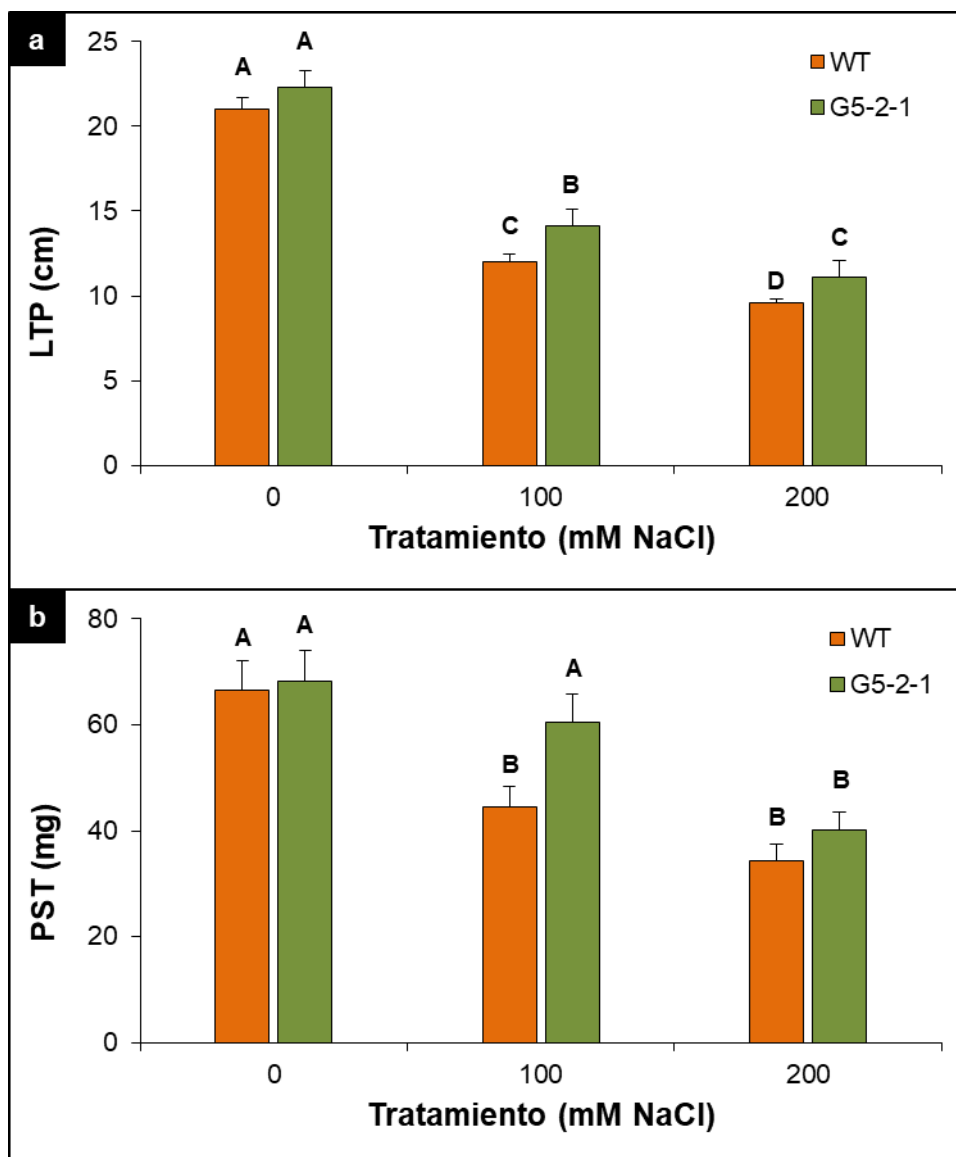


Figura 3.15: Parámetros de crecimiento evaluados en la línea transgénica G5-2-1 de *L. tenuis* y la línea *wild-type* bajo tres concentraciones salinas: 0, 100 y 200 mM NaCl. **a.** Longitud del tallo principal. **b.** Peso seco total. Las barras indican medias ajustadas y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC ($p < 0,05$).

Los índices de tolerancia reflejaron las diferencias observadas en las variables, siendo mayores en la línea transgénica (Figura 3.16).

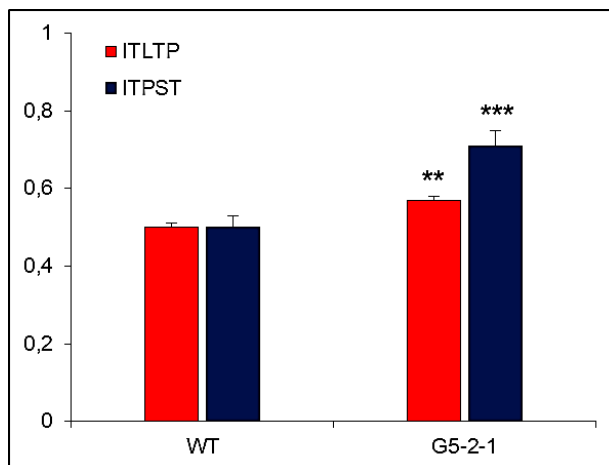


Figura 3.16: Índices de tolerancia de la longitud del tallo principal (ITLTP) y del peso seco total (ITPST) promedio de las dos concentraciones salinas en la línea transgénica G5-2-1 y la *wild-type*. Las barras indican medias y error estándar. (**) Diferencias entre genotipos según la prueba DGC ($p < 0,01$). (***) Diferencias entre genotipos según la prueba DGC ($p < 0,001$).

Adicionalmente, se evaluó la sobrevivencia en días por tratamiento, encontrando diferencias significativas entre genotipos en el tratamiento con 200 mM NaCl (Kruskal-Wallis; $p = 0,0336$). En la figura 3.17 se observa que hasta los 8 días desde iniciados los tratamientos ninguno de los genotipos presentaron plantas muertas. A partir de allí, el descenso en el número de plantas vivas fue más lento en la línea G5-2-1. Al final del ensayo, cinco de nueve plantas de esta línea permanecían con vida en 200 mM, contra dos de la *wild-type*.

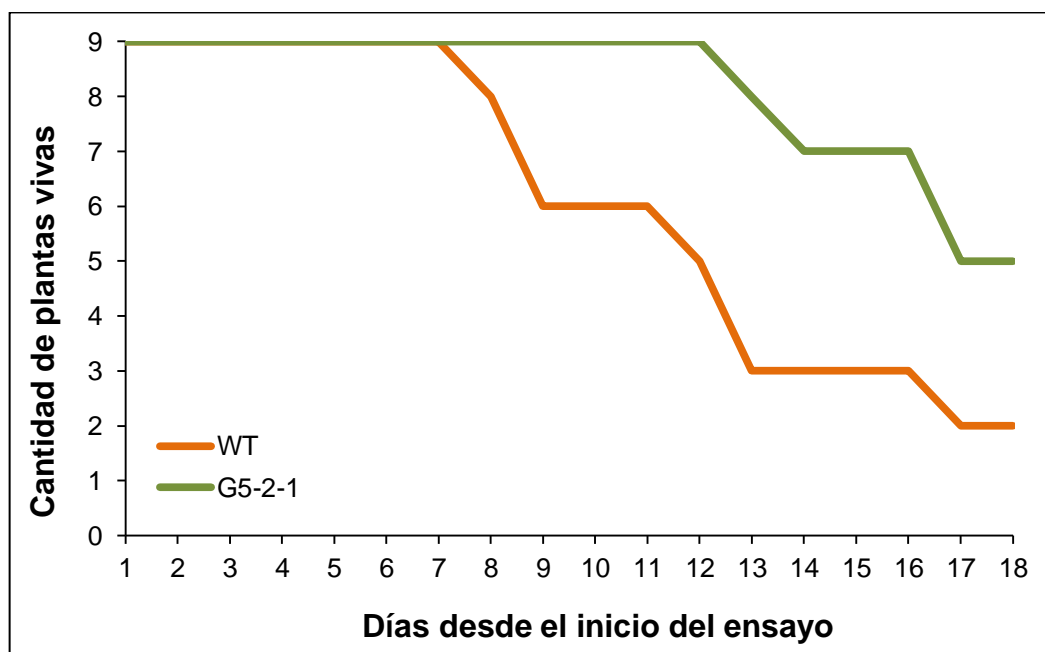


Figura 3.17: Sobrevivencia de la línea transgénica G5-2-1 de *L. tenuis* y la línea *wild-type* en 200 mM NaCl. Número diario de plantas vivas de cada una de las dos líneas durante todo el ensayo (18 días).

En el tratamiento con 100 mM NaCl, no existieron diferencias entre genotipos en la sobrevivencia en días, pero al finalizar el ensayo la línea transgénica no presentó plantas muertas, mientras que la *wild-type* presentó tres (Figura 3.18).

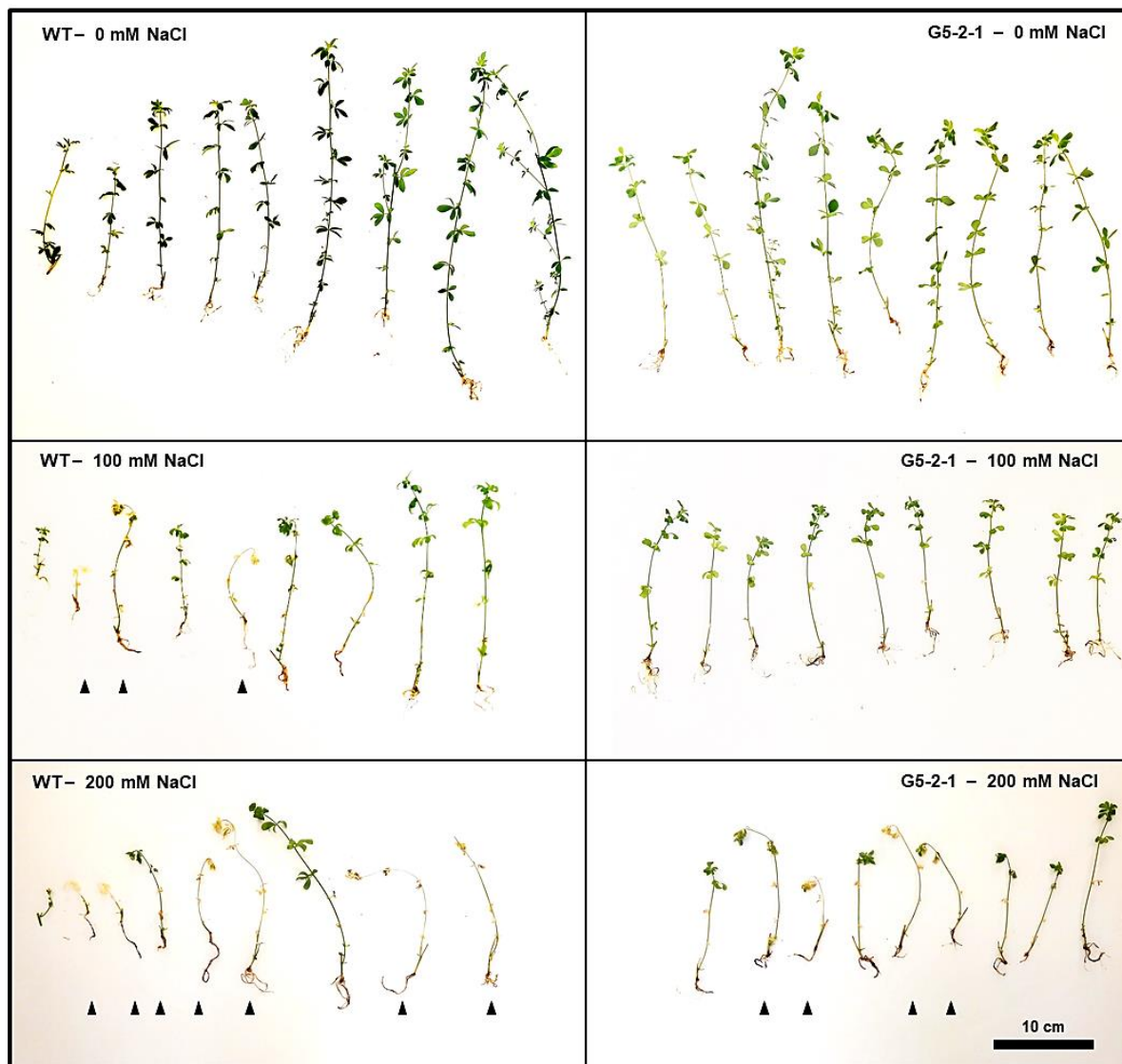


Figura 3.18: Imágenes de las plantas de la línea transgénica G5-2-1 y la *wild-type* en los tres tratamientos aplicados en el ensayo para evaluar su tolerancia a la salinidad: 0, 100 y 200 mM NaCl. Las fotografías se tomaron a los 18 días de iniciados los tratamientos, al finalizar el ensayo. Las flechas negras indican las plantas que no sobrevivieron a la salinidad.

Se evaluó el contenido de Na^+ , K^+ y Cl^- ($\mu\text{Moles g}^{-1}$ Peso Seco) en hojas de las dos líneas en el control sin agregado de sal y en 100 mM NaCl. En las dos líneas se incrementaron los contenidos de Na^+ y Cl^- cuando fueron expuestas a condiciones salinas, pero no existió diferencia entre las mismas. El contenido de K^+ disminuyó cuando se adicionó NaCl y existió interacción entre genotipos y tratamientos (Tabla 3.8).

Tabla 3.8: Análisis del contenido de iones en la línea transgénica G5-2-1 y la *wild-type* de *L. tenuis* durante la etapa vegetativa. p-valor para Genotipo, Tratamiento e Interacción Genotipo*Tratamiento.

Variable	p-valor	p-valor	p-valor
	Genotipo	Tratamiento	Interacción
*Na ⁺	0,6120	<0,0001	0,5926
*K ⁺	0,0020	<0,0001	0,0002
*Cl ⁻	0,9000	<0,0001	0,6945

*Unidad: μMoles g⁻¹ Peso Seco. En color gris se indican los casos con diferencias significativas (p<0,05).

En la condición control (0 mM NaCl), la línea transgénica y la wild-type presentaron un contenido similar de K⁺, mientras que en 100 mM el contenido en G5-2-1 fue significativamente menor (Figura 3.19).

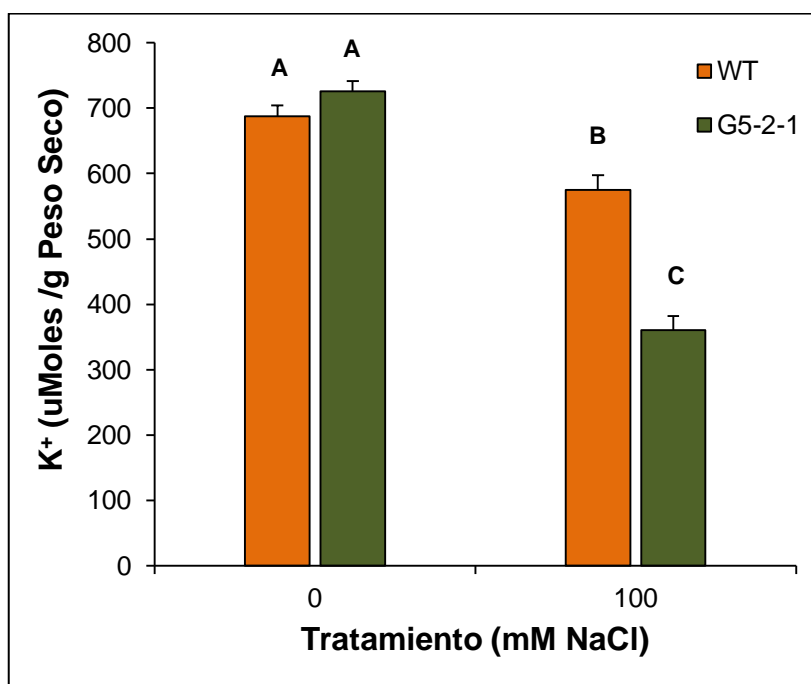


Figura 3.19: Contenido de K⁺ en hojas de la línea transgénica G5-2-1 y la *wild-type* (WT) bajo dos concentraciones de NaCl: 0 y 100 mM. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC (p<0,05).

2.2. Tolerancia a la salinidad de plantas transgénicas de *A. thaliana*

2.2.1. Expresión constitutiva de *LtNHX1* en plantas transgénicas de *A. thaliana*

Se logró el clonado de la secuencia de *LtNHX1* sin el codón de inicio de la transcripción en

el vector pEarleyGate203, lo que permitió la expresión constitutiva el antiporter NHX1 de *Lotus tenuis* (Figura 3.20).

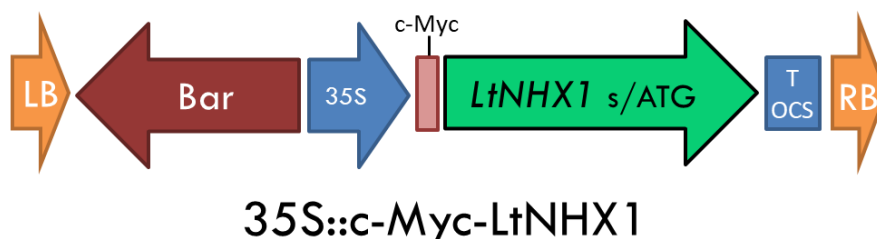


Figura 3.20: Vector de expresión 35S::cMyc-LtNHX1. Bar: gen marcador selectivo que codifica para la enzima fosfotransferasa acetiltransferasa (PAT) y genera resistencia al herbicida glufosinato de amonio; c-Myc: epítopo (*tag*); LtNHX1 s/ATG: Gen de interés; 35S: promotor CaMV35S; T OCS: terminador; LB: borde izquierdo; RB: borde derecho.

En la figura 3.21 se indican los clones evaluados a partir de la recombinación entre el clon pTg-NHX1-B1 y el vector pEarleyGate203, que dio lugar al vector de expresión. El clon E2 se utilizó para transformar *A. tumefaciens*.

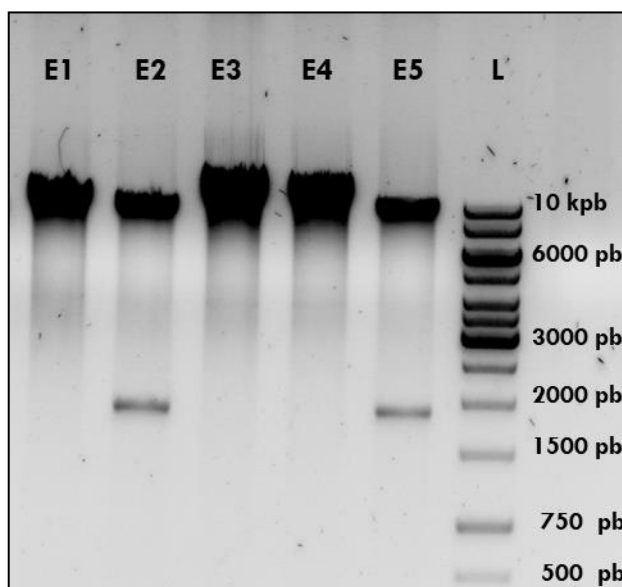


Figura 3.21: Clones obtenidos a partir de la recombinación entre pTg-NHX1-B1 y el vector pEarleyGate203 resueltos en gel de agarosa 0,8 %. E2, E5: recombinaciones positivas (bandas de 9715 y 1873 pb). E1, E3, E4: sin recombinación (banda de 11783 pb). L: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Estados Unidos).

Con el objetivo de estudiar la participación de *LtNHX1* en la tolerancia a salinidad en la especie modelo *A. thaliana*, se realizó la transformación de la misma mediante el método de inmersión floral con *A. tumefaciens* portador del plásmido de interés. Se seleccionaron 20

plantas T0 sobrevivientes a la aspersión con glufosinato de amonio y se realizó la PCR a partir de ADN genómico, resultando 13 de ellas positivas para la presencia del transgen (Figura 3.22). La eficiencia de transformación fue de 1,9 %.

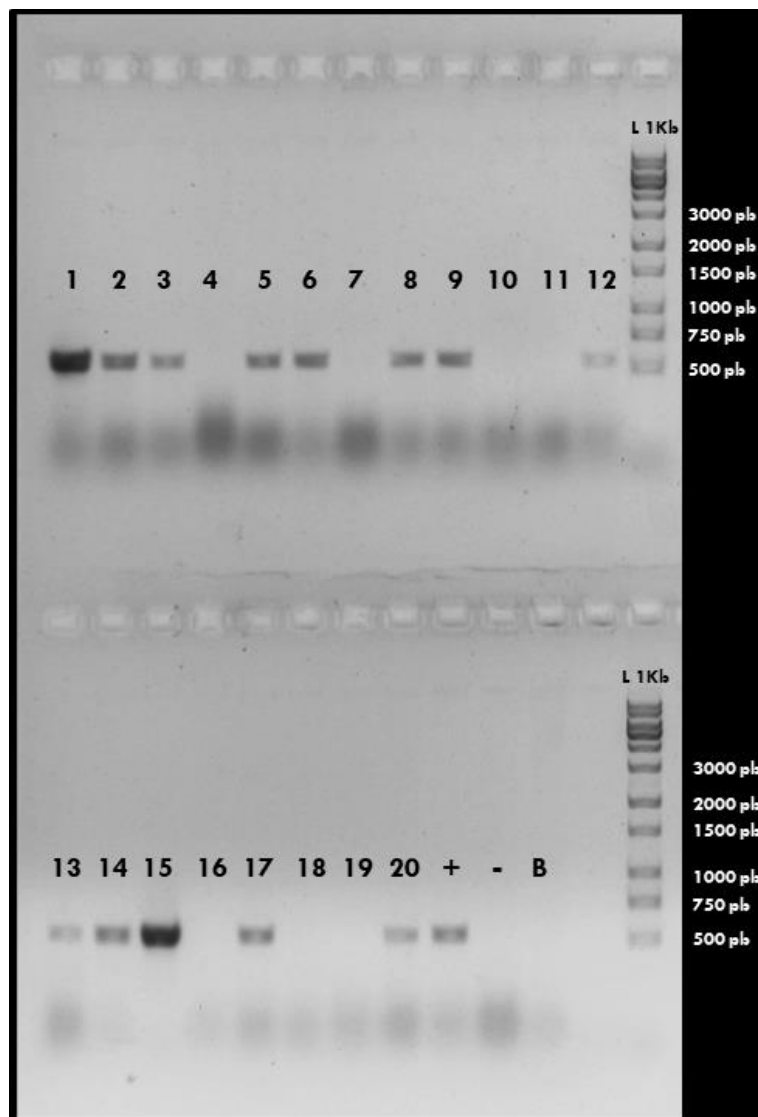


Figura 3.22: Productos de amplificación con cebadores específicos para la construcción 35S::cMyc-LtNHX1 en gel de agarosa (0,8 %) de 20 plantas seleccionadas por su resistencia a PPT. La presencia de la banda (547 pb) indica la presencia del transgén. +: control positivo. -: control negativo (ADN de planta *wild-type*). B: reacción de PCR sin ADN. L1Kb: marcador de peso molecular Ladder 1kpb plus (PB-L, Argentina).

Las plantas T0 se cosecharon y su progenie constituyó la generación T1, que fue seleccionada utilizando la misma metodología. Solo una de las plantas transgénicas identificadas (P8) presentó una segregación 3:1 (Chi-cuadrado $p=0,07$), por lo que se continuó trabajando con la misma y se cosecharon plantas T1 con el objetivo de obtener la generación T2 homocigota para el transgén, que fue la utilizada para los ensayos realizados

posteriormente (P8-68).

Se determinó la existencia de expresión del transgén *LtNHX1* a partir de su amplificación utilizando ADNc como templado. Se observó la banda de 99 pb en las plantas transgénicas, y ausencia de la misma en las *wild-type* (Figura 3.23).

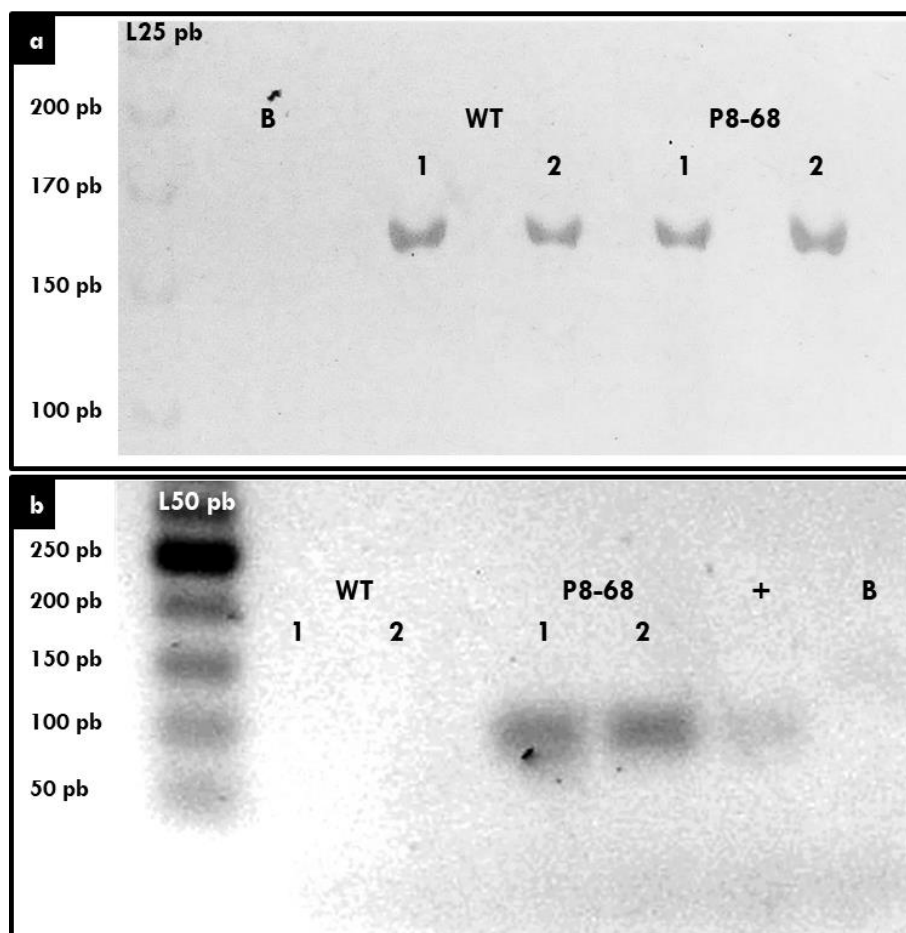


Figura 3.23: Expresión de *LtNHX1* en plantas transgénicas de *A. thaliana*. a: Amplificación de β -*tubulina*. b: Amplificación de *LtNHX1*. Gel de agarosa 2 %. L25 pb: marcador de peso molecular 25bp DNA Step Ladder (Promega, Estados Unidos); L50 pb: marcador de peso molecular Ladder 50 pb (PB-L, Argentina). WT: línea *wild-type* (dos repeticiones). P8-68: línea transgénica (dos repeticiones). \pm : control positivo. B: blanco (reacción de PCR sin ADNc).

2.2.2. Tolerancia a la salinidad de plantas transgénicas de *A. thaliana* en etapa de germinación

Para las dos variables analizadas se encontraron diferencias significativas entre genotipos y tratamientos, e interacción significativa entre ellos (Tabla 3.9).

Tabla 3.9: Comportamiento promedio de la línea transgénica P8-68 y la *wild-type* de *A. thaliana* evaluadas en etapa de germinación en condiciones salinas. Media, coeficiente de variación (C.V.), desvío estándar (D.E.), valores máximo y mínimo y p-valor para Genotipo, Tratamiento e Interacción Genotipo*Tratamiento.

Variable (unidad)	Media	C.V.	D.E.	Mín.	Máx.	p-valor Genotipo	p-valor Tratamiento	p-valor Interacción
IG	6,07	88,48	5,37	0,24	15,76	0,0003	0,0001	0,0338
PG (%)	38,62	80,05	30,92	1,89	88,41	<0,0001	<0,0001	0,0004

En color gris se indican los casos con diferencias significativas ($p < 0,05$).

La línea P8-68, que presenta expresión constitutiva de *LtNHX1*, tuvo un mayor porcentaje e índice de germinación en condiciones salinas que el ecotipo *wild-type*. Para ambas variables, el comportamiento de P8-68 en el tratamiento control fue similar al de la línea *wild-type* Col 0 (Figuras 3.24 y 3.26). El porcentaje de semillas germinadas disminuyó con el agregado de NaCl en ambos genotipos pero lo hizo en forma más acentuada en el *wild-type* (Figura 3.24). En 50, 100 y 150 mM NaCl, los PG de la línea P8-68 fueron superiores a los de Col 0.

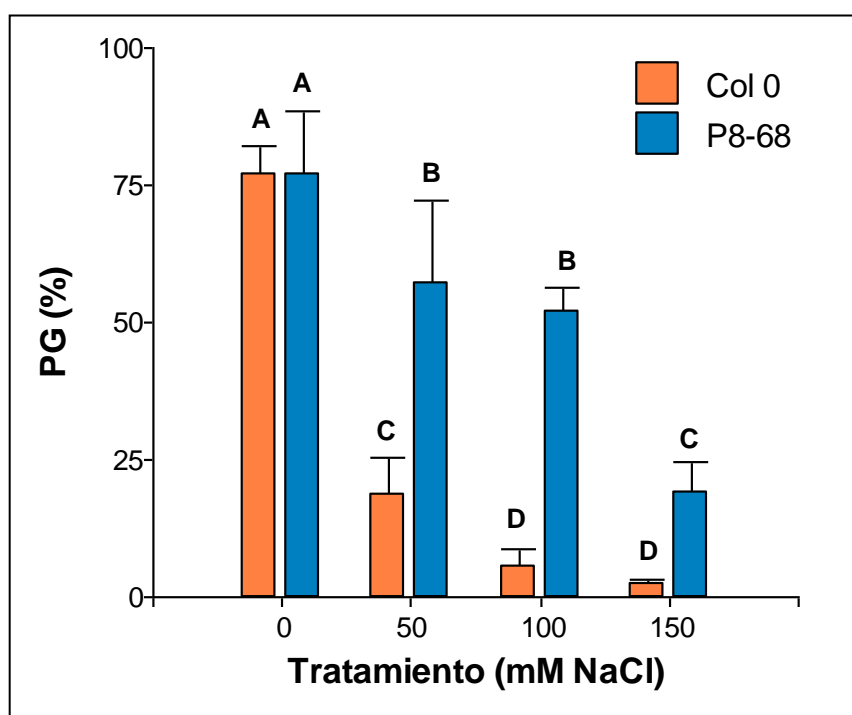


Figura 3.24: Porcentaje de semillas germinadas a 25 días de ensayo en la línea transgénica de *A. thaliana* respecto a la Col 0 bajo cuatro concentraciones de NaCl: 0, 50, 100 y 150 mM. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC ($p < 0,05$).

Este mayor porcentaje de semillas germinadas en la línea P8-68 pudo observarse desde los 6 días de iniciado el ensayo (Figura 3.25).

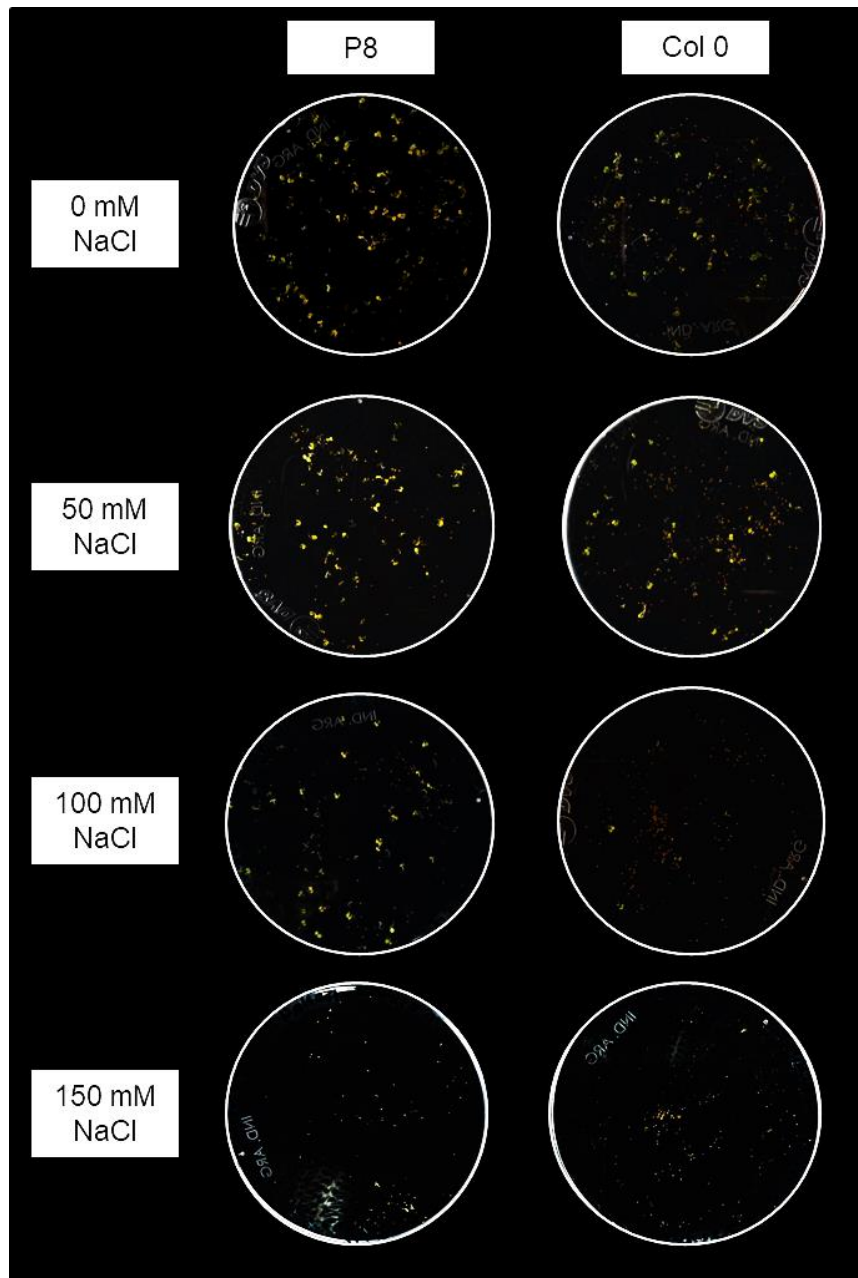


Figura 3.25: Germinación de la línea transgénica de *A. thaliana* y la línea *wild-type* (Col 0) bajo cuatro concentraciones de NaCl: 0, 50, 100 y 150 mM. Las fotografías se tomaron a los 6 días de iniciado el ensayo y corresponden a una repetición de cada genotipo en cada tratamiento.

La línea P8-68 presentó un índice de germinación, indicador de la velocidad de germinación, similar al del control en los tratamientos con 50 y 100 mM. La disminución de IG de la línea P8-68 solo fue significativa en el tratamiento con 150 mM, pero en todos los tratamientos salinos existieron diferencias con la Col 0 (Figura 3.26).

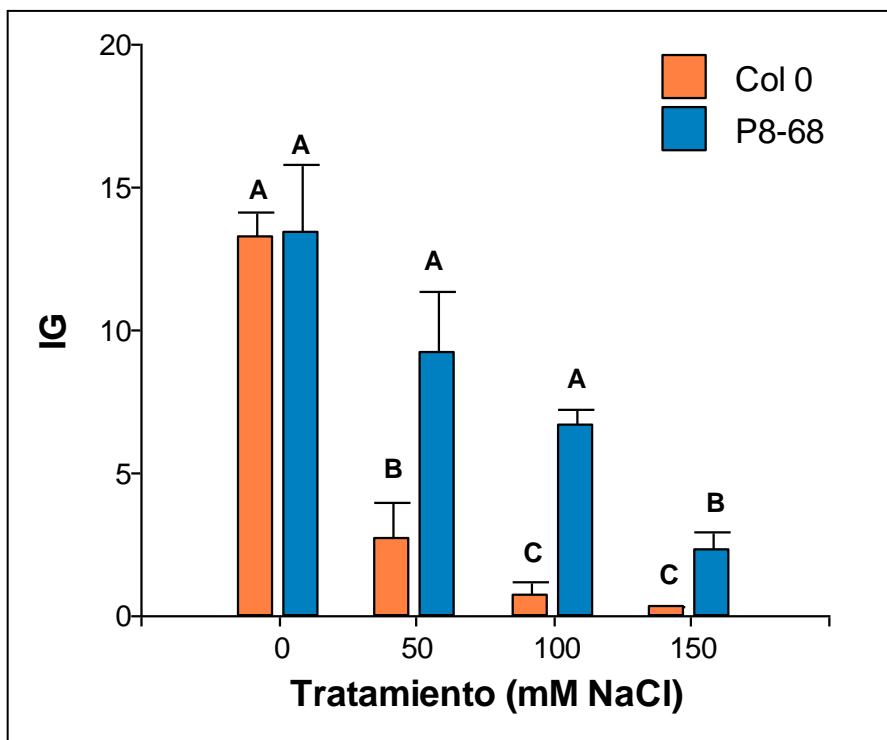


Figura 3.26: Índice de germinación de la línea transgénica de *A. thaliana* respecto a la Col 0 bajo cuatro concentraciones de NaCl: 0, 50, 100 y 150 mM. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC ($p < 0,05$).

Las diferencias entre los genotipos pueden observarse claramente en los diagramas de perfiles multivariados de la figura 3.27. Mientras las gráficas del tratamiento control fueron muy similares a lo largo del ensayo, en el resto de los tratamientos se observa claramente la ventaja de la línea P8-68.

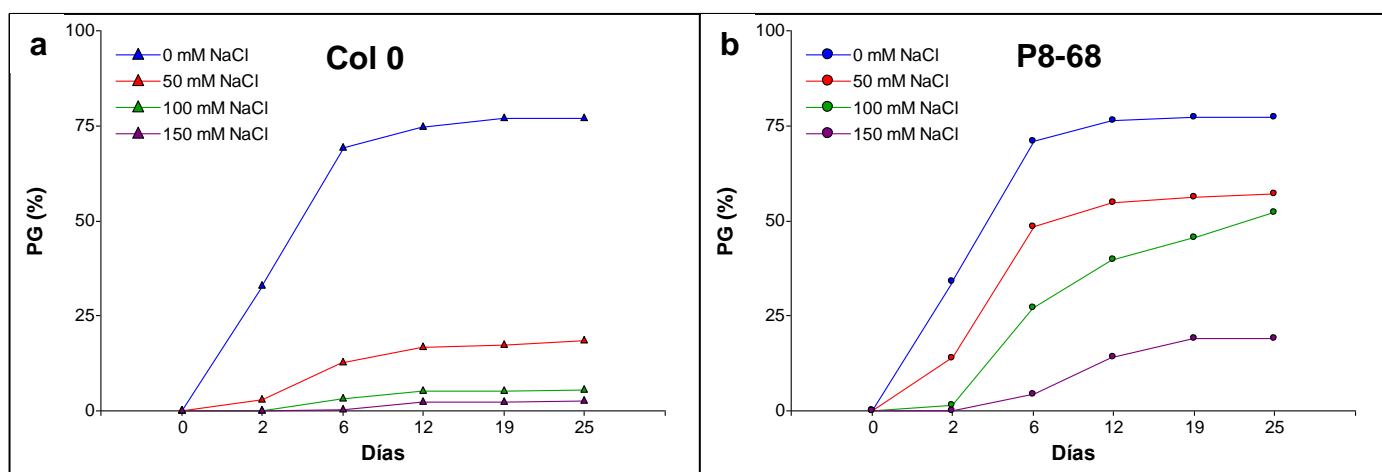


Figura 3.27: Diagramas de perfiles multivariados para la variable porcentaje de germinación (PG) registrada en 6 oportunidades desde el inicio del ensayo en una línea transgénica de *A. thaliana* (P8-68) y una *wild-type* (Col 0). a: PG de Col 0 a lo largo del tiempo. b: PG de P8-68 a lo largo del tiempo.

2.2.3. Tolerancia a la salinidad de plantas transgénicas de *A. thaliana* en etapa vegetativa

2.2.3.1. Aclimatación al estrés salino

Si bien a los 30 días de iniciados los tratamientos salinos no existieron diferencias significativas entre genotipos en el peso seco aéreo (PSA) y el diámetro (D), el p-valor fue inferior a 0,10 indicando una tendencia a favor de P8-68. Esto llevó a que existieran diferencias significativas en los índices de tolerancia (Tabla 3.10).

Tabla 3.10: Comportamiento promedio de la línea transgénica P8-68 y la *wild-type* de *A. thaliana* evaluadas en etapa vegetativa en condiciones salinas aplicadas en forma gradual. Media, coeficiente de variación (C.V.), desvío estándar (D.E.), valores máximo y mínimo y p-valor para Genotipo, Tratamiento e Interacción Genotipo*Tratamiento.

Variable (unidad)	Media	C.V.	D.E.	Mín.	Máy.	p-valor Genotipo	p-valor Tratamiento	p-valor Interacción
D (cm)	8,27	35,71	2,95	4,00	14,50	0,0885	<0,0001	0,0113
PSA (mg)	89,62	55,95	50,14	37,40	194,60	0,0782	<0,0001	0,5629
ITD	0,53	19,53	0,10	0,32	0,68	<0,0001	<0,0001	0,0503
ITPSA	0,36	15,87	0,06	0,24	0,44	<0,0001	0,0045	0,5844

En color gris se indican los casos con diferencias significativas (p<0,05).

Además, se encontró interacción entre genotipo y tratamiento en el diámetro (Figura 3.28). En el tratamiento control, no existieron diferencias entre los genotipos, mientras que en los tratamientos salinos el diámetro de P8-68 fue mayor.

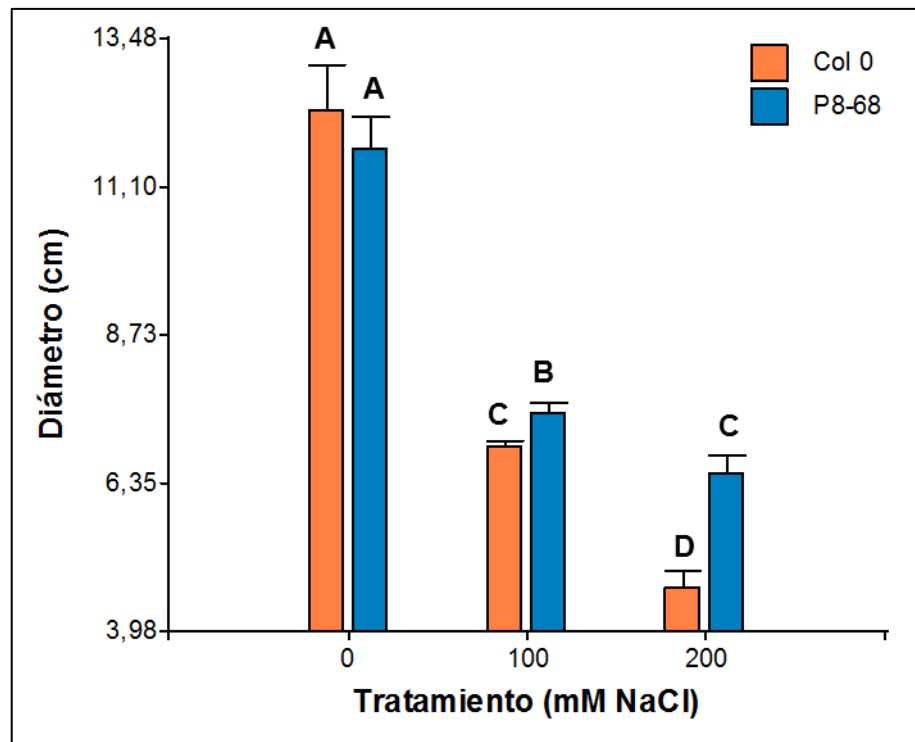


Figura 3.28: Diámetro en la línea transgénica P-8-68 de *A. thaliana* y la *wild-type* (Col 0) a los 30 días de ensayo bajo tres concentraciones de NaCl: 0, 100 y 200 mM. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC ($p < 0,05$).

La línea transgénica presentó una reducción notable en el crecimiento en condiciones salinas. Sin embargo, esta reducción fue menor que en el genotipo *wild-type*, lo cual se refleja en los índices de tolerancia estimados (Figura 3.29).

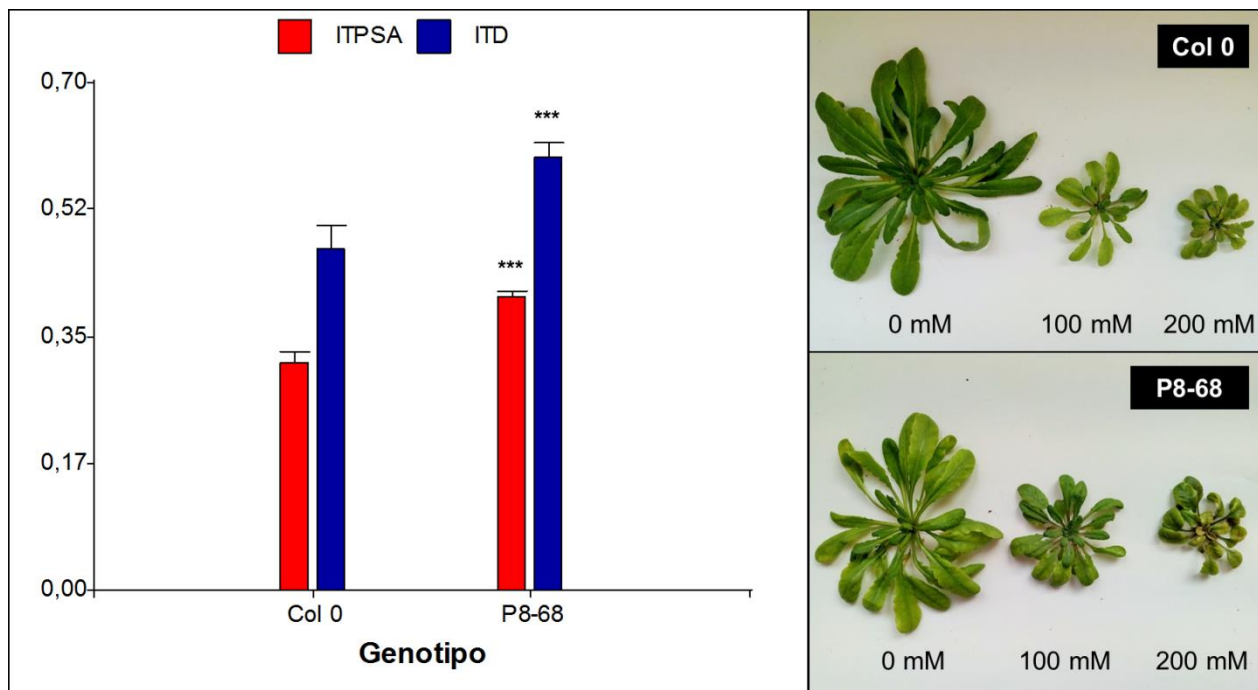


Figura 3.29: Índices de tolerancia del peso seco aéreo (ITPSA) y del diámetro (ITD) en un ensayo comparativo en condiciones salinas entre la línea transgénica P8-68 y la *wild-type* (Col 0). Las barras indican medias y error estándar. (***) Diferencias entre genotipos según la prueba DGC ($p < 0,001$). Las imágenes fueron tomadas a los 30 días de iniciado el ensayo.

2.2.3.2. Estrés salino impuesto por *shock*

Existieron diferencias significativas entre genotipos en el peso seco aéreo (PSA) y el diámetro (D) y en sus índices de tolerancia a los 28 días de iniciados los tratamientos salinos (Tabla 3.11). Además existió interacción significativa y diferencias entre tratamientos.

Tabla 3.11: Comportamiento promedio de la línea transgénica P8-68 y la *wild-type* de *A. thaliana* evaluadas en etapa vegetativa aplicando un estrés por *shock* salino. Media, coeficiente de variación (C.V.), desvío estándar (D.E.), valores máximo y mínimo y p-valor para Genotipo, Tratamiento e Interacción Genotipo*Tratamiento.

Variable (unidad)	Media	C.V.	D.E.	Mín.	Máx.	p-valor Genotipo	p-valor Tratamiento	p-valor Interacción
D (cm)	8,65	41,28	3,57	4,00	13,70	0,1867	<0,0001	0,0240
PSA (mg)	102,50	52,77	54,09	28,90	183,40	0,046	<0,0001	0,0453
ITD	0,45	22,52	0,10	0,33	0,66	0,0016	-	-
ITPSA	0,35	44,35	0,16	0,19	0,63	0,0133	-	-

En color gris se indican los casos con diferencias significativas ($p < 0,05$).

La interacción hallada entre genotipos y tratamientos se debe a que en el control no existieron diferencias entre los genotipos, mientras en el tratamiento de 200 mM la línea P8-68 presentó mayor diámetro y PSA (Figura 3.30).

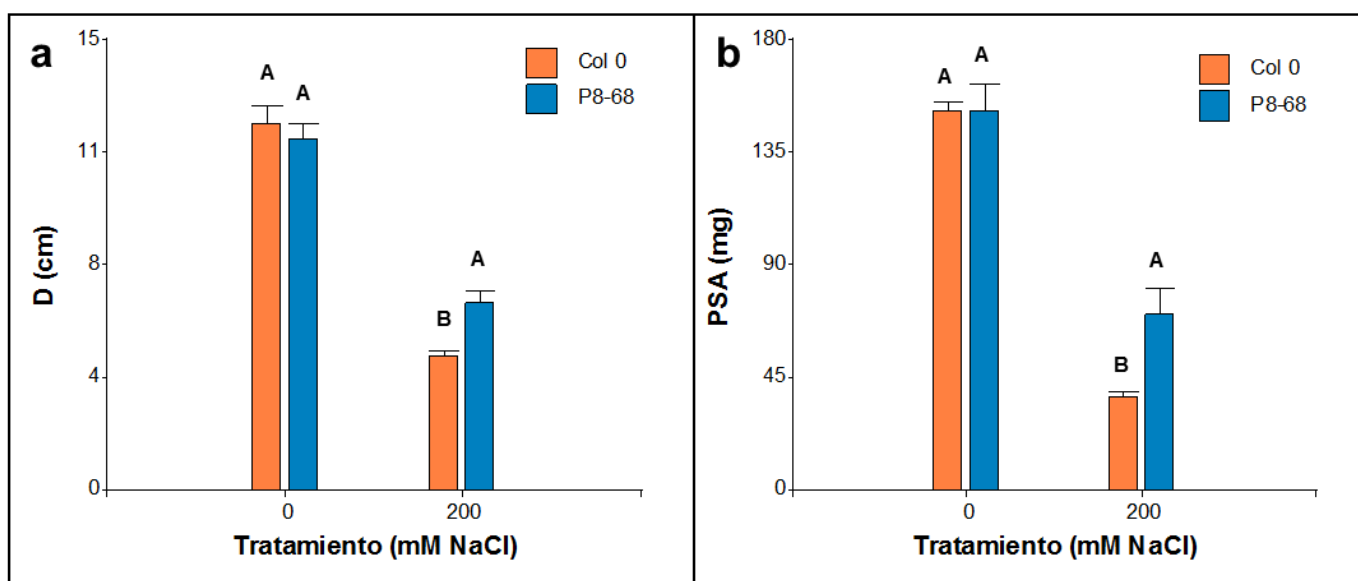


Figura 3.30: Comportamiento de P8-68 y de la línea *wild-type* en un tratamiento con 200 mM NaCl impuesto por *shock* y en el control sin agregado de sales. a. Diámetro de planta. b. Peso seco aéreo. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC ($p < 0,05$).

La línea P8-68 también presentó mayores índices de tolerancia para las dos variables (Figura 3.31).

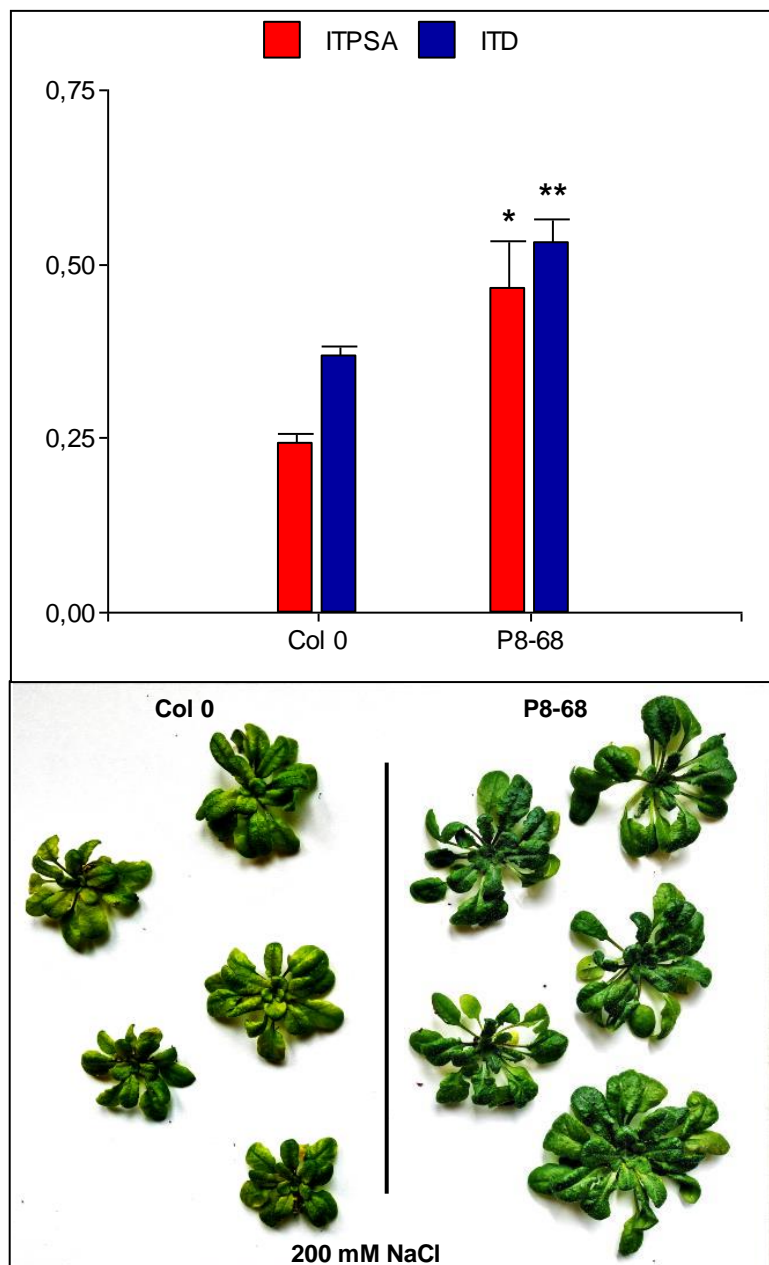


Figura 3.31: Índices de tolerancia del peso seco aéreo (ITPSA) y del diámetro (ITD) en un ensayo comparativo entre la línea transgénica P8-68 y la *wild-type* (Col 0) bajo un tratamiento de 200 mM NaCl impuesto por *shock*. Las barras indican medias y error estándar. (**) Diferencias entre genotipos según la prueba DGC ($p < 0,01$). (*) Diferencias entre genotipos según la prueba DGC ($p < 0,05$). La fotografía corresponde a las repeticiones de los dos genotipos en el tratamiento salino y fue tomada a los 28 días de iniciado el ensayo.

Se evaluó el contenido de Na^+ , K^+ y Cl^- ($\mu\text{Moles g}^{-1}$ Peso Seco) en hojas de las dos líneas en el control sin agregado de sal y en 200 mM NaCl. Al igual que en *Lotus*, en las dos líneas se incrementaron los contenidos de Na^+ y Cl^- y disminuyó el de K^+ cuando fueron expuestas a condiciones salinas. En el contenido de Na^+ existió interacción entre genotipos y

tratamientos (Tabla 3.12).

Tabla 3.12: Análisis del contenido de iones en la línea transgénica P8-68 y la *wild-type* de *A. thaliana* evaluadas en etapa vegetativa aplicando un estrés por *shock* salino. p-valor para Genotipo, Tratamiento e Interacción Genotipo*Tratamiento.

Variable	p-valor	p-valor	p-valor
	Genotipo	Tratamiento	Interacción
*Na ⁺	0,0084	<0,0001	0,0099
*K ⁺	0,3333	<0,0001	0,0905
*Cl ⁻	0,1341	<0,0001	0,0544

*Unidad: μMoles g⁻¹ Peso Seco. En color gris se indican los casos con diferencias significativas (p<0,05).

En condición control (0 mM NaCl), la línea transgénica y la *wild-type* presentaron un contenido similar de Na⁺, mientras que en 200 mM el contenido de Na⁺ de P8-68 fue significativamente mayor (Figura 3.32).

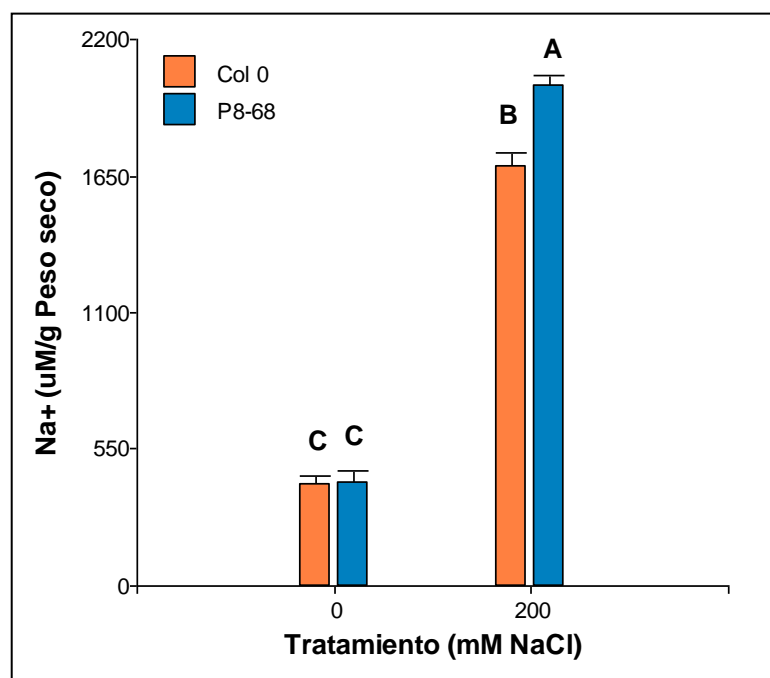


Figura 3.32: Contenido de Na⁺ en hojas de la línea transgénica P8-68 y la *wild-type* (Col 0) bajo dos concentraciones de NaCl: 0 y 200 mM. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC (p<0,05).

DISCUSIÓN

1. Ubicación subcelular del antiporter NHX1 de *Lotus tenuis*

Los antiporters de tipo NHX pertenecen a la superfamilia CPA (*Cation:Proton Antiporter*) constituida por antiporters monovalentes, y a la familia CPA1 (Sze & Chanroj, 2018). En *Arabidopsis*, se han encontrado 8 transportadores NHX, de los cuales, AtNHX7 (SOS1) y AtNHX8 se ubican en la membrana plasmática y no participan en la homeostasis iónica de los compartimentos intracelulares como lo hacen los demás (Bassil *et al.*, 2019). Los otros 6 antiporters NHX son intracelulares y se dividen en dos grupos. El grupo I está conformado por los antiporters AtNHX1 a AtNHX4 que se ubican en el tonoplasto (Bassil, Tajima, *et al.*, 2011; McCubbin *et al.*, 2014), mientras que los antiporters del grupo II, AtNHX5 y AtNHX6, se encuentran en la red de el Golgi, el trans-Golgi y compartimentos endosomales (Bassil, Ohto, *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se confirmó que la proteína codificada por la secuencia publicada del gen *NHX1* de *Lotus tenuis* (GenBank: 727217.1) se ubica en el tonoplasto, con lo cual se trata de un antiporter NHX perteneciente al grupo I. Si bien la región codificante de *LtNHX1* había sido clonada por otro grupo de investigación (Teakle, Amtmann, *et al.*, 2010), su localización *in planta* no había sido estudiada.

El análisis de la localización subcelular se realizó mediante la expresión, en dos sistemas vegetales, de la proteína de fusión *LtNHX1-GFP*. Por un lado, se obtuvo una línea transgénica de *L. tenuis* que expresa *LtNHX1-GFP* en forma constitutiva. Si bien la imagen obtenida por microscopía confocal no permitió por sí misma inferir la ubicación subcelular de la proteína, al compararla con otra línea que solo expresa GFP en citoplasma, la fluorescencia parecería localizarse en el tonoplasto (Figura 3.14). Por el contrario, al expresar la proteína de fusión en forma transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*, se pudo contar con indicios más claros de su ubicación. En este sistema, se observó fluorescencia en membrana vacuolar y en hebras transvacuolares de células epidérmicas (Figura 3.8). Además, luego de aplicar un tratamiento de plasmólisis en las células, se visualizaron estructuras esféricas dentro de las vacuolas, que podrían ser estructuras esféricas intravacuolares (IVSP) o “*bulbs*” (Reisen *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2002; Segami *et al.*, 2014). Estas se originarían a partir de la adhesión de dos tonoplastos e invaginación, por lo que se considera que están formadas por una doble membrana vacuolar, lo que lleva a que su fluorescencia sea mayor a la del tonoplasto de la vacuola central (Segami *et al.*, 2014). En este trabajo, la fluorescencia de los “*bulbs*” fue significativamente superior a la

fluorescencia de regiones de la membrana vacuolar cercanas a los mismos, en una relación mayor a 2:1 (Figura 3.9). Esto confirmaría que se trata de dichas estructuras. Su aparición podría deberse a la dimerización de GFP cuando se utiliza para marcar proteínas del tonoplasto (Segami *et al.*, 2014). La presencia de las mismas junto con los indicios previamente mencionados permitieron confirmar la localización de LtNHX1.

La proteína LtNHX1-GFP fue apenas detectada mediante Western blot y las dos bandas tenues observadas presentaron un peso molecular inferior al esperado (Figura 3.10). Esto coincide con lo observado para el antiporter NHX1 de otras especies (Apse *et al.*, 1999; Fukuda, Nakamura, *et al.*, 2004; Hanana *et al.*, 2007; Venema, Quintero, Pardo, & Donaire, 2002; Xia, Apse, Aharon, & Blumwald, 2002), y puede deberse a una migración anómala en el gel, que ya fue reportada para otras proteínas de membrana y que se explica por la unión del detergente SDS a los motivos hélice-bucle-hélice que presentan estas proteínas (Rath, Glibowicka, Nadeau, Chen, & Deber, 2009). Otra explicación es que podría deberse al clivaje o degradación de la proteína por la presencia de un péptido señal N-terminal, sin embargo, mediante herramientas bioinformáticas no se predijo la existencia del mismo. Sin embargo, se encontró una secuencia PEST, asociada a proteínas de vida media celular corta (Rechsteiner & Rogers, 1996).

Cabe mencionar que se observaron al menos dos bandas (Figura 3.10). Esto coincide con los patrones difusos o multi-banda observados en los SDS-PAGE de las proteínas NHX1 de *A. thaliana* (Venema *et al.*, 2002), *Saccharomyces cerevisiae* (Wells & Rao, 2001) y *Oryza sativa* (Fukuda, Nakamura, *et al.*, 2004), y sugeriría la existencia de modificaciones postraduccionales, ya demostradas en *S. cerevisiae* (Wells & Rao, 2001). Mediante la herramienta GlycoEP se encontraron dos sitios potenciales de N-glicosilación en los residuos 50 y 293 de LtNHX1 (Figura 3.11).

2. Funcionalidad de LtNHX1 en la tolerancia a la salinidad

Una vez determinada la ubicación subcelular, el objetivo del trabajo fue realizar una prueba de concepto que indique la importancia de *LtNHX1* en la tolerancia a la salinidad. Si bien se trata de un carácter complejo, se ha demostrado en numerosos trabajos que la sobreexpresión de un solo gen puede incrementar la tolerancia (Bassil, Coku, & Blumwald, 2012; M. S. Khan, Ahmad, & Khan, 2015; Y. C. Ma *et al.*, 2017). Desde que se identificó el gen *NHX1* de *A. thaliana*, se ha expresado en forma constitutiva en diversas especies mejorando su comportamiento frente a condiciones salinas. También se han expresado genes *NHX1* provenientes de especies de interés agronómico en sistemas heterólogos,

mayormente *arabidopsis* (referencias contenidas en P. K. Agarwal *et al.*, 2018; M. S. Khan *et al.*, 2015).

En el presente estudio se analizó la tolerancia de plantas transgénicas de *L. tenuis* y *A. thaliana* con expresión constitutiva del gen *LtNHX1*. En los dos casos, la salinidad afectó el crecimiento de las líneas transgénicas, pero en menor medida que en las respectivas líneas *wild-type* (Figuras 3.18, 3.29 y 3.31). Esta inhibición del crecimiento coincide con la observada en un gran número de trabajos. En un estudio comparativo de la tolerancia a la salinidad de plantas transgénicas de *A. thaliana* con expresión constitutiva de genes *NHX1* de distintas especies (algodón, levadura, trigo, la propia *arabidopsis* y la halófito *Suaeda salsa*), todas las líneas incrementaron la tolerancia respecto a la *wild-type* frente a 200 mM NaCl, aunque en diferente medida, y en todos los casos existió inhibición del crecimiento (P. Liu, Yang, Li, Zheng, & Wu, 2010). Lo mismo se observó en trigo y festuca alta con expresión constitutiva de *AtNHX1* (Xue *et al.*, 2004; Zhao, Zhi, Xue, Liu, & Xia, 2007), en transgénicas de arroz con sobreexpresión del propio gen *OsNHX1* (Fukuda, Nakamura, *et al.*, 2004), y en plantas transgénicas de tabaco con expresión constitutiva del gen de algodón *GhNHX1* (C. A. Wu, Yang, Meng, & Zheng, 2004). Si bien genes provenientes tanto de halófitas como de glicófitas incrementan la tolerancia a la salinidad, podría pensarse que genes aislados de especies halófitas, que naturalmente toleran altas concentraciones de NaCl, permiten una menor inhibición del crecimiento en condiciones salinas al ser expresados en sistemas heterólogos. Sin embargo, también se ha reportado reducción en el crecimiento de las plantas en condiciones salinas al expresar genes *NHX1* de halófitas en forma constitutiva, incluso sin diferencias respecto a los genes de glicófitas (Lan, Duan, Wang, Zhou, & Wu, 2011; J. Y. Li *et al.*, 2008; P. Liu *et al.*, 2010). Si bien, como ya fue mencionado, expresar en forma constitutiva un único gen puede incrementar la tolerancia, el hecho de que aún así la salinidad afecte a las plantas transgénicas da idea de la complejidad del carácter. Es por esto que en los últimos años se ha estudiado la piramidización de transgenes relacionados con la tolerancia, con mejores resultados que en líneas que expresan solo uno de los genes considerados (Bhaskaran & Savithamma, 2011; Nguyen *et al.*, 2019; Pehlivan *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2015; Q. Yang *et al.*, 2009).

En este trabajo la línea transgénica de *A. thaliana* fue más tolerante a la salinidad durante la germinación que la *wild-type* (Figura 3.27). Esto coincide con lo hallado por otros autores tanto en plantas transgénicas de *arabidopsis* con expresión constitutiva de genes *NHX1* heterólogos (An *et al.*, 2008; N. Li *et al.*, 2017), como en otras especies (Huang *et al.*, 2018; Xue *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2007).

Adicionalmente, se evaluaron los contenidos de iones Na^+ , K^+ y Cl^- en hojas de plantas transgénicas de las dos especies. En 200 mM NaCl, la línea transgénica de *A. thaliana* se diferenció de la *wild-type* únicamente en el contenido de Na^+ , presentando una mayor acumulación (Figura 3.32). Si bien en algunos estudios la tendencia fue la contraria, en general, las plantas transgénicas con expresión constitutiva de *NHX1* suelen presentar mayores contenidos de Na^+ y mayor tolerancia a la salinidad (Apse *et al.*, 1999; H. Chen *et al.*, 2007; Fukuda, Nakamura, *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2018; J. Y. Li *et al.*, 2008; P. Liu *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2019). Esto puede relacionarse con la existencia de tolerancia tisular a partir de la compartimentalización de este ion en vacuolas por la actividad del antiporter *NHX1* (Blumwald & Gelli, 1997; Munns *et al.*, 2016).

En *L. tenuis*, existieron diferencias entre genotipos para el contenido de K^+ , con una mayor disminución en la línea transgénica respecto a la *wild-type* cuando se trataron con 100 mM NaCl (Figura 3.19). Por su gran similitud química, el incremento del Na^+ genera un desplazamiento del K^+ en sus funciones haciendo que su contenido disminuya (Blumwald, 2000; Ghars *et al.*, 2008; Maathuis & Amtmann, 1999). Debido a esto, en diversos estudios con plantas transgénicas con expresión constitutiva de *NHX1* se ha reportado un incremento en el contenido de Na^+ y una disminución en el de K^+ (Bhaskaran & Savithramma, 2011; H. Chen *et al.*, 2007; L. H. Chen, Zhang, & Xu, 2008; Kumar, Kalita, Srivastava, & Sahoo, 2017; Pehlivan *et al.*, 2016). Sin embargo, en el presente trabajo, el contenido de Na^+ en condiciones salinas en plantas transgénicas de *L. tenuis* fue similar al de las *wild-type*, por lo que la disminución del K^+ no se explica directamente por el aumento del Na^+ y es posible que existan otros factores involucrados que no han sido estudiados. Por ejemplo, conocer el contenido de iones en raíces podría ayudar a explicar lo observado en relación al transporte de los mismos, pero debido a cuestiones experimentales no se pudo realizar esta evaluación en forma confiable.

En estudios previos, la expresión de *LtNHX1* había incrementado la tolerancia a la salinidad de una cepa mutante de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) con alta susceptibilidad a los excesos de NaCl debido a la falta de transportadores endógenos de Na^+ (Teakle, Amtmann, *et al.*, 2010). Sin embargo, no se había realizado un estudio semejante en organismos vegetales. Si bien hasta el momento solo se estudiaron una línea transgénica de *A. thaliana* y una de *L. tenuis*, los resultados de este trabajo sugieren que la expresión constitutiva de *LtNHX1* incrementa la tolerancia a la salinidad, confirmando el rol del antiporter en la respuesta a este estrés abiótico. En el futuro deberían estudiarse los mecanismos de regulación del gen con el fin de tener un conocimiento más acabado de la actividad del antiporter *LtNHX1* en condiciones salinas. Por ejemplo, mediante estudios funcionales con

marcadores visualizables bajo el control transcripcional de la región 5' de *LtNHX1*, o el estudio de la posible acción reguladora de sus intrones.

CONCLUSIONES

- Se determinó que la proteína LtNHX1 se localiza en la membrana vacuolar, constituyendo un antiporter NHX del grupo I.
- Se obtuvieron líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y *Lotus tenuis* con expresión constitutiva de *LtNHX1*.
- La expresión constitutiva de *LtNHX1* incrementó la tolerancia a la salinidad de *A. thaliana* mediante el aumento de la velocidad y el porcentaje de germinación en 50, 100 y 150 mM NaCl. También incrementó la tolerancia a la salinidad en etapa vegetativa cuando el estrés fue impuesto tanto por *shock* como por aclimatación.
- La expresión constitutiva de *LtNHX1* incrementó la tolerancia a la salinidad de *L. tenuis* en etapa vegetativa incrementando la sobrevivencia, la longitud del tallo principal y el peso seco total de las plantas.
- Las plantas transgénicas de *A. thaliana* presentaron mayor contenido de Na⁺ en hojas que las *wild-type* cuando fueron tratadas con 200 mM NaCl, lo cual indicaría la existencia de tolerancia tisular debido a la actividad del antiporter NHX1. Sin embargo, en *L. tenuis* no se detectaron diferencias en el contenido de Na⁺ cuando se las trató con 100 mM de NaCl pero si en el de K⁺, siendo menor en las plantas transgénicas que en las *wild-type*. En el futuro, deberían analizarse con más detalle estos y otros parámetros fisiológicos.

CONSIDERACIONES GENERALES

La presente tesis doctoral permitió ampliar los conocimientos sobre los mecanismos de tolerancia a la salinidad de la leguminosa forrajera *Lotus tenuis*, especialmente en relación a la compartimentalización de sodio en vacuolas.

Si bien se había reportado la existencia de variabilidad en la tolerancia a la salinidad de germoplasma de *L. tenuis*, existió dificultad en hallar materiales con comportamiento contrastante. Esto se debió a que se comenzó la investigación con la evaluación de familias de medios hermanos derivadas de poblaciones colectadas en suelos bajos de la provincia de Buenos Aires, por lo que puede suponerse que presentaban cierta adaptación al estrés. La variabilidad encontrada fue estrecha y, en términos generales, todas las familias presentaron tolerancia a la salinidad. Además, debido a que las condiciones ambientales no se repitieron y a la variabilidad intrafamiliar existente, el comportamiento de las familias no fue consistente en los dos ensayos realizados. Por este motivo, se introdujo variabilidad a través del cultivar Pampa INTA y se trabajó con genotipos propagados vegetativamente. A este nivel, se pudieron seleccionar un genotipo tolerante y uno susceptible con comportamiento diferencial tanto en la reducción del peso seco en condiciones salinas como en la sobrevivencia.

Se compararon los contenidos de Na^+ , K^+ y Cl^- en los genotipos previamente seleccionados, y la expresión relativa en condiciones salinas de genes codificantes de transportadores de membrana, considerados relevantes en la respuesta al estrés en estudio. El agregado de sal incrementó los niveles de Na^+ y Cl^- en ambos genotipos. En raíz este incremento con respecto al control sin agregado de sal fue mayor en el genotipo tolerante. En parte aérea ocurrió lo contrario y fue el genotipo susceptible el que presentó mayores incrementos respecto al control. Esto podría indicar una exclusión de iones más eficiente, y un mayor secuestro de los mismos en las vacuolas de la raíz en el genotipo tolerante, contribuyendo a la mayor tolerancia mediante la reducción de la toxicidad iónica en la parte aérea. Los cambios en la expresión génica en las raíces apoyaron esta conjetura, ya que el genotipo tolerante presentó un incremento en la expresión relativa de *NHX1* (responsable de la compartimentalización de Na^+), de *SOS1* (relacionado con su exclusión), y de *HKT1* (relacionado con la descarga de Na^+ del xilema para evitar su transporte a la parte aérea). También se incrementó la expresión del gen del cotransportador CCC, posiblemente relacionado con la exclusión de Cl^- . En el genotipo susceptible, el cloruro de sodio no produjo el incremento de los transcritos de estos genes en raíz.

Hacia el final del ensayo de expresión génica (96 horas de iniciados los tratamientos salinos), se invirtió la tendencia y el contenido de Na^+ en hojas respecto al control fue

superior en el genotipo tolerante que en el susceptible. Sin embargo, incluso en esta situación, el genotipo tolerante incrementó la expresión de los tres genes estudiados relacionados con el transporte y acumulación de Na^+ (*NHX1*, *SOS1* y *HKT1*), contribuyendo a la tolerancia. El genotipo susceptible incrementó la expresión de *NHX1* en hoja, lo cual resultó menos eficiente para disminuir los efectos tóxicos del Na^+ que la compartimentalización en raíces presumiblemente realizada por el genotipo tolerante.

Se logró identificar y secuenciar la región 5' no publicada de *LtNHX1* y su análisis *in silico* permitió predecir la presencia de sitios de unión de factores de transcripción y elementos reguladores relacionados con la respuesta a estrés salino y otros tipos de estrés abiótico. Se compararon las regiones 5' de los dos genotipos con comportamiento contrastante, y si bien existen diferencias en sus secuencias y en la presencia de algunos de sus elementos reguladores, estas no indican en sí mismas diferencias en la regulación de los genes. Por esto, sería de importancia profundizar los estudios de la región 5' mediante herramientas moleculares, como el análisis del control transcripcional de secuencias marcadoras visualizables.

Con el fin de determinar si la secuencia publicada de la región codificante de *LtNHX1* es efectivamente ortóloga a la del antiporter *NHX1* de *Arabidopsis thaliana*, se determinó su ubicación subcelular, concluyendo que al igual que en la especie modelo, se trata de un transportador *NHX* del grupo I, localizado en la membrana vacuolar. Además se realizó una prueba de concepto, para conocer el impacto de la expresión constitutiva de *LtNHX1* en la tolerancia a la salinidad de plantas transgénicas de *A. thaliana* y *L. tenuis*. Se incrementó la velocidad y el porcentaje de germinación en 50, 100 y 150 mM NaCl de una línea transgénica de *A. thaliana* con expresión constitutiva de *LtNHX1* respecto a la línea *wild-type* y también se incrementó la tolerancia a la salinidad en etapa vegetativa tanto cuando el estrés fue impuesto por un *shock* de 200 mM NaCl como por aclimatación con 100 y 200 mM. La sobreexpresión de *LtNHX1* en una línea transgénica de *L. tenuis* incrementó su crecimiento y sobrevivencia respecto a la línea *wild-type*.

Las dos líneas transgénicas obtenidas presentaron inhibición del crecimiento al ser expuestas a condiciones salinas, pero se vieron menos afectadas que las respectivas líneas *wild-type*. La tolerancia a la salinidad es un carácter complejo, determinado por varios genes. En el presente trabajo se demostró en el ensayo de expresión génica en genotipos contrastantes, que si bien *NHX1* participa en la tolerancia y es muy importante para la compartimentalización de Na^+ , sobre todo en raíces, actúa en combinación con otros

transportadores que reducen o retrasan el transporte de Na^+ a la parte aérea de las plantas como SOS1 y HKT1.

En conclusión, se determinó que el antiporter vacuolar NHX1, expresado en forma constitutiva o no, es de importancia en la tolerancia a la salinidad de *L. tenuis* pero comparte con otros transportadores de membrana la actividad en la respuesta a estrés salino.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrol, I. P., Yadav, J. S. P., & Massoud, F. I. (1988). *Salt-affected soils and their management*. Rome, Italy.: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Acosta-Motos, J., Ortuño, M., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M., Hernandez, J., ... Hernandez, J. A. (2017). Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms. *Agronomy*, 7(1), 18. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010018>
- Adem, G. D., Roy, S. J., Zhou, M., Bowman, J. P., & Shabala, S. (2014). Evaluating contribution of ionic, osmotic and oxidative stress components towards salinity tolerance in barley. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-113>
- Adler, G., Blumwald, E., & Bar-Zvi, D. (2010). The sugar beet gene encoding the sodium/proton exchanger 1 (*BvNHX1*) is regulated by a MYB transcription factor. *Planta*, 232(1), 187-195. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1160-7>
- Affinito, M. A. (2014). *Caracterización de la variabilidad genética a nivel morfo-fisiológico y molecular de familias de medios hermanos de Lotus tenuis tolerantes a salinidad*. TFG Ingeniería agronómica. UNNOBA.
- Agarwal, P. K., Dave, A., & Agarwal, P. (2018). Transcriptional regulation of salinity stress: role and spatio-temporal expressions of ion-transporter gene promoters. *Biologia Plantarum*, 62(4), 641-646. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0815-2>
- Agarwal, P., Shukla, P. S., Gupta, K., & Jha, B. (2014). Bioengineering for Salinity Tolerance in Plants: State of the Art. *Molecular Biotechnology*, 54, 102-123. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9538-3>
- Alem, D., Narancio, R., Dellavalle, P. D., Rebuffo, M., Zarza, R., & Dalla Rizza, M. (2011). Molecular characterization of cultivars of *Lotus corniculatus* using transferable microsatellite markers. *Ciencia e Investigación Agraria*, 38(3), 453-461.
- An, B. Y., Luo, Y., Li, J. R., Qiao, W. H., Zhang, X. S., & Gao, X. Q. (2008). Expression of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter Gene of Alfalfa Enhances Salinity Tolerance in Transgenic Arabidopsis. *Acta Agronomica Sinica*, 34(4), 557-564. [https://doi.org/10.1016/S1875-2780\(08\)60022-X](https://doi.org/10.1016/S1875-2780(08)60022-X)
- Andrés, A., & Rosso, B. (2007). Characterization of *Lotus glaber* germplasm from Buenos Aires province – Argentina. *Lotus Newsletter*, 37(1), 24.

- Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A., & Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science*, 285(5431), 1256-1258. <https://doi.org/10.1126/science.285.5431.1256>
- Arzani, A., & Ashraf, M. (2016). Smart Engineering of Genetic Resources for Enhanced Salinity Tolerance in Crop Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35(3), 146-189. <https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1245056>
- Ashraf, M. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology advances*, 27(1), 84-93.
- Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2012). Crop breeding for salt tolerance in the era of molecular markers and marker-assisted selection. *Plant Breeding*, 132(1), 10-20. <https://doi.org/10.1111/pbr.12000>
- Ayers, A. (1948). Salt tolerance of birdsfoot trefoil. *Journal of the American Society of Agronomy*.
- Baisakh, N., RamanaRao, M. V., Rajasekaran, K., Subudhi, P., Janda, J., Galbraith, D., ... Pereira, A. (2012). Enhanced salt stress tolerance of rice plants expressing a vacuolar H⁺-ATPase subunit c1 (*SaVHAc1*) gene from the halophyte grass *Spartina alterniflora* Löisel. *Plant Biotechnology Journal*, 10(4), 453-464. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00678.x>
- Bassil, E., Coku, A., & Blumwald, E. (2012). Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na⁺/H⁺ antiporters in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 63(16), 5727-5740. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers250>
- Bassil, E., Ohto, M. A., Esumi, T., Tajima, H., Zhu, Z., Cagnac, O., ... Blumwald, E. (2011). The Arabidopsis Intracellular Na⁺/H⁺ Antiporters NHX5 and NHX6 Are Endosome Associated and Necessary for Plant Growth and Development. *The Plant Cell*, 23, 224-239. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.079426>
- Bassil, E., Tajima, H., Liang, Y.-C., Ohto, M.-A., Ushijima, K., Nakano, R., ... Blumwald, E. (2011). The Arabidopsis Na⁺/H⁺ antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K⁺ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *The Plant cell*, 23(9), 3482-3497. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089581>

- Bassil, E., Zhang, S., Gong, H., Tajima, H., & Blumwald, E. (2019). Cation Specificity of Vacuolar NHX-Type Cation/H⁺ Antiporters. *Plant Physiology*, 179(2), 616-629. <https://doi.org/10.1104/PP.18.01103>
- Bernstein, L., & Hayward, H. E. (1958). Physiology of Salt Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology*, 9(1), 25-46. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.09.060158.000325>
- Beuselinck, P. R., Ben Younes, M., & McGraw, R. L. (1986). Taxonomic Investigation of an Accession of *Lotus* spp. *Crop Science*, 26(4), 661-664. <https://doi.org/10.2135/cropsci1986.0011183X002600040003x>
- Bewley, J. D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9, 1055-1066.
- Bhaskaran, S., & Savithamma, D. L. (2011). Co-expression of *Pennisetum glaucum* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter and Arabidopsis H⁺-pyrophosphatase enhances salt tolerance in transgenic tomato. *Journal of Experimental Botany*, 62(15), 5561-5570. <https://doi.org/10.1093/jxb/err237>
- Blumwald, E. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current opinion in cell biology*, 12(4), 431-434. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00112-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00112-5)
- Blumwald, E., Aharon, G. S., & Apse, M. P. (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1465(1-2), 140-151.
- Blumwald, E., & Gelli, A. (1997). Secondary Inorganic Ion Transport at the Tonoplast. *Advances in Botanical Research*, 25, 401-417. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)60159-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60159-7)
- Borsani, O., Valpuesta, V., & Botella, M. A. (2001). Evidence for a Role of Salicylic Acid in the Oxidative Damage Generated by NaCl and Osmotic Stress in Arabidopsis Seedlings. *Plant physiology*, 126(3), 1024-1030.
- Botella, M. A., Martinez, V., Pardines, J., & Cerdá, A. (1997). Salinity induced potassium deficiency in maize plants. *Journal of Plant Physiology*, 150(1-2), 200-205.
- Briggs, D., & Walters, S. M. (2016). *Plant Variation and Evolution* (4th edition). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139060196>

- Chakraborty, K., Bose, J., Shabala, L., Eyles, A., & Shabala, S. (2016). Evaluating relative contribution of osmotolerance and tissue tolerance mechanisms toward salinity stress tolerance in three *Brassica* species. *Physiologia Plantarum*, 158(2), 135-151. <https://doi.org/10.1111/ppl.12447>
- Chauhan, J. S., Rao, A., Raghava, G. P. S., Brunak, S., & Hansen, J. (2013). In silico Platform for Prediction of N-, O- and C-Glycosites in Eukaryotic Protein Sequences. *PLoS ONE*, 8(6), e67008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067008>
- Chen, H., An, R., Tang, J. H., Cui, X. H., Hao, F. S., Chen, J., & Wang, X. C. (2007). Over-expression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice. *Molecular Breeding*, 19(3), 215-225. <https://doi.org/10.1007/s11032-006-9048-8>
- Chen, L. H., Zhang, B., & Xu, Z. Q. (2008). Salt tolerance conferred by overexpression of Arabidopsis vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene *AtNHX1* in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Transgenic Research*, 17(1), 121-132. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9085-z>
- Chen, Y. A., Wen, Y. C., & Chang, W. C. (2012). AtPAN: an integrated system for reconstructing transcriptional regulatory networks in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 13(1), 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-85>
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A., & Zhu, J. K. (2005). Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. *Crop Science*. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0437>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16(6), 735-743.
- Clua, A. A., Gimenez, D. O., & Fernandez, L. V. (1997). Increase in forage yield in narrowleaf birdsfoot trefoil (*Lotus tenuis* Waldst & Kit ex Willd) in a permanent pasture with foliar applied gibberellic acid (GA3), and phosphorus. *Plant Growth Regulation*, 21(3), 223-228. <https://doi.org/10.1023/A:1005841011102>
- Colmenero-Flores, J. M., Martínez, G., Gamba, G., Vázquez, N., Iglesias, D. J., Brumós, J., & Talón, M. (2007). Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *Plant Journal*, 50(2), 278-292.
- Coppi, G. O. (2010). La agriculturización en el contexto de una nueva ruralidad: Nuevos

- actores pluriactivos en el departamento Río Primero de la provincia de Córdoba. *Geograficando*, 6(6), 77-99.
- Cuin, T. A., Bose, J., Stefano, G., Jha, D., Tester, M., Mancuso, S., & Shabala, S. (2011). Assessing the role of root plasma membrane and tonoplast Na^+/H^+ exchangers in salinity tolerance in wheat: in planta quantification methods. *Plant, Cell & Environment*, 34(6), 947-961. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02296.x>
- Dai, X., Xu, Y., Ma, Q., Xu, W., Wang, T., Xue, Y., & Chong, K. (2007). Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, *OsMYB3R-2*, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 143(4), 1739-1751. <https://doi.org/10.1104/pp.106.094532>
- Davenport, R., Muñoz-Mayor, A., Jha, D., Eassah, P., Rus, A., & Tester, M. (2007). The Na^+ transporter *AtHKT1;1* controls retrieval of Na^+ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 30(4), 497-507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01637.x>
- Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., & Schroeder, J. I. (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*, 19(6), 371-379. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.02.001>
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109(2015), 212-228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
- Di Rienzo, J. A. (2009). *fgStatistics*. Córdoba. Argentina.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, G., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2017). *Infostat - Software estadístico*. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Di Rienzo, J. A., Guzmán, A. W., & Casanoves, F. (2002). A Multiple-Comparisons Method Based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. *Journal of Agricultural Biological and Environmental Statistics*, 7(2), 129-142. <https://doi.org/10.1198/10857110260141193>
- Díaz, P., Monza, J., & Márquez, A. (2005). Drought and saline stress. En *Lotus japonicus Handbook* (pp. 39-50). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/1->

4020-3735-X_3

- Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 33(4), 751-763.
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., & Pikaard, C. S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant journal*, 45(4), 616-629. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02617.x>
- El Mahi, H., Pérez-Hormaeche, J., De Luca, A., Villalta, I., Espartero, J., Gámez-Arjona, F., ... Quintero, F. J. (2019). A Critical Role of Sodium Flux via the Plasma Membrane Na^+/H^+ Exchanger SOS1 in the Salt Tolerance of Rice. *Plant Physiology*, 180, 1046-1065. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00324>
- Entio, L. J., & Mujica, M. M. (2014). Variabilidad del número de tallos en plántulas de *Lotus tenuis* creciendo en alta densidad. *Phyton*, 83(2), 243-250.
- Epstein, E., Norlyn, J. D., Rush, D. W., Kingsbury, R. W., Kelley, D. B., Cunningham, G. A., & Wrona, A. F. (1980). Saline Culture of Crops: A Genetic Approach. *Science*, 210(4468), 399-404.
- Escaray, F. J., Antonelli, C. J., Carrasco, P., & Ruiz, O. A. (2019). Interspecific hybridization improves the performance of *Lotus* spp. under saline stress. *Plant Science*, 283, 202-210. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.02.016>
- Espasandin, F. D., Collavino, M. M., Luna, C. V., Paz, R. C., Tarragó, J. R., Ruiz, O. a., ... Sansberro, P. a. (2010). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Lotus tenuis* and regeneration of transgenic lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102(2), 181-189. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9720-x>
- Falistocco, E., & Piccirilli, M. (1989). The Basic Karyotype of *Lotus tenuis* C-banding and Feulgen Studies. *Annals of Botany*, 63(4), 401-404. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087759>
- FAO. (s. f.). Salt-affected soils - FAO Soils Portal. Recuperado 1 de agosto de 2019, de <http://www.fao.org/soils-portal/soil-management/management-of-some-problem->

soils/salt-affected-soils/more-information-on-salt-affected-soils/en/

- Flowers, T. J. (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental botany*, 55(396), 307-319.
- Flowers, T. J., & Yeo, A. (1986). Ion Relations of Plants Under Drought and Salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13(1), 75-91. <https://doi.org/10.1071/PP9860075>
- Foolad, M. R. (2004). Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(2), 101-119. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000007308.47608.88>
- Franco, M. (2014). *Estudio de la variabilidad genética en familias de medios hermanos de Lotus tenuis sometidas a estrés salino*. Facultad de Ciencias Agrarias, UNR.
- Fricke, W., & Peters, W. S. (2002). The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant physiology*, 129(1), 374-388. <https://doi.org/10.1104/pp.001164>
- Fukuda, A., Chiba, K., Maeda, M., Nakamura, A., Maeshima, M., & Tanaka, Y. (2004). Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H⁺-pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter from barley. *Journal of Experimental Botany*, 55(397), 585-594. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh070>
- Fukuda, A., Nakamura, A., Hara, N., Toki, S., & Tanaka, Y. (2011). Molecular and functional analyses of rice NHX-type Na⁺/H⁺ antiporter genes. *Planta*, 233(1), 175-188. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1289-4>
- Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H., & Tanaka, Y. (2004). Function, Intracellular Localization and the Importance in Salt Tolerance of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter from Rice. *Plant and Cell Physiology*, 45(2), 146-159.
- Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L., & Fink, G. R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11444-11449. <https://doi.org/10.1073/pnas.191389398>
- Gaxiola, R. A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S. L., & Fink, G. R. (1999). The

- Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNHX1 and AVP1, can function in cation detoxification in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), 1480-1485. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1480>
- Ghars, M. A., Parre, E., Debez, A., Bordenave, M., Richard, L., Leport, L., ... Abdelly, C. (2008). Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K⁺/Na⁺ selectivity and proline accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 165(6), 588-599. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.05.014>
- Glenn, E. P., Brown, J. J., & Blumwald, E. (1999). Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical reviews in plant sciences*, 18(2), 227-255.
- Gouiaa, S., Khoudi, H., Leidi, E. O., Pardo, J. M., & Masmoudi, K. (2012). Expression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter *TNHXS1* and H⁺- pyrophosphatase TVP1 genes in tobacco from a bicistronic transcriptional unit improves salt tolerance. *Plant Molecular Biology*, 79(1-2), 137-155. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9901-6>
- Grattan, S., Grieve, C., Poss, J., & Robinson, P. (2004). Evaluation of salt-tolerant forages for sequential water reuse systems: III. Potential implications for ruminant mineral nutrition. *Agricultural water management*, 70(2), 137-150.
- Graus, D., Konrad, K. R., Bemm, F., G€e, M., Nebioglu, P., Lorey, C., ... Hedrich, R. (2018). High V-PPase activity is beneficial under high salt loads, but detrimental without salinity. *New Phytologist*, 219, 1421-1432. <https://doi.org/10.1111/nph.15280>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2016). Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with Sodium Dodecyl Sulfate: Minipreps. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(10), pdb.prot093344. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093344>
- Greenway, H., & Munns, R. (1980). Mechanisms of Salt Tolerance in Nonhalophytes. *Annual review of plant physiology*, 31(1), 149-190.
- Guo, Q., Wang, P., Ma, Q., Zhang, J. L., Bao, A. K., & Wang, S. M. (2012). Selective transport capacity for K⁺ over Na⁺ is linked to the expression levels of *PtSOS1* in halophyte *Puccinellia tenuiflora*. *Functional Plant Biology*, 39(12), 1047-1057. <https://doi.org/10.1071/FP12174>

- Hamrick, J. L. (1979). Genetic Variation and Longevity. En *Topics in Plant Population Biology* (pp. 84-113). London: Macmillan Education UK. https://doi.org/10.1007/978-1-349-04627-0_5
- Hanana, M., Cagnac, O., Yamaguchi, T., Hamdi, S., Ghorbel, A., & Blumwald, E. (2007). A Grape Berry (*Vitis vinifera* L.) Cation/Proton Antiporter is Associated with Berry Ripening. *Plant and Cell Physiology*, 48(6), 804-811. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm048>
- Harling, H., Czaja, I., Schell, J., & Waiden, R. (1997). A plant cation-chloride co-transporter promoting auxin-independent tobacco protoplast division. *EMBO Journal*, 16(19), 5855-5866.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K., & Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 51, 463-499. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.463>
- Hawker, J. S., & Walker, R. R. (1978). Effect of sodium chloride on expansion rates and invertase activity of leaves. *Functional Plant Biology*, 5(1), 73-80.
- Henderson, S. W., Wege, S., & Gilliam, M. (2018, febrero 6). Plant cation-chloride cotransporters (CCC): Evolutionary origins and functional insights. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19020492>
- Henderson, S. W., Wege, S., Qiu, J., Blackmore, D. H., Walker, A. R., Tyerman, S. D., ... Gilliam, M. (2015). Grapevine and Arabidopsis Cation-Chloride Cotransporters Localize to the Golgi and Trans-Golgi Network and Indirectly Influence Long-Distance Ion Transport and Plant Salt Tolerance. *Plant physiology*, 169(3), 2215-2229. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00499>
- Heslop-Harrison, J. (1964). Forty Years of Genecology. *Advances in Ecological Research*, 2, 159-247. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60332-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60332-3)
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347(347), 1-32.
- Hoffmann, W. A., & Poorter, H. (2002). Avoiding Bias in Calculations of Relative Growth Rate. *Annals of Botany*, 90(1), 37-42. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf140>

- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., ... Zimmermann, P. (2008). Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in bioinformatics*, 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/420747>
- Hruz, T., Wyss, M., Docquier, M., Pfaffl, M. W., Masanetz, S., Borghi, L., ... Zimmermann, P. (2011). RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics*, 12(1), 156. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-156>
- Huang, Y., Zhang, X. xia, Li, Y. hong, Ding, J. zhou, Du, H. mei, Zhao, Z., ... Zhang, S. zhi. (2018). Overexpression of the *Suaeda salsa* SsNHX1 gene confers enhanced salt and drought tolerance to transgenic *Zea mays*. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(12), 2612-2623. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)61998-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)61998-7)
- Hur, J., Jung, K. H., Lee, C. H., & An, G. (2004). Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Science*, 167, 417-426. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.009>
- Ismail, A. M., & Horie, T. (2017). Genomics, Physiology, and Molecular Breeding Approaches for Improving Salt Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 405-434. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916>
- Isogai, M., Uyeda, I., & Lee, B.-C. (1998). Detection and assignment of proteins encoded by rice black streaked dwarf fijivirus S7, S8, S9 and S10. *Journal of General Virology*, 79, 1487-1494.
- Ixtaina, V. Y., & Mujica, M. M. (2004). Variability in the salt tolerance in *Lotus glaber* Mill. genotypes selected in situ in a saline basin of the Flooding Pampas (Province of Buenos Aires, Argentina). *Revista Pastos* (España).
- Ixtaina, V. Y., & Mujica, M. M. (2010a). Respuesta del vigor de plántula de poblaciones de *Lotus tenuis* a variaciones contrastantes de disponibilidad de agua, luz y nutrientes. *Agrociencia*, 44(1), 31-41.
- Ixtaina, V. Y., & Mujica, M. M. (2010b). Variabilidad en los componentes del vigor de plántulas de *Lotus tenuis* según las épocas y densidades de siembra. *Phyton*, 79, 95-100.

- Jabnoune, M., Espeout, S., Mieulet, D., Fizames, C., Verdeil, J. L., Conéjéro, G., ... Véry, A. A. (2009). Diversity in expression patterns and functional properties in the Rice HKT transporter family. *Plant Physiology*, 150(4), 1955-1971. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138008>
- Jha, D., Shirley, N., Tester, M., & Roy, S. J. (2010). Variation in salinity tolerance and shoot sodium accumulation in Arabidopsis ecotypes linked to differences in the natural expression levels of transporters involved in sodium transport. *Plant, Cell and Environment*, 33(5), 793-804. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02105.x>
- Kade, M., Pagani, E., Mendoza, R., Pagani, E. A., & Mendoza, R. E. (2003). A morphological study of populations of *Lotus glaber* Mill. (*Fabaceae*). *Agronomie*, 23(2003), 203-207. <https://doi.org/10.1051/agro:2002083i>
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5), 193-195. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3)
- Khan, M. A., & Ungar, I. A. (1984). The effect of salinity and temperature on the germination of polymorphic seeds and growth of *Atriplex triangularis* Willd. *American Journal of Botany*, 71(4), 481-489.
- Khan, M. S., Ahmad, D., & Khan, M. A. (2015). Trends in genetic engineering of plants with (Na⁺/H⁺) antiporters for salt stress tolerance. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(5), 815-825.
- Kizhakkedath, P., Jegadeeson, V., Venkataraman, G., & Parida, A. (2015). A vacuolar antiporter is differentially regulated in leaves and roots of the halophytic wild rice *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka. *Molecular Biology Reports*, 42(6), 1091-1105. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3848-4>
- Kubala, S., Wojtyła, Ł., Quinet, M., Lechowska, K., Lutts, S., & Garmczarska, M. (2015). Enhanced expression of the proline synthesis gene P5CSA in relation to seed osmopriming improvement of *Brassica napus* germination under salinity stress. *Journal of Plant Physiology*, 183, 1-12. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2015.04.009>
- Kumar, S., Kalita, A., Srivastava, R., & Sahoo, L. (2017). Co-expression of arabidopsis *NHX1*

- and *bar* improves the tolerance to salinity, oxidative stress, and herbicide in transgenic mungbean. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01896>
- Lambrechtsen, N. C., Wills, B. J., & Douglas, G. B. (1986). Management and uses of *Lotus tenuis* (Narrow-leaved birdsfoot trefoil). En *Plant Materials Handbook for Soil Conservation* (pp. 271-274). Wellington.
- Lan, T., Duan, Y., Wang, B., Zhou, Y., & Wu, W. (2011). Molecular cloning and functional characterization of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from halophyte *Spartina anglica*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35(5), 535-543. <https://doi.org/10.3906/tar-1003-2>
- Lane, P., Parsons, D., Hall, E., Green, P., Langworthy, A., & Shabala, S. (2015). *Improved seed production of Lotus tenuis for a global market*. RIRDC, Canberra, Australia.
- Lavado, S. R. (2007). Visión sintética de la distribución y magnitud de los suelos afectados por salinidad en la Argentina. En E. Taleisnik, K. Grunberg, & G. Santa Maria (Eds.), *La salinización de suelos en la Argentina* (pp. 1-6). Córdoba: Editorial EDUCC.
- Leidi, E. O., Barragán, V., Rubio, L., El-Hamdaoui, A., Ruiz, M. T., Cubero, B., ... Pardo, J. M. (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *The Plant Journal*, 61(3), 495-506. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04073.x>
- León, R. J. C. (1975). Las comunidades herbáceas de la región Castelli-Pila. En *Productividad Primaria Neta de los Sistemas Herbáceos - Monografía* (Vol. 5, pp. 75-107). La Plata, Argentina: CIC.
- León, R. J. C., Burkart, E. S., & Movia, C. P. (1979). *La vegetación de la República Argentina. Relevamiento fitosociológico del pastizal del norte de la Depresión del Salado. Provincia de Buenos Aires*.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., ... Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325-327.
- Li, J. Y., He, X. W., Xu, L., Zhou, J., Wu, P., Shou, H. X., & Zhang, F. C. (2008). Molecular and functional comparisons of the vacuolar Na⁺/H⁺ exchangers originated from

- glycophytic and halophytic species. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 9(2), 132-140. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0710445>
- Li, N., Wang, X., Ma, B., Du, C., Zheng, L., & Wang, Y. (2017). Expression of a Na⁺/H⁺ antiporter RtNHX1 from a recretohalophyte *Reaumuria trigyna* improved salt tolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 218, 109-120. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.07.015>
- Liu, M., Song, X., & Jiang, Y. (2018). Growth, ionic response, and gene expression of shoots and roots of perennial ryegrass under salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(6), 112. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2687-7>
- Liu, P., Yang, G. D., Li, H., Zheng, C. C., & Wu, C. A. (2010). Overexpression of *NHX1s* in transgenic *Arabidopsis* enhances photoprotection capacity in high salinity and drought conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(1), 81-90. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0383-3>
- Liu, X., Cai, S., Wang, G., Wang, F., Dong, F., Mak, M., ... Chen, Z.-H. (2017). Halophytic *NHXs* confer salt tolerance by altering cytosolic and vacuolar K⁺ and Na⁺ in *Arabidopsis* root cell. *Plant Growth Regulation*, 82(2), 333-351. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0262-7>
- Lundqvist, A. (1993). The self-incompatibility system in *Lotus tenuis* (*Fabaceae*). *Heredity*, 119, 59-66.
- Ma, L., Lukasik, E., Gawehns, F., & Takken, F. L. W. (2012). The use of agroinfiltration for transient expression of plant resistance and fungal effector proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5_4
- Ma, Y. C., Aug, R. M., Dong, C., & Cheng, Z. M. (2017). Increased salt tolerance with overexpression of cation/proton antiporter 1 genes: a meta-analysis. *Plant Biotechnology Journal*, 15, 162-173. <https://doi.org/10.1111/pbi.12599>
- Maathuis, F. J. M., & Amtmann, A. (1999). K⁺ Nutrition and Na⁺ Toxicity : The Basis of Cellular K⁺/Na⁺ Ratios. *Annals of Botany*, 84, 123-133.
- Madden, T. (2013). The BLAST Sequence Analysis Tool. En *The NCBI Handbook [Internet]*

- (2nd Edition). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
- Mano, Y., & Takeda, K. (1997). Mapping quantitative trait loci for salt tolerance at germination and the seedling stage in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica*, 94(3), 263-272.
- Masek, T., Vopalensky, V., Suchomelova, P., & Pospisek, M. (2005). Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 336(1), 46-50. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2004.09.010>
- McCubbin, T., Bassil, E., Zhang, S., Blumwald, E., McCubbin, T., Bassil, E., ... Blumwald, E. (2014). Vacuolar Na⁺/H⁺ NHX-Type Antiporters Are Required for Cellular K⁺ Homeostasis, Microtubule Organization and Directional Root Growth. *Plants*, 3(3), 409-426. <https://doi.org/10.3390/plants3030409>
- Melečková, Z., Dítě, D., Píš, V., & Galvánek, D. (2014). Succession of saline vegetation in Slovakia after a large-scale disturbance. *Annales Botanici Fennici*, 51(5), 285-297.
- Mendoza, R. E. E., Pagani, E., & Pomar, M. C. C. (2000). Variabilidad poblacional de *Lotus glaber* en relación con la absorción de fósforo del suelo. *Ecología Austral*, 10, 3-14.
- Miñón, D., Sevilla, G., Montes, L., & Fernandez, O. (1990). *Lotus tenuis*: leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. Boletín técnico 98. Balcarce: INTA.
- Moghadam, A. A., Taghavi, S. M., Niazi, A., Djavaheri, M., & Ebrahimie, E. (2012). Isolation and in silico functional analysis of MtATP6, a 6-kDa subunit of mitochondrial F. *Genetics and Molecular Research*, 11(4), 3547-3567.
- Møller, I. S., Gilliam, M., Jha, D., Mayo, G. M., Roy, S. J., Coates, J. C., ... Tester, M. (2009). Shoot Na⁺ Exclusion and Increased Salinity Tolerance Engineered by Cell Type-Specific Alteration of Na⁺ Transport in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(7), 2163-2178. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064568>
- Montes, L. (1980). Narrowleaf trefoil naturalized in low-land fields in Buenos Aires province (Argentina). *Lotus Newsletter*, (11), 9-10.
- Morran, S., Eini, O., Pyvovarenko, T., Parent, B., Singh, R., Ismagul, A., ... Lopato, S. (2011). Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnology Journal*, 9(2), 230-249.

<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00547.x>

- Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell & Environment*, 16(1), 15-24.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, 25(2), 239-250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: Bringing them together. *New Phytologist*, 167(3), 645-663. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01487.x>
- Munns, R. (2010). Approaches to identifying genes for salinity tolerance and the importance of timescale. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 639, 25-38.
- Munns, R., & Gilliam, M. (2015). Salinity tolerance of crops - what is the cost? *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.13519>
- Munns, R., James, R. A., Gilliam, Matthew, Flowers, T. J., & Colmer, T. D. (2016). Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops. *Functional Plant Biology*, 43(12), 1103-1113.
- Munns, R., & Termaat, A. (1986). Whole-plant responses to salinity. *Functional Plant Biology*, 13(1), 143-160.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology*, 59, 651-681.
- Munns, R., Wallace, P. A., Teakle, N. L., & Colmer, T. D. (2010). Measuring soluble ion concentrations (Na(+), K(+), Cl(-)) in salt-treated plants. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 639, 371-382.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nawaz, I., Iqbal, M., Hakvoort, H. W. J. J., Blik, M., de Boer, B., & Schat, H. (2014). Expression levels and promoter activities of candidate salt tolerance genes in halophytic and glycophytic *Brassicaceae*. *Environmental and Experimental Botany*, 99, 59-66.

<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.10.006>

- Negrão, S., Schmöckel, S. M., & Tester, M. (2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany*, 119(1), 1-11. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw191>
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D., & Hancock, J. T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1237-1247.
- Nguyen, N. T., Vu, H. T., Nguyen, T. T., Nguyen, L. A. T., Nguyen, M. C. D., Hoang, K. L., ... Quach, T. N. (2019). Co-expression of arabidopsis *AtAVP1* and *AtNHX1* to improve salt tolerance in soybean. *Crop Science*, 59(3), 1133-1143. <https://doi.org/10.2135/cropsci2018.10.0640>
- Oh, D. H., Leidi, E., Zhang, Q., Hwang, S. M., Li, Y., Quintero, F. J., ... Bohnert, H. J. (2009). Loss of halophytism by interference with *SOS1* expression. *Plant physiology*, 151(1), 210-222. <https://doi.org/10.1104/pp.109.137802>
- Olías, R., Eljakaoui, Z., Li, J., De Morales, P. A., Marín-Manzano, M. C., Pardo, J. M., & Belver, A. (2009). The plasma membrane Na^+/H^+ antiporter *SOS1* is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na^+ between plant organs. *Plant, Cell & Environment*, 32(7), 904-916. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01971.x>
- Orcutt, D. M., & Nilsen, E. T. (2000). *Physiology of plants under stress: Soil and biotic factors* (Vol. 2). John Wiley & Sons.
- Palmenberg, A., & Sgro, J. Y. (2008). *EMBOSS Software for sequence analysis*. Madison: University of Wisconsin-Madison.
- Pankova, E. I., Vorobieva, L. A., Balyuk, S. A., Khasanlhanove, G., Konyushkova, M. V., & Yamnova, I. A. (2018). Salt-affected soils of the Eurasian Region: diagnostics, criteria and distribution. En R. Vargas, E. I. Pankova, S. A. Balyuk, P. V. Krasilnikov, & G. M. Khasankhanova (Eds.), *Handbook for saline soil management* (pp. 3-11). Rome, Italy: FAO/MSU.
- Papp, J. C., Ball, M. C., & Terry, N. (1983). A comparative study of the effects of NaCl salinity on respiration, photosynthesis, and leaf extension growth in *Beta vulgaris* L. (sugar

- beet). *Plant, Cell and Environment*, 6(8), 675-677. <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11589273>
- Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 324-349.
- Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., ... Payton, P. (2011). Expression of an Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (*AVP1*) in cotton improves drought and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 9(1), 88-99. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00535.x>
- Passioura, J. B., & Munns, R. (2000). Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27, 941-948.
- Paz, R. C., Rocco, R. A., Reinoso, H., Menéndez, A. B., Pieckenstain, F. L., & Ruiz, O. A. (2012). Comparative Study of Alkaline, Saline, and Mixed Saline-Alkaline Stresses with Regard to Their Effects on Growth, Nutrient Accumulation, and Root Morphology of *Lotus tenuis*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(3), 448-459. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9254-4>
- Paz, R. C., Sanchez, D. H., Pieckenstain, F., Maiale, S., Sannazzaro, A., Cuevas, J. C., ... Ruiz, O. A. (2005). Molecular and biochemical approximation of polyamine roles in tolerance mechanisms to salt stress in *Lotus* spp. *Lotus Newsletter* (Vol. 35).
- Pehlivan, N., Sun, L., Jarrett, P., Yang, X., Mishra, N., Chen, L., ... Zhang, H. (2016). Co-overexpressing a Plasma Membrane and a Vacuolar Membrane Sodium/Proton Antiporter Significantly Improves Salt Tolerance in Transgenic Arabidopsis Plants. *Plant and Cell Physiology*, 57(5), 1069-1084. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw055>
- Pesqueira, J. (2008). *Cambios bioquímicos, morfológicos y ecofisiológicos en plantas del género Lotus bajo estrés salino. Tesis doctoral*. Universitat Politècnica de València, Valencia. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/5765>
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785-786.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>

- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Plett, D., Safwat, G., Gilliam, M., Skrumsager Møller, I., Roy, S., Shirley, N., ... Tester, M. (2010). Improved Salinity Tolerance of Rice Through Cell Type-Specific Expression of AtHKT1;1. *PLoS ONE*, 5(9), e12571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012571>
- Primack, R. B., & Kang, H. (1989). Measuring Fitness and Natural Selection in Wild Plant Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 20(1), 367-396. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.20.110189.002055>
- Quesada, V., García-Martínez, S., Piqueras, P., Ponce, M. R., & Micol, J. L. (2002). Genetic architecture of NaCl tolerance in Arabidopsis. *Plant physiology*, 130(2), 951-963.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., & Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), 1760-1765. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>
- Real, D., Warden, J., Sandral, G. A., & Colmer, T. D. (2008). Waterlogging tolerance and recovery of 10 *Lotus* species. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(4), 480-487.
- Rechsteiner, M., & Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in biochemical sciences*, 21(7), 267-271.
- Reguera, M., Bassil, E., & Blumwald, E. (2014). Intracellular NHX-type cation/H⁺ antiporters in plants. *Molecular plant*, 7(2), 261-263.
- Reisen, D., Marty, F., & Leborgne-Castel, N. (2005). New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress. *BMC Plant Biology*, 5(1), 13.. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-13>
- Rogers, M., Noble, C., & Pederick, R. (1997). Identifying suitable temperate forage legume species for saline areas. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 37(6), 639-645.

- Rose, A. (2008). Intron-mediated regulation of gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 326, 277-290. https://doi.org/10.1007/978-3-540-76776-3_15
- Roy, S. J., Negrão, S., & Tester, M. (2014). Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 115-124. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2013.12.004>
- Rubio, F., Gassmann, W., & Schroeder, J. I. (1995). Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science*, 270(5242), 1660-1663.
- Ruijter, J., Van Der Velden, S., & IJgun, A. (2009). LinRegPCR: Analysis of quantitative RT-PCR data [Computer program]. Amsterdam, Netherlands: Heart Failure Research Center, Academic Medical Centre.
- Rus, A., Lee, B., Muñoz-Mayor, A., Sharkhuu, A., Miura, K., Zhu, J.-K., ... Hasegawa, P. M. (2004). AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in planta. *Plant physiology*, 136(1), 2500-2511.
- Saito, C., Ueda, T., Abe, H., Wada, Y., Kuroiwa, T., Hisada, A., ... Nakano, A. (2002). A complex and mobile structure forms a distinct subregion within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 29(3), 245-255.
- Sanchez, D. H., Cuevas, J., Chiesa, M., & Ruiz, O. (2005). Free spermidine and spermine content in *Lotus glaber* under long-term salt stress. *Plant Science*, 168(2), 541-546.
- Sanchez, D. H., Pieckenstain, F. L., Escaray, F., Erban, A., Kraemer, U., Udvardi, M. K., & Kopka, J. (2011). Comparative ionomics and metabolomics in extremophile and glycophytic *Lotus* species under salt stress challenge the metabolic pre-adaptation hypothesis. *Plant, Cell and Environment*, 34(4), 605-617. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02266.x>
- Sanchez, D. H., Pieckenstain, F. L., Szymanski, J., Erban, A., Bromke, M., Hannah, M. A., ... Udvardi, M. K. (2011). Comparative Functional Genomics of Salt Stress in Related Model and Cultivated Plants Identifies and Overcomes Limitations to Translational Genomics. *PLoS ONE*, 6(2), e17094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017094>

- Sandhu, D., Cornacchione, M. V., Ferreira, J. F. S. S., & Suarez, D. L. (2017). Variable salinity responses of 12 alfalfa genotypes and comparative expression analyses of salt-response genes. *Scientific Reports*, 7(1), 42958. <https://doi.org/10.1038/srep42958>
- Sandhu, D., Ferreira, J. F. S., Pallete, A., Pudussery, M. V, Ferreira, J. F. S., Liu, X., ... Hummer, K. (2019). Variable salinity responses and comparative gene expression in woodland strawberry genotypes. *Scientia Horticulturae*, 254, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.071>
- Sathee, L., Sairam, R. K., Chinnusamy, V., & Jha, S. K. (2015). Differential transcript abundance of salt overly sensitive (SOS) pathway genes is a determinant of salinity stress tolerance of wheat. *Acta physiologiae plantarum*, 37(8), 169.
- Savo Sardaro, M. L., Atallah, M., Tavakol, E., Russi, L., & Porceddu, E. (2008). Diversity for AFLP and SSR in natural populations of *Lotus corniculatus* L. from Italy. *Crop Science*, 48(3), 1080-1089.
- Schachtman, D. P., & Kelman, W. (1991). Potential of *Lotus* germplasm for the development of salt, aluminium and manganese tolerant pasture plants. *Australian Journal of Agricultural Research*, 42(1), 139-149.
- Schachtman, D. P., & Schroeder, J. I. (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature*, 370(6491), 655-658.
- Schilling, R. K., Marschner, P., Shavrukov, Y., Berger, B., Tester, M., Roy, S. J., & Plett, D. C. (2014). Expression of the Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) improves the shoot biomass of transgenic barley and increases grain yield in a saline field. *Plant Biotechnology Journal*, 12(3). <https://doi.org/10.1111/pbi.12145>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.
- Schroeder, J. I., Delhaize, E., Frommer, W. B., Guerinot, M. Lou, Harrison, M. J., Herrera-Estrella, L., ... Sanders, D. (2013). Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature*, 497(7447), 60-66.
- Segami, S., Makino, S., Miyake, A., Asaoka, M., & Maeshima, M. (2014). Dynamics of Vacuoles and H⁺-Pyrophosphatase Visualized by Monomeric Green Fluorescent Protein

- in *Arabidopsis*: Artifactual Bulbs and Native Intravacuolar Spherical Structures. *The Plant cell*, 26, 3416-3434. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.127571>
- Shabala, S. (2013). Learning from halophytes: Physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of botany*, 112(7), 1209-1221. <https://doi.org/10.1093/aob/mct205>
- Shabala, S. (2017a). *Plant stress physiology* (2nd Edition). Boston, USA: CAB International.
- Shabala, S. (2017b). Signalling by potassium: another second messenger to add to the list? *Journal of Experimental Botany*, 68(15), 4003-4007. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx238>
- Shabala, S., & Cuin, T. A. (2007). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 133, 651-669. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01008.x>
- Shabala, S., & Munns, R. (2017). Salinity stress: physiological constraints and adaptive mechanisms. En S. Shabala (Ed.), *Plant Stress Physiology* (2 ed., pp. 24-63). Boston, UK: CAB International.
- Shabala, S., & Pottosin, I. (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiologia Plantarum*, 151(3), 257-279. <https://doi.org/10.1111/ppl.12165>
- Shen, G., Wei, J., Qiu, X., Hu, R., Kuppu, S., Auld, D., ... Zhang, H. (2015). Co-overexpression of *AVP1* and *AtNHX1* in Cotton Further Improves Drought and Salt Tolerance in Transgenic Cotton Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33, 167-177. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0739-8>
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., & Zhu, J. K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6896-6901.
- Shi, H., Lee, B., Wu, S. J., & Zhu, J. K. (2003). Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature biotechnology*, 21(1), 81-85.
- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M., & Zhu, J.-K. (2002). The Putative Plasma Membrane Na⁺/H⁺ Antiporter *SOS1* Controls Long-Distance Na⁺ Transport in Plants. *The Plant Cell*,

- 14, 465-477. <https://doi.org/10.1105/tpc.010371>
- Shi, H., & Zhu, J. K. K. (2002). Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, 50(3), 543-550.
- Sies, H. (1986). Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12), 1058-1071. <https://doi.org/10.1002/anie.198610581>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1), 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Silva, P., & Gerós, H. (2009). Regulation by salt of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase activities and Na⁺/H⁺ exchange. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8), 718-726. <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9236>
- Singh, P., Mahajan, M. M., Singh Kumar, N., Kumar, D., & Kumar, K. (2019). Deciphering molecular mechanisms underlying salinity stress tolerance in Kharchia. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13562-019-00521-3>
- Soule, M. (1973). The Epistasis Cycle: A Theory of Marginal Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 4(1), 165-187. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.04.110173.001121>
- Stoffella, S., Posse, G., & Collantes, M. (1998). Variabilidad fenotípica y genotípica de poblaciones de *Lotus tenuis* que habitan suelos con distinto pH. *Ecología Austral*, 8, 57-63.
- Sze, H., & Chanroj, S. (2018). Plant Endomembrane Dynamics: Studies of K⁺/H⁺ Antiporters Provide Insights on the Effects of pH and Ion Homeostasis. *Plant Physiology*, 177, 875-895. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00142>
- Taboada, M. A., & Micucci, S. N. (2009). Respuesta de las propiedades físicas de tres suelos de la pampa deprimida al pastoreo rotativo. *Ciencia del Suelo (Arg)*, 27(2), 147-157.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant physiology* (3er ed.). Sinauer Associates.

- Tanaka, H., Chotekajorn, A., Kai, S., Ishigaki, G., Hashiguchi, M., & Akashi, R. (2016). Determination of Genome Size, Chromosome Number, and Genetic Variation Using Inter-Simple Sequence Repeat Markers in *Lotus* spp. *Cytologia*, 81(1), 95-102. <https://doi.org/10.1508/cytologia.81.95>
- Tang, X., Mu, X., Shao, H., Wang, H., & Brestic, M. (2015). Global plant-responding mechanisms to salt stress: physiological and molecular levels and implications in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), 425-437. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.889080>
- Teakle, N. L. (2008). *Comparative molecular physiology of salt and waterlogging tolerance in Lotus tenuis and L. corniculatus: towards a perennial pasture legume for saline land*. The University of Western Australia.
- Teakle, N. L., Amtmann, A., Real, D., & Colmer, T. D. (2010). *Lotus tenuis* tolerates combined salinity and waterlogging: Maintaining O₂ transport to roots and expression of an *NHX1*-like gene contribute to regulation of Na⁺ transport. *Physiologia Plantarum*, 139(4), 358-374.
- Teakle, N. L., Bowman, S., Barrett-Lennard, E. G., Real, D., & Colmer, T. D. (2012). Comparisons of annual pasture legumes in growth, ion regulation and root porosity demonstrate that *Melilotus siculus* has exceptional tolerance to combinations of salinity and waterlogging. *Environmental and Experimental Botany*, 77, 175-184. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2011.11.020>
- Teakle, N. L., Flowers, T. J., Real, D., & Colmer, T. D. (2007). *Lotus tenuis* tolerates the interactive effects of salinity and waterlogging by «excluding» Na⁺ and Cl⁻ from the xylem. *Journal of Experimental Botany*, 58(8), 2169-2180. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm102>
- Teakle, N. L., Real, D., & Colmer, T. D. (2006). Growth and ion relations in response to combined salinity and waterlogging in the perennial forage legumes *Lotus corniculatus* and *Lotus tenuis*. *Plant and Soil*, 289(1-2), 369-383. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9146-8>
- Teakle, N. L., Snell, A., Real, D., Barrett-Lennard, E. G., & Colmer, T. D. (2010). Variation in salinity tolerance, early shoot mass and shoot ion concentrations within *Lotus tenuis*:

- Towards a perennial pasture legume for saline land. *Crop and Pasture Science*, 61(5), 379-388.
- Teakle, N. L., & Tyerman, S. D. (2010). Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 33(4), 566-589.
- Termaat, A., & Munns, R. (1986). Use of concentrated macronutrient solutions to separate osmotic from NaCl-specific effects on plant growth. *Functional Plant Biology*, 13(4), 509-522.
- Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of botany*, 91(5), 503-527.
- Tiwari, V., Patel, M. K., Chaturvedi, A. K., Mishra, A., & Jha, B. (2019). Cloning and functional characterization of the Na⁺/H⁺ antiporter (*NHX1*) gene promoter from an extreme halophyte *Salicornia brachiata*. *Gene*, 683, 233-242. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.039>
- Toranj, S., Aliabad, K. K., Abbaspour, H., & Saeedpour, A. (2019). Effect of salt stress on the genes expression of the vacuolar H⁺-pyrophosphatase and Na⁺/H⁺ antiporter in *Rubia tinctorum*. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05124-8>
- Tricart, J. (1973). *Geomorfología de la Pampa Deprimida*. INTA.
- Tuteja, N. (2007). Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. *Methods in Enzymology*, 428, 419-438. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28024-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28024-3)
- Uchiya, P., Escaray, F. J., Bilenca, D., Pieckenstain, F., Ruiz, O. A., & Menéndez, A. B. (2016). Salt effects on functional traits in model and in economically important *Lotus* species. *Plant Biology*, 18(4), 703-709. <https://doi.org/10.1111/plb.12455>
- Undurraga, S. F., Santos, M. P., Paez-Valencia, J., Yang, H., Hepler, P. K., Facanha, A. R., ... Gaxiola, R. A. (2012). Arabidopsis sodium dependent and independent phenotypes triggered by H⁺-PPase up-regulation are SOS1 dependent. *Plant Science*, 183, 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.11.011>
- Van Valen, L. (1965). Morphological Variation and Width of Ecological Niche. *The American Naturalist*, 99(908), 377-390. <https://doi.org/10.1086/282379>

- Venema, K., Quintero, F. J., Pardo, J. M., & Donaire, J. P. (2002). The arabidopsis Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *The Journal of biological chemistry*, 277(4), 2413-2418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105043200>
- Vignolio, O. R., & Fernández, O. N. (2006). Bioecología de *Lotus glaber* Mill. (*Fabaceae*) en la Pampa Deprimida (provincia de Buenos Aires, Argentina). *Revista Argentina de Producción Animal*, 26, 113-130.
- Vignolio, O. R., Fernández, O. N., & Maceira, N. O. (2002). Biomass allocation to vegetative and reproductive organs in *Lotus glaber* and *L. corniculatus* (*Fabaceae*). *Australian Journal of Botany*, 50(1), 75-82.
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
- Wells, K. M., & Rao, R. (2001). The yeast Na⁺/H⁺ exchanger NHX1 is an N-linked glycoprotein. Topological implications. *The Journal of biological chemistry*, 276(5), 3401-3407. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001688200>
- Williams, R. F. (1948). The effects of phosphorus supply on the rates of intake of phosphorus and nitrogen and upon certain aspects of phosphorus metabolism in gramineous plants. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1(3), 333-361.
- Wright, S. (1949). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15(1), 323-354. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>
- Wu, C. A., Yang, G. D., Meng, Q. W., & Zheng, C. C. (2004). The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast Na(+)/H(+) antiporter plays an important role in salt stress. *Plant & cell physiology*, 45(5), 600-607.
- Wu, H. (2018). Plant salt tolerance and Na⁺ sensing and transport. *The Crop Journal*, 6(3), 215-225. <https://doi.org/10.1016/J.CJ.2018.01.003>
- Wu, H., Shabala, L., Azzarello, E., Huang, Y., Pandolfi, C., Su, N., ... Shabala, S. (2018). Na⁺ extrusion from the cytosol and tissue-specific Na⁺ sequestration in roots confer differential salt stress tolerance between durum and bread wheat. *Journal of Experimental Botany*, 69(16), 3987-4001. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery194>

- Xia, T., Apse, M. P., Aharon, G. S., & Blumwald, E. (2002). Identification and characterization of a NaCl-inducible vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Beta vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 116(2), 206-212. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1160210.x>
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, 80(1), 75-84. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
- Xue, Z. Y., Zhi, D. Y., Xue, G. P., Zhang, H., Zhao, Y. X., & Xia, G. M. (2004). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. *Plant Science*, 167(4), 849-859. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2004.05.034>
- Yamaguchi, T., & Blumwald, E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: Challenges and opportunities. *Trends in plant science*, 10(12), 615-620.
- Yang, A., Dai, X., & Zhang, W. H. (2012). A R2R3-type MYB gene, *OsMYB2*, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 63(7), 2541-2556. <https://doi.org/10.1093/jxb/err431>
- Yang, Q., Chen, Z. Z., Zhou, X. F., Yin, H. B., Li, X., Xin, X. F., ... Gong, Z. (2009). Overexpression of SOS (salt overly sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 2(1), 22-31. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn058>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13(1), 134.
- Yeo, A. R., Lee, K. S., Izard, P., Boursier, P. J., & Flowers, T. J. (1991). Short-Term and Long-Term Effects of Salinity on Leaf Growth in Rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 42(240), 881-889.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., ... Shinozaki, K. (1995). Correlation between the induction of a gene for delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 7(5), 751-760.

- Yue, Y., Zhang, M., Zhang, J., Duan, L., & Li, Z. (2012). SOS1 gene overexpression increased salt tolerance in transgenic tobacco by maintaining a higher K⁺/Na⁺ ratio. *Journal of Plant Physiology*, 169(3), 255-261. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2011.10.007>
- Zhang, H. X., & Blumwald, E. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature biotechnology*, 19(8), 765-768. <https://doi.org/10.1038/90824>
- Zhang, H. X., Hodson, J. N., Williams, J. P., & Blumwald, E. (2001). Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12832-12836. <https://doi.org/10.1073/pnas.231476498>
- Zhang, W. D., Wang, P., Bao, Z., Ma, Q., Duan, L. J., Bao, A. K., ... Wang, S. M. (2017). SOS1, HKT1;5, and NHX1 synergistically modulate Na⁺ homeostasis in the halophytic grass *Puccinellia tenuiflora*. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00576>
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1(2), 641-646. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>
- Zhao, J., Zhi, D., Xue, Z., Liu, H., & Xia, G. (2007). Enhanced salt tolerance of transgenic progeny of tall fescue (*Festuca arundinacea*) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, 164(10), 1377-1383. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.04.001>
- Zhu, J. K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current opinion in plant biology*, 6(5), 441-445.
- Zörb, C., Noll, A., Karl, S., Leib, K., Yan, F., & Schubert, S. (2005). Molecular characterization of Na⁺/H⁺ antiporters (ZmNHX) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 162(1), 55-66.

ANEXOS

Anexo 1.1

Anexo 1.1: Tasa de crecimiento relativo de 15 FMH de *L. tenuis* en dos fechas (16 y 29 ddi) y tres tratamientos (0, 150 y 300 mM NaCl). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en cada FMH y tratamiento según el test DGC.

FMH	Identificación	16 ddi			29 ddi		
		0	150	300	0	150	300
325	1	0,14 A	0,12 B	0,12 B	0,11 A	0,10 A	0,09 B
447	2	0,13 A	0,14 A	0,14 A	0,11 A	0,09 B	0,09 B
490	3	0,14 A	0,13 A	0,12 B	0,11 A	0,10 B	0,09 B
685	4	0,16 A	0,15 B	0,15 B	0,12 A	0,11 B	0,10 C
690	5	0,18 A	0,16 A	0,15 A	0,13 A	0,11 A	0,10 B
691	6	0,13 A	0,11 B	0,10 B	0,10 A	0,09 B	0,08 B
1146	7	0,11 A	0,11 A	0,10 A	0,10 A	0,08 B	0,08 B
1193	8	0,13 A	0,13 A	0,12 A	0,11 A	0,10 A	0,07 B
1195	9	0,15 A	0,14 A	0,14 A	0,12 A	0,11 A	0,09 B
1894	10	0,11 A	0,11 A	0,12 A	0,10 A	0,09 A	0,08 A
1897	11	0,14 A	0,13 A	0,13 A	0,11 A	0,09 A	0,09 B
2241	12	0,10 A	0,08 A	0,08 A	0,09 A	0,08 B	0,07 B
2243	13	0,12 A	0,11 A	0,11 A	0,10 A	0,09 B	0,08 B
2248	14	0,11 A	0,1 B	0,09 C	0,11 A	0,08 B	0,07 C
2297	15	0,12 A	0,11 A	0,11 A	0,10 A	0,08 A	0,07 A

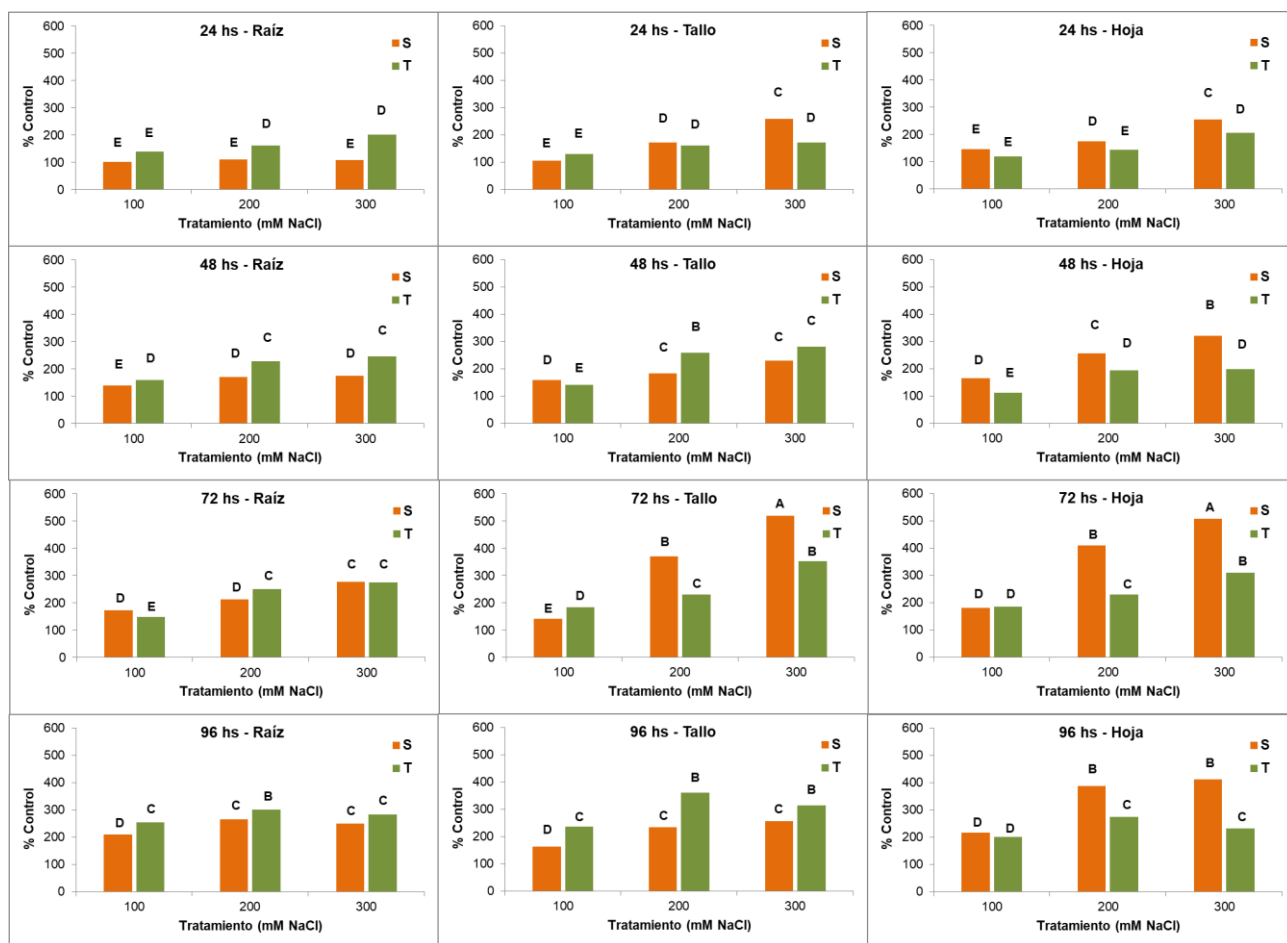
Anexo 2.1

Anexo 2.: Significancias estadísticas de la relación entre los contenidos de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ (μMoles g⁻¹ Peso Seco) en condiciones salinas y los contenidos en el control de dos genotipos de *Lotus tenuis* evaluados en condiciones salinas. p-valor para genotipo (Gen), tratamiento(Trat), considerado como la combinación de la concentración salina y el momento, tejido (Tejido) y sus interacciones.

	Variable			
	Na ⁺ /Control	K ⁺ /Control	Cl ⁻ /Control	(K ⁺ /Na ⁺)/Control
p-valor Gen	<0,0001	<0,0001	0,0875	<0,0001
p-valor Trat	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
p-valor Tejido	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
p-valor Gen*Trat	<0,0001	0,0038	<0,0001	0,0002
p-valor Gen*Tejido	<0,0001	0,0024	<0,0001	<0,0001
p-valor Tejido*Trat	<0,0001	0,0001	0,0005	<0,0001
p-valor Gen*Trat*Tejido	<0,0001	0,006	<0,0001	0,0685

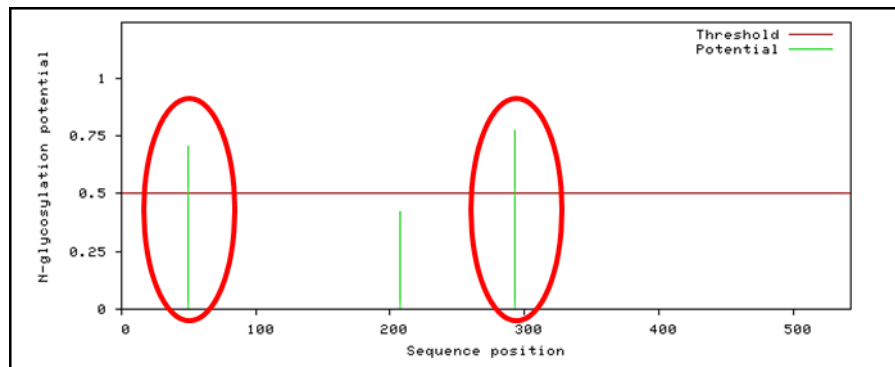
En color gris se indican los casos con diferencias significativas (p<0,01)

Anexo 2.2



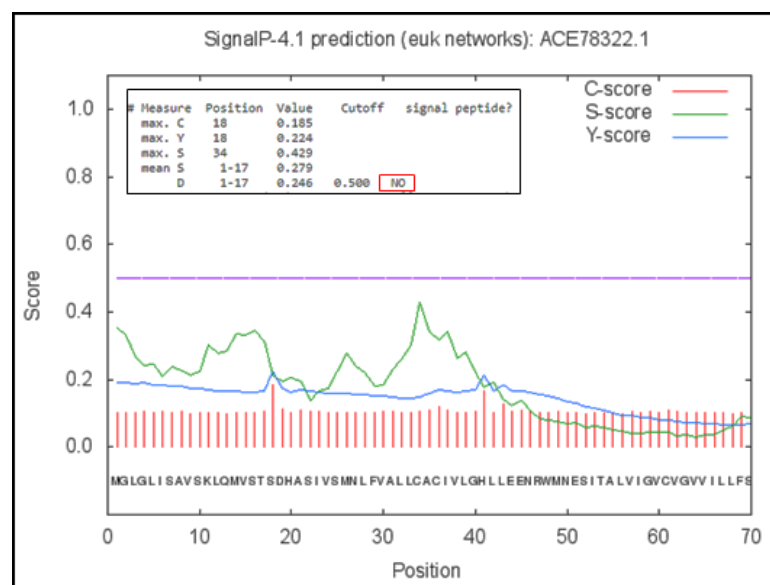
Anexo 2.: Contenido de Cl⁻ respecto al control de dos genotipos en raíz, tallo y hoja a 24, 48, 72 y 96 horas de iniciar tres tratamientos salinos: 100, 200 y 300 mM. Las barras indican las medias. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

Anexo 3.1



Anexo 3.: Posibles sitios de N-Glicosilación en el antiporter LtNHX1 predichos con la herramienta GlycoEP. En los círculos rojos se indican los dos sitios que superaron el umbral de 0,5.

Anexo 3.2



Anexo 3.: Análisis *in silico* de la proteína LtNHX1 mediante la herramienta Signal P. El score en ningún caso superó la línea de corte por lo que no se predijo la existencia de péptido señal.