



TITULO DE LA TESIS DOCTORAL: Absorción de agua y nutrientes y respuesta fisiológica de plantas halófitas y glicofitas bajo condiciones de estrés salino

DOCTORANDA: Agatha Agudelo Sánchez

TIEMPO DE REALIZACIÓN. TRES AÑOS DE 2016-2020

FECHA DE OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTOR: Diciembre de 2020

DIRECTORAS: Micaela Carvajal Alcaraz (Prof. Investigación CSIC) y M^aCarmen Martínez-Ballesta (Investigadora contratada CSIC).

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

FINALIDAD DEL PROYECTO

La escasez de recursos hídricos padecida durante los últimos años ha conducido a la necesidad de utilizar aguas salinas para el riego (sobre todo con alto contenido en NaCl). Por un lado, la sobreexplotación de los acuíferos produce una intrusión paulatina de agua del mar en los acuíferos, y por otro lado, la reciente construcción de desalinizadoras que producen aguas aptas para el riego que han de rentabilizarse mezclándose con aguas de baja calidad. Todo ello supone una salinización de los suelos y la necesidad de incorporar plantas adaptadas a condiciones de salinidad. El proyecto de investigación para alcanzar el título de Doctor, propone como fin, el utilizar aguas salinas riego, e investigar sobre las implicaciones que ello conlleva a nivel de absorción de agua y nutrientes, estudiando también los cambios fisiológicos en la planta para obtener una aplicación de las plantas objeto del estudio.

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DE LOS CONOCIMIENTOS CIENTÍFICO TÉCNICOS

Efecto de la salinidad en las plantas

La salinidad se considera uno de los principales estreses ambientales y el mayor factor abiótico que limita la producción agrícola a nivel mundial. Por sus características edafoclimáticas, el sureste español es una zona altamente susceptible de presentar problemas de salinización tanto en las aguas que se emplean para el riego de los cultivos, como las de los suelos. Los principales factores que han propiciado este problema son entre otros, la gran actividad agrícola, las altas temperaturas del verano y la escasa precipitación. Por su ubicación geográfica y debido a la alta actividad agrícola, ha sido necesario que en esta zona se haya tenido la necesidad de extraer agua de sus acuíferos. Pero debido a la alta demanda agrícola, los acuíferos han sido sobreexplotados, lo que ha ocasionado que haya una intrusión de agua marina en éstos, contaminándolos e incrementando de manera excesiva la cantidad de sales solubles en el agua de riego (Vera-Nicolás, 2006).

El rendimiento de una planta, expresado generalmente como biomasa de la planta o calidad del cultivo se ve afectado por la salinidad. Los efectos adversos de la salinidad sobre el crecimiento de la planta son: (1) estrés hídrico producido por la disminución del potencial osmótico del suelo, (2) desequilibrio nutricional, (3) y estrés salino originado por efecto específico de los iones (4) o la combinación de cualquiera de estos factores (Marschner, 1995; Shannon y Grieve, 1999).

Se ha observado que en condiciones de salinidad el crecimiento y desarrollo de la planta se ve afectado por múltiples patrones de expresión fenotípica que comprenden niveles fisiológicos y bioquímicos (Munns, 2002) así como moleculares (Tester and Davenport, 2003; Mansour and Salama, 2004)

Las relaciones entre salinidad y nutrición mineral son extremadamente complejas y su interacción depende del nivel de salinidad, composición de las sales, variedad del cultivar, el nutriente que se estudie y de los distintos factores ambientales. Condiciones nutricionales extremas pueden causar deficiencia o toxicidad en una gran variedad de especies vegetales.

Se ha observado que la salinidad afecta a la actividad de los iones de la solución nutritiva a través de cambios en la fuerza iónica, por precipitación, o formación de pares de iones (Tester and Davenport, 2003), resultando en un transporte y/o absorción excesiva de iones salinos principalmente Na^+ y Cl^- o un inadecuado transporte y/o absorción de elementos esenciales que afectan al crecimiento de la planta.

En general uno de los aspectos más relevantes a considerar en la adaptación de las plantas al estrés salino es la influencia de la salinidad en la absorción de agua (Martinez-Ballesta et al., 2006). Para mantener el turgor en las plantas sometidas a estrés salino se produce el denominado ajuste osmótico que implica la acumulación neta de solutos en la célula es respuesta a una caída de potencial hídrico en el entorno. La acumulación de iones en la vacuola desempeña un papel muy importante en la respuesta de las plantas a salinidad. Para alcanzar el equilibrio iónico en las vacuolas, el citoplasma acumula compuestos de bajo peso molecular que no interfieren con el metabolismo celular (Fernandez-Garcia et al., 2004; Martinez-Ballesta et al., 2004; Munns, 2005).

Por lo tanto, la utilización de plantas resistentes a la salinidad que sean capaces de compartimentalizar los iones salinos en la parte aérea de la planta o excretar esas sales en órganos especializados, es decir, el estudio de los mecanismos de tolerancia a la salinidad y la respuesta fisiológica de las plantas tanto glicofitas como halofitas, han sido un aspecto muy poco estudiado. De manera que uno de los objetivos planteados en este proyecto es el estudio de variedades adaptadas a la salinidad para su utilización en fitorremediación de suelos salinos.

Relaciones hídricas y acuaporinas

En la planta, el transporte de agua a corta distancia y el transporte en tejidos no vasculares ocurre en parte a través de las membranas celulares. Sin embargo, la difusión a través de la bicapa lipídica de estas membranas no es suficiente para justificar el rápido paso del agua y varios estudios han demostrado la implicación de canales de naturaleza proteica denominados acuaporinas (Daniels et al., 1994; Kammerloher et al., 1994; Kaldenhoff et al., 1998; Tyerman et al., 1999). Las acuaporinas pertenecen a la familia de proteínas trans-membrana denominada MIP y se encuentran facilitando el transporte de agua a través de las membranas celulares (tonoplasto y membrana plasmática) (Maurel et al., 1993), siguiendo gradientes de presión osmótica e hidrostática (para revisión Carvajal et al., 1998 y Maurel and Chrispeels, 2001).

Las acuaporinas son característicamente bloqueadas por mercurio (Hg) y distintos estudios han demostrado que las variaciones en la conductividad hidráulica de los tejidos de la planta en respuesta a HgCl_2 pueden ser debidas a un bloqueo de la actividad de las acuaporinas (Carvajal et al., 1999, 2000a, 2000b; Clarkson et al., 2000; Martínez-Ballesta et al., 2003a, 2003b). Más específicamente, la inhibición de transporte de agua a través de la raíz por HgCl_2 se ha empleado para indicar la proporción de flujo de agua total que ocurre *via* acuaporinas. Estos estudios también han confirmado la importancia de las acuaporinas en el transporte radial del agua desde el suelo a través de la raíz hasta alcanzar las vesículas del xilema. Así, el flujo de agua trans-membrana, y más concretamente la absorción de agua a través de la raíz puede ser controlada por cambios en la actividad o abundancia de acuaporinas.

Los mecanismos moleculares y celulares de regulación de acuaporinas en condiciones normales o de estrés se han estudiado en numerosos trabajos (ver para revisión Martínez-Ballesta et al., 2006). Distintos estímulos pueden inducir cambios en la fosforilación o protonación de las acuaporinas, desempeñando un papel fundamental en la apertura y cierre de acuaporinas durante el estrés (Tournaire-Roux *et al.* 2003).

El significado de la regulación de las acuaporinas y los mecanismos implicados durante la respuesta a estrés salino todavía no se ha establecido. Así, las diferentes regulaciones en el aumento o disminución en la expresión de los genes de las acuaporinas en condiciones de salinidad sugieren que podrían limitar las pérdidas de agua durante el primer estadio de la respuesta al estrés salino manteniendo la homeostasis celular. Sin embargo, resulta demasiado precipitado relacionar una mayor expresión de acuaporinas con un efecto beneficioso o nocivo para las plantas simplemente comparando patrones de expresión de genes PIP en condiciones de estrés. Lo que sí se ha visto claramente es una regulación a nivel de gen y proteína de las acuaporinas en respuesta de las plantas a estrés salino.

Se ha observado que la salinidad puede incrementar las cantidades de mRNA que codifica para genes PIP en *Arabidopsis* (Martínez-Ballesta *et al.* 2003a; Boursiac *et al.* 2005) y en cebada (Katsuhara *et al.*, 2003). Sin embargo Suga et al, (2002) observaron que en plántulas de rábano los niveles de mRNA y proteína de diferentes *PIP*s y *TIP*s permanecieron inalterados tras la adición de NaCl. Se ha mostrado también una regulación favorable en la expresión de ciertas isoformas de acuaporinas en *Arabidopsis* y arroz en condiciones de estrés salino (Seki, et al., 2002). En *Arabidopsis* los niveles de proteínas disminuyeron con un retraso de varias horas con respecto al mRNA (Boursiac *et al.* 2005). En *Mesembryanthemum crystallinum*, las acuaporinas pueden ser re-distribuidas desde el tonoplasto a compartimentos endosomales sugiriendo que esta re-distribución está implicada en el mantenimiento de la osmolaridad celular en condiciones de estrés osmótico (Vera-Estrella et al., 2004). Recientemente se ha observado un incremento de la abundancia de acuaporinas PIP con salinidad y tiempo de tratamiento en raíces de plantas de brócoli (López-Pérez et al., 2009).

De cualquier manera, el estudio de la funcionalidad o presencia de acuaporinas en plantas en condiciones de desequilibrio iónico o alta concentración de iones (aguas salinas) así como los mecanismos que regulan su apertura o cierre resultan de gran importancia a la hora de optimizar recursos hídricos y en la búsqueda de cultivos más tolerantes. *Además, los resultados obtenidos previamente proporciona la base para el estudio de estos mecanismos en brócoli, necesarios para alcanzar uno de los objetivos del proyecto: utilizar una acuaporina como marcador de resistencia a salinidad para programas de mejora.*

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo principal de esta Tesis doctoral es el aprovechamiento del aguas salinas y de suelo salinizados para la el cultivo de plantas. Para ello pretendemos profundizar en el conocimiento de los mecanismos de absorción de agua de las plantas distintas variedades y como se altera su metabolismo y la absorción de nutrientes en condiciones de estrés salino y como retiran sales del suelo. Se estudiará también la forma de revalorizar los cultivos obtenidos.

Objetivos específicos

1. Establecer fisiológicamente el efecto de la salinidad sobre las relaciones hídricas y la absorción de nutrientes en plantas halófitas y glicofitas. Estudiaremos el efecto de distintas concentraciones de NaCl sobre el paso del agua a través de la raíz, transpiración y ajuste osmótico para establecer el efecto y determinar y cuantificar la magnitud del estrés sobre estos parámetros.
2. Estudiar el efecto de la salinidad en el transporte de agua a nivel celular (permeabilidad osmótica del agua y conductividad hidráulica) y caracterizar, la composición y propiedades de la membrana plasmáticas de las células de las raíces y de hojas de plantas cultivadas bajo condiciones de estrés salino
3. Determinar la presencia de canales de agua (acuaporinas) en la fracción de membrana plasmática de células de plantas cultivadas en condiciones control y salino, determinando la permeabilidad osmótica Se identificarán los RNAm y proteínas de membrana de las células de la raíz.

METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

Material Vegetal

En todos los experimentos se utilizará variedades comerciales y silvestres de glicofitas y halófitas.

Los experimentos se realizarán en cámara de cultivo controlado (cultivo hidropónico) y en campo.

Actividad 1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA ABSORCIÓN DE NUTRIENTES.

Se determinará el efecto de distintas concentraciones de NaCl (100, 200, 300 mM) sobre los siguientes parámetros:

- a. **Crecimiento**, por medio de la evolución del desarrollo de la planta o del área foliar
- b. Se analizará los **nutrientes del xilema** recogido con la bomba de Scholander a la presión necesaria para igualar la presión ejercida por la transpiración. Los aniones se analizarán por cromatografía iónica y los cationes por espectroscopia de absorción atómica (Fernández-García et al., 2002).
- c. Durante los experimentos y al final, se **analizará también el material vegetal** separado en hojas (jóvenes y viejas), tallo y raíz.
- d. Se determinará y calcularán las sales retiradas del suelo. Principalmente se estudiará el Na⁺ y el Cl⁻

Todo ello se realizará en estudios a *corto* plazo, a 2, 4, 6 y 8 horas de la aplicación del estrés, a *medio* plazo, de 1 a 10 días de la aplicación del estrés y a *largo* plazo, a los dos meses de la aplicación del estrés.

En los experimentos en campo se determinará también la concentración de nutrientes en el suelo. Estos se realizarán en todas las estaciones del año.

Actividad 2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE EL AJUSTE OSMÓTICO.

Utilizaremos los mismos tratamientos de NaCl que en la *actividad 1*. También se realizará un estudio a corto, medio y largo plazo. Los parámetros a determinar serán:

- a. **Conductancia estomática de las hojas, G_s**. Esta se medirá con un porómetro en hojas jóvenes recién expandidas, a mitad del fotoperiodo.
- b. **Potencial hídrico de las hojas**. Se determinará con la bomba de Scholander.
- c. **Potencial osmótico de las hojas**. Se determinará en exudado de hoja utilizando un osmómetro.
- d. **Análisis del exudado de hoja**. Se determinará los iones inorgánicos y compuestos orgánicos. Iones inorgánicos: los aniones se analizarán por cromatografía iónica y los cationes por Espectrometría de Absorción Atómica. Iones orgánicos: los azúcares se determinarán por HPLC y los ácidos grasos y aminoácidos por cromatografía de gases.

Actividad 3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE LA ABSORCIÓN DE AGUA.

Las tareas a realizar serán:

- a. **Conductancia hidráulica de las raíces, L₀**. Ésta se medirá bien por el método de exudación natural, o bien con la bomba de Scholander (Carvajal et al., 1999).
- b. **Porcentaje de agua que atraviesa la ruta simplástica y apoplástica**. Se estudiará en las raíces por medio del colorante 'light green dye' (sólo se transporta por la ruta apoplástica) (Fernández-García et al., 2002)
- c. **Conductividad hidráulica de las células del cortex de la raíz, L_p**. Se determinará con la Sonda de Presión Celular (Cell Pressure Probe) (Martínez-Ballesta et al., 2003b)
- d. **Porcentaje de agua que atraviesa los canales de agua**. Bloquearemos los canales de agua añadiendo 50 μM de HgCl₂ durante 5 minutos a la disolución nutritiva. De esta forma calcularemos la proporción de agua que atraviesa los canales de agua sensibles al mercurio (Carvajal et al., 1996).

- e. **Flujos de agua en vesículas y protoplastos.** Los flujos de agua se determinarán mediante cinética rápida usando un aparato de *stopped-flow*. Se medirá la entrada/salida de agua por los cambios en volumen cuando se diluyen las vesículas en un medio hipoosmótico. Se observarán las variaciones de los flujos causadas por la presencia de NaCl en vesículas de membrana plasmática y protoplastos o en la disolución de cultivo donde previamente crecieron dichas plantas. También se determinarán los flujos en protoplastos midiendo el incremento de volumen al disminuir la concentración osmótica del medio externo por la técnica de video-microscopía (Carvajal et al., 1999). Esta técnica permite medir la velocidad de entrada a las células así como la permeabilidad osmótica del agua (P_f) la conductividad hidráulica (L_p) y calcular la cantidad de agua que atraviesa los canales de agua al bloquear éstos con Hg. (Maurel et al., 1993)

Se realizará un estudio a *corto* plazo midiendo tanto L_0 , como L_{p_c} y el porcentaje de la ruta apoplástica y simplástica, midiendo a 2, 4, 6 y 8 horas de la aplicación del estrés, otro estudio a *medio* plazo midiendo a de 1 a 10 días de la aplicación del estrés y otro a *largo* plazo midiendo a los dos meses de la aplicación del estrés. Debido a que en los experimentos a largo plazo, las raíces serán excesivamente grandes para poder medir con todo el material, las medidas se efectuarán con sólo una parte

Actividad 4. REGULACIÓN DEL FLUJO DE AGUA A TRAVÉS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA: CANALES DE AGUA (ACUAPORINAS)

La regulación de los flujos de agua se abordará estudiando la cinética del flujo en distintas condiciones y determinando los cambios en la concentración de canales en la membrana (aumento o disminución de su expresión). Se utilizarán vesículas de membrana plasmática y protoplastos. Para ello se abordarán las siguientes tareas:

- a. **Identificación del ARNm.** Se estudiará la expresión de los canales de agua, PIP tanto en raíces como en hojas de plantas de brócoli. Se utilizarán los mismos tratamientos de NaCl que en apartados anteriores. La expresión de los canales de agua PIP se estudiará tanto en raíces como en hojas por medio de 'Northern blots'. El grupo de investigación del CEBAS dispone de una sonda de ADN de *Arabidopsis thaliana* (Martínez-Ballesta et al., 2003a). Estudios preliminares han demostrado que dado la alta conservación de parte de la secuencia de estos genes, la hibridación heteróloga es posible.
- b. **Identificación de acuaporinas con anticuerpos.** El grupo dispone de dos anticuerpos de *Arabidopsis thaliana* frente a acuaporinas PIP. Estos anticuerpos se utilizarán para detectar acuaporinas de brócoli en geles de electroforesis de preparaciones de membrana plasmática de raíces, y protoplastos, mediante *immunoblotting*. Para separar adecuadamente los péptidos correspondientes a las bandas de 28-31 kD se realizará una electroforesis por el método de Schaefer. Las proteínas se electrotransferirán a membranas de nitrocelulosa. La reacción inmune se visualizará mediante la reacción de peroxidasa conjugada a anti-IgG de conejo. Un valor del peso molecular más preciso se podrá obtener mediante espectrometría de masas (MALDIT-OFF) de la banda del gel correspondiente a acuaporinas (Kaldenhoff et al., 1995).
- c. **Análisis de la expresión de genes y de proteínas.** Se determinará la expresión de genes (Northern) y la síntesis de proteínas (Western) en plantas crecidas con NaCl (a concentraciones que dependerán de los resultados de los experimentos anteriores)

Actividad 5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE SALES RETIRADA DEL SUELO POR LAS PLANTAS

Se determinará la retirada de sales del suelo (según los resultados obtenidos en los experimentos de las fases 3) y se aplicarán distintas dosis de riego junto a concentraciones variables de otros nutrientes como nitrato, sulfato y calcio sobre los siguientes parámetros como control del correcto desarrollo de las plantas:

- a. **Crecimiento**, por medio de la evolución del desarrollo de la planta o del área foliar
- b. Durante los experimentos y al final, se determinará **la composición mineral** en el material vegetal separado en hojas (jóvenes y viejas), tallo y raíz.
- c. El control y **análisis mineral del suelo** se realizará antes y después del experimento

Actividad 6. VALORIZACIÓN DE LOS BIOMASA OBTENIDOS CON LAS PLANTAS HALOFITAS

Nos proponemos con este estudio desarrollar diferentes tipos de estrategias para la utilización de las plantas utilizadas en fitorremediación. Para ello es necesario determinar el análisis nutricional y fitoquímico de los productos de la cosecha, es decir, toda la biomasa de la parte aérea (tallos, hojas, flores/frutos), según el siguiente esquema:

- a. **Elaboración de análisis nutricional completo.** Se enviarán a analizar a un laboratorio de análisis especializado.
- b. **Análisis de vitaminas**, principalmente vitamina C (se determinará por HPLC) y vitamina E (se determinará por Cromatografía gaseosa).
- c. **Análisis de compuestos bioactivos.** Los compuestos fenólicos se analizarán por HPLC-DAD, Glucosinolatos se analizarán por HPLC-DAD-ESI-MSn.
- d. **Lípidos totales.** La determinación de fosfolípidos totales se llevará a cabo mediante digestión con perclórico y la determinación del fosfato inorgánico. Los esteroides se separarán por cromatografía de gases tras su derivatización con BTSFA. La cuantificación se hará usando colestano como patrón interno. Los Ácidos Grasos se analizarán por cromatografía de gases tras la transmetilación de sus ésteres.

Se valorará su uso alimentario directo, su utilización como ingrediente y su interés como obtención de bioenergía.

Bibliografía

- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D. T., Sorieul, M., van den Dries, N., and Maurel, C. (2005) Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology* 139, 790-805.
- Carvajal M, Martínez-Ballesta MC, Martínez V (2000b) The response of plants to salinity involves root water channels. In: Hohmann, Nielsen (eds) *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport*. Kluwer Academic/Plenum, New York, pp 261-267
- Carvajal, M., Cerda, A., and Martínez, V. (2000a) Does calcium ameliorate the negative effect of NaCl on melon root water transport by regulating aquaporin activity?. *New Phytologist* 145, 439-447.
- Carvajal, M., Cooke, D.T., Clarkson, D.T. (1998) Water transport across plant plasma membrane. (Minireview). *Plant Growth Regulation*. 25:89-95
- Carvajal, M., Martínez, V. and Alcaraz, C.F. (1999). Physiological function of water-channels affected by salinity in paprika pepper plant roots. *Physiologia Plantarum* .105, 95-101.
- Clarkson DT, Carvajal M, Henzler T, Waterhouse RN, Smyth AJ, Cooke DT, Steudle E. 2000. Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *Journal of Experimental Botany* 51 (342) 61-70.
- Daniels MJ, Chaumont F, Mirkov TE, Chrispeels MJ. 1994. Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *Plant Cell* 8: 587-599.
- Fernandez-Garcia, N., Martínez, V., Cerda, A. and Carvajal, M. (2004 b) Fruit quality of grafted tomato plants grown under saline conditions. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79, 995-1001.
- Kaldenhoff R, Grote K, Zhu JJ, Zimmermann U. 1998. Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 14: 121-128.
- Kammerloher W, Fischer U, Piechottka GP, Schäffner AR. 1994. Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J*. 6: 187-199.
- Katsuhara, M., Koshio, K., Shibasaki, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., and Kasamo, K. (2003) Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant and Cell Physiology* 44, 1378-1383.
- Lee, G., Carrow R.N, Duncan R.R., Eiteman M.A., Rieger M.W. (2008):Synthesis of organic osmolytes and salt tolerance mechanisms in *Paspalum vaginatum*. *Environmental and Experimental Botany*, 63,(1-3), 19-27.
- López-Pérez L, Martínez-Ballesta M.C, Maurel C, Carvajal M. Changes in plasma membrane composition, lipids and aquaporins of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. *Phytochemistry* 70 492-500
- Mansour, M. M. F. and Salama, K. H. A. (2004) Cellular basis of salinity tolerance in plants. *Environmental and Experimental Botany* 52, 113-122.
- Marschner, H. (1995). Adaptation of plants to adverse chemical soil conditions: saline soils. In *Mineral nutrition of higher plants* (London: Academic Press), pp 657-681.
- Martínez-Ballesta M.C., Martínez, V., Carvajal, M. (2004). Osmotic adjustment, water relations and gas exchange in pepper plants grown under NaCl or KCl. *Environmental and Experimental Botany* 52: 161-174.
- Martínez-Ballesta M.C., Silva, C., López-Berenguer, C., Cabañero, F.J., Carvajal, M. (2006) Plant aquaporins: new perspectives on water and nutrient uptake in saline environment. *Plant Biology* 8, 535-546.
- Martínez-Ballesta, M.C., Aparicio, F. Pallas, V. Martínez, V., Carvajal, M. (2003a) Root hydraulic conductance and water channels expression in *Arabidopsis* under saline stress. *Journal of Plant Physiology*. 160: 689-697
- Martínez-Ballesta, M.C., Cabañero, F.J., Silva, C., López-Berenguer, C., Carvajal, M. (2006) Plant aquaporins: new challenge for water and nutrient uptake in saline environment. *Review- Plant Biology (en prensa)*
- Martínez-Ballesta, M.C., Martínez, V., Carvajal, M. (2000) Regulation of water channel activity in whole roots and protoplasts from roots of melon plants grown under saline conditions. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27, 685-691.
- Martínez-Ballesta, M.C., Martínez, V., Carvajal, M. (2003b) Aquaporin functionality in relation to H⁺-ATPase activity in root cells of *Capsicum annuum*, L. grown under salinity. *Physiologia Plantarum* 117, 413-420
- Maurel, C. and Chrispeels, M. J. (2001) Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology* 125, 135-138.
- Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J. I., and Chrispeels, M. J. (1993) The vacuolar membrane protein γ-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal* 12, 2241-2247.
- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25, 239-250.
- Munns, R. (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167, 645-663.
- Rivero R.M., Romero L, Ruiz J.M. (2005). Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant lettuce cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 54 (2005) 193-201
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., and Shinozaki, K. (2002)

- Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* 31, 279-292.
- Shannon MC, Grieve CM. 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Sci. Hortic.* 78: 5-38.
- Suga, S., Komatsu, S. and Maeshima, M. (2002) Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant and Cell Physiology* 43, 1229-1237.
- Tester, M. and Davenport, R. (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91, 503-507.
- Tournaire-Roux, C., Sutka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Luu, D. T., Bligny, R., and Maurel, C. (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425, 393-397
- Tyerman SD, Bohmert HJ, Maurel C, Steudle E, Smith JAC. 1999. Plant aquaporins their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J. Exp. Bot.* 50: 1055-1071.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., Bohnert, H. J., and Pantoja, O. (2004) Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiology* 135, 2318-2329.
- Vera-Nicolás P. 2006. Murcia y el agua: Historia de una pasión. http://servicios.laverdad.es/murcia_agua/index.htm
- Wu, W., Zhang Q., Zhu, Y, Hon-Ming L, Zongwei C., Dianjing G (2009) Comparative metabolic profiling reveals secondary metabolites correlated with soybean salt tolerance. *J Agric. Food Chem*-in press
- Zaghdoud C, Alcaraz- López C, Mota-Cadenas C, Martínez-Ballesta MC, Moreno DA, García-Viguera C, Ferchichi A, Carvajal M. (2012) The differing acclimation responses of two broccoli (*Brassica oleracea* L. var Italica) cultivars to salinity. *Scientific World Journal* n. 291435. DOI: 10.1100/2012/291435.