

## **Resumen**

### ***Introducción***

La salinidad y la sequía son las condiciones de estrés ambiental más importantes, que reducen los rendimientos de los cultivos en todo el mundo y que limitan la distribución de las plantas silvestres en la naturaleza. La salinidad del suelo, especialmente la salinización secundaria causada por prácticas antropogénicas, como la irrigación prolongada, conducen a pérdidas importantes de rendimiento agrícola, especialmente en las regiones áridas y semiáridas. La sequía, provocada por la reducción de contenido de agua en el suelo, se produce debido a alteraciones en el ciclo del agua en la naturaleza, principalmente cuando la evapotranspiración excede la precipitación en un área determinada, hasta el punto que las reservas de agua del suelo ya no pueden soportar el crecimiento de la planta.

La sequía y el estrés salino desencadenan la activación de una serie de mecanismos básicos de respuesta, que incluyen entre otros el control del transporte, la exclusión y la compartimentación de iones, así como la acumulación de solutos compatibles ('osmolitos'), y la activación de sistemas antioxidantes. Estos mecanismos están conservados en todas las plantas, tolerantes y sensibles a estrés por igual, y no confieren necesariamente tolerancia.

Para descifrar estos mecanismos y conseguir una mejor comprensión de la contribución de diferentes respuestas a estrés a la tolerancia al estrés en una especie dada, hemos llevado a cabo estudios comparativos sobre las respuestas a la sequía y la salinidad, en un número de taxones relacionados genéticamente con diferentes potenciales de tolerancia.

## **Metodología**

El trabajo se ha centrado en el estudio de las respuestas a la sal y la sequía en plantas genéticamente relacionadas pero con diferente tolerancia al estrés abiótico. Los taxones estudiados incluyeron plantas tolerante a sal (halófitas) y sensibles a sal (glicófitas) de especies silvestres de dos géneros diferentes: *Juncus* (monocotiledóneas) y *Plantago* (dicotiledóneas), así como plantas de especies de cultivo: *Solanum lycopersicum* var. cerasiforme (tomates cherry) y diferentes cultivares de *Phaseolus*, uno de *P. coccineus* y tres de *P. vulgaris*.

El enfoque experimental se basó principalmente en *i*) establecer la tolerancia relativa al estrés hídrico y al estrés salino en las especies estudiadas, a partir de su distribución en la naturaleza (en el caso de especies silvestres) y atendiendo a la inhibición relativa de su crecimiento en presencia de estrés, y *ii*) correlacionar cambios en los niveles de ‘marcadores bioquímicos de estrés’ asociados a vías específicas de respuesta (transporte de iones, acumulación de osmolitos ...) inducidos por los tratamientos de estrés, con la tolerancia relativa a estrés de las plantas, previamente establecido. Esta estrategia ha resultado ser apropiada para distinguir meras *respuestas generales a estrés* de los mecanismos relevantes para la *tolerancia a estrés* de las especies y cultivares investigados.

El trabajo también arroja luz sobre otros aspectos afectados por el estrés salino, específicamente en relación con la germinación y el éxito reproductivo, o cambios anatómicos en las plantas tratadas con sal. También se estudiaron los patrones de expresión del gen *NHX1*, que codifica un antiportador vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , en las especies de *Plantago*, como un primer paso en la caracterización completa de este transportador de iones, que parece desempeñar un papel importante en los mecanismos de tolerancia a sal en este género.

## ***Resultados y discusión***

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, hemos podido establecer qué respuestas generales a estrés son relevantes para la tolerancia en las especies o cultivares investigados, y cuáles no. Hemos podido aportar pruebas claras de que, a pesar de que todas las plantas parecen activar los mismos mecanismos de defensa en respuesta a estrés abiótico, su contribución relativa a la tolerancia a estrés difiere ampliamente en diferentes géneros y especies. Por otra parte, en general, la tolerancia relativa de las especies y cultivares investigados fueron los mismos, por cuando se refiere al estrés salino y al estrés hídrico, y los mismos mecanismos – excepto algunos relacionados con el transporte y la homeostasis de iones – son relevantes para la tolerancia a ambos tipos de estrés.

En los cultivares estudiados de *Phaseolus*, *P. vulgaris* cv. 'Maxidor' mostró la menor inhibición del crecimiento en condiciones de estrés salino e hídrico, y por lo tanto se definió como el más tolerante. 'Maxidor' acumula los niveles más bajos de iones tóxicos y de prolina, y registra los más altos de *myo*-inositol, en comparación con los otros cultivares. Llegamos a la conclusión que el bloqueo de transporte de iones desde las raíces hasta las hojas y la acumulación de *myo*-inositol, son los mecanismos más importantes para la tolerancia a estrés en *Phaseolus*. La prolina es un biomarcador de estrés fiable en este género, que indica el grado de estrés a que están sometidas las plantas, pero no está directamente implicada en los mecanismos de tolerancia.

En las especies de *Plantago* estudiadas se encontró que los taxones más tolerantes transportaban  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a las hojas más eficientemente que el más sensible, *P. major*, y tendían a acumular grandes cantidades de prolina, aunque sólo en condiciones

de estrés extremo; estas respuestas parecen ser las más relevantes para la tolerancia a estrés en *Plantago*. Los iones tóxicos transportados a las hojas se acumulan presumiblemente en las vacuolas, lo que dio incentivo para aislar, secuenciar y estudiar la expresión del gen del antiportador vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , *NHX1*, en las especies investigadas. En tratamientos a corto plazo con altas concentraciones de NaCl, las especies más tolerantes mostraron una mayor expresión inducida por sal del gen mencionado anteriormente, en apoyo a la contribución del antiportador NHX1 a tolerancia a sal en *Plantago*.

Mientras tanto, las especies de *Juncus* tolerantes fueron capaces de inhibir parcialmente el transporte de iones de las raíces a la parte aérea de las plantas, y registraron un incremento mucho mayor (aproximadamente 60 veces con respecto a los controles) en el contenido de prolina, en comparación con el congénere sensible a estrés. Por lo tanto, el bloqueo de acumulación de iones tóxicos y la inducción de la acumulación de prolina en las cañas parecen ser los mecanismos más importantes de tolerancia en *Juncus*. Por otro lado, no detectamos diferencias anatómicas importantes inducidas por el estrés al comparar los taxones tolerantes y el sensible a sal de *Juncus*.

### ***Conclusión***

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos generales de tolerancia al estrés en plantas, y proporcionan ideas claras sobre los mecanismos que confieren tolerancia, en concreto, a la sequía y al estrés salino, en algunas especies silvestres y cultivadas. Este trabajo también arroja más luz sobre las respuestas a estrés altamente eficientes en halófitas, plantas que podrían ser vistas como la respuesta de la naturaleza a las condiciones ambientales adversas antes mencionadas, a través de la evolución y la adaptación. Por lo tanto, las halófitas pueden

ser consideradas como una fuente adecuada – infrautilizada en la actualidad, en nuestra opinión – de conocimiento, recursos genéticos y herramientas biotecnológicas para la necesaria mejora de la tolerancia al estrés en plantas cultivadas.

Este trabajo ha dado lugar a ocho manuscritos científicos (publicados, en revisión, o en preparación), que se consideran como subcapítulos de la sección de resultados de esta tesis y se enumeran a continuación:

- 1) Al Hassan, M., Pacurar, A., Gaspar, A., Vicente, O., Boscaiu, M. (2014). Growth and reproductive success under saline conditions of three *Plantago* species with different levels of stress tolerance. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 42(1): 180-186.
- 2) Al Hassan, M., Fuertes, M., Sánchez, F., Vicente, O., Boscaiu, M. (2015). Effects of Salt and Water Stress on Plant Growth and on Accumulation of Osmolytes and Antioxidant Compounds in Cherry Tomato. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 43(1): 1-11.
- 3) Al Hassan, M., Gohari, G., Boscaiu, M., Vicente, O., Grigore, M. (2015). Anatomical modifications under salt stress in two ecologically distinct *Juncus* species. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 43(2): 501-506.
- 4) Al Hassan, M., Morosan, M., Lopez-Gresa, M.P., Boscaiu, M., Vicente, O. (2015). Selection and characterisation of salt and drought-resistant *Phaseolus* cultivars: a ‘proof-of-concept’ study. (Under revision).
- 5) Al Hassan, M., Pacurar, A., Lopez-Gresa, M.P., Llinares, J., Boscaiu, M., Vicente, O. (2015). Effects of Salt and Water Stress on Three Ecologically Distinct *Plantago* Species. (Under revision).

- 6) Al Hassan, M., Lopez-Gresa, M.P., Boscaiu, M., Vicente, O. (2015). Stress tolerance mechanisms in *Juncus*: Responses to salinity and drought in three *Juncus* species adapted to different natural environments. (Under revision).
- 7) Al Hassan, M., Cortes, J., Gaspar, A., Boscaiu, M., Vicente, O. (2015). Differential anti-oxidative responses under salinity and drought challenges in two halophytes and one glycophyte of the genus *Juncus*. (In preparation).
- 8) Al Hassan, M., Daniso, E., Martinelli, F., Boscaiu, M., Vicente, O. (2015). Expression of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene (*NHX1*) in three *Plantago* species differing in salt tolerance (In preparation).

Otros manuscritos, publicados o enviados para su publicación durante el período de trabajo, más o menos relacionados con su tema pero no incluidos en la Tesis, se enumeran en el apéndice al final de este documento.

