

**PARTICIPACIÓN DEL ANTIPORTER Na^+/H^+ NHX1 DE *LOTUS TENUIS* EN LA
TOLERANCIA A LA SALINIDAD DE *ARABIDOPSIS THALIANA***

Trabajo Final de Grado
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 19 de junio de 2023

**PARTICIPACIÓN DEL ANTIORTER Na^+/H^+ NHX1 DE *LOTUS TENUIS* EN LA
TOLERANCIA A LA SALINIDAD DE *ARABIDOPSIS THALIANA***

Trabajo Final de Grado

de la alumna

JULIETA AGUILÁ

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

María Aurora Maciel
Co-Directora

María Agustina Affinito
Directora

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino,.....

Agradecimientos

A todas las personas que me acompañaron durante estos años de formación académica en la UNNOBA, una valiosa e importante etapa de la cual me llevo grandes conocimientos y amistades.

A mi familia. A mis padres, por su apoyo incondicional, por su preocupación y por sus consejos. A mis abuelos Carlos, Julia, Lacho y Viviana, por darme un espacio para estudiar, por tenerme confianza y por estar siempre pendientes e interesarse en cómo me iba en la carrera. Gracias a mi familia por el amor de siempre.

A mis facuamigas Eri, Bren, Carli, Juli P, Juli G y Juli H, por compartir juntas estos años de carrera, estudio, alegrías, tristezas, frustraciones, aprendizajes, crecimiento, almuerzos, cenas, salidas, mateadas, birra y viajes. Fueron el empujón y apoyo cuando lo necesité, siempre presentes e incondicionales. Gracias por la hermosa amistad que construimos, las adoro con el corazón.

A Agus, por su amor y cariño, comprensión y paciencia, por apoyarme y querer ayudarme siempre, por su buena onda y energía positiva, por la escucha y los consejos. Gracias por creer en mí.

A mi directora de tesis Agos, por su confianza, dedicación, buena predisposición y ayuda constante en la realización de este trabajo. Por la buena onda, paciencia y enseñanzas.

A mi co-directora Lola, por su ayuda presencial y virtual, por la buena onda y predisposición para realizar este trabajo.

A la EEA INTA Pergamino por brindarme sus instalaciones para el desarrollo de mi tesis de grado. A la gente del laboratorio de Biotecnología por la buena onda y ayuda.

A la Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires, por darme la oportunidad de estudiar esta carrera en mi ciudad y por haberme formado.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	3
Impacto de la salinidad en la agricultura	3
Efecto del estrés salino en las plantas	6
Mecanismos de tolerancia a la salinidad en las plantas.....	8
Importancia de <i>Lotus tenuis</i> como especie forrajera.....	13
Tolerancia a la salinidad en <i>Lotus tenuis</i>	15
Hipótesis	17
Objetivos	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
Materiales y Métodos	19
Plásmido de interés: 35S:cMyc-LtNHX1	19
Transformación de <i>A. thaliana</i> con el vector 35S:cMyc-LtNHX1 mediante inmersión floral.....	20
Detección de plantas transgénicas	21
Evaluación de la expresión de <i>LtNHX1</i>	24
Evaluación de la tolerancia a la salinidad de las plantas transgénicas en etapa vegetativa.....	25
Evaluación de la tolerancia a la salinidad de las plantas transgénicas en fase de germinación	26
Análisis de la información	28
Resultados	30
Tolerancia a la salinidad de cinco líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> en etapa vegetativa.....	34
Tolerancia a la salinidad de tres líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> en etapa de germinación	43
Discusión	49
Conclusiones	54
Bibliografía	55

Resumen

Lotus tenuis es una leguminosa forrajera perenne que se encuentra naturalizada en la Pampa Deprimida y se considera tolerante a la salinidad. La compartimentalización intracelular de Na^+ en vacuolas mediante el antiporter NHX1 es una estrategia de las plantas para reducir la toxicidad iónica durante el estrés salino. Se conoce que la expresión modulada de NHX1 es clave en la tolerancia a salinidad de diversas especies, y que su expresión constitutiva en plantas transgénicas incrementa la tolerancia. El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios en la tolerancia a la salinidad de *Arabidopsis thaliana* a través de la expresión constitutiva de la región codificante del gen *NHX1* de *Lotus tenuis* (*LtNHX1*). Para esto, se obtuvieron cinco líneas transgénicas de *A. thaliana* utilizando el método de inmersión floral con *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 portadora de la construcción 35S:cMyc-LtNHX1. La misma se había obtenido previamente por el grupo de trabajo de la UI UNNOBA-INTA mediante el subclonado de la región codificante de *LtNHX1* en el vector pEarleyGate203, que permite su expresión constitutiva. Se seleccionaron las plántulas que expresaron el gen *bar*, marcador de selección que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio. Se confirmó la presencia del transgén por PCR y se obtuvieron líneas homocigotas portadoras del evento de transformación. La expresión del transgén se confirmó por RT-PCR.

Para evaluar la tolerancia a la salinidad durante la etapa vegetativa, las líneas transgénicas y el genotipo salvaje (Col 0) se analizaron en un DCA bajo tres tratamientos: 0 (control), 50 y 100 mM NaCl. A los 28 días se evaluó diámetro de planta (D, cm), peso fresco aéreo (PFA, mg), peso seco aéreo (PSA, mg), peso seco radicular (PSR, mg) y peso seco total (PST, mg) y se estimaron los índices de tolerancia del diámetro y del peso seco aéreo (ITD e ITPSA) a partir de la relación entre el valor de las plantas regadas con NaCl y el promedio del control. Además, se determinó el contenido de Na^+ y K^+ ($\mu\text{Moles g}^{-1}$ peso seco) en muestras de hoja y raíz mediante fotometría de llama. Se realizó ANOVA de dos vías y test de comparaciones múltiples DGC. Cuatro de las líneas transgénicas

presentaron mayores ITD e ITPSA que Col 0. Se realizó un nuevo análisis comparativo entre una de las líneas transgénicas (28-13) y la Col 0, disminuyendo la variabilidad de los datos. La línea 28-13 presentó mayor ITD e ITPSA y se encontró interacción genotipo*tratamiento para PSA y D, con mayores medias de 28-13 en 100 mM NaCl. Además, la línea transgénica acumuló más Na⁺ en hoja. Un incremento de Na⁺ en las células podría causar toxicidad iónica y conducir a una grave inhibición del crecimiento. Sin embargo, se observó un mejor crecimiento de las plantas transgénicas en comparación con las *wild-type* bajo condiciones salinas, lo que podría ser consecuencia de la compartimentalización del exceso de Na⁺ en las vacuolas mediada por el antiporter NHX1 de *Lotus tenuis*. Dicha compartimentalización disminuiría los niveles tóxicos del ion en el citoplasma de las células de las hojas, incrementando la tolerancia tisular en las plantas transgénicas bajo estrés salino.

Para evaluar la tolerancia a la salinidad en la germinación se sembraron semillas del tipo salvaje (Col 0) y de la generación T3 de tres de las líneas transgénicas en medio MS con 0 (control), 50, 100 y 150 mM NaCl. Se determinó el porcentaje de germinación (PG) respecto a las semillas sembradas al inicio del ensayo. La velocidad de germinación se estimó utilizando una modificación del índice de Timson: $IG = G/t$ donde G es el porcentaje de semillas germinadas en distintos recuentos y t es el periodo total de germinación (11 días). Se realizó un ANOVA de dos vías y test de comparaciones múltiples DGC. Las líneas transgénicas presentaron mayores PG e IG en los tratamientos con 100 y 150 mM NaCl que Col 0, exhibiendo una mayor tolerancia al estrés salino. Estos resultados sugieren que la expresión constitutiva de *LtNHX1* contribuye a incrementar la tolerancia a salinidad en la germinación.

En estudios previos, la sobreexpresión de *LtNHX1* había incrementado la tolerancia a la salinidad en etapa vegetativa de un genotipo transgénico de *L. tenuis*. En el presente trabajo, se confirmó el rol del antiporter NHX1 en la respuesta a dicho estrés abiótico en un sistema heterólogo como *Arabidopsis thaliana*, no solo en etapa vegetativa, sino también en germinación.

Introducción

Impacto de la salinidad en la agricultura

La salinidad del suelo se encuentran entre los principales problemas agrícolas dado que limitan el crecimiento, el rendimiento y la calidad de los cultivos (Ashraf, 2009; FAO, s.f.; Munns & Gilliam, 2015; Pessarakli & Szabolcs, 2019 y referencias allí contenidas; Yamaguchi & Blumwald, 2005). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha estimado que la superficie terrestre total afectada por salinidad comprende más de 800 millones de hectáreas, de las cuales 77 millones son agrícolas (FAO, s.f.), y se espera que aumente debido a los cambios climáticos globales y como consecuencia de las prácticas de riego (Munns & Tester, 2008; Rengasamy, 2010).

La salinización del suelo puede tener causas primarias o secundarias. En el primer caso, es el producto de procesos naturales que depositan sales durante largos períodos de tiempo en zonas áridas y semiáridas, como las sales solubles liberadas por la meteorización de las rocas parentales y las sales oceánicas transportadas por el viento y la lluvia. En el segundo caso, se debe a la acción de actividades antropogénica como la deforestación, el desmonte y el riego excesivo, que provocan que los niveles freáticos aumenten y concentran las sales en la zona de las raíces (FAO, 2008; Rengasamy, 2002; Velmurugan *et al.*, 2020).

La disminución en el rendimiento de los cultivos producto del estrés salino impacta en la seguridad alimentaria y en las ganancias económicas de los productores, sobre todo en aquellos países cuyas economías dependen en gran medida de la agricultura (Munns & Gilliam, 2015; Shah, 2014).

Argentina presenta 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 *et al.*, 1988). Esta superficie incluye ambientes áridos y semiáridos, donde la causa de las condiciones halomórficas es natural; ambientes áridos y semiáridos bajo riego, en los cuales existe una combinación de salinidad preexistente y salinización por razones antrópicas; y ambientes húmedos con

capas freáticas cercanas a la superficie, como la Pampa Deprimida en la Provincia de Buenos Aires (Lavado, 2007).

Desde la segunda mitad del siglo XX y con el crecimiento de la producción de soja en la década del '90, en el país se inició un marcado proceso de expansión agrícola, en desmedro de otras actividades agropecuarias (Coppi, 2010; Maguire *et al.*, 2020 y referencias allí contenidas). Como consecuencia, la ganadería de la Pampa Húmeda fue desplazada a suelos con limitantes edafoclimáticas, como las zonas bajas e inundables con problemas de halomorfismo (Lavado, 2007). Por ejemplo, una de las principales zonas ganaderas del país se encuentra en la Pampa Deprimida, en la Cuenca del Río Salado (Figura 1), donde aproximadamente el 60 % de los suelos son salino-alcálinos e hidromórficos, escasos en nutrientes y con alternancia de períodos de inundaciones y sequías (Batista *et al.*, 2005; Colombet, 2017; Matteucci, 2012). Es decir, son suelos con grandes dificultades para ser utilizados en la agricultura y, por ello, se destinan al pastoreo (Lavado, 2007). La historia de uso pastoril en estos ambientes ha generado pérdida en la diversidad florística (León *et al.*, 1979) y predominancia de las especies de bajo valor forrajero, es decir, que presentan baja tasa de crecimiento, baja digestibilidad y/o inaccesibilidad para el animal (Hidalgo *et al.*, 1998).

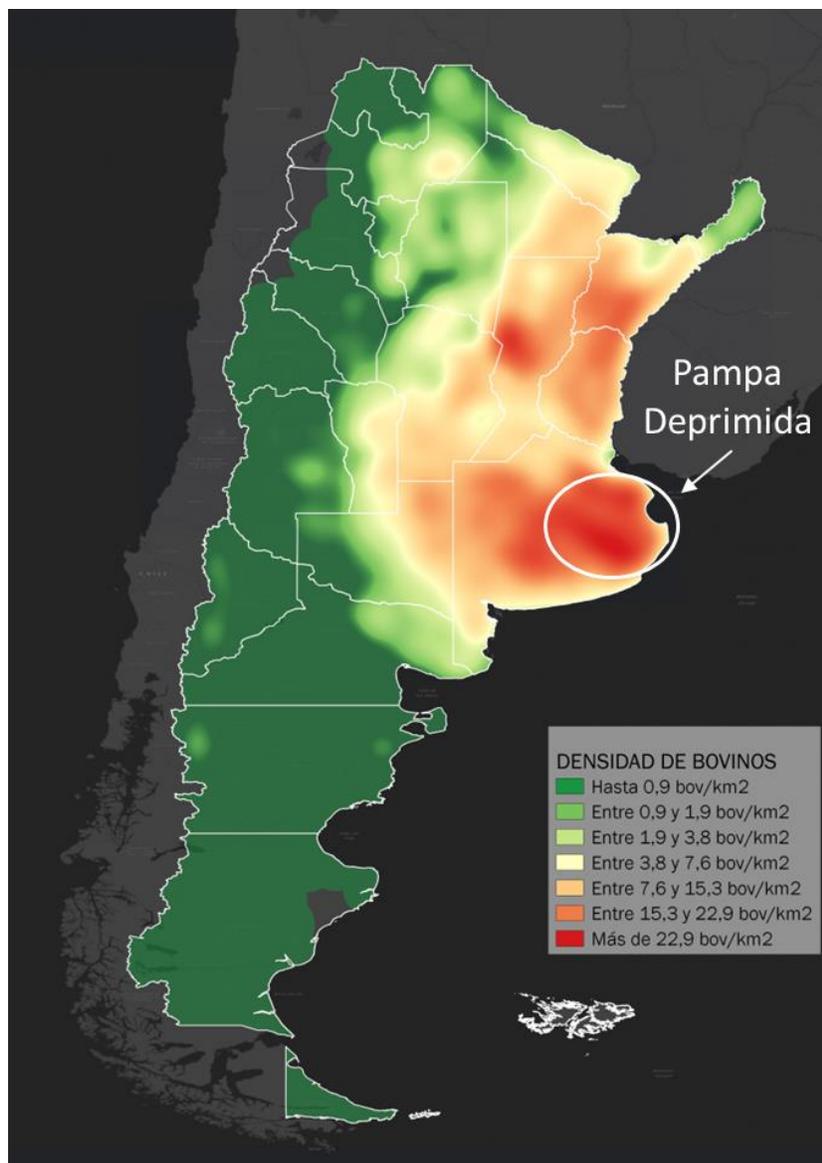


Figura 1. Mapa de densidad de bovinos por km² al 31 de diciembre de 2021. Mapa de distribución de existencias bovinas elaborado por el SENASA (*Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*, 2021). Se indica con un círculo la zona aproximada que corresponde a la Pampa Deprimida.

Frente a este nuevo contexto uno de los objetivos centrales en los programas de mejoramiento genético se centró en el desarrollo de cultivares de especies forrajeras de buena productividad con tolerancia a salinidad, ya sea en forma convencional o utilizando herramientas biotecnológicas, con el fin de incrementar

la oferta forrajera en estos ambientes (Flowers, 2004; Ismail & Horie, 2017; Yamaguchi & Blumwald, 2005).

Efecto del estrés salino en las plantas

El estrés salino inhibe el crecimiento de las plantas, lo cual ocurre en dos fases secuenciales (Munns, 1993; Munns *et al.*, 1995). En la primera fase domina el efecto osmótico, que causa una disminución en la capacidad de la planta para absorber agua, debido al bajo potencial hídrico en las soluciones del suelo 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).

En la fase osmótica, debido a las relaciones hídricas perturbadas, las células vegetales pierden turgencia, disminuyendo su tasa de elongación y división, lo cual tiene un efecto inmediato sobre su crecimiento y función (Fricke & Peters, 2002; Munns & Tester, 2008). 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, induce el cierre de los estomas para limitar la pérdida de agua, lo que conlleva a una disminución de la tasa de transpiración y del intercambio gaseoso, afectando la fotosíntesis (Methenni *et al.*, 2018; Munns, 1993; Munns, 2002).

La toxicidad iónica se desarrolla con el tiempo y se produce por la acumulación excesiva de iones salinos, principalmente sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-), en los tejidos de la planta, o por la baja tolerancia a la acumulación de los mismos (Munns & Tester, 2008). Las plantas captan las sales del suelo por vía simplástica y apoplástica. En la vía simplástica intervienen canales iónicos y distintos tipos de transportadores en la absorción (directa o indirecta), el transporte y la distribución de Na^+ y Cl^- en el interior de la planta. El exceso de estos iones disminuye la absorción de minerales, tales como K^+ y Ca^{2+} , lo que conduce a un desequilibrio nutricional y afecta la fisiología de la planta (Isayenkov & Maathuis, 2019; Munns,

2002; Sirohi *et al.*, 2016). 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).

La acumulación de sales ocurre especialmente en las hojas viejas, lo que provoca la senescencia prematura de las mismas (Munns & Tester, 2008). La hoja muere porque los iones que llegan continuamente por la corriente de transpiración exceden la capacidad de las células para compartimentalizarlos en las vacuolas, por lo que aumenta rápidamente la concentración de Na^+ y Cl^- en la pared celular, en el citoplasma o en el cloroplasto, provocando deshidratación, inhibición de las enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos o un efecto tóxico directo sobre los procesos fotosintéticos, respectivamente (Flowers & Yeo, 1986; Munns & Passioura, 1984; Munns, 2005; Munns & Tester, 2008). Si la velocidad a la que mueren las hojas viejas es mayor que la velocidad a la que se producen hojas nuevas, la capacidad fotosintética de la planta disminuye, lo que lleva a una reducción de la tasa de crecimiento, y en última instancia, la planta no logra sobrevivir (Munns & Tester, 2008).

Por último, la salinidad induce un aumento en la tasa de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células vegetales, lo que genera estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un desequilibrio entre especies pro-oxidantes y antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1986). El impacto tóxico de las ROS se traduce en peroxidación lipídica, deterioro de la estructura de varias membranas, anomalías en la ultraestructura de los orgánulos, así como el daño en el ADN, en las proteínas y enzimas (Ashraf, 2009; El Ghazali, 2020; H. Li *et al.*, 2017).

Las diferencias en la tolerancia a la salinidad entre especies y genotipos se evidencian en la segunda fase de inhibición del crecimiento, dado que el estrés osmótico afecta por igual tanto a especies sensibles como tolerantes (Figura 2). 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 (Munns, 1993; Munns *et al.*, 1995; Munns & Tester, 2008).

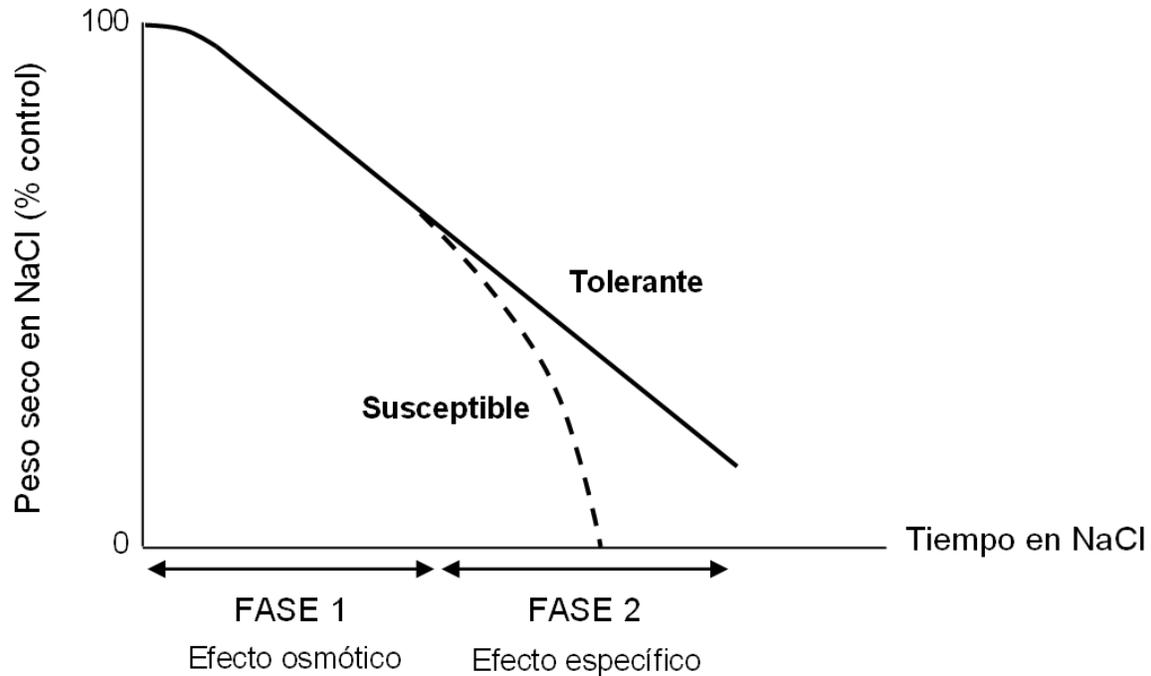


Figura 2. Respuesta de dos fases del crecimiento de las plantas frente al estrés salino. Se grafica el comportamiento de dos cultivares frente al estrés (susceptible y tolerante). En la primera fase la reducción del crecimiento se debe al efecto osmótico y ambos cultivares son igualmente afectados. En la segunda fase domina el efecto específico, y se manifiestan las diferencias entre los mismos. *Ilustración adaptada a partir de la publicación de Munns et al. (1995).*

Mecanismos de tolerancia a la salinidad en las plantas

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 según el estadio de crecimiento (Bernstein & Hayward, 1958), la especie y las condiciones climáticas y del suelo (Tang *et al.*, 2015). Las especies se clasifican en glicófitas y halófitas según su capacidad para crecer en ambientes salinos. Las glicófitas incluyen a la mayoría de las plantas de cultivo que no pueden crecer en presencia de altas concentraciones de sal, mientras que las

halófitas son aquellas plantas nativas de suelos salinos que pueden sobrevivir y completar todo su ciclo ontogénico en dicho ambiente (Acosta-Motos *et al.*, 2017).

Los mecanismos de tolerancia parecen ser fundamentalmente similares en todas las plantas (Blumwald *et al.*, 2000) y 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). Los dos últimos mecanismos están mediados por transportadores de membrana, cuyos genes se consideran candidatos para la mejora de la tolerancia a la salinidad de los cultivos (Munns, 2010; Roy *et al.*, 2014). Los genes que se han identificado como importantes en la tolerancia a la salinidad se resumen en tres categorías: transportadores iónicos, osmolitos (solutos compatibles) y factores de transcripción (Munns, 2010).

Frente al estrés osmótico, las plantas han desarrollado un mecanismo de ajuste osmótico. Éste consiste en la acumulación activa de moléculas en el citoplasma, con el objetivo de mantener un gradiente osmótico favorable que permita la absorción continua de agua y una turgencia positiva, la cual es indispensable para el crecimiento celular y la apertura estomática (Bartels & Sunkar, 2005; Chinnusamy *et al.*, 2005; Shabala & Munns, 2017; J. Zhang *et al.*, 1999). El ajuste osmótico puede realizarse mediante la absorción y acumulación de iones inorgánicos procedentes del sustrato, la absorción de osmolitos orgánicos o su biosíntesis *de novo* (Blumwald, 2000; Chinnusamy *et al.*, 2005; Shabala & Munns, 2017). La absorción de solutos orgánicos (solutos compatibles), como aminoácidos, azúcares, polioles o ácidos orgánicos, es un mecanismo rápido y energéticamente favorable, aunque no se encuentran en altas concentraciones en la solución del suelo, y, por lo tanto, las plantas deben incrementar su síntesis (Chinnusamy *et al.*, 2005; Munns & Tester, 2008; Shabala & Munns, 2017). Algunos de estos osmolitos, además de equilibrar los potenciales osmóticos, actúan como osmoprotectores y tienen función antioxidante (Ábrahám *et al.*, 2010; Bartels & Sunkar, 2005; Chinnusamy *et al.*, 2005). La absorción de iones Na^+ , K^+ y

Cl^- y su secuestro vacuolar, es una estrategia menos costosa para el ajuste osmótico (Chinnusamy *et al.*, 2005; Shabala & Munns, 2017).

La entrada de Na^+ en la célula vegetal es un proceso pasivo, debido a la diferencia de potencial eléctrico negativo de la membrana plasmática y a las bajas concentraciones citosólicas de Na^+ . Para evitar su acumulación citoplasmática en niveles tóxicos, las plantas utilizan los mecanismos de exclusión y tolerancia tisular. De esta forma, logran mantener un adecuado equilibrio K^+/Na^+ (Blumwald *et al.*, 2000; Krishnamurthy *et al.*, 2018; Munns & Tester, 2008; Tang *et al.*, 2015), lo cual es importante para su supervivencia ya que las enzimas citosólicas tanto en halófitas como en glicófitas son sensibles al Na^+ (Krishnamurthy *et al.*, 2018; Munns & Tester, 2008).

La exclusión de Na^+ de la parte aérea, implica por un lado su devolución a la solución del suelo a través de las raíces y, por el otro, a nivel celular, la exclusión de Na^+ del citosol y la “carga” del mismo en el xilema (Deinlein *et al.*, 2014; Munns & Tester, 2008; Tang *et al.*, 2015). Para esto, las plantas se valen de transportadores iónicos como el antiporter Na^+/H^+ SOS1 (*Salt Overly Sensitive 1*) de la membrana plasmática, que bombea el Na^+ citosólico fuera de las células y permite su exclusión tanto de raíz como de hoja, movilizándolo desde las células parenquimáticas del xilema hacia los vasos del xilema (Qiu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2013). Los cotransportadores CCC (*cation-chloride cotransporter*) participan en la homeostasis de Cl^- durante el estrés salino, a través de su exclusión desde las células parenquimáticas del xilema hacia los vasos del xilema en las raíces. Estas proteínas acoplan el transporte activo de Cl^- al de cationes K^+ y/o Na^+ , por lo que también participan en la “carga” de Na^+ en el xilema (Colmenero-Flores *et al.*, 2007; Shabala, 2013). Por el contrario, algunos transportadores HKT (*High-affinity Potassium Transporters*) de clase I median la “descarga” de Na^+ del xilema para evitar su transferencia a las hojas (Ismail & Horie, 2017; Ren *et al.*, 2005; Sunarpi *et al.*, 2005). Con la eliminación de Na^+ del xilema, se estimula la carga indirecta de K^+ en éste, lo que da como resultado una

alta relación K^+/Na^+ en las hojas (Ren *et al.*, 2005; Sunarpi *et al.*, 2005), que también contrarresta el estrés por salinidad.

El otro mecanismo que emplean las plantas para tolerar la salinidad es la tolerancia tisular. Esta se define como la capacidad de mantener el funcionamiento de los órganos en presencia de altas concentraciones de iones salinos en los tejidos y células (Munns *et al.*, 2016). A nivel celular, la tolerancia tisular se logra mediante la compartimentalización de Na^+ y Cl^- en la vacuola, lo cual también contribuye al ajuste osmótico (Blumwald *et al.*, 2000; Chinnusamy *et al.*, 2005; Munns *et al.*, 2016). Para equilibrar la presión osmótica de los iones en la vacuola, se acumulan solutos orgánicos y K^+ en el citoplasma (Jones & Gorham, 2002).

La compartimentalización de Na^+ en vacuolas ayuda a mantener su contenido citosólico en niveles que no sean tóxicos y depende de la actividad de los antiporters Na^+/H^+ de tipo NHX (Na^+/H^+ *eXchange*) del tonoplasto. Su actividad está impulsada por los gradientes de H^+ generados por las H^+ -ATPasas (V-ATPasa) y pirofosfatasas (V-PPasa) vacuolares (Apse *et al.*, 1999; Blumwald, 2000; Chinnusamy *et al.*, 2005; Parida & Das, 2005). Estos antiporters pertenecen a la superfamilia de proteínas de transporte CPA (Cation: Proton Antiporter) y median el intercambio de H^+ por Na^+ o K^+ , regulando la homeostasis iónica (Bassil *et al.*, 2019) y el pH celular (Barragán *et al.*, 2012). Dentro de las ocho isoformas de NHX (NHX1 – NHX8) identificadas en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, los antiporters vacuolares (NHX1 – NHX4) se ubican en el tonoplasto y catalizan el intercambio de Na^+/H^+ (Figura 3) y K^+/H^+ (Bassil *et al.*, 2011, 2019; McCubbin *et al.*, 2014).

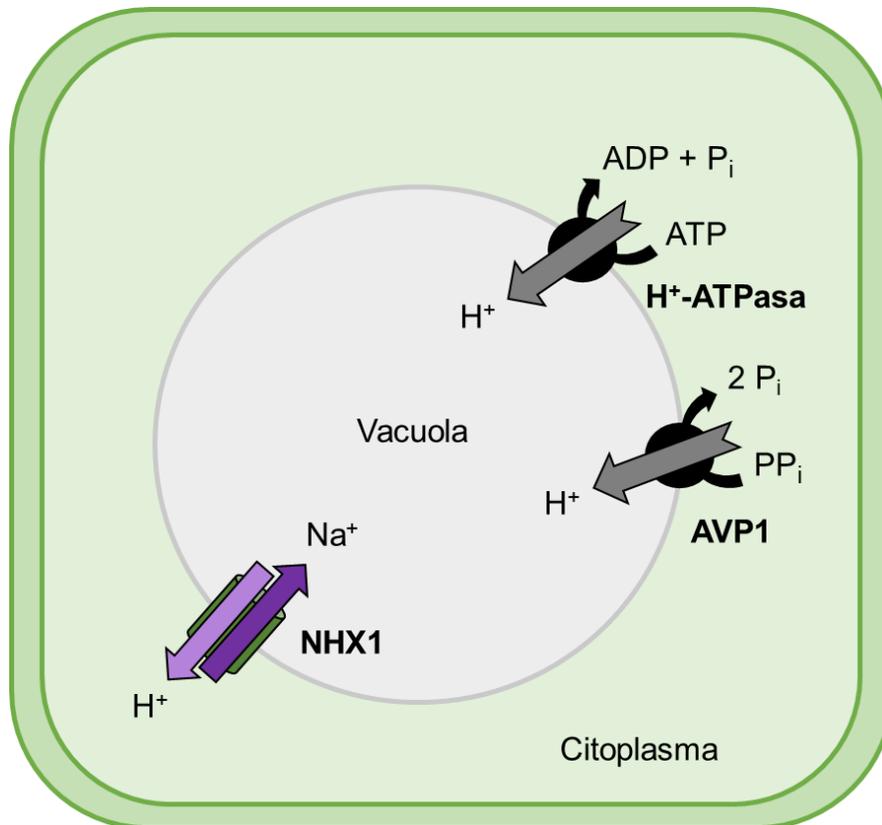


Figura 3. Representación esquemática de la compartimentalización de sodio en células vegetales bajo estrés salino. Los iones de Na⁺ que ingresan a la célula se transportan hacia la vacuola por la acción del antiporter NHX1 del tonoplasto, que utiliza los gradientes de H⁺ generados por la H⁺-ATPasa y la H⁺-PPasa (AVP1) vacuolar. *Modificado del original publicado en Yamaguchi & Blumwald (2005).*

El gen que codifica para el antiporter NHX1 es considerado de suma importancia en la tolerancia a la salinidad. Se ha demostrado en numerosas especies de trascendencia económica, como maíz, alfalfa y cebada, un incremento de su expresión en condiciones salinas (Adem *et al.*, 2014; Sandhu *et al.*, 2017; Zörb *et al.*, 2005). Además, su expresión constitutiva mejora la tolerancia a la salinidad en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (Apse *et al.*, 1999) y de numerosas especies glicófitas de interés agropecuario (Agarwal *et al.*, 2012).

Al igual que el gen *NHX1*, los genes que codifican para las enzimas V-ATPasas y V-PPasas también incrementan su expresión en condiciones salinas (Du *et al.*, 2010; Krishnamurthy *et al.*, 2014; Pang *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2015). Se ha

encontrado que la sobreexpresión del gen *NHX1* (Apse *et al.*, 1999; Brini *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2004) o de *AVP1* (V-PPasa vacuolar de tipo I) (Gaxiola *et al.*, 2001; Undurraga *et al.*, 2012) aumenta la tolerancia a la salinidad de numerosas especies de plantas. Los *knockouts* de las bombas de H⁺ como de las proteínas NHX1 tienen fenotipos sensibles a la salinidad (Krebs *et al.*, 2010).

Además de los mecanismos anteriormente mencionados, las plantas emplean otras estrategias que contribuyen a la tolerancia, como la acumulación de K⁺ en el citoplasma para mejorar la relación K⁺/Na⁺, la compartimentalización de Cl⁻ en las vacuolas, y la detoxificación de ROS (Munns & Tester, 2008).

Importancia de *Lotus tenuis* como especie forrajera

Lotus tenuis (Waldst. & Kit. ex Willd) conocida vulgarmente como “lotus”, “trébol pata de pájaro” o “lotus de hoja angosta”, es una leguminosa perenne, herbácea, alógama y diploide (2n=2x=12), originaria de Europa (Falistocco & Piccirilli, 1989; Miñón *et al.*, 1990; Vignolio *et al.*, 2002). Fue introducida en Argentina en el siglo XX y está naturalizada en los ambientes pastoriles de la Pampa Deprimida donde se resiembra de forma natural (Miñón *et al.*, 1990).

Desde el punto de vista botánico, *L. tenuis* presenta un crecimiento postrado cuando no compite por luz; en cambio, sus tallos adquieren porte erecto cuando está asociada a pastizales altos. Las hojas están formadas por cinco folíolos lanceolados, dos en la base del pecíolo y tres en la parte terminal (Figura 4). La raíz es pivotante, muy ramificada en los primeros centímetros del suelo, y se caracteriza por la presencia de nódulos producidos por la infección de bacterias nitrificantes (Miñón *et al.*, 1990). La floración es indeterminada, comienza en primavera y se extiende hasta fines del verano. Las flores son amarillas y se agrupan de 1 a 6 en inflorescencias (Colombet, 2017; Miñón *et al.*, 1990). La fecundación es cruzada y entomófila, y presenta autoincompatibilidad (Lundqvist, 1993). Los frutos son vainas de color castaño oscuro, que se abren con violencia a la madurez, diseminando entre 12 y 16 semillas, en promedio (Lambrechtsen *et*

al., 1986; Miñón *et al.*, 1990; Vignolio *et al.*, 2002). Éstas son pequeñas, lisas y de color marrón con un alto porcentaje de dormición física (dureza), por lo que no germinan inmediatamente y constituyen el banco de semillas del suelo (Colombet, 2017; Miñón *et al.*, 1990).



Figura 4. Ilustración botánica de la especie *Lotus tenuis* (Watson & Dallwitz, 1992).

L. tenuis es una especie tolerante a la salinidad y al anegamiento, que puede crecer en un rango de pH de entre 5,5 y 9,8 (Vignolio *et al.*, 1994; Vignolio & Fernández, 2006), y desarrollarse en suelos con bajo contenido de fósforo. Además, dada su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, es una importante fuente de macronutrientes para el suelo. Todas estas propiedades determinan una alta plasticidad fenotípica respecto a sus requerimientos edáficos, que la convierten en una buena alternativa para la oferta forrajera de los sistemas ganaderos en áreas donde predominan gramíneas de bajo valor nutricional y no prosperan especies leguminosas más importantes como la alfalfa (Clua *et al.*, 1997; Quinos *et al.*, 1998; Teakle, 2008). Hoy en día, *L. tenuis* es una leguminosa de relevancia para la ganadería en la Cuenca del Río Salado (Affinito *et al.*, 2015).

Tolerancia a la salinidad en *Lotus tenuis*

Lotus tenuis es considerada una especie tolerante a la salinidad en estadios de germinación, plántula y planta adulta (Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011; Teakle *et al.*, 2007; Uchiya *et al.*, 2016). Se ha encontrado un mayor crecimiento en plantas de *L. tenuis* en 50 mM de NaCl respecto a un control no salino (Uchiya *et al.*, 2016), lo que sugiere que, aunque se la considere una glicófita (Sanchez, Pieckenstain, Escaray, *et al.*, 2011; Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011), esta especie muestra con comportamiento halófito facultativo (Melečková *et al.*, 2014).

Los mecanismos involucrados en la respuesta de *L. tenuis* al estrés salino no están totalmente dilucidados, aunque se hallaron indicios de la presencia de ajuste osmótico (Pesqueira, 2008) y exclusión de iones Na⁺ y/o Cl⁻ en condiciones salinas (Affinito, 2020; Pesqueira, 2008; Teakle *et al.*, 2006, 2007) y en condiciones combinadas de anegamiento y salinidad (Teakle *et al.*, 2006, 2007). También se encontró un alto contenido de Na⁺ y Cl⁻ en tallos, lo cual indicaría una reducción de 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 (Affinito, 2020; Pesqueira, 2008; Teakle *et al.*, 2010).

L. tenuis es más tolerante a la salinidad que otras especies del género *Lotus* (Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011; Uchiya *et al.*, 2016). Si bien la producción de biomasa de la especie suele disminuir en condiciones salinas, los porcentajes de supervivencia y crecimiento de las plantas son mayores que en otras especies (Sanchez, Pieckenstain, Escaray, *et al.*, 2011; Sanchez, Pieckenstain, Szymanski, *et al.*, 2011; Teakle *et al.*, 2006, 2007; Uchiya *et al.*, 2016). En trabajos previos se ha comparado la tolerancia a la salinidad y a la combinación de salinidad y anegamiento de *L. tenuis* y *L. corniculatus* (Teakle *et al.*, 2006, 2007; Teakle, 2008; Teakle *et al.*, 2010), dos especies relacionadas y reconocidas mundialmente por su valor forrajero para el ganado (Escaray *et al.*, 2012). Se encontró una mayor tolerancia en *L. tenuis* que se asoció a una menor

carga de Na⁺ y Cl⁻ en el xilema, lo que contribuiría a un menor transporte de estos iones a la parte aérea, y a una mayor porosidad radicular debido a la formación constitutiva de aerénquima (Teakle *et al.*, 2007). En *L. tenuis* estos iones se acumularon en mayor medida en las raíces. Se planteó por un lado que la restricción en el transporte del Cl⁻ de raíz a parte aérea ocurriría gracias a los transportadores CCC, ya que se observó un incremento de los transcritos del gen *LtCCC* en raíces bajo estrés salino (Teakle 2008). Por otro lado, se presumió que el Na⁺ se secuestró en las vacuolas de las raíces a través del antiporter NHX1. En base a estos resultados, Teakle *et al.* (2010) clonaron un gen del tipo NHX de *L. tenuis* (*LtNHX1*, GenBank: EU727217.1) que fue indicado en base a características moleculares y a su caracterización funcional en levaduras, como un auténtico antiporter vacuolar de tipo 1. Se comparó la expresión de *NHX1* en *L. tenuis* y *L. corniculatus* confirmando el aumento de transcritos 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 *et al.*, 2010). Se especuló que en *L. corniculatus*, el déficit de O₂ en las raíces tendría por consecuencia la disminución en el contenido de ATP y, por lo tanto, impediría la actividad de las H⁺-ATPasas y pirofosfatasas, disminuyendo los gradientes de H⁺ a través de la membrana vacuolar, necesarios para el transporte activo de Na⁺ mediante el antiporter NHX1 en el proceso de compartimentalización. Esto no ocurriría en *L. tenuis* debido a que su mayor proporción de aerénquima en las raíces permitiría mantener el suministro de O₂ y esto contribuiría en su tolerancia al estrés combinado (Teakle *et al.*, 2007).

Además, en un estudio comparativo entre dos genotipos de *L. tenuis* con comportamiento contrastante frente a la salinidad, se encontró que el genotipo tolerante presentó mayor acumulación de Na⁺ en raíces que el genotipo susceptible acompañado de una mayor expresión del gen *NHX1*, lo cual podría indicar una mayor compartimentalización de iones en las vacuolas radiculares (Affinito, 2020). Posteriormente, Affinito *et al.* (2021) estudiaron 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*, corroborando que se trata de un antiporter NHX del grupo I, ubicado en la membrana vacuolar. Asimismo, la sobreexpresión de *LtNHX1* incrementó la tolerancia a la salinidad en etapa vegetativa de una línea transgénica de *L. tenuis* (Affinito *et al.*, 2021).

En el presente trabajo se propuso demostrar que la expresión constitutiva de *LtNHX1* incrementa la tolerancia a la salinidad de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. El conocimiento de la funcionalidad del gen *LtNHX1* permitirá, a largo plazo, desarrollar estrategias para la obtención de cultivares tolerantes a estrés salino de *L. tenuis* y otras especies.

Hipótesis

La expresión constitutiva de la región codificante del gen del antiporter vacuolar *LtNHX1* de *Lotus tenuis* incrementa la tolerancia a salinidad de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar los cambios en la tolerancia a la salinidad de *Arabidopsis thaliana* a través de la expresión constitutiva de la región codificante del gen *NHX1* de *Lotus tenuis* (*LtNHX1*).

Objetivos específicos

- Transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* mediante el método de inmersión floral (*floral dip*) mediado por *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción que contiene la región codificante del gen *LtNHX1* bajo el control transcripcional del promotor constitutivo CaMV35S.

- Detectar plantas transgénicas portadoras de la construcción.
- Determinar la expresión del transcripto *LtNHX1* en los eventos transgénicos.
- Evaluar el comportamiento de las plantas transgénicas de *A. thaliana* en condiciones salinas en comparación a un testigo no transgénico.

Materiales y Métodos

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Pergamino de INTA (EEA INTA Pergamino).

Plásmido de interés: 35S:cMyc-LtNHX1

La construcción utilizada en el presente trabajo para realizar la transformación de *A. thaliana*, se obtuvo previamente por el grupo de trabajo de la UI UNNOBA-INTA (Affinito, 2020) mediante el subclonado de la secuencia codificante de *LtNHX1* sin el codón de inicio de la transcripción en el vector pEarleyGate203 (Earley *et al.*, 2006). El mismo 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 fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) como marcador selectivo, que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio. Con esta construcción (35S:cMyc-LtNHX1, Figura 5) se transformaron células competentes de *A. tumefaciens* cepa GV3101 (Affinito, 2020).

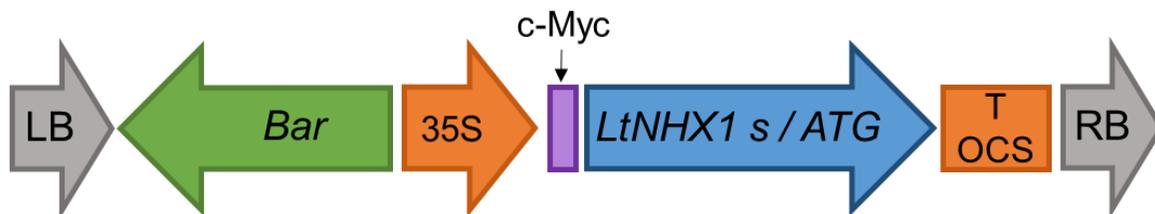


Figura 5. Vector de expresión 35S:cMyc-LtNHX1. *Bar*: gen marcador selectivo que codifica para la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) y genera resistencia al herbicida glufosinato de amonio; *c-Myc*: epítipo (tag); *LtNHX1 s/ATG*: gen de interés; *35S*: promotor CaMV35S; *T OCS*: terminador; *LB*: borde izquierdo; *RB*: borde derecho. Ilustración adaptada de Affinito (2020).

Transformación de *A. thaliana* con el vector 35S:cMyc-LtNHX1 mediante inmersión floral

Se realizó la transformación de *Arabidopsis thaliana* utilizando el método de inmersión floral descrito por Clough & Bent (1998) con modificaciones. Para esto, se sembraron semillas de *A. thaliana* ecotipo Col 0 en macetas individuales usando como sustrato GrowMix® Multipro™ (Terrafertil, Argentina). Se estratificaron durante dos días a 4 °C en oscuridad. Luego de la germinación, se dejaron crecer durante cinco semanas en cámara de cultivo a 22 °C con fotoperiodo corto de 8 hs de luz, favoreciendo el crecimiento vegetativo. Posteriormente, las plantas se pasaron a fotoperiodo largo de 16 hs de luz para favorecer la floración. Al aparecer la primera vara floral se realizó la poda al ras para facilitar la proliferación de las varas axilares. Cuando las inflorescencias secundarias presentaron aproximadamente 8 cm se realizó la infiltración con *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 portadora de la construcción 35S:cMyc-LtNHX1. 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 el cultivo se incubó 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 y 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 el *pellet* se resuspendió en 200 ml de sacarosa 5 % p/v, con adición del tensoactivo Tween 20 0,05 % v/v. Las varas florales se sumergieron en la solución durante 60 seg. Las plantas se dejaron en cámara húmeda hasta el día siguiente. Posteriormente, las plantas se dejaron crecer en cámara de cultivo hasta su cosecha (Figura 6).

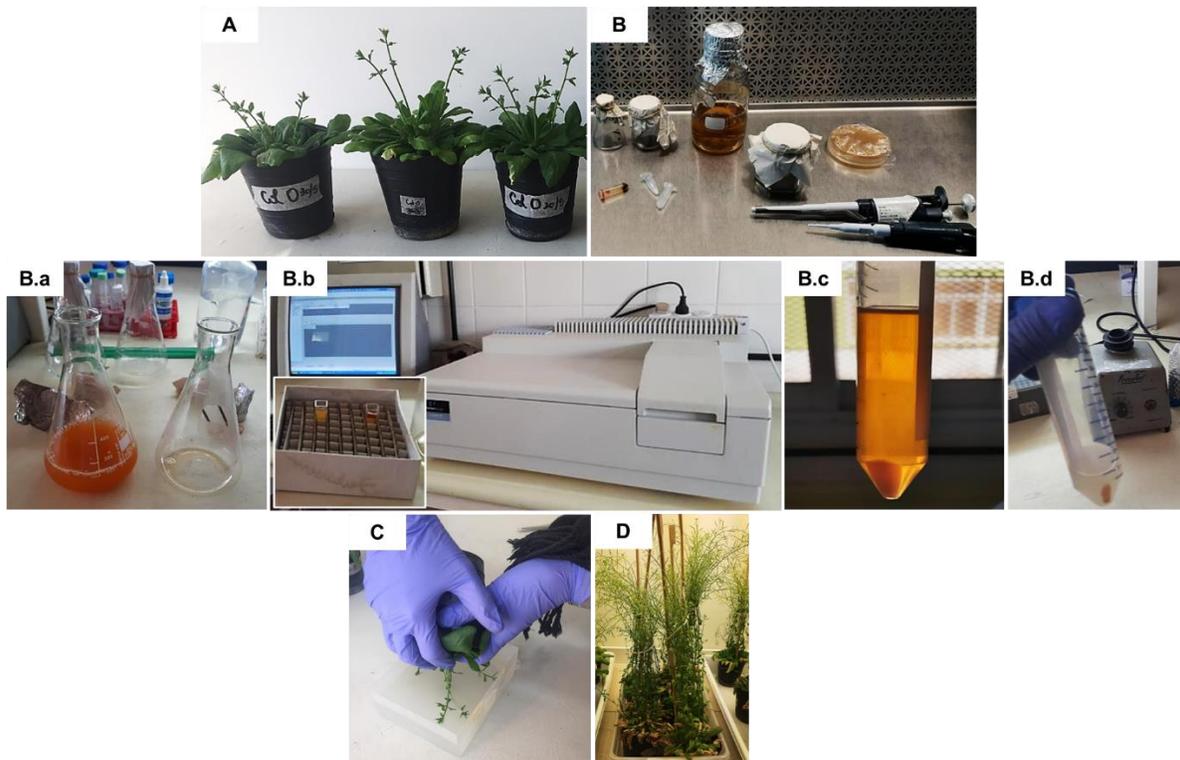


Figura 6. Transformación de *A. thaliana* mediante el método de inmersión floral. **A:** plantas de *A. thaliana* ecotipo Col 0 con inflorescencias secundarias de aproximadamente 8 cm de largo. **B:** preparación del cultivo de *A. tumefaciens* cepa GV3101. **B.a:** cultivo de *A. tumefaciens* portador del plásmido de interés con los antibióticos correspondientes. **B.b:** determinación de la densidad óptica del cultivo. **B.c:** bacterias del cultivo precipitadas por centrifugación. **B.d:** *pellet* resuspendido en sacarosa 5 % p/v, con adición del tensoactivo Tween 20 0,05 % v/v. **C:** inmersión floral. **D:** plantas mantenidas en cámara de cultivo para la cosecha.

Detección de plantas transgénicas

Se seleccionaron las plántulas que expresaron el gen *bar*, codificante de la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT), que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio y que es el marcador de selección presente en la construcción 35S:cMyc-LtNHX1. Para esto, se sembraron las semillas cosechadas de las plantas transformadas (generación T0) en macetas con sustrato GrowMix® Multipro™ (Terrafertil, Argentina), con dos repeticiones (macetas) por genotipo. Se estratificaron durante dos días a 4 °C en oscuridad y se colocaron en cámara de cultivo con fotoperiodo corto de 8 hs de luz. A los ocho días de la siembra,

comenzaron a rociarse con 250 ppm de glufosinato de amonio, repitiendo el procedimiento dos veces por semana durante tres semanas. Se seleccionaron aquellas plántulas que resistieron al herbicida (Figura 7) y se trasladaron a macetas individuales. Las plantas resistentes fueron analizadas mediante PCR utilizando cebadores específicos para el transgén (Tabla 1).

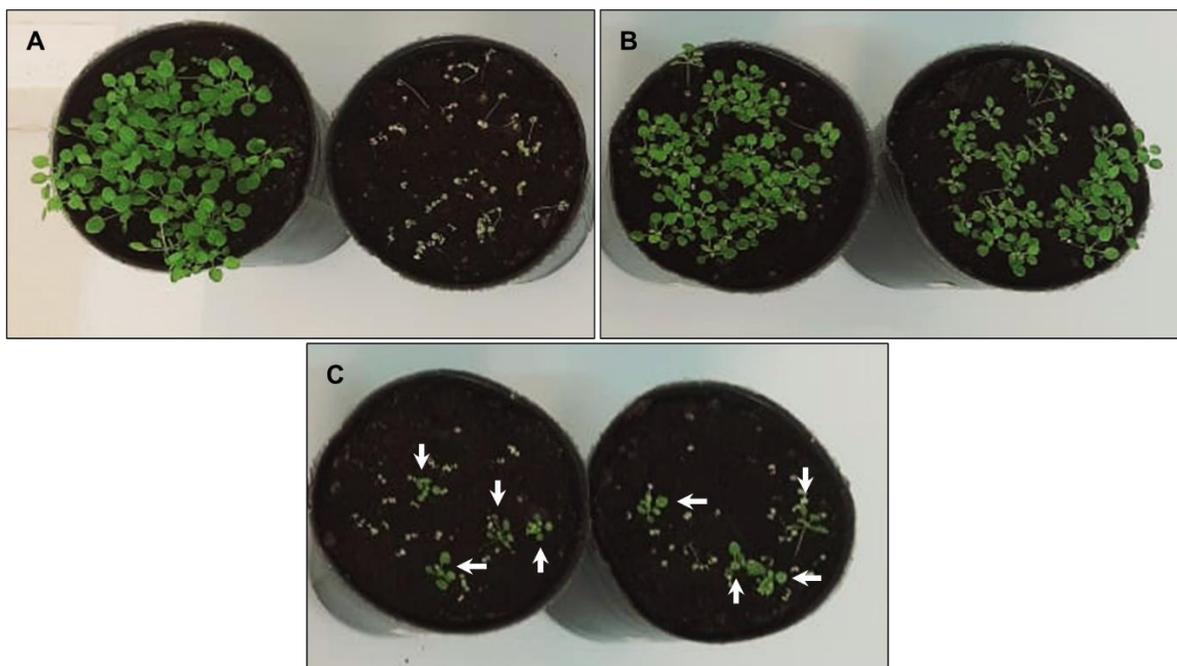


Figura 7. Selección mediante aspersión con 250 ppm del herbicida glufosinato de amonio en plántulas de *A. thaliana*. **A:** control: plántulas *wild-type* sin aplicación de herbicida (maceta izquierda) y con aplicación (maceta derecha, ninguna plántula sobreviviente). **B:** genotipo resistente al herbicida. **C:** genotipo muy afectado por el herbicida (las flechas blancas indican las plántulas sobrevivientes).

Tabla 1. 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 (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)
35SF NHXR3	GACGTAAGGGATGACGCACAA GTGGACCAACATCCATCCACT	56	671

Las extracciones de ADN genómico se realizaron a partir de 30 mg de tejido fresco, proveniente de seis plantas distintas de cada genotipo, 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. Se verificó la integridad del ADN extraído en gel de agarosa 0,8 %, teñido con bromuro de etidio (0,5 g/ml), y se estimó su concentración utilizando un patrón de peso molecular conocido.

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 5 U/µl (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 56 °C (T_m) 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).

Las plantas T0 se cosecharon individualmente y se analizó la segregación de la resistencia a glufosinato de amonio en las progenies T1 y T2 mediante el test Chi cuadrado en el *software* estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020), y se seleccionaron las plantas homocigotas. Estas progenies fueron consideradas líneas portadoras del evento de transformación y se evaluó su comportamiento frente a condiciones salinas.

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. 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). 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 que se detallan en la tabla 2. El gen *SEC-5A*, que codifica para el componente sec5 del complejo exocitosis en *A. thaliana*, se utilizó como control de amplificación.

Tabla 2. Cebadores utilizados en el análisis de la expresión de *LtNHX1* en plantas transgénicas de *A. thaliana*. 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)
<i>SEC-5A</i>	SEC-5AF	GAGACCCCAGGGCATAATCG	58	100
	SEC-5AR	TCGTTAGAGCGAGGAGGTCA		
<i>LtNHX1</i>	NHXF2	TAGTGGTGGTACAAGCTCGC	56	99
	NHXR2	TTTCACCTGAAACCCGGCAT		

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

Evaluación de la tolerancia a la salinidad de las plantas transgénicas en etapa vegetativa

Seis genotipos de *A. thaliana* (cinco transgénicos y el *wild-type*) se sembraron en macetas con sustrato GrowMix® Multipro™ (Terrafertil, Argentina) y se estratificaron durante dos días a 4 °C. Luego, se colocaron en cámara de cultivo a temperatura constante de 22 °C con fotoperiodo corto de 8 hs de luz. Cuando las plántulas alcanzaron aproximadamente 3,5 cm de diámetro se aplicaron tres tratamientos salinos en un diseño completamente aleatorizado (DCA): 0 (control), 50 y 100 mM NaCl (Figura 8). Cada genotipo estuvo representado por cuatro plantas en cada tratamiento. La concentración final de NaCl se adicionó a la solución nutritiva de riego Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) y las plántulas se regaron por capilaridad durante 28 días, sin realizar aclimatación al estrés. Luego se dio por finalizado el ensayo y se evaluó diámetro de planta (D, cm), peso fresco aéreo (PFA, mg), peso seco aéreo (PSA, mg), peso seco radicular (PSR, mg) y la suma de PSA y PSR (PSTotal, mg) y se estimaron los índices de tolerancia del diámetro y del peso seco aéreo (ITD e ITPSA) a partir de la relación entre el valor de las plantas regadas con NaCl y el promedio del control. Además, se determinó el contenido de Na⁺ y K⁺ (μMoles g⁻¹ peso seco) en muestras de hoja y raíz previamente secadas a 60 °C de cuatro repeticiones por línea y tratamiento. También se calculó la relación K⁺/Na⁺ en estos tejidos y se estimaron los índices de tolerancia del Na⁺ y del K⁺ (ITNa⁺ e ITK⁺) como se mencionó anteriormente. Las determinaciones de los contenidos de iones se realizaron con un fotómetro de llama Corning M410. Para esto, se adicionó 10 ml de HNO₃ 0,5 M a aproximadamente 100 mg de cada tejido, cuyos pesos exactos fueron registrados, y se incubaron a 80 °C durante una hora (Munns *et al.*, 2010).

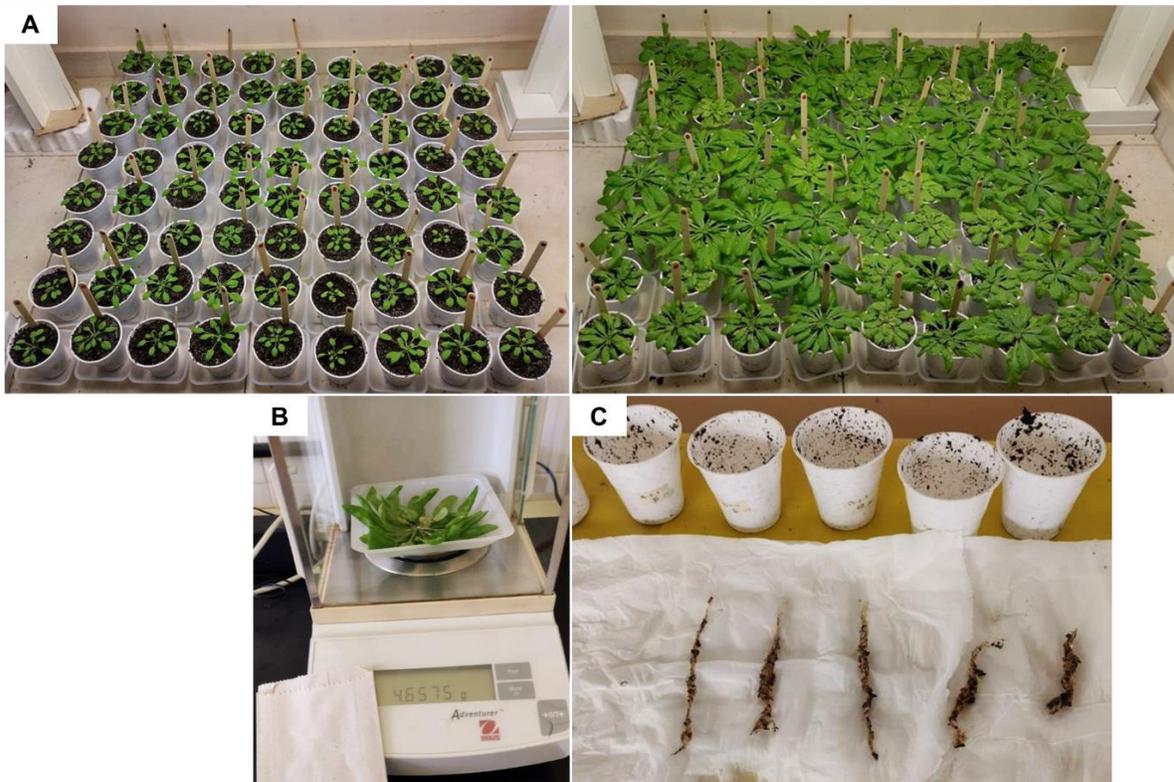


Figura 8. Ensayo de tolerancia a la salinidad de plantas de *A. thaliana* en etapa vegetativa. A: plantas transgénicas y *wild-type* en cámara de cultivo bajo los tres tratamientos salinos: 0, 50 y 100 mM NaCl. *Izquierda:* plantas a los 10 días de iniciado el ensayo. *Derecha:* plantas al finalizar el ensayo. **B:** medición del peso fresco aéreo (PFA). **C:** raíces preparadas para ser secadas para la determinación del peso seco radicular (PSR).

Evaluación de la tolerancia a la salinidad de las plantas transgénicas en fase de germinación

En este ensayo se trabajó con tres de las líneas transgénicas de *A. thaliana* con expresión constitutiva de *LtNHX1* debido a la disponibilidad de semillas. Se comparó la germinación de la generación T3 de las líneas transgénicas con la de la línea *wild-type* (Col 0) bajo distintas concentraciones de NaCl: 0 (control), 50, 100 y 150 mM (Figura 9). Para esto, las semillas de los genotipos se esterilizaron según lo indicado por Zhang *et al.* (2006) y se sembraron en placas de Petri con medio MS (Murashige & Skoog, 1962) 0,5 % con adición de agar y NaCl en la concentración indicada para cada tratamiento. Se estratificaron durante dos días a

4 °C. Luego, se colocaron en cámara de cultivo a 22 °C con fotoperiodo de 16 hs de luz. El ensayo presentó un diseño completamente aleatorizado (DCA) con dos repeticiones (placas) de cada genotipo por tratamiento. Se realizó el recuento de semillas germinadas en forma periódica, considerándolas como tal cuando se visualizó una radícula de 2 mm o más (Bewley, 1997). Se determinó el porcentaje de germinación (PG) respecto a las semillas sembradas al inicio del ensayo:

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

Además, 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, 11 días. El IG es máximo si todas las semillas germinan en un día, y es 0 si ninguna semilla germina. En este ensayo el valor máximo que podía tomar el IG fue 36,4 (400/11= 36,4) debido a que se realizaron 4 recuentos.

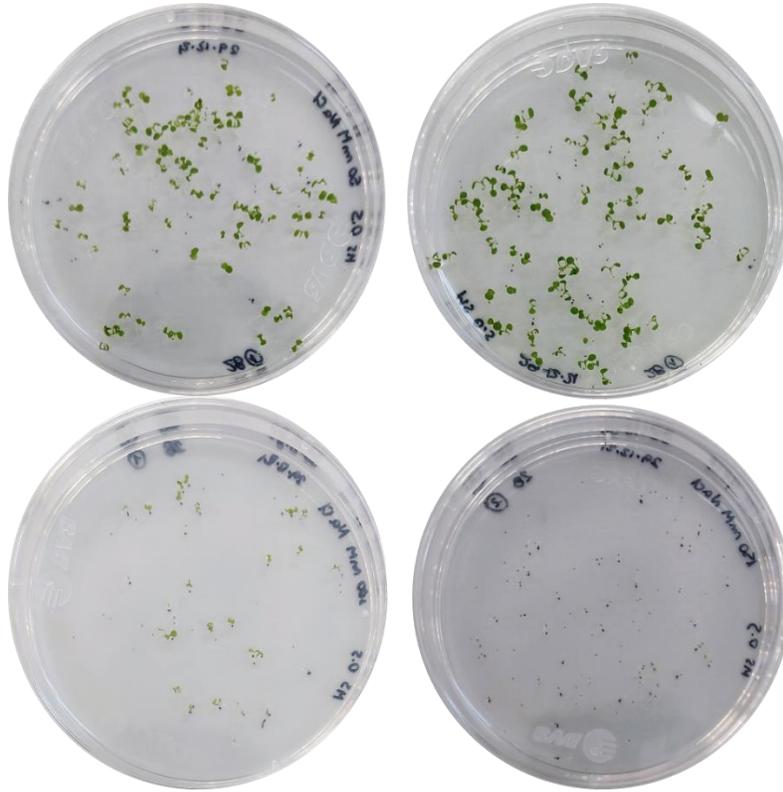


Figura 9. Ensayo de tolerancia a la salinidad de plántulas de *A. thaliana* en fase de germinación. Línea transgénica bajo las distintas concentraciones de NaCl: 0, 50, 100 y 150 mM luego de seis días de ensayo.

Análisis de la información

Se utilizó el software InfoStat en su interfaz con R (Di Rienzo *et al.*, 2020). 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).

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.

Resultados

Se logró la transformación de plantas de *A. thaliana* mediante el método de inmersión floral con *A. tumefaciens* portador del plásmido de interés. Las plantas transformadas se cosecharon y su progenie constituyó la generación T0, que fue seleccionada mediante la aspersión con glufosinato de amonio. Posteriormente, a través de una PCR se corroboró la presencia del transgén en el ADN genómico de las mismas (Figura 10).

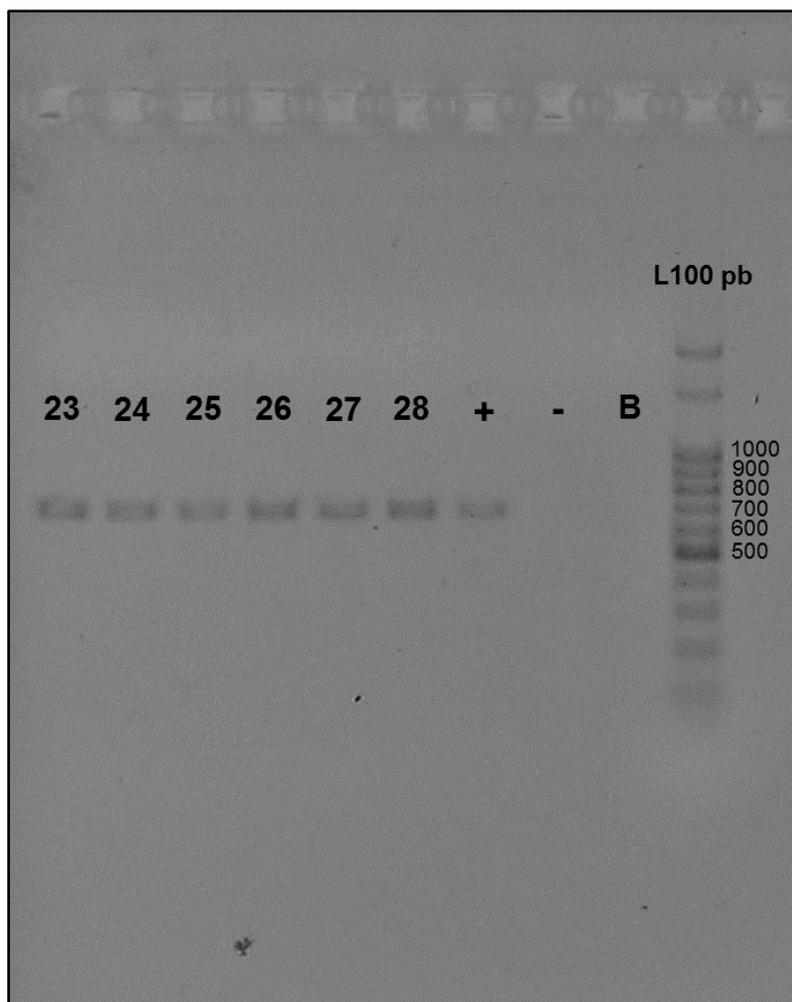


Figura 10. Productos de amplificación con cebadores específicos para la construcción 35S:cMyc-LtNHX1 en gel de agarosa (0,8 %) de plantas T0 seleccionadas por su resistencia al herbicida. La banda de 671 pb indica la presencia del transgén. \pm : control negativo (ADN de planta *wild-type*). \pm : control positivo. B: blanco (reacción de PCR sin ADN). L100 pb: marcador de peso molecular Ladder 100pb (PB-L, Argentina).

Las plantas T0 23, 24, 25, 26, 27 y 28 se mantuvieron en cámara de crecimiento hasta la cosecha. Las semillas colectadas constituyeron la progenie T1 de cada T0. Se sembraron y se aplicó la misma metodología de selección con glufosinato de amonio. Se realizó PCR de 19 plantas T1 resistentes al herbicida, de las cuales 18 resultaron positivas para la presencia del transgén (Figura 11).

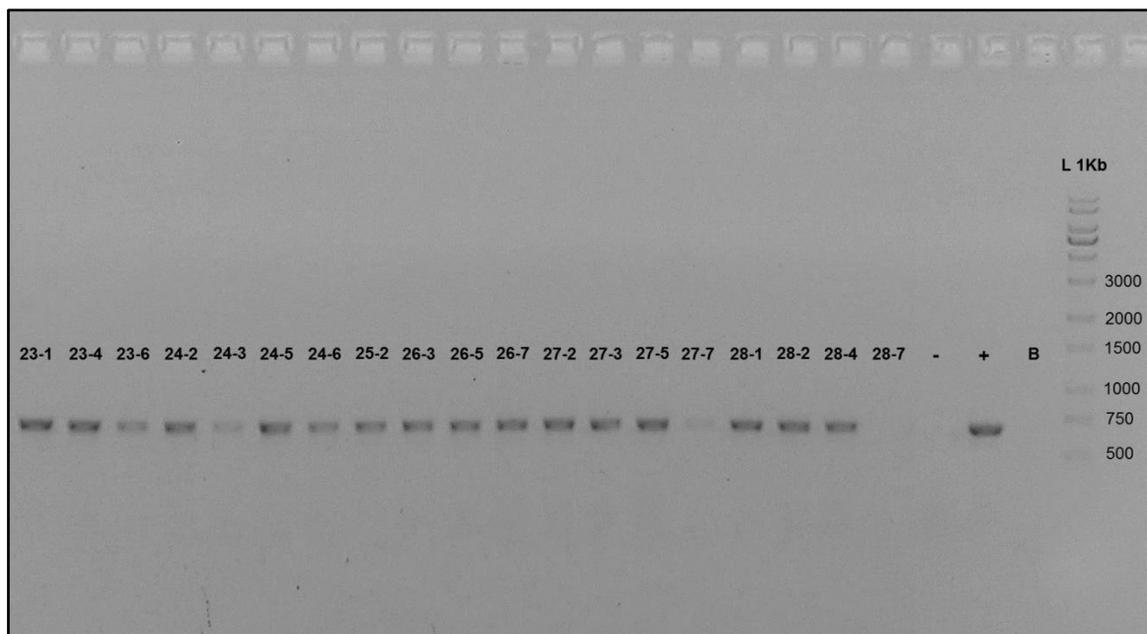


Figura 11. Productos de amplificación con cebadores específicos para la construcción 35S:cMyc-LtNHX1 en gel de agarosa (0,8 %) de plantas T1 seleccionadas por su resistencia al herbicida. La banda de 671 pb indica la presencia del transgén. -: control negativo (ADN de planta *wild-type*). ±: control positivo. B: blanco (reacción de PCR sin ADN). L 1Kb: marcador de peso molecular Ladder 1kpb plus (PB-L, Argentina).

Las plantas transgénicas T0 identificadas inicialmente como 23, 24, 26, 27 y 28 presentaron una segregación 3:1 (Chi-cuadrado $p=0,75$, $p=0,66$, $p=0,10$, $p=0,88$ y $p=0,85$, respectivamente), por lo que se continuó trabajando con su progenie: 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 (23-44, 24-24, 26-31, 27-53 y 28-13, Figura 12).

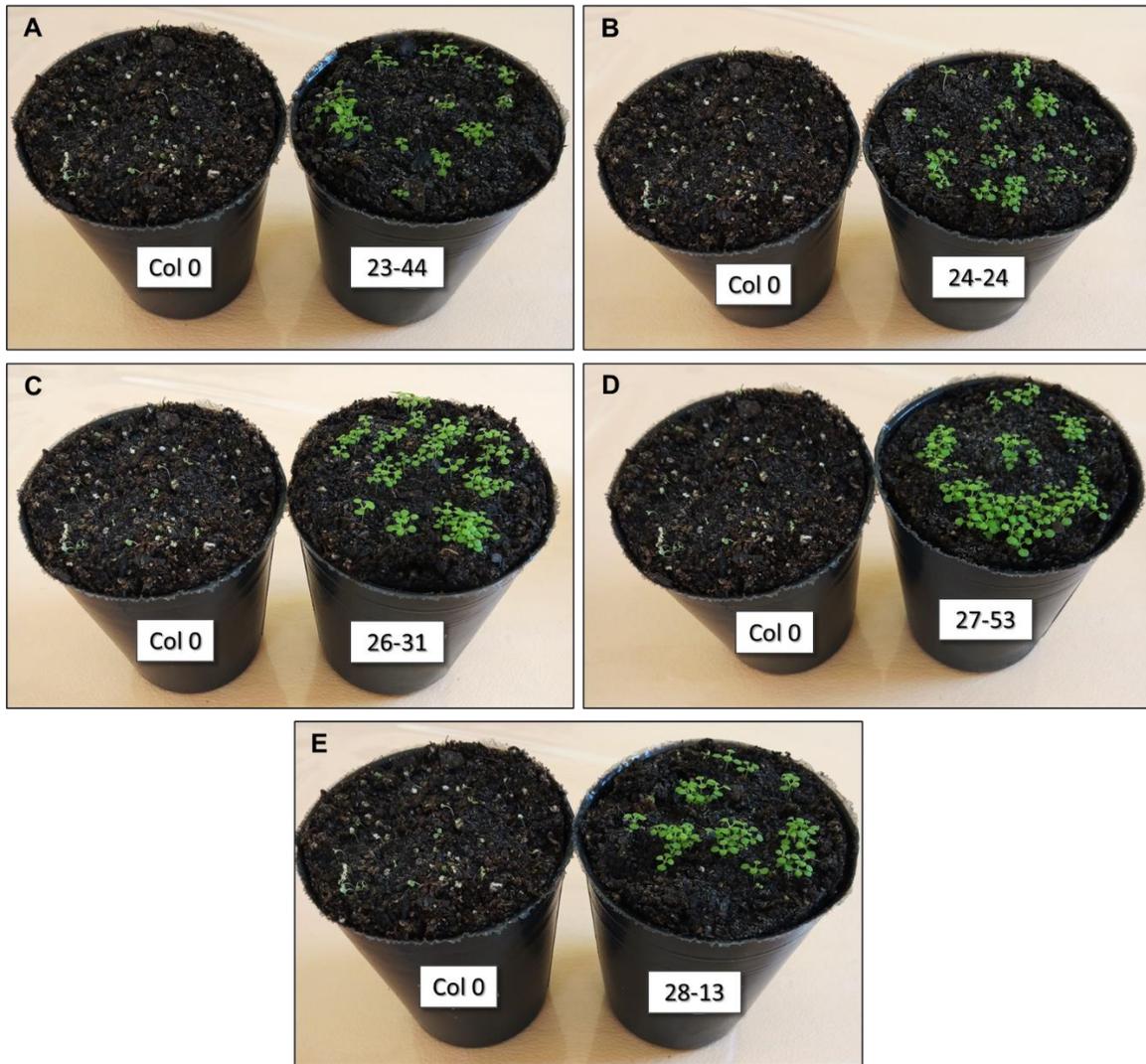


Figura 12. Plantas transgénicas T2 y *wild-type* rociadas con PPT. A-E: maceta izquierda con plántulas Col 0 (control), no sobrevivientes al herbicida; maceta derecha con plántulas transgénicas T2 resistentes al herbicida y homocigotas para *LtNHX1*. **A:** genotipo transgénico 23-44 (deriva de la T1 23-4). **B:** genotipo transgénico 24-24 (deriva de la T1 24-2). **C:** 26-31 (deriva de la T1 26-3). **D:** 27-53 (deriva de la T1 27-5). **E:** 28-13 (deriva de la T1 28-1).

A través de una RT-PCR se determinó la existencia de expresión de *LtNHX1* en plantas transgénicas T2. La presencia de amplificación (99 pb) se observó en el ADNc de los genotipos transgénicos, mientras que el genotipo *wild-type* mostró ausencia de la misma (Figura 13).

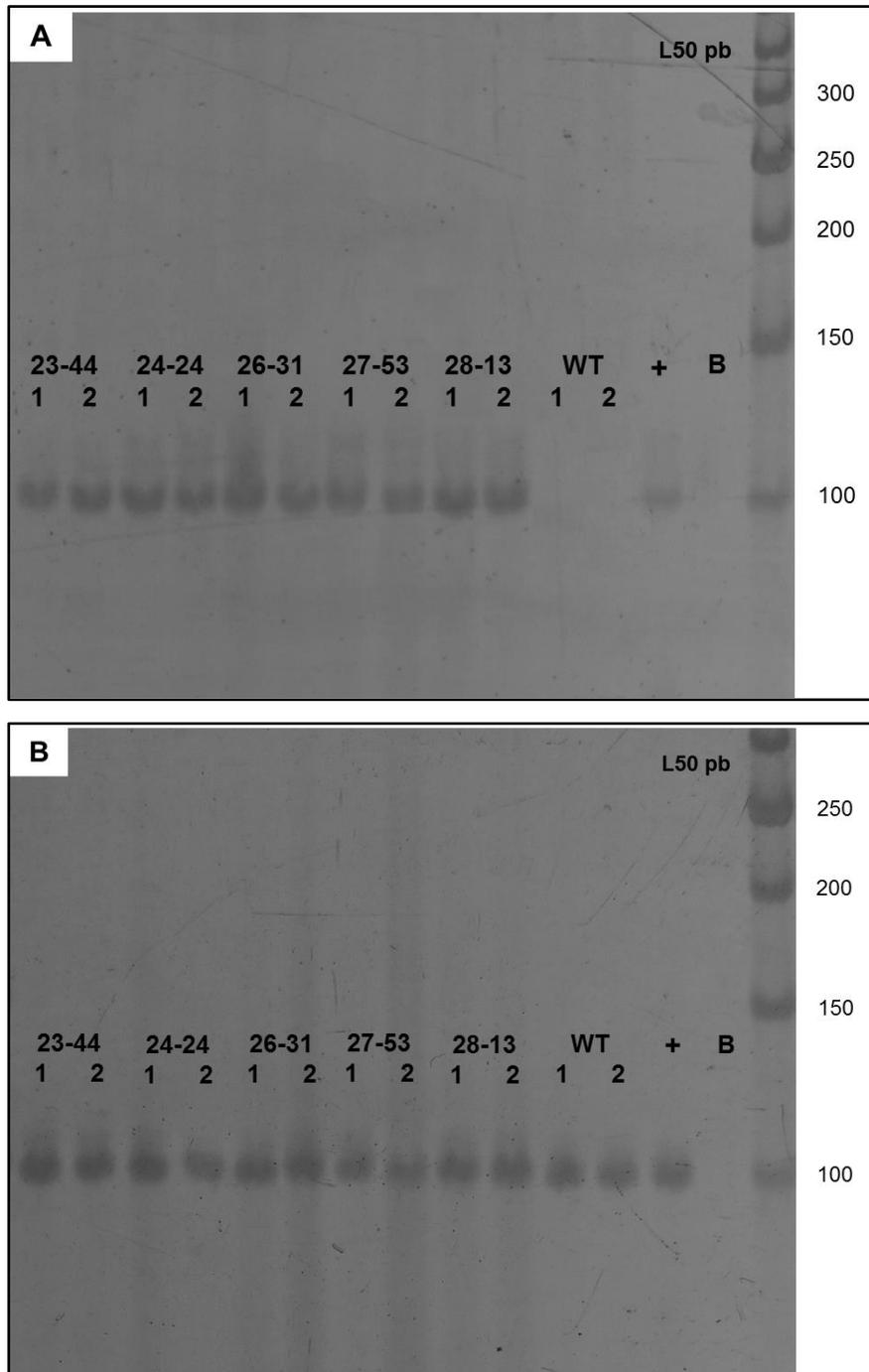


Figura 13. Expresión de *LtNHX1* en plantas transgénicas de *A. thaliana*. **A.** Amplificación de *LtNHX1*. **B.** Amplificación de *SEC-5A*, control de PCR. Gel de agarosa 2 %. L50 pb: marcador de peso molecular Ladder 50pb (PB-L, Argentina). 23-44, 24-24, 26-31, 27-53 y 28-13: líneas transgénicas (dos repeticiones). WT: línea *wild-type* (dos repeticiones). ±: control positivo. B: blanco (reacción de PCR sin ADNc).

Tolerancia a la salinidad de cinco líneas transgénicas de *A. thaliana* en etapa vegetativa

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) para todas las variables en estudio excepto para el índice de tolerancia del K^+ (ITK⁺) estimado en raíz (Tabla 3). En general, la salinidad afectó el crecimiento de las seis líneas analizadas al reducir las medias de las variables morfológicas evaluadas. También provocó un incremento en el contenido de Na^+ en hoja y raíz. Respecto al ion K^+ la salinidad causó una disminución del contenido en hoja y un aumento del contenido en raíz, de modo que se alteró la relación K^+/Na^+ en estos tejidos. Se observaron diferencias significativas entre genotipos en los índices de tolerancia del diámetro (ITD), peso seco aéreo (ITPSA), Na^+ (ITNa⁺) y K^+ (ITK⁺) estimados en raíz. También existió interacción significativa entre genotipo y tratamiento para el contenido de Na^+ ($\mu\text{Moles g}^{-1}$ peso seco) en hoja.

Tabla 3. Comportamiento promedio de las líneas transgénicas 23-44, 24-24, 26-31, 27-53, 28-13 y la línea *wild-type* de *A. thaliana* evaluadas en etapa vegetativa bajo tres concentraciones de NaCl. Media, desvío estándar (D.E.), coeficiente de variación (C.V.), valor máximo y mínimo y p-valor para Genotipo, Tratamiento e Interacción Genotipo*Tratamiento.

Tejido	Variable (unidad)	Media	D.E.	C.V.	Mín.	Máx.	Genotipo p-valor	Tratamiento p-valor	Interacción p-valor
	D (cm)	11,93	2,85	23,87	7,10	17,20	0,1279	<0,0001	0,2494
	PFA (mg)	2,55	1,23	48,43	0,87	5,38	0,2324	<0,0001	0,6379
	PSA (mg)	197,06	79,28	40,23	69,80	391,90	0,1502	<0,0001	0,4578
	PSR (mg)	82,30	49,32	59,93	19,40	248,90	0,241	<0,0001	0,6068
	PST (mg)	279,36	124,25	44,48	91,30	622,20	0,1387	<0,0001	0,5276
Hoja	*Na ⁺	1111,65	935,01	84,11	130,09	4701,20	0,2561	<0,0001	0,0408
Hoja	*K ⁺	1954,56	687,43	35,17	960,51	3528,93	0,2789	<0,0001	0,9803
Hoja	K ⁺ /Na ⁺	4,64	5,09	109,59	0,29	20,89	0,7844	<0,0001	0,5059
Raíz	*Na ⁺	196,81	93,80	47,66	48,37	356,79	0,9662	<0,0001	0,916

Raíz	*K ⁺	278,11	89,42	32,15	93,10	504,15	0,2005	0,0122	0,7209
Raíz	K ⁺ /Na ⁺	1,86	1,23	66,38	0,46	5,59	0,7044	<0,0001	0,8653
	ITD	0,67	0,11	16,79	0,45	0,88	0,0113	<0,0001	0,7888
	ITPSA	0,61	0,22	35,99	0,27	1,16	0,0315	<0,0001	0,9697
Hoja	ITNa ⁺	5,87	3,27	55,64	1,27	15,91	0,3060	<0,0001	0,9028
Hoja	ITK ⁺	0,56	0,13	24,10	0,36	0,86	0,4501	<0,0001	0,8146
Raíz	ITNa ⁺	3,39	0,70	20,75	1,93	5,51	0,0033	0,0013	0,9626
Raíz	ITK ⁺	1,28	0,42	32,62	0,55	2,49	0,0027	0,4179	0,9963

*Unidad: $\mu\text{Moles g}^{-1}$ peso seco. En color gris se indican las variables con diferencias significativas ($p < 0,05$).

La figura 14 muestra que los genotipos transgénicos tuvieron un índice de tolerancia del diámetro similar entre sí y significativamente mayor que el genotipo *wild-type*. Esto mismo se observó para la variable ITPSA, con excepción de la línea 27-53 que tuvo un comportamiento similar a la *wild-type*.

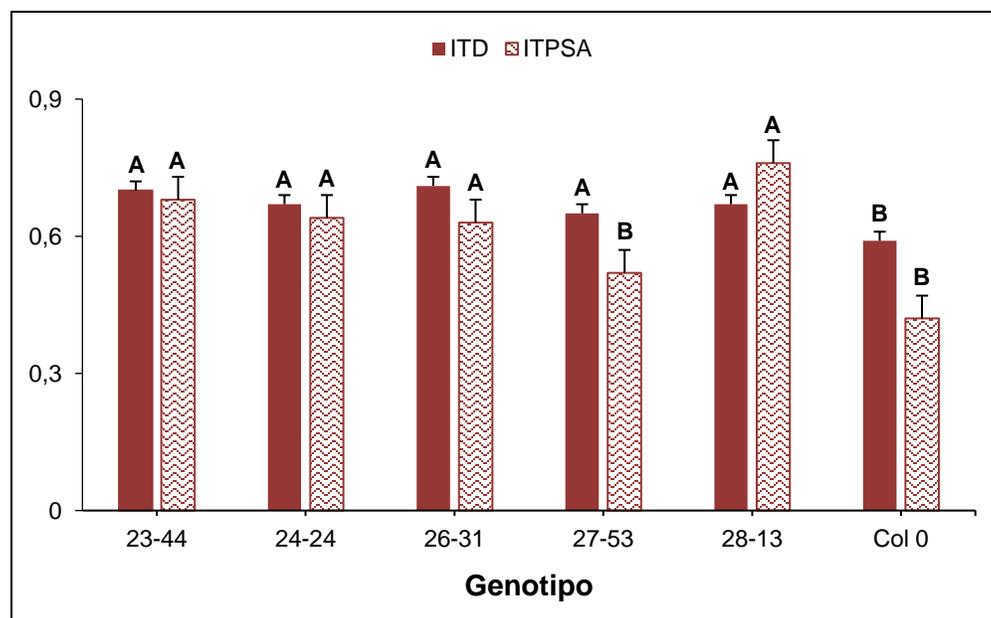


Figura 14. Índices de tolerancia promedio del diámetro (ITD) y del peso seco aéreo (ITPSA) a los 28 días de ensayo de las líneas transgénicas 23-44, 24-24, 26-31, 27-53, 28-13 y la *wild-type* (Col 0) de *A. thaliana*. Las barras indican medias y error estándar. Letras

distintas indican diferencias significativas entre genotipos según la prueba DGC ($p < 0,05$).

Si bien el análisis indicó interacción significativa entre genotipos y tratamientos para el contenido de Na^+ en hojas, no se observaron diferencias entre los genotipos en cada tratamiento (Figura 15). El contenido aumentó progresivamente con el agregado de NaCl tanto en las líneas transgénicas como en la *wild-type*.

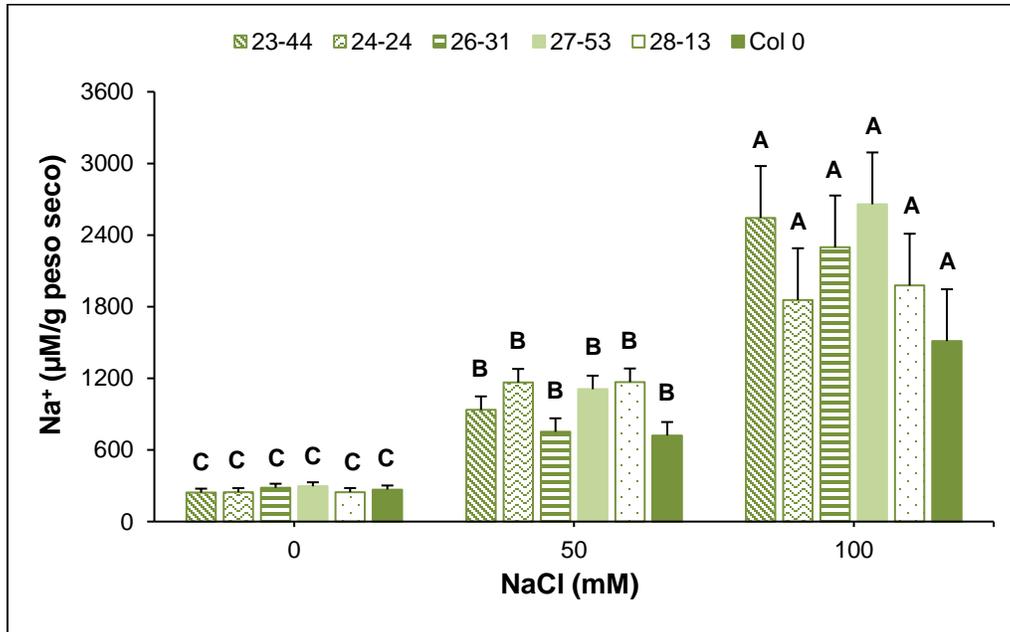


Figura 15. Contenido de Na^+ en hojas de las líneas transgénicas 23-44, 24-24, 26-31, 27-53, 28-13 y la *wild-type* (Col 0) bajo tres concentraciones de NaCl : 0, 50 y 100 mM. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC ($p < 0,05$).

Únicamente la línea transgénica 27-53 se diferenció del resto de los genotipos al presentar mayores índices de tolerancia del Na^+ y del K^+ en raíz (Figura 16). Las demás líneas transgénicas tuvieron un comportamiento similar al de la línea *wild-type* para dichas variables.

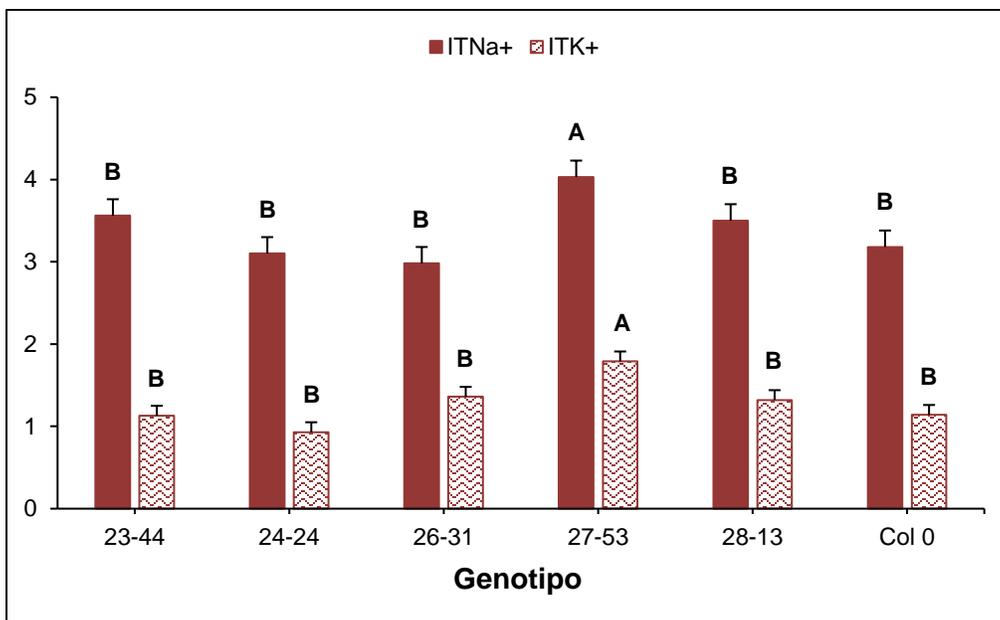


Figura 16. Índices de tolerancia promedio del Na⁺ (ITNa⁺) y del K⁺ (ITK⁺) en raíz de las líneas transgénicas 23-44, 24-24, 26-31, 27-53, 28-13 y la *wild-type* (Col 0). Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos según la prueba DGC ($p < 0,05$).

Debido que en el análisis anterior que incluye a todos los genotipos no se observaron diferencias entre ellos para la mayoría de las variables analizadas, se realizó un nuevo análisis comparativo considerando las variables más importantes entre una línea transgénica y la *wild-type*, disminuyendo de esta manera la cantidad de datos y con ello la variabilidad que influye en la potencia del análisis. Se seleccionó la línea 28-13 ya que fue una de las líneas con mayores medias para gran parte de las variables en estudio, y se comparó con la Col 0. Para el diámetro (D), se observaron diferencias significativas entre genotipos y tratamientos e interacción genotipo*tratamiento (Tabla 4). En el caso del peso seco aéreo (PSA), hubo diferencias entre tratamientos y una tendencia a la existencia de interacción genotipo*tratamiento ($p < 0,1$). También se encontraron diferencias entre genotipos y tratamientos en los índices de tolerancia de ambas variables (ITD e ITPSA). En cuanto al análisis de iones, se encontraron diferencias entre genotipos y tratamientos en el contenido de Na⁺ e índice de tolerancia del Na⁺ (ITNa⁺) en hojas, así como una tendencia a la existencia de interacción

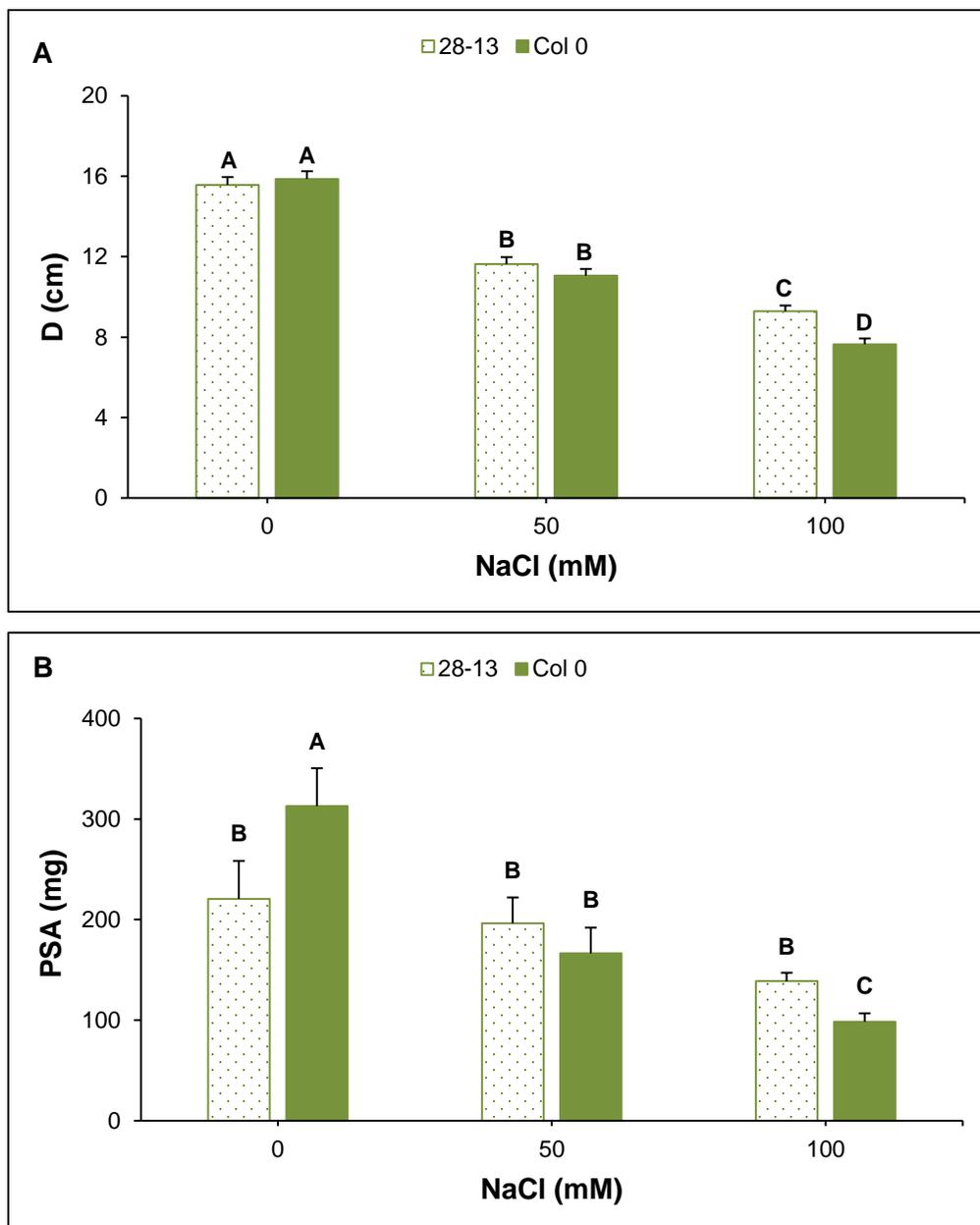
genotipo*tratamiento ($p < 0,1$) en el contenido de Na^+ en hojas. Para el resto de las variables, se hallaron diferencias significativas entre tratamientos, excepto en el contenido de K^+ e índice de tolerancia del K^+ (ITK^+) y Na^+ (ITNa^+) en raíz.

Tabla 4. Comportamiento promedio de la línea transgénica 28-13 y la *wild-type* de *A. thaliana* evaluadas en etapa vegetativa bajo tres concentraciones de NaCl. Media, desvío estándar (D.E.), coeficiente de variación (C.V.), valor máximo y mínimo y p-valor para Genotipo, Tratamiento e Interacción Genotipo*Tratamiento.

Tejido	Variable (unidad)	Media	D.E.	C.V.	Mín.	Máx.	Genotipo p-valor	Tratamiento p-valor	Interacción p-valor
	D (cm)	11,84	3,15	26,59	7,10	17,20	0,0338	<0,0001	0,0318
	PSA (mg)	188,92	83,89	44,41	85,60	391,90	0,7423	<0,0001	0,0773
Hoja	* Na^+	982,42	708,13	72,08	130,09	2293,40	0,0351	<0,0001	0,0584
Hoja	* K^+	1868,89	661,74	35,41	960,51	3183,17	0,4550	<0,0001	0,9767
Hoja	K^+/Na^+	4,93	5,91	120,04	0,46	20,89	0,7297	<0,0001	0,6425
Raíz	* Na^+	201,38	94,07	46,71	61,59	324,64	0,7254	<0,0001	0,7022
Raíz	* K^+	270,83	94,60	34,93	93,10	417,47	0,2068	0,1022	0,8866
Raíz	K^+/Na^+	1,76	1,30	74,29	0,46	5,59	0,4705	0,0006	0,9715
	ITD	0,63	0,11	17,42	0,45	0,78	0,0003	<0,0001	0,1114
	ITPSA	0,59	0,25	42,52	0,27	1,16	<0,0001	0,0073	0,7737
Hoja	ITNa^+	5,27	2,37	45,06	1,94	9,30	0,0226	0,0042	0,9752
Hoja	ITK^+	0,55	0,13	22,96	0,36	0,78	0,6263	0,0357	0,9919
Raíz	ITNa^+	3,34	0,52	15,62	2,55	4,26	0,1066	0,0627	0,9987
Raíz	ITK^+	1,23	0,32	26,07	0,56	1,71	0,3304	0,28	0,9768

*Unidad: $\mu\text{Moles g}^{-1}$ peso seco. En color gris se indican las variables con diferencias significativas ($p < 0,05$).

Si bien el diámetro de ambos genotipos disminuyó en condiciones salinas, en 100 mM NaCl la línea 28-13 presentó mayor diámetro que la Col 0 (Figura 17A, C). En los tratamientos control y 50 mM NaCl, no existieron diferencias significativas entre los genotipos. El peso seco aéreo de la línea 28-13 en condiciones salinas, fue similar al del control y en 100 mM NaCl fue mayor que el de la Col 0 (Figura 17B). En el tratamiento control, la Col 0 presentó mayor PSA que la línea transgénica pero dicho valor disminuyó significativamente con el agregado de NaCl. En 50 mM NaCl no hubo diferencias significativas entre los genotipos.



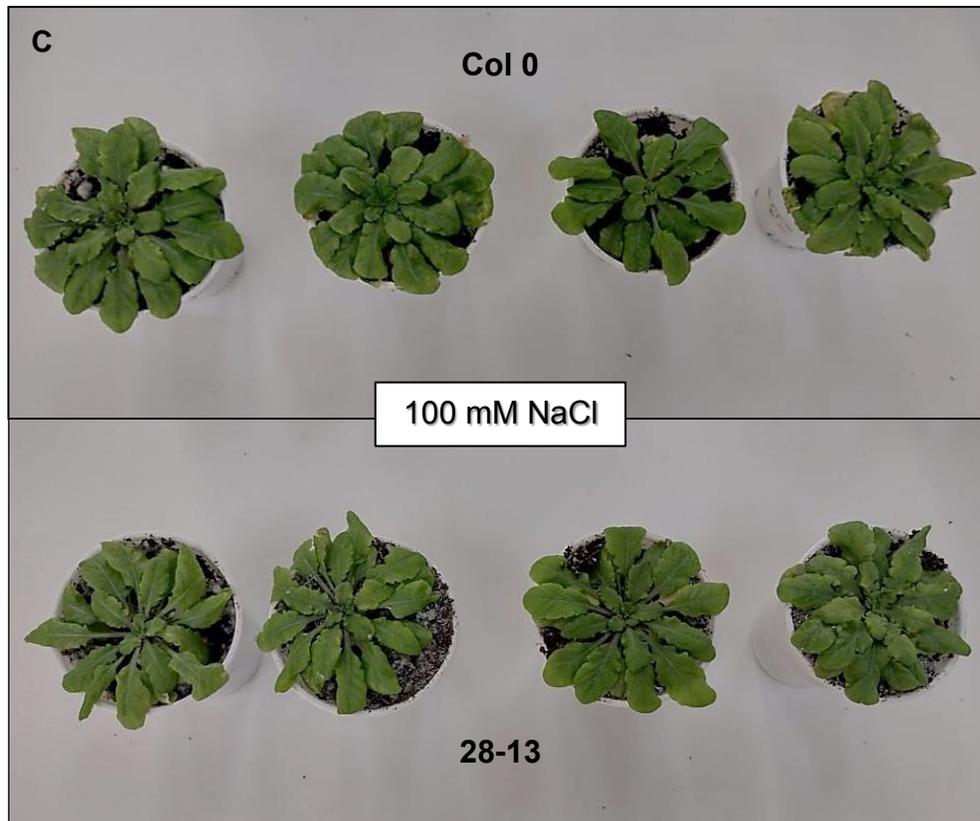


Figura 17. Comportamiento de la línea transgénica 28-13 y la *wild-type* (Col 0) de *A. thaliana* bajo tres concentraciones de NaCl: 0, 50 y 100 mM. A. Diámetro de planta. B. Peso seco aéreo. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC ($p < 0,05$). C. Fotografías correspondientes a las repeticiones de los dos genotipos en el tratamiento con 100 mM NaCl, tomadas a los 28 días de iniciado el ensayo.

La línea 28-13 también presentó mayores índices de tolerancia para las dos variables, diferenciándose de la Col 0 (Figura 18).

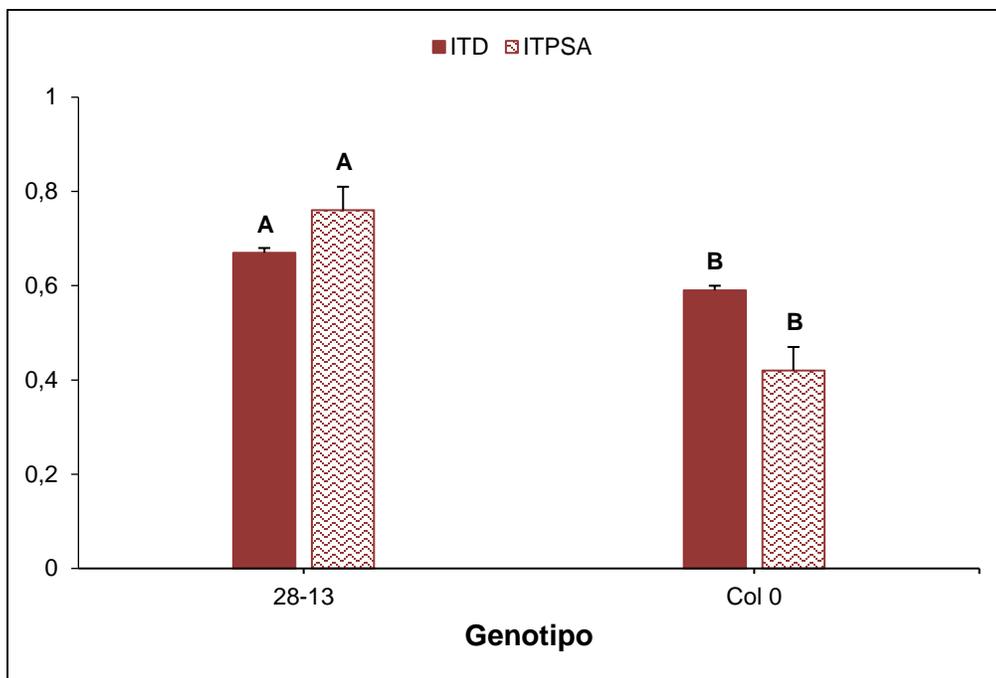


Figura 18. Índices de tolerancia promedio del diámetro (ITD) y del peso seco aéreo (ITPSA) a los 28 días de ensayo de la línea transgénica 28-13 y la *wild-type* (Col 0) de *A. thaliana* bajo dos tratamientos de 50 y 100 mM NaCl. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos según la prueba DGC ($p < 0,05$).

Tanto en la línea transgénica como en la *wild-type* aumentó el contenido de Na⁺ en hojas cuando fueron expuestas a condiciones salinas. Este aumento fue progresivo en Col 0 y más acentuado en 28-13 (Figura 19). En los tratamientos control y 100 mM NaCl, los dos genotipos presentaron un contenido de Na⁺ similar, mientras que en 50 mM NaCl el contenido de Na⁺ en la línea 28-13 fue significativamente mayor.

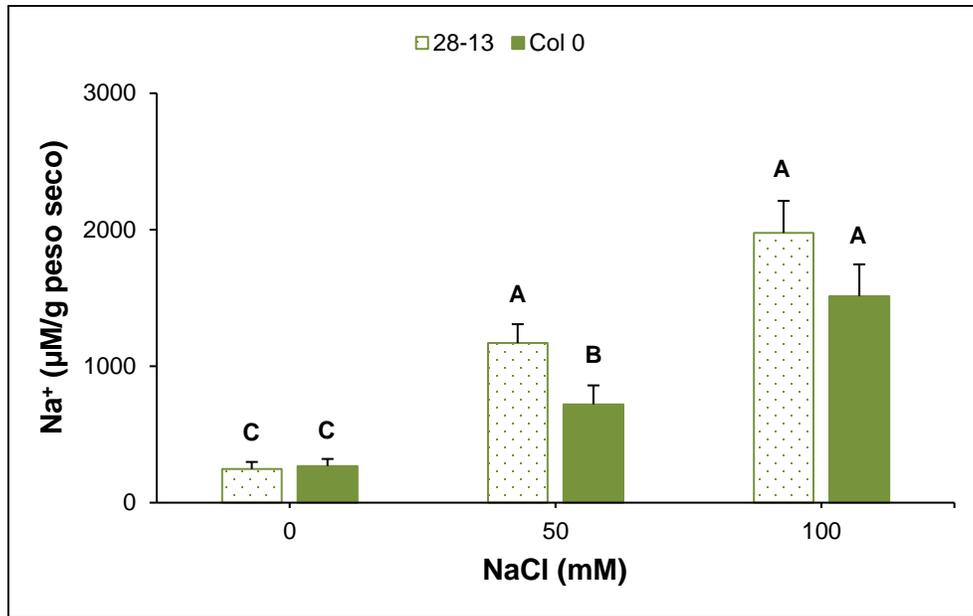


Figura 19. Contenido de Na⁺ en hoja de la línea transgénica 28-13 y la *wild-type* (Col 0) bajo tres concentraciones de NaCl: 0, 50 y 100 mM. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC ($p < 0,05$).

La línea 28-13 se diferenció significativamente de Col 0 en el índice de tolerancia del Na⁺ en hoja acumulando en promedio 6,38 más Na⁺ en hojas que el control sin adición de sal, mientras que Col 0 acumuló 4,16 más Na⁺ en hojas que su respectivo control (Figura 20).

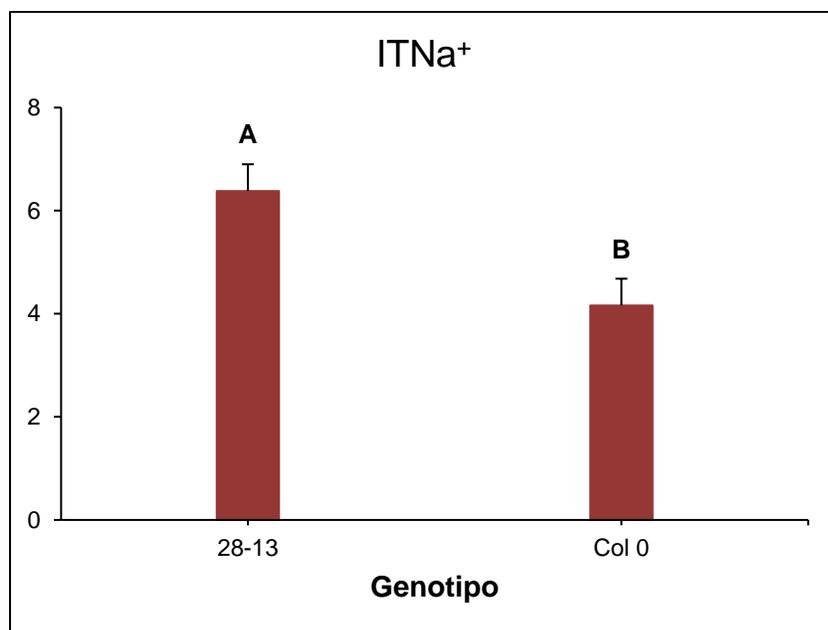


Figura 20. Índice de tolerancia promedio del Na⁺ (ITNa⁺) en hoja de la línea transgénica 28-13 y la *wild-type* (Col 0) de *A. thaliana* bajo dos tratamientos de 50 y 100 mM NaCl. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos según la prueba DGC ($p < 0,05$).

Tolerancia a la salinidad de tres líneas transgénicas de *A. thaliana* en etapa de germinación

Para las dos variables estudiadas se observaron diferencias significativas entre genotipos y tratamientos, e interacción significativa entre ellos (Tabla 5).

Tabla 5. Comportamiento promedio de las líneas transgénicas 23-44, 27-53, 28-13 y la línea *wild-type* de *A. thaliana* evaluadas en etapa de germinación bajo cuatro concentraciones de NaCl. Media, desvío estándar (D.E.), coeficiente de variación (C.V.), valor máximo y mínimo y p-valor para Genotipo, Tratamiento e Interacción Genotipo*Tratamiento.

Variable (unidad)	Media	D.E.	C.V.	Mín.	Máx.	Genotipo p-valor	Tratamiento p-valor	Interacción p-valor
PG (%)	80,49	21,20	26,34	20,83	97,62	<0,0001	<0,0001	0,0002
IG	27,37	8,50	31,04	5,49	35,30	0,0001	<0,0001	0,0011

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

Las líneas transgénicas 23-44, 27-53 y 28-13 tuvieron un mayor porcentaje e índice de germinación en 100 y 150 mM NaCl que la línea *wild-type*, mientras que en los tratamientos control y 50 mM NaCl, el PG e IG de las transgénicas fue similar al de la Col 0 (Figura 21 y 22), con excepción de la línea 23-44 que presentó un mayor poder de germinación en 0 mM NaCl respecto al resto de los genotipos (Figura 21). El porcentaje de semillas germinadas de Col 0 disminuyó significativamente en 100 y 150 mM NaCl. En este último tratamiento, también se obtuvo un menor PG de las líneas 23-44 y 27-53, mientras que el de la línea 28-13 fue similar al del control.

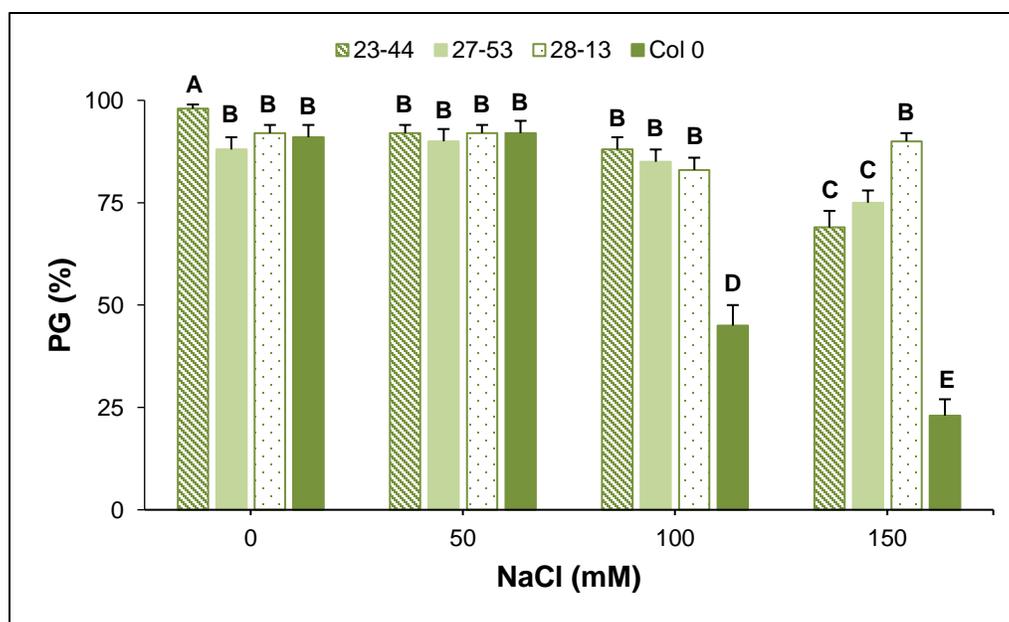


Figura 21. Porcentaje de semillas germinadas (PG) a los 11 días de ensayo de las líneas transgénicas 23-44, 27-53, 28-13 y la *wild-type* (Col 0) de *A. thaliana* bajo cuatro concentraciones de NaCl: 0, 50, 100 y 150 mM. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC ($p < 0,05$).

Las líneas transgénicas presentaron un índice de germinación (indicador de la velocidad de germinación) similar al del control con el agregado de NaCl (Figura 22). En cambio, en la línea Col 0 el IG disminuyó progresivamente en los tratamientos con 100 y 150 mM NaCl.

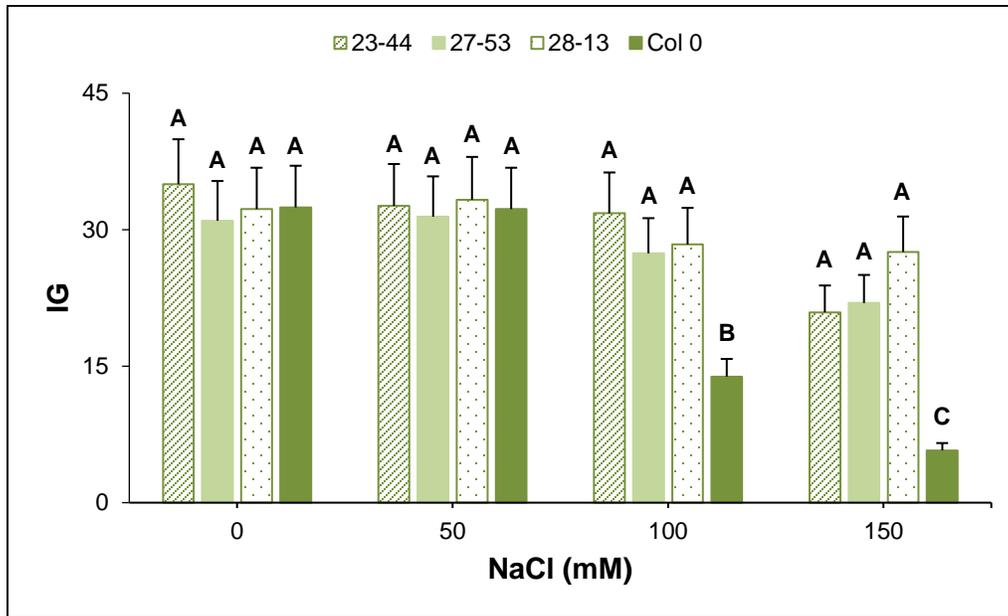


Figura 22. Índice de germinación (IG) de las líneas transgénicas 23-44, 27-53, 28-13 y la *wild-type* (Col 0) de *A. thaliana* bajo cuatro concentraciones de NaCl: 0, 50, 100 y 150 mM. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC ($p < 0,05$).

Otra manera de graficar los resultados obtenidos es mediante diagramas de perfiles multivariados (Figura 23), donde se puede observar que las gráficas de los tratamientos control y 50 mM NaCl fueron parecidas a lo largo del ensayo en los cuatro genotipos, mientras que en los otros dos tratamientos (100 y 150 mM NaCl) se aprecia la ventaja de las líneas transgénicas.

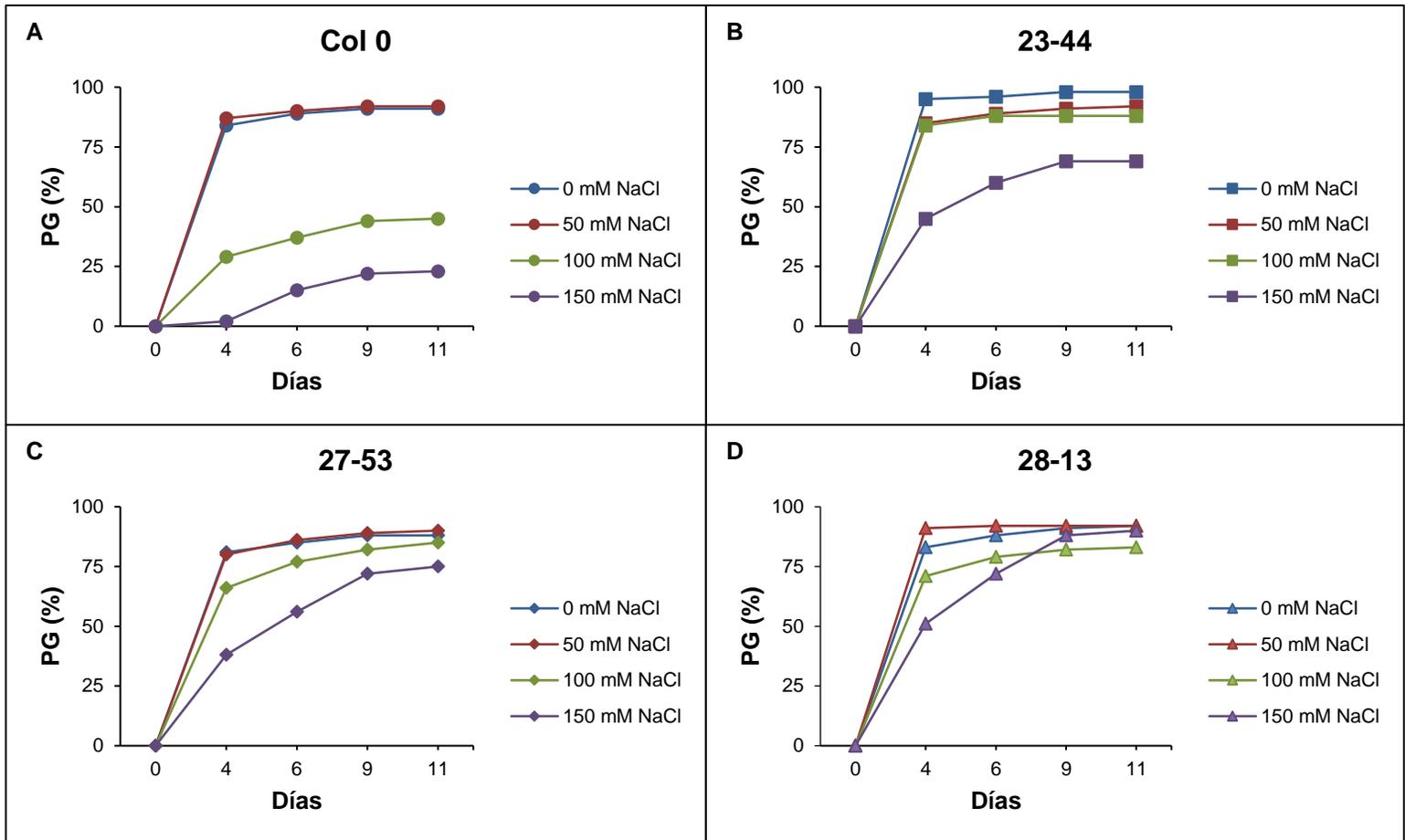


Figura 23. Diagramas de perfiles multivariados para la variable porcentaje de germinación (PG) registrada en 5 oportunidades desde el inicio del ensayo en tres líneas transgénicas (23-44, 27-53 y 28-13) y una *wild-type* (Col 0) de *A. thaliana*. A: PG de Col 0 a lo largo del tiempo. B: PG de 23-44 a lo largo del tiempo. C: PG de 27-53 a lo largo del tiempo. D: PG de 28-13 a lo largo del tiempo.

En la figura 24 se puede apreciar el efecto del tratamiento con 150 mM NaCl en la germinación de las semillas de las líneas transgénicas y la *wild-type*. Si bien los cuatro genotipos (23-44, 27-53, 28-13 y Col 0) se vieron afectados en 150 mM NaCl respecto al control sin adición de NaCl, las semillas de Col 0 estuvieron mayormente afectadas.

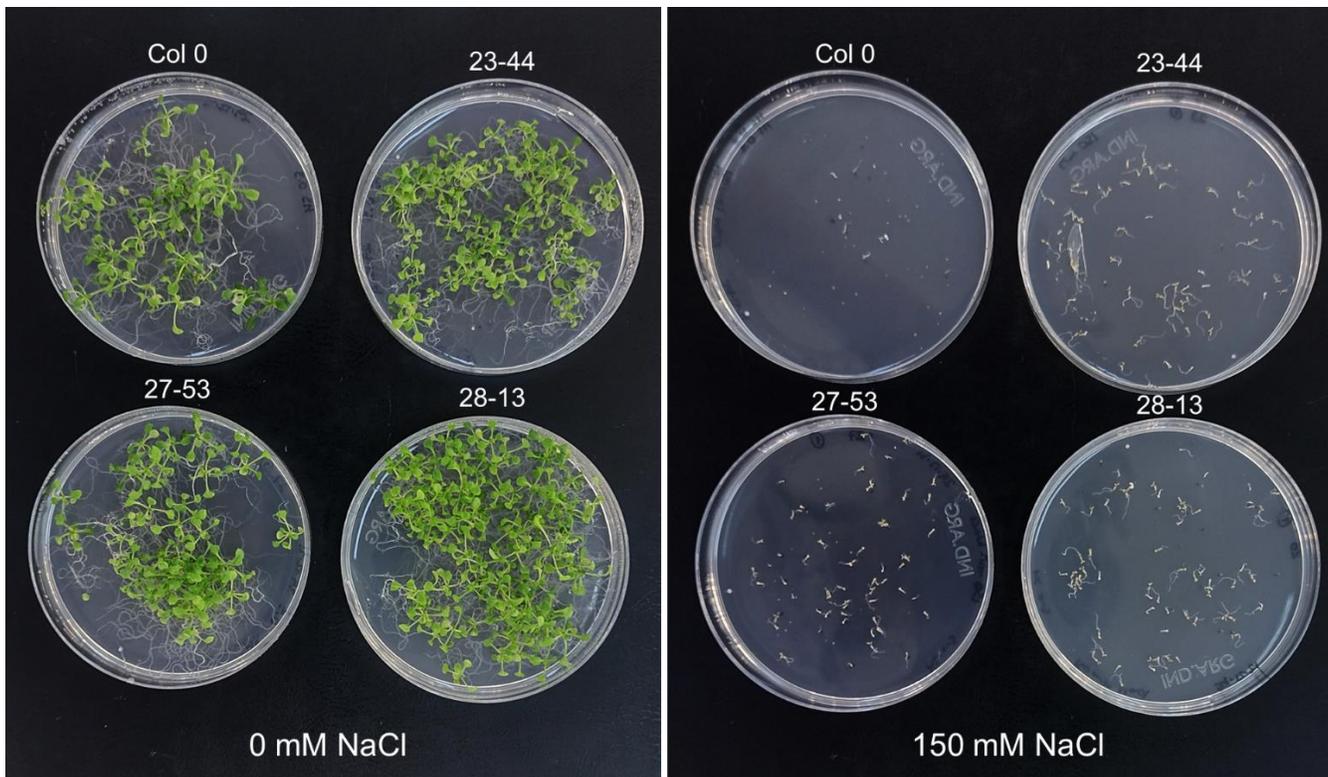


Figura 24. Imágenes de las plántulas de las líneas transgénicas 23-44, 27-53, 28-13 y la *wild-type* (Col 0) de *A. thaliana* en placas de Petri con 0 mM NaCl (tratamiento control) y 150 mM NaCl (tratamiento salino). Las fotografías corresponden a una repetición de cada genotipo en cada tratamiento y fueron tomadas al finalizar el ensayo (11 días).

Si bien en el presente trabajo no se evaluó el crecimiento de las plántulas germinadas, en la figura 25 puede observarse el efecto de los tratamientos salinos sobre las mismas, siendo el genotipo *wild-type* el que presentó menor crecimiento. Esto se evidencia en mayor medida en la longitud de las raíces en los tratamientos más severos.

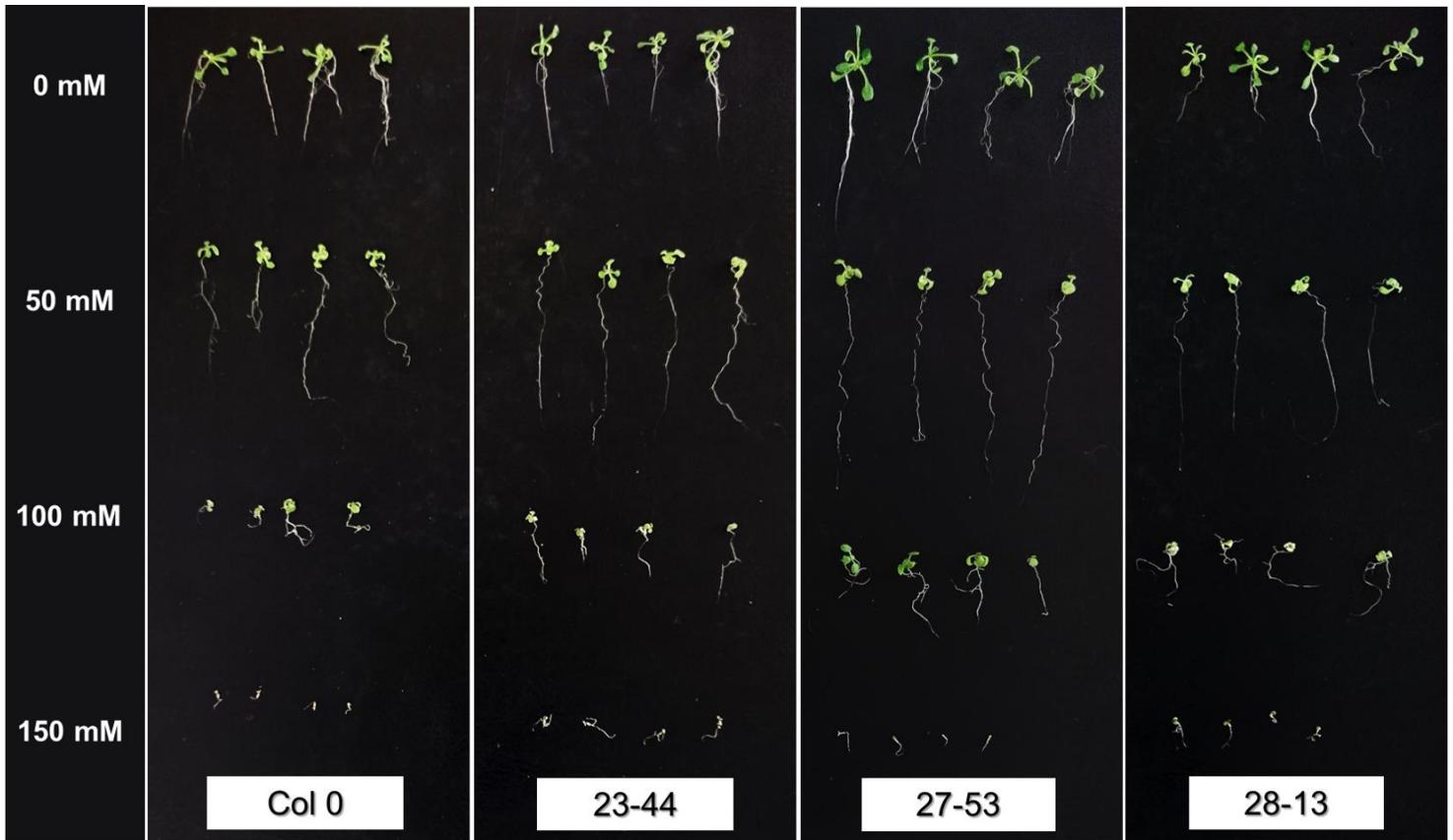


Figura 25. Imágenes de las plántulas de las líneas transgénicas 23-44, 27-53, 28-13 y la *wild-type* (Col 0) de *A. thaliana* en los cuatro tratamientos aplicados en el ensayo de germinación: 0, 50, 100 y 150 mM NaCl. Las fotografías se tomaron al finalizar el ensayo y en ellas cada genotipo está representado por cuatro plántulas por tratamiento.

Discusión

En el presente trabajo, se generaron con éxito cinco líneas transgénicas de *A. thaliana* con expresión constitutiva del gen *LtNHX1* mediante el método de inmersión floral mediado por *Agrobacterium*. Las transformaciones genéticas que involucran *Agrobacterium* constituyen el método más popular para generar plantas resistentes al estrés biótico/abiótico y a las enfermedades (Gantait & Mondal, 2018; Ziemienowicz, 2014), y consiste en transferir genes exógenos al núcleo de las plantas a transformar donde allí pueden integrarse en el genoma y pasar a la siguiente generación (Hwang *et al.*, 2017). Este método se utiliza tanto en la investigación aplicada como en la básica porque es más adecuado que otros métodos como la biolística o la microinyección (Mubeen *et al.*, 2016; Oltmanns *et al.*, 2010). Las líneas transgénicas de *A. thaliana* obtenidas se confirmaron mediante la amplificación por PCR del transgén (Figura 11) y el posterior análisis de la expresión de *LtNHX1* a través de una RT-PCR (Figura 13).

El objetivo del trabajo fue analizar los cambios en la tolerancia a la salinidad de las plantas transgénicas de *A. thaliana* con expresión constitutiva del gen *LtNHX1*. Se tomaron como indicadores de tolerancia variables relacionadas con el crecimiento como el diámetro y el peso seco aéreo, y el porcentaje de semillas germinadas en condiciones salinas.

La salinidad afectó el crecimiento de todos los genotipos evaluados, pero lo hizo en menor medida en aquellos con expresión constitutiva de *LtNHX1*. En estudios previos se han obtenido resultados similares a los observados en este trabajo como, por ejemplo, cuando *AtNHX1* se expresó de forma constitutiva en trigo (Xue *et al.*, 2004), festuca alta (Zhao *et al.*, 2007) y poroto mung (Sahoo *et al.*, 2016), y también con plantas transgénicas de arroz que sobreexpresaban *OsNHX1* (Fukuda *et al.*, 2004). Asimismo, la expresión constitutiva de genes *NHX1* de levadura, algodón, trigo, *Arabidopsis* y la halófito *Suaeda salsa* en plantas transgénicas de *A. thaliana*, confirieron mayor tolerancia en 200 mM NaCl en comparación con las plantas *wild-type*, pero exhibieron inhibición del crecimiento (Liu *et al.*, 2010). Affinito *et al.* (2021) observaron que la sobreexpresión de

LtNHX1 en plantas transgénicas de *L. tenuis* mejoró la tolerancia frente a condiciones severas de estrés salino (200 mM NaCl) respecto a las plantas *wild-type*. Sin embargo, ambos genotipos mostraron un retraso en el crecimiento bajo estas condiciones de estrés. Si bien la sobreexpresión de un único gen puede incrementar la tolerancia, el hecho de que aun así la salinidad afecte a las plantas transgénicas da idea de la complejidad del carácter. La respuesta fisiológica de las plantas al estrés salino requiere la acción coordinada de varios genes involucrados en la señalización, el ajuste osmótico, la homeostasis iónica, la compartimentalización vacuolar, la eliminación de radicales libres de oxígeno y la restauración de la actividad enzimática (Bohnert *et al.*, 2001; Gupta & Huang, 2014; Onaga & Wydra, 2016), por lo que el apilamiento de genes candidatos podría conferir una mayor tolerancia al estrés salino en comparación con las plantas transgénicas con un único transgén (Bhaskaran & Savithramma, 2011; Gouiaa *et al.*, 2012; Lavado, 2007; Nguyen *et al.*, 2019; Pehlivan *et al.*, 2016). En un trabajo anterior, se demostró mediante un ensayo de expresión génica con genotipos de *L. tenuis* con comportamiento contrastante frente al estrés salino, que si bien NHX1 participa en la tolerancia y es muy importante para la compartimentalización de Na⁺, actúa en combinación con otros transportadores iónicos que reducen o retrasan el transporte de Na⁺ a la parte aérea de las plantas como SOS1 y HKT1 (Affinito, 2020).

En condiciones fisiológicas normales, el citosol de las células vegetales contiene altas concentraciones de K⁺, mayores a las de Na⁺ (Blumwald, 2000). En este trabajo la adición de NaCl aumentó el contenido de Na⁺ en raíz y hoja y disminuyó el contenido de K⁺ en hoja, tanto en las líneas transgénicas como en la *wild-type*. La relación K⁺/Na⁺ en estos tejidos también se vio afectada por la salinidad. Un estudio previo con plantas transgénicas de *L. tenuis* que sobreexpresaban el propio gen *LtNHX1* obtuvo resultados similares en el contenido de Na⁺ y K⁺ en hojas en 100 mM NaCl (Affinito *et al.*, 2021). El exceso de iones Na⁺ y Cl⁻ en el suelo, afecta la absorción y el transporte de nutrientes, como el K⁺ y el Ca²⁺, influyendo sobre la disponibilidad de los mismos en las plantas (Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2002; Parida & Das, 2005). El Na⁺, al presentar una gran similitud

química con el K^+ , compite por los transportadores catiónicos afectando su ingreso a la planta; también lo desplaza en sus funciones y disminuye la relación K^+/Na^+ del citoplasma afectando negativamente a los procesos metabólicos que dependen del K^+ . Por lo tanto, la disminución en el contenido de K^+ en condiciones salinas se explica directamente por un aumento del Na^+ (Ghars *et al.*, 2008; Maathuis & Amtmann, 1999; Tester & Davenport, 2003). En el presente trabajo, la línea transgénica 28-13 presentó mayores contenidos de Na^+ en hojas en 50 mM NaCl que la línea *wild-type*. Este aumento significativo de Na^+ en hojas coincide con lo hallado por otros autores en plantas transgénicas con expresión constitutiva de genes *NHX1* de distintas especies, estudiadas bajo concentraciones salinas mayores que las evaluadas en este trabajo (Huang *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2019; Pehlivan *et al.*, 2016; Sahoo *et al.*, 2016). Un incremento de Na^+ en las células podría causar toxicidad iónica y conducir a una grave inhibición del crecimiento. Sin embargo, en este trabajo se observó un mejor crecimiento de las plantas transgénicas en comparación con las *wild-type*, lo que podría ser consecuencia de la compartimentalización del exceso de Na^+ en las vacuolas mediada por el antiporter NHX1. De esta forma, disminuyen los niveles tóxicos del ion en el citoplasma de las células de las hojas, incrementando la tolerancia tisular en las plantas transgénicas bajo estrés salino (Apse *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2010; Munns *et al.*, 2016; Munns & Tester, 2008; Sahoo *et al.*, 2016).

Se vio cierta tendencia a un incremento del contenido de K^+ en raíces cuando se aplicaron los tratamientos salinos tanto en las líneas transgénicas como en la *wild-type*. Una posible explicación podría ser que en condiciones salinas regresa más K^+ a las raíces a través del floema, a expensas de las hojas (Wu *et al.*, 2018). Este aumento en la tasa de recirculación del K^+ en el floema se observó en plantas de arvejas sensibles a la salinidad (Wang *et al.*, 2016). Al analizar varios trabajos, Wu *et al.* (2018) encontraron una correlación negativa entre la cantidad de K^+ retenida en las raíces y el rendimiento general de la planta bajo salinidad, mientras que en las hojas esta correlación fue positiva. Esto sugiere que el control de la recirculación de K^+ en el floema podría representar otro mecanismo de tolerancia a la salinidad de las plantas. Aunque en este trabajo se observó una mayor

acumulación de K^+ en raíces y un menor contenido del ion en hojas en todos los genotipos en condiciones de estrés salino, las líneas transgénicas mostraron un mejor comportamiento bajo salinidad respecto a la *wild-type*.

La tolerancia a la salinidad es un fenómeno que depende de la etapa de desarrollo de la planta por lo que su evaluación durante las distintas etapas puede llevar a comprender los mecanismos implicados en la respuesta al estrés (Flowers & Colmer, 2008; Shabala, 2013). En este trabajo además de estudiar la tolerancia a la salinidad de las líneas transgénicas de *A. thaliana* en etapa vegetativa, se evaluó el comportamiento de las mismas durante la etapa de germinación. En general la salinidad inhibe la germinación de semillas como consecuencia de dos procesos: el efecto osmótico debido a una disminución del potencial de solutos del sustrato, creando estrés hídrico, y el efecto iónico debido a la absorción y/o acumulación excesiva de iones por las semillas o las plántulas (Huang & Redmann, 1995; Khan & Ungar, 1997). Por lo tanto, la germinación es una etapa limitante en ambientes salinos ya que determinará si esa planta podrá crecer y sobrevivir con éxito bajo esas condiciones (Song *et al.*, 2008). En el ensayo realizado, se observó mayor tolerancia a la salinidad de las líneas transgénicas de *A. thaliana* con expresión constitutiva de *LtNHX1* durante la germinación en comparación con la línea *wild-type*. Esto coincide con lo observado en otros trabajos con plantas transgénicas de *Arabidopsis* con expresión constitutiva de genes *NHX1* heterólogos (An *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2017), y con plantas transgénicas *NHX1* de otras especies (Gouiaa *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2018).

Como se indicó anteriormente, debido a que la tolerancia a la salinidad varía según la etapa de crecimiento y la duración del estrés, las plantas presentan diferentes niveles de respuesta. Es posible que en el ensayo vegetativo las plantas de todos los genotipos pudieran adaptarse en mayor medida a las condiciones salinas, lo cual llevó a una menor diferencia en la tolerancia entre las líneas transgénicas y la *wild-type*. Además, debe considerarse que, previo a la aplicación de los tratamientos salinos, las plántulas de dicho ensayo tuvieron una etapa de

crecimiento en ausencia de sal, lo cual pudo conferirles una ventaja favoreciendo la respuesta al momento de ser regadas con NaCl. En cambio, fue notoria la existencia de una mejor respuesta a la salinidad de las líneas transgénicas respecto a la *wild-type* en la germinación y puede pensarse que el antiporter NHX1 de *Lotus tenuis* contribuyó a la tolerancia en mayor medida en esta etapa. En concordancia con esto, se ha encontrado en otros trabajos que los beneficios aportados a la tolerancia frente al estrés salino por la expresión constitutiva de un gen candidato dependen de la etapa del desarrollo. Por ejemplo, los beneficios de sobreexpresar el gen del transportador de alta afinidad de K⁺ de clase I (*high-affinity K⁺ Transporter 1, HKT1*) en *Arabidopsis* dependieron del momento de aplicación del estrés salino (Julkowska *et al.*, 2017). En arroz transgénico se encontró un menor incremento de la tolerancia respecto al genotipo salvaje en etapas del desarrollo más avanzadas que en etapas tempranas al sobreexpresar el gen codificador de la Monodeidroascorbato reductasa (MDHAR), relacionada con el estrés oxidativo (Sultana *et al.*, 2012).

En estudios previos, la sobreexpresión de *LtNHX1* incrementó la tolerancia a la salinidad en etapa vegetativa de un genotipo transgénico de *L. tenuis* (Affinito *et al.*, 2021). En el presente trabajo, se confirmó el rol del antiporter en la respuesta a dicho estrés abiótico en un sistema heterólogo como *Arabidopsis thaliana*, no solo en etapa vegetativa, sino también en la germinación.

Conclusiones

- Se obtuvieron cinco líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con expresión constitutiva de *LtNHX1*.
- La expresión constitutiva de *LtNHX1* incrementó la tolerancia a la salinidad de *A. thaliana* en fase de germinación lo que se evidenció en un mayor porcentaje de semillas germinadas en 100 y 150 mM NaCl respecto la línea *wild-type*, y en una similar velocidad de germinación en los tratamientos salinos respecto al control sin adición de sal.
- La expresión constitutiva de *LtNHX1* incrementó la tolerancia a la salinidad de *A. thaliana* en etapa vegetativa lo que se reflejó en un mayor diámetro y peso seco aéreo de las plantas en comparación con las plantas *wild-type*.
- El incremento en la tolerancia debido a la expresión constitutiva de *LtNHX1* varió según la etapa del desarrollo en la que fue evaluada, resultando mayor durante la germinación que en la etapa vegetativa.
- Las plantas transgénicas de *A. thaliana* presentaron un mayor contenido de Na⁺ en hojas en condiciones salinas respecto a las *wild-type*, lo cual indicaría la existencia de tolerancia tisular debido a la actividad del antiporter NHX1.

Bibliografía

- Ábrahám, E., Hourton-Cabassa, C., Erdei, L., & Szabados, L. (2010). Methods for determination of proline in plants. In R. Sunkar (Ed.), *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (pp. 317–331). Stillwater, OK, USA.
- 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. R., Ortuño, M. F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M. 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(113), 1–13.
- Affinito, M. A. (2020). *Participación del antiporter vacuolar NHX1 de Lotus tenuis en la tolerancia a salinidad*. Universidad Nacional de Rosario.
- Affinito, M. A., Espasandin, F. D., del Vas, M., Alvarez, M. Y., Andrés, A. N., Sansberro, P. A., & Díaz Paleo, A. H. (2021). Functional characterization and intracellular localization of a *Lotus tenuis* NHX antiporter. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 146(3), 565–576. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02094-3>
- Affinito, M. A., Franco, M., & Andrés, A. N. (2015). Desarrollo de germoplasma de *Lotus tenuis* tolerante a salinidad. *Revista de Tecnología Agropecuaria, INTA*, 0328-7750. 10(29).
- Agarwal, P. K., Shukla, P. S., Gupta, K., & Jha, B. (2012). Bioengineering for salinity tolerance in plants: state of the art. *Molecular Biotechnology*, 54(1), 102–123. <https://doi.org/10.1007/S12033-012-9538-3>
- 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)
- 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>
- Ashraf, M. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances*, 27(1), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.003>
- Barragán, V., Leidi, E. O., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, J. A., Cubero, B., & Pardo, J. M. (2012). Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(3), 1127–1142. <https://doi.org/10.1105/TPC.111.095273>
- Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(1), 23–58. <https://doi.org/10.1080/07352680590910410>
- Bassil, E., Tajima, H., Liang, Y. C., Ohto, M., Ushijima, K., Nakano, R., Esumi, T., Coku, A., Belmonte, M., & 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>
- Batista, W. B., Taboada, M. A., Lavado, R. S., Perelman, S. B., & León, R. J. C. (2005). Asociación entre comunidades vegetales y suelos en el pastizal de la Pampa Deprimida. *La heterogeneidad de la vegetación de los*

agroecosistemas, 113–129.

- 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>
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9(7), 1055–1066. <https://doi.org/10.1105/TPC.9.7.1055>
- Bhaskaran, S., & Savithramma, 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, 431–434.
- Blumwald, E., Aharon, G. S., & Apse, M. P. (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1–2), 140–151. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00135-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00135-8)
- Bohnert, H. J., Ayoubi, P., Borchert, C., Bressan, R. A., Burnap, R. L., Cushman, J. C., Cushman, M. A., Deyholos, M., Fischer, R., Galbraith, D. W., Hasegawa, P. M., Jenks, M., Kawasaki, S., Koiwa, H., Kore-eda, S., Lee, B.-H., Michalowski, C. B., Misawa, E., Nomura, M., Zhu, J.-K. (2001). A genomics approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 295–311.
- Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, G. A., & Masmoudi, K. (2007). Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter *TNHX1* and H⁺-pyrophosphatase *TVP1* improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 301–308. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl251>
- 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, 215–225.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A., & Zhu, J. K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 45, 437–448. <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*. *The Plant Journal*, 16(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.1998.00343.X>
- Clua, A. A., Gimenez, D. O., & Fernandez, L. V. (1997). Increase in forage yield in narrowleaf birdsfoot trefoil (*Lotus tenuis* Waldst and Kit ex Willd) in a permanent pasture with foliar applied gibberellic acid (GA3), and phosphorus. *Plant Growth Regulation*, 21, 223–228. <https://doi.org/10.1023/A:1005841011102>
- Colmenero-Flores, J. M., Martínez, G., Gamba, G., Vázquez, N., Iglesias, D. J., Brumó, J., & Talón, M. (2007). Identification and functional characterization of cation–chloride cotransporters in plants. *The Plant Journal*, 50(2), 278–292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03048.x>
- Colombet, A. (2017). *Agregado de semillas de Lotus tenuis en la estepa de halofitas de la Pampa Deprimida*. Doctoral dissertation. Universidad Nacional de La Plata.
- 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.
- 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>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). *InfoStat versión 2020*. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

<http://www.infostat.com.ar>

- 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/METRICS>
- Du, C. X., Fan, H. F., Guo, S. R., Tezuka, T., & Li, J. (2010). Proteomic analysis of cucumber seedling roots subjected to salt stress. *Phytochemistry*, 71(13), 1450–1459.
- 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.
- El Ghazali, G. E. B. (2020). *Suaeda vermiculata* Forssk. ex J.F. Gmel.: structural characteristics and adaptations to salinity and drought: A review. *International Journal of Sciences*, 9(02), 28–33. <https://doi.org/10.18483/ijsci.2268>
- 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.
- Escaray, F. J., Menendez, A. B., Gárriz, A., Pieckenstain, F. L., Estrella, M. J., Castagno, L. N., Carrasco, P., Sanjuán, J., & Ruiz, O. A. (2012). Ecological and agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant Science*, 182(1), 121–133. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2011.03.016>
- Falstocco, 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. (n.d.). *Salt-affected soils - FAO Soils Portal*. Retrieved November 7, 2022, from <https://www.fao.org/soils-portal/soil-management/management-of-some->

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

FAO. (2008). *FAO Land and Plant Nutrition Management Service*.
<https://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>

Flowers, T. J. (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55(396), 307–319. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh003>

Flowers, T. J., & Colmer, T. D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 945–963.

Flowers, T. J., & Yeo, A. R. (1986). Ion relations of plants under drought and salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13(1), 75–91.
<https://doi.org/10.1071/PP9860075>

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., 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. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCH014>

Gantait, S., & Mondal, S. (2018). Transgenic approaches for genetic improvement in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against major biotic and abiotic stress factors. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 537–544.
<https://doi.org/10.1016/J.JGEB.2018.08.005>

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*, 98(20), 11444–11449. <https://doi.org/10.1073/PNAS.191389398>

Ghars, A. M., Parre, E., Debez, A., Bordenave, M., Richard, L., Lepout, L., Abdelly, C., Bouchereau, A., & Savoure, A. (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, 588–599. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.05.014>
- 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/METRICS>
- Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>
- 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>
- Hidalgo, L. G., Cauhepe, M. A., & Erni, A. N. (1998). Digestibilidad de materia seca y contenido de proteína bruta en especies de pastizal de la Pampa Deprimida, Argentina. *Prod. Sanid. Animal*, 13(1, 2 y 3), 165–177.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station*, 347(2), 1–32.
- Huang, J., & Redmann, R. E. (1995). Salt tolerance of *Hordeum* and *Brassica* species during germination and early seedling growth. *Canadian Journal of Plant Science*, 75(4), 815–819. <https://doi.org/10.4141/CJPS95-137>
- Huang, Y., Zhang, X. xia., LI, Y. hong., Ding, J. zhou., Du, H. mei., Zhao, Z., Zhou, L. na., Liu, C., Gao, S. bin., Cao, M. ju., Lu, Y. li., & 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)

- Hwang, H.-H., Yu, M., & Lai, E.-M. (2017). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 15, 1–31. <https://doi.org/10.1199/TAB.0186>
- Isayenkov, S. V., & Maathuis, F. J. M. (2019). Plant salinity stress: many unanswered questions remain. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>
- 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-042916-040936>
- Jones, G. W., & Gorham, J. (2002). Intra- and inter-cellular compartmentation of ions. In A. Läuchli & U. Lüttge (Eds.), *Salinity: Environment - Plants - Molecules* (pp. 159–180). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/0-306-48155-3_8
- Julkowska, M. M., Koevoets, I. T., Mol, S., Hoefsloot, H., Feron, R., Tester, M. A., Keurentjes, J. J. B., Korte, A., Haring, M. A., De Boer, G. J., & Testerink, C. (2017). Genetic components of root architecture remodeling in response to salt stress. *The Plant Cell*, 29(12), 3198–3213. <https://doi.org/10.1105/TPC.16.00680>
- 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. <https://doi.org/10.1002/J.1537-2197.1984.TB12533.X>
- Khan, M. Ajmal., & Ungar, I. A. (1997). Effects of thermoperiod on recovery of seed germination of halophytes from saline conditions. *American Journal of Botany*, 84(2), 279–283. <https://doi.org/10.2307/2446089>
- Krebs, M., Beyhl, D., Görlich, E., Al-Rasheid, K. A. S., Marten, I., Stierhof, Y. D., Hedrich, R., & Schumacher, K. (2010). Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(7),

3251–3256.

https://doi.org/10.1073/PNAS.0913035107/SUPPL_FILE/PNAS.200913035SI.PDF

- Krishnamurthy, P., Qingsong, L., & Kumar, P. P. (2018). Proteomics perspectives in post-genomic era for producing salinity stress-tolerant crops. In V. Kumar, S. Wani, P. Suprasanna, & L. Tran (Eds.), *Salinity Responses and Tolerance in Plants* (Vol. 2, pp. 239–266). Springer, Cham. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-90318-7_10
- Krishnamurthy, P., Tan, X. F., Lim, T. K., Lim, T. M., Kumar, P. P., Loh, C. S., & Lin, Q. (2014). Proteomic analysis of plasma membrane and tonoplast from the leaves of mangrove plant *Avicennia officinalis*. *Proteomics*, *14*(21–22), 2545–2557.
- Lambrechtsen, N. C., Wills, B. J., & Douglas, G. B. (1986). Management and uses of *Lotus tenuis* (Narrow-leaved birdsfoot trefoil). In *Plant Materials Handbook for Soil Conservation* (pp. 271–274). Wellington.
- Lavado, R. S. (2007). Visión sintética de la distribución y magnitud de los suelos afectados por salinidad en la Argentina. In E. Taleisnik, K. Grunberg, & G. Santa Maria (Eds.), *La salinización de suelos en la Argentina* (pp. 1–6). Córdoba: Editorial EDUCC.
- 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.*
- Li, H., Chang, J., Chen, H., Wang, Z., Gu, X., Wei, C., Zhang, Y., Ma, J., Yang, J., & Zhang, X. (2017). Exogenous melatonin confers salt stress tolerance to watermelon by improving photosynthesis and redox homeostasis. *Frontiers in Plant Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.00295/BIBTEX>
- Li, J., Jiang, G., Huang, P., Ma, J., & Zhang, F. (2007). Overexpression of the Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Suaeda salsa* confers cold and salt tolerance to transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *90*(1),

41–48. <https://doi.org/10.1007/S11240-007-9246-Z/METRICS>

- 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, 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/METRICS>
- Lundqvist, A. (1993). The self-incompatibility system in *Lotus Tenuis* (Fabaceae). *Hereditas*, 119(1), 59–66. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1993.00059.x>
- 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.
- Maguire, V. G., Campestre, M. P., Antonelli, C. J., & Ruiz, O. A. (2020). El mejoramiento de especies forrajeras del género *Lotus* spp y su importancia económica y ambiental en los pastizales de la Pampa Deprimida del Salado. In *Estado del arte del mejoramiento genético de especies forrajeras en la Argentina* (pp. 1–17). Editorial: ORIENTACION GRAFICA EDITORA.
- 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>
- Matteucci, S. D. (2012). Ecorregión Pampa. In J. Morello, S. D. Matteucci, A. F. Rodriguez, & M. Silva (Eds.), *Ecorregiones y complejos ecosistémicos argentinos* (pp. 391–445). Orientación Gráfica Editora S.R.L.
- McCubbin, T., Bassil, E., Zhang, S., & 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., Eliáš, P., Píš, V., & Galvánek, D. (2014). Succession of saline vegetation in Slovakia after a large-scale disturbance. *Annales Botanici Fennici*, 51(5), 285–296. <https://doi.org/10.5735/085.051.0504>
- Methenni, K., Abdallah, M. B., Nouairi, I., Smaoui, A., Ammar, W. B., Zarrouk, M., & Youssef, N. B. (2018). Salicylic acid and calcium pretreatments alleviate the toxic effect of salinity in the *Oueslati olive* variety. *Scientia Horticulturae*, 233, 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.060>
- Ministerio de agricultura, ganadería y pesca. (2021). Densidad de bovinos por Km² [Fotografía]. SENASA. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2_densidad_bovinos_km2_31122021.png
- Miñón, D. P., Sevilla, G. H., Montes, L., & Fernández, O. (1990). *Lotus tenuis: leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida*. Boletín técnico n° 98. Balcarce: INTA.
- Mubeen, H., Zahra Naqvi, R., Masood, A., Shoaib, M. W., & Raza, S. (2016). Gene transformation: methods, uses and applications. *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, 1–4. <http://www.jpabs.org/>
- Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell & Environment*, 16(1), 15–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1993.tb00840.x>
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and 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, 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. In R. Sunkar (Ed.), *Methods in Molecular Biology* (pp. 25–38). Stillwater, USA.

- Munns, R., & Gilliam, M. (2015). Salinity tolerance of crops - what is the cost? *New Phytologist*, 208(3), 668–673. <https://doi.org/10.1111/nph.13519>
- Munns, R., James, R. A., Gilliam, M., 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. <https://doi.org/10.1071/FP16187>
- Munns, R., & Passioura, J. B. (1984). Effect of prolonged exposure to NaCl on the osmotic pressure of leaf xylem sap from intact, transpiring barley plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 11(6), 497–507. <https://doi.org/10.1071/PP9840497>
- Munns, R., Schachtman, D. P., & Condon, A. G. (1995). The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22(4), 561–569. <https://doi.org/10.1071/PP9950561>
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- 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*, 639, 371–382. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_23/COVER
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
- Nguyen, N. T., Vu, H. T., Nguyen, T. T., Nguyen, L. A. T., Nguyen, M. C. D., Hoang, K. L., Nguyen, K. T., & 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>
- Oltmanns, H., Frame, B., Lee, L. Y., Johnson, S., Li, B., Wang, K., & Gelvin, S. B. (2010). Generation of backbone-free, low transgene copy plants by launching T-DNA from the *Agrobacterium* chromosome. *Plant Physiology*, 152(3), 1158–

1166. <https://doi.org/10.1104/PP.109.148585>

Onaga, G., & Wydra, K. (2016). Advances in plant tolerance to abiotic stresses. In *Plant Genomics* (pp. 229–272).

Pang, Q., Chen, S., Dai, S., Chen, Y., Wang, Y., & Yan, X. (2010). Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *Journal of Proteome Research*, 9(5), 2584–2599.

Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324–349. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2004.06.010>

Pehlivan, N., Sun, L., Jarrett, P., Yang, X., Mishra, N., Chen, L., Kadioglu, A., Shen, G., & 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. In *Tesis doctoral*. Universitat Politècnica de València. <https://doi.org/10.4995/THESIS/10251/5765>

Pessaraki, M., & Szabolcs, I. (2019). Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. In Mohammad. Pessaraki (Ed.), *Handbook of Plant and Crop Stress* (4th ed., pp. 3–21). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351104609-1/SOIL-SALINITY-SODICITY-PARTICULAR-PLANT-CROP-STRESS-FACTORS-MOHAMMAD-PESSARAKLI-SZABOLCS>

Qiu, Q. S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S., & Zhu, J. K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 8436–8441. <https://doi.org/10.1073/PNAS.122224699>

Quinos, P. M., Insausti, P., & Soriano, A. (1998). Facilitative effect of *Lotus tenuis*

- on *Paspalum dilatatum* in a lowland grassland of Argentina. *Oecologia*, 114, 427–431. <https://doi.org/10.1007/s004420050466>
- Ren, Z. H., Gao, J. P., Li, L. G., Cai, X. L., Huang, W., Chao, D. Y., Zhu, M. Z., Wang, Z. Y., Luan, S., & Lin, H. X. (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics*, 37(10), 1141–1146. <https://doi.org/10.1038/ng1643>
- Rengasamy, P. (2002). Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: an overview. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 42(3), 351–361. <https://doi.org/10.1071/EA01111>
- Rengasamy, P. (2010). Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Functional Plant Biology*, 37(613–620). <https://doi.org/10.1071/FP09249>
- 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>
- Sahoo, D. P., Kumar, S., Mishra, S., Kobayashi, Y., Panda, S. K., & Sahoo, L. (2016). Enhanced salinity tolerance in transgenic mungbean overexpressing *Arabidopsis* antiporter (*NHX1*) gene. *Molecular Breeding*, 36(10), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S11032-016-0564-X/METRICS>
- Sanchez, D. H., Pieckenstein, 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 & Environment*, 34(4), 605–617. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2010.02266.X>
- Sanchez, D. H., Pieckenstein, F. L., Szymanski, J., Erban, A., Bromke, M., Hannah, M. A., Kraemer, U., Kopka, J., & 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., & Suarez, D. L. (2017). Variable salinity responses of 12 alfalfa genotypes and comparative expression analyses of salt-response genes. *Scientific Reports*, 7(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/srep42958>
- Shabala, S. (2013). Learning from halophytes: Physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of Botany*, 112, 1209–1221. <https://doi.org/10.1093/aob/mct205>
- Shabala, S., & Munns, R. (2017). Salinity Stress: physiological constraints and adaptive mechanisms. In Sergey. Shabala (Ed.), *Plant Stress Physiology* (2nd ed., pp. 24–63). Boston, UK: CAB International.
- Shah, G. M. (2014). Socio-economic impact of climate change in Aral Sea Basin. *The Journal of Central Asian Studies*, 21(1), 47–57.
- 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(2), 465–477. <https://doi.org/10.1105/TPC.010371>
- Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12), 1058–1071.
- Sirohi, G., Pandey, B. K., Deveshwar, P., & Giri, J. (2016). Emerging trends in epigenetic regulation of nutrient deficiency response in plants. *Molecular Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9919-0>
- Song, J., Fan, H., Zhao, Y., Jia, Y., Du, X., & Wang, B. (2008). Effect of salinity on germination, seedling emergence, seedling growth and ion accumulation of a euhalophyte *Suaeda salsa* in an intertidal zone and on saline inland. *Aquatic Botany*, 88(4), 331–337. <https://doi.org/10.1016/J.AQUABOT.2007.11.004>
- Sultana, S., Khew, C. Y., Morshed, M. M., Namasivayam, P., Napis, S., & Ho, C. L. (2012). Overexpression of monodehydroascorbate reductase from a mangrove plant (*AeMDHAR*) confers salt tolerance on rice. *Journal of Plant Physiology*, 169(3), 311–318. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2011.09.004>

- Sunarpi., Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W. Y., Leung, H. Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J. I., & Uozumi, N. (2005). Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *The Plant Journal*, 44(6), 928–938. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2005.02595.X>
- Tan, W. K., Lim, T. K., Loh, C. S., Kumar, P., & Lin, Q. (2015). Proteomic characterisation of the salt gland-enriched tissues of the mangrove tree species *avicennia officinalis*. *PLOS ONE*, 10(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0133386>
- 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*, 1–13. <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, 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., 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>

- Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91(5), 503–527. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCG058>
- 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., Hirschi, K. D., & 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>
- Velmurugan, A., Swarnam, P., Subramani, T., Meena, B., & Kaledhonkar, M. J. (2020). Water demand and salinity. In M. H. D. A. Farahani, V. Vatanpour, & A. Taheri (Eds.), *Desalination: Challenges and Opportunities* (pp. 45–55). Books on Demand. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.88095>
- 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). *Aust. J. Bot*, 50, 75–82.
- Vignolio, O. R., Maceira, N. O., & Fernández, O. N. (1994). Efectos del anegamiento en invierno y verano sobre el crecimiento y la supervivencia de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*. *Ecologia Austral*, 4, 19–28.
- Wang, Q., Dodd, I. C., Belimov, A. A., & Jiang, F. (2016). Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1- carboxylate deaminase increase growth and photosynthesis of pea plants under salt stress by limiting Na⁺ accumulation. *Functional Plant Biology*, 43(2), 161–172.

<https://doi.org/10.1071/FP15200>

- Watson, L., & Dallwitz, M. J. (1992). *The grass genera of the world*. Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Wu, H., Zhang, X., Giraldo, J. P., & Shabala, S. (2018). It is not all about sodium: revealing tissue specificity and signalling roles of potassium in plant responses to salt stress. *Plant and Soil*, 431(1–2), 1–17. <https://doi.org/10.1007/S11104-018-3770-Y/TABLES/3>
- 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.
- Yamaguchi, T., & Blumwald, E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in Plant Science*, 10(12), 615–620. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.10.002>
- Yamaguchi, T., Hamamoto, S., & Uozumi, N. (2013). Sodium transport system in plant cells. *Frontiers in Plant Science*, 4(410), 1–7.
- Zhang, J., Nguyen, H. T., & Blum, A. (1999). Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of Experimental Botany*, 50(332), 291–302. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.332.291>
- 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>
- Ziemienowicz, A. (2014). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors,

applications and recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 95–102. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2013.10.004>

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. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2004.03.010>