



**Universidad de Granada**

**Regulación por micorrizas arbusculares de la fisiología y las acuaporinas de maíz (*Zea mays L.*) en relación con la tolerancia de la planta hospedadora al déficit hídrico**

Gloria Bárzana González

**TESIS DOCTORAL  
2014**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Gloria Bárzana González  
D.L.: GR 2109-2014  
ISBN: 978-84-9083-137-3



# **Universidad de Granada**

Facultad de Ciencias

Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas

## **Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

Estación Experimental del Zaidín

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos

*Memoria presentada por Gloria Bárzana González,  
Licenciada en biología, para optar al grado de Doctor*

**Fdo.: Gloria Bárzana González**

VºBº de los directores de la Tesis Doctoral

**Fdo.: Juan Manuel Ruiz Lozano**

Investigador Científico del CSIC

**Fdo.: Ricardo Aroca Álvarez**

Científico titular del CSIC

Granada, Mayo 2014



## MARCO CIENTÍFICO-ACADÉMICO Y FINANCIACIÓN

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el grupo de investigación “Micorrizas” del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC, Granada).

La Tesis se enmarca en el contexto de los estudios Científico-Académicos que conforman el Máster Universitario en Biología Agraria y Acuicultura, dentro del programa de doctorado de Biología Fundamental y de Sistemas, de la Escuela de Posgrado de la Universidad de Granada.

Esta Tesis Doctoral forma parte del proyecto del Plan Nacional de I + D + i: AGL2008-00898/AGR, titulado “*Regulación de acuaporinas por micorrizas arbusculares en relación con la tolerancia de la planta hospedadora al déficit hídrico*”

Para la ejecución de esta Tesis Doctoral, la Lda. Gloria Bárzana González fue financiada por las siguientes fuentes:

\* Beca predoctoral JAE-PREDOC del programa “Junta para la Ampliación de Estudios” de ayudas para el desarrollo de tesis doctorales, Consejo Superior de Investigación Científica (CSIC), Ministerio de Economía y Competitividad, disfrutada del 1 de Noviembre de 2008 hasta el 31 de Octubre de 2012.

\* Dos becas de movilidad para Estancias Breves, Ministerio de Economía y Competitividad, disfrutadas ambas en la Universidad Católica de Lovaina (Louvain-La-Neuve, Bélgica) bajo la supervisión del Dr. François Chaumont y realizadas del 1 Septiembre de 2010 al 30 de Noviembre de 2010 y del 1 de Febrero de 2012 al 30 de Abril de 2012.

## PUBLICACIONES

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes revistas internacionales o están en vías de publicación:

Autores Juan Manuel Ruiz-Lozano, Maria del Mar Alguacil, *Gloria Bárzana*, Paolo Vernieri y Ricardo Aroca

Título Exogenous ABA accentuates the differences in root hydraulic properties between mycorrhizal and non mycorrhizal maize plants through regulation of PIP aquaporins

Fecha de publicación 2009

Revista/Libro Plant Molecular Biology 70, 565-579

Autores *Gloria Bárzana*, Aroca R., Paz J.A., Chaumont F., Martínez-Ballesta M.C., Carvajal M. and Ruiz-Lozano J.M  
Título Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic water flow in roots of the host plant under both well-watered and drought stress conditions  
Fecha de publicación 2012  
Revista/Libro *Annals of Botany* 109, 5, 1009-1017

Autores *Gloria Bárzana*, Ricardo Aroca, G. Patrick Bienert, François Chaumont and Juan M. Ruiz-Lozano  
Título Regulation of the whole set of aquaporins by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in plants under drought stress and possible implications for plant performance  
Fecha de publicación 2014  
Revista/Libro *Molecular Plant-Microbe Interactions*

Autores *Gloria Bárzana*, Ricardo Aroca y Juan M. Ruiz-Lozano  
Título Local and/or systemic effects of mycorrhization on plant physiology and biochemistry under drought stress  
Fecha de publicación *En preparación*

Asimismo, parte de los resultados obtenidos durante esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

Autores Ruiz-Lozano J.M., Alguacil M.M., *Bárzana G.*, Vernieri P. y Aroca R.  
Título Exogenous ABA accentuates the differences in root hydraulic properties between mycorrhizal and non mycorrhizal maize plants through regulation of PIP aquaporins.  
Tipo de participación POSTER  
Congreso/Curso 2<sup>nd</sup> EMBO Conference Series on Plant Molecular Biology  
Lugar de celebración Cádiz (España)  
Fecha 2009

Autores Ruiz-Lozano J.M., *Bárzana G.*, Cano C., Bago A., Vernieri P. y Aroca R.  
Título Direct evidences of abscisic acid production by an arbuscular mycorrhizal fungus in monoxenic culture under salt stress.  
Tipo de participación POSTER  
Congreso/Curso XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV)  
Lugar de celebración Zaragoza (España)  
Fecha 2009

Autores *Bárzana G.*, Aroca R., Chaumont F. y Ruiz-Lozano J.M.

Título Regulation of aquaporins in maize plants by arbuscular mycorrhizal symbiosis in relation to drought stress tolerance.

Tipo de participación POSTER

Congreso/Curso XIX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV)

Lugar de celebración Castellón (España)

Fecha 2011

Tipo de participación Diálogo abierto y POSTER

Congreso/Curso Thematic school: Trans-membrane water transport in plants.

Lugar de celebración National Institute of Agronomic Research, Montpellier

Fecha Octubre 2011





Granada, a 6 de Abril de 2014

La doctoranda Gloria Bárzana González y los directores de la tesis D. Juan Manuel Ruiz Lozano y D. Ricardo Aroca, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización de este trabajo se han respetado los derechos de otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

**Director de la Tesis**

**Director de la Tesis**

Fdo.: Juan Manuel Ruiz Lozano

Fdo.: Ricardo Aroca Álvarez

**Doctoranda**

Fdo.: Gloria Bárzana González



*Quiero aprovechar este espacio para dar mi sincero agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a formarme y crecer como persona en estos 12 años que llevo en Granada (Madre mía!! ya??) y que han hecho posible que lleve a cabo esta tesis doctoral.*

*Gracias a Vane y Lucia, sin cuya ayuda nunca hubiera sacado adelante la carrera, a mi buen compañero Javi por mencionarme (fuera de plazo jiji) que había una oferta de beca en el grupo de “micorrizas” del CSIC, sin él nunca hubiera caído aquí! Y gracias a todos los amigos que he hecho en el camino...No hay espacio para tanta gente!*

*Gracias a Carmen LLuch, mi profesora de fisiología vegetal. Ella me dio mis primeros artículos en inglés y ¿Quién nos iba a decir, Carmen, que esos artículos serían la base de mi doctorado y le dedicaría al tema todo un apartado de la introducción? Gracias a ella pude hacer el master a pesar de las dificultades familiares y no tengo forma de agradecerse lo suficiente.*

*Doy las gracias a mis jefes Ricki y Juanma por creer en mí y ofrecerme la posibilidad de estar aquí hoy. A Jose, que no sólo me enseñó a hacer PCRs sino también a lidiar con la “mala follá” granaína (pura cepa), y a Sonia, por su inestimable colaboración. Gracias a todos los “micorrizos” hoy repartidos por el mundo. Gracias a Mónica, Michel y Sebas por hacerme reír tanto en el laboratorio y disfrutar de mi trabajo, a Nidia, con la que espero encontrarme pronto, y a tantos otros que han pasado por nuestras puertas de todas partes del mundo. Y doy las gracias a Patrick y Hagen, mis compañeros alemanes en Bélgica, que me traían pizzas y hasta un horno! cuando me tocaba quedarme hasta altas horas de la madrugada midiendo el tamaño de los #\*^;##\$\* huevos de rana...*

*Los años de tesis son francamente difíciles, hay momentos en los que pierdes la objetividad, el ánimo se desgasta, y uno llega a creer que no vale para esto, y es gracias a la gente que encuentras en el camino y te ayudan a levantarte que he llegado hoy aquí, así que mil millones de gracias a todos: A Sara (mi Xari), a mi Noe, a Pelu, Eli, Pablo, Fani, etc, etc, etc... ha sido un soplo de aire fresco teneros cerca! en especial a mi Ro, que desde el primer día que puse el pie en esta tierra extraña me acogió como una hermana, contagiándome de su entusiasmo y dándome fuerza para seguir en los momentos de flaqueza...*

*Gracias a Vincent, por devolverme la fe en mi trabajo y en lo que puede llegar a aportar a este mundo.*

*Y por supuesto, gracias de todo corazón a Nono, pilar de mi vida (no hay palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí) Y a sus padres, Cari y Antonio, que descumplen todos los tópicos de unos suegros y me han dado un verdadero hogar en Andalucía.*

---

## AGRADECIMIENTOS

*Gracias también a tía Tere y tía Pili, por estar siempre pendientes, siempre animando y dándome su apoyo.*

*Pero sin lugar a dudas, la verdadera razón por la que he llegado hasta aquí es gracias a mis padres. Mi padre me enseñó a creer en mí, a ser crítica y honesta. Me enseñó que el esfuerzo tiene recompensas y que se predica con el ejemplo, no con la palabra. Mi madre me enseñó a luchar por lo que creo sin dejarme amedrentar, y a confiar en mi instinto y mi corazón. Así, entre los dos hicieron el cocktail perfecto de razón y corazón, valores imprescindibles en Ciencia que intento aplicar en mi trabajo y en mi vida.*

*Ella siempre me decía que hay que acabar lo que se empieza y este es el punto final a una etapa que nunca hubiera cumplido sin su apoyo, sin su cariño y sin su fuerza. Estoy segura de que estaría muy orgullosa de mí.*

*A mi madre*



<b>I. INTERÉS CIENTÍFICO Y OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
1. INTERÉS CIENTÍFICO DEL ESTUDIO .....	3
2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	5
<b>II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS .....</b>	<b>7</b>
<b>1. EL AGUA</b>	
1.1. NATURALEZA DEL AGUA.....	9
1.2. IMPORTANCIA DEL AGUA PARA LAS PLANTAS .....	10
1.3. TRANSPORTE DE AGUA EN LAS PLANTAS	
<u>1.3.1. Potencial Hídrico</u> .....	11
<u>1.3.2. El continuo suelo-planta-atmósfera (CSPA)</u> .....	12
1.3.2.1. El agua en el suelo.....	13
1.3.2.2. El agua en las células.....	13
1.3.2.3. El agua en la atmósfera.....	14
1.3.2.4. El flujo de agua según el CSPA .....	14
1.3.2.5. El mecanismo de cohesión-adhesión-tensión.....	15
<u>1.3.3. Transporte de agua en la raíz</u>	
1.3.3.1. Cambios en el modelo CSPA.....	16
1.3.3.2. Modelo compuesto .....	16
<b>2. ACUAPORINAS</b>	
2.1. HISTORIA DEL DESCUBRIMIENTO .....	19
2.2. ACUAPORINAS EN PLANTAS	
<u>2.2.1. Importancia de las acuaporinas en las plantas</u> .....	20
<u>2.2.2. Diversidad de las acuaporinas de las plantas</u> .....	21
2.3. ESTRUCTURA DE LAS ACUAPORINAS	
<u>2.3.1. Estructura básica</u> .....	23
<u>2.3.2. Selectividad del poro</u>	
2.3.2.1. Filtros de selectividad.....	24
2.3.2.2. Análisis de la región Ar/R de las acuaporinas de maíz .....	25
2.3.2.3. Discrepancias en la selectividad de las acuaporinas.....	28
2.4. IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE ALGUNOS PRODUCTOS TRANSPORTADOS POR LAS ACUAPORINAS	
<u>2.4.1. Glicerol</u> .....	29
<u>2.4.2. Compuestos nitrogenados</u> .....	30



2.4.3. <u>Metales</u> .....	32
2.4.3.1. El Boro .....	32
2.4.3.2. El Silicio .....	33
2.4.4. <u>Peróxido de hidrógeno</u> .....	35
2.4.5. <u>Dióxido de carbono</u> .....	36

### 3. LA SEQUÍA

3.1. ESTRÉS HÍDRICO Y SU INFLUENCIA EN LA REGIÓN MEDITERRÁNEA .....	37
3.2. EFECTOS DE LA SEQUÍA EN PLANTAS .....	38
3.3. MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS FRENTE AL ESTRÉS HÍDRICO .....	39
3.3.1. <u>Adaptaciones morfológicas a la sequía</u> .....	41
3.3.2. <u>Adaptaciones fisiológicas a la sequía</u> .....	42
3.3.2.1. Ajuste osmótico y solutos compatibles. Prolina .....	42
3.3.2.2. Ajuste hormonal. Ácido Abscísico (ABA).....	44
3.3.3. <u>Adaptaciones bioquímicas: Sistemas antioxidantes</u> .....	49

### 4. LAS MICORRIZAS

4.1. GENERALIDADES .....	52
4.2. MICORRIZAS ARBUSCULARES	
4.2.1. <u>Importancia a nivel de planta, comunidad y ecosistema</u> .....	53
4.2.2. <u>Morfología, genética y reproducción</u> .....	55
4.2.3. <u>Ciclo de vida</u>	
4.2.3.1. Fase pre-simbiótica.....	56
4.2.3.2. Fase intraradical.....	59
4.2.3.3. Fase extraradical .....	61
4.3. FISIOLOGÍA DE LA SIMBIOSIS.....	61
4.3.1. <u>El fósforo</u> .....	62
4.3.2. <u>El nitrógeno</u> .....	63
4.3.3. <u>El carbono</u> .....	65
4.3.4. <u>El agua</u> .....	66
4.4. INCREMENTO DE LA RESISTENCIA AL ESTRÉS HÍDRICO EN LAS PLANTAS MICORRIZADAS .....	68
4.4.1. <u>Efectos sobre las relaciones hídricas de la planta</u>	
4.4.1.1. Control estomático y contenido hídrico foliar.....	68
4.4.1.2. Control del transporte de agua desde las raíces .....	69
4.4.2. <u>Efectos sobre la fotosíntesis y el crecimiento</u> .....	71
4.4.3. <u>Efectos sobre el metabolismo</u> .....	72

4.4.4. <u>Efectos hormonales: ABA</u> .....	73
4.4.5. <u>Efectos sobre los sistemas antioxidantes</u> .....	73

### III. MATERIAL Y MÉTODOS ..... 75

1. MATERIALES Y CONDICIONES DE CULTIVO	
1.1. <u>Sustratos utilizados</u> .....	77
1.2. <u>Preparación del sustrato</u> .....	77
1.3. <u>Condiciones de cultivo</u> .....	77
1.4. <u>Material biológico utilizado</u> .....	77
1.5. <u>Preparación de semillas y crecimiento de plántulas</u> .....	77
2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTOS	
2.1. <u>Diseño experimental</u> .....	78
2.2. <u>Tratamientos de inoculación</u> .....	78
2.3. <u>Tratamientos de riego</u> .....	79
2.4. <u>Tratamiento hormonal (ácido abcísico)</u> .....	79
2.5. <u>Tratamiento inhibidor de acuaporinas (azida sódica)</u> .....	79
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL POR OBJETIVOS	
3.1. <u>Objetivo específico 1</u> .....	80
3.2. <u>Objetivo específico 2</u> .....	81
3.3. <u>Objetivo específico 3</u> .....	81
3.4. <u>Objetivos específicos 4 y 5</u> .....	82
3.5. <u>Objetivo específico 6</u> .....	83
4. DETERMINACIÓN DE LA COLONIZACIÓN MICORRÍCICA	
4.1. <u>Tinción de los hongos MA</u> .....	83
4.2. <u>Cuantificación del porcentaje de longitud de raíz micorrizada</u> .....	84
5. DETERMINACIONES FISIOLÓGICAS	
5.1. <u>Producción de biomasa y peso seco</u> .....	85
5.2. <u>Conductancia estomática</u> .....	85
5.3. <u>Tasa de transpiración</u> .....	85
5.4. <u>Potencial hídrico foliar</u> .....	85
5.5. <u>Contenido hídrico relativo (CHR)</u> .....	85
5.6. <u>Eficiencia del fotosistema II (PSII)</u> .....	86
5.7. <u>Flujo hídrico (<math>J_v</math>) y conductancia osmótica radical (<math>L_o</math>)</u> .....	86
5.8. <u>Conductancia hidrostática radical (L)</u> .....	87
5.8.1. Medidor de flujo de alta presión (HPFM) .....	87
5.8.2. Cámara de Scholander .....	87
5.9. <u>Estimación del flujo relativo de agua por la vía apoplástica</u> .....	88

6.	DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	
6.1.	<u>Medida de actividades enzimáticas</u>	
6.1.1.	Extracción para cuantificación de actividades Enzimáticas .....	88
6.1.2.	Actividad superóxido dismutasa (SOD) .....	89
6.1.3.	Actividad ascorbato peroxidasa (APX).....	89
6.1.4.	Actividad glutatión reductasa (GR).....	90
6.2.	<u>Determinaciones analíticas</u>	
6.2.1.	Contenido en Prolina .....	90
6.2.2.	Contenido en azúcares solubles totales.....	91
6.2.3.	Daño oxidativo a lípidos de membrana (DOL).....	92
6.2.4.	Acumulación de peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	93
6.2.5.	Acumulación de ascorbato reducido .....	94
6.2.6.	Acumulación de glutatión total .....	94
6.2.7.	Medida del contenido en ABA .....	95
7.	ANÁLISIS MILECULARES	
7.1.	<u>Determinación de la expresión génica</u>	
7.1.1.	Extracción de ARN.....	96
7.1.2.	Cuantificación y comprobación de la calidad de ARN.....	97
7.1.3.	Tratamiento del ARN con DNasa .....	98
7.1.4.	Electroforesis de ARN en gel de agarosa.....	98
7.1.5.	Transcripción inversa (RT) <i>in vitro</i> .....	99
7.1.6.	Diseño de cebadores para análisis de expresión génica de las acuaporinas .....	100
7.1.7.	Comprobación de cebadores mediante sistemas Bioinformáticos .....	102
7.1.8.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	102
7.1.9.	Electroforesis de ADN en gel de agarosa .....	103
7.1.10.	PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) .....	104
7.2.	<u>Técnicas de cuantificación de proteínas</u>	
7.2.1.	Extracción de microsomas .....	105
7.2.2.	Contenido de proteínas totales de membrana.....	106
7.2.3.	Electroforesis en gel desnaturalizante de Poliacrilamida .....	106
7.2.4.	Tinción de proteínas en el gel .....	107
7.2.5.	Diseño de anticuerpos para el análisis del contenido en acuaporinas específicas .....	107
7.2.6.	Técnica de Western Blot para la cuantificación de proteínas específicas .....	108
7.2.7.	Técnica ELISA para la cuantificación de proteínas específicas .....	110

7.3. <u>Técnica de inmuno-localización de proteínas <i>in situ</i></u> .....	111
7.4. <u>Técnica de caracterización funcional de acuaporinas mediante expresión heteróloga en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i></u> .....	112
7.4.1. Preparación del gen de interés para su inserción en un vector de clonación.....	112
7.4.2. Linearización del vector de clonación .....	113
7.4.3. Ligación del gen al vector de clonación linearizado .....	113
7.4.4. Transformación de células de <i>Escherichia coli</i> multiplicación del plásmido .....	114
7.4.5. Verificación de la presencia del inserto de interés en el plásmido .....	114
7.4.6. Multiplicación, extracción y purificación del plásmido seleccionado .....	116
7.4.7. Linearización del plásmido de ADN purificado .....	116
7.4.8. Transcripción in vitro.....	116
7.4.9. Obtención y preparación de ovocitos de <i>X. laevis</i> .....	117
7.4.10. Inyección de ARNc en los ovocitos de <i>X. laevis</i> .....	119
7.4.11. Medidas del transporte de agua y diversos solutos a través de las acuaporinas .....	119
7.5. <u>Técnica de caracterización funcional de acuaporinas mediante expresión heteróloga en levaduras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u> .....	121
7.5.1. Preparación de los vectores con el inserto de ADN del gen de interés.....	121
7.5.2. Transformación de levaduras competentes con el vector de interés.....	122
7.5.3. Test de expresión heteróloga en levaduras .....	123
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	124
<b>IV. CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>125</b>
1. ESTUDIO DEL EFECTO LOCAL Y/O SISTÉMICO DE LA MICORRIZACIÓN SOBRE LA OSMOREGULACIÓN, ACUMULACIÓN DE ACUAPORINAS Y SISTEMAS ANTIOXIDANTES DE PLANTAS DE MAÍZ SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO.	
1.1. <u>Introducción</u> .....	127
1.2. <u>Objetivo</u> .....	129
1.3. <u>Diseño experimental</u> .....	129
1.4. <u>Resultados</u>	
1.4.1. Colonización radical de plantas de maíz.....	130

1.4.2.	Estatus hídrico y fisiología de plantas de maíz .....	130
1.4.3.	Acumulación de acuaporinas en plantas de maíz .....	132
1.4.4.	Acumulación de osmolitos (prolina y azúcares solubles) en plantas de maíz .....	135
1.4.5.	Daño oxidativo a lípidos en plantas de maíz .....	137
1.4.6.	Acumulación de peróxido de hidrógeno en plantas de maíz .....	138
1.4.7.	Actividades enzimáticas y compuestos antioxidantes en plantas de maíz .....	139
1.5.	<u>Discusión</u> .....	143
<b>V.</b>	<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>151</b>
2.	ESTUDIO DEL EFECTO COMBINADO DE LA APLICACIÓN DE ABA EXÓGENO Y LA SIMBIOSIS MA SOBRE LA EXPRESIÓN Y ACUMULACIÓN DE ACUAPORINAS DE MAÍZ Y SU IMPLICACIÓN EN LAS PROPIEDADES HIDRÁULICAS DE LA RAÍZ EN PLANTAS SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO.	
2.1.	<u>Introducción</u> .....	153
2.2.	<u>Objetivo</u> .....	155
2.3.	<u>Diseño experimental</u> .....	155
2.4.	<u>Resultados</u>	
2.4.1.	Crecimiento y colonización radical de plantas de maíz .....	156
2.4.2.	Propiedades hidráulicas de las raíces de maíz .....	157
2.4.3.	Estatus hídrico y transpiración de plantas de maíz .....	158
2.4.4.	Acumulación de prolina y ABA en plantas de maíz .....	159
2.4.5.	Expresión de PIPs en plantas de maíz .....	160
2.4.6.	Acumulación de PIPs en plantas de maíz .....	164
2.5.	<u>Discusión</u> .....	165
<b>VI.</b>	<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>171</b>
3.	ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SIMBIOSIS MICORRÍFICO ARBUSCULAR SOBRE LA CONTRIBUCIÓN RELATIVA DE LAS DISTINTAS VÍAS DE TRANSPORTE DE AGUA EN LA RAÍZ DE LA PLANTA HOSPEDADORA.	
3.1.	<u>Introducción</u> .....	173
3.2.	<u>Objetivo</u> .....	174
3.3.	<u>Diseño experimental</u>	
3.3.1.	Experimento 1 .....	174
3.3.2.	Experimento 2 .....	175

<u>3.4. Resultados</u>	
3.4.1. Colonización radical de plantas de maíz y tomate.....	175
3.4.2. Crecimiento y estatus hídrico de plantas de maíz y tomate.....	176
3.4.3. Propiedades hidráulicas de la raíz de plantas de maíz y tomate	
3.4.3.1. Experimento 1.....	177
3.4.3.2. Experimento 2.....	178
<u>3.5. Discusión</u> .....	180

## **VII. CAPÍTULO 4..... 183**

4. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ACUAPORINAS DE MAÍZ REGULADAS POR LA SIMBIOSIS MICORRÍFICO ARBUSCULAR Y SUS POSIBLES IMPLICACIONES EN EL DESARROLLO Y FISIOLÓGÍA DE LAS PLANTAS EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO.	
<u>4.1. Introducción</u> .....	185
<u>4.2. Objetivo</u> .....	187
<u>4.3. Diseño experimental</u> .....	187
<u>4.4. Resultados</u>	
4.4.1. Crecimiento y colonización radical de plantas de maíz .....	188
4.4.2. Propiedades hidráulicas de las raíces de maíz.....	188
4.4.3. Expresión de las acuaporinas en raíces de maíz.....	190
4.4.4. Acumulación de acuaporinas en raíces de maíz.....	195
4.4.5. Caracterización funcional de acuaporinas	
4.4.5.1. Transporte de agua.....	196
4.4.5.2. Transporte de glicerol .....	198
4.4.5.3. Transporte de compuestos nitrogenados.....	198
4.4.5.4. Transporte de metaloides .....	199
4.4.5.5. Transporte de peróxido de hidrógeno .....	201
<u>4.5. Discusión</u> .....	202

## **VIII. CAPÍTULO 5..... 215**

5. INMUNO-LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ACUAPORINAS DE MAÍZ REGULADAS POR LA SIMBIOSIS MICORRÍFICO ARBUSCULAR EN CONDICIONES DE DÉFICIT HÍDRICO.	
<u>5.1. Introducción</u> .....	217
<u>5.2. Objetivo</u> .....	218
<u>5.3. Diseño experimental</u> .....	218

5.4. <u>Resultados</u>	
5.4.1. Crecimiento y colonización radical de plantas de maíz .....	218
5.4.2. Estatus hídrico de plantas de maíz .....	219
5.4.3. Inmuno-localización de la acuaporina ZmPIP1;3/ PIP1;4 en raíces de plantas de maíz inoculadas con <i>R. intraradices</i> .....	219
5.4.4. Inmuno-localización de la acuaporina ZmPIP2;1/ PIP2;2 en raíces de plantas de maíz inoculadas con <i>R. intraradices</i> .....	221
5.4.5. Inmuno-localización de la acuaporina ZmTIP1;1 en raíces de plantas de maíz inoculadas con <i>R. intraradices</i> .....	223
5.5. <u>Discusión</u> .....	224
<b>IX. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>227</b>
<b>X. CONCLUSIONES.....</b>	<b>239</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>243</b>

# I. INTERÉS CIENTÍFICO Y OBJETIVOS

---





## 1. INTERÉS CIENTÍFICO DEL ESTUDIO

La correcta utilización y explotación del potencial de la simbiosis micorrízico arbuscular (simbiosis MA) en el contexto de una moderna agricultura sostenible se considera de vital importancia y requiere de una investigación básica apropiada. Esta investigación contribuirá a mejorar el desarrollo vegetal en ambientes afectados por sequía como las zonas semiáridas de la cuenca mediterránea en las que la disponibilidad de agua para la planta es limitada, así como a incrementar la producción agrícola desde la perspectiva de la conservación del medio ambiente y el uso integral del territorio.

En la actualidad, se siguen desconociendo muchos de los mecanismos por los que la simbiosis MA altera la respuesta de la planta frente al déficit hídrico y mejora su tolerancia al mismo. Como queda reflejado en la introducción de esta Tesis, la simbiosis micorrízica protege a la planta frente a los efectos del déficit hídrico actuando sobre cinco aspectos fundamentales de su fisiología: las relaciones hídricas de la planta, la fotosíntesis, la osmoregulación, la regulación hormonal (especialmente la del ABA) y los sistemas antioxidantes. Muchos de estos efectos tienen una clara relación con la expresión, acumulación y/o actividad de las acuaporinas, ya que éstas aparecen involucradas en todos los procesos relacionados con las propiedades hídricas de las plantas. Además, el descubrimiento de un número cada vez mayor de moléculas diversas con importancia fisiológica para las plantas cuyo transporte ocurre a través de las acuaporinas, abren las puertas a una nueva forma de entender la relevancia de estas proteínas, convirtiéndose en punto clave en el estudio fisiológico y molecular del funcionamiento de las plantas y su respuesta al estrés hídrico.

El presente estudio pretende combinar e integrar los estudios fisiológicos con los bioquímicos y moleculares para elucidar cómo las micorrizas modifican esos aspectos fisiológicos fundamentales de la resistencia al estrés hídrico y cómo se relacionan con el control de las acuaporinas.

La regulación de la tolerancia al estrés hídrico de las plantas micorrizadas está altamente relacionada con el control de las actividades osmoreguladoras y antioxidantes de las mismas. Los estudios llevados a cabo hasta la fecha presentan variaciones en los resultados en función de los compuestos analizados y de la parte concreta de la planta considerada en el análisis. Así pues, en primer lugar encontramos necesario elucidar si el efecto de la micorrización sobre estos sistemas de protección se produce sólo a nivel local o de manera sistémica a nivel de toda la planta. Para ello se llevará a cabo el análisis de los procesos bioquímicos y compuestos implicados en estos sistemas de protección. También trataremos de obtener información sobre el control de la presencia y actividad de las acuaporinas más importantes relacionadas con el estatus hídrico de la planta.

En segundo lugar, los estudios llevados a cabo hasta la fecha sugieren que el ácido abscísico (ABA) podría ser fundamental en la regulación de la respuesta al estrés a nivel de toda la planta. Se

ha puesto de manifiesto la fuerte influencia que la simbiosis MA puede tener sobre el contenido y la regulación de la señal generada por ABA en condiciones de estrés hídrico, ya que ambos factores parecen influir sobre los mismos procesos y mecanismos de tolerancia al estrés en plantas. Tanto el ABA como la simbiosis MA afectan especialmente a las relaciones hídricas de la planta, en las que las acuaporinas juegan un papel fundamental. Así pues, nos hemos propuesto analizar en detalle el efecto combinado de la simbiosis MA y de la aplicación de ABA sobre plantas sometidas a estrés hídrico y estudiar la relación que existe entre ambos factores y la regulación de las acuaporinas, como piezas clave en el control del transporte de agua a nivel de toda la planta en condiciones de estrés hídrico.

En tercer lugar, dados los efectos de la micorrización sobre las propiedades hidráulicas de la planta, y dada la controversia que existe acerca de las implicaciones que las distintas vías de transporte de agua pueden estar jugando en el transporte total de agua en la planta en condiciones de sequía, encontramos imprescindible determinar claramente la influencia de la micorrización sobre las distintas vías de transporte de agua en la planta en condiciones de buen regadío y de estrés hídrico.

Por último y puesto que las acuaporinas parecen estar implicadas en un amplio rango de procesos fisiológicos de las plantas, proponemos una investigación que responde al objetivo de determinar, tanto en condiciones óptimas como de sequía, de qué forma la simbiosis MA modula la totalidad de las acuaporinas presentes en la planta. Hay poca información sobre la influencia de la simbiosis MA sobre las acuaporinas y los resultados obtenidos son en algunos casos contradictorios. Esto es debido a que la importancia de estas proteínas como canales de membrana para un importante número de compuestos sólo se ha puesto de manifiesto en los últimos años. No obstante, dado que en plantas las acuaporinas constituyen una familia multigénica y que cada gen parece tener una actividad específica dependiendo del tejido en que se expresa y de las condiciones ambientales, hemos considerado necesario determinar la influencia de la simbiosis MA sobre la expresión de todos y cada uno de los genes de acuaporinas para poder identificar así aquellos genes que resulten claves en la respuesta de la planta micorrizada al déficit hídrico. Analizaremos también su capacidad para transportar diversos solutos que puedan tener una influencia en la diferente respuesta de las plantas MA con respecto a las plantas no MA. Finalmente, estudiaremos la presencia y localización subcelular de aquellas que resulten más relevantes en estas condiciones.

Puesto que hemos visto que las especies implicadas en la simbiosis definen las bases de las respuestas al estrés impuesto y que, por ello, los resultados no son extrapolables a otras especies, hemos querido utilizar para este proyecto de investigación una de las plantas de mayor interés agrícola, el maíz (*Zea mays L.*), que constituye la fuente de alimento básica para millones de

personas en todo el mundo (Heng et al., 2009) y cumple, además, varios requisitos indispensables para abordar este proyecto:

- 1.- Es una planta micotrófica en la que se alcanzan elevados niveles de colonización (Boomsma y Vyn, 2008).
- 2.- En pruebas previas, esta planta ha mostrado ser sensible al estrés hídrico y a la micorrización, mostrando variaciones fisiológicas claras y siendo adecuada para las medidas de las relaciones hídricas y sistemas de protección frente al estrés (Boomsma y Vyn, 2008).
- 3.- Se han descrito ya todas las acuaporinas presentes en su genoma (Chaumont et al., 2001).

Como simbionte fúngico hemos escogido uno de los más extendidos en todos los ecosistemas terrestres, el hongo MA *Rhizophagus intraradices*, anteriormente conocido como *Glomus intraradices*, que cumple varios requisitos indispensables:

- 1.- Es un hongo MA de baja especificidad, tanto en hospedadores como en hábitats.
- 2.- Tiene alta capacidad infectiva incluso en suelos degradados o sometidos a laboreo.
- 3.- Genera efectos fenotípicos claramente visibles en el hospedador tanto en condiciones óptimas como en situaciones de estrés.

Con este estudio, se pondrán las bases que permitan obtener un máximo rendimiento de la simbiosis MA bajo condiciones ambientales de limitación hídrica y permitirá, también, una futura manipulación de los genes de acuaporinas a fin de obtener plantas más resistentes a dicho estrés.

## 2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

### **Objetivo Principal:**

El objetivo principal de esta investigación es determinar cómo actúa la simbiosis micorrízico arbuscular sobre los distintos mecanismos de tolerancia al estrés hídrico de la planta hospedadora, fundamentalmente los relacionados con la regulación de las acuaporinas, y la repercusión que dicha regulación tiene sobre el estatus hídrico y tolerancia de la planta frente al mismo.

### **Objetivos específicos:**

1. Estudiar el efecto local y/o sistémico de la simbiosis MA sobre la osmoregulación, los sistemas antioxidantes y la acumulación de acuaporinas de plantas de maíz sometidas a estrés hídrico.

- 2.** Establecer el efecto combinado de la simbiosis MA y del ABA sobre la regulación de la expresión de aquellas acuaporinas con mayor incidencia sobre el transporte de agua y su repercusión sobre la conductividad hidráulica de la raíz de las plantas de maíz.
- 3.** Determinar la influencia de la simbiosis MA sobre la contribución relativa de las distintas vías de transporte de agua en las raíces de plantas de maíz sometidas a sequía.
- 4.** Estudiar el efecto de la simbiosis MA sobre la expresión de la totalidad de los genes de acuaporinas de maíz y sobre la acumulación de las correspondientes proteínas, en relación con las respuestas de la planta al déficit hídrico.
- 5.** Caracterizar funcionalmente a aquellas acuaporinas que muestren regulación por la simbiosis MA en condiciones de déficit hídrico.
- 6.** Estudiar el efecto de la micorrización sobre la localización de algunas de las acuaporinas de mayor interés para el transporte de agua y solutos en las raíces de plantas de maíz.

## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

---



# 1. EL AGUA

(Cuadros de Claude Monet)



## 1.1. NATURALEZA DEL AGUA

El agua es el componente mayoritario de los seres vivos, representando en torno al 90% del contenido celular. La importancia del agua en los organismos vivos resulta de sus exclusivas propiedades físicas y químicas. La molécula de agua está compuesta por dos átomos de hidrógeno unidos a un átomo central de oxígeno (Gay-Lussac y Von Humboldt, 1805) formando un ángulo de  $104,5^\circ$ . Esta particularidad hace que los electrones que forman cada enlace covalente estén más cerca del núcleo del oxígeno, generando una carga negativa y dejando los dos núcleos de hidrógeno con cargas positivas hacia el exterior formándose un dipolo (Hopkins y Hüner, 2009). El agua adquiere por ello una de las constantes dieléctricas más altas que se conocen ( $78.5$  a  $T_{amb.}$  y  $P_{atm.}$ ) (Uematsu y Franck, 1980) lo que determina su capacidad para unirse a otras moléculas, ya sean de agua u otros solutos, fundamentalmente electrolitos, estableciendo puentes de hidrógeno en los que la porción (+) de la molécula de agua es atraída hacia la superficie (-) y viceversa. Esto hace que cada ion sea rodeado por un escudo de moléculas de agua, que mantienen los iones de carga opuesta separados, convirtiéndose así en el **solvente universal** (Hopkins y Hüner, 2009) y determinando en buena medida las **estructuras tridimensionales** de las macromoléculas biológicas (Levy y Onuchic, 2006).

Las propiedades físicas del agua le permiten mantenerse en **estado líquido** a temperatura ambiente. Posee un **calor latente de vaporización** muy alto ( $2.452$  J/g), así como elevado **calor de fusión** ( $335$  J/g), razones que hacen que la evaporación del agua tenga un pronunciado efecto refrigerante y la condensación un efecto calentador (Hopkins y Hüner, 2009). También tiene un **coeficiente de viscosidad** muy bajo, permitiendo que el agua fluya con facilidad. Además tiene una tensión superficial más alta que otros líquidos, presentando una elevada **fuerza de cohesión** entre sus moléculas y una elevada **fuerza de adhesión** a las estructuras que la rodean, que sirve para explicar el ascenso del agua en los árboles de gran altura. (Para revisión, leer Kramer y Boyer, 1995).



## 1.2. IMPORTANCIA DEL AGUA PARA LAS PLANTAS



La distribución de las plantas sobre la superficie de la tierra está determinada por la cantidad y distribución del agua y la temperatura (Kramer y Boyer, 1995).

El agua es el principal **constituyente** de las plantas, llegando a ser más del 70% del peso fresco en plantas no leñosas y más del 50% en plantas leñosas, aunque su contenido varía en función del estado fisiológico, la actividad metabólica y el tejido (Ruiz-Lozano et al., 2012). Sus propiedades como **solvente** permiten el transporte masivo de gases, minerales, iones y solutos. La alta permeabilidad de la pared celular y las membranas del protoplasma permiten la formación de una fase líquida, que se extiende a través de la planta, sirviendo de **medio** para que ocurra la translocación de los elementos disueltos a través de toda la planta (Azcon-Bieto y Talon, 2002). El agua es además el medio en el que se producen todos los procesos metabólicos y fisiológicos y es **sustrato** de algunos de ellos como la fotosíntesis. También se genera como **producto** de reacciones químicas y hoy día se reconoce su papel tanto en la estructura secundaria de macromoléculas como en su dinámica y actividad, pasando a considerarse como una **biomolécula activa** en sí misma (Chaplin, 2006).

Por último, el agua mantiene el **turgor celular**. La turgencia es esencial para el crecimiento y alargamiento celular siendo el motor de crecimiento de la planta, y también es importante para la apertura de los estomas, el movimiento de las hojas y otras estructuras especializadas (Kramer y Boyer, 1995; Hopkins y Hüner, 2009).

A pesar del alto contenido en agua de las plantas, la mayor parte de ella, que se absorbe a través de las raíces, se pierde en forma de vapor de agua mediante el proceso de **transpiración**. La transpiración es una consecuencia directa de la apertura de los estomas. A medida que el dióxido de carbono necesario para la fotosíntesis penetra en las hojas por los estomas, el vapor de agua sale a través de estos. La pérdida de agua es un hándicap para las plantas pero también suministra la fuerza motriz para la absorción de agua a través de las raíces y es un mecanismo para el control de su temperatura (Larcher, 2003). Esto permite mantener una temperatura celular adecuada para llevar a cabo con eficiencia las reacciones enzimáticas que permiten la supervivencia de las plantas.

### 1.3. TRANSPORTE DE AGUA EN LAS PLANTAS



#### 1.3.1. POTENCIAL HÍDRICO

Para entender el sistema de transporte de agua desde el suelo y a través de la planta hasta la atmósfera es necesario conocer algunos conceptos básicos relacionados con la termodinámica. A principios del siglo XX se propone que las relaciones hídricas de la planta deben ser tratadas en términos de **energía libre** (para revisión, leer Kramer, 1988) que se define como la energía disponible para producir un trabajo (Gibbs, 1931). De esta manera se establece que el **potencial químico** de una sustancia bajo cualquier condición es la energía libre por mol de esa sustancia. Puesto que el valor absoluto del potencial químico resulta difícil de medir se recurre a la medida de las diferencias de potencial, de esta forma surge el concepto de **potencial hídrico ( $\psi$ )** que se mide en unidades de presión. El potencial hídrico se define como la energía libre por unidad de volumen de agua (Boyer, 1995), en la que se toma como referencia el potencial hídrico del agua pura, que se asume que es 0 a temperatura ambiente y presión atmosférica, y se define así la ecuación (en la que se asumen condiciones isotérmicas):

$$\Psi = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g + \Psi_m$$

Donde,

$\Psi_s$ = potencial osmótico o de solutos: determinado por la presencia de sustancias osmóticamente activas disueltas en el agua y tiene valores negativos.

$\Psi_p$ = potencial de presión: representa la presión del agua contenida en la célula sobre las paredes celulares. Es siempre positivo en las células vivas debido a la turgencia celular y su valor mínimo es 0 (célula plasmolizada).

$\Psi_g$ = potencial gravitacional: es consecuencia de la diferencia en energía potencial producida por la altura y representa la fuerza con que la gravedad afecta el movimiento del agua.

$\Psi_m$ = potencial matricial: hace referencia a la retención del agua provocada por las superficies de componentes celulares y paredes y es siempre negativo.

De entre estos factores, el potencial gravitacional sólo es importante en plantas muy altas (5 o 10m) o en suelos muy profundos (Conner et al., 1977), por lo que no se tiene en consideración en células o plantas pequeñas; y el potencial matricial, es muy bajo en relación a los potenciales de solutos y presión, por lo que tiende a no considerarse importante a nivel celular y suele eliminarse

de la ecuación (Tyree y Jarvis, 1982). De esta forma acabamos definiendo el potencial hídrico de las plantas como:

$$\Psi = \Psi_s + \Psi_p$$

El agua fluye de manera pasiva desde las zonas de mayor presión a zonas de menor presión a favor del gradiente de potencial hídrico.

Es necesario aclarar que el agua que se mueve en respuesta a un gradiente de presión se conoce como “flujo masivo”, que es el que viene definido por el potencial hídrico. Tradicionalmente, se considera que existen, además del flujo masivo, otros procesos de transporte de agua en las plantas como son la difusión (movimiento pasivo debido a la agitación térmica de las moléculas) y la ósmosis (movimiento del agua desde una solución menos concentrada a una más concentrada a través de membranas semipermeables). Este último (flujo osmótico) se debe a diferencias en el  $\Psi_s$  y se encuentra modificado en el sistema de membranas de las células por la participación de canales de apertura y cierre controlados como son las acuaporinas, que se discutirán en apartados posteriores.

Los conceptos básicos de potencial hídrico y de flujo masivo han permitido la comprensión del movimiento de agua en suelo, plantas y atmósfera de una manera simplista y efectiva, y es la base de la teoría del movimiento del agua según el continuo suelo-planta-atmósfera (CSPA).

### 1.3.2. EL CONTINUO SUELO-PLANTA-ATMÓSFERA (CSPA)

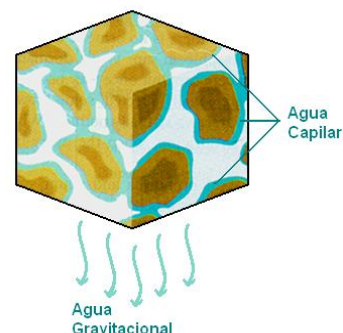
En 1948, Van den Honert introduce la idea de que el movimiento del agua en las plantas podría ser considerado análogo al flujo eléctrico y por tanto cumpliría las leyes de Ohm's. Considera así la planta y los factores que la afectan en términos de fuerzas motrices y resistencias hidráulicas encadenadas. Según este concepto, el flujo del agua en el continuo suelo-planta-atmósfera se produciría siguiendo las diferencias de potencial hídrico a través de los distintos componentes con sus respectivas resistencias (oposición al flujo) siguiendo la ecuación general:

$$\text{Flujo} = \text{diferencia de } \Psi / \text{resistencia}$$

Esta ecuación general se aplica en función de los distintos segmentos que atraviesa el agua en su flujo (suelo, raíz, tallo, hoja y atmósfera) y proporciona un sistema sencillo para el estudio del movimiento del agua a través de una planta y para analizar la manera en que diversos factores ambientales afectan a ésta, ya que modifican la resistencia de los distintos segmentos al flujo del agua.

### 1.3.2.1. El agua en el suelo

El suelo consta de una matriz formada por infinidad de partículas de diversos tamaños y composición química que dejan huecos que pueden contener agua o aire en distinta proporción. Cuando el suelo está totalmente hidratado, el agua que es capaz de retener frente a la fuerza de la gravedad y la fuerza con que la retenga dependerá de la naturaleza química de las partículas que lo componen y definirá su potencial matricial, que es el componente principal del  $\Psi$  del suelo (Boyer, 1995). Se denomina **agua gravitacional** a aquella que se infiltra por gravedad a capas más profundas. Una vez que un suelo drena por gravedad se considera que su  $\Psi$  es 0 y el agua que ha quedado retenida por la fuerza matricial de las partículas del suelo (denominada **agua capilar**) es el agua disponible para su utilización por las plantas. La cantidad de agua contenida en este momento es lo que se conoce como **Capacidad de Campo** (Israelson y West, 1922). A medida que el agua va disminuyendo en el suelo por absorción de las raíces o evaporación, su  $\Psi$  disminuye, hasta que llega un momento en que el agua que queda no puede ser utilizada por las plantas. Este punto se conoce como **punto de marchitamiento permanente (pmp)** (Slatyer, 1967) y para la mayoría de las plantas corresponde con un  $\Psi$  del suelo de aproximadamente -1.6 MPa. Puesto que el flujo de agua desde el suelo a la raíz se define por  $(\Psi_{\text{suelo}} - \Psi_{\text{raíz}}) / \text{resistencia}$ , a medida que la sequía afecta al suelo, su  $\Psi$  disminuye y su resistencia al flujo aumenta, disminuyendo el flujo total.



### 1.3.2.2. El agua en las células

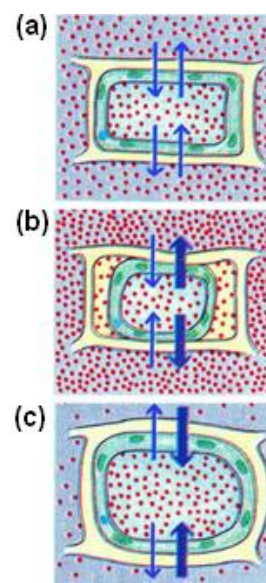
El agua en las células está presente tanto en la pared celular como en el protoplasto, principalmente en la vacuola. A nivel de potencial hídrico, los flujos de entrada y salida de agua en la célula vegetal dependen de la diferencia de potencial con el medio externo. Así,

a) Si  $\Psi_{\text{interno}} = \Psi_{\text{externo}}$ , no hay flujo neto

b) Si  $\Psi_{\text{interno}} > \Psi_{\text{externo}}$ , habrá una salida neta de agua produciéndose el fenómeno conocido como plasmólisis. En este caso el valor de  $\Psi_p$  en la ecuación general será 0.

c) Si  $\Psi_{\text{interno}} < \Psi_{\text{externo}}$ , habrá una entrada neta de agua hacia el protoplasto generándose turgor celular. El valor de  $\Psi_p$  será  $>0$ .

Estos valores del potencial de presión modifican el  $\Psi$  total, aunque su valor al tener en cuenta el  $\Psi_s$  sigue siendo negativo. La regulación de los distintos componentes del  $\Psi$  interno permite ajustes entre las distintas



partes de la planta que favorezcan el flujo de agua mediante el ajuste en el contenido de solutos en las células, tema que será discutido en apartados posteriores.

En el sistema suelo-planta-atmósfera nos encontramos que los valores de potencial hídrico, de forma general, son los que se representan en la siguiente figura:

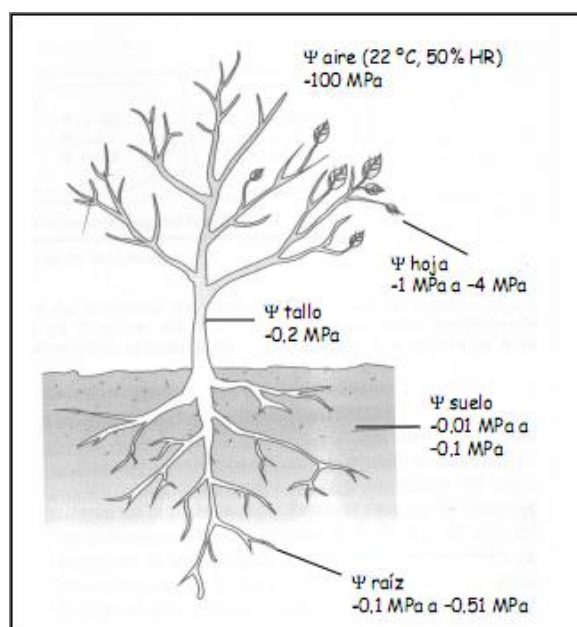


Imagen tomada de Azcón-Bieto y Talon (2002)

Esta diferencia de potenciales permite el flujo a favor de gradiente de potencial hídrico del agua desde la raíz hacia la parte aérea de la planta (Azcon-Bieto y Talon, 2002).

### 1.3.2.3. El agua en la atmósfera

El potencial hídrico atmosférico está en estrecha relación con la **humedad relativa del aire (HR)** que se define como la relación entre la cantidad de vapor de agua presente en una masa de aire y la cantidad máxima de vapor de agua que dicha masa de aire podría admitir a una temperatura dada. La humedad relativa en las cavidades subestomáticas que se encuentran en el parénquima lagunar del mesófilo foliar está próxima a saturación, mientras que la HR del aire exterior rara vez lo está. Esto provoca una pérdida inevitable y constante de agua desde la hoja hacia el exterior a favor de gradiente que se conoce como transpiración, que es la fuerza motriz fundamental que genera el transporte de agua desde la raíz (Aroca et al., 2012).

### 1.3.2.4. El flujo de agua según el CSPA

El potencial hídrico atmosférico es significativamente menor que el de cualquier otra parte del continuo suelo-planta-atmósfera, generando una pérdida constante de agua a través de los estomas. A medida que este agua se evapora por transpiración, el  $\Psi$  de las cámaras subestomáticas disminuye, lo que aumenta la diferencia de potencial con las paredes de las células adyacentes que

en consecuencia aportan agua (Boyer, 1985), la cual pasa de su forma líquida a vapor, saturando de nuevo las cavidades subestomáticas (Larcher, 1995).

Esta diferencia de potencial se transmite así a través de las células adyacentes del mesófilo foliar hasta llegar a los vasos xilemáticos. Siempre a favor de este gradiente, el agua sale del interior de los elementos xilemáticos, generando en ellos una presión negativa o tensión que se transmite a lo largo del xilemaprovoando el ascenso de la columna de agua según el modelo conocido como mecanismo de la cohesión-adhesión-tensión (Dixon y Joly, 1894), y provocando la caída del  $\Psi$  en el xilema de la raíz. En el cilindro radical formado por las distintas “capas” celulares (en maíz: exodermis, cortex, endodermis, parénquima medular o estela, protoxilema y metaxilema) (Steudle y Peterson, 1998), el potencial hídrico sufre caídas que se van transmitiendo de manera seriada a través de las distintas capas celulares con sus respectivas oposiciones al flujo (resistencias) hasta llegar a la capa externa en contacto con el suelo donde la diferencia de potencial entre raíz y suelo permite la entrada de agua al sistema planta (Aroca et al., 2012). Así, mientras haya transpiración, el  $\Psi$  de la raíz se mantendrá más bajo que en el suelo y la absorción de agua se producirá espontáneamente.

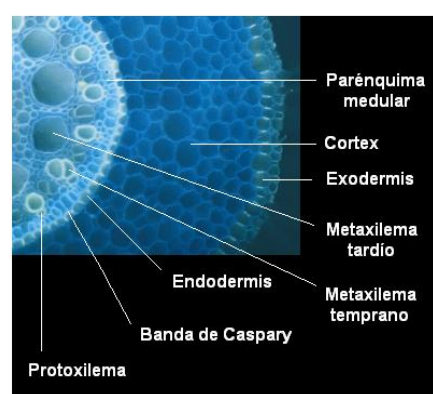


Imagen tomada de Steudle and Peterson, 1998.

### 1.3.2.5. El mecanismo de cohesión-adhesión-tensión

Las células del xilema (vasos y traqueidas) son células que pierden su citoplasma en el proceso de maduración y poseen paredes de celulosa rígidas con abundantes conexiones entre ellas que permiten el paso del agua como si fueran “tuberías” (Dixon y Joly, 1894). El agua de estos “tubos” está sometida a la presión negativa (tensión) generada por la transpiración y transmite esta tensión a través de la columna de agua sin que ésta pierda el contacto con las paredes del tubo (adhesión) y gracias a la fuerza de cohesión entre las moléculas de agua (Steudle, 2001). Este sistema funciona mientras el agua forme un continuo, pero la cohesión puede romperse cuando los gases disueltos, bajo exceso de presión, forman burbujas que interrumpen la columna de agua, fenómeno que se conoce como **cavitación o embolismo** (Vilagrosa et al., 2012). La cavitación puede ocurrir por diversas causas como un exceso de tensión xilemática debido a un aumento de transpiración o un descenso de agua en el suelo, congelación y descongelación del agua (Davis et al., 1999) o por acción de patógenos (Solla y Gil, 2002). El agua del vaso bloqueado puede moverse entonces lateralmente hacia vasos contiguos y las burbujas pueden re-disolverse por disminución de la tensión o por presión radical durante la noche (Taiz y Zeiger, 2006).



### 1.3.3. TRANSPORTE DE AGUA EN LA RAÍZ

#### 1.3.3.1. Cambios en el modelo CSPA

Como hemos visto en el apartado anterior, la teoría del CSPA representa de manera simplista las fuerzas físicas que permiten el transporte de agua en las plantas. En este sistema, la fuerza promotora del transporte radial del agua a través de las distintas “capas celulares” de la raíz es generalmente el gradiente de presión hidrostática o potencial hídrico. Sin embargo, en ausencia de transpiración, la situación cambia, ya que se pierde la tensión negativa, y la raíz pasa a comportarse más como un **osmómetro** que como una resistencia hidráulica (Steudle, 2000). La idea de la raíz como osmómetro fue propuesta por Weatherley (1982) y fue definida como “modelo de membrana simple equivalente” (Dainty, 1985) y se basa en que la planta ha de tener mecanismos que regulen el aporte masivo de solutos, que acompañan al agua en su camino desde el suelo hasta el xilema. En este sentido la endodermis radicular hace de “membrana semipermeable” que permite el paso de agua de manera pasiva por el fenómeno físico de ósmosis, pero no permite el paso de solutos (Steudle, 1994), que deben ser transportados activamente por la planta. La carga de solutos continuada hacia el fluido xilemático generaría entonces un flujo de agua a través de la endodermis por gradiente osmótico generando una presión radical positiva. Se genera así la fuerza de ascenso del agua hacia la parte aérea, sustituyendo a la succión (tensión negativa) de la transpiración. De esta manera surge el concepto de **conductancia osmótica radical ( $L_o$ )** que tendría importancia fundamental en los casos de cierre estomático que se producen diariamente (por la noche) o a consecuencia de las condiciones ambientales (estrés osmótico).

Hay que tener en cuenta además la formación de la **banda de Caspary**, barrera impermeable de suberina y/o lignina que se forma en las paredes de las células de la endodermis y, en ocasiones, también en la exodermis. Estas bandas suponen una barrera para el paso de agua y solutos a través de los espacios intercelulares, rompiendo así el flujo masivo producido por la diferencia de potencial hídrico.

Toda esta nueva visión global empuja a plantearse que en la raíz, las resistencias al paso del agua difieren en función de sus distintas estructuras y de la presencia o ausencia de transpiración, por lo que aparece un nuevo modelo que perfecciona el modelo del continuo suelo-planta-atmósfera. Este nuevo modelo se conoce como “modelo compuesto” y permite aunar ambas visiones (transporte debido a potencial hídrico y raíz como osmómetro) en una sola teoría.

#### 1.3.3.2. Modelo compuesto

El agua en la planta puede moverse por dos vías fundamentales (Steudle, 1994):

La **vía apoplástica** es aquella en la que el agua circula entre las células a través de las paredes celulares y de los espacios intercelulares por flujo masivo debido a diferencias de potencial. El

componente osmótico de esta vía es despreciable ya que no discrimina agua y solutos, y la resistencia al paso del agua es menor, por lo que el agua tiende a seguir esta vía de flujo para soportar los elevados requerimientos promovidos por la transpiración.

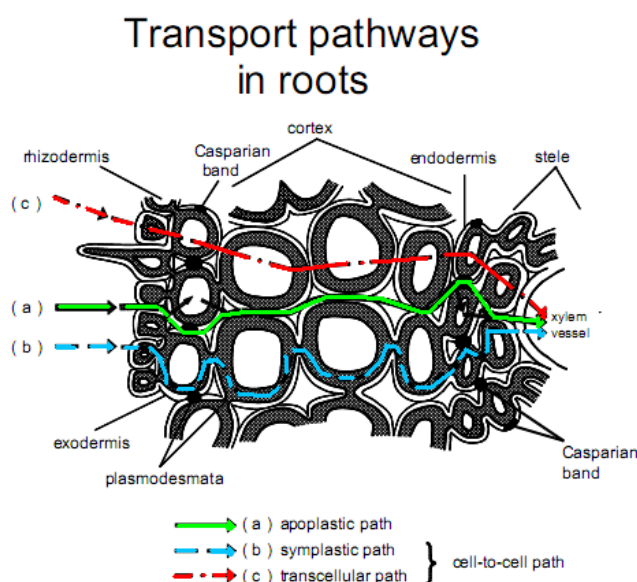


Imagen tomada de Steudle, 2000.

**vía transcelular.** Las membranas semipermeables permiten un rápido equilibrio de potenciales al permitir el libre paso de agua, sin embargo no permite el libre paso de solutos. De esta manera, la vía célula a célula tiene además un componente osmótico importante y se asume que supone una resistencia hidráulica mayor que la vía apoplástica (Steudle y Peterson, 1998). Tiene por ello menor importancia en condiciones de transpiración para muchas plantas, como el caso del maíz (Zhu y Steudle, 1991), pero será la vía fundamental en su ausencia. La medida del flujo de agua a través de ambas vías (apoplástica y célula a célula) se denomina **conductancia hidráulica radical (K)** y se expresa en  $\text{g H}_2\text{O s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ . Si esta medida la relacionamos con el tamaño de la raíz obtenemos la **conductancia hidráulica radical (L)**.

Según este modelo, el agua entra en la raíz a través de los pelos radicales y fluye a favor de gradiente, fundamentalmente por la vía del apoplasto, de manera radial hasta llegar a la endodermis. La banda de Caspariy impide que el agua continúe por la vía apoplástica y por ello el agua se ve obligada a penetrar en las células endodérmicas y por tanto en la vía célula a célula. Una vez atravesada la endodermis, el agua que alcanza la estela puede volver a la vía apoplástica de menor resistencia y penetrar en los vasos xilemáticos. En el xilema, la resistencia al transporte de agua es muy baja. El agua se mueve axialmente a favor de potencial hacia la parte aérea de la planta por vía apoplástica hasta llegar a las hojas donde de nuevo existe transporte radial (apoplástico o célula a célula) hasta las cavidades subestomáticas, y de ahí, a la atmósfera.



Bajo esta perspectiva, la endodermis supone el punto de mayor resistencia y control del flujo de agua y solutos en la planta, actuando como barrera semipermeable donde el transporte de agua habitualmente deja de producirse por flujo masivo y pasa a ser controlado osmóticamente. A pesar de ello, hoy sabemos que todas estas vías trabajan de manera combinada a lo largo de los tejidos, dando lugar a un sistema de resistencias seriadas pero también en paralelo, moviéndose el agua por una combinación entre fuerzas hidráulicas y osmóticas que han permitido explicar las desviaciones respecto al modelo original (Steudle y Peterson, 1998). Este modelo de interacción entre las distintas vías de transporte permite a la planta modificar su resistencia hidráulica en función de las exigencias ambientales de manera que cuando la transpiración aumenta, la resistencia hidráulica disminuye y viceversa. También explica que un descenso de potencial hídrico del suelo conlleve un aumento de la resistencia hidráulica radical para evitar la pérdida de agua de la raíz hacia el suelo.

## 2. ACUAPORINAS

(Cuadros de Salvador Dalí)

### 2.1. HISTORIA DEL DESCUBRIMIENTO



Hasta hace sólo unas décadas se consideraba que el agua atravesaba la membrana celular por difusión pasiva; si bien esto es cierto, las evidencias sugerían un transporte de agua en las células mucho más elevado que el que este mecanismo permitía, especialmente en algunos tejidos como eritrocitos y paredes de los túbulos renales, en los que aparecían membranas especializadas en el transporte de agua (para revisión, leer Finkelstein, 1987). Las primeras alusiones a poros en la membrana fueron propuestas por Sidel y Solomon (1957). En 1968, Solomon comprobó que la energía que se requería para el paso de agua en las membranas de los eritrocitos era equivalente a la difusión del agua, y por tanto debía haber un “continuo” que apuntaba a poros o canales. Macey, en 1984 descubre que este transporte de agua se veía inhibido por  $\text{HgCl}_2$  sugiriendo su naturaleza proteica. A pesar de las pruebas, durante años se intentó el aislamiento de dichas proteínas sin éxito.

Casualmente, en 1987, un grupo de investigadores, mientras intentaban aislar un componente de membrana del factor Rh de la sangre, obtienen un fragmento polipeptídico de 28KDa (Agre et al., 1987) que continúa investigándose en los años posteriores (para revisión, leer Borgia et al., 1999) hasta que en 1991 se identifica finalmente como un canal proteico de membrana, perteneciente a la familia de las proteínas intrínsecas de membrana (MIPs) (Preston y Agre 1991) a la que se llamó CHIP28 (channel-like integral protein of 28 kDa). Preston y colaboradores (1992) en estudios con expresión heteróloga en ovocitos de la rana *Xenopus laevis* la caracteriza como transportadora de agua. El nombre de “acuaporinas” surgió en una reunión informal en Baltimore y se extendió el nombre a esta nueva familia de canales acuosos (Agre et al., 1993). La CHIP28 pasó a llamarse desde este momento AQP1 y en esos años llegaron a caracterizarse hasta 9 acuaporinas de mamíferos (AQP0-AQP9) (Para revisión, leer King et al., 2004) y varias más en otros organismos vertebrados (Ma et al., 1996; Beuron et al., 1995), bacterias (Calamita et al., 1995) y plantas (Maurel et al., 1993). Algunas de ellas mostraron alta capacidad para transportar glicerol (Maurel et al., 1994) pasando a llamarse “Gliceroporinas” y con el tiempo se han ido identificando distintos sustratos que pueden ser transportados por acuaporinas específicas en distintos tejidos.

## 2.2. ACUAPORINAS EN PLANTAS

### 2.2.1. IMPORTANCIA DE LAS ACUAPORINAS EN PLANTAS.



El descubrimiento de las acuaporinas en plantas fue un gran avance para la comprensión del transporte de agua y solutos a través de las membranas, y resaltó la importancia que el transporte célula a célula podía llegar a adquirir bajo determinadas condiciones. Las acuaporinas son proteínas integrales de membrana que facilitan y regulan el transporte pasivo de moléculas de agua a favor de gradiente de potencial hídrico (Maurel et al., 2008). La tasa de transporte de agua se ve altamente incrementada por la presencia de estos canales que aumentan el coeficiente de permeabilidad de las membranas (Pf) de 10 a 20 veces (Chaumont et al., 2001) pudiendo transportar las más activas hasta  $10^9$  moléculas de agua por segundo (Katsuhara et al., 2008). Esto disminuye considerablemente la resistencia al transporte de agua de la vía célula a célula. De hecho, se han encontrado altos niveles de expresión de acuaporinas en tejidos implicados en el transporte hídrico de la planta tales como la epidermis y exodermis radicular, las células parenquimáticas adyacentes al xilema, células compañeras del floema o en las células guarda que regulan la apertura de los estomas, así como en zonas de rápido crecimiento de las plantas (Kjellbom et al., 1999); medidas que concuerdan con aquellas zonas en que el movimiento vía célula a célula es más limitante según el modelo compuesto de transporte de agua (Steudle, 2000). El modelo compuesto predice que la contribución de la vía célula a célula será menor que la vía apoplástica en condiciones de elevada transpiración. Esta idea ha sido apoyada por estudios sobre la contribución relativa de ambas vías de transporte (Bramley et al., 2007). Sin embargo, algunos estudios apuntan a que la contribución de las acuaporinas a la vía célula a célula podría ser mucho mayor de lo esperado incluso en estas condiciones (Knipfer y Fricke, 2010; Fritz y Ehwald, 2011). A raíz de estos descubrimientos, las propiedades de estas proteínas, los genes que las codifican, su regulación funcional y sus implicaciones en el transporte de agua en plantas, han sido ampliamente estudiados (Ver revisiones Johanson et al., 2000; Katsuhara et al., 2008; Maurel et al., 2008; Chaumont y Tyerman, 2014).

En los últimos años, el estudio de las acuaporinas en planta ha llevado a plantearse que además de su función clara en la regulación hídrica de las plantas, las acuaporinas pueden estar desempeñando otro tipo de funciones fisiológicas relevantes. En particular, la capacidad para transportar moléculas como amonio (Jahn et al., 2004; Loque et al., 2005) o urea (Gerbeau et al., 1999; Liu et al., 2003b) apunta a importantes papeles en el metabolismo del nitrógeno. La difusión

de CO<sub>2</sub> en las membranas celulares a través de estos poros (Uehlein et al., 2003) sugieren una función en la fijación de carbono y, por lo tanto, en la fotosíntesis. La capacidad para transportar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bienert et al., 2007) apunta a posibles papeles en la señalización y reacción ante distintos tipos de estrés. El transporte de boro (Mitani et al., 2008) está claramente relacionado con la nutrición y desarrollo estructural de las plantas. La implicación en la absorción y en el metabolismo del silicio (Ma y Yamaji, 2006) parece crucial en la respuesta de las plantas a estreses bióticos y abióticos (Maurel, 2007). Un número cada vez mayor de moléculas complejas (Bienert et al., 2008) con importancia fisiológica para las plantas, abren las puertas a una nueva forma de entender la relevancia de estas proteínas, su distribución y especialización, convirtiéndose en punto clave en el estudio fisiológico y molecular del funcionamiento de las plantas.

### 2.2.2. DIVERSIDAD DE LAS ACUAPORINAS EN PLANTAS

La primera acuaporina identificada en plantas fue la  $\gamma$ -TIP (AtTIP1;1) que se caracterizó como transportadora de agua en el tonoplasto (Maurel et al., 1993). A día de hoy, se han hallado entre 31 y 71 genes distintos que las codifican en distintas especies de plantas (Maurel et al., 2008; Park et al., 2010). En maíz se han encontrado 31 genes que codifican acuaporinas, pertenecientes a cuatro subgrupos definidos en función de la similitud de sus secuencias aminoacídicas. Así, encontramos

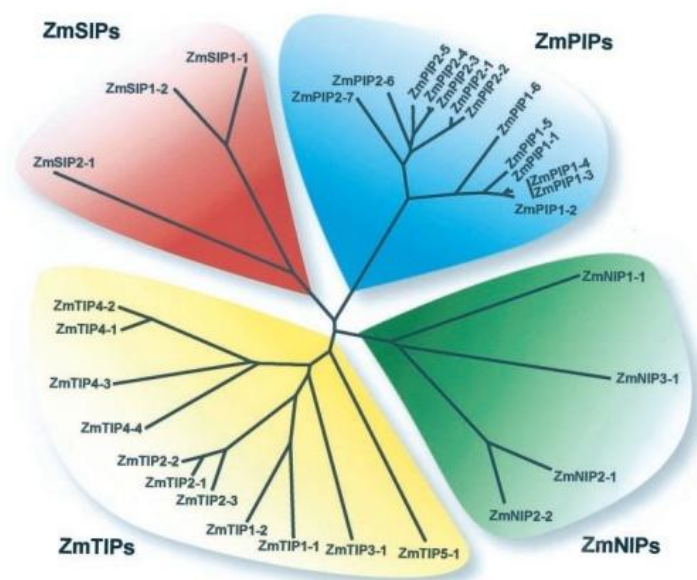


Imagen obtenida de Chaumont et al. 2001

en maíz 13 proteínas intrínsecas de la membrana plasmática (PIPs, del inglés “plasma membrane intrinsic proteins”), 11 proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIPs, de “tonoplast intrinsic proteins”), 4 proteínas intrínsecas similares a Nod26 (NIPs, de “Nod26-like intrinsic proteins”), y 3 proteínas intrínsecas pequeñas y básicas (SIPs, de “small and basic intrinsic proteins”) (Chaumont et al., 2001). Hay que añadir que existe en plantas un quinto

subgrupo de acuaporinas, recientemente descrito, a las que se conocen como XIPs (Danielson y Johanson, 2008; Gupta y Sankararamakrishnan, 2009) que, sin embargo, no aparecen en brasicáceas ni monocotiledóneas (Chaumont y Tyerman, 2014) como el maíz.

Dentro de estos subgrupos, las TIPs son las más abundantes. Sin embargo, aunque el tonoplasto tiene una permeabilidad al agua mucho mayor que la membrana plasmática (Maurel et al., 1997; Gerbeau et al., 1999), al ser el transporte de agua célula a célula un sistema seriado de membranas, la limitación a la entrada de agua en esta vía está limitada por la membrana externa de las células (membrana plasmática) donde se localizan las PIPs, que ejercen por ello el papel fundamental en el transporte de agua en la planta (Katsuhara et al., 2008). Por otro lado, las TIPs en el tonoplasto serían indispensables para el mantenimiento del estatus hídrico intracelular (Tyerman et al., 2002) además de otras posibles funciones que serán tratadas en apartados posteriores. Numerosos estudios demuestran a su vez la correlación que existe entre la abundancia de PIPs y la conductancia hidráulica radicular (Martre et al., 2002; Javot et al., 2003; Katsuhara et al., 2003; Sakurai et al., 2005).

Dentro de las PIPs existen dos subgrupos, denominados PIP1 y PIP2. La diferencia fundamental entre estos subgrupos, además de su secuencia aminoacídica, reside en su diferente permeabilidad al agua, testada con el sistema heterólogo de ovocitos de *Xenopus laevis* (Chaumont et al., 2000). Así, se vio que, mientras todas las PIPs 2 testadas se muestran como grandes transportadoras de agua, las PIPs 1 no han mostrado esa capacidad, o al menos en una tasa mucho más baja. El hecho de que las PIP1 no revelen una alta capacidad de transporte de agua mientras que sus homólogas (PIPs2) sí lo hacen, y a pesar de que su estructura de poro apunta a que ésta sea su función principal, se ha explicado desde varios puntos de vista: Por un lado, diversos estudios en ovocitos revelan que la mayor parte de las PIP1 son incapaces de transportar agua cuando constituyen homotetrámeros, pero han mostrado la capacidad de formar heterotetrámeros con las PIP2, tanto en ovocitos como en células vegetales, aumentando de manera correlativa el transporte de agua de estas últimas en función de la cantidad de PIP1 co-inyectada (Fetter et al., 2004; Zelazny et al., 2007). Se ha demostrado además que la interacción de PIP1 y PIP2 es necesaria para el transporte de las PIP1 hasta la membrana plasmática (Zelazny et al., 2007) lo que explicaría su imposibilidad para transportar agua. Finalmente, se ha sugerido una interacción entre PIP1 y PIP2, de manera que si ambas se ven silenciadas el efecto no es aditivo sino que se observa la misma disminución de la conductividad hidráulica radical al silenciar una, otra o ambas isoformas a la vez (Martre et al., 2002).

El análisis filogenético apunta a que la separación dentro de estos grupos ocurrió antes de la divergencia entre monocotiledóneas y dicotiledóneas sugiriendo que hubo un gen ancestral común que codificaba para una proteína con un rol específico en plantas arcaicas. Sin embargo, la permanencia y la extraordinaria divergencia ocurren dentro de ramas bien diferenciadas del árbol filogenético sugiriendo fenómenos de duplicación muy recientes. Estos fenómenos ocurrieron de manera independiente en las distintas ramas bajo presiones selectivas similares, lo que refleja la elevada especialización en función y localización de los distintos grupos. Este hecho evidencia las

necesidades de una regulación cada vez más fina en función de los factores ambientales que promovieron dichas duplicaciones (Chaumont et al., 2001).

Estos subgrupos se diferencian, además de en su secuencia aminoacídica y su localización subcelular, en que cumplen funciones específicas y diferenciales en el transporte de agua y solutos neutros (Katsuhara et al., 2008) que vienen definidos por su estructura secundaria como se explica en el apartado siguiente.

## 2.3. ESTRUCTURA DE LAS ACUAPORINAS

### 2.3.1. ESTRUCTURA BÁSICA



Las acuaporinas constituyen una amplia y diversa familia dentro de las proteínas intrínsecas de membrana (MIPs). La estructura básica monomérica se caracteriza por la presencia de 6  $\alpha$ -hélices transmembrana interrumpidas por 5 lazos (Preston y Agre, 1991), tres de los cuales son extracelulares (A, C y E) y dos citoplasmáticos (B y D), con los extremos carboxilo y amino terminales hacia el citoplasma (Nielsen et al., 1993). La conformación de las MIPs viene de una ancestral duplicación genética, de manera que la estructura consiste en dos repeticiones en tándem de tres dominios transmembrana cada una (Jung et al., 1994) que se orientan en la membrana con un ángulo de 180° la una respecto a la otra formando una estructura en forma de “reloj de arena” típica de los canales de membrana (Para revisión ver Reizer et al., 1993).

En los lazos B y E aparecen dos motivos altamente conservados formados por la secuencia de aminoácidos As-Pro-Ala (NPA). Estos dominios NPA forman  $\alpha$ -hélices que se sitúan hacia el interior de la membrana constituyendo el poro.

Cada una de estas subunidades monoméricas forma un poro funcionalmente independiente (Preston et al., 1993). Sin embargo, el análisis de la estructura mediante técnicas de alta resolución han determinado que, en las membranas, las acuaporinas se asocian formando un tetrámero (Fotiadis et al., 2001). Esta oligomerización se puede producir entre monómeros iguales constituyendo un homotetrámero pero también ocurre entre isoformas distintas constituyendo heterotetrámeros, que generan cambios en la estabilidad de las acuaporinas e incrementan la permeabilidad y los niveles de algunas de las isoformas, como es el caso de la interacción entre PIPs1 y PIPs2 (Fetter et al., 2004; Chaumont et al., 2000).



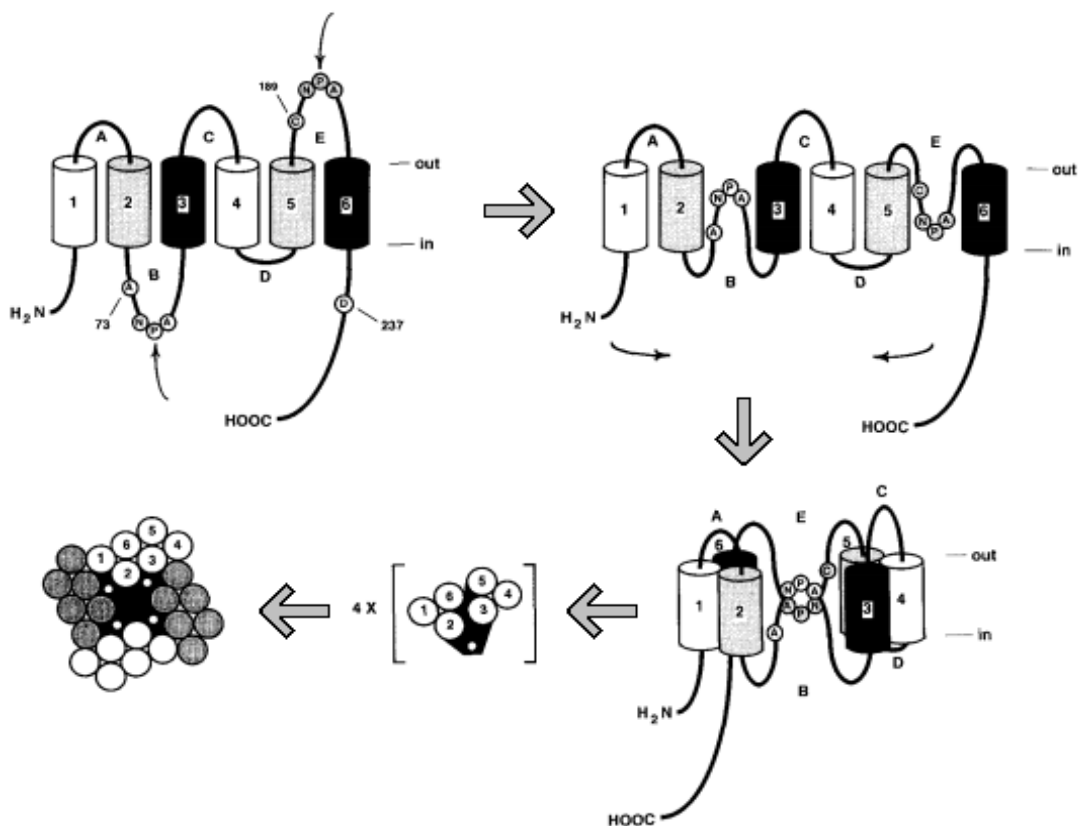


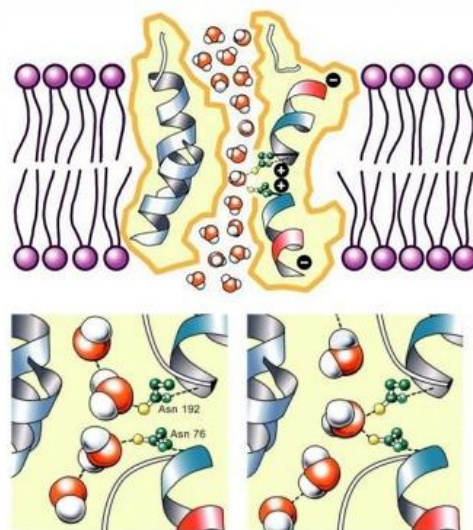
Imagen obtenida de Jung et al. 1994

## 2.3.2. SELECTIVIDAD DEL PORO

### 2.3.2.1. Filtros de selectividad

Se asume que el principal determinante de la selectividad del poro de las acuaporinas es el tamaño de la apertura del poro. En este sentido existen dos filtros fundamentales de selectividad definidos por las dos zonas de mayor constricción del poro que actúan como una barrera de exclusión por tamaño y bloquean estéricamente el transporte de sustratos voluminosos (Wallace et al., 2005) y moléculas cargadas (Murata et al., 2000; Hedfalk, 2006).

1) **Región NPA:** La primera región de constricción es la que forman los dominios NPA. Simulaciones de la dinámica molecular del paso de agua por este filtro mostraron que las moléculas de agua se ven obligadas a formar una fila de moléculas que pasan de una en una a través del poro, reorientándose debido a su interacción con los residuos Asn de los dominios NPA como se muestra en la figura (Tajkhorshid et al., 2002). Este mecanismo hace que no se puedan establecer puentes de



hidrógeno entre moléculas vecinas, interrumpiendo la posible entrada de cationes a través del poro y controlando así la selectividad del transporte.

**2) Región Ar/R:** El segundo y más importante filtro de selectividad de las acuaporinas es la constricción conocida como “aromatic/arginine región” (región Ar/R) situada en el vestíbulo del poro por la parte citoplasmática, 8Å por encima de la región NPA (Wallace et al., 2004). Fue descrita por Sui et al. (2001) y está formada por 4 residuos aminoacídicos entre los cuales prevalecen residuos aromáticos y Arg (R), lo que da nombre a la región. De estos cuatro residuos, 2 están situados en las hélices transmembrana 2 (H2) y 5 (H5), mientras que los otros 2 se sitúan en el lazo E (LE1 y LE2) de manera que aparecen enfrentados hacia el interior del poro formando una constricción cuyo diámetro dependerá de las interacciones electrostáticas que se generan entre ellos, regulando así, además del tamaño, el tipo de moléculas que pueden entrar al poro en función de los enlaces que puedan generarse y las interacciones electrostáticas que se produzcan con los distintos solutos (Wallace et al., 2005). Las propiedades de estos cuatro residuos determinarán por tanto las propiedades físicas (estructura y tamaño) y químicas (hidrofobicidad, posibles enlaces con las moléculas, etc.) del poro y, por lo tanto, cambios en cualquiera de estos residuos generarán grandes cambios en la selectividad del poro de las acuaporinas (Beitz et al., 2006). La importancia de estos residuos ha sido ampliamente confirmada en estudios estructurales, bioquímicos y computacionales (Wallace et al., 2006) y su estudio nos puede ayudar a predecir la especificidad y función de cada acuaporina (Forrest et al., 2007).

### **2.3.2.2. Análisis de la región Ar/R de las acuaporinas de maíz.**

Los análisis de estructura mediante rayos X muestran que, a diferencia de las AQP's descritas en animales (Agre et al., 2002), las acuaporinas de plantas presentan una gran diversidad respecto a la estructura del poro y una clara divergencia del paradigma de acuaporinas versus gliceroporinas, sugiriendo una mayor diversidad funcional (Wallace et al., 2004). Basándose en estudios de la AQP1 y GlpF se descubrió que la presencia del residuo altamente conservado de Arg (R) en la posición LE2 que da nombre a la región Ar/R es determinante para la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas tanto de agua como de glicerol (Sui et al., 2001) y genera a su vez fuerzas de repulsión que impiden el paso de cationes a través del poro (Hedfalk, 2006), mientras los aniones son excluidos por los grupos carbonilo de los aminoácidos que lo forman (Murata et al., 2000).

En el caso de las proteínas transportadoras de agua, la presencia de His en posición H5 y de Phe en posición H2 generan una constricción de 2.8Å de diámetro, que limita el paso a moléculas de gran tamaño (Wallace et al., 2002). Estos aminoácidos, junto con la altamente conservada LE2, permiten establecer varios puentes de hidrógeno con cada molécula de agua, contribuyendo a la reorientación y el incremento de la tasa de transporte de la misma (Zeidel et al., 1992). En maíz,



todas las PIPs presentan una región Ar/R característica del transporte de agua, por lo que cabría esperar que esta sea su función fundamental.

Acuaporina	H2	H5	LE1	LE2
AQP1	F	H	C	R
GlpF	W	G	F	R
ZmPIP1;1	F	H	T	R
ZmPIP1;2	F	H	T	R
ZmPIP1;3	F	H	T	R
ZmPIP1;4	F	H	T	R
ZmPIP1;5	F	H	T	R
ZmPIP1;6	F	H	T	R
ZmPIP2;1	F	H	T	R
ZmPIP2;2	F	H	T	R
ZmPIP2;3	F	H	T	R
ZmPIP2;4	F	H	T	R
ZmPIP2;5	F	H	T	R
ZmPIP2;6	F	H	T	R
ZmPIP2;7	F	H	T	R

Residuos aminoacídicos de la región Ar/R de las 31 acuaporinas de maíz y las representantes del transporte de agua (AQP1) versus glicerol (GlpF)

Acuaporina	H2	H5	LE1	LE2
ZmTIP1;1	H	I	A	V
ZmTIP1;2	H	I	A	V
ZmTIP2;1	H	I	G	R
ZmTIP2;2	H	I	G	R
ZmTIP2;3	H	I	G	R
ZmTIP3;1	H	V	A	R
ZmTIP4;1	H	S	A	R
ZmTIP4;2	H	S	A	R
ZmTIP4;3	Q	S	A	R
ZmTIP4;4	H	V	A	R
ZmTIP5;1	Q	V	A	R
ZmNIP1;1	W	V	A	R
ZmNIP2;1	G	S	G	R
ZmNIP2;2	G	S	G	R
ZmNIP3;1	A	I	G	R
ZmSIP1;1	L	I	P	N
ZmSIP1;2	L	V	P	N
ZmSIP2;1	S	H	G	S

Puesto que la conformación de las MIPs proviene de una ancestral duplicación genética (Reizer et al., 1993). Las posiciones H2 y H5 son homólogas, por lo que el intercambio que se produce en las TIPs respecto a las PIPs del residuo polar por apolar y viceversa no tendrían por qué modificar su capacidad para transportar agua, ya que se conservan las propiedades del poro de selectividad en su forma tridimensional, pero se abre la puerta al transporte de otros solutos (Wallace et al., 2004). Estructuralmente, estas TIPs1 presentan una región Ar/R compuesta por los aminoácidos His (H2), Ile (H5), Ala (LE1) y Val (LE2). La importancia de los residuos H2 y H5 en el transporte de amonio está comprobada por Jahn et al. (2004). Estas posiciones aparecen también en las ZmTIP2s por lo que cabría esperar que sean capaces de transportar dicho soluto (Ludewig et al., 2007). Además, las posiciones H5 y LE2 son las dos hidrofóbicas, aumentando el tamaño del poro (Sui et al., 2001) y abriendo la posibilidad al transporte de moléculas como urea (2,62Å), o ácido bórico (2,57Å) (Fitzpatrick, 2009). De hecho, las posiciones H2, H5 y LE1 se conservan en otras acuaporinas caracterizadas en el transporte de urea (Gerbeau et al., 1999; Liu et al., 2003) apuntando a que pueden estar implicadas en dicho transporte.

Dentro de las TIPs es interesante el caso de ZmTIP4;1, ZmTIP4;2 y ZmTIP4;3. En ellas, la posición H5 es un residuo de Ser y la LE1 una Ala, ambos aminoácidos muy pequeños, por lo que el tamaño de poro se amplía considerablemente (Sui et al., 2001). Además H2 y H5 son ambas

hidrofóbicas, generándose en conjunto un poro con un diámetro de tamaño similar a GlpF que permitiría el paso de moléculas solubles de gran tamaño como el glicerol (Bansal y Sankararamakrishnan, 2007). Así mismo, la Arg en LE2 facilita el transporte de glicerol (Sui et al., 2001) por lo que todo ello apunta a que puedan estar desempeñando esta función. En el caso de ZmTIP3;1, ZmTIP4;4 y ZmTIP5;1, la presencia de Val en posición H5 aumenta la hidrofobicidad del poro manteniendo un gran diámetro que podría indicar un transporte menos especializado o una especificidad diferente. Se ha sugerido que la ZmTIP4;4 puede tener una influencia importante en la nutrición nitrogenada, debido a su capacidad para transportar urea y a su localización (Gu et al., 2012), y por ende, la ZmTIP3;1, con los mismos aminoácidos, podría desempeñar una función similar.

Recientemente las NIPs han emergido como un subgrupo de acuaporinas muy interesantes en cuanto a su especificidad funcional debido a su clara divergencia con otros grupos (Wallace et al., 2006). Las NIPs provienen originalmente de una transferencia horizontal desde bacterias a plantas (Zardoya et al., 2002) y sin embargo han sido conservadas evolutivamente, probablemente por su capacidad para desempeñar funciones muy específicas en plantas. De hecho, las NIPs tienen menor representación en plantas que las TIPs o las PIPs, expresándose a niveles mucho más bajos y generalmente en órganos o tejidos específicos y en momentos fenológicos distintos (Wallace et al., 2006). En base a su Ar/R región, Wallace et al. (2002) presenta 2 tipos de NIPs en Arabidopsis (I, II) que se ven ampliadas con un tercer grupo (NIP III) por Mitani et al. (2008) después de analizar las acuaporinas de otras plantas.

Las NIP I son el subgrupo más parecido en su región Ar/R al arquetipo GmNod26, que fue la primera acuaporina transportadora de glicerol descubierta en plantas (Dean et al., 1999). Su región Ar/R está claramente relacionados con el transporte de glicerol (Wallace et al., 2002; Wallace y Roberts, 2004), aunque se ha visto que son capaces de transportar además otros compuestos como formamida y ácido láctico (Rivers et al., 1997; Wallace and Roberts, 2005; Choi et al., 2007). Por otro lado, su región Ar/R reduce la posibilidad de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, lo que explicaría la baja tasa de transporte de agua encontrada en ellas (Dean et al., 1999). Por todo ello cabría esperar que la ZmNIP1;1 fuese capaz de transportar glicerol y quizás alguna otra molécula de gran tamaño, así como agua, aunque con una tasa de transporte menor a la de PIPs y TIPs.

El subgrupo de las NIP II presenta una sustitución del Trp en posición H2 por una Ala, lo que hace aumentar el tamaño de poro (Wallace y Roberts, 2004). Esta sustitución está muy conservada en todas las NIP II y permite el paso a solutos grandes como urea, boro, glicerol y formamida (Wallace y Roberts, 2005). La posición H2 parece ser la causante de una disminución casi total del transporte de agua (Wallace y Roberts, 2005). De las acuaporinas de maíz, la ZmNIP3;1 pertenece a este grupo.

Las acuaporinas ZmNIP2;1 y ZmNIP2;2 se incluyen dentro del grupo de las NIP III (Mitani et al., 2008). Presentan un filtro de selectividad único debido al pequeño tamaño de los aminoácidos Ser y Gly, presentando el mayor diámetro de poro descrito en acuaporinas (Forrest y Bhave 2007; Wang et al., 2005) que permite el paso de moléculas de tamaño muy grandes como el silicio (4.38Å) (Ma et al., 2008), además de agua, glicerol, ácido bórico y urea. Aún así los estudios basados en la OsNIP2;1 (Jian et al., 2006) revelan una alta afinidad de las NIP III por el silicio más que por cualquier otra molécula (Mitani et al., 2008) y parece que esta función es única en especies de plantas acumuladoras de silicio (Ma et al., 2007), apuntando directamente a ésta como su principal función.

Las SIPs siguen siendo las grandes desconocidas de entre todas las acuaporinas de plantas. Reciben su nombre de su pequeño tamaño (25,9 KDa), y su elevada basicidad (Maeshima y Ishikawa, 2008). Aunque forman parte de las acuaporinas, presentan variaciones en muchos aminoácidos altamente conservados, incluidos los del dominio NPA (Johanson y Gustavsson, 2002), alejándose del resto de subgrupos en el árbol filogenético (Chaumont et al., 2001) y sugiriendo una especificidad diferente (Ishibashi, 2006).

### 2.3.2.3. Discrepancias en la selectividad de las acuaporinas.

Tanto las evidencias mutacionales (Beitz et al., 2006) como los modelos dinámicos de simulación (Ludewig et al., 2009) sugieren que el tamaño del soluto es determinante para el transporte. Sorprendentemente, algunas acuaporinas con diámetro de poro limitante para el paso de grandes moléculas son capaces de transportarlas. El ejemplo más llamativo es el de las PIPs, que presentan un tamaño de poro muy pequeño y altamente selectivo para el transporte de agua. Dentro de ellas, sin embargo, algunas han mostrado en ensayos de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* la capacidad para transportar solutos de gran tamaño molecular como glicerol (Biela et al., 1999), ácido bórico (Dordas et al., 2000) o urea (Gaspar et al., 2003). Estudios con mutaciones puntuales de residuos externos a la región de selectividad demuestran que éstos pueden influenciar directamente el diámetro de poro o la conformación del mismo modificando la orientación de residuos de la región Ar/R, variando así la capacidad de transporte y el coeficiente de permeabilidad de los solutos (Suga y Maeshima, 2004; Katsuhara et al., 2008; Ludewig et al., 2009). Así pues, aunque la estructura atómica provee de una estimación del tamaño máximo que puede tener una molécula para atravesar el poro, es difícil predecir la imposibilidad de transportar otros solutos y todo resultado debe considerarse con precaución. Aún debe avanzarse más en el análisis estructural de estas proteínas para determinar las bases de su transporte y otras discrepancias.

No hay que olvidar el hecho de que observar un transporte positivo para algunas moléculas en los sistemas heterólogos no implica que ocurra en la planta *in vivo*, ya que en un sistema vivo y

dinámico como la planta, múltiples factores afectan a cada respuesta. Así pues, puede ser que aunque las acuaporinas presenten la potencialidad para transportar determinados solutos, en el sistema planta no lo hagan o dicho transporte no resulte fisiológicamente útil. Igualmente puede ocurrir que, en planta, la conformación o la localización subcelular cambie respecto al sistema heterólogo, permitiendo el paso a moléculas que no pueden ser determinadas mediante estos sistemas.

Por último, hay que tener en consideración que la permeabilidad de las células de plantas debe estar controlada por mecanismos y sistemas de rápida regulación que las permitan adaptarse a los frecuentes cambios ambientales. Para llevar a cabo esta rápida regulación, las **modificaciones post-traduccionales** parecen ser la clave en la regulación de la actividad de las acuaporinas a corto plazo (Vandeleur et al., 2014). Se han encontrado modificaciones post-traduccionales, tales como fosforilación, metilación, ubiquitinación, deamidación, glicosilación, heteromerización, formación de puentes disulfido y protonación. Estas modificaciones pueden provocar cambios en la localización intracelular de las acuaporinas, afectando al tráfico de las mismas entre las vesículas y las membranas celulares, o bien afectar directamente a la apertura y el cierre de estas proteínas (Chaumont y Tyerman, 2014). Así pues, factores como el pH, el  $\text{Ca}^{2+}$ , solutos osmóticamente activos, compuestos oxidantes o fitohormonas, pueden influir en la regulación de la permeabilidad de las acuaporinas afectando, no sólo a la intensidad del transporte, sino también a las diferentes moléculas que puedan ser transportadas por las distintas acuaporinas (Katsuhara et al., 2008; Aroca et al., 2012; Cahumont y Tyerman, 2014). Muchas de estas regulaciones están sujetas a cascadas de señalización y a la interacción con otras proteínas o moléculas, cuyo conocimiento es escaso. Por todo ello hay que tener en cuenta que, el patrón específico de regulación puede no existir en los sistemas heterólogos y puede resultar igualmente importante para identificar la función de una determinada acuaporina (Kaldenhoff et al., 2007).

## **2.4. IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE ALGUNOS SOLUTOS TRANSPORTADOS POR LAS ACUAPORINAS.**

### **2.3.3. GLICEROL**

El glicerol es un alcohol que contiene una molécula carbonada con tres grupos hidroxilo (-OH) y forma parte de los lípidos de todos los organismos vivos (Smith y Wood, 1991; Garça y Santos, 2007). Es bien conocido como osmoprotector extendido a todos los Reinos, desde levaduras,



hongos, protozoos y bacterias hasta ciertos organismos superiores (Luyten et al., 1995; Dean et al., 1999; Clark et al., 2003; Kayingo y Wong, 2005; Dietz et al., 2011). También se le han atribuido otras funciones como generación de turgor celular (De Jong et al., 1997; Dixon et al., 1999) o incluso como crio-protector (Naidu et al., 1998).

El glicerol debe ser capaz de entrar y salir de las células a través de las membranas lipídicas rápidamente, permitiendo a los organismos responder ante un desequilibrio osmótico. Esto requiere de la presencia de proteínas transportadoras de glicerol que permitan el paso de esta molécula de manera rápida y altamente regulada, apuntando directamente hacia las acuaporinas. De hecho, muchas acuaporinas han sido caracterizadas como transportadoras de glicerol en plantas, la mayoría pertenecientes al subgrupo de las NIPs (Weig y Jakob, 2000; Schuurmans et al., 2003; Cabello-Hurtado y Ramos, 2004) y algunas acuaporinas pertenecientes a otros subgrupos como la NtAQP1, una PIP1 (Biela et al., 1999) y algunas TIPs (Gerbeau et al., 1999; Li et al., 2008).

A pesar del creciente número de acuaporinas caracterizadas como transportadoras de glicerol en planta, las implicaciones fisiológicas de esta molécula siguen sin estar claras, ya que no se ha encontrado una función generalizada. Gustavsson et al. (2005) ponen de relieve la posible implicación que la simbiosis con otros organismos, como los hongos, puede estar jugando en el mantenimiento evolutivo de transportadores específicos de glicerol en planta. La idea parte de la base de que varios genes codificantes de proteínas transportadoras de membrana (MIPs) provienen originariamente de una transferencia horizontal desde bacterias, como el caso de las NIPs (Zardoya et al., 2002) y las GIPs (Gustavsson et al., 2005), ambas del grupo de las acuaporinas, adaptándose con posterioridad al transporte de glicerol. Puesto que el uso de glicerol es bien conocido para hongos, pero no es extensivo en plantas, y existen además estudios que apuntan a que esta molécula es transportada desde la planta hacia hongos patógenos (Wei et al., 2004), parece que la ventaja evolutiva de mantener dichos transportadores de glicerol pueda estar promovida por la co-evolución con dichos organismos, llegando a fijarse a lo largo del tiempo en el genoma de la planta. Esta idea, enormemente interesante a nivel evolutivo, abre la puerta a múltiples estudios basados en la interacción simbiótica de las plantas con otros organismos, como el caso de la simbiosis micorrízico arbuscular, que será tratada en apartados posteriores.

#### 2.3.4. COMPUESTOS NITROGENADOS

El nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes para los organismos vivos ya que se utiliza para la síntesis de todo tipo de compuestos incluyendo aminoácidos, purinas, pirimidinas, algunos carbohidratos y lípidos, cofactores enzimáticos y proteínas, todos ellos esenciales en los procesos de crecimiento y desarrollo.

El ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y su base conjugada amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) se consideran como la fuente primaria de la nutrición nitrogenada de las plantas. Por el contrario, la urea no ha sido considerada como fuente directa de nitrógeno hasta hace unas pocas décadas, a pesar de estar presente frecuentemente en los suelos. Esto se debe a que esta molécula se degrada rápidamente por acción de la enzima ureasa, presente en los microorganismos del suelo, y tiene por ello una vida media muy corta (Watson et al., 1994). Así, durante mucho tiempo se creyó que las plantas se nutrían del N resultante de la degradación de la urea, que es el amonio. Sin embargo, existen muchas evidencias fisiológicas que apuntan a una absorción directa de la urea por parte de las plantas (Wilson y Walker, 1988; Hine y Sprent, 1988). Por otro lado, la urea es un importante intermediario metabólico producido en el catabolismo del nitrógeno (Wang et al., 2008) que podría suponer una fuente extra del mismo. Puesto que la concentración de N es generalmente baja en los suelos naturales, un aprovechamiento de la urea como fuente de nitrógeno resultaría ventajoso para las plantas. Todo ello lleva a pensar que, tanto amonio como urea, pueden estar jugando un importante papel en la nutrición vegetal, para lo cual es necesario que se muevan de manera rápida y sencilla a través de las membranas biológicas, proceso en el que las acuaporinas parecen estar directamente implicadas.

El transporte de amonio, cuando existe una baja concentración extracelular, está catalizado en plantas, hongos y levaduras por miembros de las proteínas de la familia “Ammonium transporter methylammonium permease” (AMT/Mep) (Marini et al., 1994) y en el caso de la urea, en plantas superiores, por las proteínas DUR3 (Liu et al., 2003a), que constituyen los transportadores de alta afinidad y baja capacidad de N. Las acuaporinas se presentan como los canales **de baja afinidad y alta capacidad** de transporte de amonio y urea, implicadas en la absorción, movilización y detoxificación de estos compuestos nitrogenados cuando existen en grandes concentraciones. Jahn et al. (2004), Holm et al. (2005), Loque et al. (2005) y Dynowski et al. (2008a) identificaron diversas acuaporinas transportadoras de  $\text{NH}_3$ ; mientras que Gerbeau et al. (1999), Gaspar et al. (2003), Liu et al. (2003b) y Gu et al. (2012) encontraron diversas acuaporinas capaces de transportar urea. La mayor parte de estas acuaporinas corresponden al grupo de las TIPs. Esto es interesante ya que, el tonoplasto, donde se localizan las TIPs, presenta una mayor permeabilidad a compuestos no electrolitos que la membrana plasmática, mostrando una actividad de transporte altamente específica (Gerbeau et al., 1999). Además, tanto la urea como el amonio, pueden ser acumulados en la vacuola central (Wang et al., 2008; Ludewig et al., 2007). Esto apunta a que, en caso de exceso en el citoplasma, el N sobrante puede ser transportado al interior de la vacuola evitando su efecto tóxico y sirviendo como almacén de N (Wang et al., 2008; Britto et al., 2001a y b), de manera que cuando sea requerido, puede ser re-movilizado mediante transporte pasivo de baja afinidad como el que permiten las TIPs (Liu et al., 2003b).

### 2.3.5. METALOIDES

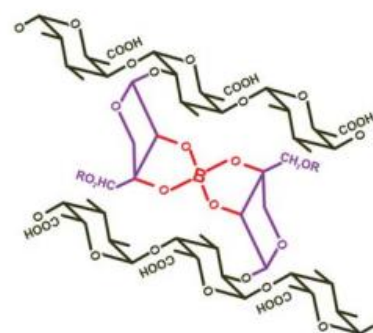
El boro (B) y el silicio (Si) son compuestos de la categoría de los metaloides que presentan cierta similitud. Ambos son moléculas no cargadas que en la solución acuosa a pH neutro aparecen en forma de ácidos ( $H_3BO_3$  y  $H_4SiO_4$ ) (Takahashi y Hino, 1978). No son metabolizadas por las plantas, razón por la cual se transportan en esta forma ácida tanto a corta como larga distancia (Casey et al., 2003; Miwa et al., 2009). Han mostrado sistemas análogos de transporte en plantas de maíz, basados en las acuaporinas como transportadores pasivos de entrada del suelo a la planta (Mitani y Ma, 2005; Takano et al., 2006; Mitani et al., 2009a; Chiba et al., 2009) combinados con sistemas de transporte de alta afinidad (BOR1 para B y Lsi2 para Si) que generan, al cargar esta molécula hacia el xilema, el gradiente de concentración necesario en las células de la raíz para permitir el flujo pasivo de entrada a través de las acuaporinas (Takano et al., 2005; Mitani et al., 2009b). Ambos metaloides cumplen funciones estructurales importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas (O'Neill et al., 2004; Miwa et al., 2009) y aparecen por ello presentes en todas las especies, aunque en distintas cantidades según la especie, el tejido concreto y el estado fenológico de la planta, como discutiremos a continuación.

#### 2.3.5.1. El Boro

El B es un micronutriente esencial para las plantas. Aparece en concentraciones de 10-100mg por kg de peso seco de la planta. La distinta concentración de B en distintas especies de plantas se explica, básicamente, por la cantidad de pectina de sus paredes celulares, ya que forma complejos polisacarídicos (fracción RGII) que enlazan las estructuras de la pared celular de las plantas (O'Neill et al., 2004).

En el caso del maíz, el requerimiento de B imprescindible para sostener el crecimiento vegetativo de las plantas es bajo, ya que las gramíneas poseen el menor contenido en pectina de todas las variedades de plantas, aunque, por el contrario, requieren mucha más cantidad de B en estado reproductivo que otras especies (Blevins y Lukaszewski, 1998).

La capacidad del B para interaccionar con moléculas hidroxiladas (Berger, 1949) sugirió que el B podía estar jugando un papel fundamental en la translocación de azúcares a través de las membranas plasmáticas (Gauch y Dugger, 1953) y se comprobó específicamente su capacidad para la formación de complejos con moléculas de polioles y azúcares en distintas plantas (Brown y Hu, 1996; Brown y Shelp, 1997) llegando incluso a plantearse que pudo ser esta capacidad la que



Función del boro en la estructura RG-II.  
Imagen tomada de Bar-Peled et al. (2012)



convirtió al B en nutriente esencial en el curso de la evolución (Lewis, 1980). La peculiaridad de estos complejos es que no sólo colaboran en la translocación de los azúcares sino que a su vez convierten el B en un elemento móvil, de manera que las plantas ricas en polioles pueden movilizar el B rápidamente a través de todas sus estructuras (Brown y Hu, 1996). Esto es importante, ya que estas plantas tendrán un acceso rápido al mismo en el periodo primaveral, cuando, en la floración, los requerimientos de B crecen, mientras las plantas que acumulan B en forma inmóvil deberán presentar otros mecanismos para su acumulación y movilización, donde puede ser que la cooperación simbiótica con los hongos micorrícicos pueda jugar un papel importante (Sonmez et al., 2009).

Se ha propuesto que el B juega un papel en el mantenimiento de la integridad de las membranas (Cakmak et al., 1995) y en la conformación y actividad de las proteínas transportadoras intrínsecas de membrana (Heyes et al., 1991; Power y Woods, 1997). Finalmente, se ha comprobado que el B tiene una función fisiológica en el control de la actividad enzimática (Para revisión, leer Power y Woods, 1997).

A pesar de la variedad de funciones que el B desempeña en las plantas, a elevadas concentraciones puede ser muy tóxico, por lo que las plantas deben tener mecanismos de absorción, almacenaje y redistribución muy controlados para mantener una cantidad adecuada de B en sus células, razón por la que existe un gran número de proteínas involucradas en estos procesos. De hecho, el ácido bórico es altamente permeable por difusión pasiva a través de las membranas, pero existen también transportadores activos y pasivos del mismo (para revisión, leer Miwa y Fujiwara, 2010). Entre los transportadores pasivos se han encontrado diversas acuaporinas capaces de transportar B que aparecen en zonas específicas de la planta como ZmPIP1 (Dordas et al., 2000), AtNIP5;1 (Takano et al., 2006), AtNIP6;1 (Tanaka et al., 2008), AtNIP7;1 (Li et al., 2011), AtTIP5;1 (Pang et al., 2010), OsNIP2;1 y HvNIP2;1 (Mitani et al., 2008; Schnurbusch et al., 2010).

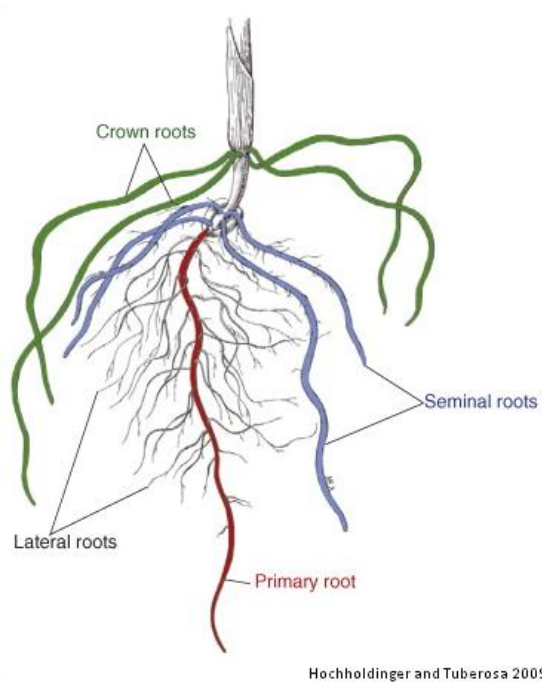
### **2.3.5.2. El Silicio**

El silicio es el segundo elemento más abundante de la corteza terrestre. A pesar de aparecer en grandes cantidades, no se considera un elemento esencial para las plantas, ya que no está involucrado en el metabolismo (Arnon y Stout, 1936), pero su deficiencia causa graves anomalías (Ma, 2004). El volumen máximo que cada especie es capaz de mantener varía dependiendo del número y la eficiencia de los transportadores de Si presentes en dicha especie (Ma et al., 2008). Las gramíneas y cyperaceas son las únicas plantas angiospermas que presentan alta concentración de silicio en sus tejidos debido a su capacidad para absorberlo activamente del suelo. Este es el caso del maíz (Ma y Takahasi, 2002; Mitani y Ma, 2005).

La función directa del Si en plantas es la formación de un polímero hidratado de silica-gel en la pared celular (Fauteux et al., 2005) formando una doble capa en el espacio inmediatamente



inferior a la cutícula de hojas, tallos y otras estructuras de la planta (Yoshida 1965; Ma et al., 2006a). Las consecuencias de esta formación son muy diversas, entre ellas: la reducción de la pérdida de agua por transpiración cuticular, la mejora de la captación de luz, manteniendo las hojas erectas y estimulando así la fotosíntesis, las modificaciones de la ruta apoplástica, el proporcionar sitios de unión a metales y sales, disminuyendo así su toxicidad, y el aumentar la rigidez y resistencia del tallo (Ma y Yamaji 2006; 2008). Estos efectos pueden ser especialmente obvios en condiciones de estrés, donde la presencia de Si se vuelve más ventajosa (Ma y Yamaji, 2008), aliviando tanto el estrés químico (sal, toxicidad por metales, desequilibrios de nutrientes) como físico (caída de parte aérea por debilidad del tallo, sequía, radiación, altas temperaturas, congelación, rayos UV). Además, protege frente a estreses bióticos (Ma y Yamaji, 2006), ya que funciona como barrera mecánica que limita el ataque por hongos patógenos, dificultando la penetración de los mismos. Además, se ha propuesto un segundo mecanismo en el que el Si soluble actúa como modulador de la resistencia a patógenos estimulando la reacción de defensa de la planta. Se vio, por ejemplo, que algunas plantas suplementadas con Si, producían fenoles y fitoalexinas en respuesta a las infecciones fúngicas (Remus-Borel et al., 2005; Rodrigues et al., 2004), presentaban diferente acumulación de glucanasas y peroxidasas, que han sido relacionadas con una limitada colonización por hongos (Rodrigues et al., 2005) y aumentaban la actividad de quitinasas, peroxidasas y polifenoloxidasas que actúan también como protectores (Chérif et al., 1994).



A diferencia del B, el Si no es tóxico para las plantas, por lo que no requiere mecanismos de almacenaje ni de detoxificación. Hasta ahora, se han descrito en maíz dos acuaporinas implicadas en la absorción de Si: La ZmNIP2;1 aparece principalmente en raíces seminales, donde está acompañada por los Lsi2 (transportador de Si hacia el xilema) lo que apunta a que en estas raíces tiene lugar la absorción de Si del suelo y transporte hacia el resto de la planta (Mitani et al., 2009b); mientras que, la ZmNIP2;2, aparece fundamentalmente en las raíces de anclaje (Mitani et al., 2009a), también llamadas “raíces de corona”, que son clave para la resistencia a la caída del tallo (Hochholdinger et al., 2004). En estas raíces no existe la Lsi2, por lo que todo el Si absorbido será, por tanto, utilizado estructuralmente por estas mismas raíces.

### 2.3.6. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es una de las más abundantes especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que se produce constantemente durante el metabolismo de los organismos aerobios y tiene una vida media relativamente larga en comparación con otras ROS. En bajas cantidades, actúa como molécula señal (Bienert et al., 2006), controlando gran número de procesos esenciales para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Para revisión, leer Quan et al., 2008). Por otro lado, y a pesar de sus importantes funciones celulares, no deja de ser una molécula oxidante que reacciona con distintas dianas celulares causando daños y, a elevadas concentraciones, es capaz de generar la muerte celular programada (Dat et al., 2000; Bienert et al., 2006).

Debido a estas funciones opuestas, el balance intracelular entre la producción y la eliminación de este compuesto debe estar altamente controlado en las células (Mittler et al., 2004). El nivel de  $H_2O_2$  acumulado se mantiene casi siempre a niveles muy bajos gracias a los sistemas antioxidantes de la planta, mientras que las perturbaciones metabólicas generan picos de acumulación que la planta interpreta para el inicio de las respuestas defensivas que le permiten adaptarse a los cambios ambientales (Quan et al., 2008) siendo especialmente reconocida su participación en la respuesta al estrés osmótico (Apel y Hirt, 2004). En este sentido, el peróxido de hidrógeno actúa directamente sobre el sistema redox (Bienert et al., 2006), puede modular la expresión de diversos genes (Neill et al., 2002), inducir la transcripción de proteínas con funciones en el metabolismo energético, promover el transporte y fijar el destino celular de muchas proteínas, así como promover la internalización de las proteínas PIPs, regulando sus funciones (Boursiac et al., 2008) y regular la defensa de la planta mediante la activación de mensajeros secundarios y hormonas (Quan et al., 2008).

Como señal intracelular, el  $H_2O_2$  ha de ser transportado a través de las membranas. El peróxido de hidrógeno tiene propiedades muy similares a la molécula de agua. Consecuentemente, la difusión simple a través de los lípidos de membrana es similar a la del agua y puede ser modificada mediante cambios en la composición de la bicapa lipídica o presiones osmóticas, de manera que las células tienen el potencial para controlar de alguna manera la tasa de difusión del  $H_2O_2$  (Mathai and Sitaramam, 1994; Sousa-Lopes et al., 2004). Sin embargo, se hace necesaria la existencia de mecanismos de regulación rápida del contenido en peróxido de hidrógeno en respuesta a los cambios ambientales. Dado su tamaño y propiedades similares al agua, parece que las acuaporinas podrían ser las responsables de llevar a cabo esta función. De hecho, muchas acuaporinas de plantas son capaces de transportar  $H_2O_2$  (Bienert et al., 2007; Dynowski et al., 2008b). Todas ellas capaces también de transportar agua y situadas en distintos orgánulos celulares, lo que permitirían el control de la acumulación de peróxido en las células.

### 2.3.7. DIÓXIDO DE CARBONO

El dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) es el sustrato de la fotosíntesis, y como tal, debe difundir desde la atmósfera hasta las hojas, y de éstas, al sitio de carboxilación en el estroma de los cloroplastos, donde la enzima Rubisco fija el carbono a moléculas de azúcar, siendo este proceso la base de la vida en nuestro planeta (Flexas et al., 2006).

Hasta los años 90, se había considerado que la fotosíntesis estaba limitada por dos factores fundamentales: (I) la difusión de  $\text{CO}_2$  a través de los estomas y (II) la maquinaria fotosintética que transforma la energía luminosa en energía química, ya que se consideraba que la capacidad de difusión del  $\text{CO}_2$  a través del mesófilo era ilimitada. Sin embargo, diversos estudios han demostrado en las últimas décadas que la conductancia del mesófilo, con las barreras físicas que supone, es finita, y por lo tanto ha de ser considerada como tercer factor limitante del proceso fotosintético que, de hecho, ha demostrado ser la condición más limitante bajo diversas condiciones ambientales (Galmes et al., 2007; Zhang, 2010). La conductancia del mesófilo está constituida por diferentes medios que incluyen una fase gaseosa, correspondiente a las cavidades aéreas de la hoja, una fase líquida, en las paredes celulares, citoplasma y estroma, y una fase lipídica constituida por las membranas celulares, siendo esta última la más limitante de las tres (Flexas et al., 2012; 2013). Este hecho, junto con el descubrimiento de acuaporinas capaces de transportar  $\text{CO}_2$  en animales y plantas (Cooper y Boron, 1998; Uehlein et al., 2003), y la localización de acuaporinas en las membranas del cloroplasto (Uehlein et al., 2008), sugieren un posible rol de las acuaporinas en la conductancia del mesófilo, que facilitaría la adquisición de las altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  necesarias para llevar a cabo la fotosíntesis (Katsuhara et al., 2008).

Hoy día, existen suficientes evidencias experimentales de la implicación de las acuaporinas en la difusión del  $\text{CO}_2$ , la asimilación del mismo y la actividad fotosintética como para no poner en duda su participación en estos procesos, aunque su función concreta aún no ha sido elucidada. Algunos estudios proponen un control de las acuaporinas directamente sobre la conductancia estomática (Uehlein et al., 2003), otros apuntan a un efecto directo sobre la conductancia del mesófilo (Flexas et al., 2006; López et al., 2013), e incluso algunos estudios apuntan a que la vía de transporte de agua y  $\text{CO}_2$  es común en el mesófilo, aunando la fisiología de fijación de carbono con la de absorción de agua (Flexas et al., 2012). De hecho, parece que pueda existir una regulación diferencial de la capacidad para transportar uno u otro soluto a través de una misma acuaporina. En este sentido, Otto et al. (2010) observó que, si bien algunas isoformas mostraban capacidad para transportar agua pero no  $\text{CO}_2$  (La NtPIP2;1) y viceversa (La PIP1 NtAQP1), la proporción de cada una de ellas en la formación de un tetrámero permitía regular el paso de uno u otro soluto. Esto abre las puertas a la implicación del poro central que se forma al constituirse los tetrámeros en el transporte de gases y a una posible regulación del transporte por competición entre subunidades en la formación del tetrámero.

## 3. LA SEQUÍA

(Cuadros de Vincent Van Gogh)

### 3.1. ESTRÉS HÍDRICO Y SU INFLUENCIA EN LA REGIÓN MEDITERRÁNEA



Cuando una planta está sometida a unas condiciones significativamente diferentes de las óptimas para la vida se dice que está sometida a estrés. Si bien, las diferentes especies o genotipos difieren en sus requerimientos óptimos y, por tanto, en su susceptibilidad a un determinado estrés (Levitt, 1980). Las plantas en la naturaleza están constantemente sometidas a presiones medioambientales siendo la sequía, la salinidad y las bajas temperaturas los estreses abióticos más comunes que disminuyen la productividad de las plantas (Seki et al., 2003; Bray, 2004). Todos estos estreses tienen un componente osmótico común, ya que todos ellos causan la deshidratación de los tejidos de la planta debido a la descompensación entre el agua tomada por la raíz y la transpirada por las hojas (Aroca et al., 2001).

De entre ellos, es la sequía la que afecta a una mayor cantidad de plantas cultivables, ya que se estima que un 26-28% de los suelos de la tierra están demasiado secos para ser aprovechados en agricultura (Blum, 1985; Bray, 2004). Por otro lado, se estima que un tercio de los suelos potencialmente cultivables del planeta están sometidos a un suministro inadecuado de agua, y los rendimientos de la mayor parte del resto, ven reducida su productividad periódicamente por los efectos de la sequía (Kramer, 1980). El principal efecto de la sequía es la reducción de las cosechas, que oscila entre el 10 y el 90%, dependiendo de la severidad y el estadio de la planta en el momento de sufrir sus efectos (Porcel, 2006). Aunque la sequía es un fenómeno normal y recurrente del clima, sus características varían de unas regiones a otras. La característica climática general de la región mediterránea es el déficit hídrico, particularmente durante el verano, al cual hay que añadir una notable fluctuación interanual en los regímenes de temperaturas y lluvias, lo cual magnifica el efecto del estrés (Valladares et al., 2004).

Como problema añadido, el cambio climático está generando un aumento de la temperatura global. El aumento de 2-4° C previsto para mediados del siglo XXI conllevará un incremento de evapotranspiración de 200-300 mm, el cual agravará la sequía y comprometerá la supervivencia de las plantas, disminuyendo la disponibilidad real de agua (IPCC 2001), que ya se encuentran al límite de sus posibilidades (De Luis et al., 2001; Martínez-Vilalta et al., 2002a). Así, el cambio climático está generando problemas de déficit hídrico en regiones donde no existían históricamente y aumentando la desertificación en muchas partes del mundo, particularmente en las zonas

semiáridas de la cuenca mediterránea. De hecho, se ha constatado en el Mediterráneo occidental una disminución significativa de la precipitación en las últimas décadas (Maheras, 1988). El aumento de la sequía no será el resultado sólo de una menor precipitación anual, sino también de un patrón de distribución estacional diferente, con lluvias torrenciales e irregulares de escasa utilidad para el rendimiento del ecosistema, que tenderán a aumentar durante el invierno, seguidas de largos períodos secos, que tenderán a aumentar durante el verano (Rambal y Debussche, 1995, Reichstein et al., 2002). Estos cambios afectarán directamente a la agricultura, que sigue siendo el sector económico más importante de la región mediterránea, por lo que el interés por comprender los mecanismos que mejoran el uso eficiente del agua por parte de las plantas y que permiten la supervivencia en condiciones de sequía se ha incrementado considerablemente en los últimos años y es imprescindible para garantizar la producción de alimento en el futuro (Bray, 2004; Chaves y Oliveira, 2004).

### 3.2. EFECTOS DE LA SEQUÍA EN PLANTAS



El estrés hídrico produce cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan negativamente al crecimiento y desarrollo de las plantas (Wang et al., 2001), de manera que, casi todos los procesos de la planta se ven afectados directa o indirectamente por la falta de agua (Akinci y Losel, 2012).

El efecto más directo de la sequía a **nivel celular** es una reducción del contenido de agua y con ello de la turgencia celular. La pérdida de turgencia lleva asociadas consecuencias directas como el aumento en la concentración de moléculas en el fluido celular, la alteración de las membranas que se adaptan a la reducción del volumen celular, y los cambios en la estructura o configuración de las macromoléculas (Porcel, 2006).

Los efectos celulares traen consigo **efectos fisiológicos** tales como:

- Disminución de la expansión celular y, con ella, del crecimiento de la planta, especialmente en la parte aérea, que reduce el número y tamaño de las hojas (Parker, 1968; Timpa et al., 1986; Akinci y Losel, 2012), afectando directamente a la fotosíntesis. Por otro lado, la raíz disminuye la formación de raíces secundarias, por lo que se reduce la absorción de nutrientes (Rambal y Debussche, 1995).

- Variaciones de las membranas celulares (Porcel et al., 2006) que modifican la actividad y contenido en proteínas tales como las acuaporinas (Aroca et al., 2011).
- El cierre estomático, con la consecuente pérdida de transpiración y de difusión de CO<sub>2</sub>, necesario para la fotosíntesis (Kramer y Boyer, 1995; Flexas et al., 2004).
- Variación del pH citosólico afectando a todo tipo de procesos celulares, desde la actividad enzimática hasta la movilidad hormonal (Chaves et al., 2003), generando el cierre estomático y afectando directamente a la transpiración y la fotosíntesis. También se ha visto su implicación en la regulación de las acuaporinas.

El estrés hídrico produce además **efectos bioquímicos**: El desacoplamiento entre la cadena de transporte de electrones y la formación de poder reductor conduce a que los electrones busquen un nuevo aceptor, el oxígeno (Kreslavski et al., 2012), generándose así una serie de moléculas oxidantes (O·, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y radicales OH·) conocidas como “especies reactivas del oxígeno” (ROS, de sus siglas en inglés). En condiciones normales, estas moléculas se producen en poca cantidad y pueden actuar como señalizadores celulares. Sin embargo, el estrés hídrico genera un desequilibrio energético debido al cierre estomático y la menor disponibilidad de CO<sub>2</sub>, que disminuyen la fotosíntesis (Chaves, 1991; Cornic, 2000). Esto da lugar a un “pico” en la producción de ROS que genera un estrés oxidativo secundario (Kreslavski et al., 2012). Las ROS degradan proteínas y atacan directamente la integridad de las membranas mediante la peroxidación de los lípidos (Mittler, 2002), afectando al sistema de transporte de electrones y destruyendo la clorofila (Manivannan et al., 2007), anulando la correcta actividad del sistema fotosintético. El daño oxidativo, además, produce la fragmentación del ADN pudiendo en último caso llegar a causar la muerte celular programada (Mittler, 2002). Todos estos efectos adversos confluyen en la paralización del crecimiento.

### 3.3. MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS FRENTE AL ESTRÉS HÍDRICO



Al ser organismos sésiles, las plantas no pueden escapar de los efectos medioambientales adversos, por ello han desarrollado mecanismos de defensa frente al estrés, que han sido denominados estrategias, y son características de cada especie (Larcher, 1995). Existen fundamentalmente 3 estrategias (Valladares et al., 2004):



**1) Estrategia de evasión:** Es aquella donde las plantas completan su ciclo vital antes de la llegada del estrés hídrico pasando el período desfavorable en forma de semilla o entrando en dormancia vegetativa. La maduración rápida o el ajuste de la reproducción a los momentos de lluvia, son también estrategias de evasión (Kramer y Boyer, 1995).

**2) Estrategia de evitación:** Estas plantas previenen o minimizan la penetración del estrés en sus tejidos. Dentro de esta estrategia encontraríamos dos mecanismos de evitación: uno por derroche de agua, el cual permite mantener hidratados los tejidos en plena sequía maximizando la absorción, y otro por ahorro de agua, minimizando las pérdidas. Ambos mecanismos mantienen a las plantas dentro del estado de turgencia, con potenciales hídricos relativamente altos. Los derrochadores asumen un riesgo mayor, pero pueden aprovechar mejor los episodios breves de buena disponibilidad hídrica (Vilagrosa et al., 2003). Sin embargo, cuando las condiciones de déficit hídrico se acentúan, no pueden mantener las elevadas tasas de transpiración, y, o bien se vuelven ahorradores, o bien el individuo muere (Levitt, 1980, Kozlowski et al., 1991).

**3) Estrategia de tolerancia:** Las especies con estrategia tolerante serían aquella que toleran que el estrés llegue a afectar a sus tejidos (Levitt, 1980). Estas especies tienen mecanismos que minimizan o eliminan el efecto del estrés alcanzando un equilibrio termodinámico con el mismo sin sufrir daños en sus estructuras (Valladares et al., 2004). Un aspecto importante de esta estrategia son los mecanismos reparadores, que la planta tiene que poner en funcionamiento cuando el estrés ha dejado de actuar (Levitt, 1980).

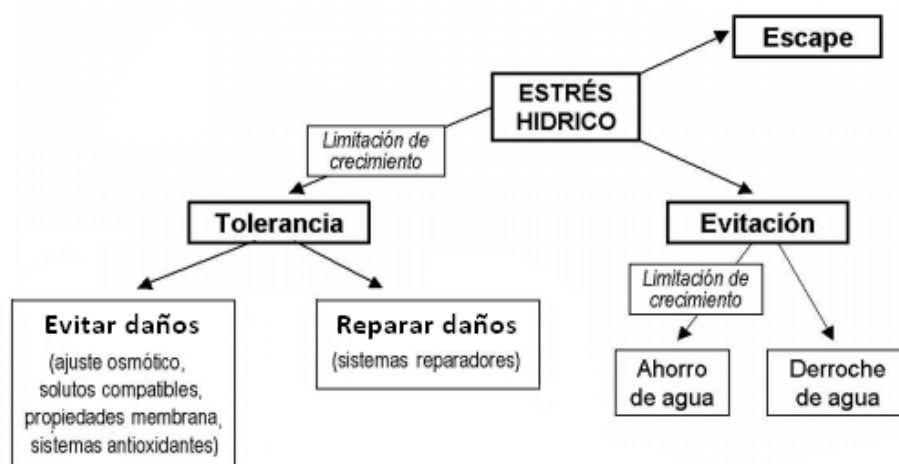


Imagen resumen de las estrategias de defensa de las plantas frente al estrés.

En estas dos últimas estrategias las plantas soportan el período desfavorable en estado vegetativo activo y son igualmente exitosas, ya que co-existen en especies adaptadas a ambientes deficitarios hídricamente, como los hábitats mediterráneos (Davis y Mooney, 1986; Rambal y Debussche, 1995; Abril y Hanano, 1998). Sin embargo las plantas han evolucionado hacia el desarrollo de mecanismos de evitación del déficit hídrico ya que les permite continuar creciendo y

desarrollándose en ambientes con carestía hídrica, evitando los efectos adversos y los costes energéticos asociados. Sin embargo, dado que una planta no es perfectamente impermeable a las pérdidas de agua, necesita mecanismos que le permitan tolerar un cierto déficit hídrico en sus tejidos, por lo que los mecanismos tolerantes complementarían a los anteriores.

### 3.3.1. ADAPTACIONES MORFOLÓGICAS A LA SEQUÍA

Las adaptaciones morfológicas y anatómicas son mecanismos de adaptación a largo plazo, ya que requieren de modificaciones lentas que se dan en plantas sometidas a un estrés recurrente y duradero. Por ello son habituales en plantas de climas áridos, aunque muchas otras plantas convergen en este tipo de estrategias cuando son sometidas a estrés. Son mecanismos destinados normalmente a la evitación del estrés:

- **Sistemas radicales profundos** y una mayor densidad de raíces secundarias para alcanzar el agua de las capas profundas del suelo. Este cambio activo de la relación raíz/parte aérea puede mejorar la eficiencia en el uso del agua disponible, al aumentar la superficie de absorción frente a la transpiración aérea, con el consiguiente mantenimiento del contenido hídrico celular.

- **Mayor lignificación/suberificación de las raíces** y el desarrollo de bandas de Caspary exodérmicas como protección frente a la pérdida de agua.

- **Modificación en el número de hojas:** En este sentido se ha visto que la senescencia inducida favorece la removilización de nutrientes desde las partes maduras de la planta hacia otras partes más necesitadas de la planta (hojas jóvenes o flores). Además, la senescencia suele ir acompañada de la abscisión de las hojas lo que reduce las pérdidas de agua por transpiración, contribuyendo al mantenimiento del balance hídrico general de la planta. Este efecto está controlado por el balance hormonal (Aimar et al., 2011). Aquí hay que matizar que las especies con una estrategia de “derroche” mantienen el número de hojas para fomentar que siga existiendo una alta transpiración que permita absorber el agua disponible rápidamente (Vilagrosa et al., 2003).

- **Suberificación y engrosamiento de las cutículas** de las hojas, aunque en consecuencia se produce la disminución de la fotosíntesis.

- **Evitar el exceso de radiación** y la formación de ROS mediante cambios de posición de las hojas, mayor densidad de pelos más cortos, reorganización del aparato fotosintético y de la antena, disminución en el contenido de clorofila o protección de los estomas, mediante su inclusión en estructuras especializadas (Chaves et al., 2003).

- **Acumulación de agua** en tejidos carnosos durante los periodos favorables.

- **Desarrollo de ramas y tallos:** Algunas plantas utilizan los tallos como lugares de reserva de nutrientes que pueden removilizarse en caso de necesidad (Blum et al., 1994). Otras desarrollan tallos fotosintéticos capaces de reducir la fotoinhibición y el sobrecalentamiento por exceso de radiación (Valladares y Pugnaire, 1999).



### 3.3.2. ADAPTACIONES FISIOLÓGICAS A LA SEQUÍA

Las adaptaciones fisiológicas están encaminadas al control de la tasa de transpiración, generalmente mediante el control estomático (Akinci y Losel, 2012), la mejora de la fotosíntesis, manteniendo la integridad de las membranas y el aparato fotosintético (Nanjo et al., 1999), el control de la conductancia hidráulica, generalmente mediante cambios hormonales y ajuste osmótico (Aroca et al., 2011), y favorecer el mantenimiento del **contenido hídrico relativo (CHR)**. El CHR es una medida ampliamente utilizada para estimar el estado de hidratación de las plantas y que se mantiene alta mediante el control conjunto de los procesos de transpiración y conductancia hidráulica, consiguiendo una turgencia celular adecuada (Nayyar y Gupta, 2006). Este tipo de adaptaciones son procesos a corto plazo, como respuesta más o menos rápida a variaciones en las condiciones ambientales, por lo que, en general, se corresponden con la estrategia de tolerancia al estrés, actuando una vez que éste afecta a la planta (Valladares et al., 2004).

#### 3.3.2.1. Ajuste osmótico y solutos compatibles. Prolina.

Una de las maneras de controlar el flujo hídrico a través de una planta es modificando el potencial hídrico ( $\Psi$ ) de sus células y tejidos. De manera pasiva, la reducción del contenido hídrico celular produce una concentración de moléculas que genera una disminución relativa del  $\Psi$  celular. Se ha encontrado, además, que existe una acumulación pasiva de diversos aminoácidos en condiciones de sequía (Girousse et al., 1996; Van Heerden y Kruger, 2002), que se produce como consecuencia de la disminución del crecimiento, ya que los requerimientos de la planta disminuyen y cesa la fabricación de proteínas, aumentando la acumulación de aminoácidos libres (Akinci y Losel, 2012). Sin embargo, no hay que confundir estos procesos con la acumulación activa de osmolitos que, en condiciones de estrés, consigue mantener un  $\Psi_{\text{celular}}$  más bajo que el  $\Psi_{\text{exterior}}$ , evitando la deshidratación de los tejidos, que es lo que se denomina **ajuste osmótico** (Iglesias-Acosta et al., 2010; Antolín y Sanchez-Diaz, 1992).

El ajuste osmótico posibilita el mantenimiento de la turgencia celular mediante la acumulación de moléculas tales como **iones inorgánicos**, especialmente  $K^+$  y  $Cl^-$  (Flowers y Yeo, 1986), **ácidos orgánicos** como el aspártico o el glutámico (Hamilton y Heckathorn, 2001), **azúcares** como la sacarosa y trehalosa (Steward, 1971; Quick et al., 1992; Antolín y Sanchez-Diaz, 1992; Holmström et al., 1996) o las hexosas (fructosa y glucosa) (Barlow, 1986; Drossopoulos et al., 1987; Holmström et al., 1996) y otras moléculas orgánicas sin carga específica, conocidas habitualmente como solutos compatibles.

Los **solutos compatibles** se caracterizan por su bajo peso molecular, por ser eléctricamente neutros, muy solubles y porque, aunque se encuentren en altas concentraciones, no resultan tóxicos para las células (Yancey et al., 1984). Existen tres grupos principales: Polialcoholes como el manitol y los ciclitoles (Loewus y Loewus, 1980; Tang et al., 2005), aminas cuaternarias, fundamentalmente glicina-betaína (Hanson et al., 1985; Moghaieb et al., 2004) y aminoácidos libres, fundamentalmente prolina (Antolín y Sánchez-Díaz, 1992; Porcel, 2006).

El ajuste osmótico es un mecanismo de tolerancia que resulta muy efectivo en condiciones de estrés moderado (Morgan, 1984). Sin embargo, cuando el estrés se vuelve demasiado severo, la paralización de la fotosíntesis es inevitable y reduce la fabricación de solutos compatibles y azúcares, por lo que el ajuste osmótico es insuficiente para evitar la inhibición del crecimiento de la parte aérea (Morgan, 1984; Akinci y Loser, 2012).

**La Prolina** es el soluto compatible más extendido entre los organismos vivos, siendo utilizado por eubacterias, invertebrados marinos, protozoos, algas y plantas superiores (McCue y Hanson, 1990; Delauney y Verma, 1993; Porcel, 2006). Su acumulación ha sido correlacionada con el aumento de la tolerancia al estrés en diversas variedades de plantas (Ober y Sharp, 1994; Kishor et al., 1995; Verslues y Sharp, 1999). Sin embargo, otros estudios han correlacionado su acumulación con una mayor sensibilidad al estrés (Chen et al. 2007). Esta controversia entre sensibilidad o adaptación al estrés aún no ha sido resuelta (Kishor y Sreenivasulu, 2014) y dependerá de la especie de planta y la intensidad del estrés aplicado. Aun así, la acumulación de prolina es sin duda alguna uno de los marcadores de estrés más utilizado en la cuantificación del mismo.

Es un aminoácido que se sintetiza en plantas a partir de dos sustratos, la ornitina y el glutamato. En condiciones normales de crecimiento se utiliza la vía de síntesis de la ornitina, mientras que en condiciones de estrés se utiliza la vía del glutamato (Kishor y Sreenivasulu, 2014). La prolina se sintetiza en el citoplasma y los cloroplastos de raíces y hojas (Lehmann et al., 2010; Szabados y Savoure, 2009), y es acumulada en las vacuolas (Fricke y Pahlich, 1990). Al iniciarse un estrés osmótico se produce la removilización de este compuesto hacia el citosol, pero su acumulación se debe fundamentalmente a la síntesis *de novo*, relacionada directamente con su regulación transcripcional (Yoshida et al., 1997). El estrés abiótico (sequía, salinidad y bajas temperaturas) y diversas hormonas (ABA, auxinas, ácido salicílico y óxido nítrico) promueven el aumento de la transcripción del gen *P5CS* que codifica la enzima clave en la biosíntesis de prolina. También se ve afectada por el aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Neill et al. 2008) que se genera habitualmente en condiciones de estrés (Mittler, 2002). Cuando se produce un estrés hídrico la prolina puede ser transportada a través del floema hasta las raíces de la planta. Se ha encontrado que el aumento en prolina está implicado en un mayor crecimiento radical en estas condiciones (Kishor et al., 1995). El catabolismo de la prolina se produce en las mitocondrias (Szabados y Savoure, 2009) promovida por la enzima ProDH, que reduce su actividad en condiciones de estrés abiótico, generando un

incremento sustancial de prolina libre (Sharma y Verslues, 2010). La oxidación de la prolina acumulada genera NADPH, que es utilizada como fuente de energía para el crecimiento celular, lo que permite a las raíces crecer en busca de nuevas fuentes de agua en el subsuelo, generando un cambio en la relación raíz/parte aérea.

Por otro lado, el exceso de prolina puede dar lugar a que la enzima que cataliza el último paso de oxidación (P5CDH) sea insuficiente, y se produzca una fuerte acumulación del intermediario de la degradación, el P5C (Miller et al., 2009). Este intermediario puede ser tóxico para la célula y su exceso se ha relacionado con una producción masiva de especies reactivas de oxígeno y una fuerte alteración del equilibrio REDOX mitocondrial (Cecchini et al., 2011) que reduce el crecimiento celular y puede llevar incluso a la apoptosis de la célula (Szabados y Saviouré, 2009; Sharma et al., 2011). Esto demuestra que el correcto balance entre la síntesis y la degradación de la prolina es vital para la planta (Miller et al., 2009; Sharma et al., 2011).

Por otro lado, la prolina contribuye al balance energético. En su síntesis y degradación se generan  $\text{NADP}^+$  y NADPH respectivamente (Kishor y Sreenivasulu, 2014). Esto, unido a su elevada movilidad no sólo entre distintas partes de la planta, sino también entre distintos compartimentos celulares, permite disponer de una fuente de energía allí donde es requerida, actuando como depósito energético (Sharadi y Sharadi, 1991).

La prolina ha demostrado tener también cierta capacidad para neutralizar radicales hidroxilo (Smirnoff y Cumbes, 1989; Hong et al., 2000; Ashraf y Foolad, 2007) y generar variaciones en diversas enzimas antioxidantes de la planta, aunque sus efectos varían de unas especies a otras (Ozden et al., 2009; Campos et al., 2011). Ejerce así un importante papel antioxidante, evitando el daño oxidativo a lípidos de membrana (Vendruscolo et al., 2007). También protege de la desnaturalización de las macromoléculas y estabiliza estructuras celulares (Schobert y Tschesche, 1978), formando incluso parte de proteínas estructurales de la pared celular (Nanjo et al., 1999). Se le han atribuido también otras funciones como la desintoxicación de metales pesados (Sharma et al., 1998; Rai, 2002) o la reducción de la acidez de las células (Kishor et al., 1995). Por último, actúa como señal de activación de la respuesta al estrés mediante la activación de genes específicos (Szabados y Saviouré, 2009). Así pues, las funciones de la prolina van mucho más allá de su papel como osmoregulador afectando a muchos procesos metabólicos de las plantas y actuando en la defensa frente al estrés abiótico a muchos niveles (Para revisión, leer Kishor y Sreenivasulu, 2014).

### **3.3.2.2. Ajuste hormonal. Ácido Abscísico (ABA).**

Cuando se produce un desajuste entre el agua que puede ser absorbida por las raíces y la que es perdida por transpiración, se genera deshidratación de los tejidos (Aroca et al., 2001), siendo la primera respuesta fisiológica el cierre estomático. Sin embargo, el cierre estomático se produce, en ocasiones, antes de que se observen variaciones en el contenido hídrico, potencial hídrico o

turgencia celular en las hojas, de manera tan precoz que no da tiempo a actuar al mecanismo de ajuste osmótico por acumulación de osmolitos (Trejo y Davies, 1991; Bano et al., 1993). Este tipo de observaciones dieron lugar a la idea de la existencia de moléculas-señal emitidas por las raíces y transportadas hasta la parte aérea consiguiendo poner en marcha los diversos mecanismos de defensa de la planta desde el primer momento, preparando así al resto de la planta para reducir sus efectos (Dubos y Plomion, 2003; Porcel y Ruiz-Lozano, 2004). Las moléculas capaces de realizar esta función en plantas se han llamado **hormonas vegetales**.

Las hormonas vegetales o fitohormonas, son compuestos orgánicos de producción endógena, que son producidos por distintos órganos de la planta y pueden actuar a muy bajas concentraciones en el mismo sitio donde se generan o bien ser transportados hasta las zonas “diana” donde desencadenan la respuesta fisiológica (Shamshad y Naqvi, 1999).

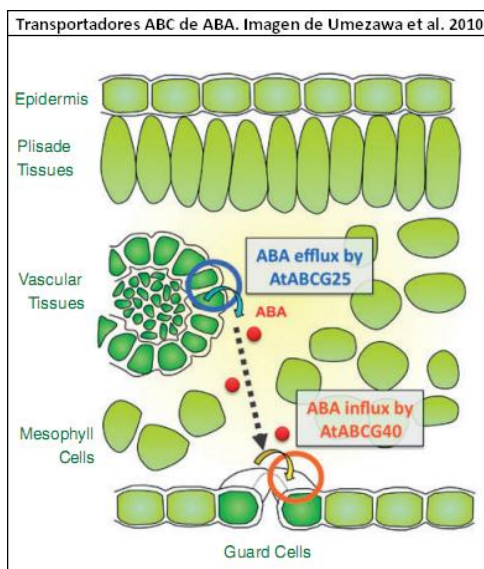
Hoy día se conocen 10 grupos de hormonas vegetales (Peleg y Blumwald, 2011): El ácido abscísico (ABA), el etileno, las auxinas, las citoquininas, las giberelinas, el ácido salicílico, los jasmonatos, los brasinoesteroides, las estrigolactonas y el óxido nítrico (aunque este último aún está en discusión) y de sus distintas concentraciones dependerán los efectos fisiológicos en la planta, por lo que existe un balance constante entre ellas y un exhaustivo control de su biosíntesis/degradación, transporte, percepción, transducción y respuesta (Weiss y Ori, 2007; Santner et al., 2010; Ghanem et al., 2011; Yang et al., 2011).

**El ABA** juega papeles importantísimos en el desarrollo y fisiología de las plantas. Entre ellos controlar la dormancia y germinación de las semillas, controlar la senescencia foliar, inducir la floración, retrasar la maduración del fruto, mantener el crecimiento de raíces, controlar el crecimiento de parte aérea, etc. (Hirayama y Shinozaki, 2007). Sin embargo, es su función como molécula-señal y de respuesta ante el estrés la que ha generado un mayor interés. El ABA controla procesos como el cierre estomático, la activación de la expresión de múltiples genes inducibles por estrés y cambios metabólicos fundamentales para la resistencia de las plantas al estrés (Seki et al., 2007), lo que ha dado lugar a un esfuerzo científico elevado por elucidar sus mecanismos de actuación, descubriéndose cada día nuevos procesos en los que interviene y mostrando un panorama ciertamente complejo (Para revisión, leer Hauser et al., 2011).

El ABA es un sesquiterpeno sintetizado a partir de carotenoides cuyo precursor es el ácido mevalónico (Skriver y Mundy, 1990) y que sigue una compleja **ruta de biosíntesis** donde la actividad de la enzima NCED es el paso limitante (Chernys y Zeevaart, 2000; Qin y Zeevaart, 2002), ya que existe una elevada cantidad de precursores de ABA “aguas arriba” que dependen de su actividad para continuar la ruta biosintética (Zhang et al., 2006; Ren et al., 2007). El último paso de transformación es el catalizado por la enzima AAO3 que ha sido localizada fundamentalmente en el sistema vascular y sus células circundantes (Koiwai et al., 2004) apuntando a estos tejidos como los principales productores de ABA.

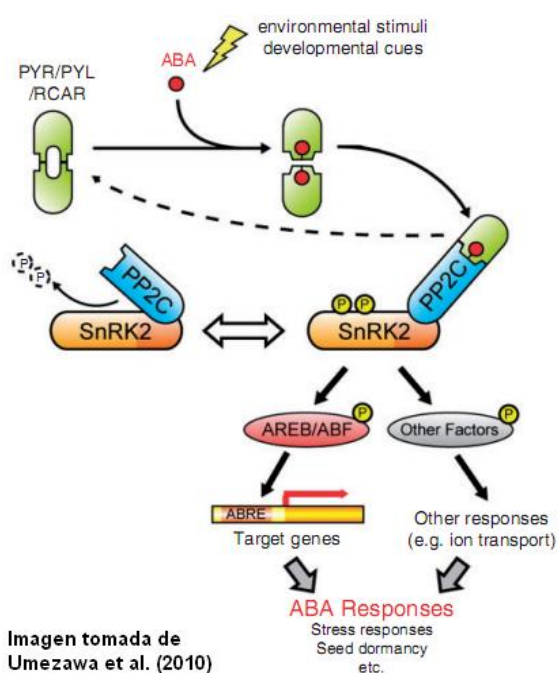
Es bien sabido que, ante una situación de estrés hídrico, aumenta la biosíntesis de ABA, que recupera niveles normales cuando se produce una rehidratación de la planta (Zeevaart, 1980). Este aumento es fruto de una ruta de señalización dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que se genera ante el estrés osmótico secundario y que estimula la transcripción de genes de la ruta biosintética del ABA (Xiong et al., 2002). La concentración de ABA no depende únicamente de un incremento de su síntesis sino también de su activación/inactivación. La **inactivación reversible o conjugación** del ABA se produce por glucosilación, dando lugar a la formación de ABA glucosil-éster (ABA-GE) (Kushiro et al., 2004), que actúa como molécula de transferencia o como molécula de almacenamiento de ABA en las vacuolas, pudiendo ser rápidamente reconvertido en ABA libre en respuesta a cambios en el desarrollo o a estrés (Lee et al., 2006). La **inactivación irreversible o catabolismo** consiste en su transformación en ácido faseico (PA) (Krochko et al., 1998) que se induce con la rehidratación de los tejidos (Okamoto et al., 2009). Las dos características más importantes del catabolismo del ABA son: que es un proceso muy rápido y que se produce de manera proporcional a la cantidad de ABA, por lo que ambos procesos (biosíntesis y degradación) mantienen una relación dinámica constante que controla los niveles en cada momento (Ren et al., 2007).

El **transporte** del ABA en el interior de la planta se realiza tanto a través del floema como del xilema. La distribución de ABA está directamente relacionada con el pH ya que es un ácido débil y las membranas son permeables a la forma protonada (ABAH), pero no a la ionizada ( $\text{ABA}^-$ ). Así, el ABA puede ser redistribuido por variación de gradientes de pH, sin variar la cantidad total de hormona en la planta (Ren et al., 2007). Se sabe desde hace muchos años que el pH del xilema se alcaliniza en condiciones de sequía (Wilkinson, 1999), esto permitiría al ABA en su forma ionizada llegar hasta la parte aérea a través de los haces vasculares de las hojas y, al no poder atravesar membranas, se movería por el apoplasto hasta las células diana. Sin embargo, este modelo estaba incompleto ante la falta de transportadores de membrana que permitiesen la salida del ABA del tejido vascular y su entrada en las células adyacentes del estoma. No ha sido hasta hace pocos años que se han conseguido caracterizar varios transportadores de membrana de la familia de los genes “ATP-binding cassette” (ABC) capaces de transportar ABA. Estos transportadores son: el *AtABCG25* (Kuromori et al., 2010), que aparece en la membrana de las células vasculares permitiendo la salida del ABA hacia el



apoplasto, y el *ATABCG40* (Kang et al., 2010), que permite la entrada al interior celular, completándose de esta manera el modelo.

La **percepción** del ABA está mediada por la unión a receptores de membrana (Shen et al., 2006; Pandey et al., 2009; Hua et al., 2012) y receptores solubles PYR/PYL/RCAR (Ma et al., 2009, Park et al., 2009). El “**núcleo**” de señalización se ha comenzado a descifrar en los últimos años gracias al descubrimiento en 2009 de estos receptores solubles (Ma et al., 2009, Park et al., 2009) que pertenecen a la superfamilia de los Pyrabactin-Resistance (PYR), *PYR-like1* (PYL) y Regulatory components of ABA receptor 1 (RCAR), y que se caracterizan por tener un “bolsillo” hidrofóbico en el que se introduce la molécula de ABA, generando un cambio conformacional que permite la unión del receptor PYR/PYL/RCAR a la proteína PP2C correspondiente. En ausencia de



ABA, estas proteínas interaccionan físicamente con las proteínas quinasas SnRK2 manteniéndolas inactivas por de-fosforilación, pero cuando el ABA se une a los receptores PYR/PYL/RCAR se forma un complejo ABA-PYR/PYL/RCAR-PP2C, que libera a la SnRK2 permitiendo la transducción de la señal. La liberación de la SnRK2 permite su auto-fosforilación y da comienzo a una cascada de fosforilaciones que llevan finalmente a la activación de diversos canales iónicos y factores de transcripción (AREB/ABF) (Para revisión, leer Hauser et al., 2011).

La unión de ABA a receptores de las células guarda de los estomas genera una serie de reacciones entrecruzadas que producen **el cierre estomático**: Por un lado, el ABA genera la salida de  $Cl^-$  de las vacuolas y, por la acción directa de las proteínas quinasas SnRK2

(OST1) sobre los canales de extrusión de aniones  $Cl^-$ , su salida al exterior celular. También activa las V-ATPasas que transportan protones hacia la vacuola, produciéndose una alcalinización del citoplasma y una despolarización de las membranas (Beguerisse-Diaz et al., 2012). La despolarización activa los canales voltaje-sensibles de salida de potasio generando una fuerte extrusión de  $K^+$ . Por otro lado, la OST1 fosforila a las NADPH oxidasas generando la producción de ROS y, como consecuencia indirecta, la producción de NO (Neil et al., 2008). Ambos tipos de moléculas aumentan la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico al promover su salida desde los compartimentos celulares y su entrada desde el exterior de la célula a través de canales transportadores de  $Ca^{2+}$  (Pei et al., 2000), que también son afectados directamente por la activación



de las CDPKs. El  $\text{Ca}^{2+}$  inhibe los canales de entrada de  $\text{K}^+$  produciéndose un mayor descenso de este en el interior celular y desactiva las  $\text{H}^+$ -ATPasas de entrada de  $\text{H}^+$  (Beguerisse-Diaz et al., 2012). Todo ello en conjunto conlleva a una disminución de iones en el citoplasma que empuja la salida por ósmosis de agua hacia las células adyacentes a través de las acuaporinas (Heinen et al., 2009). La disminución de la turgencia de las células guarda de los estomas genera el cierre estomático.

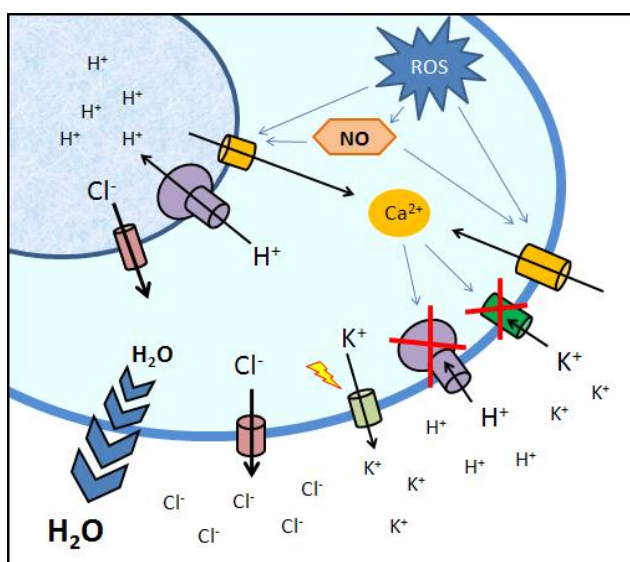


Imagen del conjunto de reacciones en cadena promovidas por ABA que generan el cierre estomático.

Otra de las respuestas más importantes al ABA es la **activación de la transcripción** de múltiples genes de tolerancia al estrés. Los estudios moleculares y genéticos han establecido que en condiciones de estrés hídrico existen dos vías de activación de genes: una ABA-dependiente y otra ABA-independiente (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997 y 2000; Riera et al., 2005). La transcripción de genes impulsada por ABA en estrés hídrico está implicada en múltiples procesos de tolerancia a la desecación entre los que se incluyen: el control de genes involucrados en su propia degradación (Krochko et al., 1998), la síntesis, degradación y actuación de otras hormonas (Peleg y Blumwald, 2011), el crecimiento de raíces (Sharp et al., 1994; Wang et al., 2010), la inhibición del crecimiento de la parte aérea (Sharp et al., 1994; Zhang et al., 2006), la regulación del desarrollo y la dormancia de las semillas (Seiler et al., 2011), la osmoregulación, mediante la producción de osmoprotectores como prolina y azúcares (Rook et al., 2001; Costa y Lobato, 2011), activación del sistema antioxidante de eliminación de ROS (Jiang y Zhang, 2002), regulación de canales de membrana como las acuaporinas (Kaldenhoff et al., 1996; Shinozaki et al., 1998) y producción de proteínas chaperonas como las proteínas *LEA* (Giordani et al., 1999; Aroca et al., 2008b).

Por último, hay que añadir que el ABA regula la **conductividad hidráulica ( $L_h$ )** de las raíces en condiciones de estrés hídrico, si bien, las respuestas generadas son a veces contradictorias (Parent et al., 2009). En múltiples estudios la respuesta a ABA ha sido asociada con el aumento de  $L_h$  (Morillon y Chrispeels, 2001; Aroca, 2006; Thompson et al., 2007), mientras que la aplicación de estrés hídrico produce el efecto contrario, inhibiendo  $L_h$  (North et al., 2004; Aroca et al., 2006; Vandeleur et al., 2009). Esta aparente contradicción se ha explicado en base a diferencias en el tratamiento, que en el caso de la aplicación exógena puede generar exceso de ABA, distintos mecanismos según el origen del ABA (externo o interno), degradación diferente del mismo o distinta localización celular (Aroca et al., 2003; Parent et al., 2009). Sin embargo, algunos estudios apuntan a un mecanismo compensatorio mediante ajuste osmótico promovido por ABA, que explicaría este comportamiento diferencial (Wang et al., 2010). También existen estudios en los que  $L_h$  no se ve afectado (Wan y Zwiazek, 1999) o incluso disminuye con la aplicación de ABA (Aroca et al., 2003).

Puesto que la conductancia hidráulica está directamente relacionada con las **acuaporinas**, numerosos estudios se han llevado a cabo sobre la regulación de acuaporinas por ABA encontrándose una clara relación entre estos dos factores que de nuevo presenta fuertes contradicciones siendo positiva (Kaldenhoff et al., 1993; Zhu et al., 2005; Aroca et al., 2006) o negativa (Suga et al., 2002) según los casos, lo cual es comprensible teniendo en cuenta las diferencias en el tratamiento, tejido, duración y severidad del estrés impuesto, especie de planta e isoformas de acuaporina analizadas. En cualquier caso, la respuesta de las acuaporinas y  $L_h$  a la aplicación de ABA es normalmente transitoria (Hose et al., 2000) y dependiente de su concentración (Zhu et al., 2005; Beaudette et al., 2007). Aunque los mecanismos mediante los cuales el ABA afecta a la expresión, acumulación y funcionamiento de estas proteínas aún no han sido del todo elucidados (Aroca et al., 2011), se han encontrado elementos cis de respuesta a ABA en algunas acuaporinas (Mariaux et al., 1998; Siefritz et al., 2001) y se ha demostrado la existencia de una regulación por fosforilación (Kline et al., 2010), por lo que parece que exista una doble regulación (transcripcional y post-traducciona) de las acuaporinas en respuesta a ABA.

### 3.3.3. ADAPTACIONES BIOQUÍMICAS: SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Como hemos mencionado anteriormente, las plantas sometidas a estrés hídrico presentan un aumento en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que generan un estrés oxidativo secundario en sus tejidos. Esto sugiere que los tejidos sometidos a estrés hídrico poseen un mayor estado de oxidación (Kramer y Boyer, 1995). Dicho estado puede detectarse por el estudio del daño oxidativo de lípidos de membrana, razón por la cual es una medida habitual en estudios sobre estrés. Los “picos” de producción de moléculas reactivas del oxígeno (ROS)



desnaturalizan proteínas y atacan directamente la integridad de las membranas, disminuyendo la fotosíntesis (Smirnoff, 1998; Mittler, 2002; Manivannan et al., 2007), y en grandes concentraciones son capaces de generar daños permanentes y muerte celular (Anjum et al., 2011). Por otro lado hemos hablado del peróxido de hidrógeno como señal molecular de estrés que a bajas concentraciones es capaz de activar las respuestas de la planta al estrés, mientras a altas concentraciones resulta igualmente perjudicial (Quan et al., 2008). Por último, ya hemos descrito la implicación de las ROS como mensajeros secundarios en el control del cierre estomático (Beguirisse-Díaz et al., 2012). Todo esto implica la necesidad de un control exhaustivo del contenido celular de las ROS, que se lleva a cabo mediante la activación/inactivación de los sistemas antioxidantes de la planta.

La primera ROS producida en las células de las plantas es el radical superóxido ( $O_2^-$ ), que se genera en condiciones normales como subproducto del metabolismo aeróbico, fundamentalmente en cloroplastos y mitocondrias, como consecuencia del exceso de electrones en las cadenas de transporte electrónico implicadas en los procesos de fotosíntesis (cloroplastos) y respiración (mitocondrias), aunque también pueden producirse en otros orgánulos celulares como peroxisomas (Mittler, 2002). El exceso de ROS en mitocondrias puede generar la muerte celular programada (PCD) por lo que en estos orgánulos existe un mecanismo propio en el que se produce el desvío del exceso de electrones de la cadena electrónica mediante la activación de las oxidasas alternativas AOXs, que utilizan el  $O_2$  para la formación de  $H_2O$  evitando su conversión en  $O_2^-$  tras la saturación

de la citocromo oxidasa. Por tanto, se podría considerar un mecanismo de evitación (Mittler, 2002).

El  $O_2^-$  es rápidamente transformado en  $H_2O_2$  por la enzima **superóxido dismutasa (SOD)** presente en casi todos los compartimentos celulares. La detoxificación de  $H_2O_2$  implica su transformación en moléculas no dañinas mediante tres mecanismos fundamentales, que pueden estar interrelacionados entre sí:

a) El primero se da en cloroplastos y es el llamado “ciclo del agua” en el que la energía necesaria es tomada directamente del aparato fotosintético para generar de nuevo agua (Asada, 1999).

b) El segundo es el ciclo ascorbato-glutation (Alscher et al., 1997): Este ciclo se basa en la reducción del peróxido de hidrógeno a agua mediante una cadena de reacciones de oxidación-reducción que incluye como elementos antioxidantes al **ácido ascórbico** y el

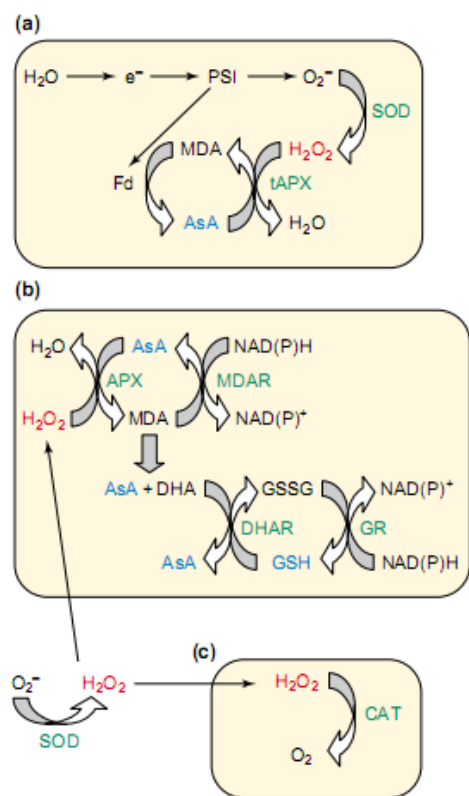


Imagen tomada de Mittler (2002)

**glutación**, que regeneran su estado de reducción gracias a la participación de enzimas como la **glutación reductasa (GR)**, la monodehidroascorbato reductasa (MDAR) y la dehidroascorbato reductasa (DHAR) utilizando NAD(P)H como fuente de poder reductor. El paso de  $H_2O_2$  a agua está catalizado por la **ascorbato peroxidasa (APX)** que tiene una alta afinidad por el peróxido de hidrógeno y aparece en casi todos los orgánulos celulares, por lo que se supone que tiene una alta influencia en el constante control del contenido de  $H_2O_2$  en su función de señalizador.

c) Por último, en los peroxisomas aparece la enzima catalasa (CAT) que es responsable de la eliminación del exceso de peróxido celular en caso de que aparezca en cantidades tóxicas, formándose  $O_2$ .

El primer mecanismo funciona correctamente mientras se conserve la integridad de las membranas y por tanto es más importante en condiciones normales, mientras que los dos últimos mecanismos tienen funciones imprescindibles en condiciones de estrés oxidativo, evitando que se acumulen grandes cantidades de ROS que puedan generar daños graves o incluso inducir la PCD (Para revisión, leer Mittler, 2002).

## 4. LAS MICORRIZAS

(Cuadros de Kandinsky)



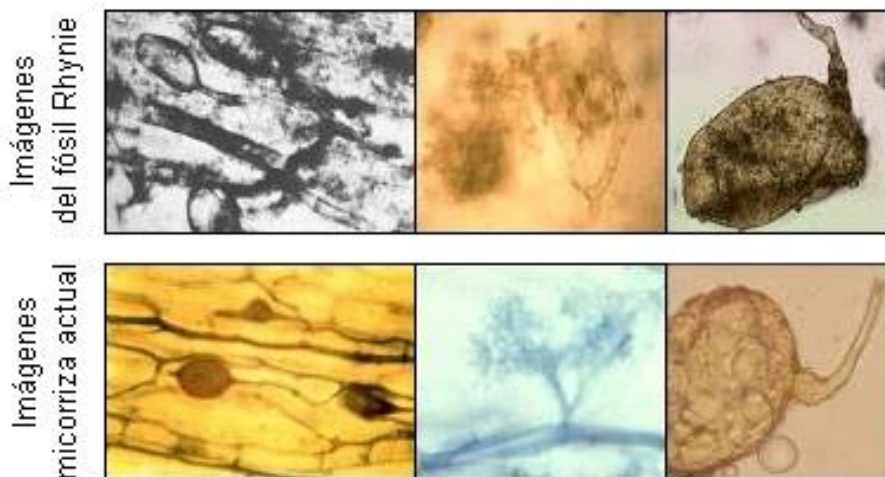
### 4.1. GENERALIDADES

Se conoce con el nombre de micorriza a la asociación mutualista establecida entre las raíces de la mayoría de las plantas y ciertos hongos del suelo en la que se produce un intercambio de nutrientes entre ambos simbios (Brundrett, 2002). Las micorrizas fueron descritas por primera vez en 1842 por Nägeli aunque el término “micorriza” fue acuñado por primera vez en 1885 por Albert Bernard Frank (Frank, 1885) que estableció que dicha asociación era mutualista. Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no sólo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas sino también porque puede estar presente en la mayoría de los hábitats naturales (Barea y Azcón-Aguilar, 1983). Esta integración es tan fuerte que puede hablarse de la formación de una nueva entidad Planta-Hongo.

Se pueden distinguir tres grupos fundamentales que difieren tanto en estructura como en las características fisiológicas de la simbiosis (Barea y Honrubia, 2004; Smith y Read, 2008; Brundrett, 2009): Las **endomycorrizas** colonizan las células del cortex de la raíz penetrando en su interior. La mayoría pertenecen al grupo de las micorrizas arbusculares (MA), que se caracterizan porque colonizan el interior de las células mediante divisiones dicotómicas sucesivas formando una estructura en forma de árbol donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo (Smith y Read, 2008). Las **ectomycorrizas** se caracterizan por la formación de una envoltura o manto alrededor de las células. En este caso el micelio penetra en las raíces a través de los espacios intercelulares sin llegar a penetrar intracelularmente. Por último existe un tercer grupo conocido como **ectendomycorrizas**, que presenta características intermedias de los dos grupos anteriores formando un manto y penetraciones intracelulares.

Las micorrizas son tan antiguas como las propias plantas, su origen se remonta al Ordovícico, cuando los primeros briófitos comenzaron su colonización del ambiente terrestre (Kenrick y Crane, 1997; Schüßler y Walker, 2011), aunque existen estudios que apuntan a que son incluso anteriores (Heckman et al., 2001; Smith et al., 2010), dando consistencia a la hipótesis de que el micotrofismo fue fundamental para la colonización del duro ambiente terrestres (Pirozynski y Malloch, 1975). Estas primeras micorrizas desarrollaban formaciones muy similares a los arbuscúlos actuales, tanto en estructura como en funciones, por lo que se considera a las MA como las más antiguas de la tierra y se asume que los mecanismos genéticos implicados se establecieron ya en estas primeras asociaciones (Wang y Qiu, 2006). El fósil Rhynie, de 460 millones de años (Remy et al., 1994) es

una evidencia de ello, así como los fósiles de hifas y vesículas encontrados en el mismo yacimiento correspondiente a hace 400 millones de años (Kenrick, 2003; Honrubia, 2009).



La diversificación de los hongos micorrícicos ocurre en correlación directa con la evolución de las plantas. Las diversas líneas de plantas que surgen en la transición de pteridófitos a plantas gimnospermas y posteriormente angiospermas contienen micorrizas del tipo ancestral (glomeromicetos) pero aparecen también nuevos grupos de micorrizas (ascomicetos y basidiomicetos), de modo que los nuevos grupos de plantas fueron capaces de colonizar nuevos ambientes no accesibles para los hongos MA (Malloch et al., 1980). Poco a poco esta asociación evolucionó de ser obligada a facultativa, y en algunos casos dio lugar a plantas no micorrizadas. Hoy día aproximadamente el 92% de las familias de plantas terrestres conocidas establecen de forma natural y constante este tipo de simbiosis con hongos del suelo (Wang y Qiu, 2006), siendo la simbiosis más extendida la que se establece con los llamados hongos micorrícicoarbusculares (MA).

## 4.2. MICORRIZAS ARBUSCULARES

### 4.2.1. IMPORTANCIA A NIVEL DE PLANTA, COMUNIDAD Y ECOSISTEMA



Las micorrizas arbusculares son las asociaciones mutualistas más extendidas del planeta, ya que afectan al 70-90% de las especies de plantas terrestres incluyendo a la mayoría de plantas con

interés agronómico e industrial (Trappe, 1986; Linderman, 1988; Smith y Read, 2008). Su importancia ecológica es absoluta, ya que son las grandes “autopistas” del subsuelo, que conectan plantas y microorganismos, son fuente de alimento, intervienen en los ciclos de nutrientes, modifican las propiedades del suelo y generan cambios en la diversidad de los ecosistemas (Corradi y Bonfante, 2012).

Su característica fundamental es la capacidad para generar redes de micelio de hasta 100m de hifas/cm<sup>3</sup> de suelo (Miller et al., 1995) que exploran el terreno y penetran en las cavidades del suelo inaccesibles para las raíces de las planta (Drew et al., 2003). Estas redes de micelio están altamente especializadas en la adquisición de agua y nutrientes, particularmente en aquellos nutrientes cuya forma iónica tiene baja movilidad como el fósforo y otros como el nitrógeno, que en condiciones particulares pueden estar presentes en cantidades bajas (Barea et al., 2005). Estos nutrientes son transferidos a la planta hospedadora a través de las estructuras intraradicales especializadas llamadas arbusculos, siendo una estrategia evolutiva fundamental para el crecimiento de las plantas especialmente en ecosistemas de bajos recursos, como el caso de las zonas áridas y semiáridas (Allen, 2007). Además de la absorción de nutrientes, se ha llegado a estimar que la contribución al aporte de agua de las micorrizas arbusculares puede alcanzar el 20% (Ruth et al., 2011) por lo que en condiciones de sequía puede ser fundamental para el desarrollo y la supervivencia de la planta. A cambio, los hongos formadores de micorrizas arbusculares reciben de su hospedador las moléculas carbonadas imprescindibles para su desarrollo y crecimiento calculándose que un 20% de los productos fotosintéticos producidos por las plantas terrestres es consumido por el hongo (Bago et al., 2000).

Al ser organismos biótrosos obligados (Parniske, 2008) y teniendo en cuenta su escaso grado de dispersión, los hongos MA han sido considerados siempre como organismos generalistas, lo que les conferiría la ventaja evolutiva de poder colonizar plantas de diversas especies o incluso varias plantas a la vez (Smith et al., 2009), con el consiguiente incremento en las posibilidades de obtención de carbono, necesario para completar su ciclo de vida. Si bien esto es cierto, se sabe que existe un cierto grado de especialización. Por un lado, se ha visto que una misma planta puede establecer simbiosis con distintos hongos MA (Santos-González et al., 2007), desarrollando fenotipos distintos que podrían beneficiar a unas especies de plantas frente a otras (Sanders, 2002), lo que conllevaría el desarrollo de procesos selectivos según el hábitat. De hecho, las evidencias apuntan a una cierta selección por parte de las plantas respecto a los hongos que son capaces de colonizarlas (Vandenkoornhuyse et al., 2003; Rosendahl y Stukenbrock, 2004), lo que puede modificar completamente la diversidad de hongos en un suelo determinado en función de una cierta “compatibilidad” entre los genomas de la planta y el hongo (Bever et al., 2002; Munkvold et al., 2004; Wolfe et al., 2005). A su vez, los hongos MA presentes como propágulos en el suelo pueden generar variaciones en el tipo de plantas que puedan desarrollarse en un ecosistema determinado, al

modificar las condiciones del suelo en el que habitan (Allen, 2007) y la capacidad de crecimiento de las plantas que son capaces de colonizar frente a las que no (Barea y Azcón-Aguilar, 2013), o frente a las que son colonizadas por otros hongos MA. De hecho, se ha demostrado que la diversidad de hongos MA puede determinar la diversidad de plantas de un ecosistema (Van der Heijden et al., 1998).

Además del efecto sobre las comunidades de plantas, también se ha estudiado ampliamente su interacción con otros organismos del suelo que genera cambios en la microbiota de la rizosfera, ya que modifican las propiedades del suelo, la disponibilidad de nutrientes y los exudados producidos por la planta y el propio hongo, además de servir ellos mismos como fuente de alimento (Smith et al., 2009). Así, la importancia de las micorrizas arbusculares alcanza un nivel superior al de la propia simbiosis y pasa a ser fundamental en el desarrollo de las comunidades y la sucesión ecológica (Azcón-Aguilar y Barea, 1996). Por último, las micorrizas modifican las propiedades del suelo en el que se desarrollan mediante la producción y acumulación de glomalinas, que ayuda a la formación de agregados del suelo, modificando las reservas de carbono, la acumulación de nutrientes y la capacidad de retención de agua del mismo (Paul y Clark 1989; Six et al., 2000). Por todo ello, las micorrizas son un elemento fundamental en el establecimiento y distribución de los diversos ecosistemas terrestres (Azcón-Aguilar y Barea, 1996).

#### 4.2.2. MORFOLOGÍA, GENÉTICA Y REPRODUCCIÓN

El micelio de los hongos MA es **aseptado** y **cenocítico**, lo que significa que contiene cientos de núcleos en un mismo citoplasma (Parniske, 2008) y esta característica se mantiene a lo largo de todo el ciclo de vida, incluido en las esporas, donde se ha encontrado además un elevado **polimorfismo** genético (Corradi y Bonfante, 2012). Los estudios realizados hasta ahora apuntan a que estos organismos son **haploides** (Hijri y Sanders, 2005) aunque la poliploidía ha sido propuesta por algunos autores (Pawlowska y Taylor, 2004).

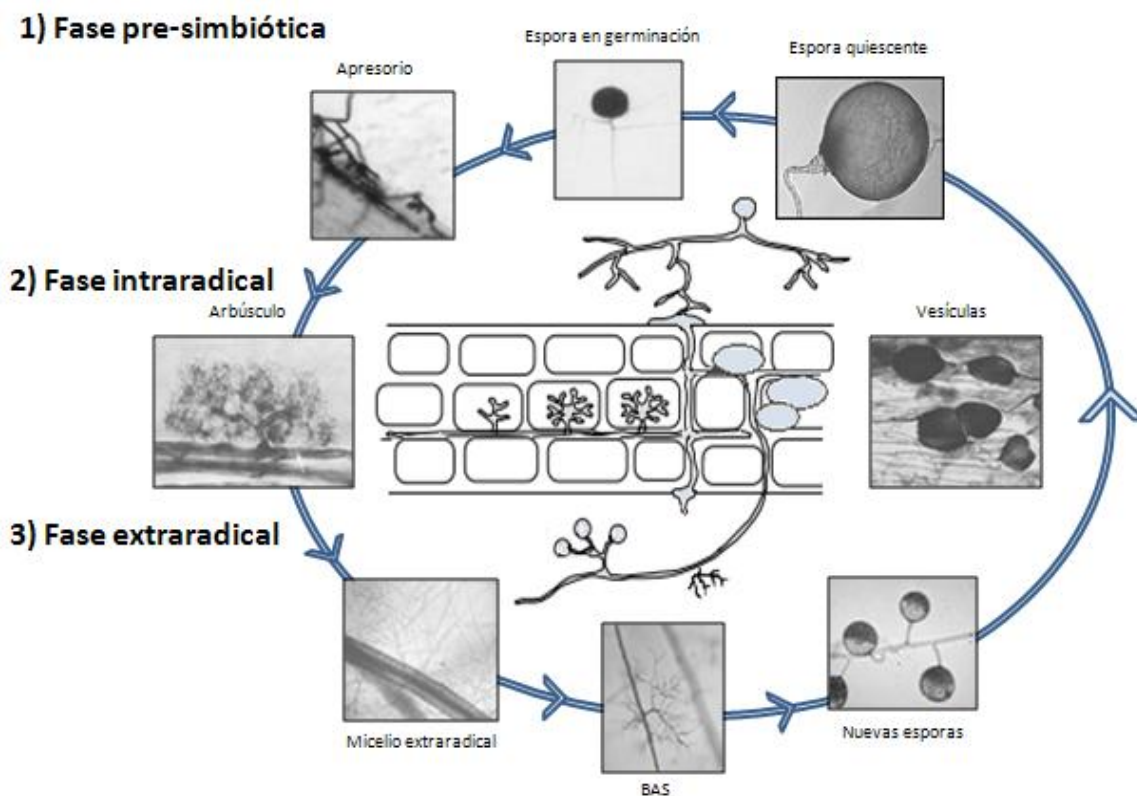
Los micelios de los hongos no son independientes, sino que se producen frecuentemente fenómenos de **anastomosis** con otros micelios procedentes de diferentes esporas, lo que da lugar a una continuidad de citoplasma y a la migración e intercambio de núcleos (Giovannetti et al., 2004; De la Providencia et al., 2005; Croll et al., 2009), confiriendo variabilidad genética de varios parentales (Angelard et al., 2010; Croll et al., 2009). Se ha demostrado que plantas inoculadas con micorrizas procedentes de un mismo inóculo pueden llegar a compartir nutrientes, por lo que la anastomosis parece ser también ventajosa para las plantas hospedadoras (Mikkelsen et al., 2008).

Históricamente se les ha considerado siempre como organismos de **reproducción asexual** basada en la clonación de núcleos (Judson y Normark, 1996). Esta característica sería fundamental para explicar el elevado polimorfismo y la divergencia genética entre sus poblaciones, ya que la



recombinación homogeniza las diferencias genéticas entre núcleos y por lo tanto entre individuos (Sanders y Croll, 2010). También explicaría la morfología casi idéntica entre ancestros y hongos actuales (Remy et al., 1994; Bonfante y Genre, 2008). Sin embargo, si la reproducción fuese exclusivamente asexual, habría una acumulación de mutaciones deletéreas que minarían la supervivencia de la especie (Maynard Smith, 1986; Judson y Normark, 1996), lo que apunta a la existencia de mecanismos sexuales que den como resultado la “limpieza” del genoma. Esto ha llevado a muchos investigadores a buscar activamente la **recombinación** en estos hongos con resultados contradictorios (Rosendahl y Taylor, 1997; Kuhn et al., 2001; Gandolfi et al., 2003). Recientemente, Croll y Sanders (2009) proporcionaron pruebas sólidas de recombinación genética en *Glomus intraradices* (Hoy llamado *Rhizophagus intraradices*) (Schüßler y Walker, 2010) y demuestra que la mayoría presentan un comportamiento casi totalmente clonal pero manteniendo un cierto porcentaje de recombinación en todos los casos.

#### 4.2.3. CICLO DE VIDA



##### 4.2.3.1. Fase pre-simbiótica

Existen tres fuentes de propágulos por las que los hongos pueden llegar a colonizar nuevas plantas: esporas, fragmentos de raíces micorrizadas e hifas, adquiriendo cada una diferente importancia como propágulo según el hábitat (Smith y Read, 2008).

Las **esporas** son las estructuras de resistencia. En el suelo aparecen diferentes poblaciones de esporas de distintas edades y estados de dormancia, de manera que funcionan como reservorio de inóculo que puede persistir durante años. Su tamaño puede alcanzar los 500µm de diámetro y están recubiertas de una gruesa pared, normalmente de quitina. Contienen gran cantidad de lípidos, algunos carbohidratos y de 800 a 35000 núcleos haploides (Sanders y Croll, 2010) con contenido en DNA variable (Smith y Read, 2008). En condiciones ambientales apropiadas las esporas germinan utilizando las reservas lipídicas y comenzando la formación de un micelio de 20-30mm sin apenas ramificación que crece de manera errática y que, en caso de que no detecte la presencia de señales moleculares exudadas por raíces, se retrae de nuevo y forma septos. Una vez se retrae, la espora y el micelio asociado son capaces de conservar su viabilidad por largos periodos de tiempo a la espera de condiciones más favorables.

Se sabe que los factores ambientales que afectan a la germinación son muchos, entre ellos la humedad, el pH del suelo, el potencial mátrico del mismo, la temperatura, la concentración de P, de otros nutrientes minerales y de metales pesados, la presencia de ácidos orgánico y azúcares, las condiciones de estrés, los exudados radicales, la actividad microbiana e incluso la cantidad de CO<sub>2</sub> (Para revisión, leer Smith y Read, 2008).

Cuando este primer micelio pre-simbiótico está en la cercanía de una raíz, se inicia un diálogo molecular entre ambos. Dentro de este diálogo parece que la exudación de flavonoides y estrigolactona por la planta tiene una importancia fundamental en el desarrollo del micelio (Gianinazzi-Pearson et al., 1989; Requena et al., 2007). Los **flavonoides** son una familia de compuestos muy amplia cuya exudación radical parece variar en función del hongo MA presente en las cercanías, lo que apunta a cierta especificidad dependiente de la especie de hongos (Abdel-Lateif et al., 2012). Las **estrigolactonas** exudadas por la planta forman un gradiente en el suelo cuyo aumento indica al hongo la proximidad de raíces (Parniske, 2008) favoreciendo su elongación y ramificación (Akiyama et al., 2005) así como la actividad fisiológica y mitocondrial del mismo (Besserer et al., 2006).

Del mismo modo que el hongo reacciona a la presencia de la planta, también ésta reacciona a la presencia del hongo (Para revisión, leer Harrison, 2005). Se sabe que los hongos emiten elicitores de diversos tipos que difunden en el suelo y generan en la planta la transcripción de genes relacionados con la simbiosis que preparan a la planta para el reconocimiento y penetración del hongo (Kosuta et al., 2003). Los **factores Myc** son moléculas lipochito-oligosacáridas que son reconocidas por receptores de la planta aún no identificados y que, por analogía con los factores Nod ampliamente estudiados en la simbiosis de leguminosas con *Rhizobium* (Walker et al., 2000), se cree que son los causantes de las oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> que se detectan en las células de los pelos radiculares cercanos al punto de contacto con el hongo MA. Puesto que la simbiosis MA es anterior



a la de las leguminosas, los factores Myc son probablemente los antecesores de los factores Nod, lo que apunta a un sistema ancestral común de reconocimiento (Wang et al., 2010; Maillet et al., 2011). De hecho, se sabe que existió un receptor común a los factores Nod y Myc (Bapaume y Reinhardt, 2012) y se han encontrado siete genes comunes a ambas simbiosis conocidos como **genes SYM** que están implicados en la reprogramación de la planta, su desarrollo celular y la reestructuración necesaria para la penetración de la hifa/bacterias y la formación de arbusculos/nódulos en el cortex de la planta. Estos genes están relacionados con la generación de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Kosuta et al., 2008; Parniske, 2008), sin embargo, la frecuencia y amplitud de estas oscilaciones es diferente según el tipo de simbiosis, por lo que se presupone que son las responsables de la distinta respuesta generada (Kosuta et al., 2008).

Además de estos genes, la proximidad del hongo y su detección por parte de la planta genera la activación de genes de los **sistemas de defensa de la planta** frente a patógenos. Parece que las MAMPS (moléculas patrón asociadas a microbios), comunes a microbios patogénicos y micorrizas, activan las NADPH oxidasas generando un incremento de producción de ROS, que suponen la primera barrera de defensa de las plantas (Recorbet et al., 2013). Se ha confirmado la existencia de genes SOD del hongo que se activan para la eliminación de ROS (Lanfranco et al., 2005). También se ha encontrado que existen programas de defensa basados en el etileno y el ácido salicílico (López-Ráez et al., 2010) que son neutralizados por proteínas producida tanto por el hongo (Kloppholz et al., 2011) como por la planta (Siciliano et al., 2007). Se ha hablado también de un sistema de defensa basado en la eliminación de elicitores por hidrolasas procedentes de ambos simbiontes (García-Garrido et al., 2002). Todos estos mecanismos neutralizan la respuesta defensiva de la planta y permiten el establecimiento de la simbiosis.

Una vez que la hifa alcanza la superficie de la raíz va creciendo paralela a ésta hasta seleccionar el punto de entrada mediante mecanismos aún desconocidos (Bonfante y Genre, 2010) entre los que un reconocimiento de las zonas de máxima actividad metabólica de las células epidérmicas de la planta pueda ser el desencadenante de la unión, ya que la exudación radical es más abundante en estas zonas. El hongo MA se adhiere en estos puntos formando una estructura ramificada llamada “**apresorio**” (Genre et al., 2005) mediante la activación de diversos genes del hongo (Breuninger y Requena, 2004). El apresorio se adhiere fuertemente a la raíz desarrollando protuberancias que penetran en la pared celular de la planta y genera una presión mecánica sobre la célula iniciando la fase de colonización, con la probable participación de otros factores de reconocimiento específico aún no identificados y probablemente con la participación de enzimas pectinolíticos y celulolíticos del hongo que producen la desorganización de la pared celular (Gus-Mayer et al., 1998; García-Garrido et al., 2000).

#### 4.2.3.2. Fase intraradical

El **aparato de pre-penetración (PPA)** es el comienzo de la fase de colonización y se genera unas 4-6h después de la formación del apresorio, dando tiempo suficiente a la preparación de la planta para el inicio de la penetración mediante la activación de nuevos genes además de los antes mencionados genes SYM (Bonfante y Genre, 2010). Entre ellos se encuentran algunos relacionados con la re-modelización de la pared celular, formación de membrana, factores de transcripción y genes de defensa de la planta (García-Garrido et al., 2002; Siciliano et al., 2007; Pumplin y Harrison, 2009; Kuhn et al., 2010), necesarios en todas las fases del desarrollo fúngico intracelular (Recobert et al., 2013). El proceso se inicia con la migración del núcleo de la célula de la planta hacia la zona de contacto debido, primeramente, a la presión mecánica del apresorio sobre la pared celular (Gus-Mayer et al., 1998). Desde allí, el núcleo va guiando la formación del PPA, que es un canal hueco formado por la reordenación de microtúbulos y microfilamentos y que funciona a modo de puente citoplasmático, dividiendo la vacuola y rodeándose de cisternas del retículo endoplasmático, cuerpos de Golgi y vesículas secretoras, los cuales permiten con su actividad el crecimiento del tubo y la formación de la membrana peri-fúngica que irá rodeando la hifa del hongo cuando ésta penetre (Genre et al., 2005; Siciliano et al., 2007). El canal va creciendo siguiendo el movimiento del núcleo y penetrando célula a célula hasta el cortex. La penetración de la hifa en el interior de una nueva célula no se produce hasta que este PPA está totalmente formado (Parniske, 2008).

Cuando la hifa llega al cortex sale al apoplasto, por donde se propaga extracelularmente formando un **micelio intraradical** que, a diferencia con las infecciones de hongos patógenos, nunca penetra la endodermis ni en los tejidos vasculares y meristemáticos (Harley y Smith, 1983); va formando ocasionalmente nuevas invaginaciones celulares que mediante divisiones dicotómicas generan la estructura llamada **arbúsculo**. La formación del arbúsculo conlleva la reestructuración completa de la célula que lo aloja. En primer lugar se genera alrededor de las ramificaciones de la hifa una **membrana periarbuscular**, formada por invaginaciones de la membrana plasmática de la planta, que recubre y comprime las hifas, modelándolas y separando la estructura fúngica del citoplasma celular. La formación de esta enorme cantidad de membrana requiere, al igual que la formación del PPA, de grandes cantidades de retículo endoplasmático, aparato de golgi y vesículas secretoras que van formando agregados que se anticipan al avance de las hifas en el interior celular (Genre et al., 2008). El espacio apoplástico que queda comprendido entre la membrana fúngica y la periarbuscular se denomina **espacio periarbuscular (PAS)** y al conjunto de estas tres estructuras se le reconoce como “**interfaz simbiótica**” y en ella tiene lugar el intercambio de nutrientes y probablemente de moléculas señal entre ambos simbioses (Parniske, 2008).

A la formación del arbusculo acompañan: la proliferación de plastidios, el crecimiento del núcleo y nucléolo, acompañado por una clara des-condensación que apunta a una elevada actividad de transcripción (Genre et al., 2008) y la fragmentación y disminución de la vacuola (Pumplin y Harrison, 2009) que se mantiene fuertemente ligada al simbiosoma, por lo que parece que las vacuolas, con su contenido concreto y la composición del tonoplasto, puedan estar también directamente relacionadas con la fisiología de la interfaz simbiótica (Bapaume y Reinhardt, 2012). Toda esta reordenación ha de ir ligada a una actividad transcripcional muy elevada y específica de esta simbiosis. En este sentido, se han encontrado diversos genes específicos que son imprescindibles en la formación de arbusculos, como los transportadores de fosforo PT11 y PT4 (Javot et al., 2007; Pumplin et al., 2010), los de producción de apocarotenoides, necesarios para la síntesis de hormonas como ABA, giberelinas y estrigolactonas (Strack y Fester, 2006; Walter et al., 2007 y 2010), subtilasas con actividad proteolítica (Takeda et al., 2009) y transportadores STR del grupo de los ABC transportadores (Zhang et al., 2010).

Además de estos genes específicos, existen más de 500 genes codificadores de proteínas cuyos niveles de expresión se ven significativamente alterados, incluyendo transportadores de nutrientes, factores de transcripción, genes implicados en la biogénesis de membranas y paredes celulares, genes implicados en la biosíntesis de hormonas y proteínas relacionadas con la dinámica y metabolismo celular, así como numerosos genes de defensa (Isayenkov et al., 2005; Franken et al., 2007; Bonfante y Genre, 2010; Recorbet et al., 2013).

La vida media de un arbusculo es corta, pudiendo variar de 1 a 10 días (Sanders et al., 1977). En ese tiempo, los arbusculos crecen hasta un tamaño máximo, tras el cual comienza un proceso de senescencia en el que se produce la separación del arbusculo mediante septos y el posterior colapso y retracción del citoplasma (Parniske, 2008). Cuando se produce el colapso de un arbusculo, la célula de la planta reordena su contenido recuperando su organización habitual (Bonfante-Fasolo, 1984), de manera que puede ser colonizada por nuevos arbusculos en el futuro. Esto significa que la infección es un proceso dinámico y que dentro de una misma raíz coexisten arbusculos en distintos estadios de desarrollo (Bonfante y Genre, 2010).

Un descubrimiento reciente verdaderamente interesante es que el periodo de vida de un arbusculo parece estar controlado por ambos simbiosomas. Por un lado, la planta hospedadora detecta los contenidos en fosfato y nitrato suministrados al PAS por el hongo MA, acelerando o decelerando la senescencia arbuscular en función de su utilidad para la célula hospedadora (Javot et al., 2007; Yang et al., 2012; Guether et al., 2009b, Gutjahr y Parniske, 2013). De modo similar, el hongo MA detecta el nivel de abastecimiento de carbono que la célula de la planta cede al arbusculo, generando una senescencia prematura en caso de disminución del mismo y cancelando así su aporte de nutrientes (Baier et al., 2010, Helber et al., 2011; Kiers et al., 2011). Este mecanismo de percepción mutua y reajuste es imprescindible para la elección de simbiosomas

eficientes por ambas partes, estableciéndose en los ecosistemas naturales el mejor equilibrio simbiótico posible según las circunstancias ambientales (Kiers et al., 2011).

Además de arbusculos, algunos hongos MA desarrollan estructuras globosas conocidas como **vesículas**, que tienen un alto contenido en lípidos y parecen constituir un órgano de reserva de nutrientes (Barea et al., 1991). Estas estructuras no son efímeras como los arbusculos, sino que van madurando con el paso del tiempo, pudiendo en algunos casos convertirse en esporas en situaciones concretas. Fue la observación de estas estructuras claramente visibles en la raíz lo que llevó a que durante mucho tiempo, las micorrizas arbusculares se denominaran de hecho micorrizas vesículo-arbusculares, aunque hoy sabemos que no todas las especies de hongos MA las forman (Koide y Mosse, 2004).

### 4.2.3.3. Fase extraradical

Cuando la infección interna está bien establecida, las hifas del hongo crecen externamente formando el **micelio extraradical**, aumentando considerablemente el volumen de suelo que puede ser explotado para la adquisición de recursos para la planta hospedadora (Varma, 2008). Este micelio comienza su crecimiento con hifas exploradoras que van sufriendo ramificaciones extendiéndose por el terreno. Sobre el micelio externo se forman a intervalos regulares estructuras transitorias conocidas como BAS (*Branched Absorbing Structures*) cuya estructura y características apuntan a que su función sea la absorción de agua y nutrientes (Bago, 2000). Además de BAS, se generan del micelio externo las esporas de resistencia, cerrando con ello el ciclo de vida del hongo MA.

## 4.3. FISIOLÓGÍA DE LA SIMBIOSIS



Como hemos mencionado anteriormente, las micorrizas son fundamentales para la extracción de nutrientes poco accesibles para la planta y a cambio reciben de esta productos fotosintéticos. La base de esta interacción es por lo tanto su capacidad para intercambiar compuestos, proceso que ocurre habitualmente en los arbusculos. El transporte activo de los distintos metabolitos a través de las membranas que componen la interfaz simbiótica va acoplado al transporte de protones, cuyo gradiente se genera gracias al funcionamiento de  $H^+$ -ATPasas de la planta, que se activan

específicamente en los arbusculos (Gianinazzi-Pearson et al., 1991; Ferrol et al., 2000; Requena et al., 2003).

La micorriza mejora la adquisición de agua y macronutrientes básicos para el desarrollo de la planta como el P y el N, pero también es fundamental para la captación de otros compuestos esenciales en pequeñas cantidades como el K, S, Fe, Zn, Ni, Mg, etc. y el control de la acumulación de metales pesados tóxicos para la planta (Ike-Izundu, 2007). En los siguientes apartados nos centraremos en la fisiología de intercambio de aquellos nutrientes que juegan un papel fundamental en la simbiosis.

#### 4.3.1. EL FÓSFORO

El fósforo es uno de los elementos esenciales para los organismos vivos ya que forma parte estructural de ácidos nucleicos, fosfolípidos, enzimas y coenzimas, y está involucrado directamente en el metabolismo energético, la activación de cascadas de señales, activación de metabolitos intermediarios y regulación enzimática. Su movilidad en suelos es reducida, por lo que existe un desequilibrio entre la captación por las raíces y la reposición por difusión, generándose alrededor de las raíces las llamadas “zonas de agotamiento” (Shapiro et al., 1960). Las micorrizas son una estrategia efectiva para solucionar este problema ya que crecen más allá de la zona de agotamiento alcanzando nuevas fuentes y mejorando la solubilización del mismo (Karandashov y Bucher, 2005; Ezawa et al., 2005), por lo que se ha considerado que el aporte de fósforo es el elemento clave en el establecimiento de la simbiosis micorrízica.

Se han encontrado diversos transportadores de fósforo en el micelio extraradical de hongos MA con alta afinidad por el mismo (Harrison y Van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza et al., 2001; Benedetto et al., 2005). Puesto que el exceso de iones fosfato puede causar un aumento de la presión osmótica, el fósforo es transformado rápidamente en polifosfatos (PolyP) que se acumulan en vacuolas tubulares asociadas al citoesqueleto que forman una red de cisternas que se mueve por pulsos peristálticos (Rasmussen et al., 2000; Bago et al., 2001) transportando los PolyP al micelio intraradical, donde se hidrolizan por la acción de diversas fosfatasas (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1978; Aono et al., 2004; Javot et al., 2007). El fósforo es transferido al PAS mediante transportadores o canales aún desconocidos, de donde son tomados por la planta gracias a transportadores específicos de la familia de los Pht1, localizados en la membrana periarbuscular (Rausch et al., 2001; Harrison et al., 2002; Paszkowski et al., 2002; Karandashov y Bucher, 2005). La inducción de estos transportadores por la simbiosis micorrízica conlleva una disminución de los transportadores propios de la raíz de la planta (Liu et al., 1998; Karandashov et al., 2004) que delegan esta función en su simbionte dada su efectividad en la rápida incorporación y transporte de este nutriente (Ezawa et al., 2004; Ohtomo y Saito, 2005), aunque esta eficiencia varía en función

de las especies implicadas (Smith et al., 2003; 2004). El fósforo disponible es un factor fundamental que regula el establecimiento de la simbiosis, ya que el aumento del P en las hojas da lugar a la inhibición de los mecanismos sistémicos de señalización de carencia de fósforo (Lin et al., 2008) reactivando los transportadores propios de la planta (Nagy et al., 2009; Denvers, 2011), reduciendo la producción de estrigolactonas, disminuyendo la fase presimbiótica de la colonización (López-Raez et al., 2008; Balzergue et al., 2011) e inhibiendo la translocación de carbohidratos a las raíces (Olsson et al., 2002), por lo que las micorrizas reducen su crecimiento y comienzan la senescencia arbuscular (Denvers, 2011; Kiers et al., 2011).

#### 4.3.2. EL NITRÓGENO

El nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes para los organismos vivos. Debido a la alta movilidad de sus compuestos inorgánicos en el suelo, puede ser obtenido directamente por las plantas sin generar zonas de agotamiento, por lo que se pensó durante mucho tiempo que la simbiosis micorrícica no era fundamental para la obtención de este compuesto como lo es en el caso del fósforo (Smith y Smith, 2011). Sin embargo, la concentración de N es generalmente muy baja en los suelos naturales convirtiéndose en el macronutriente limitante para el crecimiento de las plantas (Gobert y Plassard, 2008) y diversos estudios apuntan a que la micorriza supone una estrategia efectiva que permite aumentar el radio de absorción, resultando especialmente importante en condiciones de sequía, donde la movilidad del N se ve fuertemente reducida (Azcón et al., 1996; Kerbirou et al., 2013). Se sabe que las MA favorecen la solubilización orgánica del N (Hodge et al., 2001) además de haber numerosas evidencias de su acumulación extraradical y su transferencia a la planta (Toussaint et al., 2004; Tanaka y Yano, 2005; Smith y Smith, 2011). Además, se ha demostrado que la presencia de N disponible directamente para las plantas reduce la translocación de carbohidratos a las raíces micorrizadas de manera similar a como veíamos en el caso del fósforo (Olsson et al., 2002).

Bago y colaboradores (2001) propusieron un modelo de transporte de N en MA que ha sido confirmado por Govindarajulu y colaboradores (2005). Las micorrizas adquieren fundamentalmente nitrógeno inorgánico del suelo, aunque aún no se ha descartado la posibilidad de que absorban N orgánico (Hodge et al., 2001; Jin et al., 2005; Capellazzo et al., 2008). Se han encontrado transportadores de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  en el micelio extraradical (López-Pedrosa et al., 2006; Tian et al., 2010; Pérez-Tienda et al., 2011). Ambos compuestos pueden ser asimilados, ya que se ha confirmado la presencia y actividad enzimática de nitrato reductasa (Jin et al., 2005; Tisserant et al., 2012) así como las enzimas del ciclo GS/GOGAT en el micelio extraradical (Johansen et al., 1992) que dan lugar a la formación de glutamina/glutamato, que mediante el ciclo de la urea generan arginina, que es la forma más abundante en el micelio extraradical (Johansen et

al., 1996) y es la forma utilizada para el transporte al micelio intraradical, utilizando para ello el sistema de vacuolas tubulares conectadas que veíamos en el apartado anterior (Javot et al., 2007). De hecho, parece que pueda existir una interconexión entre ambos transportes y sus regulaciones de manera que los polyP, de carga negativa, son compensados por arginina, de carga positiva, durante el transporte (Jin et al., 2005), aunque no se descarta la implicación de otros cationes que el hongo transporta hacia la planta, como el  $K^+$  (Smith y Smith, 2011; Hairu et al., 2012).

La formación de Arg requiere de carbono, que el hongo obtiene de la planta. Se ha comprobado que la transferencia de N al espacio peri-arbuscular requiere un previo catabolismo de la arginina mediante un nuevo ciclo de la urea y diversas enzimas que dan lugar a  $NH_4^+$  (Govindarajulu et al., 2005; Tian et al., 2010). Este proceso está regulado por el sustrato (Arg) proveniente del micelio extraradical (Cruz et al., 2007) y está destinado a reciclar el carbono utilizado en el transporte (Fitter et al., 1998) de manera que no suponga un gasto extra para el hongo, cuyo contenido en carbono es dependiente de la planta y, por tanto, limitante.

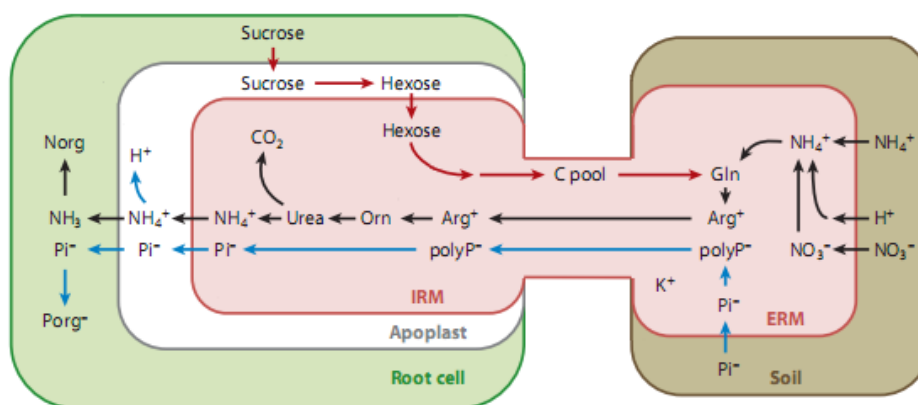


Imagen resumen del metabolismo del nitrógeno y el fósforo en la interfaz simbiótica tomada de Bago et al. (2001).

La transferencia del N a través de la interfase simbiótica es probablemente la parte más desconocida del proceso y no existe una imagen clara de cómo se produce (Chalot et al., 2006). Hay que tener en cuenta que el espacio periarbuscular es fuertemente ácido, por lo que la exportación de  $NH_4^+$  y su posterior incorporación a la planta requiere de un balance iónico constante y altamente regulado. Se han encontrado transportadores de  $NH_4^+$  de la familia de los AMTs en el micelio intraradical (Bapaume y Reinhardt, 2012; Gaude et al., 2012) pero la exportación de  $NH_4^+$  a un medio repleto de este compuesto podría resultar muy costoso y se ha propuesto que pueda funcionar de igual o mejor forma a la inversa, importando  $NH_4^+$  hacia el hongo (Chalot et al., 2006; Maurel y Plassard, 2011). También se han encontrado supuestos transportadores de nitrato y amonio de la planta inducidos en las células arbusculadas durante la simbiosis (Javot et al., 2007) pero su función exacta y localización son desconocidos. Guether et al.



(2009a) encontraron y caracterizaron un transportador de amonio de *Lotus japonicus* que toma  $\text{NH}_4^+$  del espacio periarbuscular y libera un  $\text{H}^+$  antes del transporte de manera que el N accede a la planta en forma de  $\text{NH}_3$ . Esta posibilidad de transporte permite mantener los protones libres necesarios para el transporte activo de otros solutos sin perjudicar el balance homeostático del citoplasma celular. Sin embargo existen dudas de que este transporte sea posible sin el co-transporte con  $\text{H}^+$ , ya que es un proceso activo (Smith y Smith, 2011). En cualquier caso, no hay que perder de vista la posibilidad real de que ciertas **acuaporinas** estén implicadas en el proceso, ya que el espacio peri-arbuscular ácido elimina el contenido en  $\text{NH}_3$  neutro, que rápidamente se protona, por lo que podría permitir el paso de este compuesto a favor de gradiente desde el hongo al PAS a través de acuaporinas y trabajar de manera combinada con otros transportadores (Dietz et al., 2011). Por otro lado, se ha hablado de una clara relación entre la Nod26, presente en el simbiosoma de plantas leguminosas, con las TIPs de plantas no leguminosas (Wallace et al. 2006) ya que ejerce un importante papel en la regulación osmótica del citosol de manera similar al que ejercen las TIPs en otras plantas (Maurel et al. 2002), idea que concuerda con el hecho de que al intentar expresar Nod26 en plantas no leguminosas, esta aparece asociada al tonoplasto. La fuerte homología de las TIPs con la bien estudiada Nod26 de plantas leguminosas (Wallace et al., 2006; Maurel et al., 2002), hace pensar que, al igual que Nod26 está relacionada con el transporte de  $\text{NH}_3$  como un primer paso de asimilación del N por la planta (Mifflin et al., 2002) y parece ser la clave para evitar la toxicidad que genera la acumulación de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  al entrar masivamente al citosol en las zonas simbióticas (Britto et al., 2001b), las TIPs podrían desempeñar un papel similar, acumulando el  $\text{NH}_3$  en las vacuolas y generando un gradiente favorable para que continúe el flujo de entrada al citoplasma a través de otras acuaporinas. Del mismo modo, puesto que los hongos MA transfieren gran cantidad de N a la planta cuando éste se aplica en forma de urea (Tanaka y Yano, 2005) y dada la existencia de acuaporinas de plasma-membrana y tonoplasto capaces de transportarla (Gu et al., 2012), tampoco hay que descartar la posibilidad de un transporte de este compuesto a favor de gradiente a través de acuaporinas. Estudios sobre el posible papel de las acuaporinas en el intercambio de N en plantas micorrizadas y su localización, especialmente en la interfase simbiótica, pueden por lo tanto aportar nuevas perspectivas que permitan completar el modelo actual.

#### 4.3.3. EL CARBONO

Los hongos MA son incapaces de adquirir carbono del medio (Pfeffer et al., 1999), lo que les convierte en biótrosos obligados dependientes de la producción fotosintética de las plantas. Las plantas micorrizadas destinan entre un 4 y un 20% más de foto-asimilados a las raíces (Bago et al., 2000). Esta producción extra de carbono podría considerarse como un coste excesivo para la planta,



sin embargo se ha comprobado que la micorrización estimula la actividad fotosintética de la planta y que, junto con el aumento de la nutrición fosforada promovida por el hongo que ejerce también un efecto beneficioso en el sistema fotosintético, aumenta la fijación de carbono produciéndose lo que se ha llamado “compensación fotosintética” (Jakobsen, 1995; Fester et al., 2005). Además, la micorrización promueve el crecimiento de la parte aérea frente a las raíces, por lo que una mayor cantidad relativa de carbono es empleada por las plantas micorrizadas en su propio crecimiento y producción. Así pues, el beneficio de la micorrización respecto al balance de carbono es mutuo (García-Rodríguez, 2006).

En base a los conocimientos actuales existe un modelo en el que la sacarosa es cedida al espacio periarbuscular mediante transportadores de hexosas de la planta (Harrison, 1996), previa hidrólisis por la sacarosa sintasa (SucS) citoplasmática, o bien mediante transporte pasivo en forma de sacarosa, siendo hidrolizada posteriormente por enzimas sacarosa invertasas del PAS. Ambas enzimas han sido encontradas en zonas relacionadas con la micorrización (Blee y Anderson, 2002; Ravnskov et al., 2003; Hohnjec et al., 2003) y son cruciales en el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis (Schaarschmidt et al., 2007; Baier et al., 2010). Pfeffer et al. (1999) demostraron que las micorizas absorben hexosas del espacio periarbuscular, probablemente mediante co-transporte activo de  $H^+$  (Schübler et al., 2006) y transportadores de hexosas de alta afinidad como el MST2, (Helber et al., 2011). Una vez en el micelio intraradical, el carbono se fija en moléculas de mayor tamaño y menor efecto osmótico como glucógeno y trehalosa (Douds et al., 2000) o bien, si el aporte se mantiene durante periodos largos, se generan lípidos. Estos lípidos y el glucógeno son las formas en que se transfiere el C al micelio extraradical, donde se concentra la actividad gluconeogénica del hongo que libera los carbohidratos para su uso (Rillig et al., 2001; Bago et al., 2002 y 2003; Govindarajulu et al., 2005).

#### 4.3.4. EL AGUA

El efecto de las micorizas sobre la **estructura del suelo** es el primer factor que mejora la resistencia de las plantas a la sequía. Las micorizas constituyen una matriz en la que el suelo forma agregados, con mejor estructura y aireación, y con ello mayor número de organismos que viven en comunidades rizosféricas estables que permiten la formación de una fase orgánica desarrollada, mejorando la presencia de nutrientes y la retención de agua, imprescindibles en periodos de sequía. Además de mejorar la disponibilidad de agua en el suelo, las plantas micorrizadas presentan una mayor capacidad para obtener agua de los poros del suelo inaccesibles para las raíces de plantas sin micorrizar gracias a una **mayor superficie de absorción** y a una mayor capacidad para extraer el agua en suelos con bajo potencial hídrico (Augé, 2001; Ruiz-Lozano, 2003; Lehto y Zwiazek, 2011). De hecho, se estima que la densidad de las hifas del micelio extraradical puede ser desde 1 a 100m por gramo de suelo (Smith et al., 2010). Por otro lado, el **diámetro de las hifas** es mucho

menor que el de las raíces y tiene la capacidad para ajustarse al tamaño de los poros del suelo (Drew et al., 2002), por lo que el acceso a agua y nutrientes en suelos secos o compactados es mucho mayor que el de plantas no micorrizadas. También se ha sugerido que la mayor absorción de las plantas MA se deba a la **eliminación de las fases gaseosas** que se producen entre las raíces y las partículas del suelo debido al exceso de transpiración y absorción de agua no repuesta (Nobel y Cui, 1992). Estas “burbujas” de aire pueden ser eliminadas por el contacto íntimo entre las micorrizas y el suelo o la producción de glicoproteínas, formándose una conexión que mantiene la continuidad de los líquidos reduciendo la pérdida de conductancia hidráulica del suelo (Wright et al., 1998; Smith et al., 2009). De hecho se ha visto que, a igual tamaño, las plantas micorrizadas acaban más rápido con el agua disponible en el suelo (Bryla y Duniway, 1998; Ebel et al., 1994; 1996). Este efecto se cumple en el 75% de los estudios realizados y puede ser debido tanto a una mayor demanda evaporativa de estas plantas (Faber et al., 1991), como a la mayor superficie de absorción y penetración en el suelo (Allen et al., 1981; Huang et al., 1985; Augé, 2001). También existen algunos estudios en los que se observa el efecto contrario, con una mejor hidratación del suelo circundante (Augé et al., 1994, 1995; Subramanian et al., 1997) lo cual puede ser debido simplemente a la mejor estructura del suelo. Igualmente puede estar relacionado con el proceso de **redistribución hidráulica (RH)** por el cual las plantas son capaces de redistribuir el agua del suelo de las zonas más húmedas a las más secas a favor de gradiente de potencial durante periodos de baja transpiración (Burgess et al., 1998) y que es fundamental durante los periodos de sequía, en los que la zona superficial del suelo sufre mayor desecación que las zonas profundas. De este modo, se consigue mantener un nivel mínimo de humedad en las capas altas que permita el mantenimiento de las raíces (Caldwell et al., 1998) y de las hifas de los hongos micorrícicos, permitiendo que continúen con su función en la absorción de agua y nutrientes del suelo (Querejeta et al., 2003). Así, este proceso podría ser el causante de una mayor hidratación de la rizosfera por la presencia micorrícica en determinadas situaciones (Querejeta et al., 2012). Lo que sí es seguro es que las hifas son capaces de transferir grandes cantidades de agua desde el suelo hasta la planta hospedadora (Ruiz-Lozano y Azcón, 1995; Marulanda et al., 2003; Khalvati et al., 2005; Ruth et al., 2011).

Por último cabe destacar que en los últimos años se han encontrado acuaporinas propias de los hongos MA. La primera encontrada fue la GintAQP1 en *R. intraradices* (Aroca et al., 2009). Más recientemente se encontraron dos más en *R. irregularis* GintAQP1 y GintAQP2 (Li et al., 2013). Estas últimas acuaporinas se han visto relacionadas con el transporte de agua en el micelio extraradical, así como en la membrana periarbuscular, son capaces de transportar agua en sistemas heterólogos y han mostrado un incremento en su expresión génica en condiciones de estrés hídrico (Li et al., 2013). Así, la capacidad de las plantas MA para obtener mayor cantidad de agua del suelo bajo condiciones de estrés puede deberse a la actuación de estas acuaporinas, y de hecho, Aroca et

al. (2009) aportan evidencias que apuntan a un mecanismo en el que el aumento de las acuaporinas del hongo compensaría la disminución de las acuaporinas de la planta hospedadora bajo condiciones de estrés.

#### **4.4. INCREMENTO DE LA RESISTENCIA AL ESTRÉS HÍDRICO EN LAS PLANTAS MICORRIZADAS**



Además de su función fundamental en la nutrición vegetal, las micorrizas proporcionan una defensa frente al estrés biótico por hongos y bacterias patógenas, nematodos y herbívoros (Azcón-Aguilar y Barea, 1996; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007; Veresoglou and Rillig, 2012), y frente al estrés abiótico por salinidad, temperatura extrema, déficit hídrico, metales pesados, etc. (Ruiz-Lozano, 2003; Aroca et al., 2007; Hildebrandt et al., 2007). Esta función se reconoce hoy como un factor importante para el mantenimiento de la simbiosis, ya que se ha visto que en algunos casos no se genera el efecto esperado de mayor crecimiento de la planta MA y sin embargo se mantiene el equilibrio simbiótico, apuntando a que esta función de defensa pueda resultar igualmente interesante para las plantas (Smith et al., 2010).

Las plantas micorrizadas suelen presentar mayor resistencia al estrés hídrico que las plantas no micorrizadas. Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado ya que puede suponer un mecanismo para mejorar la producción agrícola en las zonas afectadas por sequía. Los efectos son muchos y actúan a todos los niveles, pudiendo ser directamente incluidos dentro de las estrategias de defensa de la planta frente al estrés, ya sea consiguiendo que la planta pase el periodo de estrés continuando con su metabolismo y crecimiento (evitación), o mejorando la capacidad de soportar el estrés mediante el ajuste osmótico y mejora de los mecanismos antioxidantes (tolerancia).

##### **4.4.1. EFECTOS SOBRE LAS RELACIONES HÍDRICAS DE LA PLANTA**

###### **4.4.1.1. Control estomático y contenido hídrico foliar**

La conductancia estomática y la transpiración suelen aumentar en plantas MA, especialmente en condiciones de estrés hídrico (Augé, 2001). Esto es debido a que la micorrización suele dar lugar a diferencias en el nivel umbral al que se produce el cierre estomático, que suele producirse a niveles más bajos de potencial hídrico en plantas MA que en plantas no micorrizadas bajo las mismas condiciones de estrés (Allen y Boosalis

1983; Augé et al., 1986) alargando el periodo de mantenimiento de la transpiración, que se ha relacionado directamente con una promoción del crecimiento (Ruiz-Lozano et al., 1995). La conductancia estomática va normalmente ligada al contenido hídrico de las hojas por lo que el mantenimiento de la transpiración puede ser el efecto indirecto de mantener elevado el estatus hídrico de las hojas durante más tiempo, que se consigue a pesar del menor contenido de agua en el suelo, gracias a la mayor absorción mediante los hongos MA (Huang et al., 1985; Davies et al., 1992; Subramanian et al., 1995; 1997; Khalvati et al., 2005). Sin embargo, en algunos ensayos se ha encontrado el efecto contrario (Goicoechea et al., 2004; Aroca et al., 2008b). En estos casos, la disminución de la conductancias estomática no va unida a un menor contenido hídrico de las células de las hojas (Augé et al., 1986; Augé, 2001), lo que parece indicar la existencia de mecanismos de señalización no hidráulicos que se transmiten desde la raíz (Davies y Zhang, 1991; Davies et al., 1994; Thompson et al., 1997) sugiriendo la implicación de las hormonas vegetales.

Sea cual sea la estrategia utilizada, las plantas micorrizadas tienen una mejor **recuperación** tras un periodo de sequía, aumentando la conductividad hidráulica radical durante las primeras fases de la recuperación y controlando la transpiración, permitiendo así reajustar los niveles normales de  $\Psi$  en hojas más rápidamente que las plantas no micorrizadas (Subramanian et al., 1997; Aroca et al., 2008b).

#### **4.4.1.2. Control del transporte de agua desde las raíces**

Las variaciones en la **conductividad hidráulica radical** (L) entre plantas MA y no MA han dado resultados muy contradictorios encontrándose que aumenta, disminuye o se mantiene según los simbiontes implicados y las condiciones experimentales, por lo que es difícil hablar de un patrón claro. Un aumento de L en plantas MA podría entenderse, dada la mayor absorción radical y el elevado contenido hídrico foliar, como un mecanismo necesario para maximizar el aporte de agua en condiciones de estrés; mientras que la disminución del mismo se podría interpretar como un intento de reducir la pérdida de agua cuando la absorción es insuficiente para mantener una elevada transpiración. Así pues, ambos comportamientos son esperables según las condiciones de estrés a las que sean sometidas las plantas.

La conductancia hidráulica radical depende de dos **vías de transporte de agua**: apoplástica y célula a célula. Como hemos visto anteriormente, la contribución relativa de estas dos vías de transporte no está clara y varía enormemente dependiendo de las condiciones ambientales (Martínez-Ballesta et al., 2003; Voicu et al., 2009; Pou et al., 2013). Además, la conmutación entre

ambas vías puede aportar cierta flexibilidad en la respuesta al estrés hídrico (Morillon y Chrispeels, 2001). Así pues, los cambios en la contribución de estas dos vías por la presencia de MA pueden suponer la diferencia en la capacidad de transportar agua en condiciones de sequía. Por un lado, las modificaciones morfológicas que se producen por la micorrización en el desarrollo de las raíces (Augé, 2001) podrían generar cambios en el transporte por la **vía apoplástica**. En este sentido, se ha sugerido que las micorrizas podrían ser capaces de transportar el agua desde el micelio extraradical directamente al cortex de la planta por flujo masivo, liberándose directamente en la vía apoplástica (Muhsin y Zwiazek, 2002). Se puede entender que las hifas funcionen aquí como una vía directa, que disminuye la resistencia al paso del agua a través de las células o los espacios intercelulares de las raíces, pudiendo ser una forma de vencer la barrera de la lignificación y/o suberización producida en condiciones de sequía.

Por otro lado, se ha sugerido que el transporte **célula a célula** de las raíces micorrizadas ha de ser más arduo debido a que el agua debe atravesar no sólo las membranas celulares sino también las del propio hongo micorrícico, ya que no existen conexiones simplásticas entre ambos simbiontes (Lehto y Zwiazek, 2011). Las modificaciones de la vía célula a célula están directamente relacionadas con el control de las acuaporinas. Muchos estudios apuntan a que el control de las acuaporinas puede ser el que condicione la conductancia hidráulica total de la planta micorrizada (Marjanovic et al., 2005; Lee et al., 2010) pudiendo ser aún más relevante su contribución en condiciones de sequía (Aroca et al., 2007; Ruiz-Lozano y Aroca, 2010). La presencia y actividad de las acuaporinas es modificada por la micorrización, encontrándose de nuevo mucha variación en las respuestas (Aroca et al., 2007, 2008b). La dificultad para encontrar un patrón claro en el control de las acuaporinas radica en el gran número de isoformas que están presentes en los distintos tejidos y que son reguladas cada una de ellas de manera diferente (Valot et al., 2005) así como en los múltiples mecanismos de regulación posibles. A pesar de ello, se ha visto que, en conjunto, el estrés reduce la expresión génica de las PIPs en raíces de plantas no micorrizadas (Gao et al., 1999; Alexandersson et al., 2005; Maurel et al., 2008), mientras que la respuesta de las plantas micorrizadas varía: Una disminución aún mayor de la expresión génica y contenido en PIPs en plantas MA sometidas a estrés hídrico se interpreta como un mecanismo conservativo que evita la pérdida de agua de las células (Smart et al., 2001; Porcel et al., 2006; Jang et al., 2007), lo que se corrobora normalmente por el mantenimiento de un elevado CHR y  $\Psi$  de las hojas (Amerian y Stewart, 2001; Porcel et al., 2006). También se ha visto que esta reducción da comienzo mucho antes en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas, por lo que la micorriza parece ser capaz de detectar la situación de estrés y generar una reacción anticipada ante el mismo (Porcel et al., 2006).

Por otro lado, el mantenimiento o aumento de la expresión y contenido de diversas acuaporinas ha sido también observado en plantas micorrizadas sometidas a estrés hídrico (Porcel

et al., 2006; Aroca et al., 2007), y se ha discutido sobre su papel en las células que contienen arbusculos (Krajinski et al., 2000), lo que se interpreta como un aumento en la absorción y flujo del agua y nutrientes promovida por la micorrización (Uehlein et al., 2007), y en el caso de las TIPs, también permite mejorar la osmoregulación celular (Maurel et al., 1997), fundamental en condiciones de estrés hídrico.

Estas dos estrategias dependerán mucho de la especie de hongo analizada y de su capacidad para aportar agua a la planta según las condiciones específicas del estrés, como ha sido demostrado a través de estudios comparativos entre distintas especies de hongos MA (Marulanda et al., 2003; Porcel et al., 2006) y en cualquier caso, ambas estrategias convergen en un mejor estatus hídrico de la planta micorrizada frente a la no micorrizada (Ruiz-Lozano et al., 2006).

#### 4.4.2. EFECTOS SOBRE LA FOTOSÍNTESIS Y EL CRECIMIENTO

La **fotosíntesis** se ve aumentada en plantas micorrizadas sometidas a estrés hídrico. Esta característica está muy relacionada con la conductancia estomática y transpiración de estas plantas y ha sido relacionado con una menor resistencia al paso de CO<sub>2</sub> de las fases tanto gaseosa como líquida de las hojas, así como un incremento en el número de unidades fotosintéticas y concentración de clorofila (Allen et al., 1981; Davies et al., 1993). Por otro lado, también se ha visto que la diferencia entre plantas MA y no MA es mayor cuanto mayor es el contenido en P de las hojas (Sánchez-Díaz et al., 1990; Davies et al., 1993). A su vez, se ha demostrado que las plantas micorrizadas tienen una mayor eficiencia en el uso fotosintético del P (Ruiz-Lozano y Azcón, 1995) por lo que existe una fuerte relación entre el contenido en nutrientes y la fotosíntesis.

Mayor fotosíntesis implica mayor **crecimiento** de las plantas micorrizadas frente a las no micorrizadas en condiciones de estrés hídrico. El crecimiento va ligado a una mayor acumulación de nutrientes y una mayor eficiencia en el uso del agua (WUE) (Subramanian y Charest, 1997; 1999). En numerosos estudios, sin embargo, no se observa un incremento en la biomasa de las plantas micorrizadas en condiciones de estrés hídrico o incluso se observa disminución respecto a las no MA. Esto ha sido explicado tradicionalmente en base a los costes-beneficios de la simbiosis respecto al balance de carbono. Sin embargo, la disminución en tamaño también puede ser entendida como un mecanismo de resistencia en determinados hábitats donde la escasez de agua es un fenómeno recurrente, ya que una planta de menor tamaño requiere un menor aporte de agua para sustentar la transpiración y de nutrientes para el crecimiento vegetativo, lo cual puede significar una ventaja en momentos de escasez y no tiene por qué perjudicar la producción, que por el contrario puede hacer uso de los nutrientes acumulados durante el periodo vegetativo (Smith et al., 2010).

#### 4.4.3. EFECTOS SOBRE EL METABOLISMO

La actividad enzimática de diversas enzimas implicadas en el **metabolismo del N y el P** como la nitrato reductasa, enzimas del ciclo GS/GOGAT, y las fosfatasas ácidas, son mayores en plantas micorrizadas sometidas a estrés hídrico que en las no micorrizadas, lo que indica un mayor metabolismo en estas plantas (Goicoechea et al., 1996; Ruiz-Lozano and Azcón, 1996; Subramanian y Charest, 1998).

Las plantas micorrizadas acumulan menos cantidad de **hexosas** en hojas durante los periodos de estrés hídrico, esto puede ser explicado desde dos puntos de vista. El primero es que exista mayor competencia del hongo simbiótico por los carbohidratos producidos por la planta, cuya producción está disminuida en estas condiciones. Esta idea se apoya en estudios que observan un aumento de azúcares compuestos en el hongo. La segunda es que las plantas no micorrizadas sufren más el estrés, reduciendo rápidamente el crecimiento celular, más sensible al estrés que la asimilación de CO<sub>2</sub> (Hsiao, 1973), provocándose una acumulación inicial de azúcares libres que no son utilizados por el metabolismo de la planta y que, a su vez, ayudan al ajuste osmótico (Ogawa y Yamauchi, 2006). Por el contrario, las plantas micorrizadas presentan mayor contenido de azúcares solubles en el periodo de recuperación, lo que apunta a un mantenimiento de la fotosíntesis durante el periodo de estrés (Subramanian y Charest, 1995; Subramanian et al., 1997), que se apoya en una mayor acumulación de almidón y otros azúcares en las hojas (Augé et al., 1987; Davies et al., 1993), indicando la continuidad de los procesos metabólicos.

Algo parecido ocurre con la acumulación de **aminoácidos y prolina**. Los casos en que la acumulación de aminoácidos libres en hojas es menor en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas se ha interpretado como una mayor tolerancia de estas plantas al estrés. Esta idea se apoya en una mayor concentración de proteínas totales en estas plantas (Subramanian y Charest, 1995; 1998; Ruiz-Lozano et al., 1996) y en un potencial hídrico de las hojas que no disminuye excesivamente (Ruiz-Lozano y Azcón, 1997). También se ha encontrado en ocasiones un aumento de prolina y azúcares solubles en las raíces, lo que parece ser un mecanismo de disminución del potencial hídrico de las células radicales que permite la continua entrada de agua desde el suelo, cuyo potencial hídrico también se ve disminuido en condiciones de sequía, manteniendo así el flujo de agua que permita a la planta MA continuar con sus procesos normales a pesar del estrés (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004). En ocasiones también se ha encontrado una mayor acumulación de aminoácidos en hojas de plantas MA que en no MA, y se ha interpretado como una mayor capacidad de ajuste osmótico ante un potencial hídrico del suelo similar, acompañado de un aumento de la prolina que actúa como soluto compatible y antioxidante (Ruiz-Lozano et al., 1995; Azcón et al., 1996).



#### 4.4.4. EFECTOS HORMONALES: ABA

Existen muchas publicaciones que muestran variaciones en diversas hormonas vegetales durante la micorrización (Hause et al., 2007; Ruiz-Lozano et al., 2012) y han sido relacionadas directamente con una mayor resistencia al estrés hídrico de las plantas micorrizadas (Augé 2001; Ruiz-Lozano, 2003). Entre las hormonas vegetales, **el ABA** es la que está directamente relacionada con el cierre estomático. Los estudios sobre el contenido de ABA tanto en raíces como en hojas de plantas micorrizadas sometidas a sequía presentan resultados muy contradictorios (Goicoechea et al., 1997; Estrada-Luna y Davies 2003; Aroca et al., 2008b; Ruiz-Lozano et al., 2012). Hay que tener en cuenta que el ABA y la simbiosis MA están implicados en los mismos procesos, controlando la fisiología hídrica de la planta tanto a nivel de transpiración como de conductancia hidráulica radical, así como la expresión de genes comunes relacionados con la respuesta al estrés, incluidos los genes *lea*, *p5cs* (biosíntesis de prolina), *ncde* (biosíntesis de ABA) y acuaporinas (Ruiz-Lozano et al., 2006; Aroca et al., 2008b). Ello parece indicar que parte de la respuesta al estrés generada por las micorrizas pueda deberse al distinto contenido en ABA presente en las plantas hospedadoras, que es controlado por la micorrización (Ruiz-Lozano et al., 2006; Aroca et al., 2008a), siendo esta regulación mejor y más rápida, permitiendo un mejor balance hídrico tanto en condiciones de estrés como tras su recuperación (Aroca et al., 2008b). Así, los cambios en el contenido en ABA estarán muy relacionados con la respuesta metabólica de defensa al estrés que tengan las distintas especies implicadas dependiendo del tipo e intensidad del estrés.

Por otro lado, la micorrización no solo controla la acumulación de ABA sino también puede influir en sus efectos. La desigual absorción de nutrientes y otros compuestos en las plantas micorrizadas sometidas a sequía frente a las no micorrizadas puede influir en la señalización por ABA. Así, la nutrición de fósforo y su contenido en hojas puede aumentar la sensibilidad de los estomas al contenido en ABA (Radin, 1984; Mansfield et al., 1990) de manera que la misma cantidad de ABA es capaz de generar efectos mayores. También, una diferente concentración de aniones y cationes puede provocar cambios en el pH del xilema que generen diferente movilidad del ABA. Por último, también es posible que algunos de estos compuestos como el ion  $\text{Ca}^{2+}$  sea movilizado a través del xilema, participando en las cascadas de señalización y actuando de forma directa en el cierre estomático promovido por ABA (Augé, 2001).

#### 4.4.5. EFECTO SOBRE LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Las micorrizas también protegen a la planta del estrés oxidativo secundario generado en condiciones de sequía. La **prevención del daño oxidativo** y la eliminación de las especies reactivas de oxígeno son uno de los mecanismos más importantes para incrementar la tolerancia de las plantas al estrés hídrico (Bartels, 2001; Ruiz-Lozano, 2003). Como se comentó anteriormente,



una medida habitual para evaluar el daño causado por el estrés oxidativo es el daño oxidativo a lípidos (DOL). Se ha visto que las plantas micorrizadas presentan menor DOL en condiciones de estrés hídrico (Ruiz-Lozano et al., 2001; Porcel and Ruiz-Lozano, 2004). Muchos estudios sugieren que la simbiosis MA ayuda a aliviar los efectos del déficit hídrico y la salinidad aumentando la actividad de las enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GR o diversas peroxidasas, así como modificando el contenido en compuestos antioxidantes como glutatión o ascorbato (Alguacil et al., 2003; Porcel et al., 2003; Porcel and Ruiz-Lozano, 2004; Garg y Manchanda, 2009; Ruiz-Sánchez et al., 2010; Talaat and Shawky, 2011). Así, por ejemplo, se ha visto que la enzima SOD (primera en el proceso de eliminación de  $O_2^-$ ) aumenta su actividad en plantas micorrizadas (Ruiz-Lozano et al., 1996) y la transcripción de algunas de sus isoformas se ve fuertemente incrementada en plantas MA en condiciones de sequía (Ruiz-Lozano et al., 2001). Por otro lado, se ha detectado un aumento de la actividad glutatión reductasa (GR) en plantas micorrizadas de soja sometidas a estrés hídrico, lo que se ha relacionado con una protección de los nódulos de las plantas leguminosas frente al daño oxidativo generado por el estrés hídrico (Ruiz-Lozano et al., 2001; Porcel et al., 2003). Por el contrario, dicho aumento no se ha encontrado en otros experimentos en los que las plantas micorrizadas resultaron ser menos sensibles al estrés impuesto (Porcel and Ruiz-Lozano, 2004). Así pues, la respuesta individual de estas enzimas ha mostrado variaciones en función de las especies de hongo y de planta implicadas en la simbiosis, así como del estrés impuesto.

Esta variación de la actividad antioxidante también depende de la disponibilidad de nutrientes, ya que algunas de estas enzimas como la SOD, CAT y APX son metaloenzimas, cuya actividad viene determinada por la disponibilidad de los metales que utilizan. Esto también sugiere que existe un efecto indirecto de las MA sobre las enzimas antioxidantes mediante la mayor adquisición de nutrientes del suelo (Alguacil et al., 2003; Evelin et al., 2009).

También se ha demostrado la existencia de genes que codifican proteínas involucradas en la defensa celular frente al estrés oxidativo en hongos MA, incluidos genes que codifican la SOD, la glutaredoxinas (GRXs), que son pequeñas proteínas con actividad oxido-reductasa glutatión-dependientes (Benabdellah et al., 2009c), la piridoxina 5'-fosfato sintasa (PDX), que está involucrada en la síntesis de la vitamina B6, metabolito esencial en la defensa frente al estrés oxidativo (Benabdellah et al., 2009a), o incluso la metalotioneína (MT), que participa en la regulación REDOX del micelio extraradical de *G. intraradices* (Benabdellah et al., 2009b). Muchos de estos genes se han visto inducidos por el estrés oxidativo secundario que se genera en condiciones tanto de estrés hídrico como salino (Ruiz-Lozano et al., 2012).

La influencia de la simbiosis MA sobre la acumulación de antioxidantes no enzimáticos como el ascorbato, el glutatión, los carotenoides o los tocofenoles ha sido muy poco estudiado y requiere de investigaciones más profundas.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 1. MATERIALES Y CONDICIONES DE CULTIVO

### 1.1. Sustratos utilizados

En este estudio se han utilizado dos tipos de suelo diferentes según disponibilidad:

Suelo1: Suelo franco arenoso procedente de la parcela de la Estación Experimental del Zaidín (Granada, España). Este suelo presenta las siguientes características: pH 8.1 (agua, 1:5 p/v); 1.8% de materia orgánica, concentración de nutrientes ( $\text{mg kg}^{-1}$ ): N, 2.5; P, 6.2 (extraíble con  $\text{NaHCO}_3$ ) y K, 132.0. Se empleó este suelo en los ensayos de los capítulos 3 (experimento 1) y 4.

Suelo2: Suelo franco procedente de Dúrcal (Granada, España). Este suelo presenta las siguientes características: pH de 8.2 (agua, 1:5 p/v), 1.5% de materia orgánica, concentración de nutrientes ( $\text{g kg}^{-1}$ ): N, 1.9; P, 1 (extraíble con  $\text{NaHCO}_3$ ) y K, 6.9. Se empleó este suelo en los ensayos de los capítulos 1, 2, 3 (experimento 2) y 5.

### 1.2. Preparación del sustrato

El suelo fue tamizado (5 mm) y esterilizado por tinalización en autoclave con flujo de vapor (100 °C durante 1 h, 3 días consecutivos). Tras la esterilización se diluyó con arena de cuarzo (< 2 mm) lavada y esterilizada 20 min a 120 °C en autoclave. El Sustrato utilizado fue siempre una mezcla de suelo y arena en proporción 1:1 (v:v) o 1:9 (v:v) dependiendo del ensayo realizado y sus objetivos específicos. Se distribuyó en macetas, rellenando en cada experimento una cantidad fija de entre 750 g y 1.200 g, dependiendo del ensayo.

### 1.3. Condiciones de cultivo

Los experimentos se llevaron a cabo en macetas de 1,5 L en invernadero, con unas condiciones de temperatura que van de 19 a 25 °C, con un periodo día/noche de 16/8 h, una humedad relativa de 50-70% y una intensidad luminosa de  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (LI-188B; LICOR, Lincoln, NE, USA).

### 1.4. Material biológico utilizado

Las plantas utilizadas en este estudio han sido maíz (*Zea mays L.* cv 'potro') y tomate (*Solanum lycopersicum* Mill. 'Rheinlands Ruhm', accession LA0535).

El Hongo utilizado fue *Glomus intraradices* (Schenck y Smith), denominado actualmente como *Rhizophagus intraradices* (Krüger et al., 2012). Se utilizaron dos aislados diferentes según disponibilidad, el BEG 121 en el ensayo del capítulo 2 y el EEZ 58 en el resto de ensayos.

### 1.5. Preparación de semillas y crecimiento de plántulas

Las semillas de maíz se sumergieron en etanol al 70% durante 5 segundos con agitación para eliminar el fungicida aplicado por la casa comercial que las suministra. Después se lavaron

abundantemente con agua destilada y se sembraron dos por maceta. Una vez que emergieron se seleccionó una por maceta, tratando de escoger tamaños lo más homogéneos posible en todos los tratamientos.

Para el ensayo específico de raíz dividida (capítulo 1), las semillas de maíz se plantaron primeramente en semilleros, donde se dejaron crecer durante 10 días antes de su trasplante a las macetas con el sistema de raíces divididas. El tiempo adecuado del trasplante se estimó mediante ensayos previos en los que se ensayó el trasplante desde el día 7 al 15, encontrándose que el décimo día era suficiente para permitir una fácil extracción del sustrato sin daños a las raíces y una división equitativa de las mismas, sin perjudicar el crecimiento de las plantas una vez trasplantadas.

Las semillas de tomate fueron esterilizadas superficialmente con etanol al 70% durante 2 min y con hipoclorito sódico al 50% durante 8 min. Finalmente se lavaron abundantemente con agua destilada para eliminar los residuos de estos compuestos. Una vez esterilizadas, se plantaron en semilleros con un sustrato de vermiculita esterilizada que se regó abundantemente y se cubrió con papel de aluminio durante varios días hasta su germinación. Tres días después, se trasplantaron, colocando una plántula por maceta.

## 2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTOS

### 2.1. Diseño experimental

La base del diseño experimental de todos los ensayos realizados en esta tesis doctoral es un diseño factorial combinado en el que se dividen las plantas en dos grupos (1) Plantas control (C) y (2) Plantas inoculadas con *G. intraradices* (en adelante, *R. intraradices*) (Ri). La mitad de las plantas de cada uno de estos tratamientos se sometieron a diferentes condiciones de riego (1) condiciones óptimas de riego (WW, del inglés “well watered”) y (2) condiciones de estrés hídrico (DS, del inglés “drought stress”). A partir de este diseño base, la duración e intensidad del estrés fue diferente en cada ensayo en función de los objetivos específicos, tal y como se detallará más adelante.

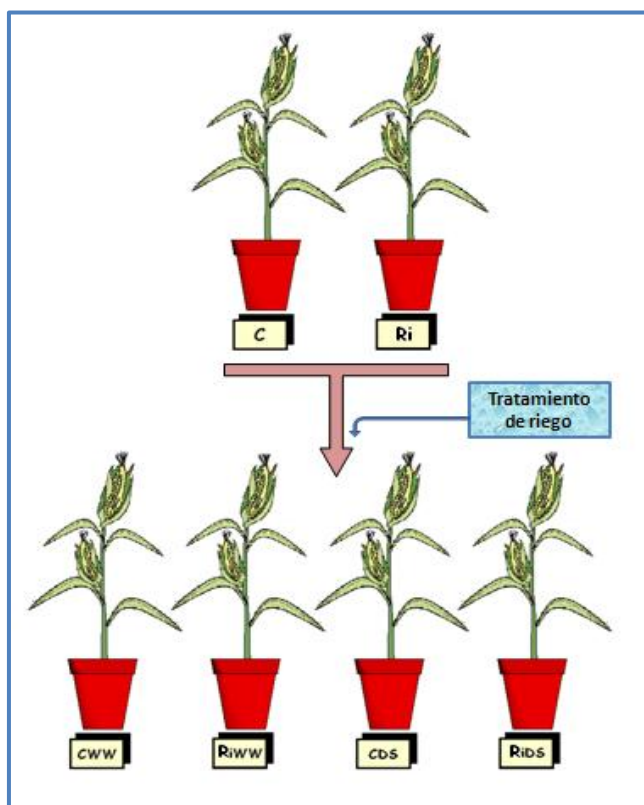
### 2.2. Tratamientos de inoculación

Los inóculos de *R. intraradices* se multiplicaron en cultivos de *Zea mays L* y estaban compuestos por una mezcla de sustrato con esporas, micelio y fragmentos de raíces infectadas.

En las macetas correspondientes al tratamiento inoculado (Ri), se aplicaron 10 g de inóculo por maceta, lo que equivale aproximadamente a 60 propágulos infectivos por gramo (según la prueba del número más probable). Las macetas control (C), recibieron la misma cantidad de inóculo micorrízico autoclavado junto con una alícuota de 2-3 ml de filtrado (< 20 µm) del inóculo, destinada a proveer una población microbiana libre de propágulos de micorrizas arbusculares.

### 2.3. Tratamientos de riego

El contenido de agua del suelo se controló con un dispositivo ThetaProbeML2 (AT Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK) que mide el contenido volumétrico en agua del suelo en base a cambios en la constante dieléctrica del suelo cuando está húmedo. Este dispositivo mide el cociente entre el volumen de agua presente en el suelo y el volumen total de la muestra de suelo, dando como resultado un valor adimensional que se representa como % en volumen (Roth et al., 1992). El agua se suministró diariamente durante las 6-7 primeras semanas de crecimiento de las plantas para



mantener el 100% de la capacidad de campo del suelo, que equivale a aproximadamente al 20% de humedad volumétrica del suelo medida con el ThetaProbeML2. A partir de este momento la mitad de las plantas de cada experimento se sometió a estrés hídrico diferente en función de los objetivos específicos, tal y como se detallará más adelante.

**Imagen 1.** Diseño factorial básico en el que se muestran los dos posibles tratamientos de inoculación: (C) Control sin inocular y (Ri) plantas inoculadas con *R. intraradices*. Estas plantas se someten a su vez a dos tratamientos de riego: (WW) plantas en condiciones óptimas de riego y (DS) plantas sometidas a estrés hídrico, dando lugar a 4 tratamientos base sobre los que se aplicarán nuevos tratamientos en función de los objetivos específicos.

### 2.4. Tratamiento hormonal (ácido abscísico)

En los experimentos en que fue requerido, el diseño factorial se amplió añadiendo un nuevo factor: Sin aplicación de ABA exógeno y con aplicación de 10 ml por maceta de ABA 100  $\mu$ M, 3 días antes de comenzar los tratamientos de riego y cada tres días después del inicio del tratamiento. La concentración y frecuencia de aplicación apropiada se escogió en base a experimento previos en los que se testó la aplicación de ABA en un rango de entre 10  $\mu$ M y 1 mM y ha sido utilizada en diversos estudios anteriores (Aroca et al., 2008a y 2008b).

### 2.5. Tratamiento inhibidor de acuaporinas (azida sódica)

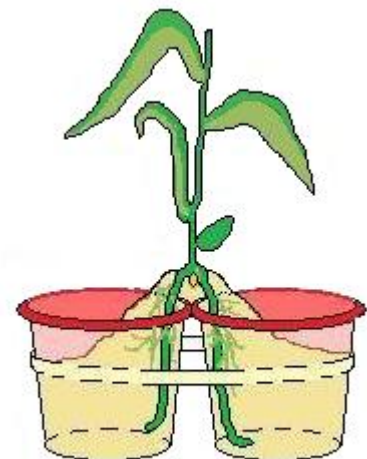
En los experimentos en que se requirió, el diseño factorial se amplió con la aplicación o no de un tratamiento con azida sódica que se aplicó a la mitad de las plantas de cada tratamiento justo

antes de proceder al análisis fisiológico y cosecha de las mismas. Las macetas con las plantas sometidas a este tratamiento fueron inmersas en una solución aireada de azida sódica 7mM (Fitzpatrick y Read, 2009) durante 50 min, permitiendo la difusión de la solución a través del sustrato y su absorción por las raíces. La concentración y el tiempo de exposición fueron seleccionados de acuerdo con experimentos preliminares en los que se utilizaron concentraciones en un rango de 1 a 30 mM con tiempos de exposición entre 15 min y 2 h. La concentración y el tiempo seleccionados están dentro del rango utilizado en otros estudios (Postaire et al., 2010). Las plantas que no requirieron del tratamiento de azida sódica fueron inmersas en solución aireada acuosa durante el mismo periodo de tiempo.

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL POR OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo específico 1

Se llevaron a cabo dos réplicas de un experimento de raíces divididas en dos compartimentos (“Split root system” en inglés). Este sistema permite la aplicación independiente de los distintos tratamientos de inoculación (C o Ri) y riego (WW o DS) a cada parte de la raíz permitiendo analizar los efectos locales o sistémicos de un tratamiento determinado.



**Imagen 2.** Representación del sistema de raíz dividida en 2 compartimentos.

Se utilizaron para ello plántulas de maíz pre-germinadas en semilleros en presencia o ausencia de inóculo de *R. intraradices*. Tras 10 días de crecimiento, las plántulas fueron trasplantadas a macetas, unidas de 2 en 2 sumando un total de 60 pares de macetas (6 por tratamiento) con 1.200 g de sustrato en cada una de ellas. El sustrato estaba formado por suelo del tipo 2 mezclado con arena en proporción 1:1 (v/v). A las macetas y compartimentos que les correspondía se les aplicó 10g de inóculo de *R. intraradices* aislado EEZ 58. En cada maceta se incluyó una de las dos raíces principales (cortadas al mismo tamaño para evitar un crecimiento desigual y basándose en análisis preliminares del efecto sobre el crecimiento de las raíces divididas) y dos de las cuatro raíces de corona. Las plantas crecieron durante un periodo de 7 semanas en condiciones óptimas de riego antes de ser sometido cada uno de sus compartimentos radicales a uno de los dos posibles tratamientos de riego (1) condiciones óptimas de riego durante todo el experimento (2) estrés hídrico durante 12 días mediante el mantenimiento al 55% de la capacidad de campo del suelo (C.C.). Esto último se consiguió permitiendo a las macetas secarse hasta alcanzar el 55% de su C.C. (se necesitaron dos días). El contenido de agua en el suelo fue medido diariamente con un

ThetaProbeML2 (a última hora de la tarde) y se reponía el volumen de agua adecuado para mantener las macetas al 8% de volumen de agua en el suelo (equivalente al 55% C.C.) de manera que en ningún momento se redujo la C.C. por debajo del 50%.

### 3.2. Objetivo específico 2

Se llevaron a cabo dos réplicas de un experimento basado en el diseño experimental descrito en el apartado 2.1. Se utilizó un sustrato de suelo tipo 1 mezclado con arena en proporción 1:1 (v:v). Las plantas de maíz crecieron en macetas con 750 g de sustrato, estando la mitad de ellas inoculadas con *R. intraradices*, aislado BEG 121. Las plantas crecieron en condiciones óptimas de riego durante 7 semanas. A partir de la semana cuarta de crecimiento, se aplicó a las plantas no MA 10 ml de solución nutritiva (Hewitt, 1952) una vez por semana durante dos semanas, con el fin de obtener plantas MA y no MA de tamaño similar antes de la aplicación del tratamiento de riego. Tras las 7 semanas de crecimiento, un tercio de las macetas de cada uno de los tratamientos fue mantenido en condiciones óptimas de riego hasta el final del experimento, mientras que los otros dos tercios se sometieron a estrés hídrico mediante el cese total de riego durante 4 días. Tras este periodo, la mitad de las plantas sometidas a estrés fue cosechada, mientras la otra mitad se recuperó del estrés llevándose al 100% de C.C. durante tres días. Así obtenemos 6 tratamientos en los que se combinan 2 tratamientos de inoculación (C y Ri) y 3 de riego (condiciones óptimas, estrés hídrico y estrés hídrico mas recuperación). Finalmente, de cada uno de los 6 tratamientos anteriores, la mitad de las plantas se sometió a una aplicación de ácido abscísico, tal y como se explica en el apartado 2.4, obteniéndose un total de 12 tratamientos con 10 réplicas en cada uno (total 120 macetas).

### 3.3. Objetivo específico 3

Para cumplir con el objetivo específico número 2 se diseñaron tres experimentos independientes. Los experimentos 1 y 2 se llevaron a cabo paralelamente y con condiciones similares pero utilizando dos variedades distintas de planta: *Zea mays* y *Solanum lycopersicum*. Para ello se utilizó un sustrato de suelo tipo 2 mezclado con arena en proporción 1:9 (v:v) para permitir la fácil extracción de las raíces sin producir daño en las mismas y con la mínima perturbación del micelio fúngico (Ruiz-Lozano and Azcón, 1997). Las plantas crecieron en macetas de 1200 g de sustrato, estando la mitad de ellas inoculadas con *R. intraradices* aislado EEZ 58. El alto contenido en arena del sustrato impide la retención de agua y es muy baja en nutrientes, por lo que durante todo el experimento hubo de aportarse solución nutritiva (Hoagland y Arnon, 1950), que fue modificada para contener sólo el 25% de P y evitar así una inhibición de la micorrización. Las plantas crecieron durante 8 semanas en las que se mantuvieron unas condiciones óptimas de riego mediante la aplicación de 50 ml de solución nutritiva modificada tres días a la semana alternando con la aplicación de 25 ml de agua los días intermedios. Tras este periodo, la mitad de



las macetas de cada tratamiento (C o Ri) se sometieron a estrés hídrico (DS) durante 12 días mediante el ajuste de la solución nutritiva a un volumen de 25 ml, manteniendo el mismo contenido en nutrientes y aplicada del mismo modo, tres días a la semana y con aplicación de 12,5 ml de agua en los días alternos, de manera que el resultado es la reducción al 50% respecto a la cantidad de agua aplicada a las plantas en condiciones óptimas (WW), siguiendo el procedimiento de Ruiz-Sánchez et al. (2010).

El experimento 3 se llevó a cabo con plantas de *Zea mays*. Para este experimento se utilizó un sustrato de suelo tipo 2 mezclado con arena en proporción 1:1 (v:v). Se prepararon 96 macetas con 1.200 g de sustrato, estando la mitad de ellas inoculadas con *R. intraradices*, aislado EEZ 58. Las plantas crecieron durante las primeras 6 semanas en unas condiciones óptimas de riego. A partir de la semana cuarta de crecimiento, se aplicó a las plantas no MA 10 ml de solución nutritiva (Hoagland y Arnon, 1950) una vez por semana durante dos semanas con el fin de obtener plantas MA y no MA de tamaño similar antes de la aplicación del tratamiento de riego. Después de 6 semanas de crecimiento, la mitad de las plantas de cada tratamiento (C o Ri) fue sometida a uno de los dos posibles tratamientos de riego (1) condiciones óptimas de riego durante todo el experimento (2) estrés hídrico durante 12 días mediante el mantenimiento al 70% de la capacidad de campo del suelo (C.C.). Esto último se consiguió permitiendo a las macetas secarse hasta alcanzar el 70% de su C.C. (se necesitaron dos días). El contenido de agua en el suelo fue medido diariamente con un ThetaProbe ML2 y regando diariamente (a última hora de la tarde) con el volumen de agua adecuado para mantener las macetas al 11% de volumen de agua en el suelo (equivalente al 70% C.C.) de manera que en ningún momento se redujo la C.C. por debajo del 65%. En el momento de la cosecha y antes de las medidas de conductividad, la mitad de las plantas de cada tratamiento (12 macetas por tratamiento, 48 en total) fueron sometidas a un tratamiento con azida sódica tal y como se describe en el apartado 2.5. Se llevaron a cabo 2 réplicas de este experimento.

### 3.4. Objetivos específicos 4 y 5

Para cumplir con los objetivos específicos número 3, 4 y 5, se diseñaron dos experimentos independientes con el mismo diseño experimental pero con diferente sustrato y distinta intensidad y duración del estrés hídrico aplicado.

Experimento 1: Se utilizó un sustrato de suelo tipo 1 mezclado con arena en proporción 1:1 (v:v). Las plantas de maíz crecieron en macetas con 900 g de sustrato, estando la mitad de ellas inoculadas con *R. intraradices*, aislado EEZ 58. El experimento duró un total de 8 semanas. Las plantas crecieron durante los 52 primeros días en unas condiciones óptimas de riego antes de ser sometidas la mitad de ellas a uno de los dos posibles tratamientos de riego (1) condiciones óptimas durante todo el experimento (2) estrés hídrico de corta duración mediante el cese total de riego durante 4 días. Se llevaron a cabo 2 réplicas de este experimento.

Experimento 2: Se utilizó un sustrato de suelo tipo 2 mezclado con arena en proporción 1:1 (v:v). Las plantas de maíz crecieron en macetas con 900 g de sustrato, estando la mitad de ellas inoculadas con *R. intraradices*, aislado EEZ 58. El experimento duró un total de 8 semanas. Las plantas crecieron durante las primeras 6 semanas en unas condiciones óptimas de riego antes de ser sometidas la mitad de ellas a uno de los dos posibles tratamientos de riego (1) condiciones óptimas durante todo el experimento (2) estrés hídrico durante 12 días mediante el mantenimiento al 55% de la capacidad de campo del suelo (C.C.) tal y como se ha descrito en apartados anteriores.

### 3.5. Objetivo específico 6

Se llevaron a cabo dos réplicas de un experimento basado en el diseño experimental descrito en el apartado 2.1. En cada experimento se utilizó un sustrato de suelo tipo 2 mezclado con arena en proporción 1:1 (v:v). Las plantas de maíz crecieron en 24 macetas con 900g de sustrato, estando la mitad de ellas inoculadas con *R. intraradices*, aislado EEZ 58. A partir de la semana cuarta de crecimiento, se aplicó a todas las plantas 5ml por semana de solución nutritiva (Hoagland y Arnon, 1950) que fue modificada para contener sólo el 25% de P y evitar así el efecto negativo que éste tiene sobre la micorrización. Después de 6 semanas de crecimiento, la mitad de las plantas de cada tratamiento (C o Ri) fue sometida a uno de los dos posibles tratamientos de riego (1) condiciones óptimas durante todo el experimento (2) estrés hídrico durante 12 días mediante el mantenimiento al 55% de la capacidad de campo del suelo (C.C.), tal y como se ha descrito en apartados anteriores.

## 4. DETERMINACIÓN DE LA COLONIZACIÓN MICORRÍCICA

### 4.1. Tinción de los hongos MA

En el momento de la cosecha, se procedió a la separación de raíces y parte aérea. Las raíces se extrajeron del sustrato cuidadosamente y se lavaron y secaron para eliminar los restos del mismo. La raíz de cada planta se troceó en fragmentos de 1cm de longitud, eliminándose previamente la parte apical y la parte superior próxima al tallo. Todos los fragmentos de raíz procedentes de la misma planta se mezclaron para homogeneizar la muestra, tomándose una porción representativa de dicha mezcla para su tinción y cuantificación. Se tomaron alícuotas de tres raíces diferentes por tratamiento y se procedió a su tinción utilizando el método de Phillips y Hayman (1970). Este método se basa en la utilización del colorante azul tripán, que tiñe específicamente las estructuras que contienen quitina, principal componente de las paredes de hongos MA (Bartinicki-García, 1968), de manera que podemos observar las estructuras del hongo en el interior de las raíces de la planta, que no se tiñen.

Procedimiento:

- 1) Las raíces se incubaron durante 15 minutos en una solución de KOH al 10% al “baño maría” para hidrolizar las paredes celulares de la raíz.
- 2) Se enjuagaron varias veces con agua corriente y se incubaron 5 minutos en HCl 0,1N a temperatura ambiente, para neutralizar los restos de KOH.
- 3) Se incubaron las raíces en una disolución del colorante azul tripán al 0,5% en ácido láctico (p/v) durante 20 minutos al “baño maría”.
- 4) Se enjuagaron con agua corriente para eliminar el exceso de colorante y se conservaron en ácido láctico hasta su visualización en la lupa.

#### 4.2. Cuantificación del porcentaje de longitud de raíz micorrizada.

La longitud de raíces micorrizadas se estimó visualmente con una lupa binocular utilizando el método conocido como “Gridline intersect method” (Giovannetti y Mosse, 1980). Se distribuyeron aleatoriamente las raíces, previamente teñidas, en placas de 10cm de diámetro divididas en cuadrículas de 1,2 cm<sup>2</sup>. Para estas dimensiones de las cuadrículas y según la fórmula de Newman (1966), el número de entrecruzamientos de la raíz con las líneas de las cuadrículas es directamente proporcional a la longitud total de la raíz extendida en la placa (Newman, 1966). Del mismo modo, el número de entrecruzamientos de raíz micorrizada con las líneas de las cuadrículas es directamente proporcional a la longitud de la raíz micorrizada. Por lo tanto el porcentaje de entrecruzamientos con infección respecto al total de entrecruzamientos nos proporciona el valor en tanto por ciento de la longitud de la raíz colonizada respecto al total de raíz.

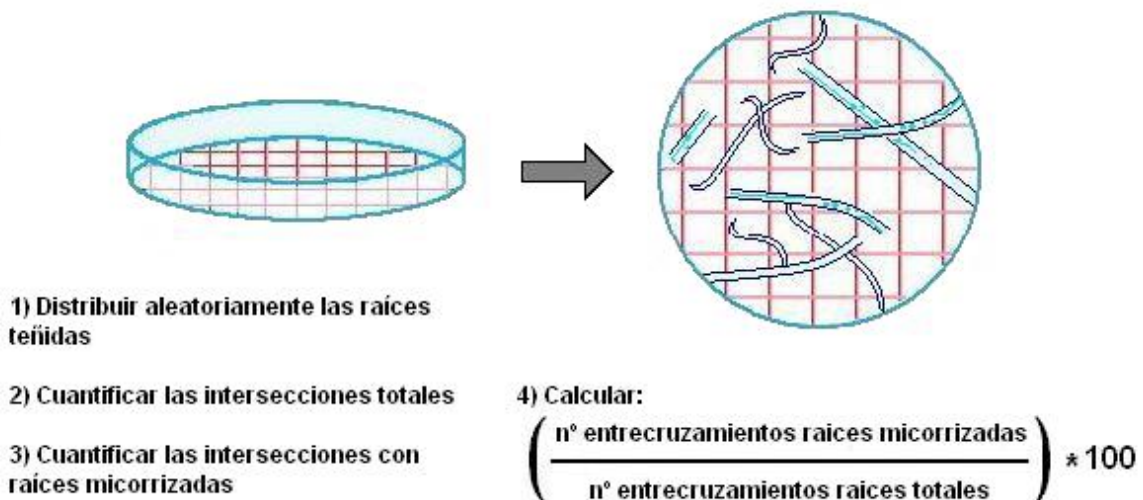


Imagen 3. Gridline intersect method de Giovannetti y Mosse, (1980).

## 5. DETERMINACIONES FISIOLÓGICAS

### 5.1. Producción de biomasa y peso seco

En el momento de la cosecha, se procedió a la separación de raíces y parte aérea. Las raíces se extrajeron del sustrato cuidadosamente y se lavaron y secaron para eliminar los restos del mismo. Se determinó el peso fresco de raíces y parte aérea y tras 2 días en un horno a 70 °C se determinó el peso seco de ambos tejidos.

### 5.2. Conductancia estomática

Para medir la conductancia estomática se utilizó un porómetro tipo AP4-UM-3 (Delta-T Devices Ltd, Cambridge, UK). Este instrumento da una medida de la resistencia a la pérdida de vapor de agua a través de los estomas. Funciona midiendo el tiempo que le lleva a la hoja liberar suficiente vapor de agua para cambiar la humedad relativa en una pequeña cámara con una cantidad previamente fijada. Las medidas se realizaron sobre la segunda hoja más desarrollada de cada planta.

### 5.3. Tasa de transpiración

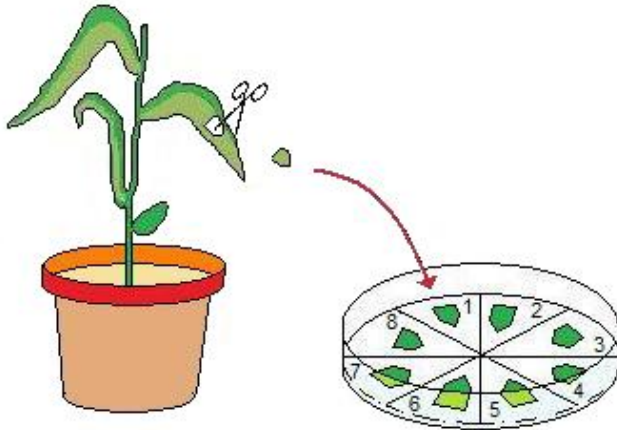
La tasa de transpiración se calculó utilizando el método gravimétrico (Aroca et al., 2007). Para ello, se cubrió la superficie de las macetas con papel de aluminio y se pesó el sistema maceta-planta obteniéndose el peso inicial ( $W_0$ ). Tras 2h se pesaron de nuevo todas las macetas obteniéndose el peso final ( $W_f$ ). La tasa de transpiración de las hojas se calcula como  $(W_0 - W_f) / t * A$ , donde  $t$  = tiempo en segundos y  $A$  = área de las hojas en  $m^2$ . El área de las hojas se midió mediante el escaneado de todas las hojas de cada planta (hp scanjet 5550c, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) y analizando las imágenes con Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA).

### 5.4. Potencial hídrico foliar

El potencial hídrico ( $\Psi$ ) se midió al mediodía, un día antes de la cosecha utilizando una cámara sicrométrica C-52 unida a un microvoltímetro HR-33T (Wescor Inc., Logan, UT, USA). Para ello se cortaron discos de la tercera hoja más desarrollada de cada planta y se colocaron en la cámara C-52. Para alcanzar el equilibrio entre vapor de agua y temperatura son necesarios 15 minutos de incubación tras los cuales se procede a la medida utilizando el método del “dewpoint” (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004).

### 5.5. Contenido hídrico relativo (CHR)

Para la medida del CHR se cortó de cada planta un trozo de hoja de aproximadamente  $1cm^2$  de la 2ª hoja más desarrollada y se pesó inmediatamente, obteniéndose el peso fresco ( $P_f$ ). Los trozos se colocaron en un vial saturado de agua, se numeraron y se dejaron en oscuridad a 5 °C durante 24



**Imagen 4.** Toma de muestras para la medida del CHR.

h tras lo cual se pesó de nuevo. Se obtuvo así el peso a máxima turgencia (Pt). Posteriormente se secaron las muestras en un horno a 75°C durante 48h y se pesaron de nuevo, obteniéndose el peso seco (Ps). El CHR se obtiene aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{CHR} = [(P_f - P_s) / (P_t - P_s)] * 100$$

### 5.6. Eficiencia del fotosistema II (PSII)

La eficiencia del PSII fue medida con un FluorPen FP100 (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic), que nos permite hacer una medida no invasiva de la eficiencia fotosintética midiendo la fluorescencia de la clorofila a. El FluorPen cuantifica el rendimiento cuántico del PSII como la relación entre la fluorescencia actual ( $FV'$ ) en condiciones de luz saturante y el rendimiento fotosintético máximo ( $FM'$ ) también en condiciones de luz saturante, de acuerdo con Oxborough y Baker (1997). Esta medida se llevó a cabo en la segunda hoja más desarrollada de cada planta.

### 5.7. Flujo hídrico ( $J_v$ ) y conductancia osmótica radical ( $L_o$ ).

La tasa de flujo de savia o flujo hídrico ( $J_v$ ) y la conductancia osmótica radical ( $L_o$ ) se midieron 3 h después de la salida del sol mediante la recogida del exudado producido por las raíces bajo presión atmosférica. En estas condiciones, el agua se mueve exclusivamente siguiendo el gradiente osmótico entre la solución del suelo y el contenido celular utilizando la vía conocida como célula a célula (Steudle, 2000). Para ello, las plantas fueron inmersas en bandejas con solución nutritiva aireada. La parte aérea fue eliminada mediante un corte en la base del tallo. El líquido exudado durante los primeros 15 minutos fue descartado para evitar la contaminación floemática. Se recogió el exudado durante las 2h posteriores ajustando al tallo cortado un tubo de silicona o un eppendorf con un trozo de algodón previamente pesado ( $P_i$ ) en su interior y cubierto con parafilm para evitar las pérdidas por evaporación. Tras 2h, los trozos de algodón fueron pesados ( $P_f$ ) y la savia fue extraída mediante dos centrifugaciones de 2 minutos a 20.780 g según un procedimiento testado previamente.

La osmolaridad del exudado y de la solución nutritiva inicial fue determinado usando un osmómetro crioscópico (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin, Germany). Las medidas se obtienen aplicando las fórmulas siguientes:

$J_v = [(P_r - P_i) / RDW] * t^{-1}$  donde, RDW=peso seco de la raíz (g) y t= tiempo (h).

$L_o = J_v / \Delta\Psi$  donde,  $\Delta\Psi$ =potencial osmótico de la muestra-potencial osmótico de la solución inicial (MPa).

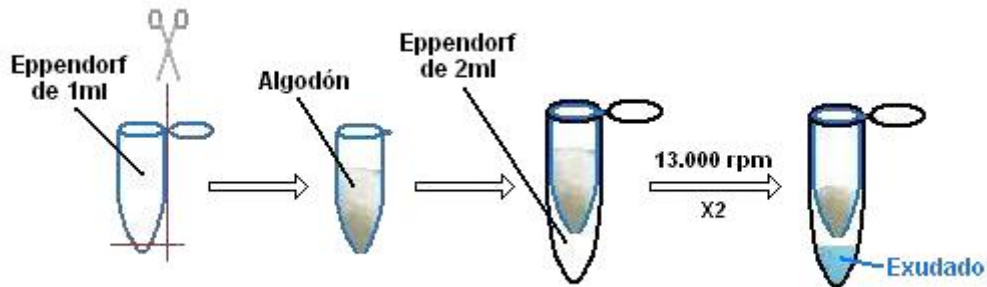


Imagen 5. Método de recuperación del exudado a partir del algodón.

## 5.8. Conductancia hidrostática radical (L)

La conductancia hidrostática radical fue medida utilizando dos sistemas diferentes: Un sistema HPFM (high-pressure flow meter) tal y como describe Voicu et al. (2009) y una cámara de Scholander siguiendo el método descrito por López-Pérez et al. (2007).

### 5.8.1. Medidor de flujo de alta presión (HPFM) (Tyree et al., 1995).

La parte aérea de las plantas fue eliminada mediante un corte en la base del tallo y las raíces fueron conectadas a una cámara de compresión sin extraerlas de la maceta. Este sistema mide la resistencia al paso del agua de los tejidos radicales al aplicar sobre el sistema radical un flujo de agua a presión creciente y gradual desde 250 a 450 KPa. Un ordenador recoge los datos de flujo versus presión y calcula la conductancia hidrostática radical como la pendiente de la recta de regresión. Se expresa como  $\text{mg H}_2\text{O} * \text{g}^{-1} \text{RDW} * \text{h}^{-1} * \text{MPa}^{-1}$  (RDW=peso seco de raíz).

### 5.8.2. Cámara de Scholander

La parte aérea de las plantas fue eliminada mediante un corte en la base del tallo y las raíces fueron extraídas del sustrato de crecimiento y embebidas en solución acuosa dentro de una cámara de presión. Se aplicó a las raíces una presión gradual creciente (0.2, 0.3 y 0.4 MPa). Cada presión se mantuvo durante un intervalo de 2 minutos y la savia exudada en cada intervalo de presión fue recogida en tubos eppendorf y pesada en una balanza de precisión. La diferencia en peso de cada intervalo nos permite calcular el flujo hídrico ( $J_v$ ) que se expresa en  $\text{mg H}_2\text{O} * \text{g}^{-1} \text{RDW} * \text{h}^{-1}$ . La pendiente de la recta de regresión obtenida al representar  $J_v$  frente a la presión aplicada es la medida de  $L_h$  expresada en  $\text{mg H}_2\text{O} * \text{g}^{-1} \text{RDW} * \text{h}^{-1} * \text{MPa}^{-1}$  (RDW=peso seco de la raíz).

## 5.9. Estimación del flujo relativo de agua por la vía apoplástica

El flujo relativo de agua que se mueve por la vía apoplástica se estimó usando el colorante marcador light green SF yellowish (Sigma-Aldrich Chemical, Gillingham, UK; índice de color 42095, peso molecular=792,85 g/mol) cuyo alto peso molecular impide su penetración en las vías simplástica o transcelular y por ello se asume que se mueve exclusivamente a través de la vía apoplástica (Zimmermann y Steudle, 1998). Aunque este sistema no mide de manera absoluta la cantidad total de agua que se mueve por la vía apoplástica, si puede ser usado para detectar cambios relativos entre tratamientos distintos (Kamaluddin y Zwiazek, 2001; Voicu y Zwiazek, 2004). La parte aérea de las plantas fue eliminada mediante un corte en la base del tallo y las raíces fueron embebidas en solución acuosa de 250  $\mu\text{mol/L}$  de colorante dentro de una cámara de presión de Scholander, donde se mantuvo 5-10 minutos antes de proceder a la medición del flujo apoplástico y durante todo el proceso de medición. Se aplicó a las raíces una presión gradual creciente (0.2, 0.3 y 0.4 MPa) durante intervalos de 2 minutos y la savia exudada fue recogida. La concentración de colorante en las muestras obtenidas fue medida inmediatamente con un espectrofotómetro (Hitachi U-1900) a 630 nm (López-Pérez et al., 2007). El porcentaje de agua movida por vía apoplástica se calculó como la relación entre el valor obtenido en la muestra de savia y el de la disolución inicial de colorante, cuyo valor se considera del 100%.

## 6. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

### 6.1. Medida de actividades enzimáticas

#### 6.1.1. Extracción para cuantificación de actividades enzimáticas

Las enzimas se extrajeron a partir de 0,5 g de peso fresco de hojas o raíces congeladas en nitrógeno líquido en el momento de la cosecha y conservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- 1) Se homogenizó el material en un mortero con N líquido.
- 2) Se añadieron 5 ml de tampón de extracción (Tabla 2) adicionado con 0,04 g de PVPP que evita daños provocados por fenoles y quinonas.
- 3) Se transfirió el material a tubos eppendorf estériles previamente pesados que se centrifugaron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 27.670 g durante 20 minutos.
- 4) Se recogió el sobrenadante en alícuotas midiendo el volumen ( $V_i$ ) y se guardaron los tubos con el sedimento en una estufa a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 días para calcular el peso seco de la muestra (DW).
- 5) Los extractos así obtenidos se utilizaron directamente para la medida correspondiente o se conservaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



### 6.1.2. Actividad superóxidodismutasa (SOD)

La medida de la actividad SOD se realizó según el método de Beyer y Fridovich (1987) modificado para ajustar los volúmenes al sistema espectrofotométrico del lector de placas. El método se basa en la capacidad de SOD para inhibir la reducción de nitrobluetetrazolium (NBT) por los radicales superóxido generados fotoquímicamente.

- 1) En una placa de ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) se mezclaron 5  $\mu$ l del extracto enzimático y 200  $\mu$ l de solución generadora de iones (Tabla 1) por pocillo (3 pocillos por muestra).
- 2) Se expuso la placa a la luz solar (excepto el blanco, que se mantuvo en oscuridad) durante un periodo de 15 minutos hasta obtener una coloración morada.
- 3) Se midió la absorbancia (A) resultante a 560 nm.

Solución generadora de iones (SGI)
Nitrotetrazolium blue chloride (NBT) 65 $\mu$ M en tampón de extracción
Metionina 14,3 mM en tampón de extracción
→Preparar la solución anterior y añadir la siguiente solución en proporción 1:1
Riboflavina 2,2 mM en agua destilada

**Tabla 1.** Composición de la solución generadora de iones.

### 6.1.3. Actividad ascorbato peroxidasa (APX)

La medida de la actividad APX se realizó según el método de Jimenez et al. (1997) modificado para ajustar los volúmenes al espectrofotómetro lector de placas. El método se basa en la reacción de oxidación del ascorbato en presencia de  $H_2O_2$ .

- 1) En una placa de ELISA se mezclaron 10  $\mu$ l del extracto enzimático y 100  $\mu$ l de ascorbato sódico 0,5 mM por pocillo (3 pocillos por muestra).
- 2) Añadimos 100  $\mu$ l de  $H_2O_2$  2,5 mM dando comienzo a la reacción y medimos inmediatamente.
- 3) Se siguió el descenso de la absorbancia (A) midiendo a 290 nm cada minuto durante 5 minutos (valores  $A_1$  a  $A_5$ ).
- 4) Calculamos la actividad APX utilizando la fórmula:

$$(\Delta A/\text{min}) \cdot (V_r/V_m) \cdot (d/\epsilon) \cdot 1000$$

Donde,

$$\Delta A/\text{min} = (A_1 - A_5)/5$$

$$V_r = \text{volumen de reacción} = 0,210 \text{ ml}$$

$$V_m = \text{volumen de muestra} = 0,01 \text{ ml}$$

$$\epsilon = \text{coeficiente de extinción molar} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ (Hossain y Assada, 1984)}$$

$$d = 1$$



#### 6.1.4. Actividad glutatión reductasa (GR)

La medida de la actividad GR se realizó según el método de Carlberg y Mannervik (1985) modificado para ajustar los volúmenes al lector de placas. El método estima la tasa de oxidación del NADPH necesaria para transformar el glutatión oxidado (GSSG) en glutatión reducido (GSH).

- 1) En una placa de ELISA se mezclaron 10  $\mu$ l del extracto enzimático y 100  $\mu$ l de GSSG 1 mM por pocillo (3 pocillos por muestra).
- ➔ Para corregir la oxidación de NADPH no atribuible a GR se realizaron reacciones control en las que se eliminó o bien la muestra (blanco de reactivos) o bien el GSSG (blanco de muestras).
- 2) Añadimos 100  $\mu$ l de NADPH 0,3 mM dando comienzo a la reacción y medimos inmediatamente.
- 3) Se siguió el descenso de la absorbancia (A) midiendo a 340 nm cada minuto durante 6 minutos (valores  $A_1$  a  $A_6$ ).
- 4) Calculamos la actividad GR utilizando la fórmula:

$$(\Delta A/\text{min}) \cdot (1/V_m) \cdot d(V_r/\epsilon) \cdot 1000$$

Donde,

$$\Delta A/\text{min} = (A_1 - A_6)/6$$

$$V_r = \text{volumen de reacción} = 0,210 \text{ ml}$$

$$V_m = \text{volumen de muestra} = 0,01 \text{ ml}$$

$$\epsilon = \text{coeficiente de extinción molar} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ (Jiménez et al, 1997)}$$

$$d = 1$$

Extracción para:	Tampón de extracción
Daño oxidativo a lípidos de membrana	Ácido tricloroacético 5% (p/v)
Contenido en prolina	Ácido sulfosalicílico 5% (p/v)
Contenido en glutatión	Ácido sulfosalicílico 5% (p/v)
Contenido en ascorbato reducido	Ácido metafosfórico 2% (p/v)+1 g NaCl
Contenido en azúcares solubles	PK 100 mM, pH 7.0
Actividad superóxidodismutasa	PK 50 mM, pH 7.8
Actividad ascorbato peroxidasa	PK 80 mM, pH 7.0* <sup>1</sup>
Actividad glutatión reductasa	Tris 50 mM+MgCl <sub>2</sub> 3 mM, pH 7.5* <sup>2</sup>
Actividad catalasa	PK 50 mM, pH 7.0

**Tabla 2.** Listado de tampones de extracción.

\*<sup>1</sup> Añadir ascorbato sódico 4 mM para su conservación a -80 °C.

\*<sup>2</sup> Añadir  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM para su conservación a -80 °C.

## 6.2. Determinaciones analíticas

### 6.2.1. Contenido de Prolina

• Extracción:

Se parte de aproximadamente 1 g de peso fresco de hojas o raíces congeladas en nitrógeno líquido en el momento de la cosecha y conservadas a -80 °C.

- 1) Se homogenizó el material en un mortero con N líquido.
- 2) Se añadieron al mortero 5 ml de tampón de extracción (Tabla 2).
- 3) Se transfirió el material a tubos eppendorf estériles previamente pesados que se centrifugaron a 4 °C y 12.290 g durante 10 minutos.
- 4) Se recogió el sobrenadante en alícuotas, midiendo el volumen obtenido ( $V_i$ ) y se guardaron los tubos con el sedimento en una estufa a 60 °C durante 2 días para calcular el peso seco de la muestra (DW).
- 5) Las extracciones así obtenidas se utilizaron directamente para la medición correspondiente o se conservaron a -20 °C.

• Cuantificación:

Para la cuantificación de prolina se utilizó el método descrito por Bates et al. (1973).

- 1) Se hicieron reaccionar en tubos de cristal 0,5 ml de extracto con 0,5 ml de ácido acético glacial y 0,5 ml de nihidrina ácida (Tabla 3). Como blanco se utilizó tampón de extracción en lugar de muestra (Tabla 2). Para la curva patrón se utilizaron distintas concentraciones de prolina (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{mol/ml}$ ).
- 2) Se calentó la mezcla a 100 °C durante una hora y se terminó la reacción metiendo los tubos en hielo.
- 3) Se añadió 1 ml de tolueno, agitando en un vórtex durante 10 segundos.
- 4) Se extrajo la fase resultante superior, conteniendo la prolina y el tolueno, y se llevó a cubetas de cuarzo donde se midió la absorbancia a 530 nm.

Reactivo de Nihidrina
1,25 g de nihidrina 30 ml ácido acético glacial 20 ml ácido fosfórico 6 M →Calentar en agitación hasta disolución en campana de extracción (genera gases tóxicos)

**Tabla 3.** Composición del reactivo de nihidrina ácida.

### 6.2.2. Contenido de azúcares solubles totales

• Extracción:

El procedimiento de extracción es similar al de la extracción para la cuantificación de actividades enzimáticas descrito en el apartado 6.1.1.

• Cuantificación:

Para la cuantificación de azúcares totales se utilizó el método descrito por Irigoyen et al. (1992) ajustado para muestras de maíz.

- 1) Se hicieron reaccionar en tubos de cristal 0,025 ml de extracto con 3 ml de reactivo de antrona (Tabla 4). Como blanco se utilizó tampón de extracción en lugar de muestra (Tabla 2). Para la

curva patrón se utilizaron distintas concentraciones de glucosa (0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6 y 4 mg/ml).

- 2) Se calentó la mezcla a 100 °C durante 10 minutos y se terminó la reacción metiendo los tubos en hielo.
- 3) Se llevó la mezcla a cubetas de cuarzo y se midió la absorbancia a 620 nm.

Reactivo de antrona
250 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 72%
0,5 g de antrona
→ Remover con suavidad hasta completa disolución en campana de extracción (reacción exógena y explosiva que genera gases tóxicos)

**Tabla 4.** Composición del reactivo de antrona.

### 6.2.3. Daño oxidativo a lípidos de membrana (DOL)

• Extracción:

El procedimiento de extracción es similar al de la extracción para la cuantificación de prolina descrito en el apartado 6.2.1.

• Cuantificación:

Para la cuantificación del DOL se utilizó el método descrito por Minotti y Aust (1987) que permite cuantificar espectrofotométricamente el DOL mediante la medida del complejo que forma el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el malondialdehído (MDA) resultante de la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados que están peroxidados en la muestra.

- 1) Se añadieron a tubos eppendorf 100 µl del extracto y 1 ml de mezcla de reacción (Tabla 5). Como blanco se utilizó tampón de extracción en lugar de muestra (Tabla 2). Para la curva patrón se utilizaron distintas concentraciones de MDA disueltas en tampón de extracción (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5 y 10 mM).
- 2) Se calentó la mezcla a 100 °C durante 30 minutos y se terminó la reacción metiendo los tubos en hielo.
- 3) Centrifugamos 5 min a 800 g y se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm ( $A_{532}$ ) y 600 nm ( $A_{600}$ =absorbancia residual).

Mezcla de reacción
Tricloroacético (TCA) 15% (p/v)
Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,375% (p/v)
Butilhidroxitolueno (BHT) 0,01% (p/v)
HCl 0,25 N
→ Calentar en agitación hasta disolución.

**Tabla 5.** Composición de la mezcla de reacción.

#### 6.2.4. Acumulación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

##### • Extracción:

Se parte de aproximadamente 1 g de peso fresco de hojas o raíces congeladas en nitrógeno líquido en el momento de la cosecha y conservadas a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

- 1) Se homogenizó el material en un mortero con N líquido.
- 2) Se añadieron al mortero 5 ml de tampón de extracción (Tabla 2).
- 3) Se transfirió el material a tubos eppendorf estériles previamente pesados que se centrifugaron a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  y 12.290 g durante 10 minutos.
- 4) Se recogió el sobrenadante en alícuotas midiendo el volumen obtenido ( $V_i$ ) y se guardaron los tubos con el sedimento en una estufa a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 días para calcular el peso seco de la muestra (DW).

➔ Hasta este punto la extracción es similar a la del apartado 6.2.1. A partir de este punto continuamos el proceso con los siguientes pasos:

- 5) Se añadieron 0,1 g de carbón activo y 0,01 g de PVPP.
- 6) Se filtró la mezcla con filtros milipore de  $0,22\text{ }\mu\text{m}$ .
- 7) Se recogió el filtrado en alícuotas que se utilizaron directamente para la medición correspondiente o se conservaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

##### • Cuantificación:

Para la cuantificación del  $H_2O_2$  se utilizó el método descrito por Patterson et al. (1984) que permite medir espectrofotométricamente el  $H_2O_2$  mediante la cuantificación del complejo que forma con el titanio ( $Ti^{4+}$ ).

- 1) Se añadieron a tubos falcon 100  $\mu\text{l}$  del extracto y 1 ml de tampón PK100 mM y 1 ml de mezcla de reacción (Tabla 6). Como blanco se utilizó tampón de extracción en lugar de muestra (Tabla 2). Para la curva patrón se utilizaron distintas concentraciones de  $H_2O_2$  disueltas en tampón de extracción (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mM).
- 2) Se calentó la mezcla a  $45\text{ }^\circ\text{C}$  durante una hora y se terminó la reacción metiendo los tubos en hielo.
- 3) Se midió la absorbancia (A) resultante a 508 nm.

Tampón PK 100 mM	Mezcla de reacción:
$KH_2PO_4$ 30 mM	Titanium oxalato 0,6 mM
$K_2HPO_4$ 70 mM	4-(2-pyridylazo)resorcinol 0,6 mM
➔ Ajustar pH a 8.4	

**Tabla 6.** Composición de los reactivos utilizados para medir acumulación de  $H_2O_2$

### 6.2.5. Acumulación de ascorbato reducido

#### • Extracción:

Se parte de 0,2 g de peso fresco de hojas o raíces congeladas en nitrógeno líquido en el momento de la cosecha y conservadas a -80 °C.

- 1) Se homogenizó el material en un mortero con N líquido.
- 2) Se añadieron al mortero 5 ml de tampón de extracción (Tabla 2).
- 3) Se filtró la mezcla a través de papel de filtro para retener restos del tejido.
- 4) Las extracciones así obtenidas se utilizaron directamente para la medición correspondiente o se conservaron a -20 °C.

#### • Cuantificación:

Para la cuantificación del ascorbato reducido (Asc.) se utilizó el método descrito por Leipner et al. (1997) que permite medir espectrofotométricamente la reducción del 2'6-diclorofenolindol (DCPIP).

- 1) En una placa de ELISA se mezclaron 30 µl de extracto y 20 µl de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 45% (p/v) por pocillo (3 pocillos por muestra). Como blanco se utilizó tampón de extracción en lugar de muestra (Tabla 2). Para la curva patrón se utilizaron distintas concentraciones de ácido ascórbico disueltas en tampón de extracción (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 y 1 mM).
- 2) Añadimos 100 µl de tampón citrato-fosfato 2 M (Tabla 7) y 100 µl de DCPIP 0,003% dando comienzo a la reacción.
- 3) Medimos inmediatamente la absorbancia (A) resultante a 524 nm.

<b>Tampón Citrato-Fosfato 2 M</b>
Ácido cítrico 2 M
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 M
→ Ajustar pH a 2,3

**Tabla 7.** Composición de los reactivos utilizados para medir la acumulación de ascorbato reducido.

### 6.2.6. Acumulación de glutatión total

#### • Extracción:

El procedimiento de extracción es similar al de la extracción para la cuantificación de prolina descrito en el apartado 6.2.1.

#### • Cuantificación:

Para la cuantificación del glutatión total se utilizó el método descrito por Smith (1985), que mide la reducción del ditiobis a lo largo del tiempo.

- 1) Se añadieron a tubos eppendorf 750 µl del extracto y 1,125 ml de mezcla de tampón PK 0,5 M (Tabla 8).

- 2) En una placa de ELISA añadimos 25µl de la mezcla anterior por pocillo (3 pocillos por muestra). Como blanco se utilizó tampón de extracción en lugar de muestra (Tabla 2). Para la curva patrón se utilizaron distintas concentraciones de glutatión oxidado (GSSG) disueltas en tampón de extracción (0, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 mM).
- 3) Se añadieron a los pocillos 100 µl de tampón fosfato 0,1 M (Tabla 8), 50 µl de 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) 6 mM, 25 µl de NADPH 2 mM y 25 µl de enzima GR (10 unidades/ml), dando inicio a la reacción.
- 4) Medimos inmediatamente la absorbancia (A) a 412 nm cada minuto durante 5 minutos (valores A<sub>1</sub> a A<sub>5</sub>).

Tampón PK 0,5 mM	Tampón fosfato 0,1 M
Solución1: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 mM Solución2: K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 mM → Mezclar 130 ml de la solución 2 con 320 ml de la solución 1 → Ajustar el pH a 7.5	Fosfato sódico 0,1 M EDTA-Na 5 mM → Ajustar el pH a 7.5

**Tabla 8.** Composición de los reactivos utilizados para medir acumulación de glutatión total.

### 6.2.7. Medida del contenido en ABA

- Extracción:

Se parte de 200 mg de peso fresco de hojas congeladas en nitrógeno líquido en el momento de la cosecha y conservadas a -80 °C. Se descongelaron las muestras y se dejaron en 2 ml agua destilada a 4 °C durante toda la noche (Aroca et al., 2003).

- Cuantificación:

El contenido en ABA se midió según el método de Walker-Simmons (1987) modificado para ajustar los colúmenes al sistema espectrofotométrico del lector de placas. El método se basa en la capacidad del anticuerpo monoclonal DBPA1 para obtener una cuantificación precisa del ABA en extractos acuosos. Su efectividad en extractos de plantas de maíz fue previamente confirmado mediante experimentos de validación (Bochicchio et al., 1994; Aroca et al., 2003).

- 1) En una placa de ELISA se adicionaron 200 µl del conjugado ABA-4'-BSA por pocillo y se dejó incubando toda la noche a 4 °C.
- 2) Se realizaron 3 lavados de 10 min a 37 °C con tampón PBS 75 mM (Tabla 9). Añadimos 100 µl de muestra y 100 µl de DBPA1 por pocillo (3 pocillos por muestra) dando comienzo a la reacción de competición que se llevó a cabo durante 30 min a 37 °C. Para la curva patrón se utilizaron distintas concentraciones de ABA.
- 3) Se realizaron 3 lavados (tal y como se describe en el punto 2) y se añadieron 200 µl de anticuerpo secundario (Sigma cat. N. A4312) por pocillo. Se incubó durante 30 min a 37°C.

- 4) Se realizaron 3 lavados (tal y como se describe en el punto 2) y se añadieron 200 µl de p-Nitrofenil fosfatasa por pocillo. Se incubó durante 30 min a 37°C.
- 5) Se midió la absorbancia (A) a 415 nm.

Tampón PBS 75 mM
PBS 75 mM
BSA (10 g/l)
Tween 20 (1 ml/l)
→ Ajustar el pH a 7.0

**Tabla 9.** Composición de los reactivos utilizados para medir acumulación de ácido abscísico.

## 7. ANÁLISIS MOLECULARES

### 7.1. Determinación de la expresión génica

#### 7.1.1. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó el método de Kay et al. (1987).

• Precauciones: El ARN es un material extremadamente sensible y fácil de degradar. Por ello, previo a la extracción de ARN, todos los productos y materiales fueron tratados con solución desnaturalizante para eliminar las RNasas (Tabla 10) durante 30 min antes de comenzar la extracción. Todo el proceso se llevó a cabo en frío para evitar la degradación de las moléculas de ARN. Además, todos los reactivos de la extracción se prepararon con H<sub>2</sub>O milliQ tratada con 0,2% dietilpicrocarbonato (DEPC) durante varias horas. El agua así tratada (H<sub>2</sub>O-DEPC) se autoclavó a 120 °C durante 20 minutos y se dejó agitar sin el tapón bajo una campana de extracción de gases para eliminar los gases tóxicos que se generan al autoclavar.

Se parte de 1g de peso fresco de raíces congeladas en nitrógeno líquido en el momento de la cosecha y conservadas a -80 °C.

- 1) Se homogenizó el material en un mortero con N líquido.
- 2) Se añadieron al mortero 1800 µl de tampón REB (Tabla 10) y se continuó homogeneizando la mezcla hasta que se descongeló totalmente.
- 3) Rápidamente se añadieron al mortero 1800 µl de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (F/C/IAA 50:24:1) y se transfirió el material a tubos eppendorf estériles que se agitaron enérgicamente para mezclar las fases.
- 4) Se centrifugaron a 4 °C y 17.700 g durante 10 minutos y se recogió la fase acuosa superior.
- 5) Se re-extrajo dos veces más con 900 µl de F/C/IAA 25:24:1 mediante centrifugaciones consecutivas tal y como se describe en el punto 4.

- 6) Se recogió la fase acuosa superior midiendo el volumen obtenido ( $V_i$ ) y se añadió lentamente y en un vórtex a baja velocidad  $1/3$  de  $V_i$  de CILi 8 M, consiguiendo así la concentración final de CILi 2 M.
  - 7) Se deja incubando en hielo durante toda la noche.
  - 8) Centrifugamos las muestras a máxima velocidad (24.100 g) durante 30 min a 4 °C y eliminamos el sobrenadante.
  - 9) Se lavó el precipitado obtenido con 350  $\mu$ l de CILi 2 M frío, centrifugando en las mismas condiciones del punto 8 durante 10 min.
  - 10) El precipitado obtenido se resuspendió en 200  $\mu$ l de tampón TE (Tabla 10).
  - 11) Precipitamos el ARN con 2,5 volúmenes de etanol 100% frío (500  $\mu$ l) y 0,1 volúmenes de acetato sódico (AcNa) 3 M y pH 5,2 (20  $\mu$ l).
  - 12) Se deja incubando a -20 °C toda la noche.
  - 13) Centrifugamos las muestras a máxima velocidad (24.100 g) durante 30 min a 4 °C y eliminamos el sobrenadante.
  - 14) Se lavó el precipitado obtenido con 300  $\mu$ l de etanol 75% frío, centrifugando en las mismas condiciones del punto 13 durante 5 min.
  - 15) Se secaron los tubo con cuidado y se resuspendió el precipitado final en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DEPC.
- ➔ Las muestras pueden conservarse a -80 °C hasta su uso.

Solución desnaturalizante	Tampón TE
NaOH 0,1 M EDTA-Na 1 mM H <sub>2</sub> O-DEPC hasta volumen final ➔ Autoclavar	Tris 10 mM, pH 8 EDTA-Na 1 mM H <sub>2</sub> O-DEPC hasta volumen final ➔ Autoclavar
Tampón REB	
Tris-Cl 25 mM a pH 8 EDTA-Na 25 mM Na Cl 75 mM SDS 1% H <sub>2</sub> O-DEPC hasta volumen final ➔ Autoclavar ➔ Añadir en campana de extracción (en el momento): B-mercaptoetanol 1 M	

**Tabla 10.** Composición de los reactivos utilizados para la extracción de ARN.

### 7.1.2. Cuantificación y comprobación de calidad del ARN

La cuantificación del ARN se llevó a cabo mediante espectrofotometría a 260nm, usando el NanoDrop-1000 Spectrophotometer UV/Vis (Thermo Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante.



Para comprobar la calidad de la extracción se midió también la relación entre las absorbancias obtenidas:

- 260 y 230 nm: un valor superior a 2 implica que no hay contaminación por carbohidratos.
- 260 y 280 nm: un valor superior a 1,8 implica que no hay contaminación por proteínas y/o fenol.

### 7.1.3. Tratamiento del ARN con desoxiribonucleasa (DNasa)

Junto con el ARN extraído se encuentran contaminaciones de ADN que pueden interferir en los posteriores análisis de expresión génica por amplificación del ADNc. Para evitarlo, se realizó un tratamiento con DNasa previo a la reverso-transcripción del ARN en ADNc.

1) Se mezclaron en un tubo eppendorf estéril:

- ARN	30 µg
- Inhibidor de RNasas (40 U/µl)	1 µl
- Tampón 10X	6 µl
- Cl <sub>2</sub> Mg	3 µl
- Enzima DNasa (10 U/µl)	<u>2 µl</u>
- H <sub>2</sub> O-DEPC	hasta volumen final de 60 µl

- 2) Se incubó 30 minutos a 37 °C y se añadió el mismo volumen de H<sub>2</sub>O-DEPC (60 µl).
- 3) Se extrajo con dos volúmenes de F/C/IAA 25:24:1 (120 µl) mediante centrifugación a 4 °C y 17.700 g durante 10 minutos.
- 4) Se recogió la fase acuosa superior y se precipitó el sobrenadante con 0,1 volúmenes de AcNa 3 M a pH 5.2 y 2,5 volúmenes de etanol 100% frío incubando 2 h a -20 °C.
- 5) Centrifugamos las muestras a máxima velocidad (24.100 g) durante 30 min a 4 °C y eliminamos el sobrenadante.
- 6) Se lavó el precipitado obtenido con 300 µl de etanol 75% frío, centrifugando en las mismas condiciones del punto 5 durante 15 min.
- 7) Se secaron los tubo con cuidado y se resuspendió el precipitado final en 20 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC.
- 8) Se midió el contenido en ARN purificado tal y como se explica en el apartado 7.1.2.

### 7.1.4. Electroforesis de ARN en gel de agarosa

Como cuantificación adicional y como medida de la integridad del ARN se realizó una separación por electroforesis en gel de agarosa 1,2% en condiciones desnaturizantes.

Las moléculas de ARN se separaron en función de su tamaño y la concentración de ARN se midió tal y como se explica en el apartado 7.1.2.

1) Se preparó un gel de agarosa 1,2% en tampón MOPS 1X (Tabla 11)

2) Se prepararon las muestras en tubos eppendorf estériles mezclando:

- 15 µg de ARN
- 1 volumen de tampón de muestra (TM, Tabla 11)
- 0,1 volúmenes de tampón de carga con un colorante de ácidos nucleicos (TC, Tabla 11)

- 3) Se incubaron las muestras a 65 °C durante 15 minutos para desnaturalizar el ARN introduciéndolas inmediatamente después en hielo antes de cargarlas en el gel.
- 4) Se llevó a cabo la electroforesis en el gel de agarosa utilizando tampón MOPS 1X (Tabla 11) a voltaje constante de 80 V.
- 5) Para visualizar la fluorescencia de las bandas de ARN teñidas se expuso el gel a luz ultravioleta de 260 nm.

Tampón MOPS 10X	Tampón de muestra (TM)
MOPS 200 mM → Ajustar el pH a 7.0 AcNa 50 mM EDTA-Na 10 mM H <sub>2</sub> O-DEPC hasta volumen final → Autoclavar	100 µl Formamida des-ionizada 20 µl Tampón MOPS 10X 38 µl Formaldehido 42 µl H <sub>2</sub> O-DEPC
Tampón de carga con colorante de ácidos nucleicos (TC)	
Sacarosa 50% (p/v) Azul de Bromofenol 0,3% H <sub>2</sub> O-DEPC hasta volumen final → Como colorantes se pueden usar: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bromuro de etidio 1 µg/ml</li> <li>- Gel-Red (Biotium) 0,5 µl/ml</li> </ul>	

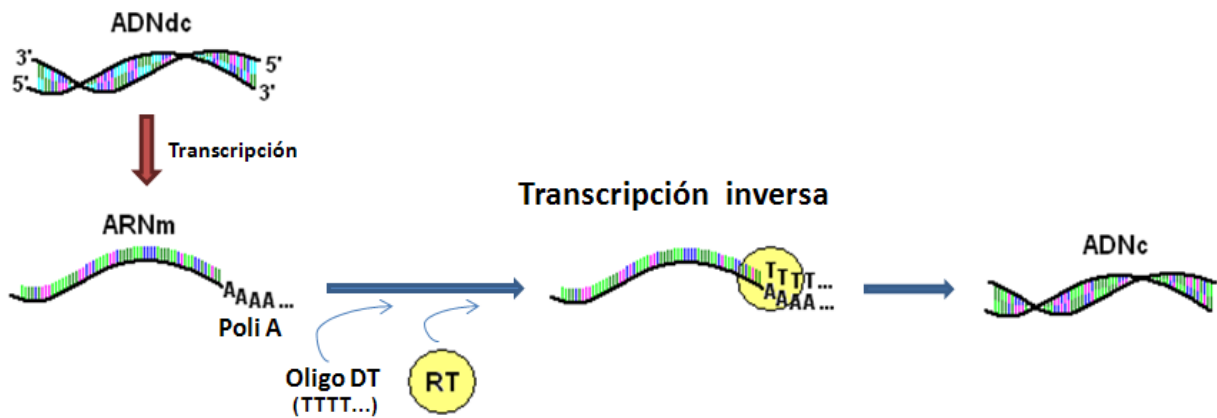
**Tabla 11.** Composición de los tampones utilizados para la electroforesis del ARN en gel de agarosa.

### 7.1.5. Transcripción inversa (RT) *in vitro*.

Mediante transcripción inversa, el ARNm fue transcrito a ADN de cadena simple (ADNc) para su posterior amplificación mediante PCR.

- 1) Se mezclaron en un tubo eppendorf estéril:
    - ARN 1 µg
    - H<sub>2</sub>O-DEPC hasta volumen final de 15 µl
    - Cebador Oligo DT de unión a PoliA 5 µl
  - 2) Incubamos 10 minutos a 70 °C e inmediatamente lo pasamos a hielo
  - 3) Añadimos:
    - dNTP mix 10 mM 1,5 µl
    - Tampón 5X 4 µl
    - DTT 0,1 M 2 µl
    - Inhibidor de RNasas 1 µl
    - Enzima RT SuperScript 1 µl
  - 4) Incubamos 45 minutos a 42 °C y posteriormente 10 minutos a 70 °C.
- ➔ Otra opción para llevar a cabo los procesos de tratamiento con DNasa y transcripción inversa es utilizando el kit QuantiTect reverse-transcription (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 5) Se cuantificó el contenido de ADNc siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 7.1.2.



**Imagen 6.** Esquema de los procesos de transcripción y transcripción inversa *in vitro*.

#### 7.1.6. Diseño de cebadores para análisis de expresión génica de las acuaporinas.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en el análisis de la expresión de los genes PIPs en las reacciones de PCR fue obtenida de referencias bibliográficas (Hachez et al., 2006) (Tabla 12).

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en el análisis de la expresión génica del resto de las acuaporinas de maíz fueron diseñados en la región no codificante 3' o 5' de cada gen, con el fin de evitar la amplificación inespecífica de otros genes de acuaporinas, ya que en la región codificante la homología entre sus secuencias es muy elevada (Tabla 13). Por este mismo motivo, el diseño de cebadores se llevó a cabo de manera manual atendiendo al cumplimiento de los requerimientos específicos impuestos por la elevada homología de las secuencias utilizadas y la técnica usada para el análisis.

• **Requerimientos específicos:**

- 1) Los cebadores directos (dirección 5' → 3') deben acabar con la secuencia de nucleótidos CC, GG o CG, evitando en todo caso la presencia de más de tres de estos nucleótidos consecutivos en toda la secuencia del oligonucleótido.
- 2) Los cebadores inversos (dirección 3' → 5') deben comenzar con la secuencia de nucleótidos CC, GG o CG, evitando en todo caso la presencia de más de tres de estos nucleótidos consecutivos en toda la secuencia del oligonucleótido.
- 3) Debe evitarse la presencia de más de cuatro nucleótidos de T y/o A consecutivos.
- 4) La temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) ideal es la que va de los 59 a los 61 °C, siendo aceptable entre 57 y 63 °C. Para estimar un valor aproximado de la  $T_m$  utilizamos la ecuación:  $T_m = [2(A+T) + 4(C+G)] - 5$

➔ El valor de Tm de los primer directo e inverso ha de ser lo más similar posible para incrementar la eficiencia de la reacción de amplificación.

5) El tamaño del fragmento amplificado debe oscilar entre 80 y 150 pb.

Genes	Código	Cebador directo	Cebador inverso
ZmPIP1.1	GRMZM2G174807_P01	cccctactatgttacgtggagttc	gcggcatattacacaattggta
ZmPIP1.2	AC209208.3_FGP002	ctcattttatgcgttgggatgt	actgaaaccaagaaaaccctga
ZmPIP1.3	GRMZM2G392975_P02	ggtcccgtatccttttatgc	aatccagctgatagataaacccac
ZmPIP1.4	GRMZM2G392975_P02	gccatctaccaccaggatgt	gggcagacaatacattcccc
ZmPIP1.5	GRMZM2G081843_P01	cacgtggatcatcatcagg	cgatgctgcatggttctg
ZmPIP1.6	GRMZM2G136032_P01	taccaccaggctcgtcctca	ggcagcagaactccgtgta
ZmPIP2.1	GRMZM2G014914_P01	cgggtcgcctttttttg	cccttgagagtcacgacatga
ZmPIP2.2	GRMZM2G092125_P01	ggccttctaccaccagtacatc	ggcctttcttagctctgctc
ZmPIP2.3	GRMZM2G081192_P01	agtacgtgctgagagccagc	cgtagctatctacttggatcgat
ZmPIP2.4	GRMZM2G154628_P01	taccggagcaacgcctaag	gaaaacagcagcgagcga
ZmPIP2.5	GRMZM2G178693_P01	tgtcgtcgttggttgcct	cacaacaatcacactagcttgaa
ZmPIP2.6	GRMZM2G047368_P02	ttaaggtgaacggagaaggaga	gaaagctactgctgctgtggat
ZmPIP2.7	nd	tcaacaacgacaaagcctg	ttgatggttagattgcagccac
ZmTIP1.1	GRMZM2G168439_P01	tgcacgtcgcactgtctcagg	cacaaatcttacagaagcaaacg
ZmTIP1.2	GRMZM2G168439_P01	agagctagcaactgtattctcc	tcataccaagctatactcaatcg
ZmTIP2.1	GRMZM2G027098_P01	atttattcaccactccatctcc	gcacatacatgcatacacaacc
ZmTIP2.2	GRMZM2G056908_P01	ttcgtctggattcagctcatcc	ccaggacgacacacatcattgg
ZmTIP2.3	GRMZM2G125023_P01	tgtgttgattcaccatcgtcg	ggaaatgaaaaccagacgttgg
ZmTIP3.1	GRMZM2G305446_P01	actagcttgaatgtattgtgg	acatacactacagtgaaagcagc
ZmTIP4.1	GRMZM2G103945_P02	gagaggctgtgtaaaagcag	aaaagaaagaattccttggcagg
ZmTIP4.2	GRMZM2G108273_P01	gcagtgagcacggttcagtc	caccagggtaactttaaagcagc
ZmTIP4.3	GRMZM2G146627_P01	ggagtgtgactggtttgagc	aacaaccataagtcggttgc
ZmTIP4.4	GRMZM2G093090_P01	ggcagtaggtgtgtgtctcc	ctgctgctccattccattcg
ZmTIP5.1	GRMZM2G121275_P01	cggtgtggttgaatgagtcg	caagctattaagtacagcaacg
ZmSIP1.1	GRMZM2G113470_P01	aaatagaggaaggtcacataagc	aataagtaacagagcacaacacc
ZmSIP1.2	GRMZM2G060922_P01	gaacatcatttggcatggatgc	ctgggaaccaggaacttattgg
ZmSIP2.1	GRMZM2G175038_P01	gaagtctcctgatgtgtattcc	gtcaactctgagaagctttagc
ZmNIP1.1	GRMZM2G041980_P02	gtcgtgtcagtagctgagagg	ccatccacacaaaaccatacc
ZmNIP2.1	GRMZM2G028325_P01	gctccatcgatcagagagtcg	tgcattggtcagagagaagagc
ZmNIP2.2	GRMZM2G137108_P01	gtatgtatgtgtgtgtgtacg	catctttgcaaaccagcaaagc
ZmNIP3.1	GRMZM2G176209_P01	ttgcttctccagaacggctc	ggacacgacgctgatggatcg
<b>ZmPoli-Ubiquitin</b>	gi:248338	ggtcagtaagccatgggttcatt	cgacgacatccatagaggtaca
<b>Zm<math>\alpha</math>-Tubulin</b>	gi:450292	tcctggacaacgaggctatctat	tgtgagatcagcctgttcaagtt
<b>ZmGapDH</b>	gi:22237	agcaggtcgcagcatcttcg	ctgtagccccactcgttgc
<b>ZmElongation Factor1</b>	gi:2282583	gatctgaagcgtgggtatgtg	gatgacctgggaggtaaagctag

Tabla 12. Cebadores de todos los genes de acuaporinas y cuatro genes constitutivos (nombres en negrita) de maíz.

### 7.1.7. Comprobación de cebadores mediante sistemas bioinformáticos

Una vez diseñados, los pares de oligonucleótidos fueron testados mediante diversos programas bioinformáticos:

- **Amplify 1.2** para MacOS (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/index>): Programa que lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa virtualmente (PCR virtual) indicando el % de homología de los cebadores seleccionados con otras secuencias no específicas y la estabilidad de estas uniones inespecíficas.

- **Nucleotide BLAST** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): Programa que compara las secuencias seleccionadas con los fragmentos del genoma de todos los organismos que se encuentren en la base de datos.

- **Oligo Analyzer 3.1** (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/Default.aspx>): Programa que nos permite analizar la posible formación de dímeros entre los pares de oligonucleótidos seleccionados o cada uno consigo mismo, así como la posible formación de estructuras secundarias que puedan interferir en la eficiencia de dichos oligonucleótidos. También hace un cálculo de T<sub>m</sub> real de cada cebador.

### 7.1.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez seleccionados y obtenidos los oligonucleótidos, se comprobó la especificidad y eficiencia de las parejas de cebadores mediante la técnica de amplificación por PCR utilizando de molde las muestras de ADNc.

1) En tubos de 0,2 ml se mezclaron:

- ADNc (1:10)	1 µl
- Tampón 10X de Taq-polimerasa termoestable	2 µl
- Cl <sub>2</sub> Mg (25 mM)	1 µl
- dNTP mix (1 mM)	1 µl
- Cebador 5' (10 µM)	1 µl
- Cebador 3' (10 µM)	1 µl
- Taq-DNA polimerasa (Roche) (5 u/µl)	<u>0,1 µl</u>
- H <sub>2</sub> O miliQ estéril	hasta volumen final de 20 µl

2) La amplificación por PCR de fragmentos de ADN se realizó empleando el “termociclador Eppendorf MasterCycler™ Personal”. Las condiciones de la reacción de PCR de comprobación fueron:

- Desnaturalización a 95°C durante 5 minutos.
- 35 ciclos de amplificación (C<sub>amp</sub>), consistiendo cada uno de ellos en tres fases: una de desnaturalización de 45 segundos a 95°C; otra de hibridación de 45 segundos a la temperatura de alineamiento (T<sub>m</sub>) adecuada para cada pareja de cebadores, y otra última de extensión a 72°C de 50 segundos.
- Extensión final a 72°C durante 5 minutos.

- 3) Tras la PCR, los fragmentos amplificados se cargaron en un gel de agarosa 1,2% (Ver apartado siguiente, 7.1.9).
- 4) Una vez analizados los resultados, se ajustaron las condiciones de la PCR (Tabla 13) para cada par de cebadores hasta obtener una única banda del tamaño esperado en cada caso.

Genes	Nº de C <sub>amp</sub>	Protocolo de PCR en cada ciclo	Dilución DN <sub>Ac</sub>
ZmPIP1.1	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmPIP1.2	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmPIP1.3	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmPIP1.4	38	95° 30" 60° 30" 72° 30"	1:1
ZmPIP1.5	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmPIP1.6	38	95° 30" 60° 30" 72° 30"	1:1
ZmPIP2.1	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmPIP2.2	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmPIP2.3	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmPIP2.4	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmPIP2.5	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmPIP2.6	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmNIP1.1	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmNIP2.1	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmNIP2.2	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:1
ZmNIP3.1	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:1
ZmSIP1.1	35	95° 45" 61° 20" 72° 30"	1:10
ZmSIP1.2	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmSIP2.1	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmTIP1.1	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmTIP1.2	27	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmTIP2.1	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmTIP2.2	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmTIP2.3	27	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmTIP4.1	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:10
ZmTIP4.2	30	95° 30" 62° 20" 72° 25"	1:10
ZmTIP4.4	35	95° 45" 60° 45" 72° 50"	1:1

**Tabla 13.** Protocolo de PCR ajustado para cada par de cebadores.

### 7.1.9. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Como comprobación del éxito de la PCR, se realizó una separación por electroforesis en gel de agarosa 1,2%.

- 1) Se preparó un gel de agarosa 1,2% en tampón TAE 1X (Tabla 14)
- 2) Se prepararon las muestras en tubos eppendorf estériles mezclando:
  - 1 µg de ADN
  - 0,1 volúmenes de tampón de carga con un colorante de ácidos nucleicos (TC, Tabla 11)
- 3) Se llevó a cabo la electroforesis en el gel de agarosa utilizando tampón TAE 1X (Tabla 14) a voltaje constante de 100 V.

- 4) Para visualizar la fluorescencia de las bandas de ADN teñidas se expuso el gel a luz ultravioleta de 260 nm.

Tampón TAE 50X
18,6 g/l EDTA-Na
121 g/l Tris
28,55 ml Ácido acético glacial
H <sub>2</sub> O destilada hasta volumen final (1L)

**Tabla 14.** Composición de los reactivos utilizados para la Electroforesis del ADN en gel de agarosa.

#### 7.1.10. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Mediante la metodología qRT-PCR la acumulación de productos amplificados es detectada y medida en la reacción en progreso en “tiempo real”, mediante la inclusión en la reacción de una molécula fluorescente de unión al ADN que informa del aumento en la cantidad de ADN amplificado proporcional con el incremento de la señal fluorescente.

- 1) En cada pocillo de una placa de qRT-PCR se añadieron:

- ADNc (1:10)	1 µl
- Mezcla de reacción Quantimix (contiene: tampón específico, Cl <sub>2</sub> Mg, dNTPs y Taq-DNA polimerasa)	7 µl
- Cebador 5' (10 µM)	1 µl
- Cebador 3' (10 µM)	1 µl
- SyBr Green 1X en agua miliQ	<u>2,5 µl</u>
- H <sub>2</sub> O miliQ estéril	hasta volumen final de 19 µl

➔ Para cada ADNc y cada pareja de cebadores la reacción se realizó por triplicado. Se utilizaron 3 muestras biológicas distintas y 2 ADNc diferentes de cada tratamiento por cada una de ellas (n=6).

- 2) La amplificación PCR de fragmentos de ADN se realizó empleando el termociclador “iQ5 Real-Time PCR Detection System” (Bio-Rad) utilizando para cada par de cebadores la condiciones de reacción especificadas en la tabla 14.

- 3) Se determinó la eficiencia de cada par de cebadores utilizando el software Bio-Rad iQ5 (version 2.1.97.1001) mediante el análisis de la relación entre el ciclo umbral (Ct, del inglés “threshold cycle”), que es el ciclo de la PCR en el cual se comienza a detectar la fluorescencia a partir de un umbral, y la fluorescencia obtenida para 4-6 puntos de la curva de qRT-PCR en la zona de crecimiento exponencial, tal y como describe Remakers et al. (2003), obteniéndose valores de entre el 90% y el 98%.

- 4) A partir de los datos obtenidos calculamos la expresión génica de cada acuaporina utilizando dos métodos:

- Método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001): Basado en la estandarización del resultado de expresión génica del gen de interés con la expresión génica de un gen constitutivo.

- Método del factor de normalización (NF): Los resultados de expresión génica de un mínimo de 4 genes constitutivos se analizan mediante un programa bioinformático (GeNorm) que

calcula automáticamente la estabilidad de dichos genes para el total de tratamientos analizados, seleccionando los 3 genes más estables y calculando a partir de ellos el factor de normalización (NF) (Vandesompele et al., 2002). Los resultados de qRT-PCR obtenidos para cada gen de interés se transforman en valores relativos comparables de acuerdo con Die y colaboradores (2010) y se estandarizan utilizando el NF obtenido, utilizando para ello la eficiencia de cada pareja de primers calculada tal y como se describe en el paso 3 de este mismo apartado. Finalmente, los niveles de expresión normalizados se re-escalan para los análisis estadísticos.

➔ Hemos descartado las acuaporinas ZmPIP2;7, ZmTIP 3.1, ZmTIP 4;3 y ZmTIP 5.1 del estudio debido a su bajísima o nula expresión en raíces, que imposibilita el análisis.

## 7.2. Técnicas de cuantificación de proteínas.

### 7.2.1. Extracción de microsomas:

Se parte de 1g de peso fresco de hojas o raíces congeladas en nitrógeno líquido en el momento de la cosecha y conservadas a -80 °C. Todo el proceso se lleva a cabo en frío.

- 1) Se añadieron al mortero 8 ml de tampón de extracción de proteínas (Tabla 15).
  - 2) Se filtró la mezcla utilizando un embudo y gasas estériles.
  - 3) Se transfirió el material a tubos falcon de 15ml estériles que se centrifugaron a 4 °C y 4.420 g durante 15 minutos.
  - 4) Se recogió el sobrenadante en tubos especiales de ultracentrífuga y se centrifugó a 144.500 g durante 2 h en una ultracentrífuga (Sorvall WX Ultra Series Centrifuge).
  - 5) Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 20 µl de tampón de suspensión (Tabla 15).
  - 6) Se sometieron las muestras a ultrasonido tres veces durante 5 segundos cada vez para mejor dilución de las proteínas.
- ➔ Se conservó la muestra a -20 °C hasta su uso.

Tampón de extracción de proteínas:	Tampón de suspensión:
Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM EDTA-Na 2 mM Sorbitol 250 mM Inhibidores de proteasas: · 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PSMF) · 1 µg/ml leupeptina · 1 µg/ml aprotinina · 1 µg/ml antipaina · 1 µg/ml chymostatina · 1 µg/ml pepstatina	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM Sacarosa 330 mM KCl 3 mM ➔ Ajustar pH a 7.8 ➔ Someter a ultrasonido 8 segundos

**Tabla 15.** Composición de los tampones utilizados en la extracción de microsomas:



### 7.2.2. Contenido de proteínas totales de membrana

La cuantificación de proteínas totales presentes en una muestra se realizó mediante el método de Bradford (1976) que permite medir espectrofotométricamente el contenido en proteínas mediante la medida del complejo que estas forman con un colorante.

El colorante utilizado es el reactivo comercial “Dye reagent protein assay” (Bio-Rad).

- 1) En una placa de ELISA se mezclaron 1 µl del extracto de microsomas (sección 7.2.1), 20 µl de reactivo comercial y 80 µl de agua miliQ por pocillo (3 pocillos por muestra).
- 2) Se hizo también una curva patrón con albúmina de suero bobino (BSA) a concentraciones conocidas (0, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 µg BSA/ml).
- 3) Se midió la absorbancia (A) resultante a 595 nm.

### 7.2.3. Electroforesis en Gel desnaturante de poliacrilamida

Como cuantificación adicional y como medida de la integridad de las proteínas se realizó una separación por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes donde las proteínas se separaron en función de su peso molecular y la concentración de las proteínas se estimó comparando con la intensidad de las bandas de un marcador de peso molecular de concentración conocida (Pre Stained SDS Standard Broad Range, Bio-Rad, USA).

Gel concentrador (Superior)	Gel separador (Inferior)
1,3 ml de tampón de gel superior pH 6,8: - Tris 0,5 mM - SDS 0,4% 0,5 ml de Acrilamida 40% 0,3 ml Solución Bis-Acrilamida 2% 2,9 ml H <sub>2</sub> O miliQ → Agitar en vorteador y añadir rápidamente: 60 µl APS 10% 20 µl TEMED	2,5 ml de tampón de gel inferior pH 8,8: - Tris 1,5 mM - SDS 0,4% 3,6 ml de Acrilamida 40% 1,9 ml Solución Bis-Acrilamida 2% 1,9 ml H <sub>2</sub> O miliQ → Agitar en vorteador y añadir rápidamente: 160 µl APS 10% 20 µl TEMED
Tampón desnaturante DB 6X	Tampón de electroforesis 1X
Tris-HCl a pH 8,6 120 mM SDS 6% B-mercaptoetanol 2% Glicerol 50% Bromofenol azul 1%	30 g /l Tris-HCl 144 g/l Glicina 10 g/l SDS → Ajustar pH a 8,3

**Tabla 16.** Composición de los reactivos utilizados para la electroforesis en Gel de poliacrilamida

- 1) Se preparó un gel de poliacrilamida con 2 fases: un gel concentrador superior y un gel separador inferior (Tabla 16).
- 2) Se prepararon las muestras en tubos eppendorf estériles mezclando:
  - 10 µg de microsomas
  - H<sub>2</sub>O miliQ hasta volumen final igual para todas la muestras.
  - 1 µl de tampón de carga desnaturante DB 6X (Tabla 16)

- 3) Se incubaron las muestras a 60 °C durante 15 minutos para desnaturalizar las proteínas introduciéndolas inmediatamente después en hielo antes de cargarlas en el gel.
- 4) Se llevó a cabo la electroforesis en el gel de acrilamida utilizando tampón de electroforesis 1X (Tabla 16) a voltaje constante de 100 V.

#### 7.2.4. Tinción de proteínas en el gel

Para la observación de las bandas de proteínas de cada muestra de extracción de microsomas, una vez que finaliza la electroforesis se procede a la tinción de las bandas.

- 1) Se separó el gel inferior del superior con una cuchilla.
  - 2) Se introdujo el gel inferior en una solución de tinción “Protein Stain Comassie” (Tabla 17), donde se mantuvo en agitación durante toda la noche.
  - 3) Se hicieron lavados de 10-15 min con una solución decolorante “Destain solution” (Tabla 17) hasta que se eliminó el exceso de colorante.
- ➔ A partir de los resultados obtenidos mediante los métodos de cuantificación de proteínas (Bradford y electroforesis y tinción del gel) se ajustó la cantidad de muestra, repitiéndose los procesos de los apartados 7.2.2., 7.2.3. y 7.2.4. hasta conseguir la misma cantidad de proteínas en todas las muestras.

Protein Stain Comassie	Destain solution
0,25 g de Comassie →Diluir en 225 ml de metanol 46 ml ácido acético 230 ml agua destilada	Metanol 50% (v/v) ácido acético 10% (v/v) agua destilada hasta volumen final

**Tabla 17.** Composición de reactivos utilizados para la tinción de proteínas.

#### 7.2.5. Diseño de anticuerpos para el análisis del contenido en acuaporinas específicas.

La secuencia de los anticuerpos primarios utilizados en los análisis de cuantificación de las proteínas, ZmPIP1;2, ZmPIP2;5, ZmPIP2;6, PIPs1, PIPs2 y PIPs2 fosforiladas en S<sub>274</sub> (S<sub>285</sub> en maíz) fueron obtenidas de referencias bibliográficas (Hachez et al., 2006; Marulanda et al., 2010; Calvo-Polanco et al., 2014) y el anticuerpo primario para el análisis de PIPs2 fosforilada en S<sub>115</sub> (S<sub>126</sub> en maíz) aún no ha sido publicado. Todos ellos fueron testados en maíz en estudios previos.

El resto de anticuerpos primarios fueron diseñados manualmente en la región amino-terminal (Hachez et al., 2006) de la siguiente manera:

- 1) A partir de la secuencia nucleotídica de cada gen, se obtuvieron las secuencias aminoacídicas mediante el programa bioinformático “Translate” (<http://web.expasy.org/translate/>).
- 2) Las secuencias se alinearon mediante el programa bioinformático ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

- 3) Para cada acuaporina, se buscaron secuencias de aproximadamente 15 aminoácidos lo más diferentes posible al resto de acuaporinas, para el diseño de los anticuerpos específicos. En la tabla 18 se indican los anticuerpos utilizados y las proteínas que reconocen cada uno de ellos.
- ➔ La elevada homología entre algunas de las secuencias de interés, no nos permitió diseñar anticuerpos específicos para todas ellas, por lo que algunas reconocen dos péptidos diferentes.

Proteínas	Anticuerpos IgG anti-conejo (Hachez et al., 2006)
ZmPIP1;2	AAQGAADDKDYKEP
ZmPIP2;1/ZmPIP2;2	KDDVIESGAGGGGEFAAKD
ZmPIP2;5	AKDIEAAAAHEGKD
ZmPIP2;6	KEVDVSTLEAGGVRDRD
Anticuerpos IgG anti-pollo (diseño manual)	
ZmPIP1;3/ZmPIP1;4	QGAGAGDDDDKDYKEP
ZmPIP2;3/ZmPIP2;4	DIEASGPEAGEFSAK
ZmTIP1;1	ALGSHQEVYHPGALK
ZmTIP1;2	GQRPHQQLPTTAADY
Anticuerpos IgG anti-rata (Marulanda et al., 2010; Calvo-Polanco et al., 2014)	
PIPs1	MEGKEQDVSLGANKFSERQPIGTAAQ
PIPs2	AIKALGSFRSNA
PIPs2 fosforiladas en S <sub>115</sub>	RKV{pSer}LPRA
PIPs2 fosforiladas en S <sub>274</sub>	AIKALGSFR {pSer} NA

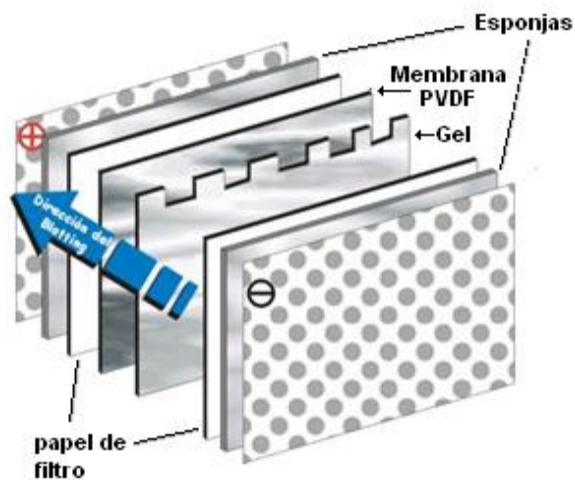
**Tabla 18.** Secuencia polipeptídica de los anticuerpos primarios específicos y las proteínas que reconocen. {pSer}=Serina fosforilada.

### 7.2.6. Técnica de Western Blot para la cuantificación de proteínas específicas.

Se llevó a cabo la transferencia de las proteínas mediante el método descrito por Towbin et al. (1979) utilizando para ello una cubeta especial de transferencia (TransBlot, Bio-Rad, USA) y se procedió a la cuantificación de las isoformas específicas de las distintas acuaporinas mediante inmunodetección con anticuerpos específicos siguiendo el siguiente procedimiento:

- 1) Se separaron las proteínas contenidas en los extractos de microsomas en base al peso molecular de las mismas mediante un gel desnaturizante de poliacrilamida tal y como se describe en el apartado 7.2.3.
- 2) Cortamos una membrana Immun-Blot™ PVDF (Bio-Rad, USA) del tamaño del gel de separación y la introducimos en metanol durante 1-2 minutos, para posterior transferencia de las proteínas a la membrana.
- 3) Ensamblamos el sistema de transferencia sumergiendo los componentes del mismo en tampón de transferencia (Tabla 19) y en el siguiente orden (Imagen 7):
  - Esponja (10 cm de largo x 8 cm de ancho)
  - Papel de filtro absorbente tipo Whatman o similar cortado al tamaño de la esponja
  - Gel de separación de poliacrilamida resultante del paso 1.
  - Membrana PVDF

- Papel de filtro absorbente tipo Whatman o similar cortado al tamaño de la esponja
- Esponja (10 cm de largo x 8 cm de ancho).



→ Hay que evitar la formación de burbujas entre las distintas capas.

**Imagen 7.** Montaje del sistema de transferencia de proteínas a la membrana PVDF en la técnica de Western blot.

- 4) Se colocó el sistema en el soporte específico relleno con tampón de transferencia (Tabla 19) procurando que la parte de la membrana quedase colocada lo más cerca posible del cátodo.
- 5) Se realizó una electroforesis a voltaje constante de 100 mV durante 75 minutos a 4 °C.
- 6) Al finalizar la transferencia de proteínas a la membrana, se colocó ésta en una bandeja con solución bloqueante (5% de BSA en TTBS 1X) durante 2h en agitación constante.
- El gel se sometió a tinción, tal y como se describe en el apartado 7.2.4., para su uso posterior en la normalización de la cuantificación de las bandas.
- 7) Se eliminó la solución bloqueante y se añadieron 10-15 ml de anticuerpo primario específico (Tabla 18) diluido en TTBS 1X (Tabla 19) en proporción 1:2000 (v/v). Se dejó incubando toda la noche a 4 °C en agitación constante.
- 8) Se eliminó la solución sobrante y se llevaron a cabo 3 lavados de 15 minutos con TTBS 1X en agitación constante.
- 9) Se añadieron 10-15 ml de anticuerpo secundario (Inmunoglobulina G de cabra anti-conejo, anti-pollo o anti-rata según el animal en que se había obtenido el anticuerpo primario, conjugada con peroxidasa de rábano) diluido en TTBS 1X en proporción 1:20.000 y se dejó incubando 1h a temperatura ambiente en agitación constante.
- 10) Tras hacer 3 nuevos lavados con TTBS 1X, se añadieron 10 ml de una mezcla (1:1 v/v) de dos productos de un kit comercial (SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate, Pierce, IL, USA). Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitación constante.
- 11) Secamos la membrana cuidadosamente con papel absorbente y se incubó poniendo la membrana envuelta en plástico transparente junto a una película Hyperfilm ECL durante periodos de tiempo de entre 30s-1h.

- 12) El revelado se llevó a cabo en una cámara oscura usando las soluciones reveladora y fijadora adecuadas para las películas ECL.
- 13) La cuantificación de la señal inmunológica de las imágenes así obtenidas se realizó cuantificando la intensidad de cada banda mediante el programa informático Adobe PhotoShop 8.0.1 (Adobe Systems, Mountain View, CA) normalizado respecto a la intensidad de la señal de la banda de proteína obtenida tras la tinción del gel correspondiente según el procedimiento descrito por Aroca et al. (2005).

TBS 10X	Tampón de transferencia 1X
80 g/l NaCl 2 g/l KCl 30 g/l Tris-HCl → Ajustar a pH 7.5	3,63 g /l Tris-HCl 14,4 g/l Glicina 0,37 g/l SDS 200 ml Metanol
TTBS 1X	
500 ml TBS 1X 250 µl de Tween 20%	

**Tabla 19.** Composición de reactivos utilizados para análisis mediante Western Blot.

#### 7.2.7. Técnica ELISA para la cuantificación de proteínas específicas.

Otro procedimiento utilizado para la cuantificación de las isoformas específicas de las distintas acuaporinas es un ensayo ELISA mediante inmunodetección con anticuerpos específicos (Sanchez-Romera et al., 2014) en un espectrofotómetro Infinite 200 PRO series (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland).

- 1) En una placa de ELISA (Immulon 4HBX, Thermo Fisher Scientific Inc., Belgium) se mezclaron 2 µg de muestra con 100 µl de tampón comercial “Coating buffer” (Sigma-Aldrich) por pocillo (3 pocillos por muestra) y se dejó incubando toda la noche a 4 °C.
- 2) Se realizaron 3 lavados de 20 min con tampón TTBS 1X (Tabla 19)
- 3) Se añadieron 200 µl de solución de bloqueo (1% de BSA en TTBS 1X) y se incubó durante 30min-1h a temperatura ambiente. Después se hicieron otros 3 lavados de 10 min con TTBS 1X.
- 4) Se añadieron 100 µl de anticuerpo primario específico (Tabla 18) diluido en TTBS 1X en proporción 1:2000 (v/v) y se dejó incubando durante 1h a temperatura ambiente en agitación constante. Después se realizaron otros 3 lavados de 10 min con TTBS 1X.
- 5) Se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario (IgG conjugada con peroxidasa de rábano) diluido en TTBS 1X en proporción 1:20.000 y se dejó incubando 1h a temperatura ambiente en balanceo constante.
- 6) Tras hacer 3 nuevos lavados con TTBS 1X, se añadieron 100 µl de sustrato TMB (Sigma-Aldrich), se incubó durante 10 min a temperatura ambiente.

- 7) La reacción colorimétrica se consiguió añadiendo 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M.
- 8) Se midió inmediatamente en espectrofotómetro a 450 nm.

### 7.3. Técnica de inmuno-localización de proteínas *in situ*.

Se llevó a cabo la inmuno-localización *in situ* de diversas acuaporinas utilizando el método descrito por Hachez et al. (2006) mediante inmunodetección con anticuerpos específicos. La tinción del hongo micorrízico se incluyó en el proceso siguiendo el método utilizado por Harrison et al. (2002).

- 1) Se utilizaron raíces frescas de maíz de tamaños intermedios (2-3 mm Ø) y se realizaron a mano cortes transversales limpios con una cuchilla, procurando que fueran lo más finos posible.
- 2) Los cortes fueron fijados con paraformaldehído 0,8% diluido en PBS 1X (Tabla 20) durante 1h a temperatura ambiente en cámara de vacío.
- 3) Se llevaron a cabo 5 lavados con PBS 1X.
- 4) Para permeabilizar las muestras, se introdujeron los cortes en Triton X-100 al 0,25% en PBS 1X durante 30 min a temperatura ambiente.
- 5) Se incubaron las muestras en solución bloqueante (5% de BSA en PBS 1X) durante 1 h a 37 °C.
- 6) Se incubaron las muestras con anticuerpo primario específico (Tabla 18) diluido en tampón bloqueante en proporción 1:100 (v/v) o con suero preinmune (control) y se dejó incubando durante 1h a 37 °C. Después se realizaron otros 3 lavados de 20 min con solución bloqueante.
- 7) Se incubaron las muestras con anticuerpo secundario (IgG marcada con Alexa-Fluor 633) diluido en tampón bloqueante en proporción 1:100 (v/v) y se dejó incubando durante 1h a 37 °C en oscuridad.
- 8) Se incubaron las muestras con 0,2 µg/ml WGA-488 0,2 µg/ml (del inglés “lectin Wheat Germ Agglutinin”) que se une específicamente a la quitina del hongo. Después se realizaron otros 5 lavados de 10 min con PBS 1X.  
→ La concentración utilizada de WGA-488 se escogió en base a experimentos previos en los que se testó la aplicación de WGA-488 en un rango de entre 0,1 µg/ml y 0,5 mg/ml.
- 9) Para eliminar la autofluorescencia de las raíces, se incubaron las muestras con Toluidina azul 0,1% diluida en PBS 1X durante 2 minutos.
- 10) Se lavaron las muestras en PBS1X y se analizaron en microscopio de fluorescencia y microscopio electrónico de transmisión bajo luz U.V. (para observación del anticuerpo secundario-633: excitación 610-650 nm, emisión 660-680 nm; para observación del WGA-488: excitación 460-500 nm, emisión 510-530 nm).

#### 7.4. Técnicas de caracterización funcional de acuaporinas mediante expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Se llevó a cabo la caracterización funcional de diversas acuaporinas utilizando el método descrito por Fetter et al. (2004) en el que se introdujo ARNc de las proteínas de interés ZmPIP1,3-1;4, ZmPIP2;1-2;2, ZmPIP1,3-1;4 en co-expresión con ZmPIP2;1-2;2, ZmNIP1;1, ZmNIP2;1, ZmNIP2;2, ZmTIP1;1, ZmTIP1;2 y un control positivo (ZmPIP2;5 para transporte de agua, rAQP9 para transporte de glicerol, urea y ácido bórico) en ovocitos de rana (*Xenopus laevis*). Estos ovocitos contienen todos los mecanismos necesarios para la transcripción del ARN, lo que permite la traducción del ARNc de interés en proteínas. Los ovocitos de rana son células altamente impermeables, por lo que la presencia de las acuaporinas de interés en la membrana externa del ovocito nos permitirá medir la capacidad para transportar diversas moléculas según los cambios en volumen del ovocito al exponerse a soluciones de diferente concentración. Las diferencias de potencial hídrico externo e interno de los ovocitos darán lugar al transporte de agua a favor de gradiente a través de la acuaporina testada. Por ello, el primer test imprescindible es el de transporte de agua, ya que el método sólo funcionará si la acuaporina testada es capaz de transportar agua.

##### 7.4.1. Preparación del gen de interés para su inserción en un vector de clonación.

La obtención del ADN de interés puede hacerse a partir de ADNc sintetizado siguiendo los protocolos de los apartados 7.1.1-7.1.5 del material y métodos.

- 1) Amplificamos el fragmento de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, apartado 7.1.8.) utilizando cebadores específicos para cada gen (Tabla 20).
- 2) Llevamos a cabo una electroforesis (apartado 7.1.9.) con todo el producto obtenido en el paso 1.
- 3) Recortamos la banda correspondiente a nuestro gen con una cuchilla bajo luz U.V. y la purificamos utilizando un kit de purificación de ADN (MN NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 4) Llevamos a cabo una PCR como la del apartado 7.1.8. con ligeras modificaciones:
  - Cebadores específicos (Tabla 20) con una secuencia añadida en el extremo, necesaria para la inserción en el vector de clonación: 5'-{GGCTTAAU} Cebador directo-3' y 5'-{GGTTTAAU} Cebador inverso-3' .
  - Utilizamos una polimerasa especial (Taq-polimerasa Pfu Cx) que traduce el uracilo.
- 5) Repetimos los pasos 2 y 3.

Genes	Cebador directo	Cebador inverso
ZmPIP1.4	atggaggggaaggaggag	ttaagacctactctgaa
ZmPIP2.2	atgggcaaggacgacgtg	tcacgcgttgctcctgaag
ZmNIP1.1	atggccggaggcggagacc	tcaggcggaggcggcggag
ZmTIP1.1	atgccaatcaataggatgcc	ttagtagtcggtggaggggagc
ZmTIP1.2	atgcctgtgagcaggatcg	tcagtagtctgctgccgtg

**Tabla 20.** Cebadores específicos para la amplificación de cada gen de las acuaporinas seleccionadas para el análisis de expresión heteróloga.

- ➔ Los cebadores de los genes que no aparecen en esta tabla fueron amablemente cedidos por el laboratorio del Dr. François Chaumont (Universidad Católica de Lovaina, Bélgica).

#### 7.4.2. Linearización del vector de clonación

Como vector se utilizó un plásmido pNB1 circular, compatible con el sistema de clonación USER (del inglés “uracil-specific excision reagent cloning technique”). Para la linearización del vector se utilizaron dos enzimas de restricción (Pac1 y Nt.BbvC1) siguiendo el método descrito por Nour-Eldin et al. (2006).

- 1) Añadimos en un tubo eppendorf de 1,5 ml:
 

- Vector pNB1 circular	5 µg
- Tampón específico (NEB 4 Buffer)	8 µl
- BSA 100X	0,8 µl
- Enzima Pac1 40 U (New England Biolabs)	5 µl
  - 2) Incubar toda la noche a 37 °C
  - 3) Añadimos al mismo eppendorf:
 

- Enzima Pac1 40 U (New England Biolabs)	2 µl
- Enzima Nt.BbvC140 U (New England Biolabs)	2 µl
  - 4) Incubamos 3h a 37 °C
  - 5) Llevamos a cabo una electroforesis (apartado 7.1.9.) con todo el producto obtenido en el paso 1.
  - 6) Recortamos la banda correspondiente a nuestro gen con una cuchilla bajo luz U.V. y la purificamos utilizando un kit de purificación de ADN (MN NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- ➔ El vector, una vez linearizado, es muy frágil, por lo que ha de mantenerse en frío.

#### 7.4.3. Ligación del gen al vector de clonación linearizado

Para la ligación entre el fragmento de ADN de la proteína de interés y el vector de clonación, se utilizó el método descrito por Nour-Eldin et al. (2006). Nuestro inserto es introducido en la región del plásmido donde se encuentra el gen de la β-globina, de manera que ésta queda partida en



2 con el gen de interés en medio, lo cual sirve para estabilizar el ARN posteriormente polimerizado y permite una buena traducción de la proteína final en los ovocitos.

1) Añadimos en un tubo eppendorf estéril:

- Fragmento amplificado de ADN del gen de interés	3,9 µl
- Vector pNB1 linearizado	1 µl
- Tampón 10X (no específico)	0,6 µl
- Enzima USER™ enzyme mix 1U (New England Biolabs)	0,5 µl

2) Incubamos la mezcla a 37 °C durante 20 minutos seguido de 30 minutos a 25 °C.

#### 7.4.4. Transformación de células de *Escherichia coli* y multiplicación del plásmido.

El método utilizado es el de Rodríguez y Tait (1983) con ligeras modificaciones.

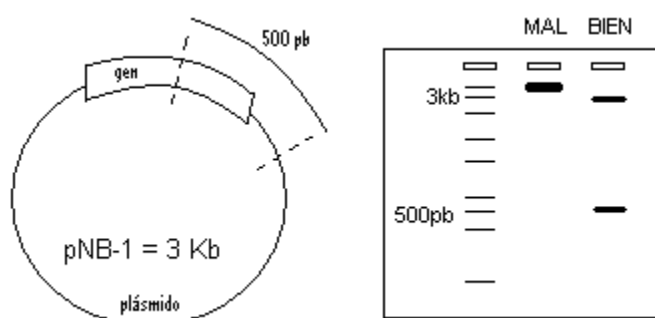
- 1) Enfriamos una alícuota de 40 µl de células competentes de *E. coli* en hielo hasta que estén totalmente descongeladas.
- 2) Añadimos a la alícuota 6 µl del vector resultante del apartado anterior y agitamos suavemente.
- 3) Dejamos la mezcla en hielo durante 1-2 minutos
- 4) Incubamos a 42 °C durante 45-110 segundos y volvemos a poner la mezcla en hielo durante 5-10 minutos.
- 5) Añadimos 200 µl de LB líquido estéril e incubamos durante 30 minutos a 37 °C en agitación.
- 6) Sembramos en 2 placas de LB sólido + Ampicilina (1µl/ml de solución stock de 100 µg/ml de ampicilina) 50 µl y 100 µl del cultivo anterior y las dejamos incubando toda la noche a 37 °C.
- 7) Seleccionamos una colonia con el inserto adecuado y la incubamos en un tubo de cristal estéril con 2 ml de LB líquido + Ampicilina durante 24h a 37 °C en agitación.
- ➔ La selección de las colonias que son transformadas con éxito se consigue gracias a la resistencia a la ampicilina que les confiere el plásmido insertado.
- 8) Colectamos las bacterias transformadas mediante centrifugación durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- ➔ Se puede repetir la centrifugación anterior añadiendo 1,5 ml de agua miliQ para una mejor limpieza de sales.
- 9) Tiramos el sobrenadante y dejamos secar a temperatura ambiente durante unos minutos.
- 10) Extraemos el plásmido con nuestro inserto de ADN de las bacterias de *E. Coli* mediante un kit de miniprep (GenElute™ Plasmid Miniprep kit, Sigma-Aldrich) mediante el cual obtenemos más de 15 µg finales de plásmidos aislados.

#### 7.4.5. Verificación de la presencia del inserto de interés en el plásmido.

Para comprobar si los plásmidos obtenidos de cada colonia contienen o no el gen de interés llevamos a cabo los siguientes procesos:

**A) Digestión del plásmido:**

Mediante la utilización de una o dos enzimas de restricción seleccionadas para la ruptura del plásmido en dos puntos, uno en el interior del gen de interés y otro en el plásmido a una distancia de  $\approx 500$  pb (Imagen 7). Los plásmidos que contengan el gen de interés quedarán así fragmentados en dos trozos de tamaños bien diferenciados que podrán ser analizados mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa. Aquellos plásmidos que no contengan el gen de interés se fragmentarán en un solo punto dando lugar a un único trozo de mayor peso molecular.



**Imagen 7.** Esquema del procedimiento de digestión y comprobación de la presencia del gen de interés en el plásmido pNB1.

- Selección de enzimas de restricción mediante programas bioinformáticos:
  - **NEBcutter2** (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>): Nos da un listado completo de las enzimas de restricción y el número de cortes que realizan en la secuencia de interés.
  - **Double Digest finder** (<http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp>): Para los enzimas seleccionados nos indica los tampones específicos requeridos para el proceso de digestión.

- Procedimiento:

1) Añadimos en un tubo eppendorf estéril:

- |                              |                                   |
|------------------------------|-----------------------------------|
| - ADN del plásmido           | 3 $\mu$ l                         |
| - Enzima de restricción SacI | 0,3 $\mu$ l                       |
| - Enzima de restricción XhoI | 0,3 $\mu$ l                       |
| - Tampón específico          | 1 $\mu$ l                         |
| - H <sub>2</sub> O miliQ     | hasta volumen final de 10 $\mu$ l |

2) Incubamos 90 minutos a 37 °C.

3) Llevamos a cabo una electroforesis en gel de agarosa (apartado 7.1.9.)

**B) Secuenciación del plásmido:**

Para aquellas “miniprep” donde la digestión del plásmido haya sido realizada con éxito, llevamos a cabo su secuenciación para comprobar que el gen insertado sea el adecuado. Esto se llevó a cabo en el servicio de secuenciación ISV de la Universidad Católica de Lovaina (Lovain-la-Neuve, Bélgica).

#### 7.4.6. Multiplicación, extracción y purificación del plásmido seleccionado

Una vez comprobado que los plásmidos contienen el gen de interés, llevamos a cabo su multiplicación siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 7.4.4 pero utilizando en la extracción el kit para Maxiprep (GenElute™ HP Plasmid Maxiprep kit, Sigma-Aldrich) para volúmenes superiores, mediante el cual obtenemos más de 1,2 mg de plásmidos aislados. La purificación del plásmido se lleva a cabo mediante el kit de purificación (MN NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up).

#### 7.4.7. Linearización del plásmido de ADN purificado.

Para la linearización del plásmido con nuestro fragmento de ADN, es necesario hacer un solo corte “aguas abajo” del extremo 3’ del gen de la  $\beta$ -globina, evitando así que el corte pueda afectar al promotor del gen o al propio inserto. Para ello seleccionamos una enzima de restricción mediante los programas bioinformáticos anteriormente descritos (apartado 7.4.6.). El procedimiento es el siguiente:

1) Mezclamos en un tubo eppendorf:

- |  |                                    |
|--|------------------------------------|
| - ADN del plásmido   | 0,8 $\mu$ g                        |
| - Tampón específico (NEB 4 Buffer)   | 10 $\mu$ l                         |
| - BSA 100X   | 1 $\mu$ l                          |
| - Enzima de restricción Xho1 (50 unidades del enzima/10 $\mu$ g ADN plasmídico a digerir). | $\approx$ 5 $\mu$ l                |
| ➔ Para el plásmido con el gen <i>ZmNIP2;1</i> utilizamos la enzima de restricción Not1.    |                                    |
| - H <sub>2</sub> O miliQ   | hasta volumen final de 100 $\mu$ l |

2) Incubamos 6 h a 37 °C

3) Hacemos un gel de ADN en agarosa de comprobación (apartado 7.1.9.)

4) Purificamos la muestra utilizando el kit de purificación (MN NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up).

#### 7.4.8. Transcripción *in vitro*.

Mediante la transcripción *in vitro*, el ADN plasmídico linearizado y purificado fue transcrito a ARN (ARNc) para su posterior inyección en los ovocitos.

1) Mezclamos en un tubo eppendorf:

- |   |             |
|---|-------------|
| - ADN del plásmido linearizado y purificado                 | 25 $\mu$ l  |
| - Tampón de transcripción optimizado 5X                     | 7 $\mu$ l   |
| - DTT 1 mM  | 5 $\mu$ l   |
| - rNTP mix 1 mM (con uracilo)                               | 5 $\mu$ l   |
| - Inhibidor de RNasas 50 U                                  | 1,5 $\mu$ l |
| - Ribo m <sup>7</sup> G cap (protector de ARN)              | 2,5 $\mu$ l |
| - Enzima T7 polimerasa 20 U                                 | 1 $\mu$ l   |
| - H <sub>2</sub> O-DEPC (hasta volumen final de 50 $\mu$ l) | 3 $\mu$ l   |

2) Incubamos 1 h a 37 °C

- 3) Añadimos otros 2  $\mu\text{l}$  de enzima T7 polimerasa 20 U e incubamos de nuevo 1h a 37 °C
- 4) Pasamos los tubos a hielo y añadimos 4  $\mu\text{l}$  de enzima RQ1 DNasa para eliminar los restos de ADN.
- 5) Incubamos 30 min a 37 °C.
- ➔ inmediatamente comenzamos la fase de purificación y precipitación del ARN
- 6) Añadimos 50  $\mu\text{l}$  de F/Cl (60:40 v/v) y mezclamos en un vortex.
- 7) Se centrifugó a 24.100 g durante 4 minutos y se recogió la fase acuosa superior.
- 8) Se re-extrajo dos veces más con 50  $\mu\text{l}$  de cloroformo mediante centrifugaciones consecutivas tal y como se describe en el punto 7.
- 9) Se recogió la fase acuosa superior y se añadieron 25  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  7,5 mM y 225  $\mu\text{l}$  de etanol 100%.
- 10) Se dejó incubando durante 2h a -80 °C.
- 11) Centrifugamos las muestras a máxima velocidad (24.100 g) durante 32 min a 4 °C. y eliminamos el sobrenadante.
- 12) Se secaron los tubo con cuidado y se resuspendió el precipitado final en 23-25  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC.
- 13) Realizamos una comprobación mediante electroforesis de ARN en gel de agarosa tal y como se describe en el apartado 7.1.4.
- 14) Se cuantificó el contenido de ARNc final tal y como se describe en el apartado 7.1.2.
- 15) Se prepararon diluciones de ARNc de cada muestra para conseguir una concentración final de 25 ng ARNc /50 nl. Se preparó en un volumen final de 5  $\mu\text{l}$ .
- ➔ Para el caso de co-inyección de ZmPIP1;3 con ZmPIP2;1/ZmPIP2;2 y de ZmPIP2;2 sola funcionando como control de la anterior, calculamos la dilución de ZmPIP2;2 para conseguir una concentración final de 0,5 ng ARNc /50 nl.

#### 7.4.9. Obtención y preparación de ovocitos de *X. laevis*

Los ovocitos se extrajeron directamente de la rana (Imagen 8) sin dañarla, realizando una operación sencilla que consiste en la apertura de una pequeña incisión en la zona gonadal y cosiendo de nuevo tras la obtención de un número suficiente de ovocitos. La rana se deja posteriormente en recuperación en  $\text{NaCl}$  9 g/l y hielo y se devuelve, tras un periodo posoperatorio adecuado, al acuario del que procede.



**Imagen 8.** *Xenopus Laevis*.

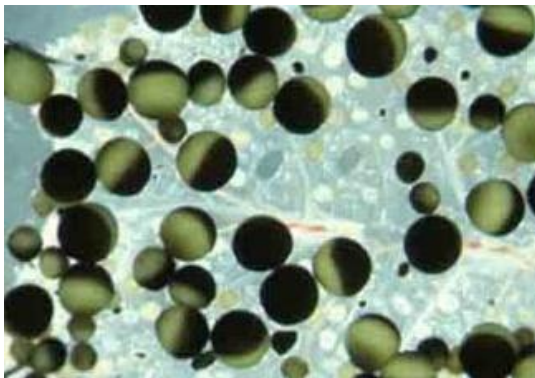
**Tampón BARTH**

NaCl 880 mM  
 KCl 10 mM  
 NaHCO<sub>3</sub> 24 mM  
 HEPES 100 mM  
 MgSO<sub>4</sub> + 7 H<sub>2</sub>O 8,2 mM  
 → Hasta aquí para BARTH sin Calcio, para BARTH CON Calcio añadimos:  
 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 4 H<sub>2</sub>O 5 mM  
 CaCl + 2 H<sub>2</sub>O 4 mM  
 → Ajustar a pH 7.4  
 → Filtrar a 0,2 μm

**Tabla 21.** Composición de los tampones utilizados en la obtención y preparación de los ovocitos de *Xenopus laevis*.

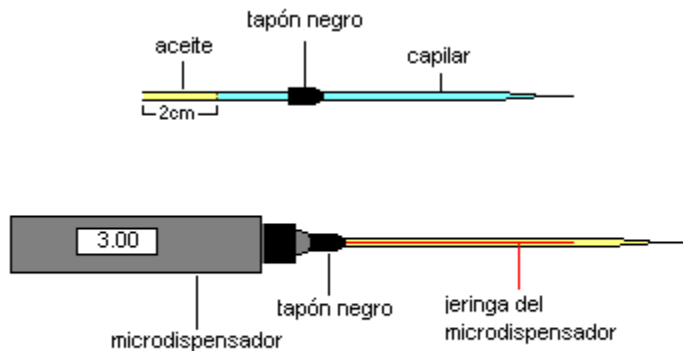
Los ovocitos recién obtenidos aparecen formando una masa unida por membrana folicular de colágeno y se prepararon para su uso siguiendo el siguiente procedimiento:

- 1) Según se fueron extrayendo, se sumergieron en tampón BARTH sin Calcio (Tabla 21) durante el tiempo que duró la operación.
- 2) Dividimos la masa de ovocitos en pequeños grupos de 20-40 unidades con la ayuda de material quirúrgico esterilizado y procedimos a tratarlas con una solución de Colagenasa A 0,025% (p/v) en tampón BARTH sin Ca donde se incubaron durante 1-2 h en agitación hasta que la colagenasa A eliminó la membrana folicular que los mantenía unidos.
- 3) Una vez sueltos, se realizaron 3 lavados con tampón BARTH sin Ca y otros 3 lavados en tampón BARTH con Calcio 200 mOsm (Tabla 21).
- 4) Los ovocitos fueron seleccionados visualmente con ayuda de una lupa binocular. Para ello fueron colocados en una placa petri con tampón BARTH con Calcio 200 mOsm y se fueron seleccionando ovocitos de tamaño grande, totalmente esféricos, con una división perfecta entre los polos animal (negro) y vegetal (blanco), sin manchas de distinto color o textura en los dos hemisferios y plenamente turgentes.



**Imagen 9.** Ovocitos de *Xenopus laevis* observados a través de una lupa binocular.

#### 7.4.10. Inyección de ARNc en los ovocitos de *X. laevis*



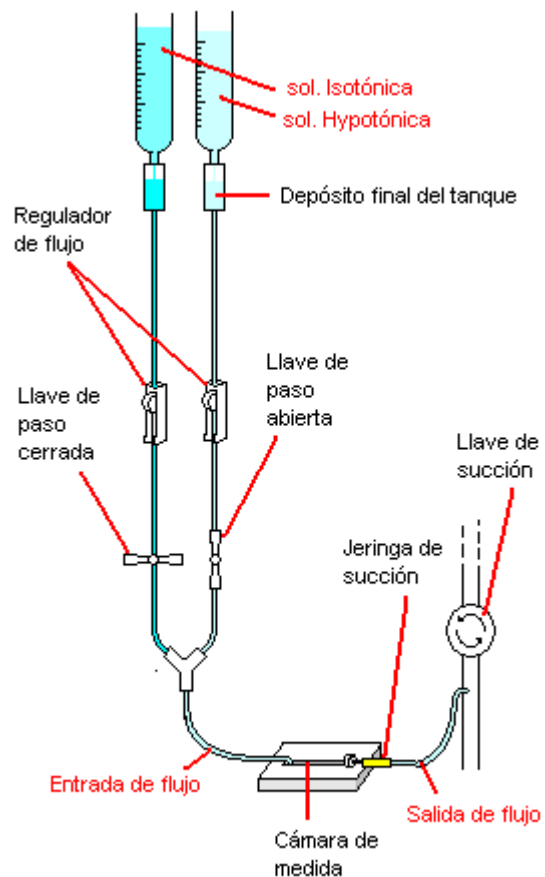
**Imagen 10.** Ensamblaje del capilar de vidrio al microdispensador.

Utilizando el microdispensador, cargamos en el capilar unos 5  $\mu$ l de muestra de cada ARNc cuya concentración se ajustó previamente (apartado 7.4.9.) o bien con H<sub>2</sub>O-DEPC para el control negativo. Con ayuda de una lupa binocular inyectamos 50 nl de muestra por ovocito. Tras su inyección, los ovocitos fueron trasladados a tampón BARTH con calcio al que se añadió Gentamicina (50  $\mu$ g/ml) e incubados durante 3-4 días a 18 °C, dando tiempo a que la maquinaria molecular del ovocito genere las proteínas de interés, cuya presencia en las membranas se comprobó preparando construcciones paralelas de estos mismos genes con un marcador fluorescente (YFP) que nos permitió su observación en la membrana al exponer los ovocitos inyectados con estas construcciones marcadas a luz U.V.

#### 7.4.11. Medidas del transporte de agua y diversos solutos a través de las acuaporinas.

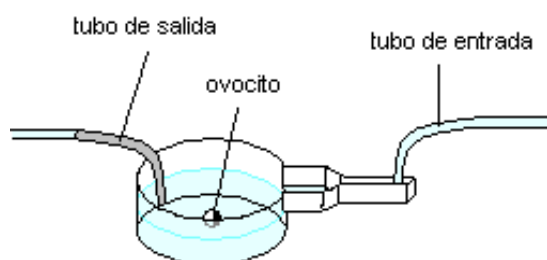
El sistema se preparó para la medición (Imagen 11) utilizando una solución isotónica de tampón BARTH con calcio (sin Gentamicina) 200 mOsm que se hizo pasar por una cámara de medida (Imagen 12) donde se colocó cada ovocito para la medición de las va\_

Para la inyección del ARNc en los ovocitos seleccionados utilizamos el método descrito por Daniels et al. (1996). Para ello utilizamos un microdispensador al que acoplamos un capilar de vidrio de 1,5-2  $\mu$ m de diámetro que rellenamos con 2 cm de aceite (Imagen 10).



**Imagen 11.** Montaje del sistema de medición del transporte de compuestos en ovocitos.

riaciones de volumen mediante un microscopio asociado a una cámara digital LG-3 Grayscale Scientific PCI Frame Grabber (Scion Corporation, Frederick, MD) que toma fotos a intervalos de 5



segundos durante 6 minutos. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa informático Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD).

**Imagen 12.** Detalle de la cámara de medida del transporte de compuestos en ovocitos.

Para la medida del transporte de agua a través de las acuaporinas utilizamos el método descrito por Fetter et al. (2004) que consiste en cambiar la solución de la cámara de medida por una solución hipotónica. La diferencia de potencial generará la entrada de agua hacia el ovocito en función de la presencia y capacidad de transporte de agua de las proteínas presentes en su membrana externa generando el aumento de volumen del mismo. Para ello utilizamos como solución hipotónica tampón BARTH con calcio 0,2X (40 mOsm). El coeficiente de permeabilidad osmótica (Pf) se calculó de acuerdo con Zhang y Verkman (1991) utilizando la fórmula:

$$Pf = V_0 [d(V / V_0) / dt] / [S \times V_w (Osm_{in} - Osm_{out})]$$

Donde,

$$Osm_{in} = 200 \text{ mOsm}$$

$$Osm_{out} = 40 \text{ mOsm}$$

V = volumen del ovocito en cada momento de captura de la imagen.

$V_0$  = volumen inicial del ovocito

S = superficie inicial del ovocito

$V_w$  = volumen molar de agua =  $18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$

Para la medida del transporte de solutos a través de las acuaporinas utilizamos los métodos descritos por Gerbeau et al. (1999) para transporte de glicerol, Takano et al. (2006) para transporte de urea y Tanaka et al. (2008) para transporte de boro. El principio consiste en generar un gradiente osmótico por exposición del ovocito a una solución externa isotónica pero con elevada concentración en el compuesto testado (Tabla 22) utilizando, de manera que si las proteínas presentes en la membrana externa del ovocito son capaces de transportar dicho soluto, entrará a favor de gradiente en el interior del mismo. El aumento de concentración de dicho compuesto en el interior del ovocito aumentará el potencial de solutos interno y la diferencia de potencial generará la entrada de agua hacia el ovocito dando lugar al aumento de volumen del mismo que se calcula utilizando la fórmula:

$$\Delta V = V_0 [d(V / V_0) / dt]$$

Donde,

V = volumen del ovocito en cada momento de captura de la imagen.

$V_0$  = volumen inicial del ovocito

Transporte de Glicerol	Transporte de Boro	Transporte de Urea
Tampón BARTH sin NaCl Glicerol 150 mM →Ajustar a 200mOsm con NaCl	Tampón BARTH sin NaCl Ácido bórico 150 mM →Ajustar a 200mOsm con NaCl	Tampón BARTH sin NaCl Urea 100 mM →Ajustar a 200mOsm con NaCl

**Tabla 22.** Composición de los tampones para los test de transporte de glicerol, boro y urea en ovocitos.

## 7.5. Técnicas de caracterización funcional de acuaporinas mediante expresión heteróloga en levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se llevó a cabo la caracterización funcional de diversas acuaporinas introduciendo oligonucleótidos de ADN optimizados para su compatibilidad con levaduras de los genes de interés ZmPIP1,3-1;4, ZmPIP2;1-2;2, ZmPIP1,3-1;4 en co-expresión con ZmPIP2;1-2;2, ZmNIP1;1, ZmNIP2;1, ZmNIP2;2, ZmTIP1;1, ZmTIP1;2 y un control positivo (rAQP9 para transporte de urea, ácido bórico y peróxido de hidrógeno, hAQP8 para el transporte de amonio y ZmNIP2;1 para transporte de silicio) en cepas de *S. cerevisiae*.

### 7.5.1. Preparación de los vectores con el inserto de ADN del gen de interés

Los genes de las acuaporinas de maíz seleccionados fueron optimizados en secuencias oligonucleotídicas de ADN sintéticas compatibles con su expresión en levaduras y fueron clonadas en un vector pMA-T por la compañía Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, U.S.A.).

Para la preparación de los vectores con el inserto de ADN del gen de interés se siguió el mismo proceso que en los apartados 7.4.1. - 7.4.6 con ligeras modificaciones:

- 1) Para la preparación del gen de interés para su inserción en un vector de clonación (apartado 7.4.1.) se realizó directamente una PCR a partir del vector pMA-T con el gen optimizado para levaduras utilizando cebadores específicos con una secuencia añadida en el extremo, necesaria para la inserción en el vector de clonación compatible con el sistema USER: 5'-{GGATTAAUA} Cebador directo-3' y 5'-{GGGTAAU} Cebador inverso-3'.
- 2) Como vector de clonación (apartado 7.4.2) se utilizó el pYeDP60u (Hamann and MØller, 2007) compatible con el sistema de clonación USER (Nour-Eldin et al., 2006). Este plásmido confiere a las levaduras la capacidad de sintetizar uracilo, lo que servirá como método de selección de las bacterias transformadas.
- 3) En el proceso de ligación del gen de interés al vector de clonación (apartado 7.4.3.), el inserto es introducido en la región del plásmido donde se encuentra el gen de la galactosa, por lo que su posterior activación dependerá del promotor que se activará en presencia de ésta en el medio.
- 4) Para la comprobación de la validez de los plásmidos obtenidos (apartado 7.4.5.), se utilizaron las enzimas de restricción BamH1 y EcoR1 para la digestión del plásmido pYeDP60u.

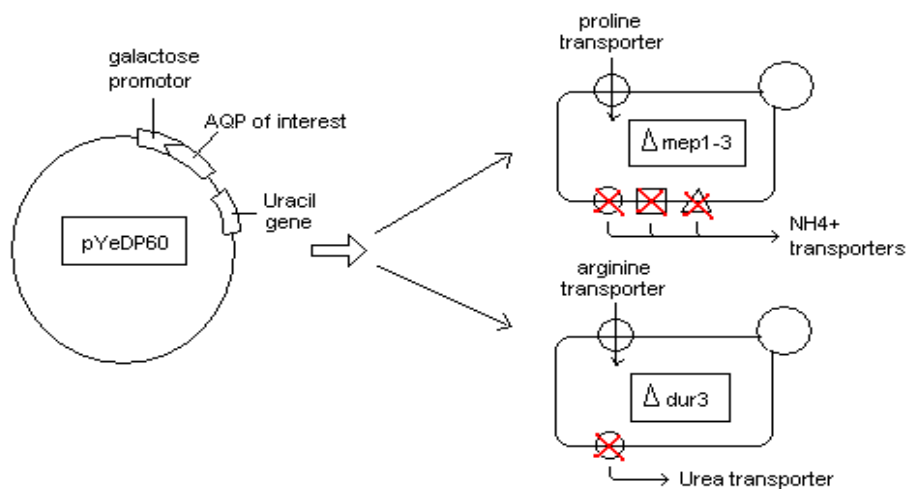


### 7.5.2. Transformación de levaduras competentes con el vector de interés.

Para los test de expresión heteróloga en levaduras hemos utilizado 2 cepas distintas de levaduras modificadas genéticamente (Imagen 13):

- **Cepa  $\Delta$ mep1-3 triple mutante 31019b** (Marini et al., 1997): Corresponde a una levadura en la que se han eliminado los 3 transportadores naturales que tiene para  $\text{NH}_3$ , lo que nos permite utilizarla para el test de complementación del transporte de  $\text{NH}_3$ .

- **Cepa  $\Delta$ dur3 mutante YNVW1** (Liu et al. 2003a): Corresponde a una levadura en la que se ha eliminado el transportador de urea, lo que nos permite utilizarla para el test de complementación del transporte de Urea.



**Imagen 13.** Introducción del plásmido pYeDP60 con la acuaporina de interés en cepas de la levadura *S. cerevisiae* modificadas genéticamente para la eliminación de transportadores específicos.

➔ Para los test de toxicidad que miden transporte de ácido bórico, dióxido de germanio (como análogo del silicio) y peróxido de hidrógeno, utilizamos las mismas cepas, pero añadimos al medio otra forma de nitrógeno utilizable por estas levaduras.

El proceso de transformación de levaduras competentes de las cepas  $\Delta$ mep1-3 y YNVW1 con plásmidos pYeDP60u conteniendo cada gen de interés o el vector vacío (control negativo) se llevó a cabo siguiendo el método de electrochoque descrito en Ku Lueven yeast electroporation webpage (<http://www.agr.kuleuven.ac.be/dp/logt/protocol/yeastelectroporation.htm>).

- Precauciones: Todo el proceso (salvo el electrochoque) se lleva a cabo en campana de flujo y con los componentes previamente enfriados en hielo.

- 1) Se prepararon alícuotas de levaduras competentes y se añadieron 2  $\mu\text{l}$  del plásmido de interés.
- 2) Se pasó la mezcla a cubetas especiales de electrochoque frías y se sometieron a electrochoque a 1,5 KV y 200 Ohm.

- 3) Se resuspendieron las levaduras añadiendo a las cubetas 200  $\mu$ l de sorbitol frío 1 M y se extendieron en placas petri con un medio sólido adecuado (Tabla 23) donde se incubaron durante 3 días a 28 °C.

**Medio sólido para multiplicación de bacterias transformadas:**

Agar 2%  
 Glucosa 2%  
 H<sub>2</sub>O miliQ hasta volumen final  
 → Autoclavar y conservar a 60 °C  
 Yeast Nitrogen Base sin NH<sub>4</sub> 0,17%  
 Ácido succínico 0,05 M pH 5,5  
 Componentes específicos:  
 - Para cepa  $\Delta$ mep1-3: Prolina 2%  
 - Para cepa YNVW1: Arginina 1 mM (Arg 1 mM)

**Tabla 23.** Composición de los medios de cultivo sólido para la multiplicación de las levaduras transformadas con el plásmido de interés.

### 7.5.3. Test de expresión heteróloga en levaduras

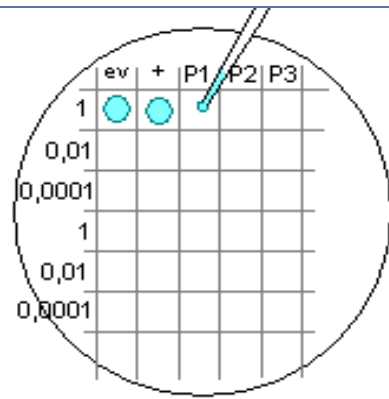
Las pruebas realizadas de expresión heteróloga en levaduras fueron de 2 tipos:

• **Test de complementación:** Las cepas utilizadas están modificadas genéticamente de manera que se ha eliminado la presencia de transportadores específicos del soluto a testar. Así, la expresión y acumulación de la acuaporina de interés en sus membranas, si el test de transporte es positivo, devolverá la capacidad para transportar dicho soluto, permitiendo la supervivencia de las levaduras en un medio donde dicho soluto sea la única fuente de ese compuesto.

• **Test de toxicidad:** Se basa en que la presencia en las membranas de acuaporinas capaces de transportar solutos tóxicos para las levaduras desde el medio de cultivo al interior del organismo, provocará una toxicidad creciente a mayor concentración de soluto en el medio, dando lugar a la disminución de la supervivencia de las levaduras.

• Procedimiento:

- 1) Se seleccionaron dos colonias aisladas de cada placa resultante del apartado 7.5.2. punto 3 y se recrecieron en condiciones similares durante 2 días a 28 °C.
  - 2) Con un asa estéril tomamos muestras de cada placa y se disolvieron en agua miliQ estéril. Realizamos este procedimiento hasta conseguir una DO<sub>600</sub>=1. Conservamos la muestra para su uso.
  - 3) Tomamos 10  $\mu$ l de la dilución DO<sub>600</sub>=1 y diluimos en 1 ml de agua miliQ para obtener una nueva dilución DO<sub>600</sub>=0,01. Conservamos la muestra para su uso.
  - 4) Repetir el paso anterior con la nueva dilución para obtener una nueva dilución DO<sub>600</sub>=0,0001.
- ➔ Repetimos todo el proceso para conseguir al menos dos réplicas experimentales independientes.



5) En placas petri con los medios adecuados para cada test (Tabla 24) pusimos una plantilla cuadrículada y fuimos poniendo ordenadamente 10  $\mu$ l de cada dilución de cada muestra a testar tal y como se representa en la Imagen 14.

6) Se incubaron las placas durante una semana a 28 °C.

**Imagen 14.** Preparación del test de transporte en levaduras.

<b>Medio sólido para los test de transporte de los distintos compuestos:</b>				
<b>Componentes comunes:</b>				
Agar 2% <b>Galactosa 2%</b> (activador de la transcripción) H <sub>2</sub> O miliQ hasta volumen final →Autoclavar y conservar a 60 °C Yeast Nitrogen Base (YNB) sin NH <sub>4</sub> 0,17% Ácido succínico 0,05 M pH 5,5		Agar 2% <b>Galactosa 2%</b> H <sub>2</sub> O miliQ hasta volumen final →Autoclavar y conservar a 60 °C Yeast Nitrogen Base <b>CON</b> NH <sub>4</sub> 0,17% Ácido succínico 0,05 M pH 5,5		
<b>Componentes específicos de cada placa para los test de:</b>				
<b>Urea</b> * <sup>1</sup>	<b>Amonio</b> * <sup>2</sup>	<b>Silicio (GeO<sub>2</sub>)</b> * <sup>3</sup>	<b>Boro</b> * <sup>4</sup>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> * <sup>5</sup>
Arg 1 mM Urea 20 mM Urea 5 mM Urea 4 mM Urea 3 mM Urea 2 mM Urea 1 mM	Prolina 0,2% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,5 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,5 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 mM	Arg 1 mM + GeO <sub>2</sub> 4 mM Arg 1 mM + GeO <sub>2</sub> 3 mM Arg 1 mM + GeO <sub>2</sub> 2 mM Arg 1 mM + GeO <sub>2</sub> 1 mM Arg 1 mM + GeO <sub>2</sub> 0,5 mM Arg 1 mM + GeO <sub>2</sub> 0,2 mM Arg 1 mM + GeO <sub>2</sub> 0 mM	Ácido Bórico 0 mM Ácido Bórico 5 mM Ácido Bórico 10 mM Ácido Bórico 15 mM Ácido Bórico 20 mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1,5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,8 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,6 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0 mM

\*<sup>1</sup> Levadura: cepa YNVW1. Fuente de nitrógeno: ninguna. Referencia bibliográfica: Liu et al. (2003b)

\*<sup>2</sup> Levadura:  $\Delta$ mep1-3. Fuente de nitrógeno: ninguna. Referencia bibliográfica: Jahn et al. (2004)

\*<sup>3</sup> Levadura: cepa YNVW1. Fuente de nitrógeno: Arg 1 mM. Referencia bibliográfica: Gu et al. (2012)

\*<sup>4</sup> Levadura: cepa YNVW1. Fuente de nitrógeno: YNB **CON** NH<sub>4</sub>. Referencia bibliográfica: Bienert et al. (2011)

\*<sup>5</sup> Levadura: cepa YNVW1. Fuente de nitrógeno: YNB **CON** NH<sub>4</sub>. Referencia bibliográfica: Bienert et al. (2007)

**Tabla 24.** Composición de los medios de cultivo sólidos para los test de transporte de urea, amonio, silicio, boro y peróxido de hidrógeno. Los componentes comunes se aplicaron a todas las placas de los test que aparecen en la misma columna. Los componentes específicos se aplicaron en distintas placas para cada test en particular. El pH de todas las placas fue de 5,5 (Bienert et al., 2007, 2011; Dynowski et al., 2008b; Gu et al., 2012).

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados de todas las gráficas y tablas presentadas en el apartado de “Resultados por capítulos” de esta tesis doctoral se sometieron a un análisis de varianza ANOVA de una vía, seguido de un test de rango múltiple de LSD con un nivel de significación de  $p \leq 0,05$ . Se utilizó para ello el programa estadístico SPSS. Las diferencias significativas encontradas se indican con letras diferentes en los distintos tratamientos.

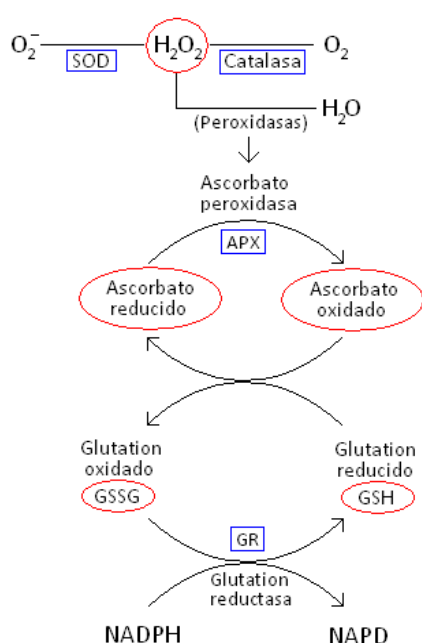
IV. CAPÍTULO 1



## 1. Estudio del efecto local y/o sistémico de la micorrización sobre la osmoregulación, acumulación de acuaporinas y los sistemas antioxidantes de plantas de maíz sometidas a estrés hídrico.

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han desarrollado diferentes estrategias de defensa frente al estrés (Larcher, 1995; Valladares et al., 2004). Frente al estrés hídrico destacan las estrategias de ajuste osmótico y regulación de los sistemas antioxidantes. La primera se basa en la modificación del potencial hídrico de las células y tejidos de la planta para mantener la turgencia celular, que se consigue mediante la acumulación de osmolitos como **azúcares** o solutos compatibles como **prolina**, glicina-betaína, pinitol, manitol, etc. (Yoshiba et al., 1997; Antolín y Sánchez-Díaz, 1992; Porcel, 2006). La segunda está destinada a la eliminación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se acumulan ante una situación de estrés, generando un **daño oxidativo** a biomoléculas (**lípidos**, proteínas o ADN). La eliminación de ROS se basa en sistemas que transforman estos compuestos en moléculas inocuas para la planta. El primer paso es el que transforma el  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ , gracias a la enzima **superóxido dismutasa (SOD)**. El ciclo ascorbato-glutation (Alscher et al., 1997) es el más importante en la eliminación de  $H_2O_2$  en condiciones de estrés y se basa en la reducción del peróxido de hidrógeno a agua mediante una cadena de reacciones de oxidación-reducción que



incluye como elementos antioxidantes el **ascorbato** y el **glutation**, que regeneran su estado de reducción gracias a la participación de enzimas como la **glutation reductasa (GR)**, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) o la dehidroascorbato reductasa (DHAR), utilizando NAD(P)H como fuente de poder reductor. El paso de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  en este ciclo lo realiza la **ascorbato peroxidasa (APX)**. Por último, en peroxisomas existe otro mecanismo de eliminación de  $H_2O_2$  basado en la actividad de la enzima **catalasa (CAT)**, que libera  $O_2$  (Mittler, 2002). La simbiosis MA confiere a las plantas una mayor resistencia al estrés, habiéndose estudiado ampliamente su relación con la tolerancia de las plantas al estrés hídrico (Augé 2001; Ruiz-Lozano et al., 2006). Se ha visto que en condiciones de

sequía, la micorrización modifica el metabolismo y con él la acumulación de azúcares y solutos compatibles. Sin embargo, los resultados varían mucho en función del tejido y de los compuestos analizados (Davies et al., 1993; Subramanian y Charest, 1995; Ruiz-Lozano, 2003; Bheemareddy y

Lakshman, 2011; He et al., 2011). Existen también algunos estudios que demuestran la capacidad de las micorrizas para modificar la actividad de diversas enzimas del sistema antioxidante de la planta, aunque, de nuevo, los resultados varían en función de los tejidos y componentes del sistema analizados (Porcel et al., 2003 y 2004; Ruiz-Sánchez et al., 2010; Talaat y Shawky, 2011).

Además de la importancia del ajuste osmótico y de los sistemas antioxidantes, en condiciones de sequía las plantas también modifican la permeabilidad de sus tejidos al agua, proceso en el que intervienen las acuaporinas. Las acuaporinas son canales que regulan el transporte pasivo de agua a través de las membranas celulares (Maurel et al., 2008) afectando directamente al flujo de agua por la vía célula a célula. Esta vía de transporte de agua adquiere mayor relevancia en condiciones de baja transpiración (Steudle y Peterson, 1998), como ocurre en condiciones de estrés hídrico (Flexas et al., 2004). Dentro de las acuaporinas, las PIPs (PIPs1 y PIPs2) son fundamentales en el transporte de agua a nivel de planta completa (Javot et al., 2003; Katsuhara et al., 2008). La permeabilidad de las PIPs debe estar controlada por mecanismos de regulación que permitan una adaptación rápida a los frecuentes cambios ambientales. Para llevar a cabo esta rápida regulación, las modificaciones post-traduccionales parecen ser claves (Vandeleur et al., 2014). El primer mecanismo de regulación post-traduccionales encontrado en acuaporinas fue la fosforilación de residuos de serina concretos, que generan cambios conformacionales que permiten la apertura del canal de agua e incrementan la actividad de las acuaporinas (Maurel et al., 1995; Johansson et al., 1998) o bien modifican la localización subcelular de las PIPs en las membranas (Prak et al., 2008). En este sentido, la fosforilación de la S<sub>115</sub> en el lazo B o la S<sub>274</sub> en la región C-terminal (ambas altamente conservadas en todas las PIPs2 de maíz, ocupando las posiciones S<sub>126</sub> y S<sub>285</sub> respectivamente) da lugar a la apertura de las acuaporinas aumentando el transporte de agua a través de las mismas (Törnroth-Horsefield et al., 2006). Por el contrario, la de-fosforilación de

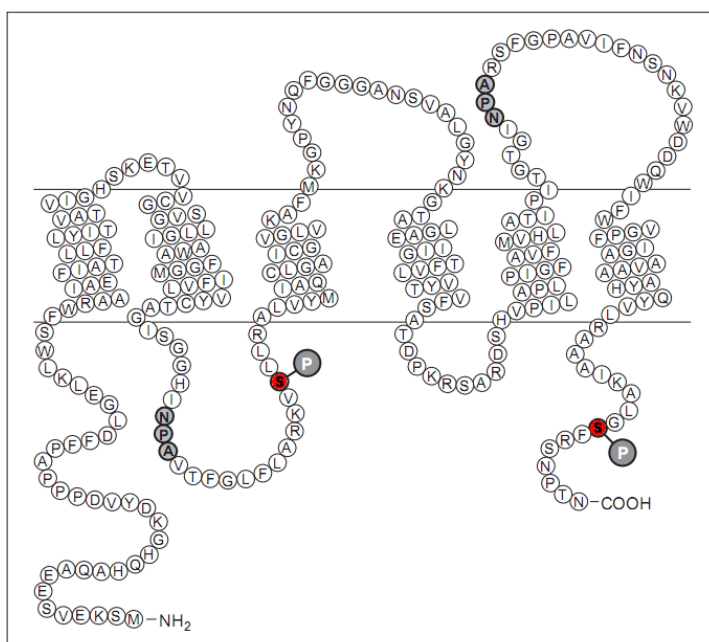


Imagen tomada de Kjellbom et al. (1999)

estos residuos ocurre habitualmente en condiciones de estrés hídrico (Johansson et al., 1996; 1998) y se cree que puede ser un mecanismo que, además de reducir la pérdida de agua celular, provee a la planta de un tiempo adicional para ajustarse a las nuevas circunstancias, como por ejemplo mediante la síntesis de solutos compatibles (Johansson et al., 2000; Chen y Murata, 2002). Cuando la planta detecta un aumento del potencial hídrico, la

fosforilación de estos residuos permite la reactivación de los canales de agua, aumentando la tasa de transporte de la misma a través de toda la planta (Johansson et al., 2000).

De otro lado, la simbiosis MA tiene la capacidad de alterar las propiedades hidráulicas de las plantas (Khalvati et al., 2005) y muchos estudios apuntan a que el control del transporte de agua a través de las acuaporinas puede ser el que condicione la conductancia hidráulica total de la planta micorrizada (Marjanovic et al., 2005; Lee et al., 2010) pudiendo ser aún más relevante su contribución en condiciones de sequía (Aroca et al., 2007; Ruiz-Lozano y Aroca, 2010). Además, la presencia y actividad de las acuaporinas es modificada por la simbiosis MA (Aroca et al., 2007, 2008b) por lo que un efecto de la micorrización sobre la acumulación y/o regulación post-traduccionales de las PIPs es esperable en condiciones de estrés hídrico.

## 1.2. OBJETIVO

Por todo ello, nos hemos propuesto analizar la naturaleza local o sistémica del efecto de la micorrización con *Rhizophagus intraradices* (Ri) sobre el estatus hídrico y la fisiología de plantas de maíz sometidas a estrés hídrico y su relación con la acumulación de acuaporinas, de osmoprotectores y la modificación de los sistemas antioxidantes de la planta, tanto en raíces como en hojas, utilizando un sistema de raíces divididas (En inglés “Split root system”) en el que uno o ambos compartimentos radicales están o no micorrizados y sometidos o no a déficit hídrico.

## 1.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

### **Tratamientos en condiciones óptimas de riego (verde oscuro en las gráficas):**

- CWW/CWW: Ambos compartimento sin micorrizar y con condiciones óptimas de riego.
- CWW/RiWW: Un compartimento sin micorrizar y otro micorrizado, ambos con condiciones óptimas de riego.
- RiWW/RiWW: Ambos compartimentos micorrizados y con condiciones óptimas de riego.

### **Tratamientos sometidos a sequía completa (rojo en las gráficas):**

- CDS/CDS: Ambos compartimento sin micorrización y sometidos a sequía.
- CDS/RiDS: Un compartimento sin micorrizar y otro micorrizado, ambos sometidos a sequía.
- RiDS/RiDS: Ambos compartimento micorrizados y sometidos a sequía.

### **Tratamientos sometidos a sequía parcial no fisiológica (verde amarillento en las gráficas):**

- CWW/CDS: Ambos compartimento sin micorrización y uno con condiciones óptimas de riego y el otro sometido a sequía.
- CWW/RiDS: Un compartimento sin micorrizar y en condiciones óptimas de riego y el otro compartimento micorrizado y sometido a sequía.



·RiWW/CDS: Un compartimento micorrizado y en condiciones óptimas de riego y otro compartimento sin micorrizar y sometido a sequía.

·RiWW/RiDS: Ambos compartimento micorrizados. Uno de ellos en condiciones óptimas de riego y el otro sometido a sequía.

## 1.4. RESULTADOS

### 1.4.1. Colonización radical de plantas de maíz.

El % de MA de los compartimentos inoculados superó el 70% en todos los casos y fue independiente del tratamiento de riego aplicado.

Tratamiento	Compartimento		Tratamiento	Compartimento	
	Izquierdo	Derecho		Izquierdo	Derecho
Cww/Cww	0b	0b	Rids/Rids	79a	81a
Cww/Riww	0b	79a	Cww/Cds	0b	0b
Riww/Riww	76a	81a	Cww/Rids	0b	73a
Cds/Cds	0b	0b	Riww/Cds	83a	0b
Cds/Rids	0b	71a	Riww/Rids	80a	83a

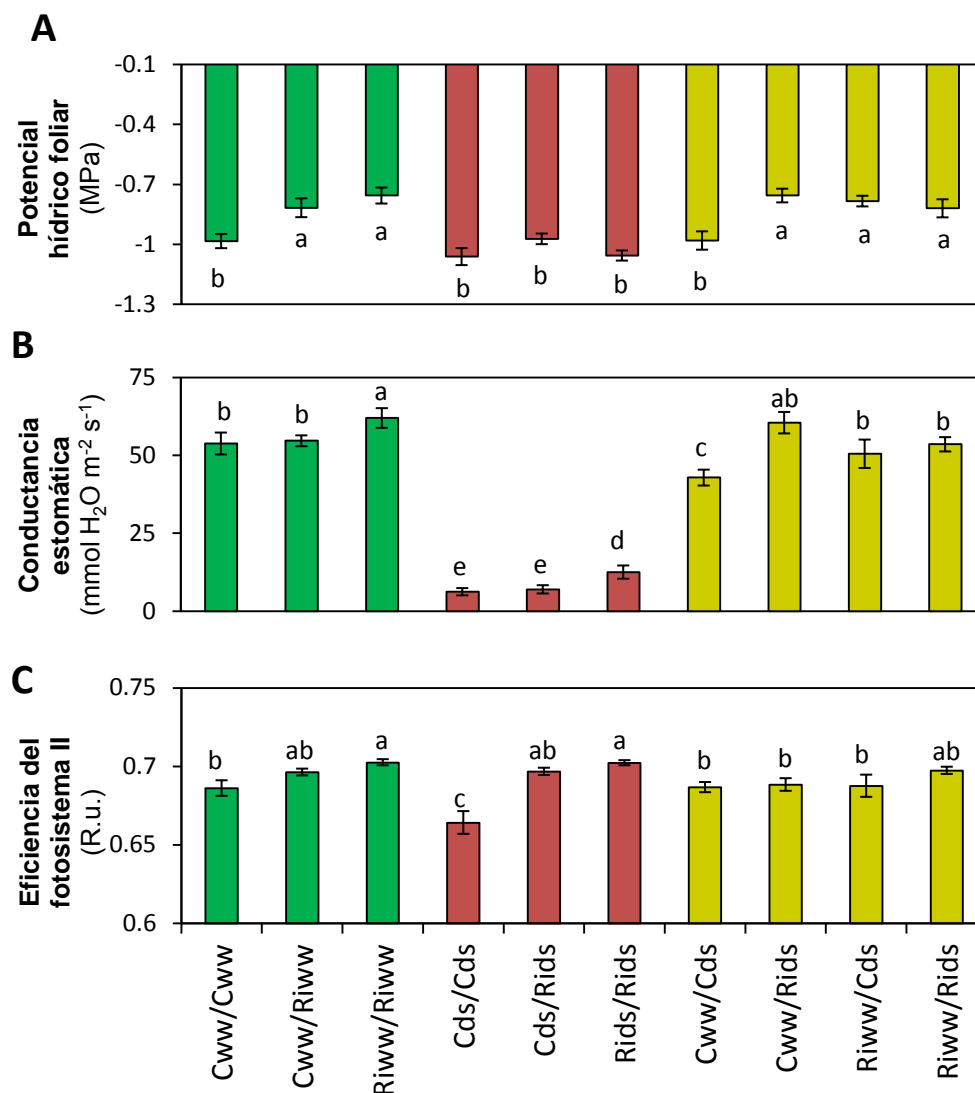
**Tabla 1.1.** Porcentaje de longitud de raíz micorrizada en plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos sometidos o no a estrés hídrico. Los tratamientos están designados como control sin inocular (C) o plantas inoculadas con *R. intraradices* (Ri). Cada compartimento radical fue cultivado en condiciones óptimas de riego (ww) o sometido a estrés hídrico (ds). Medias seguidas por letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) según el test de LSD ( $n = 6$ ).

### 1.4.2. Estatus hídrico y fisiología de plantas de maíz.

El potencial hídrico foliar más bajo se encontró en las plantas sin micorrizar sometidas a sequía que alcanzaron valores de  $-1,06\text{MPa}$  (Fig. 1.1A), mientras que los valores más altos se encontraron en plantas micorrizadas en condiciones óptimas de riego ( $-0,75\text{MPa}$ ). El potencial hídrico fue siempre mayor en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas cuando la disponibilidad de agua fue adecuada (ww) en al menos uno de los compartimentos de la raíz. Es interesante señalar que cuando el compartimento bien regado no presentaba micorrización, el potencial hídrico fue un 33% mayor si el compartimento sometido a sequía era el micorrizado ( $Cww/Rids > Cww/Cds$ ), mientras que cuando el compartimento con disponibilidad de agua era el micorrizado no se encontraron diferencias ( $Riww/Cds = Riww/Rids$ ). En condiciones de sequía aplicada a ambos compartimentos, no se detectaron variaciones significativas entre plantas MA y no MA (Fig. 1.1A).

Cuando las plantas se cultivaron en condiciones óptimas de riego, las plantas parcialmente micorrizadas no elevaron la conductancia estomática por encima de las plantas control (Fig. 1.1B) mientras que las plantas con micorrización en los dos compartimentos sí lo hicieron, aumentándola en un 15%. Las plantas sometidas a sequía redujeron su conductancia estomática entre un 80% y un

88%, siendo aquellas que estaban plenamente micorrizadas las que mantuvieron una mayor conductancia estomática. En este caso, la conductancia estomática fue un 50% superior que en las plantas no micorrizadas y un 45% mayor que en las parcialmente micorrizadas.



**Figura 1.1.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre (A) potencial hídrico foliar, (B) conductancia estomática y (C) eficiencia del PSII en plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos. Los tratamientos están designados como control sin inocular (C) o plantas inoculadas con *R. intraradices* (Ri). Cada compartimento radical fue cultivado en condiciones óptimas de riego (ww) o sometido a estrés hídrico (ds) dando lugar a tres grupos de tratamientos: plantas en condiciones óptimas (barras verde oscuro), plantas en condiciones de sequía parcial no fisiológica (barras verde-amarillento) y plantas en condiciones de sequía total (barras rojas). Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=6). Las distintas letras en las barras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) calculadas mediante el test de LSD.

Al igual que observábamos con los valores de potencial hídrico, las diferencias entre los tratamientos Cww/Cds y Cww/Rids fueron significativas, siendo la conductancia estomática más elevada (30% más) cuando el compartimento sometido a sequía era el micorrizado, mientras que no hubo diferencias entre Riww/Cds y Riww/Rids.

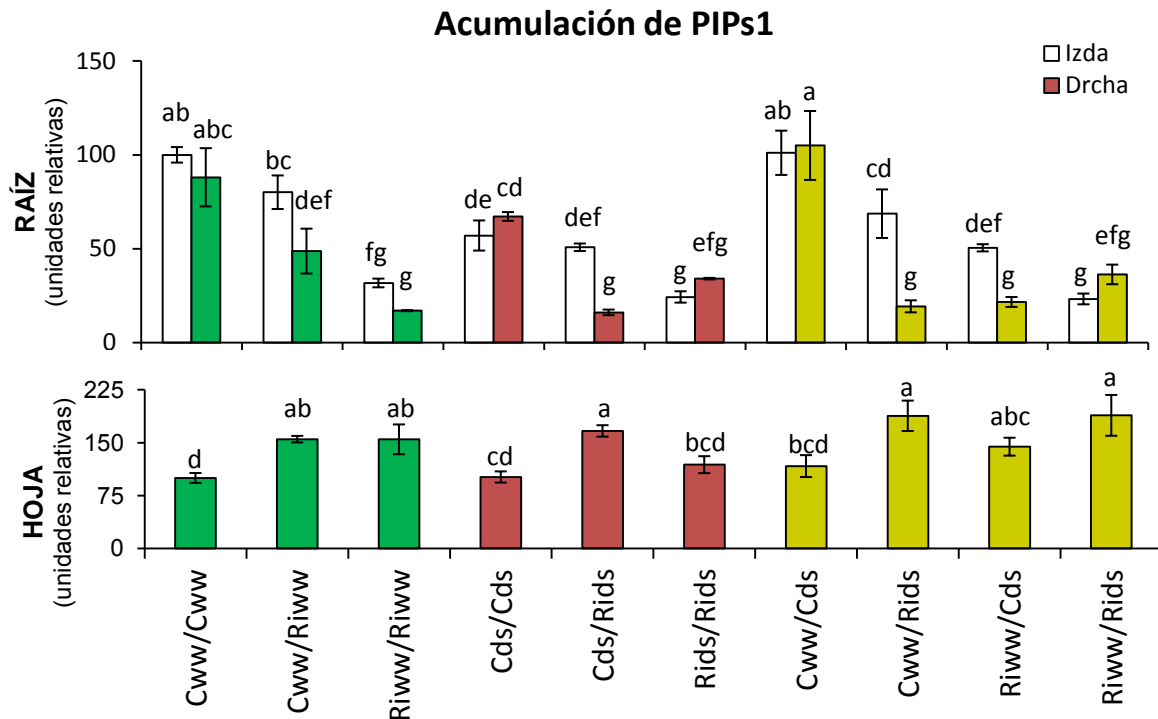
La eficiencia del fotosistema II (PSII) es indicativa de la integridad del aparato fotosintético. Las plantas micorrizadas presentaron niveles más elevados de eficiencia fotosintética que las plantas no micorrizadas (Fig. 1.1C). De hecho, en condiciones de sequía, las plantas parcial o totalmente micorrizadas mantuvieron unos niveles similares a las plantas en condiciones óptimas de riego. Por el contrario, las plantas control redujeron su eficiencia fotosintética al someterse a estrés hídrico, siendo un 6% menor que en plantas micorrizadas.

### 1.4.3. Acumulación de acuaporinas en plantas de maíz.

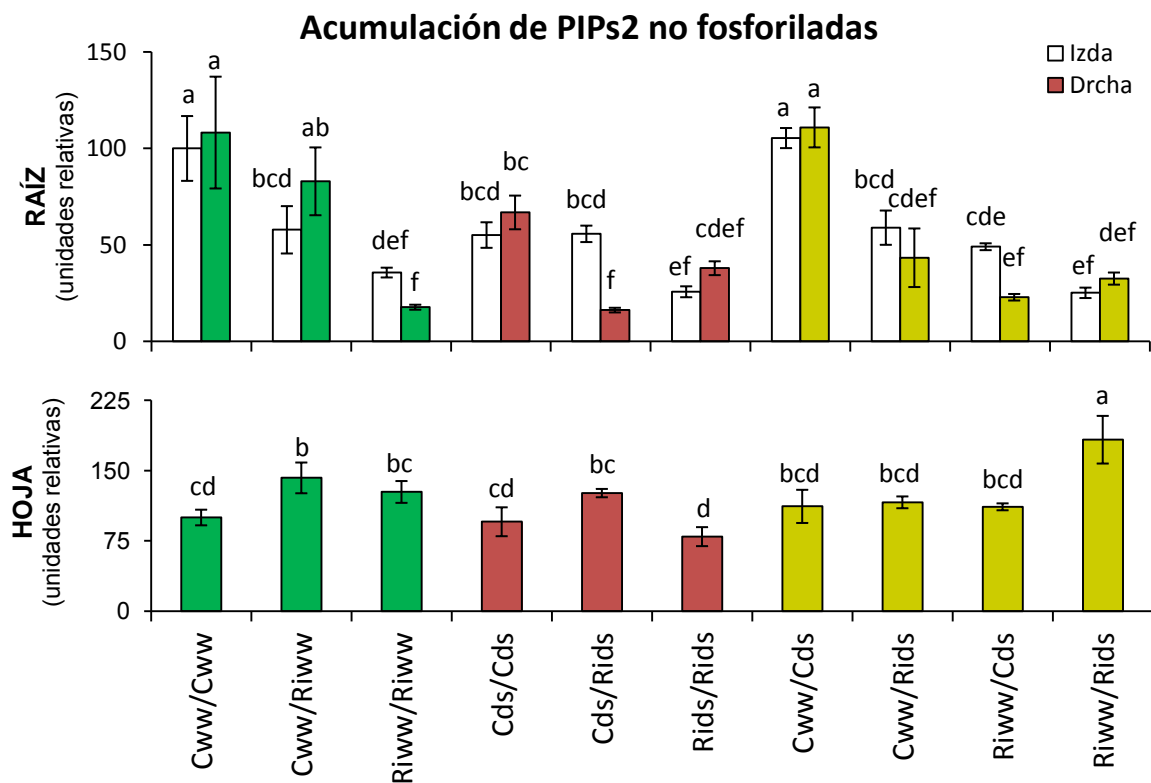
El análisis de la acumulación de PIP1s, PIP2s y PIPs2 fosforiladas en las posiciones S<sub>285</sub> del extremo C-terminal (por abreviar, P<sub>285</sub> en el resto del texto) y S<sub>126</sub> del loop B (por abreviar, P<sub>126</sub> en el resto del texto) mostró que la acumulación de estas proteínas sigue un patrón similar y está regulada de manera diferencial entre plantas MA y no MA. En raíces, las plantas no MA mostraron una disminución de los niveles de todas las PIPs en condiciones de sequía total, oscilando esta disminución entre el 33% (PIP1s y P<sub>285</sub>) y el 43% (PIP2s y P<sub>126</sub>). Por su parte, las plantas MA mantuvieron siempre unos niveles de PIPs más bajos que las plantas no MA, pero similares en todas las condiciones de riego aplicadas, siendo estos valores aproximadamente un 70% inferiores respecto a los de las plantas control no MA (Fig. 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5).

En condiciones óptimas de riego, todas las PIPs2 (Fig. 1.3, 1.4 y 1.5) redujeron sus niveles a medida que aumentaba la micorrización, afectando por igual a ambos compartimentos radiculares. Por el contrario, la acumulación de PIPs1 (Fig. 1.2) fue menor exclusivamente en los compartimentos micorrizados, sin afectar significativamente al compartimento no micorrizado (C<sub>ww</sub>/R<sub>iww</sub>), siendo aproximadamente un 40% inferior respecto al compartimento no MA. En condiciones de sequía total, los niveles de todas las PIPs resultaron significativamente inferiores en los compartimentos micorrizados frente a los no micorrizados en aproximadamente un 55-60% (Fig. 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5), siendo la mayor diferencia la que encontramos en el caso de PIPs2 fosforiladas en S<sub>285</sub> (Fig 1.4).

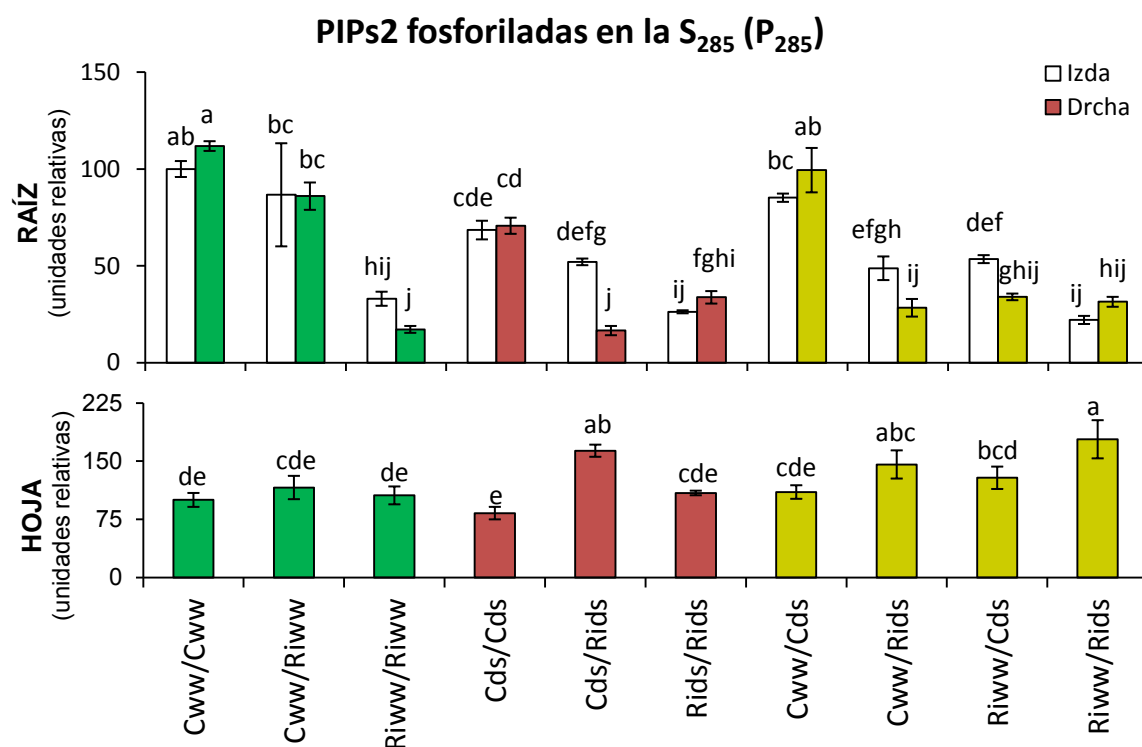
Cuando las plantas fueron sometidas a sequía parcial no fisiológica, las plantas no MA no vieron reducidos sus niveles de PIPs respecto a las plantas en condiciones óptimas de riego (C<sub>ww</sub>/C<sub>ww</sub>=C<sub>ww</sub>/C<sub>ds</sub>). Las plantas totalmente micorrizadas también mantuvieron los valores similares a las plantas en condiciones óptimas de riego (R<sub>iww</sub>/R<sub>iww</sub>=R<sub>iww</sub>/R<sub>ids</sub>). Sin embargo, cabe destacar que las plantas parcialmente micorrizadas mostraron un comportamiento ligeramente distinto. Si bien estas plantas mantuvieron unos niveles más bajos de PIPs que las plantas no MA y similares a los de las plantas completamente micorrizadas, se observó que en los compartimentos con riego óptimo de estas plantas se producía un aumento de las PIPs2 fosforiladas y de las PIP1s respecto a los compartimentos sometidos a sequía (Fig. 1.2, 1.4 y 1.5). Cuando el compartimento con acceso a agua fue el micorrizado, aumentó la cantidad de PIPs2 fosforiladas.



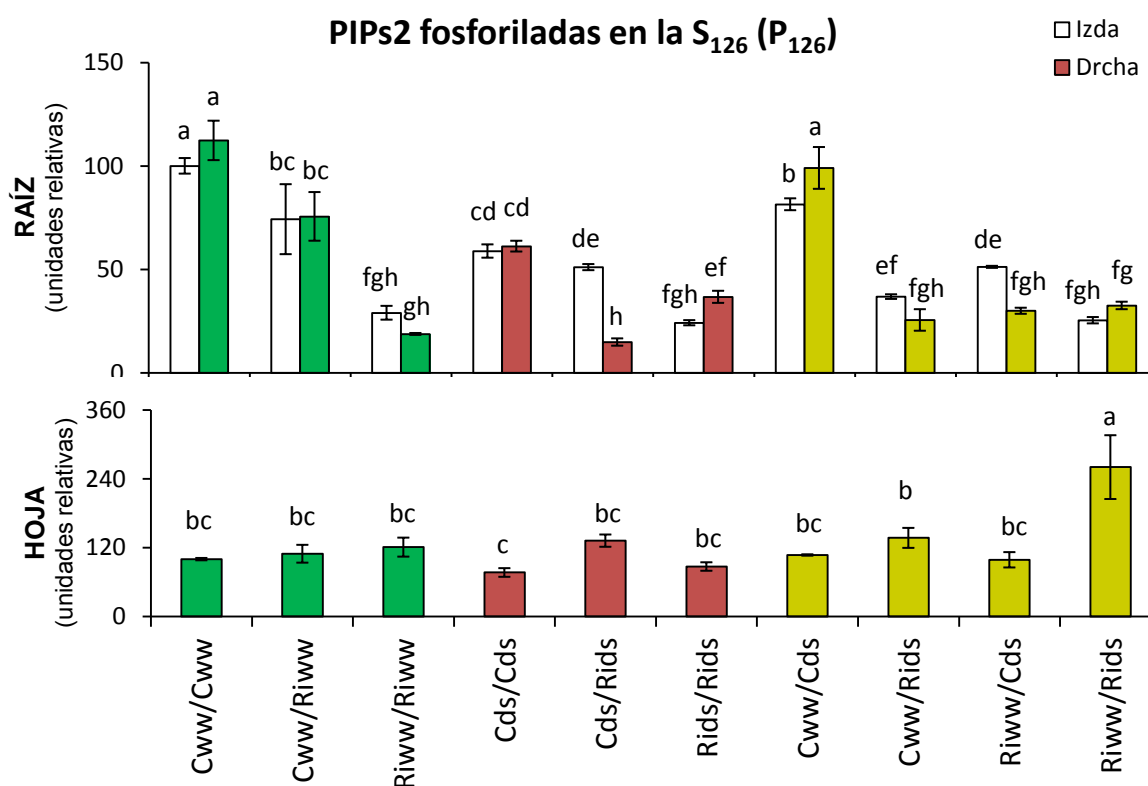
**Figura 1.2.** Acumulación de PIP1s en raíces y hojas de plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=3). Ver la leyenda de la Figura 1.1 para más detalles.



**Figura 1.3.** Acumulación de PIP2s no fosforiladas en raíces y hojas de plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=3). Ver la leyenda de la Figura 1.1 para más detalles.



**Figura 1.4.** Acumulación de PIPs2 fosforiladas en la posición S<sub>285</sub> del extremo C-terminal (P<sub>285</sub>) en raíces y hojas de plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=3). Ver la leyenda de la Figura 1.1 para más detalles.



**Figura 1.5.** Acumulación de PIPs2 fosforiladas en la posición S<sub>126</sub> del loop B (P<sub>126</sub>) en raíces y hojas de plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=3). Ver la leyenda de la Figura 1.1 para más detalles.

El otro caso llamativo es el de las PIP1s, que se incrementaron en un 71% en el compartimento en condiciones óptimas de riego cuando el compartimento sometido a sequía fue el micorrizado (Cww/Rids) (Fig. 1.2).

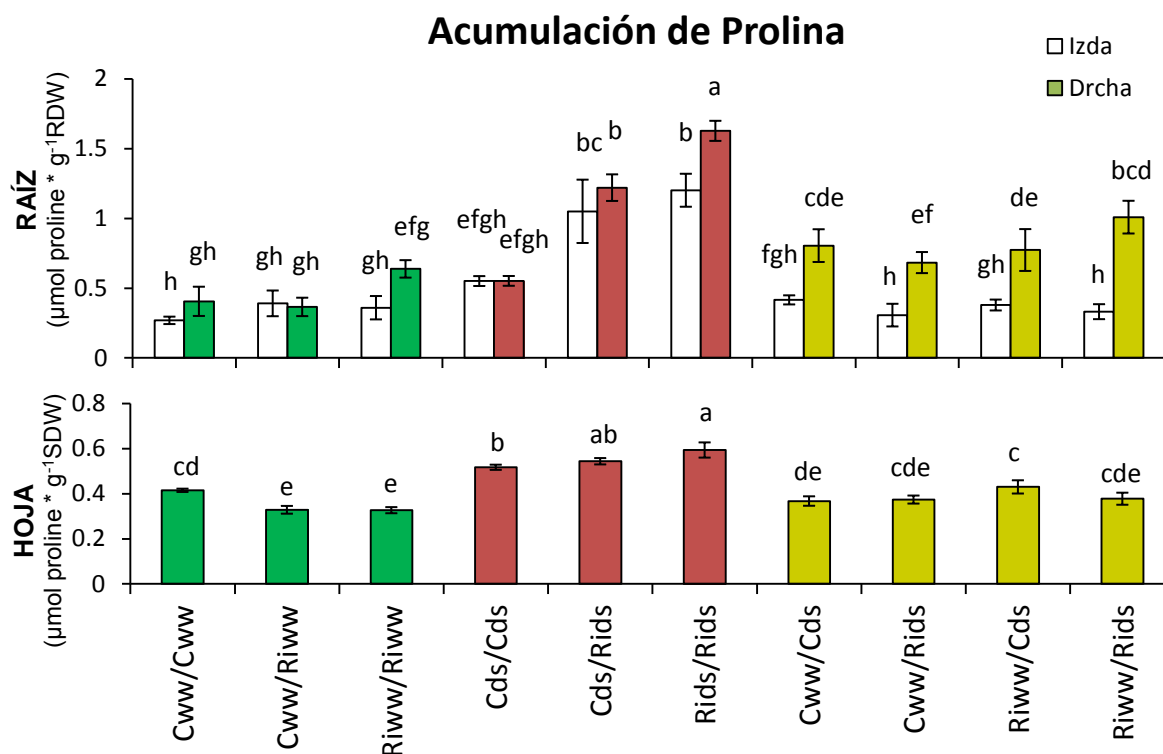
En las hojas de plantas no MA no se encontraron variaciones significativas en los niveles de PIPs en ninguno de los tratamientos de riego aplicados. Las PIPs1 se mostraron más elevadas en hojas de plantas micorrizadas tanto en condiciones óptimas de riego como en condiciones de sequía parcial (Fig. 1.2).

Bajo condiciones de sequía parcial se observaron diferencias en la acumulación de PIPs en hojas en función de si el compartimento radical sometido a sequía era o no el micorrizado. Tanto las PIPs2 fosforiladas como las PIPs1 mostraron una tendencia a incrementar su contenido cuando la sequía afectó al compartimento micorrizado, siendo este incremento más significativo en las plantas totalmente micorrizadas y sometidas a sequía parcial, que de hecho, mostraron los valores más elevados en todas las PIPs analizadas (Fig. 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5).

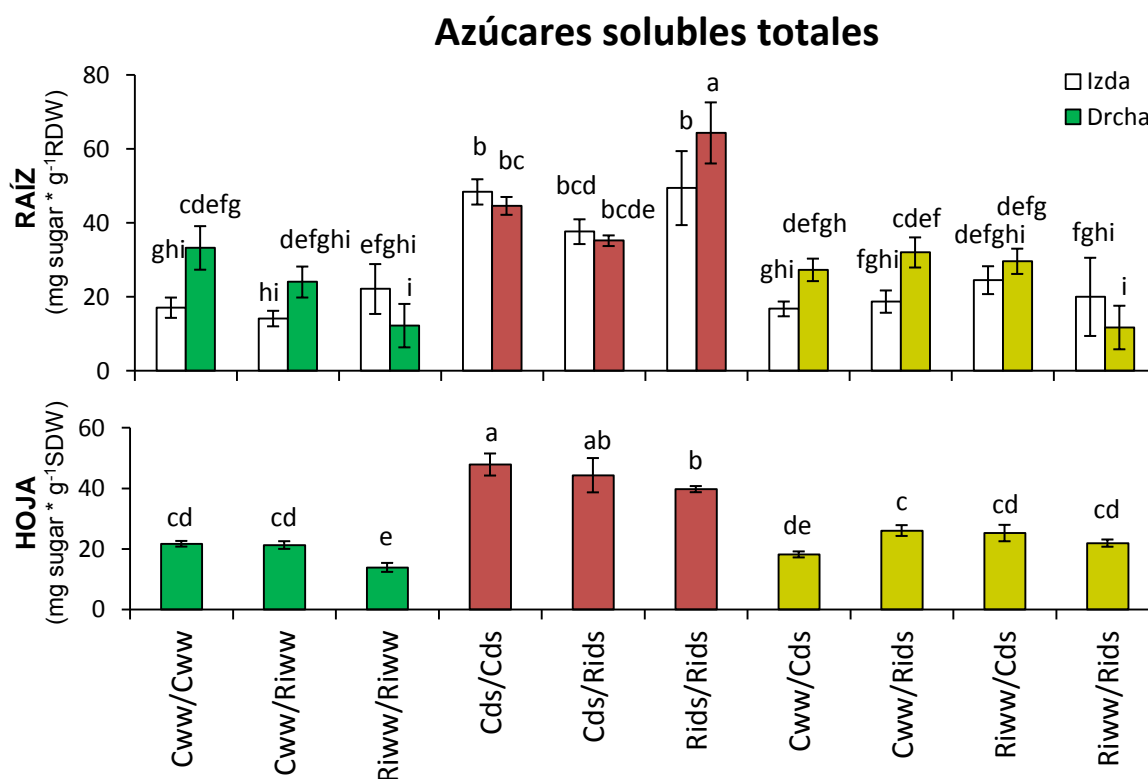
En condiciones de sequía total, todas las PIPs en hojas se vieron incrementadas con la micorrización parcial, siendo este aumento significativo en los casos de PIPs1 y P<sub>285</sub>. Sin embargo, cuando la micorrización afectó a ambos compartimentos, estas proteínas recuperaron niveles similares a las plantas no MA (Fig 1.2 y 1.4).

#### **1.4.4. Acumulación de osmolitos (prolina y azúcares solubles) en plantas de maíz.**

En condiciones óptimas de riego no se observaron diferencias significativas en la acumulación de prolina en las raíces, mientras que en hojas las plantas no micorrizadas acumularon un 20% más de prolina que las micorrizadas (Fig. 1.6). Cuando la sequía afectó a un solo compartimento radical, las raíces sometidas a sequía acumularon prolina, mientras que la raíz del compartimento en condiciones óptimas mantuvo niveles basales de la misma. Este efecto fue similar tanto si el compartimento sometido a sequía contenía raíces micorrizadas como si no. Estas plantas sin embargo, no acumularon mayor cantidad de prolina en hojas, puesto que la parte aérea no estaba sufriendo una sequía fisiológica al poder obtener suficiente agua del compartimento radical hidratado. Sin embargo, cuando ambos compartimentos radicales se vieron sometidos a sequía, el efecto de acumulación fue mucho mayor en las plantas MA, incluso cuando un compartimento permaneció sin micorrizar. Las plantas MA alcanzaron los máximos valores de acumulación de prolina tanto en raíces como en hojas, donde aumentó más de un 45%. No se produjo acumulación de prolina en raíces de plantas no micorrizadas sometidas a estrés y en hojas se incrementó sólo en un 20% respecto a las plantas cultivadas en condiciones óptimas (Fig. 1.6).



**Figura 1.6.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre la acumulación de prolina en raíces y hojas de plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=5). Ver la leyenda de la Figura 1.1 para más detalles.



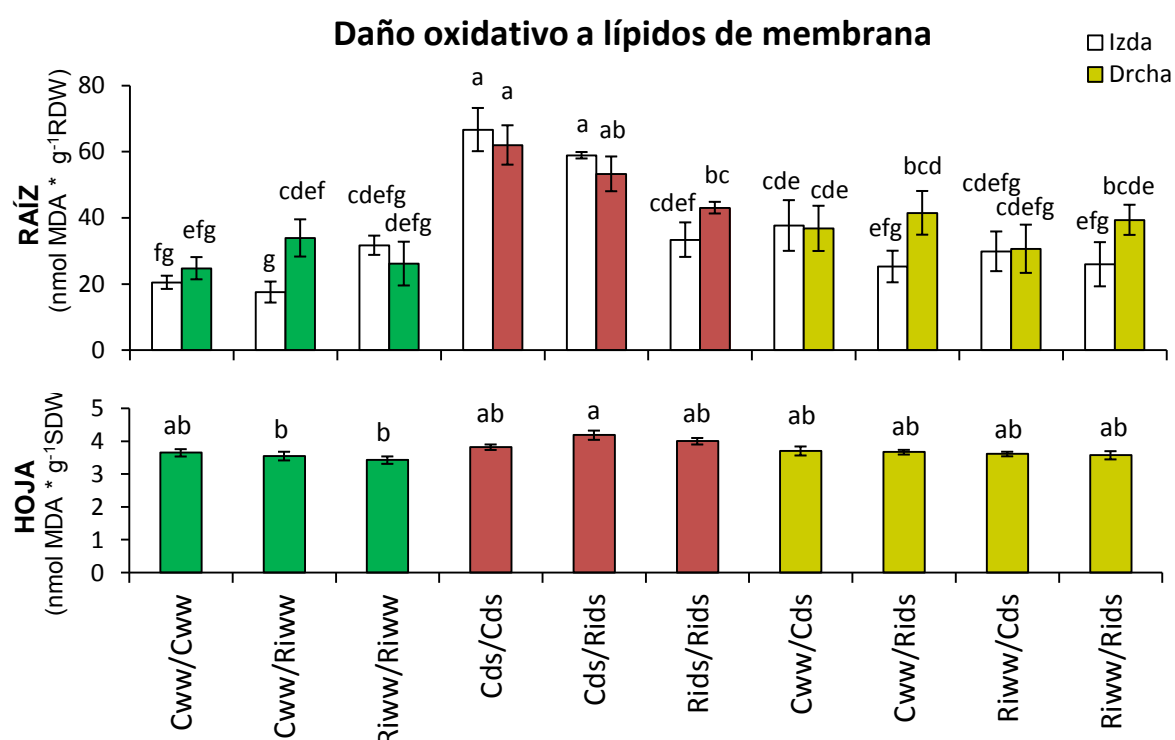
**Figura 1.7.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre la acumulación de azúcares solubles totales en raíces y hojas de plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=5). Ver la leyenda de la Figura 1.1 para más detalles.

Los azúcares solubles totales se acumularon más en todas las plantas sometidas a sequía tanto a nivel de raíces como de parte aérea. En raíces, el aumento de azúcares solubles en plantas no micorrizadas o parcialmente micorrizadas sometidas a sequía fue del 45% y 47% respectivamente, mientras en las plantas micorrizadas en ambos compartimentos el aumento fue de hasta un 70%.

En hojas, la acumulación de azúcares solubles también fue similar entre las plantas no MA y las parcialmente micorrizadas, mientras que las plantas totalmente micorrizadas presentaron una acumulación de azúcares solubles algo menor, pero también significativa respecto a su control en condiciones óptimas (Fig. 1.7).

#### 1.4.5. Daño oxidativo a lípidos en plantas de maíz.

El daño oxidativo producido por la sequía lo cuantificamos como daño oxidativo a lípidos de membrana (DOL), mediante acumulación de malondialdehído (MDA). El primer resultado llamativo fue que el DOL producido por la sequía aplicada afectó exclusivamente a las raíces del maíz, no habiendo diferencias significativas a nivel de parte aérea (Fig. 1.8). En condiciones de riego óptimo, no hubo diferencias significativas entre plantas MA y no MA.



**Figura 1.8.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre el daño oxidativo a lípidos de membrana (DOL) en raíces y hojas de plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=4). Ver la leyenda de la Figura 1.1 para más detalles.

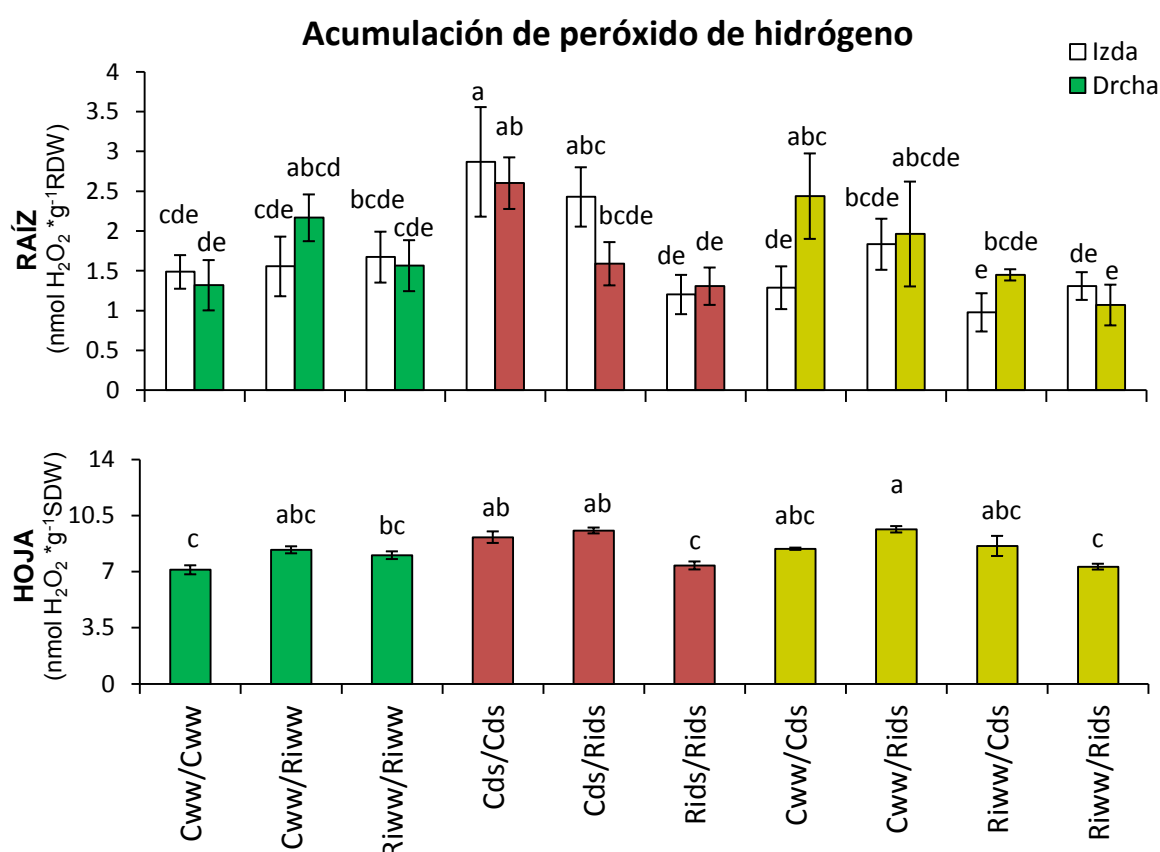
Como era de esperar, la sequía produjo un incremento del DOL en las raíces. Este aumento fue mayor en las raíces no micorrizadas, donde el daño oxidativo se incrementó en un 64%, mientras que en plantas micorrizadas el aumento fue algo menor, siendo del 54% en plantas con un solo



compartimento micorrizado y de sólo un 24% en plantas totalmente micorrizadas, donde además, el aumento no era estadísticamente significativo respecto a las plantas mantenidas en condiciones óptimas de riego.

Cuando sólo uno de los compartimentos estaba sometido a sequía, si esta sequía afectaba a las raíces no micorrizadas el nivel de DOL fue igual en ambos compartimentos radicales. En las plantas micorrizadas observamos un comportamiento ligeramente distinto que apunta a un efecto local, ya que si la sequía afectaba sólo al compartimento micorrizado, el incremento del DOL quedaba restringido exclusivamente a ese compartimento, aunque no existían diferencias significativas respecto a las plantas en condiciones óptimas de riego.

#### 1.4.6. Acumulación de peróxido de hidrógeno en plantas de maíz.



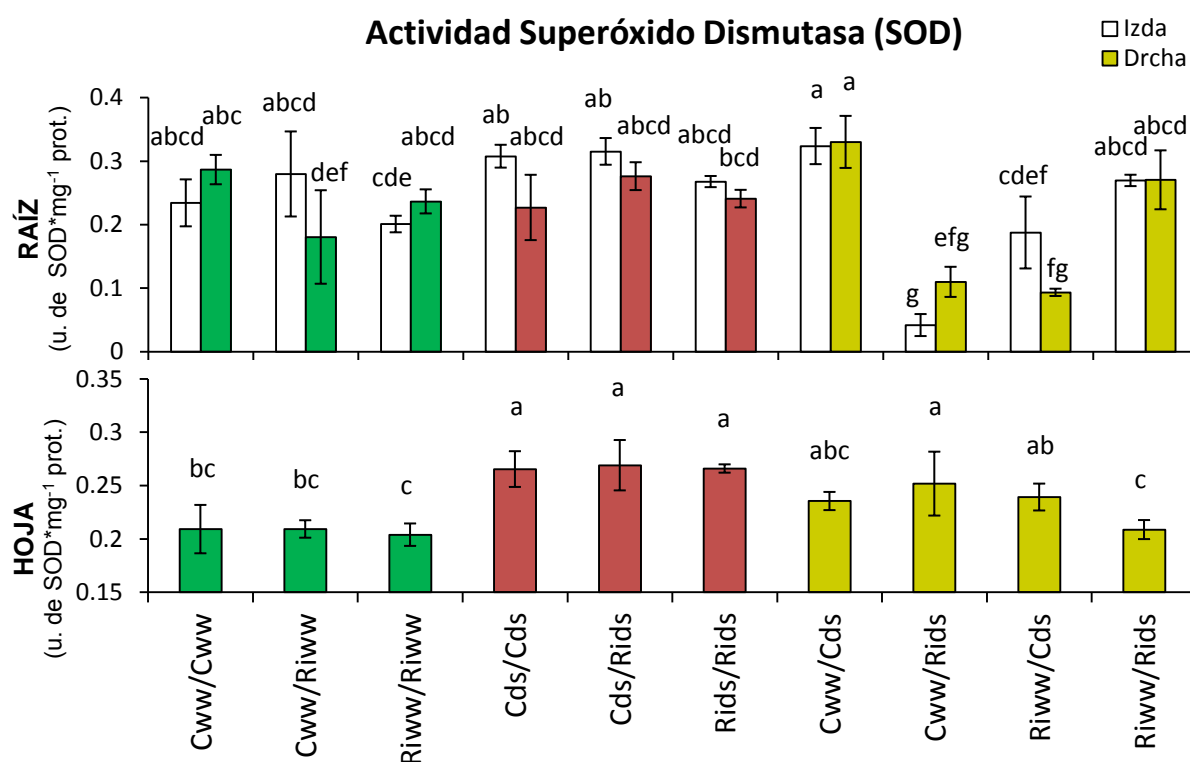
**Figura 1.9.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre la acumulación de peróxido de hidrógeno en raíces y hojas de plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=4). Ver la leyenda de la Figura 1.1 para más detalles.

Los niveles de peróxido de hidrógeno de las plantas con riego óptimo fueron similares entre las plantas micorrizadas y las no micorrizadas, tanto en raíces como en hojas (Fig. 1.9). En raíces, sometidas a sequía en ambos compartimentos, la acumulación de peróxido de hidrógeno afectó sólo a las partes no micorrizadas de las plantas sometidas a estrés, donde se produjo un aumento en

promedio del 49%, manteniéndose las zonas micorrizadas en niveles similares o incluso inferiores al de las plantas en condiciones óptimas de riego.

En las raíces sometidas a sequía en sólo uno de los compartimentos, se observaron diferencias en función de si el compartimento bien hidratado era o no el micorrizado. Así, en aquellas plantas donde el compartimento bien hidratado no estaba micorrizado, los niveles de peróxido se incrementaron en el compartimento sometido a estrés cuando éste no estaba micorrizado (Cww/Cds). Por el contrario, cuando el compartimento micorrizado estuvo bien hidratado, los niveles de peróxido se mantuvieron muy bajos en toda la raíz (Riww/Cds y Riww/Rids). Aunque las variaciones en el contenido en  $H_2O_2$  en la parte aérea fueron pequeñas, las plantas totalmente micorrizadas presentaron los niveles más bajos de este compuesto en condiciones de estrés hídrico (Fig 1.9).

#### 1.4.7. Actividades enzimáticas y compuestos antioxidantes en plantas de maíz.



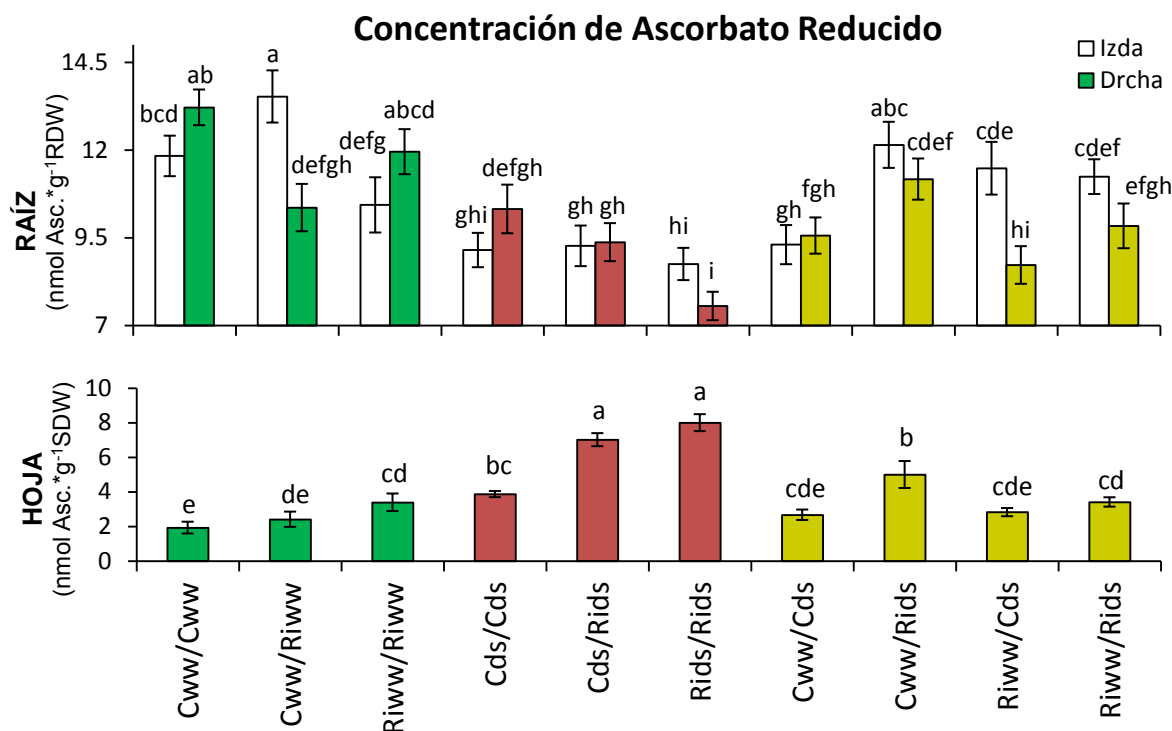
**Figura 1.10.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre la actividad superóxido dismutasa (SOD) en raíces y hojas de plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=6). Ver la leyenda de la Figura 1.1 para más detalles.

La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza el primer paso en la eliminación de ROS transformando el radical  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ . Las variaciones en su actividad apenas sufrieron cambios significativos en raíces, salvo en las plantas sometidas a sequía parcial donde se encontraron valores altos en las plantas no MA (Cww/Cds). Por el contrario, el tratamiento Cww/Rids presentó

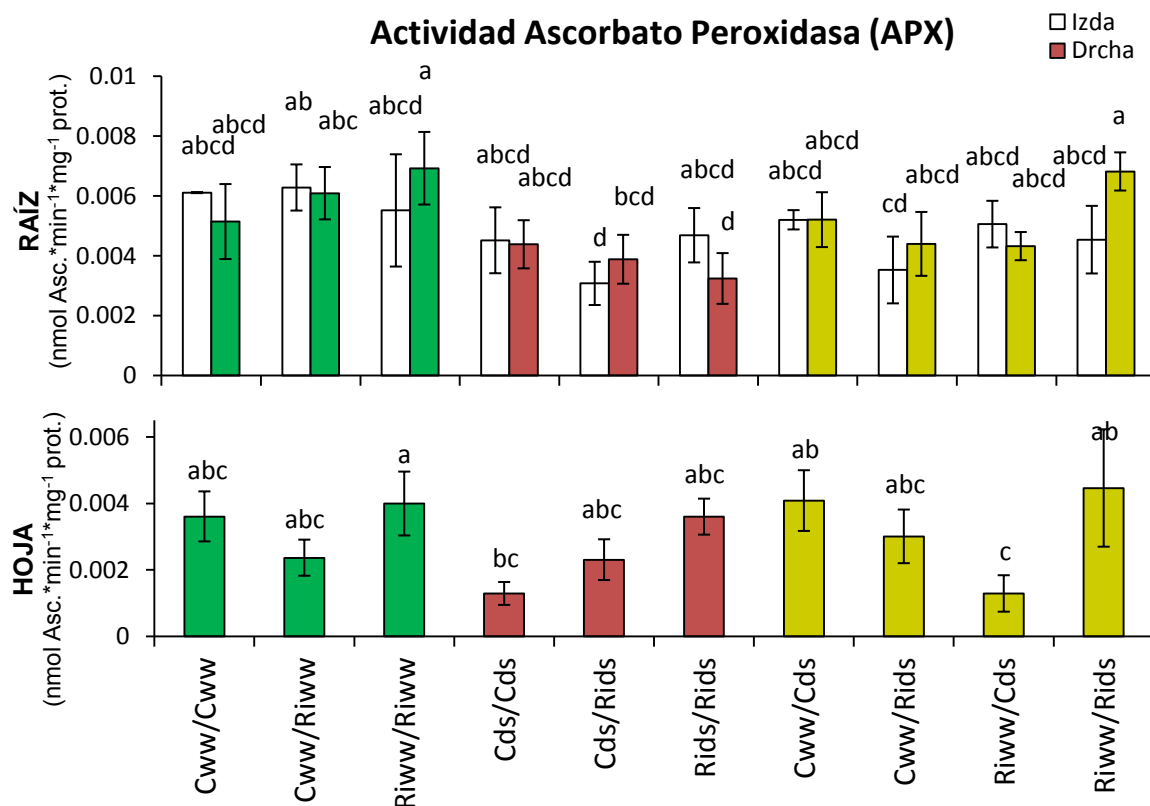
los niveles más bajos de actividad SOD (Fig. 1.10). En parte aérea, la sequía parcial o total aumentó la actividad SOD en todos los casos salvo en plantas Riww/Rids, que no se vieron afectadas por el estrés aplicado sólo a uno de los compartimentos, comportándose como las plantas control (Fig. 1.10).

El ascorbato reducido es el sustrato que utiliza la enzima ascorbato peroxidasa (APX) para la reducción de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ . El ascorbato reducido fue muy abundante en las zonas no micorrizadas de las raíces cultivadas en condiciones óptimas, con unos niveles basales hasta un 20% superiores que en las zonas micorrizadas (Fig. 1.11). Cuando las plantas se sometieron a sequía en ambos compartimentos se produjo una reducción del ascorbato reducido en sus raíces de entre un 21% en raíces micorrizadas y un 25% en raíces sin micorrizar, mientras la actividad de la APX apenas sufrió variaciones significativas entre las plantas micorrizadas y las no micorrizadas (Fig. 1.12). El mismo efecto de reducción de ascorbato lo encontramos en raíces no micorrizadas parcialmente sometidas a sequía (Cww/Cds), donde la reducción fue próxima al 25% (Fig. 1.11). En contraste, en las plantas del tratamiento Riww/Cds, donde el aporte de agua del compartimento hidratado estaba mediado por la micorrización, la disminución de ascorbato reducido ocurrió sólo de manera local en el compartimento sometido a sequía, donde disminuyó hasta un 32%. Cuando la sequía afectó al compartimento micorrizado, los niveles de ascorbato se mantuvieron similares a las plantas bien regadas (Fig. 1.11).

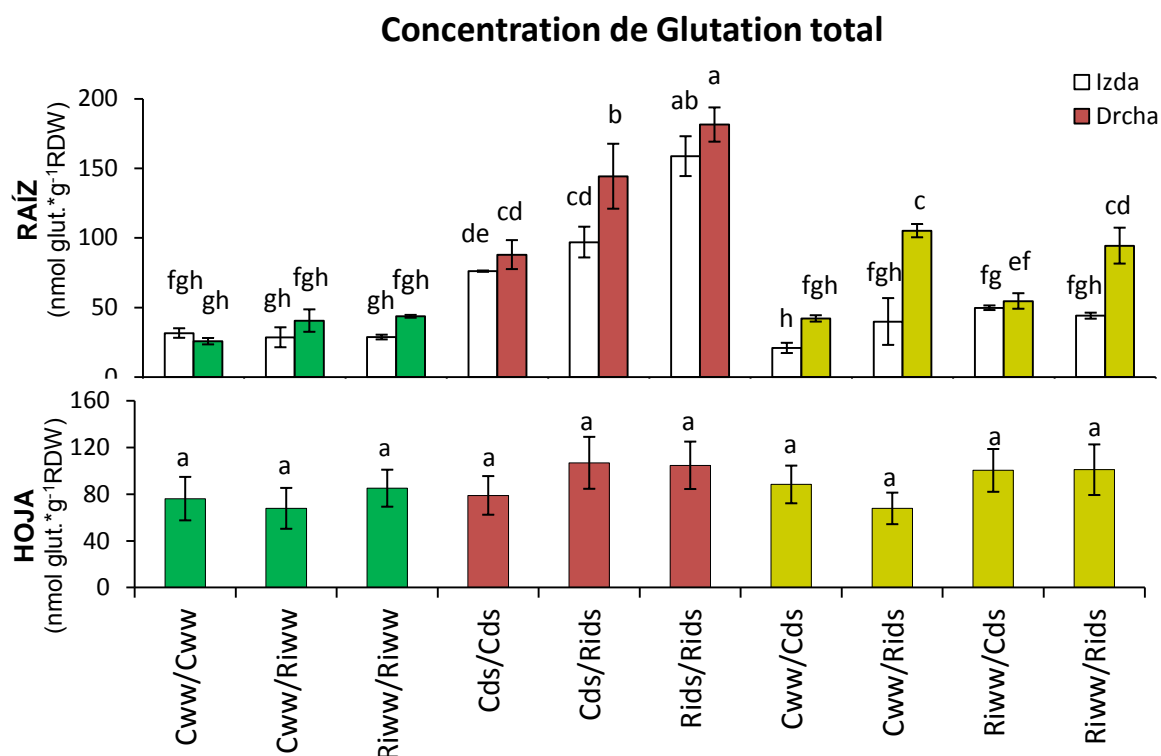
En hojas, sin embargo, encontramos un comportamiento totalmente distinto. Los niveles de ascorbato reducido en hojas fueron generalmente bajos en condiciones óptimas de riego, siendo mayores cuanto mayor era el porcentaje de micorrización de sus raíces, llegando a ser 43% mayor en plantas con micorrización en ambos compartimentos (Fig. 1.11). En condiciones de estrés hídrico los niveles de ascorbato reducido aumentaron, alcanzando los valores más altos en hojas de plantas micorrizadas sometidas a sequía en ambos compartimentos. En estas plantas, el incremento de la acumulación de ascorbato reducido fue de un 65% en plantas parcialmente micorrizadas y de un 57% en plantas totalmente micorrizadas respecto a las respectivas plantas en condiciones óptimas y a pesar de mantener una actividad de la APX elevada en ambos casos (Fig. 1.12). Por el contrario, en las plantas no micorrizadas, el aumento fue de sólo un 50%, en paralelo a una disminución de la actividad APX. Sin embargo, cuando las plantas se sometieron a sequía parcial no fisiológica, la acumulación de ascorbato en hoja sólo se vio incrementada en las plantas parcialmente micorrizadas cuando la sequía afectaba al compartimento micorrizado.



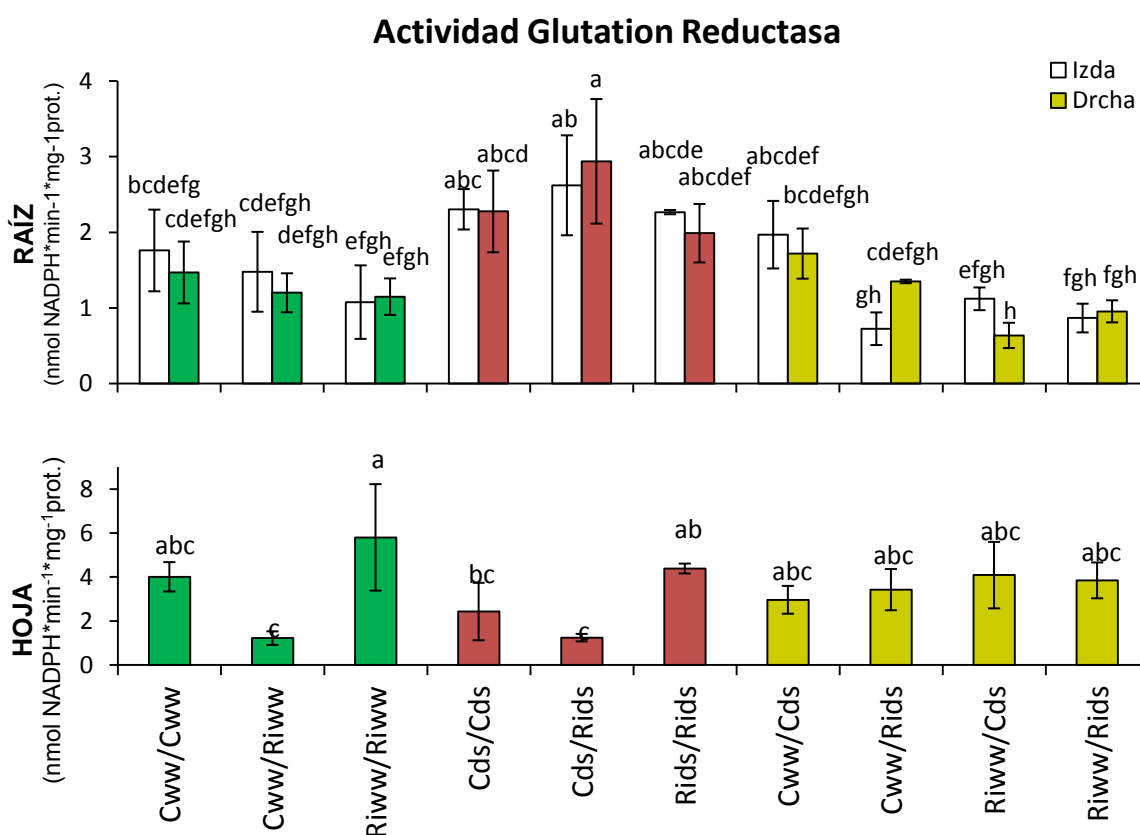
**Figura 1.11.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre la concentración de ascorbato reducido en raíces y hojas de plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=4). Ver la leyenda de la Figura 1.1 para más detalles.



**Figura 1.12.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre la actividad ascorbato peroxidasa (APX) en raíces y hojas de plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=5). Ver la leyenda de la Figura 1.1 para más detalles.



**Figura 1.13.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre la concentración de glutación total en raíces y hojas de plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=4). Ver la leyenda de la Figura 1.1 para más detalles.



**Figura 1.14.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre la actividad de glutación reductasa (GR) en raíces y hojas de plantas de maíz cultivadas con las raíces divididas en dos compartimentos. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=5). Ver la leyenda de la Figura 1.1 para más detalles.

El glutatión es la molécula que se utiliza para regenerar la forma reducida de ascorbato desde el dehidroascorbato, gracias a la actividad de la GR en el ciclo del ascorbato-glutatión. En las raíces, el contenido total de glutatión disponible fue bajo en las plantas cultivadas en condiciones óptimas (ww), independientemente de la micorrización (Fig. 1.13), pero aumentó con la sequía cuando ésta afectó a ambos compartimentos, siendo en promedio un 53% mayor en los compartimentos micorrizados que en los no micorrizados. La actividad de la glutatión reductasa también mostró ligeros aumentos en condiciones de sequía aplicada a los 2 compartimentos, pero este aumento sólo fue significativo cuando la planta tenía un compartimento micorrizado y otro no, en cuyo caso el aumento de la actividad fue más alto (Fig. 1.14). Cuando la sequía afectó a un solo compartimento, el contenido en glutatión de las raíces aumentó de manera local y sólo si éste compartimento estaba micorrizado (Cww/Rids y Riww/Rids), siendo el aumento de aproximadamente el 53% y 62% respectivamente respecto al compartimento bien hidratado (Fig. 1.13). Por el contrario, la actividad GR no aumentó en estos tratamientos (Fig. 1.14). No hubo cambios significativos en el glutatión total a nivel de hojas (Fig. 1.13).

## 1.5. DISCUSIÓN

### Estatus hídrico y osmoregulación

Las plantas en la naturaleza están constantemente sometidas a presiones medioambientales, siendo la sequía el estrés abiótico más común (Bray, 2004). La sequía produce cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan negativamente al crecimiento y desarrollo de las plantas (Wang et al., 2001), de manera que casi todos los procesos de la planta se ven afectados directa o indirectamente por la falta de agua (Akinci y Losel, 2012). La sequía lleva consigo la deshidratación de los tejidos debido a la descompensación entre el agua tomada por la raíz y la transpirada por las hojas (Aroca et al., 2001). Por todo ello, muchas de las adaptaciones fisiológicas de las plantas al estrés hídrico están encaminadas al control de la tasa de transpiración, generalmente mediante el control estomático (Akinci and Losel, 2012), de la conductancia hidráulica de sus raíces (Aroca et al. 2012) y del ajuste osmótico, que, en conjunto, permiten el mantenimiento de la turgencia celular y una fisiología adecuada para continuar con los procesos de crecimiento y desarrollo de la planta (Nayyar y Gupta, 2006). En este sentido, las plantas micorrizadas han demostrado en este estudio una mejor respuesta fisiológica a la sequía que las no micorrizadas.

Las plantas micorrizadas presentaron un mayor  $\Psi$  en hojas que las no micorrizadas en condiciones óptimas de riego, lo que sugiere un mejor aprovechamiento del agua disponible en el suelo que permite mantener una turgencia celular más elevada. Además, cuando las plantas de maíz se sometieron a sequía en uno sólo de los compartimentos radicales, encontramos diferencias significativas en el potencial hídrico foliar entre plantas MA y no MA, siendo más elevado en las

plantas MA. Este hecho sugiere que cuando las plantas sin micorrizar perciben el comienzo de la sequía en algunas zonas del suelo comienzan el proceso de disminución del potencial hídrico, ya que su capacidad para absorber agua se reduce, mientras que las plantas micorrizadas mantienen la capacidad de aportar agua durante más tiempo y con ella mantienen el potencial hídrico. Sin embargo, cuando la sequía fue más severa y afectó a toda la raíz, la eficiencia de la micorrización en la absorción de agua también alcanzó un límite y las plantas MA comenzaron a percibir los efectos del estrés, disminuyendo también el potencial hídrico foliar.

Un estricto control en el transporte de agua de las plantas puede ser fundamental para la supervivencia en condiciones de estrés hídrico. Es bien sabido que la sequía disminuye la conductancia hidráulica de las plantas (Aroca et al., 2012), proceso en el que las PIPs juegan un papel fundamental (Javot y Maurel, 2002; Katsuhara et al., 2008). Los mecanismos concretos por los que las plantas micorrizadas consiguen una mayor tolerancia a la sequía en plantas micorrizadas varían mucho en función de las especies de hongo y planta implicados en la simbiosis (Marulanda et al., 2003; Porcel et al., 2006). Los hongos MA pueden afectar a la conductancia hidráulica de las plantas a través del control de las acuaporinas (Aroca et al., 2007, 2008b) y de hecho, éste se ha considerado como un factor clave en el control de agua en plantas micorrizadas (Marjanovic et al., 2005; Lee et al., 2010).

Cuando analizamos el contenido en PIPs en las membranas de las raíces de plantas sometidas a condiciones óptimas de riego, observamos una disminución de las mismas con la micorrización que, sin embargo, no impidió que se mantuviera un potencial hídrico en las hojas de estas plantas mayor que el de las plantas no MA. Esto parece indicar que estas plantas son capaces de regular la turgencia celular de manera más eficaz que las plantas no MA al ejercer un mejor control de la conmutación entre las vías de transporte célula a célula y apoplástica (Morillon y Chrispeels, 2001).

Cuando aplicamos a las plantas un estrés hídrico fisiológico, observamos que los niveles de PIPs bajaron en los compartimentos no MA (Fig. 2). Esto ha sido interpretado como un mecanismo para tratar de preservar la mayor cantidad de agua posible en sus células una vez que se produce el estrés (Yamada et al., 1997; Johansson et al., 1998; Smart et al., 2001). Sin embargo, los niveles de PIPs se mantuvieron bajos en las raíces que estaban micorrizadas, manteniendo el mismo nivel que en condiciones óptimas. Esto sugiere que un menor contenido de PIPs cuando las plantas crecen en condiciones óptimas de riego puede ser a su vez una ventaja cuando las condiciones ambientales cambian, ya que la planta está intrínsecamente preparada para la conservación de agua, mejorando la eficiencia en el uso del agua (Hanba et al., 2004; Sade et al., 2010; Belko et al., 2012a y b).

Por otro lado, los efectos de la micorrización parcial sobre la acumulación de PIPs2 fosforiladas y PIPs1 en los compartimentos bien hidratados cuando el otro compartimento estaba sometido a sequía, sugieren que las plantas micorrizadas ajustan su contenido de acuaporinas de

manera local en función del grado de micorrización e intensidad del estrés. Este aumento mejoraría el movimiento del agua vía célula a célula en las raíces que aún tienen un mayor acceso a la misma, consiguiendo así mantener el potencial hídrico foliar. Concretamente observamos que si el compartimento con acceso a agua era el micorrizado, aumentaba la fosforilación de las PIPs2 presentes en sus membranas, mientras que si el compartimento micorrizado era el sujeto a sequía, aumentaba más la acumulación de PIPs1. Quizás la explicación más directa sea la existencia de un mecanismo de señalización a nivel de toda la planta como el que proveen las hormonas. Mediante este sistema, la planta estimularía la acumulación de agua cuando comienza a detectar sequía en algunas zonas del suelo, especialmente cuando la colonización micorrízica es baja, ya que en este caso el acceso a agua puede estar más limitado que en plantas totalmente micorrizadas. Por otro lado, se ha sugerido que podría existir un mecanismo de compensación de las acuaporinas propias del hongo MA que aumentarían el transporte de agua en estas raíces secas pese a la reducción del transporte de agua a través de las acuaporinas propias de la planta (Aroca et al., 2009). En cualquier caso, los datos aquí presentados nos muestran que existe un claro efecto local de la micorrización sobre la acumulación de acuaporinas.

Es bien sabido que cuando los suelos comienzan a secarse su potencial hídrico disminuye, por lo que el gradiente de potencial respecto a las plantas también disminuye y con ello el flujo de agua hacia las mismas. Las plantas sometidas a sequía tienden por ello a disminuir el potencial hídrico de sus tejidos con el objetivo de mantener un gradiente favorable a la entrada de agua y lo consiguen gracias a la acumulación de osmolitos en un proceso conocido como ajuste osmótico (Antolín y Sanchez-Díaz, 1992; Flowers y Colmer, 2008). La acumulación de prolina y azúcares solubles ha sido interpretada como un mecanismo de tolerancia destinado a proteger las células de los efectos de la deshidratación gracias a su función osmoreguladora (entre otras muchas funciones), ya que consigue disminuir el potencial de solutos ( $\Psi_s$ ) favoreciendo la entrada de agua hacia las células. En este estudio, un menor potencial hídrico en hojas concuerda con un mayor contenido en prolina y azúcares solubles en las mismas, tanto en condiciones de riego óptimo como en condiciones de sequía e independientemente de la micorrización.

En condiciones óptimas de riego se encontraron diferencias entre las hojas de plantas no micorrizadas, que acumularon más prolina y azúcares y tuvieron menor potencial hídrico, y las hojas de plantas micorrizadas, lo que parece indicar que las plantas no micorrizadas tienen una sensibilidad mayor a los cambios y requieren por ello un control más fino del contenido en osmolitos incluso en condiciones hídricas favorables.

La acumulación de azúcares solubles en condiciones de sequía mostró tener un efecto sistémico, afectando a ambos compartimentos de la raíz y a la parte aérea. En cualquier caso, la acumulación de azúcares solubles en hojas de plantas micorrizadas fue menor que en las no micorrizadas. Este efecto ha sido descrito en diversos estudios que apuntan a un mayor



metabolismo en las plantas MA (Subramanian y Charest, 1995; Subramanian et al., 1997). De hecho, concuerda con los datos fisiológicos de potencial hídrico foliar, conductancia estomática y eficiencia del PSII, que apuntan a que las plantas MA mantienen durante más tiempo los procesos de desarrollo y crecimiento, siendo este efecto mayor cuanto mayor es el grado de micorrización de la planta.

La acumulación de prolina y azúcares en las raíces sometidas a sequía se ha interpretado como un mecanismo para conseguir mantener el flujo de entrada de agua cuando el potencial hídrico del suelo disminuye (Porcel et al., 2004). En este sentido, las raíces de las plantas micorrizadas presentaron mayor acumulación de azúcares y prolina cuando ambos compartimentos estaban sujetos a sequía, lo que sugiere una capacidad de ajuste osmótico mayor que en las raíces de plantas no MA bajo estas condiciones.

Por último, el presente estudio revela que la acumulación de prolina en raíces, a diferencia de la acumulación de azúcares solubles, funciona a nivel local, lo que podría explicar los resultados contradictorios encontrados hasta la fecha. La acumulación de prolina en las raíces sometidas a sequía sería un mecanismo que funcionaría a nivel local para conseguir mantener el flujo de entrada de agua en estas raíces sometidas a sequía, independientemente de la micorrización. Sin embargo, la elevada acumulación de este compuesto en raíces y hojas de plantas micorrizadas sometidas a sequía completa sugiere que la limitación total de agua genera en las plantas micorrizadas la acumulación de prolina, afectando a toda la planta. La acumulación de prolina y otros aminoácidos en plantas MA les proporciona una mayor capacidad de ajuste osmótico ante un potencial hídrico del suelo similar (Ruiz-Lozano et al., 1995; Azcón et al., 1996; Talaat y Shawky, 2011). Así pues, podemos concluir que, cuando la sequía afecta solo a ciertas zonas del suelo, la acumulación de prolina tiene un efecto local, funcionando por igual en plantas micorrizadas y no micorrizadas, pero cuando el estrés se acentúa tiene un efecto sistémico en plantas MA, afectando y protegiendo a toda la planta de los efectos de la deshidratación gracias a su mayor capacidad de osmoregulación, mediante una mayor acumulación de este soluto compatible.

Curiosamente, las plantas no micorrizadas sometidas a sequía parcial (Cww/Cds) no presentaron una elevada concentración ni de prolina ni de azúcares solubles en hojas, a pesar de presentar un potencial hídrico foliar bajo y conductancia estomática más baja que las plantas control, por lo que es de suponer que algún otro mecanismo de defensa frente al estrés esté actuando en estas plantas en respuesta a una sequía parcial de sus raíces. Esto pudiera deberse a la emisión de señales hormonales desencadenadas en el compartimento radical sometido a sequía (Dubos y Plomion, 2003; Porcel y Ruiz-Lozano, 2004).

El potencial hídrico foliar y la conductancia estomática suelen ser parámetros muy relacionados, ya que una menor turgencia celular influye en el cierre estomático (Kramer y Boyer, 1995). En este sentido, las plantas cultivadas en condiciones óptimas y plenamente micorrizadas

mantuvieron una mayor conductancia estomática y un mayor potencial hídrico foliar. Por otro lado, el hecho de que las plantas sometidas a sequía parcial variasen su conductancia estomática en función de si la sequía afectaba o no al compartimento micorrizado sugiere dos cosas: 1) la sequía afecta menos a las raíces de la planta que están micorrizadas y 2) Las plantas en las que las raíces micorrizadas tienen suficiente acceso a agua no son tan sensibles al estrés como aquellas en las que el aporte de agua depende exclusivamente de las raíces no micorrizadas.

Por último, y dadas las diferencias en conductancia estomática entre las plantas control y parcialmente micorrizadas y las plantas totalmente micorrizadas, parece que el aporte de agua necesario para mantener una elevada tasa de transpiración es mayor cuanto mayor es el porcentaje de micorrización de las raíces de maíz. Esto es así tanto en condiciones óptimas como de sequía, de manera que las plantas micorrizadas no sólo mantuvieron el potencial hídrico foliar sino también la conductancia estomática durante más tiempo que las no MA en valores más elevados (Hajiboland et al., 2010). Este efecto de la micorrización en condiciones de estrés hídrico se ha asociado a las diferencias en el nivel umbral al que se produce el cierre estomático, que suele producirse a niveles más bajos de potencial hídrico en plantas MA que en plantas no MA bajo las mismas condiciones de estrés (Allen y Boosalis 1983; Augé et al. 1986). Ello se consigue gracias a la mayor absorción de agua por parte de los hongos MA (Subramanian et al. 1995, 1997; Khalvati et al., 2005), alargando así el periodo de mantenimiento de la transpiración y con ella el crecimiento de la planta (Ruiz-Lozano et al., 1995). Puesto que las plantas micorrizadas consiguieron mantener una elevada transpiración tanto en condiciones óptimas como en estrés hídrico pese a un menor contenido en PIPs, parece que la vía apoplástica puede estar jugando un papel fundamental en el aporte de agua en las plantas MA, ya que la vía célula a célula debe estar muy reducida en estas plantas.

El mantenimiento de una elevada conductancia estomática permite una mayor captación de CO<sub>2</sub>, necesario para llevar a cabo la fotosíntesis (Allen et al. 1981; Davies et al. 1993; Sheng et al., 2008). De hecho, en este estudio es evidente que una de las mayores ventajas de las plantas micorrizadas frente a las no micorrizadas fue el mantenimiento de la eficiencia fotosintética tanto en condiciones óptimas como durante los periodos de sequía, independientemente del grado de micorrización. Cuando la sequía se aplicó a ambos compartimentos, las plantas micorrizadas sometidas a estrés mantuvieron el 100% de su eficiencia fotosintética respecto a las plantas con buen acceso a agua a pesar de una reducida conductancia estomática y de un bajo potencial hídrico de las hojas, lo que nos indica que los beneficios de la simbiosis van más allá del simple aporte de agua.

Las PIPs en hojas pueden estar desempeñando un papel crucial en el control del cierre y apertura estomáticos (Uehlein et al., 2003) y en la conductancia del mesófilo (Flexas et al., 2006; López et al., 2013), controlando tanto el transporte de agua como de CO<sub>2</sub>, necesarios para la fotosíntesis (Katsuhara et al., 2008; Flexas et al., 2012). En plantas no MA sometidas a sequía

parcial o total no observamos variaciones del contenido en PIPs en las hojas. Las plantas MA, por el contrario, mostraron una regulación mucho más fina del contenido de estas acuaporinas en hojas. Es bien sabido que la micorrización estimula la actividad fotosintética de las plantas llevando a cabo lo que se conoce como “compensación fotosintética” (Jakobsen, 1995; Fester et al., 2005). Así pues, no es de extrañar que la micorrización genere cambios en el contenido y actividad de las acuaporinas en las hojas. En este sentido, es especialmente interesantes el caso de las PIPs1, ya que se ha sugerido que su contenido en hojas está directamente relacionado con el transporte de CO<sub>2</sub> (Otto et al., 2010). Observamos que existe un mayor contenido en PIPs1 en plantas parcial o totalmente micorrizadas en condiciones óptimas de riego y de sequía parcial no fisiológica, coincidiendo con una elevada transpiración y eficiencia del PSII. Esto apoya la idea de que en condiciones de suficiente acceso a agua, las plantas micorrizadas mantienen un mayor transporte de CO<sub>2</sub> necesario para mantener unos elevados niveles fotosintéticos. Por otro lado, el aumento de PIPs en condiciones de sequía parcial en hojas de plantas MA apunta de nuevo a un sistema de señalización que favorece el incremento del transporte cuando la sequía comienza a afectar al suelo, especialmente cuando ésta afecta a las raíces micorrizadas y mayor aún si hay una colonización completa de las raíces por el hongo MA. En estas plantas, el elevado contenido en PIPs coincidió con los valores más altos de eficiencia fotosintética, lo que sugiere que la acumulación de PIPs en las hojas y la eficiencia del sistema fotosintético pueden estar fuertemente relacionadas.

En plantas sometidas a sequía total, la micorrización parcial de la raíz generó el aumento de las PIPs en las hojas, especialmente PIPs2 fosforiladas en la S<sub>285</sub> y PIPs1 que, sin embargo, se mantuvieron bajas cuando la micorrización de la raíz era total. Estas plantas presentaron una eficiencia del PSII similar a las plantas totalmente micorrizadas pero no mantuvieron los mismos niveles de transpiración, lo que sugiere que un aumento de la conductividad del mesófilo es necesario para incrementar el movimiento del agua y CO<sub>2</sub> y conseguir así mantener la integridad y funcionamiento del sistema fotosintético en estas plantas. De hecho, Morillón y Chrispeels (2001) observaron que una disminución de la transpiración aumentaba la permeabilidad al agua de las células del mesófilo, relacionándose directamente con un aumento de la actividad de las acuaporinas.

### Defensa antioxidante

Las plantas sometidas a estrés hídrico presentan un aumento en la acumulación de ROS, que generan un estrés oxidativo secundario en sus tejidos (Kramer y Boyer, 1995; Miller et al., 2010), que puede detectarse por el estudio del daño oxidativo a lípidos de membrana (DOL). El peróxido de hidrógeno es una de las ROS más abundantes ya que tiene una vida media relativamente larga en comparación con otras ROS. El peróxido de hidrógeno puede funcionar como señal molecular

de estrés que a bajas concentraciones es capaz de activar las respuestas de la planta al mismo, mientras a altas concentraciones resulta igualmente perjudicial (Quan et al., 2008).

Se ha visto que las plantas micorrizadas presentan menor DOL en condiciones de estrés hídrico que las plantas no MA (Ruiz-Lozano et al., 2001; Porcel et al., 2004). De hecho, los niveles de DOL no aumentaron en las plantas micorrizadas sometidas a sequía y el aumento en las plantas parcialmente micorrizadas fue (en porcentaje) menor que en las plantas no micorrizadas, lo que indica que los mecanismos antioxidantes actúan más eficientemente cuando existe micorrización, evitando el incremento de los daños causados por la acumulación de ROS en condiciones de estrés hídrico. De hecho, los resultados obtenidos en este estudio muestran que las zonas micorrizadas de la raíz acumulan menos peróxido de hidrógeno a nivel local en respuesta al estrés hídrico, lo que nos indica de nuevo que las raíces micorrizadas tienen una menor sensibilidad al estrés o un sistema antioxidante más eficiente (Talaat y Shawky, 2011).

Para comprobar si efectivamente las raíces micorrizadas sometidas a sequía poseían mejores mecanismos antioxidantes, procedimos al análisis de algunos de los compuestos y de la actividad de algunas enzimas implicadas en la respuesta antioxidante de la planta.

Los resultados de ascorbato reducido sugieren que, bajo condiciones de sequía, este compuesto está siendo utilizado por las plantas para llevar a cabo el proceso de eliminación del  $H_2O_2$ . En raíces micorrizadas, esta reducción es suficiente para mantener unos niveles de peróxido bajos, como se ha encontrado en otros estudios (Ruiz-Sánchez et al., 2010), mientras que en las raíces no micorrizadas continuó la acumulación de  $H_2O_2$  a nivel local a pesar de una mayor actividad de la APX, generándose un mayor DOL que en las plantas plenamente micorrizadas.

Las plantas no micorrizadas sometidas a sequía parcial mostraron el mismo comportamiento que las sometidas a sequía total en muchos de los componentes del sistema antioxidante analizados, y además, la acumulación de  $H_2O_2$  fue muy elevada en el compartimento radical sometido a sequía de estas plantas, lo que de nuevo sugiere que las raíces no micorrizadas sufren los efectos del estrés con mayor intensidad que las raíces micorrizadas. De hecho, cuando la sequía fue parcial, la actividad SOD presentó variaciones fuertes en función de los tratamientos de micorrización. En concreto, la actividad SOD más baja en raíces se observó en el tratamiento Cww/Rids, donde la conductancia estomática y contenido hídrico indicaban un bajo nivel de estrés en estas plantas en comparación con las del tratamiento Cww/Cds, que se mostraron más sensibles a la sequía parcial y presentaron los niveles más altos de SOD en raíces. Estos resultados parecen indicar que las raíces micorrizadas consiguen una mayor eficiencia en la obtención de agua cuando se les somete a estrés hídrico, permitiendo a la planta continuar con sus procesos normales cuando el suelo comienza a secarse, mientras que las plantas sin micorrizar encuentran más dificultades para enfrentarse al estrés hídrico desde el comienzo del mismo.

Siguiendo en este contexto, cuando la sequía parcial afectó a raíces micorrizadas, los niveles de ascorbato se mantuvieron similares a las plantas cultivadas en condiciones óptimas, manteniéndose además los niveles de peróxido y DOL bajos. Además, los compartimentos que contienen raíces micorrizadas sometidas a sequía presentaron más glutatión a nivel local y menos ascorbato reducido, reducción del peróxido de hidrógeno y compartimentación de los efectos del DOL en estas zonas de la raíz, sin perjudicar con ello los procesos fisiológicos de las plantas. Todo ello se traduce en el mantenimiento del estatus hídrico y la eficiencia fotosintética de las mismas (Garg y Manchanda, 2009).

El análisis de la actividad de las enzimas SOD, APX y GR, así como los compuestos glutatión y ascorbato reducido en hojas reveló que sólo el tratamiento micorrizado sometido a sequía parcial Riww/Rids consiguió evadir por completo el estrés hídrico en su parte aérea, manteniendo todos sus parámetros fisiológicos, así como los sistemas de protección osmóticos y antioxidantes, a niveles similares a los de las plantas cultivadas en condiciones óptimas. De hecho, cuando las raíces micorrizadas tienen acceso a agua, el efecto de la sequía parcial sobre la acumulación de peróxido en la planta es nulo y el DOL se mantiene en niveles similares a las plantas en condiciones óptimas.

Así pues, en conjunto, los sistemas antioxidantes de las plantas micorrizadas resultaron más eficaces en la reducción del peróxido de hidrógeno acumulado en caso de estrés. Estos sistemas suelen actuar a nivel local, afectando especialmente a las zonas de las raíces sometidas a estrés hídrico y siendo su regulación más eficaz en los compartimentos micorrizados. De hecho, los efectos diferenciales en el daño oxidativo encontrados entre las plantas sometidas a sequía parcial nos indican claramente que cuando la sequía afectó a los compartimentos micorrizados, el daño tuvo un efecto localizado, restringiéndose a esa zona de las raíces pero manteniéndose en niveles normales en el resto de la planta. Por el contrario, si el compartimento sometido a sequía no estaba micorrizado, el daño oxidativo afectó a toda la planta por igual, siendo menor cuando el acceso al agua disponible estaba mediado por las raíces micorrizadas. Esto nos indica que los beneficios de la micorrización no se restringen a un menor estrés oxidativo secundario sino que favorece también su compartimentación, lo que permite a la planta continuar con sus procesos normales al limitar el daño localmente.

V.                      CAPÍTULO 2



## **2. Estudio del efecto combinado de la aplicación de ABA exógeno y la simbiosis MA sobre la expresión y acumulación de acuaporinas en maíz y su implicación en las propiedades hidráulicas de la raíz en plantas sometidas a estrés hídrico.**

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

Las sequía altera las relaciones hídricas de las plantas, ya que disminuye el potencial hídrico del suelo, dificultando la absorción de agua o incluso favoreciendo la pérdida de la misma hacia el suelo (Jones, 2007). La adaptación de la planta a la sequía se consigue a través de múltiples mecanismos fisiológicos que actúan a nivel celular, tisular y de planta entera. Estos mecanismos están controlados por cambios en la expresión génica (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005; Ito et al., 2006). Una de las primeras respuestas fisiológicas al estrés hídrico es la reducción del estatus hídrico de las hojas, que acompaña habitualmente a la deshidratación del suelo. Sin embargo, actualmente sabemos que muchas de las respuestas de la planta frente al estrés hídrico pueden ocurrir en ausencia de cambios en el estatus hídrico de las hojas a través de señales químicas como el ácido abscísico (ABA) (Wilkinson y Davies, 2002). El ABA es considerada la señal más importante en la respuesta al estrés (Wilkinson y Davies, 2002; Zhang et al., 2006; Hirayama y Shinozaki, 2007), ya que regula importantes procesos relacionados con el estatus hídrico de las plantas como la conductancia hidráulica radical (L) (Aroca, 2006; Thompson et al., 2007; Vandeleur et al., 2009; Parent et al., 2009) o la tasa de transpiración (Netting, 2000; Holbrook et al., 2002; Wilkinson y Davies, 2002; Zhang et al., 2006), así como la expresión de genes que codifican enzimas y otras proteínas involucradas en la tolerancia a la deshidratación celular (Zhang et al., 2006; Hirayama y Shinozaki, 2007; Wang et al., 2010; Costa y Lobato, 2011).

Por otro lado, se ha demostrado que el ABA regula la expresión de las acuaporinas en una variedad de plantas (Zhu et al., 2005; Beaudette et al., 2007; Mahdieh and Mostajeran, 2009; Ruiz-Lozano et al., 2009). Aunque los mecanismos mediante los cuales el ABA afecta a la expresión, acumulación y funcionamiento de estas proteínas aún no han sido del todo elucidados (Aroca et al., 2011), se sabe que la respuesta de las acuaporinas y  $L_o$  a la aplicación de ABA es normalmente transitoria (Hose et al., 2000) y dependiente de su concentración (Zhu et al., 2005; Beaudette et al., 2007). Se han encontrado además elementos *cis* de respuesta a ABA en algunas acuaporinas (Mariaux et al., 1998; Siefritz et al., 2001) por lo que se sabe que existe una vía de regulación de estos genes que es dependiente de ABA y otra independiente de ABA (Jang et al., 2004). Se ha demostrado también la existencia de una regulación por fosforilación (Kline et al., 2010), por lo que parece que exista una doble regulación (transcripcional y post-traducciona) de las acuaporinas



en respuesta a ABA, mostrando así la elevada complejidad de la regulación de su actividad en respuesta a distintos estreses.

En la naturaleza, la mayor parte de las plantas establecen asociaciones simbióticas con hongos MA. Las plantas MA son normalmente más tolerantes a diversos estreses ambientales que las plantas no MA, incluyendo la sequía (Augé, 2001 y 2004; Ruiz-Lozano, 2003, Ruiz-Lozano et al., 2006). El efecto beneficioso de la simbiosis MA en condiciones de estrés ha sido ampliamente estudiado a nivel fisiológico e incluye una mejor conductancia hidráulica, un incremento en la absorción de agua (Augé, 2001 y 2004; Lehto y Zwiazek, 2011) y un mejor control de la tasa de transpiración durante los periodos de sequía (Ruiz-Lozano et al., 1995; Sánchez-Blanco et al., 2004; Aroca et al., 2007 y 2008b). También se ha comprobado que, en condiciones de estrés hídrico, las plantas MA y no MA regulan de manera diferente la expresión en raíces de muchos genes relacionados con la respuesta al estrés (Ruiz-Lozano et al., 2006) y se ha sugerido que estos cambios están causados (entre otros factores) por las diferencias en el contenido en ABA entre las plantas MA y no MA (Ruiz-Lozano et al., 2006). Entre estos genes regulados por la simbiosis MA durante periodos de estrés hídrico se encuentran los de las acuaporinas (Ouziad et al., 2006; Porcel et al., 2006; Aroca et al., 2007; Jahromi et al., 2008). La actividad de las acuaporinas se ha relacionado con el movimiento de agua tanto a nivel celular como a nivel de toda la planta (Javot y Maurel, 2002; Javot et al., 2003, Maurel et al., 2008; Postaire et al., 2010).

Así pues, la simbiosis MA modula los mismos procesos fisiológicos que el ABA mejorando la tolerancia al estrés hídrico (Augé, 2001 y 2004; Ruiz-Lozano, 2003). En estudios previos sobre el efecto combinado de ABA y simbiosis MA en la tolerancia de las plantas al estrés hídrico, nuestro grupo de investigación evaluó la influencia de la simbiosis MA y la aplicación de ABA exógeno en la respuesta de plantas de lechuga (Aroca et al., 2008b). Los resultados obtenidos mostraron que la aplicación de ABA exógeno tiene efectos opuestos en la respuesta fisiológica al estrés de plantas MA y no MA y en la expresión de varios genes de respuesta al estrés (*lea*, *p5cs* o *nced*). Los resultados sugerían que las plantas MA regulan mejor y más rápido sus niveles de ABA que las plantas no MA, permitiendo un mejor equilibrio entre la tasa de transpiración y el movimiento de agua a través de las raíces en condiciones de estrés hídrico y tras su recuperación. Otro estudio llevado a cabo con plantas mutantes de tomate deficientes en ABA y plantas de tomate silvestres de la línea parental (Aroca et al., 2008a) mostró diferencias en la regulación de los patrones de expresión de cuatro genes de acuaporinas del subgrupo de las PIPs, dependiendo a su vez de la presencia o no del hongo MA. Todo ello sugería que el efecto de la simbiosis MA sobre estos genes dependía del contenido endógeno de ABA en estas plantas. Sin embargo, existe poca información acerca del efecto combinado de la aplicación de ABA exógeno sobre las propiedades hidráulicas y sobre la regulación de acuaporinas en raíces por parte de la simbiosis MA.

## 2.2. OBJETIVO

Por todo ello, la finalidad de este estudio es la de evaluar la influencia combinada de la simbiosis MA y la aplicación de ABA exógeno sobre las propiedades hidráulicas de la planta de maíz y la expresión y acumulación de las PIPs, como proteínas fundamentales en la regulación del transporte de agua a nivel de las raíces. Ello se analizó tanto en condiciones de estrés hídrico como tras un periodo de recuperación del mismo. Las hipótesis que planteamos fueron (1) la aplicación de ABA exógeno a las plantas modificará las propiedades hidráulicas y la respuesta a la sequía de las plantas de maíz y (2) la respuesta al ABA exógeno será diferente en las plantas MA frente a las no MA.

## 2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cumplir con este objetivo, las plantas de maíz fueron inoculadas o no con el hongo MA *Rhizophagus intraradices*. Un tercio de ellas se mantuvo en condiciones óptimas hasta el final del experimento, dos tercios de ellas fueron sometidos a 4 días de déficit hídrico. A la mitad de estas últimas, tras el periodo de sequía, se les aplicó un periodo de 3 días de recuperación. Las plantas fueron a su vez tratadas o no con 10 ml de una solución de ABA exógeno 100  $\mu\text{M}$  3 días antes de comenzar los tratamientos de riego y cada tres días después del inicio del tratamiento, tal y como se explica en el material y métodos. El resultado combinado da lugar a 12 tratamientos:

### **Tratamientos en condiciones óptimas de riego (ww):**

- Cww: Plantas control (no inoculadas) en condiciones óptimas de riego.
- Cww+ABA: Plantas control en condiciones óptimas de riego con aplicación de ABA exógeno.
- Riww: Plantas MA cultivadas en condiciones óptimas de riego.
- Riww+ABA: Plantas MA cultivadas en condiciones óptimas de riego y con aplicación de ABA exógeno.

### **Tratamientos sometidos a sequía durante 4 días (ds):**

- Cds: Plantas control sometidas a sequía durante 4 días.
- Cds+ABA: Plantas control sometidas a sequía durante 4 días con aplicación de ABA exógeno.
- Rids: Plantas MA sometidas a sequía durante 4 días.
- Rids+ABA: Plantas MA sometidas a sequía durante 4 días y con aplicación de ABA exógeno.

### **Tratamientos sometidos a 3 días de recuperación tras un periodo de sequía de 4 días (ds+rec):**

- Cds+rec: Plantas control sometidas a recuperación tras un periodo de sequía.
- Cds+rec+ABA: Plantas control sometidas a recuperación tras un periodo de sequía y con aplicación de ABA exógeno.
- Rids+rec: Plantas MA sometidas a recuperación tras un periodo de sequía.

·Rids+rec+ABA: Plantas MA sometidas a recuperación tras un periodo de sequía y con aplicación de ABA exógeno.

## 2.4. RESULTADOS

### 2.4.1. Crecimiento y colonización radical de plantas de maíz.

Como era de esperar, las plantas no inoculadas no presentaron colonización MA (Tabla 2.1). Las plantas micorrizadas exhibieron entre un 82 y un 86% de longitud de raíz micorrizada. Los tratamiento de riego y ABA no afectaron a este parámetro.

Para conseguir plantas MA y no MA de tamaño similar, antes del comienzo de los tratamientos de estrés y recuperación, las plantas no MA recibieron una aplicación de solución nutritiva. La aplicación de ABA causó una disminución del peso seco de raíz en condiciones óptimas de riego y un aumento del mismo en condiciones de estrés hídrico. En parte aérea no hubo cambios significativos (Tabla 2.1). Tras la recuperación de 3 días tras el estrés hídrico tampoco se vieron cambios significativos con la aplicación de ABA exógeno en la parte aérea, pero de nuevo se encontró una disminución del peso seco en raíces.

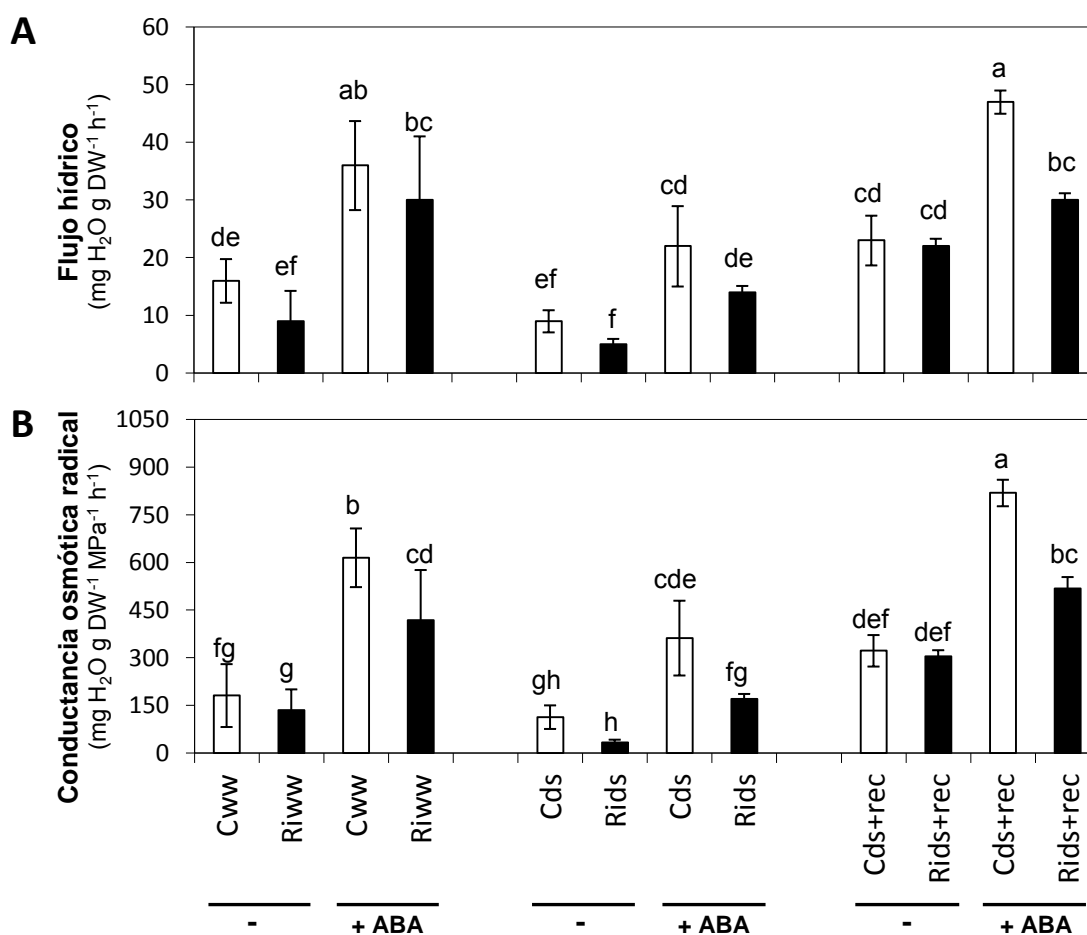
Tratamiento	PSPA (g planta <sup>-1</sup> )	PSR (g planta <sup>-1</sup> )	MA (%)
<b>Condiciones óptimas de riego</b>			
Control	1.24ab	2.7ab	0b
<i>R. intraradices</i>	1.09ab	2.8ab	86a
Control+ABA	1.01ab	1.9c	0b
<i>R. intraradices</i> +ABA	0.83b	1.8c	82a
<b>Sequía</b>			
Control	1.04ab	2.0bc	0b
<i>R. intraradices</i>	0.94b	2.1bc	83a
Control+ABA	1.26ab	3.0a	0b
<i>R. intraradices</i> +ABA	1.09ab	2.3bc	84a
<b>Recuperación tras sequía</b>			
Control	1.42a	2.4b	0b
<i>R. intraradices</i>	1.17ab	2.2bc	85a
Control+ABA	1.22ab	1.6c	0b
<i>R. intraradices</i> +ABA	1.11ab	1.7c	86a

**Tabla 2.1.** Peso seco de parte aérea (PSPA) y de raíz (PSR) (g planta<sup>-1</sup>) y porcentaje de longitud de raíz micorrizada. Los tratamientos son control sin inocular o plantas inoculadas con *R. intraradices*. Las plantas fueron cultivadas en condiciones óptimas de riego hasta el final del experimento o sometidas a estrés hídrico 4 días (Sequía) seguido o no por un tratamiento de tres días de recuperación tras el estrés hídrico. Un grupo de plantas de cada tratamiento fueron tratadas con ABA exógeno. Los valores representan el valor medio (n=5). Las distintas letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) calculadas mediante el test de LSD.

### 2.4.2. Propiedades hidráulicas de las raíces de maíz.

En condiciones óptimas de riego, el flujo hídrico ( $J_v$ ) aumentó con la aplicación de ABA exógeno tanto en plantas MA como en no MA (Fig. 2.1A) sin que hubiera diferencias significativas entre ambos grupos de plantas. La sequía hizo disminuir  $J_v$  sólo en las plantas tratadas con ABA exógeno. Aún así, las plantas tratadas con ABA exógeno mostraron valores siempre superiores de  $J_v$  que las plantas correspondientes sin aplicación de ABA.

Tras el periodo de recuperación del estrés, las plantas no MA presentaron valores similares de  $J_v$  a las plantas correspondientes en condiciones óptimas de riego, mientras las plantas MA mostraron mayor  $J_v$  en comparación con las plantas MA en condiciones óptimas de riego. El efecto positivo del ABA sobre este parámetro fue observado de nuevo sólo en las plantas no MA sometidas a este tratamiento, que mostraron unos valores de  $J_v$  un 56% superiores a las plantas MA.



**Figura 2.1.** Flujo hídrico (A) y conductividad osmótica radical (B) en raíces de plantas de maíz. Los tratamientos están designados como control sin inocular (C, barras blancas) o plantas inoculadas con *R. intraradices* (Ri, barras negras). Las plantas fueron cultivadas en condiciones óptimas de riego hasta el final del experimento (ww) o sometidas a estrés hídrico 4 días (ds). A un grupo de estas últimas se le permitió una recuperación tras el periodo de sequía mediante riego óptimo durante 3 días (ds+rec). Finalmente, un grupo de plantas de cada tratamiento fueron tratadas con ABA exógeno justo antes y durante los distintos tratamientos de riego (+ABA). Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=5). Las distintas letras en las barras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) calculadas mediante el test de LSD.

En condiciones óptimas de riego, la aplicación de ABA exógeno dio lugar a un aumento de la conductancia osmótica radical ( $L_o$ ) del 238% en plantas no MA y el 207% en plantas MA (Fig. 2.1B). En cualquier caso, tras la aplicación de ABA, las plantas no MA mostraron unos valores de  $L_o$  significativamente superiores a los de las plantas MA (incremento del 46%). La sequía disminuyó  $L_o$  en las plantas MA, siendo esta disminución más evidente en ambos grupos de plantas, cuando se trataron con ABA exógeno. De nuevo, los valores de  $L_o$  fueron superiores en aproximadamente el 110% en plantas no MA suplementadas con ABA que en las correspondientes plantas MA.

Las plantas que fueron sometidas a estrés y posterior recuperación durante 3 días también recuperaron sus valores de  $L_o$ , resultando similares o superiores a los de las plantas en condiciones óptimas de riego. Tal y como observamos en condiciones óptimas de riego, la aplicación de ABA aumentó los valores de  $L_o$  en plantas no MA y MA (incremento del 154 y 70%, respectivamente). De hecho, las plantas no MA suplementadas con ABA mostraron los valores más altos de  $L_o$  encontrados en este estudio. Tras la recuperación de la sequía, las plantas no MA suplementadas con ABA tuvieron unos valores de  $L_o$  un 58% superiores a las correspondientes plantas MA. Estos datos muestran claramente que la aplicación exógena de ABA acentúa las diferencias en  $L_o$  entre plantas MA y no MA.

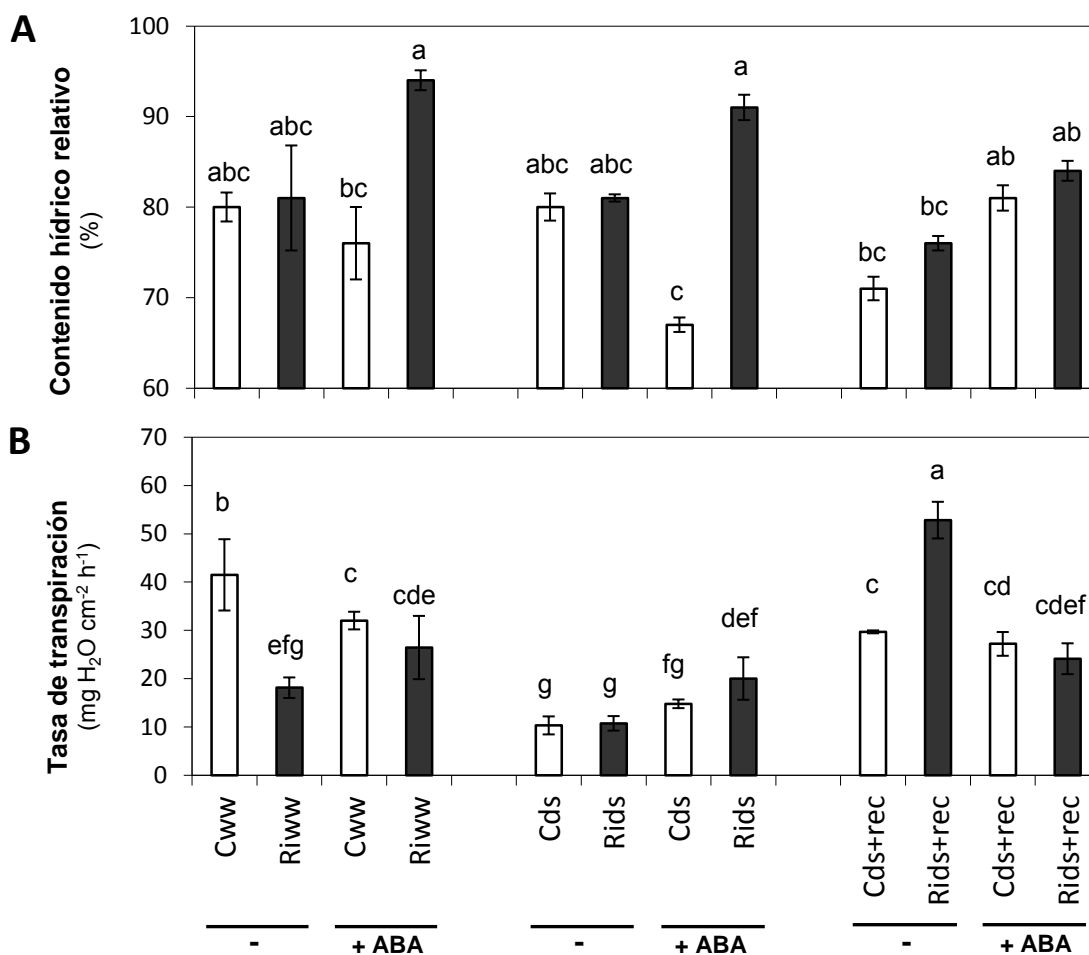
### **2.4.3. Estatus hídrico y transpiración de plantas de maíz.**

El contenido hídrico relativo (CHR) en parte aérea apenas sufrió variaciones debidas a la micorrización o a la aplicación de ABA exógeno. Sólo la combinación de ambos tratamientos tuvo un efecto significativo sobre el CHR en condiciones óptimas de riego y sequía (Figura 2.2A). De hecho, bajo estas condiciones de riego, la aplicación de ABA exógeno tuvo un efecto positivo sobre el CHR de la parte aérea de plantas MA, que presentaron los valores más altos de todos los tratamientos, siendo mucho mayores que los de las plantas no MA.

En condiciones óptimas de riego y ausencia de ABA, la inoculación con el hongo MA disminuyó la tasa de transpiración en un 56%. La aplicación de ABA exógeno disminuyó este parámetro en un 22% sólo en las plantas no MA (Fig. 2.2B). Bajo condiciones de estrés hídrico, la tasa de transpiración de las plantas no MA disminuyó en comparación con las mismas plantas en condiciones óptimas de riego, mientras las plantas MA mantuvieron una tasa de transpiración similar a las plantas MA en condiciones óptimas. Bajo condiciones de estrés hídrico, la aplicación de ABA a las plantas MA aumentó la tasa de transpiración en un 86% mientras que en las plantas no MA no hubo cambios significativos en este parámetro.

Cuando las plantas se sometieron a recuperación durante 3 días tras el periodo de estrés hídrico, la tasa de transpiración de las plantas MA alcanzó el mayor valor encontrado en este

estudio (77% mayor que en plantas no MA). Por el contrario, la aplicación de ABA a las plantas recuperadas tras un periodo de sequía, evitó este incremento de transpiración de las plantas MA y no produjo ningún cambio en las plantas no MA.



**Figura 2.2.** Contenido hídrico relativo (A) y tasa de transpiración (B) en plantas de maíz. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=5). Ver la leyenda de la Figura 2.1 para más detalles.

#### 2.4.4. Acumulación de prolina y ABA en plantas de maíz.

Cuando las plantas crecieron en condiciones óptimas de riego o se recuperaron tras un periodo de sequía, el contenido en prolina en las hojas no estuvo afectado por la micorrización o por la aplicación de ABA exógeno (Tabla 2.2). Bajo condiciones de estrés hídrico y en ausencia de ABA, las plantas no MA aumentaron su contenido en prolina en un 64% comparadas con las plantas correspondientes en condiciones óptimas de riego, retornando a valores similares al aplicar el tratamiento de recuperación de 3 días tras el periodo de estrés hídrico, mientras las plantas MA no mostraron variaciones en su contenido en prolina con el tratamiento aplicado.

El contenido en ABA de la parte aérea fue similar en plantas MA y no MA bajo condiciones óptimas de riego (Tabla 2.2). La aplicación de ABA exógeno aumentó el contenido en ABA de las

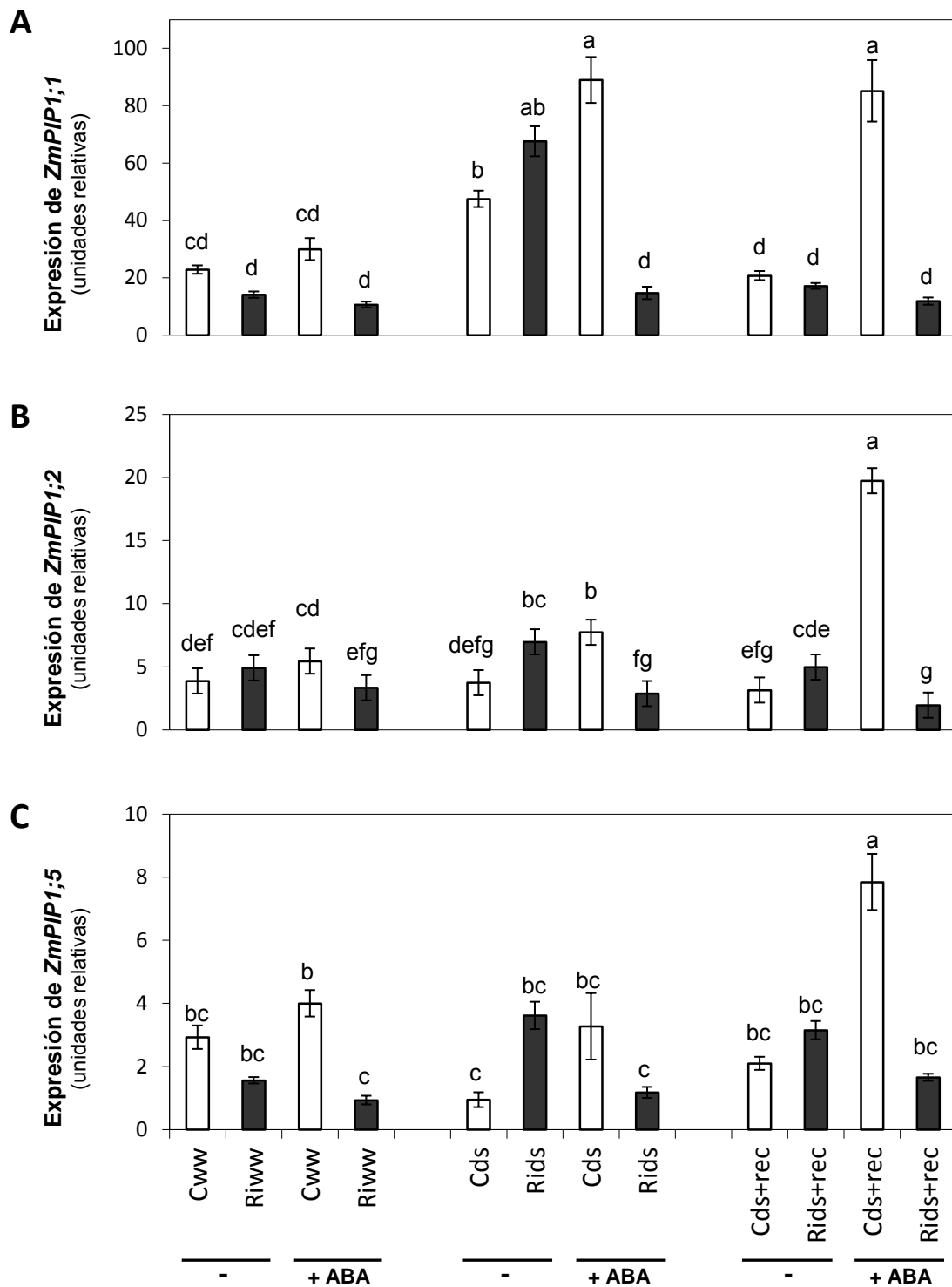
plantas no MA en un 129% pero no se observaron cambios significativos en las plantas MA. El estrés hídrico aumentó la acumulación de ABA en todos los tratamientos, especialmente en las plantas no MA. En estas plantas, la combinación de sequía y ABA exógeno dio lugar a los valores más altos de contenido en ABA. Las plantas MA también incrementaron su contenido en ABA como consecuencia de la sequía, pero sus niveles se mantuvieron considerablemente inferiores a los de las plantas no MA (aproximadamente un 75% menores). En el tratamiento de recuperación tras un periodo de sequía, los niveles de ABA disminuyeron hasta alcanzar valores similares a los de las plantas en condiciones óptimas de riego en las plantas colonizadas por *R. intraradices* independientemente de la aplicación o no de ABA exógeno, mientras que las plantas no MA mantuvieron unos altos niveles de ABA por encima de las plantas correspondientes en condiciones óptimas de riego. Las plantas no MA bajo estas condiciones mostraron de nuevo mayores niveles de contenido en ABA en parte aérea que las plantas MA.

<b>Tratamiento</b>	<b>Prolina</b> (nmol*g <sup>-1</sup> PS)	<b>ABA</b> (ng*g <sup>-1</sup> PS)
<b>Condiciones óptimas de riego</b>		
Control	185b	247hi
<i>R. intraradices</i>	174b	211hi
Control+ABA	182b	567ef
<i>R. intraradices</i> +ABA	175b	320gh
<b>Sequía</b>		
Control	304a	2920b
<i>R. intraradices</i>	203b	754de
Control+ABA	204b	3654a
<i>R. intraradices</i> +ABA	226b	800cd
<b>Recuperación tras sequía</b>		
Control	183b	615ef
<i>R. intraradices</i>	166b	145i
Control+ABA	164b	894cd
<i>R. intraradices</i> +ABA	177b	302gh

**Tabla 2.2.** Acumulación de prolina y ácido abscísico (ABA) en hojas de plantas de maíz. Los valores representan el valor medio (n=5). Ver la leyenda de la Tabla 2.1 para más detalles.

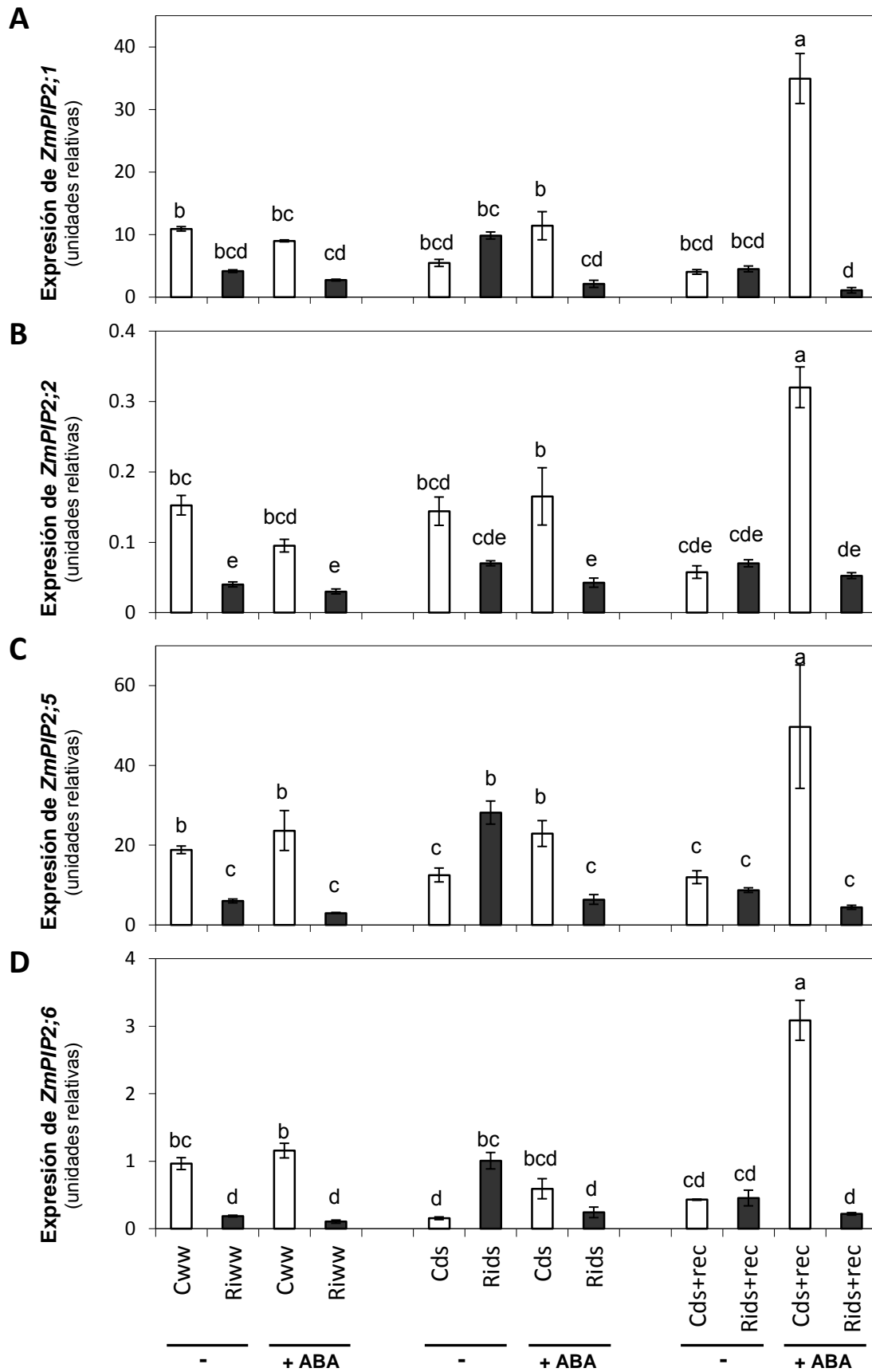
#### 2.4.5. Expresión de PIPs en plantas de maíz.

En este estudio analizamos el patrón de expresión de siete genes de acuaporinas del subgrupo de las *PIPs* (*3PIPs1* y *4PIPs2*), que en estudios anteriores (Hachez et al., 2006) mostraron una elevada expresión en raíces de maíz.



**Figura 2.3.** Niveles de expresión de los genes (A) *ZmPIP1;1*, (B) *ZmPIP1;2* y (C) *ZmPIP1;5* determinados en raíces de maíz mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=6, con dos o tres réplicas biológicas independientes y las correspondientes repeticiones técnicas por cada muestra). Ver la leyenda de la Figura 2.1 para más detalles.





**Figura 2.4.** Niveles de expresión de los genes (A) *ZmPIP2;1*, (B) *ZmPIP2;2*, (C) *ZmPIP2;5* y (D) *ZmPIP2;6* determinados en raíces de maíz mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Ver la leyenda de la Figura 2.3 para más detalles.

**Gen *ZmPIP1;1***

La sequía aumentó la expresión de este gen, especialmente en plantas MA donde se incrementó en un 383%. La aplicación de ABA exógeno tuvo efectos contrarios en plantas MA y no MA (Fig. 2.3A). De hecho, la aplicación de ABA incrementó aún más la expresión de este gen en plantas no MA sometidas a sequía, pero disminuyó en un 78% la expresión del gen *ZmPIP1;1* en plantas MA sometidas a sequía, que recuperaron valores similares a los de las plantas en condiciones óptimas de riego. Tras la recuperación de la sequía, las plantas no MA adicionadas con ABA exógeno mostraron los mayores niveles de expresión del gen *ZmPIP1;1*.

**Gen *ZmPIP1;2***

Cuando las plantas de maíz se sometieron a sequía, las plantas MA mostraron mayor expresión del gen *ZmPIP1;2* que las plantas no MA, pero la aplicación de ABA exógeno tuvo, de nuevo, un efecto contrario en ambos tipos de plantas (Fig. 2.3B). La aplicación de ABA aumentó la expresión de este gen en plantas no MA y la disminuyó en plantas MA. Las plantas no MA recuperadas tras un periodo de estrés hídrico y con aplicación de ABA mostraron un considerable incremento en la expresión del gen *ZmPIP1;2*.

**Gen *ZmPIP1;5***

Tanto en condiciones óptimas de riego como de sequía, el patrón de expresión del gen *ZmPIP1;5* no mostró cambios significativos por la micorrización o por el aporte de ABA exógeno (Fig. 2.3C). Tras la recuperación del periodo de sequía, sólo las plantas no MA con aplicación de ABA exógeno mostraron un aumento de la expresión de este gen.

**Gen *ZmPIP2;1***

Tal y como hemos observado en los anteriores genes *PIPs1*, el único tratamiento que afectó significativamente a la expresión de este gen fue la aplicación de ABA exógeno a plantas no MA en el tratamiento de recuperación de 3 días tras el estrés hídrico, que aumentó considerablemente su expresión génica (Fig. 2.4A). Tanto en condiciones de sequía como tras su recuperación, las plantas MA suplementadas con ABA exógeno mostraron una inhibición de la expresión de *ZmPIP2;1* comparadas con las plantas no MA.

**Gen *ZmPIP2;2***

Bajo condiciones óptimas de riego, las plantas MA mostraron valores de expresión de *ZmPIP2;2* más bajos que las plantas no MA (aproximadamente el 70% inferiores) independientemente de la aplicación o no de ABA exógeno (Fig. 2.4B). Bajo condiciones de estrés hídrico, la menor expresión de este gen en plantas MA frente a las plantas no MA fue significativo sólo cuando se aplicó ABA exógeno. De nuevo, en condiciones de recuperación tras un periodo de

estrés hídrico, las plantas no MA suplementadas con ABA exógeno alcanzaron los valores de expresión más elevados para este gen.

### **Gen *ZmPIP2;5***

Bajo condiciones óptimas de riego, las plantas MA mostraron una reducción de la expresión del gen *ZmPIP2;5* en comparación con las plantas no MA independientemente de la aplicación de ABA exógeno (Fig. 2.4C). En ausencia de ABA exógeno, la sequía produjo un aumento de la expresión de *ZmPIP2;5* del 366% en plantas MA, mientras las plantas no MA redujeron su expresión en un 33%. Por el contrario, la aplicación de ABA a las plantas sometidas a sequía inhibió la expresión de *ZmPIP2;5* un 77% en plantas MA y la aumentó un 83% en plantas no MA con respecto a las plantas sometidas a sequía sin tratamiento de ABA. Tras la recuperación de un periodo de sequía, este gen también aumentó considerablemente su expresión en plantas no MA suplementadas con ABA exógeno.

### **Gen *ZmPIP2;6***

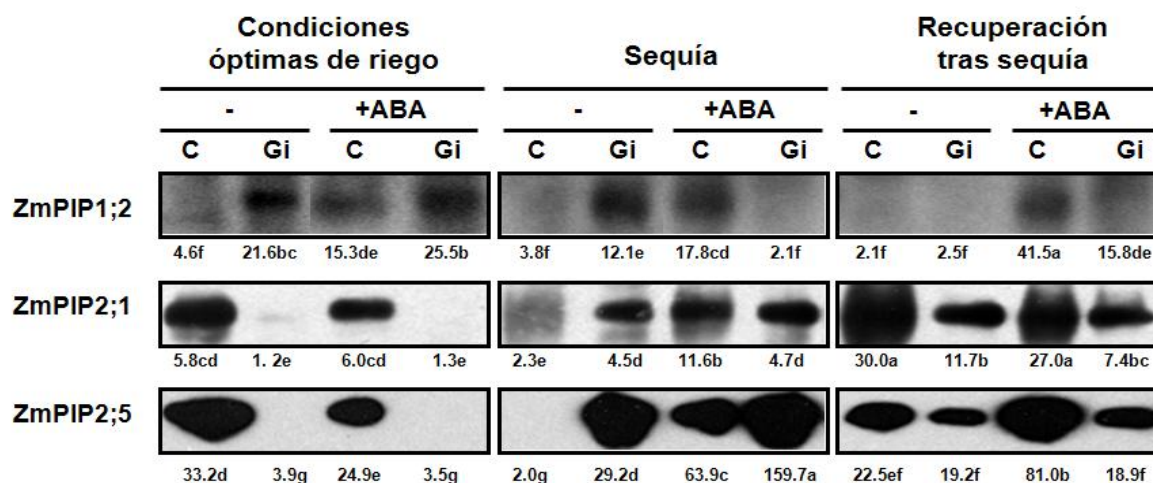
Bajo condiciones óptimas de riego, la expresión de *ZmPIP2;6* fue inhibida alrededor de un 80% en plantas MA en comparación con las plantas no MA, pero no se observó ningún efecto con la aplicación de ABA exógeno (Fig. 2.4D). Bajo condiciones de estrés hídrico, las plantas no MA redujeron la expresión de este gen en un 84%, mientras las plantas MA la aumentaron en un 430%. Sin embargo, la aplicación de ABA exógeno a estas plantas evitó los efectos de la sequía en la expresión del gen *ZmPIP2;6*. Es remarcable el hecho de que, en condiciones de sequía, la aplicación de ABA sólo inhibió la expresión de *ZmPIP2;6* en las plantas MA, siendo esta disminución del 75%. Finalmente, tal y como se observó en todos los genes *PIPs* analizados, la expresión de *ZmPIP2;6* fue inducida considerablemente en las plantas no MA suplementadas con ABA exógeno en el tratamiento de recuperación tras el periodo de sequía.

#### **2.4.6. Acumulación de PIPs en plantas de maíz.**

El patrón de acumulación de las proteínas *ZmPIP1;2*, *ZmPIP2;1*, *ZmPIP2;5* y *ZmPIP2;6* fue analizado en raíces de plantas de maíz mediante la técnica de “Western Blot”. Sin embargo, la última proteína no pudo detectarse en los extractos radicales, por lo que sólo se presentan los valores obtenidos para las otras tres acuaporinas analizadas (Figura 2.5).

No encontramos una correlación exacta entre los datos obtenidos de expresión génica y acumulación de proteínas. De hecho, *ZmPIP1;2* mostró correlación sólo bajo condiciones de sequía y tras la recuperación del periodo de estrés hídrico, pero no en condiciones óptimas de riego. El efecto contrario lo encontramos para *ZmPIP2;1* y *ZmPIP2;5* que, en condiciones óptimas de riego se acumularon más en raíces de plantas no MA que en las de plantas MA, mostrando una correlación clara con la expresión génica. Bajo condiciones de estrés hídrico o tras la recuperación

del mismo, la correlación entre expresión génica y acumulación de proteínas fue menos evidente. No obstante, las tres acuaporinas vieron inducida su acumulación en raíces de plantas no MA suplementadas con ABA al aplicar el tratamiento de recuperación de tres días tras un periodo de sequía, de acuerdo con los resultados obtenidos en sus patrones de expresión génica.



**Figura 2.5.** Análisis mediante western blot de la acumulación de ZmPIP1;2, ZmPIP2;1 y ZmPIP2;5 en raíces de plantas de maíz. Los valores representan el valor medio (n=4, con dos muestras biológicas independientes) de la intensidad de la señal, cuantificada mediante análisis de imagen. Ver la leyenda de la Tabla 2.1 para más detalles.

## 2.5. DISCUSIÓN

### Fisiología y crecimiento

La tolerancia de las plantas al estrés hídrico es un fenómeno complejo, que incluye cambios tanto fisiológicos como moleculares (Ingram y Bartels, 1996). Es bien sabido que el ABA juega un papel fundamental en la respuesta de las plantas a diversos estreses ambientales y que sus niveles aumentan en los tejidos vegetativos de la planta en respuesta al déficit hídrico (Bray, 2002; Zhang et al., 2006). El efecto protector del ABA se explica por el hecho de que, en primer lugar, promueve el cierre estomático, minimizando la pérdida de agua por transpiración, y en segundo lugar, mitiga los daños generados por el estrés mediante la activación de genes de respuesta al mismo. Todo ello, en conjunto, aumenta la tolerancia de la planta al estrés hídrico (Bray, 2002; Zhang et al., 2006; Hirayama y Shinozaki, 2007). Así pues, en condiciones de estrés hídrico, las plantas estimulan la producción de ABA en hojas y remobilizan el ABA almacenado en los tejidos en su forma conjugada (Christmann et al., 2007) que se transportan a través del xilema hasta la parte aérea de la planta (Hartung et al., 2005).

En este estudio encontramos que el contenido en ABA de las plantas de maíz no MA fue mayor que el de las plantas MA tanto en condiciones de sequía como tras su recuperación. Además, las plantas MA sometidas a sequía no mostraron un incremento en los niveles de ABA tras la aplicación de ABA exógeno, mientras que las plantas no MA mostraron mayor acumulación de

ABA bajo estas condiciones. La razón por la que las plantas micorrizadas presentaron menores niveles de ABA no está del todo elucidada, pero las diferencias entre plantas MA y no MA en la tasa de metabolismo del ABA, su recirculación, su exudación por las raíces hacia la rizosfera o los cambios en su localización interna, podrían ser causantes de tales diferencias (Wilkinson y Davies, 2002; Hartung et al., 2005; Parent et al., 2009). También es posible que la aplicación exógena de ABA genere un exceso de este compuesto. El exceso de ABA puede dar lugar a cambios en la tasa de degradación del mismo (Krochko et al., 1998) o pueden existir diferentes mecanismos de regulación según el origen (externo o interno) del ABA (Aroca et al., 2003). Dado que el contenido en ABA puede verse afectado por la simbiosis MA (Ruiz-Lozano et al., 2006), todos estos mecanismos pueden verse modificados para evitar la acumulación excesiva de este compuesto en plantas MA. Además, la regulación por simbiosis MA del contenido en ABA resultó mejor y más rápida en plantas MA, permitiendo un mejor balance hídrico tanto en condiciones de estrés como en su recuperación (Aroca et al., 2008b) de manera que los cambios del contenido en ABA estarán muy relacionados con la respuesta metabólica de defensa al estrés que tengan las distintas especies (planta y hongo MA) implicadas y dependerán también del tipo e intensidad del estrés. De hecho, un menor contenido en ABA de las plantas MA frente a las plantas no MA sometidas a sequía ha sido observado en diversos estudios (Goicoechea et al., 1997; Ludwig-Müller, 2000; Estrada-Luna y Davies, 2003) y se ha propuesto que las plantas MA pueden acumular menor ABA que las plantas no MA como consecuencia de la existencia de mecanismos primarios de evitación del estrés (Porcel et al., 2005; Ruiz-Lozano et al., 2006).

Para contrarrestar el estrés hídrico, muchas plantas disminuyen el potencial osmótico de sus células sintetizando y acumulando osmolitos compatibles como la prolina, que participa en el ajuste osmótico (Yoshida et al., 1997; Kishor y Sreenivasulu, 2014). En este estudio, este efecto fue claramente visible en las plantas no MA bajo condiciones de estrés hídrico, que incrementaron significativamente la acumulación de prolina en sus tejidos, mientras que la micorrización o la aplicación de ABA exógeno evitaron dicha acumulación en las plantas de maíz sometidas a sequía. Aunque el mecanismo exacto no es del todo conocido, la regulación del contenido en prolina por una vía dependiente de ABA y otra independiente de ABA (por deshidratación) han sido descritas anteriormente (Savoure et al., 1997), lo que podría explicar este efecto del ABA exógeno en el control de la acumulación de prolina. Por otro lado, se ha demostrado que la simbiosis MA protege la planta hospedadora de la deshidratación causada por el estrés hídrico, por lo que es posible que estas plantas necesiten menor acumulación de prolina que las correspondientes plantas no MA (Porcel et al., 2004).

La sequía es uno de los estreses abióticos más importantes que reducen la producción agrícola. La simbiosis MA generalmente aumenta el crecimiento de la planta hospedadora gracias a una mejor nutrición de la misma (Smith y Read, 1997). En estudios sobre las relaciones hídricas de la

planta llevados a cabo en contenedores cerrados donde la planta está confinada, es siempre difícil comparar los tratamientos si las plantas no alcanzan tamaños similares, ya que una diferencia en tamaños genera diferente grado de agotamiento del agua en el suelo, diferente transpiración y, consecuentemente, diferente grado de estrés (Goicoechea et al., 1997). En este estudio, las plantas no MA recibieron una aplicación de solución nutritiva hacia la mitad del experimento tratando de conseguir plantas MA y no MA de tamaños similares antes de proceder a la aplicación de los tratamientos de sequía y recuperación. Además, la aplicación de ABA exógeno no afectó significativamente al crecimiento de la planta. Así pues, el efecto de los distintos tratamientos sobre la tasa de transpiración o las propiedades hidráulicas de la raíz no fueron afectadas directamente por el distinto tamaño de las plantas.

### Propiedades hidráulicas y regulación de la expresión y acumulación de PIPs.

Hasta la fecha se han llevado a cabo pocos estudio sobre la influencia combinada de la simbiosis MA y la aplicación de ABA exógeno sobre las propiedades hidráulicas y expresión génica de acuaporinas en plantas sometidas a estrés hídrico y, aunque sabemos que la micorrización regula tanto el contenido en ABA como la expresión de algunas acuaporinas en la planta hospedadora (Porcel et al., 2006; Ruiz-Lozano et al., 2006; Aroca et al., 2007, 2008a y 2008b), los mecanismos por los que ocurre esta regulación aún no han sido elucidados. En cualquier caso, el presente estudio muestra dos resultados consistentes: En primer lugar, la aplicación de ABA exógeno aumentó  $J_v$  y  $L_o$  tanto en plantas MA como no MA independientemente del régimen hídrico aplicado y, en segundo lugar, cuando las plantas recibieron ABA exógeno, las plantas MA mostraron siempre valores más bajos de  $L_o$  que las plantas no MA. De hecho, la aplicación de ABA exógeno acentuó las diferencias en  $L_o$  entre plantas MA y no MA.

El aumento de  $L_o$  por aplicación de ABA exógeno ha sido observado con anterioridad (Hose et al., 2000; Wan et al., 2004; Schraut et al., 2005; Aroca, 2006), aunque los mecanismos íntimos involucrados en esta promoción del transporte hídrico en las raíces de plantas por la aplicación de ABA siguen siendo muy poco conocidos (Aroca, 2006). Sin embargo, la regulación de la conductancia radical ha sido relacionada directamente con cambios en la presencia y actividad de las acuaporinas (Javot y Maurel, 2002; Luu y Maurel, 2005; Beaudette et al., 2007) por lo que se ha propuesto que la función de las acuaporinas y la señal de transducción del ABA puedan estar interconectadas (Kaldenhoff et al., 2008). De hecho, se ha propuesto un aumento del flujo de agua transcelular causado por ABA mediante la inducción de la acumulación de acuaporinas (Kaldenhoff et al., 2008; Lovisolo et al., 2008). Los valores de  $L_o$  medidos en este estudio fueron debidos exclusivamente al gradiente osmótico existente entre los tejidos radicales y la solución del suelo, ya que la transpiración fue eliminada al cortar la parte aérea de las plantas. Así pues, de

acuerdo con el modelo compuesto de transporte de agua propuesto por Steudle (2000), el incremento o disminución de este parámetro indica un aumento o disminución de la vía de transporte célula a célula, vía en la que las acuaporinas participan directamente (Javot y Maurel, 2002; Javot et al., 2003; Luu y Maurel, 2005). Así pues, es esperable que el papel de las acuaporinas sea crucial en condiciones de estrés hídrico, cuando la baja transpiración no promueve el transporte de agua y el flujo se debe fundamentalmente al gradiente osmótico.

Los estudios previos sobre los efectos del ABA en la expresión de las acuaporinas presentaron fuertes contradicciones, siendo su relación positiva (Jang et al., 2004; Aroca et al., 2006) o negativa (Suga et al., 2002) según los casos y dependiendo de las isoformas analizadas y el genotipo de la planta (Lian et al., 2006). Aún así, los diversos estudios demuestran que el ABA modula la expresión de las PIPs (Suga et al., 2002; Jang et al., 2004; Zhu et al., 2005; Aroca et al., 2006). Así pues, la regulación de  $L_o$  por ABA parece estar ligada a la regulación de las acuaporinas. De hecho, la elevada  $L_o$  en plantas suplementadas con ABA exógeno (especialmente en plantas no MA) y la reducción de  $L_o$  en plantas MA comparada con la de plantas no MA, está claramente relacionada con la expresión de la mayor parte de las PIPs analizadas, que también presentaron menor expresión en las plantas MA que en las no MA.

También es remarcable el importante incremento de  $L_o$  y de la expresión de las siete PIPs analizadas en las plantas no MA sometidas a recuperación tras un periodo de sequía al aplicarles ABA exógeno, mientras que las correspondientes plantas MA mostraron una clara reducción de  $L_o$  en paralelo a la reducida expresión de las PIPs. Este incremento de la conductancia radical en plantas no MA recuperadas tras un periodo de sequía al aplicarles ABA exógeno, puede ser el resultado de una compensación de la pérdida de agua generada durante el periodo de estrés, ya que el ABA ha sido relacionada con el aumento de  $L$  en múltiples estudios (Morillon y Chrispeels, 2001; Aroca et al., 2006; Thompson et al., 2007) y la abundancia de agua disponible tras la recuperación del estrés, permitiría a la planta incrementar el transporte de la misma sin causar agotamiento de agua en el suelo, recuperando así el estatus hídrico de la planta. De hecho, bajo estas condiciones, los valores de CHR alcanzaron los mismos niveles que en las plantas no MA en condiciones óptimas de riego.

En este estudio, también observamos que el efecto de ABA sobre la expresión de los genes de *PIPs* depende de las condiciones de crecimiento y de la presencia o ausencia del hongo MA. De hecho, bajo condiciones óptimas de riego, la aplicación de ABA exógeno no afectó significativamente a ninguna de las *PIPs* analizadas. En el tratamiento de recuperación tras un periodo de sequía, el efecto del ABA sólo fue significativo en plantas no MA, donde aumentó considerablemente la expresión de todas las *PIPs* analizadas. Por el contrario, en condiciones de sequía, *ZmPIP1;1*, *ZmPIP1;2* y *ZmPIP2;5* aumentaron su expresión con la aplicación de ABA en las plantas no MA, pero disminuyeron en plantas MA. Bajo estas mismas condiciones, una



reducción de *ZmPIP2;6* por ABA fue también observada en plantas MA, mientras en las plantas no MA no hubo cambios significativos. Una disminución de la expresión génica y contenido en PIPs en plantas MA sometidas a estrés hídrico se interpreta como un mecanismo conservativo que evita la pérdida de agua de las células (Smart et al., 2001; Porcel et al., 2006; Jang et al., 2007). Estos descubrimientos sugieren que la permeabilidad al agua de las plantas sometidas a estrés hídrico está dirigida por una compleja regulación de las acuaporinas, dependiendo de los papeles específicos que las distintas isoformas jueguen en la planta (Alexandersson et al., 2005; Luu y Maurel, 2005) y que estas variaciones están muy relacionadas con el contenido en ABA de estas plantas (Aroca et al., 2008a).

Sin embargo, los cambios en la expresión o acumulación de las acuaporinas analizadas debidos a los tratamientos de sequía y simbiosis MA sin aplicación de ABA exógeno, no mostraron una correlación perfecta con los cambios en  $L_o$ . La falta de correlación entre expresión de acuaporinas y  $L_o$  ha sido descrita por otros autores (Galmés et al., 2007) y puede ser debida al hecho de que la regulación de la actividad de las acuaporinas no se restringe al nivel transcripcional. Muchas modificaciones post-traduccionales de regulación de la actividad de las acuaporinas han sido descritas hasta la fecha (para revisión, leer Chaumont y Tyerman, 2014). Además, las acuaporinas no son el único medio de controlar  $L_o$ , el movimiento de agua por la vía simplástica a través de los plasmodesmos puede contribuir significativamente a  $L_o$  dependiendo de las condiciones ambientales (Galmés et al., 2007). Por último, debe tenerse en consideración que las acuaporinas constituyen una familia con múltiples isoformas diferentes en plantas (Maurel, 2007) y en este estudio, solo siete PIPs han sido analizadas. Así pues, efectos diferentes sobre otras acuaporinas no analizadas en este estudio podrían estar contribuyendo a los cambios de  $L_o$  observados.

Los análisis de western blot mostraron que algunos cambios en los patrones de expresión se confirmaban a nivel de acumulación de proteínas. Por ejemplo, la menor expresión en plantas MA en condiciones óptimas de riego de los genes *ZmPIP2;1* y *ZmPIP2;5* se correlacionó con los patrones encontrados de acumulación de proteínas. También encontramos un importante incremento de las proteínas *ZmPIP1;2*, *ZmPIP2;1* y *ZmPIP2;5* en las plantas no MA sometidas a recuperación tras un periodo de sequía cuando aplicamos ABA exógeno, mientras en plantas MA no se observó dicho aumento en el contenido de estas proteínas, coincidiendo en ambos casos con las variaciones de expresión de estos genes. Sin embargo, para algunos tratamientos no existió una correlación entre el nivel de expresión del gen y el nivel de proteína acumulado. Esta falta de correlación entre ARNm y proteínas ha sido encontrada previamente en estudios sobre acuaporinas (López et al., 2003; Aroca et al., 2005; Boursiac et al., 2005) y sugiere que la regulación post-transcripcional y post-traducciona l o una tasa diferente de degradación de éstas proteínas puede estar teniendo lugar en estos casos (López et al., 2003). Es más, en el caso de *ZmPIP2;1*, debe



tenerse en cuenta que el anticuerpo utilizado en la técnica de western blot también reconoce a la proteína ZmPIP2;2 (Hachez et al., 2006) y por ello, ambas proteínas afectaron a los resultados obtenidos.

Por último comentar que los valores de  $L_o$  más bajos en plantas MA que en plantas no MA al aplicar ABA exógeno, contradicen los resultados obtenidos previamente por otros investigadores, que encontraron un aumento de este parámetro en plantas MA de tomate, romero y lechuga sometidas a sequía en comparación con las plantas no MA (Dell'amico et al. 2002; Sánchez-Blanco et al., 2004; Aroca et al., 2008b). No obstante, Augé (2001) ya indicó que la conductancia hidráulica radical no se incrementaba habitualmente por la simbiosis MA en ausencia de diferencias de crecimiento o nutrición fosforada en las plantas MA, como es el caso de este estudio. Además, Kyllö et al. (2003) demostraron que el efecto de la simbiosis MA sobre la conductancia hidráulica radical dependía de la especie de planta y la intensidad lumínica. Sin embargo, la reducción de  $L_o$  como consecuencia de la colonización MA, también se ha observado en limoneros sometidos a sequía (Levy et al., 1983) o en plantas de alubia en condiciones óptimas de riego (Aroca et al., 2007).

A pesar de la disminución de  $L_o$  en plantas MA sometidas a sequía en comparación con las plantas no MA al aplicar ABA exógeno, el aumento del CHR en estas condiciones sugiere un incremento del transporte por la vía apoplástica debido a la micorrización, tal como se ha sugerido en otros estudios anteriores (Muhsin y Zwiazek, 2002; Lehto y Zwiazek, 2011). Así pues, no se descarta que la disminución de  $L_o$  en las plantas MA al aplicar ABA exógeno en condiciones de sequía pueda ser compensada por un aumento de la vía apoplástica que permita mantener una conductancia hidráulica elevada y un estatus hídrico mayor en plantas MA que en plantas no MA.

En conclusión, nuestros datos mostraron que, en primer lugar, la aplicación de ABA exógeno aumentó  $L_o$  en todas las plantas independientemente del tratamiento de riego aplicado, y en segundo lugar, que las plantas MA mostraron menores valores de  $L_o$  que las plantas no MA, especialmente cuando se aplicó ABA exógeno, que acentuó las diferencias de  $L_o$  entre ambos tipos de plantas. Este efecto estuvo claramente relacionado con los patrones de regulación de las distintas PIPs analizadas, ya que la mayoría de ellas redujeron su expresión y contenido en plantas MA comparados con los niveles obtenidos en plantas no MA al aplicarles ABA exógeno. En su conjunto, todos estos resultados sugieren que la combinación de ABA exógeno y simbiosis MA inhiben la expresión de las PIPs como estrategia de conservación de agua en la planta hospedadora, que permitiría a estas plantas mantener unos altos niveles de contenido hídrico relativo. A su vez estos datos sugieren una mayor contribución de la vía apoplástica al flujo de agua en las plantas MA.

VI. CAPÍTULO 3



### 3. Estudio del efecto de la simbiosis micorrízico arbuscular sobre la contribución relativa de las distintas vías de transporte de agua en la raíz de la planta hospedadora.

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

Cuando las plantas se someten a estrés hídrico, tienden a regular su estatus hídrico mediante ajustes de la **conductividad hidráulica** de sus raíces, la **conductancia estomática** y variaciones osmóticas que afectan al **potencial hídrico** de sus células y tejidos tratando de mantener el flujo de agua y unos niveles de turgor celular adecuados (Aroca et al., 2011; Akinci y Losel, 2012). En este sentido, varios estudios han demostrado que cuando el agua se mueve desde el suelo hasta los tejidos vasculares de la raíz, la principal barrera al flujo de agua es el transporte radial entre la epidermis de la raíz y los vasos xilemáticos, con mayor incidencia que el movimiento axial a través de dichos vasos (Steudle y Peterson, 1998; Doussan et al., 1998). En su conjunto, el movimiento radial y axial determina lo que conocemos como **conductancia hidráulica radical (L)**. Según el modelo compuesto (Steudle, 1994), L se basa en la acción combinada de dos vías de transporte: la **vía apoplástica** y la vía **“célula a célula”**. Se asume que la vía célula a célula supone una resistencia hidráulica mayor que la vía apoplástica (Steudle y Peterson 1998) y, por tanto, tendrá menor importancia en condiciones de transpiración elevada (Zhu y Steudle, 1991) pero será la vía fundamental en su ausencia. Sin embargo, la contribución relativa de estas dos vías de transporte no está clara (Voicu et al., 2009). Es más, dependiendo de las condiciones ambientales, la contribución relativa de cada vía puede variar notablemente (Steudle, 2000; Martínez-Ballesta et al., 2003). El descubrimiento de las **acuaporinas** como canales de membrana que permiten el paso de grandes cantidades de agua a través de la vía célula a célula ha llevado a algunos autores a desarrollar estudios que apuntan a que la contribución al transporte por la vía célula a célula podría ser mucho mayor de lo esperado, incluso en condiciones de elevada transpiración (Fritz y Ehwald, 2011). El agua que se mueve por ésta vía se mide como **conductancia osmótica radical (L<sub>o</sub>)** y es debida exclusivamente al gradiente osmótico entre los distintos compartimentos celulares.

Por otro lado, las variaciones en la conductancia hidráulica radical (L) entre plantas MA y no MA ha dado resultados muy contradictorios, encontrándose que aumenta, disminuye o se mantiene según los simbiontes implicados y las condiciones experimentales (Sánchez-Blanco et al., 2004; Porcel et al., 2006; Aroca et al., 2007 y 2008b). Estos efectos han sido relacionados con la regulación de las acuaporinas (Ruiz-Lozano y Aroca, 2010), que generan variaciones en la conductancia osmótica radical (L<sub>o</sub>). De otra parte, en la actualidad, se conoce muy poco sobre cómo se produce el movimiento del agua y de iones a través de los tejidos del hongo micorrízico y

entre el hongo y la raíz (Lehto y Zwiazek, 2011). Así, por ejemplo, en la simbiosis ectomicorrícica se ha propuesto que modificaciones estructurales como un manto con una red más flexible de hifas podría resultar en una alteración de las proporciones de flujo apoplástico y simplástico (Bogeat-Triboulot et al., 2004). Algunos estudios han sugerido que los aumentos en la conductividad hidráulica radical en las raíces micorrizadas podrían deberse a un incremento del flujo de agua por la vía célula a célula (Marjanović et al., 2005; Lee et al., 2010). El micelio de los hongos MA posee sus propias acuaporinas, aunque se sabe muy poco de su contribución al transporte de agua en las plantas MA (Aroca et al., 2009; Lehto y Zwiazek, 2011; Li et al., 2013). Se ha sugerido también que la micorrización pueda tener una influencia importante sobre el transporte de agua por la vía apoplástica, al aportar agua desde el suelo directamente al córtex de las raíces (Smith et al., 2010) y generar modificaciones estructurales en las mismas (Augé, 2001) que modifican la resistencia de esta vía al paso de agua. De hecho, los resultados de Muhsin y Zwiazek (2002) sugieren que las hifas de ectomicorizas incrementan la conductancia hidráulica de la raíz gracias a que disminuyen la resistencia al flujo de agua apoplástico, más que a través de un transporte de agua mediado por acuaporinas. Así pues, el efecto que la micorrización pueda tener sobre la contribución de ambas vías de transporte de agua y sobre la conductancia hidráulica total de la raíz no está claro, pero dada la capacidad de la micorizas para aumentar la tolerancia al estrés hídrico de las plantas (Augé, 2001; Ruiz-Lozano, 2003; Ruiz-Lozano y Aroca, 2010), esta diferente contribución al transporte de agua desde el suelo hasta el xilema puede suponer la diferencia en la capacidad para resistir el estrés hídrico.

### 3.2. OBJETIVO

Por todo ello, nos hemos propuesto elucidar el efecto de la micorrización arbuscular sobre la contribución relativa de las dos vías de transporte de agua y su relación con el estatus hídrico y tolerancia al estrés hídrico de las plantas. Para ello proponemos el uso de dos compuestos: un colorante marcador denominado “light green SF yellowish” cuyo alto peso molecular impide su penetración celular y por ello se mueve exclusivamente a través de la vía apoplástica (Martínez-Ballesta et al., 2003; López-Pérez et al., 2007), y azida sódica como inhibidor de las acuaporinas y por lo tanto de la vía célula a célula (Tournaire-Rouxet et al., 2003; Fitzpatrick y Reid, 2009; Postaire et al., 2010).

### 3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

**3.3.1. Experimento 1:** Experimento factorial en el que plantas de maíz (*Zea mays*) se sometieron a distintos tratamientos de inoculación: control no inoculado (C) versus inoculación con *R. intraradices* (Ri), y dos tratamientos de riego: condiciones óptimas (WW) versus sequía durante 12

días (para más información, ver “Material y métodos”) (DS). El resultado combinado da lugar a 4 tratamientos:

- Cww: Plantas control cultivadas en condiciones óptimas de riego.
- Riww: Plantas micorrizadas cultivadas en condiciones óptimas de riego.
- Cds: Plantas control sometidas a sequía durante 12 días.
- Rids: Plantas micorrizadas sometidas a sequía durante 12 días.

Con el fin de verificar los datos en diferentes plantas hospedadoras, hemos repetido este mismo experimento con otra planta, el tomate (*Solanum lycopersicum*). De esta manera podemos comprobar si esta contribución relativa de las vías de transporte de agua varía o no con la planta hospedadora.

**3.3.2. Experimento 2:** Experimento factorial en el que las plantas se sometieron a distintos tratamientos de inoculación, regadío y tratamiento con acida sódica durante 50 min tal y como se explica en el apartado de “Material y métodos”. El resultado combinado dio lugar a 8 tratamientos:

- Cww: Plantas control en condiciones óptimas de riego.
- Cww+Az: Plantas control en condiciones óptimas de riego con aplicación de acida sódica.
- Riww: Plantas inoculadas cultivadas en condiciones óptimas de riego.
- Riww+Az: Plantas micorrizadas cultivadas en condiciones óptimas de riego y con aplicación de azida sódica.
- Cds: Plantas control sometidas a sequía durante 12 días.
- Cds+Az: Plantas control sometidas a sequía durante 12 días con aplicación de azida sódica.
- Rids: Plantas micorrizadas sometidas a sequía durante 12 días.
- Rids+Az: Plantas micorrizadas sometidas a sequía durante 12 días y con aplicación de azida sódica.

## 3.4. RESULTADOS

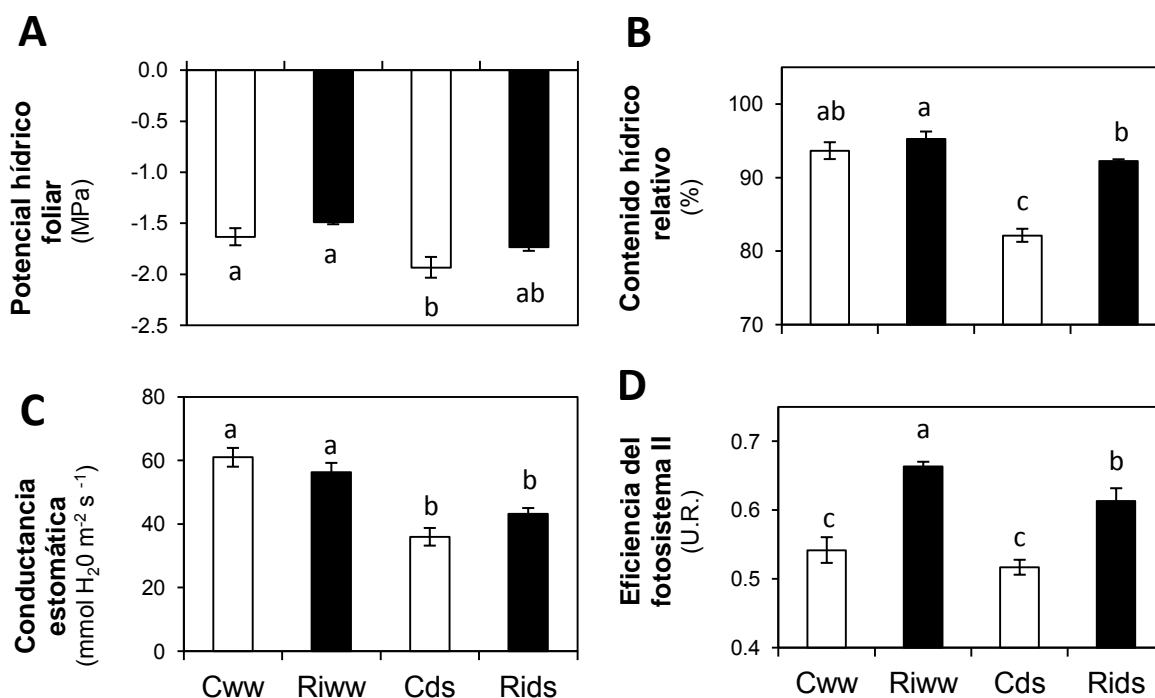
### 3.4.1. Colonización radical de plantas de maíz y tomate.

	Experimento 1		Experimento 2
	Maíz	Tomate	Maíz
Cww	0b	0b	0b
Riww	74a	68a	63a
Cds	0b	0b	0b
Rids	73a	70a	60a

El porcentaje de micorrización de los tratamientos inoculados superó el 60% en todos los casos sin que se viera afectado por el tratamiento de riego aplicado.

**Tabla 3.1.** Porcentaje de longitud de raíz micorrizada en plantas de maíz y tomate en los experimentos 1 y 2. Medias seguidas por letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) según el test de LSD ( $n = 6$ ).

## 3.4.2. Crecimiento y estatus hídrico de plantas de maíz y tomate.

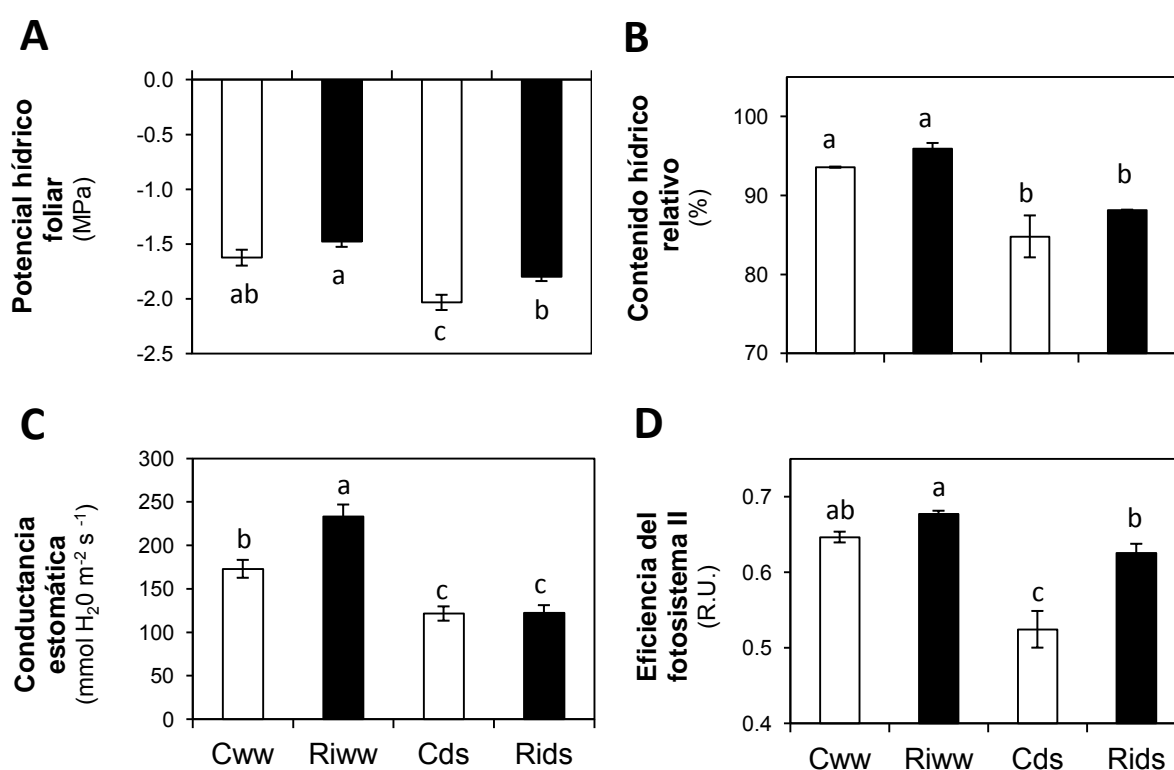


**Figura 3.1.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre (A) potencial hídrico foliar, (B) contenido hídrico relativo, (C) conductancia estomática y (D) eficiencia del PSII en plantas de maíz bajo las condiciones del experimento 1. Los tratamientos están designados como control sin inocular (C, barras blancas) o plantas inoculadas con *R. intraradices* (Ri, barras negras). Las plantas fueron cultivadas en condiciones óptimas de riego (ww) o sometidas a estrés hídrico (ds). Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=6). Las distintas letras en las barras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) calculadas mediante el test de LSD.

Las plantas de maíz crecieron bien bajo las condiciones de este ensayo, alcanzando un peso fresco medio de parte aérea de 18 g durante las 8 semanas que duró el periodo de crecimiento (datos no mostrados). En estas plantas, el potencial hídrico de las hojas disminuyó de manera significativa sólo en las plantas no MA sometidas a estrés hídrico, mientras las plantas MA mantuvieron valores similares a las plantas control (Fig. 3.1A). El contenido hídrico relativo (CHR) disminuyó en plantas de maíz como consecuencia de la sequía aplicada tanto en plantas MA como en no MA. Sin embargo, esta disminución fue menor en las plantas MA, manteniéndose los valores un 10% superiores a los de las plantas sin micorrizar (Fig. 3.1B). La conductancia estomática también disminuyó con la sequía aplicada sin mostrar diferencias significativas entre plantas MA y no MA (Fig. 3.1C). En cuanto a la eficiencia del fotosistema II, los valores fueron máximos en las plantas MA cultivadas en condiciones óptimas de riego. El estrés redujo este parámetro en plantas MA, pero aun así, mantuvieron valores un 15% superiores a los de las plantas no MA (Fig. 3.1D).

Las plantas de tomate también crecieron adecuadamente, alcanzando al final del periodo de crecimiento un promedio de peso fresco de parte aérea de 15 g (datos no presentados). El potencial

hídrico de las hojas de tomate disminuyó con la sequía, siendo más pronunciado en las plantas no MA que en las MA (Fig. 3.2A). El CHR también decreció como consecuencia de la sequía aplicada con valores similares en plantas MA y no MA (Fig. 3.2B). En condiciones óptimas de riego, la conductancia estomática fue un 25% superior en las plantas MA de tomate que en las no MA y disminuyó en ambos casos con la sequía aplicada hasta alcanzar valores similares (Fig. 3.2C). La eficiencia del fotosistema II fue similar en condiciones óptimas de riego en las plantas de tomate MA y no MA y disminuyó en ambos casos con la sequía, siendo esta disminución un 16% mayor en las plantas sin micorrizar (Fig. 3.2D).



**Figura 3.2.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre (A) potencial hídrico foliar, (B) contenido hídrico relativo, (C) conductancia estomática y (D) eficiencia del PSII en plantas de tomate bajo las condiciones del experimento 1. Ver la leyenda de la Figura 3.1 para más detalles.

### 3.4.3. Propiedades hidráulicas de la raíz de plantas de maíz y tomate.

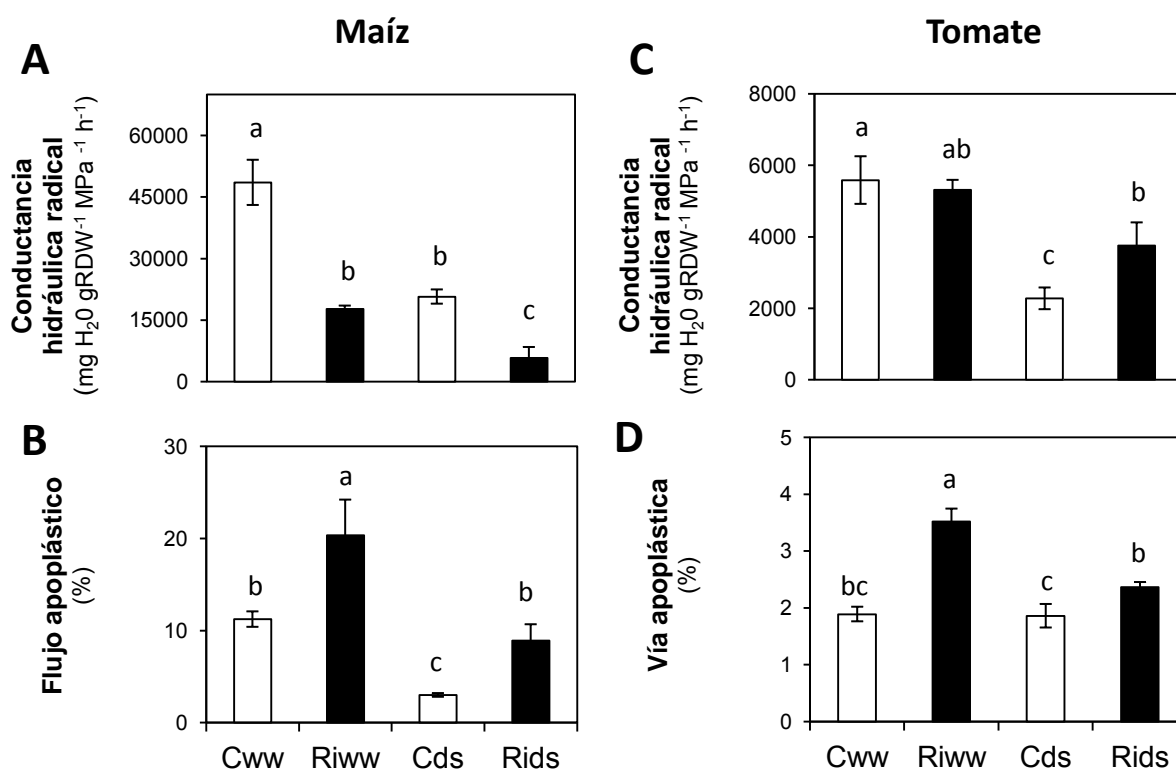
#### 3.4.3.1. Experimento 1

Los valores más altos de L en maíz se obtuvieron en las plantas cultivadas en condiciones óptimas de riego, sin que existieran diferencias significativas entre plantas MA y no MA. La conductancia hidráulica radical descendió con la sequía aplicada siendo este descenso estadísticamente significativo sólo en plantas no MA, donde se redujo casi un 60% (Fig. 3.3A). Bajo estas condiciones, el flujo de agua por la vía apoplástica fue significativamente superior en plantas MA que en plantas no MA tanto en condiciones óptimas (87% superior) como de sequía



(27% superior). Las plantas no MA, no redujeron el flujo apoplástico como consecuencia del estrés hídrico aplicado en este experimento, manteniendo valores similares al control en condiciones óptimas, mientras que las plantas MA redujeron la proporción del flujo apoplástico en un 32% con respecto a las plantas en condiciones óptimas (Fig. 3.3B).

A diferencia de las plantas de maíz, las plantas MA de tomate mostraron valores significativamente inferiores de  $L$  en comparación con las plantas no MA tanto en condiciones óptimas de riego como de sequía (Fig. 3.3C). La sequía disminuyó este parámetro en ambos tratamientos, siendo esta disminución un 10% mayor en las plantas MA que en las no MA. Sin embargo, la proporción del flujo de agua por la vía apoplástica en tomate (Fig. 3.3D) fue, al igual que en el caso del maíz, significativamente superior en plantas MA que en plantas no MA tanto en condiciones óptimas (aumento del 81%) como de sequía (aumento del 195%). En este caso, dicha proporción disminuyó por la sequía en ambas plantas (MA y no MA).



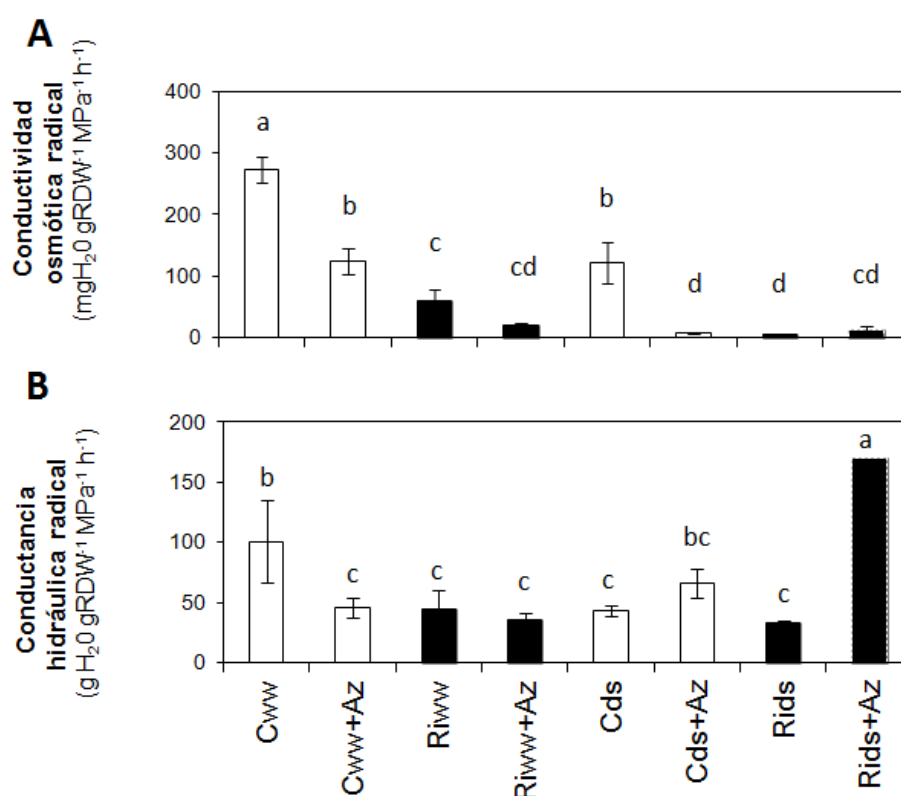
**Figura 3.3.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre conductividad hidráulica radical en plantas de maíz (A) y tomate (C) y flujo de agua por la vía apoplástica en plantas de maíz (B) y tomate (D) bajo las condiciones del experimento 1. Ver la leyenda de la Figura 3.1 para más detalles.

### 3.4.3.2. Experimento 2

La conductancia osmótica radical ( $L_o$ ) de las plantas de maíz cultivadas en condiciones óptimas de riego fue un 355% mayor en plantas no MA que en plantas MA (Fig. 3.4A). La aplicación de azida sódica redujo considerablemente este parámetro tanto en plantas MA (68% de

reducción) como no MA (54% de reducción). Cuando las plantas se sometieron a estrés hídrico,  $L_o$  disminuyó en todos los tratamientos, aunque las plantas no MA mostraron valores superiores a las plantas MA. Sin embargo,  $L_o$  en las plantas no MA quedó prácticamente suprimida al tratarlas con azida sódica, llegando a igualar los valores de las plantas MA con o sin azida sódica (Fig. 3.4A).

La conductancia hidráulica radical ( $L$ ) que mide el transporte de agua tanto por la vía célula a célula como apoplástica, fue también superior (126%) en plantas no MA cultivadas en condiciones óptimas de riego comparada con las plantas MA (Fig. 3.4B). El tratamiento con azida sódica redujo este parámetro en un 55% en plantas no MA pero no afectó significativamente a las plantas MA. Bajo condiciones de sequía, la  $L$  de las plantas no MA fue un 57% inferior que en condiciones óptimas y el tratamiento de azida sódica elevó este parámetro levemente sin llegar a ser estadísticamente significativo. Por el contrario, las plantas MA no redujeron  $L$  ni a consecuencia del estrés aplicado ni al añadir el tratamiento de azida sódica. De hecho, bajo condiciones de estrés hídrico, las plantas MA tratadas con azida sódica mostraron los mayores valores encontrados en este experimento, muy por encima de las plantas en condiciones óptimas de riego, tratadas o no con azida sódica.



**Figura 3.4.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre (A) conductividad hidráulica radical y (B) conductividad osmótica radical en plantas de maíz bajo las condiciones del experimento 2. Los tratamientos son control sin inocular (C, barras blancas) o plantas inoculadas con *R. intraradices* (Ri, barras negras). Las plantas fueron cultivadas en condiciones óptimas de riego (ww) o sometidas a estrés hídrico (ds). Un grupo de plantas de cada tratamiento fueron tratadas con azida sódica 7mM (+Az) antes de tomar las medidas de conductividad. Las barras representan el valor medio con su error estándar (n=6). Las distintas letras en las barras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) calculadas mediante el test de LSD.

### 3.5. DISCUSIÓN

El porcentaje de micorrización de las plantas de maíz y tomate del experimento 1 fueron similares, lo que permite asegurar que las variaciones fisiológicas encontradas no fueron debidas al diferente grado de colonización (Smith et al., 2010). En los estudios sobre relaciones hídricas con plantas confinadas en macetas es importante conseguir plantas con tamaños similares en los diferentes tratamientos.

Plantas de tamaños desiguales generan un diferente agotamiento del agua del suelo y tasas de transpiración y, consecuentemente, una intensidad de estrés desigual (Goicoechea et al., 1997; Ruiz-Sánchez et al., 2011). En este estudio se consiguió que las plantas de cada ensayo fueran de tamaños similares independientemente del tratamiento experimental, gracias a la aplicación extra de solución nutritiva una vez por semana a las plantas no MA, para compensar el efecto del incremento nutritivo causado por la micorrización en las plantas MA, (Smith y Read, 1997), y asegurando así que los efectos fisiológicos encontrados no sean debidos a diferencias de tamaño.

Los resultados de potencial hídrico foliar, CHR, conductancia estomática y eficiencia del PSII obtenidos tanto en maíz como en tomate mostraron que el estrés hídrico impuesto disminuyó significativamente estos parámetros. Sin embargo, el efecto fue mucho menor en las plantas MA que en las no MA, sugiriendo que las plantas MA mantienen un estatus hídrico y fisiológico significativamente mejor que las plantas no MA. Este hecho se ha explicado en base a la mayor capacidad de las plantas MA para obtener agua de los poros del suelo inaccesibles para las raíces de plantas sin micorrizar, gracias a una mayor superficie de absorción y a una mayor capacidad para extraer el agua en suelos con bajo potencial hídrico (Augé, 2001; Ruiz-Lozano, 2003; Lehto y Zwiazek, 2011), además de una mayor penetración en las cavidades del suelo gracias al pequeño diámetro de las hifas extraradicales del hongo (Drew et al., 2003). Este incremento en la absorción de agua puede ser menos importante en condiciones óptimas de riego, puesto que las cavidades más grandes del suelo también estarán repletas de agua permitiendo una absorción directa por parte de las raíces de las plantas. Sin embargo, cuando la sequía comienza a afectar al suelo, el agua se retiene sólo en los pequeños poros a donde sólo las hifas de los hongos pueden acceder, por lo que el incremento en la absorción de agua en estas condiciones puede ser crucial para la supervivencia (Allen, 2007; Lehto y Zwiazek, 2011).

El mejor estatus hídrico de las plantas MA sometidas a sequía en comparación con las no MA, implica un mejor ajuste de las fuentes y sumideros de agua que permitan mantener el turgor celular. En este sentido, las variaciones encontradas entre plantas MA y no MA de la conductancia estomática (sumidero) en el experimento 1 no fueron significativas, lo que nos indica que el mejor estatus hídrico se consigue mediante variaciones en las vías de transporte de agua de las raíces (fuente). De hecho, encontramos que las plantas MA, tanto de tomate como de maíz, presentaban

un aumento de la vía apoplástica en condiciones óptimas, y los valores se mantenían más elevados que en plantas no MA también en condiciones de sequía. Por lo tanto, parece que el transporte de agua por las hifas del hongo, que se asume que es principalmente apoplástico por ser el micelio cenocítico (Duddridge et al., 1980), genera de hecho un incremento en la vía apoplástica de la planta, como ha sido sugerido en ectomicorrizas (Muhsin y Zwiazek, 2002; Plamboeck et al., 2007; Lehto y Zwiazek, 2011).

También se observó que, aunque el flujo de agua por la vía apoplástica fuese más elevado en plantas MA, L fue significativamente reducido en tomate pero no en maíz, lo que puede ser debido a las distintas especies implicadas, como sugieren otros estudios que observan aumento o disminución con la micorrización en función de las diferentes especies de planta utilizadas (Sánchez-Blanco et al., 2004; Aroca et al., 2007 y 2008b; Ruiz-Lozano et al., 2009). Puesto que L es la suma de las vías apoplástica y célula a célula, la fuerte disminución encontrada en tomate implica que el transporte por la vía célula a célula ha de estar fuertemente disminuido con la micorrización en estas plantas, de manera que a pesar del aumento de la vía apoplástica, el flujo total sea menor. De hecho, bajo condiciones de sequía, la conductividad hidráulica radical tiende a disminuir, pero la proporción de agua que circula por la vía apoplástica aumenta en comparación con la que circula célula a célula (Siemens y Zwiazek, 2003) lo que explica los resultados obtenidos en este estudio. Además se ha sugerido que en las plantas MA el transporte vía célula a célula ha de ser más difícil, debido a que el agua ha de atravesar no sólo las membranas celulares de la planta sino también las de las hifas del hongo (Lehto y Zwiazek, 2011), por lo que una disminución de la vía célula a célula es esperable en estas plantas en mayor o menor proporción. Sin embargo, no hay que olvidar que la regulación de las acuaporinas puede estar jugando igualmente importantes papeles en la diferente contribución de la vía célula a célula en estos experimentos.

Para conseguir más información sobre la regulación de las acuaporinas y su intervención en la ruta célula a célula se llevó a cabo el experimento 2 basado en el uso de un inhibidor de las acuaporinas. Dentro de los inhibidores de acuaporinas, el cloruro de mercurio suele ser el más utilizado, sin embargo, los estudios con este inhibidor han demostrado que los efectos son tremendamente variables dependiendo de las dosis y duración del tratamiento aplicado (Niemietz y Tyerman, 2002; Maurel et al., 2008) y que puede alterar la permeabilidad de las membranas e indirectamente inhibir el metabolismo celular (Kamaluddin y Zwiazek, 2001). Por ello, hemos preferido utilizar la azida sódica, compuesto cuyo efecto es la acidificación del citoplasma y la inhibición de la fosforilación de las acuaporinas contribuyendo con estos efectos a mantener estos canales cerrados sin dañar el metabolismo celular (Tournaire-Roux et al., 2003) utilizando las dosis que en estudios anteriores han demostrado ser eficaces en otras plantas (Fitzpatrick y Reid, 2009). En este experimento, los elevados valores de L de las plantas MA sometidas a sequía cuando se

aplicó azida sódica contrastan con los valores de conductancia osmótica radical, que se mantuvieron muy bajos en estas condiciones, lo que analizado junto a los datos encontrados en el experimento 1 sugiere que cuando la sequía o la aplicación del inhibidor de acuaporinas inhibe  $L_o$ , en las plantas MA se produce una compensación del flujo de agua célula a célula con el aumento de la vía apoplástica. Este aumento de  $L$  al aplicar azida sódica en condiciones de sequía, también afecta a las plantas no MA pero a un nivel muy inferior, a pesar de que la inhibición de  $L_o$  es mayor en estas plantas. Por otro lado, en condiciones óptimas de riego, al aplicar azida sódica el mecanismo compensatorio se observó sólo en plantas MA donde  $L$  se mantuvo a niveles similares a las plantas sin la aplicación del inhibidor mientras en plantas no MA se redujeron tanto  $L_o$  como  $L$ , indicando que no se produjo una compensación del flujo por la vía apoplástica. Todo ello apunta a que las plantas MA tienen la capacidad para cambiar el flujo de agua entre las distintas vías de transporte disponibles de una manera más dinámica que las plantas no MA.

Así pues, siguiendo el modelo compuesto propuesto por Steudle (2000), parece que existe un mecanismo de regulación de la conductancia hidráulica mediante el cambio del flujo de transporte de agua entre las vías apoplástica y célula a célula dependiendo de las fuerzas motoras que impulsan este movimiento (Ranathunge et al., 2004). Por lo tanto, existiría una regulación del flujo hídrico en la raíz de dos tipos; uno más general y amplio que afectaría a la vía apoplástica en condiciones de transpiración elevada de la planta (condiciones óptimas), de manera que la contribución de esta vía se incrementa con la tensión generada por la transpiración. Por otro lado, habría también una regulación más fina basada en la acción de las acuaporinas, que modifica la contribución de la vía célula a célula, que tiene una resistencia relativa superior a la vía apoplástica pero que dominaría en situaciones de estrés, donde se incrementa la resistencia de la vía apoplástica como consecuencia de la formación de barreras en el cortex radical. Esta regulación fina, a su vez permitiría el paso de agua también en condiciones de transpiración en la planta, abriendo los canales de transporte de las membranas cuando aumentan los requerimientos de la misma en las hojas, o bien pueden cerrarse contribuyendo a evitar la pérdida de agua cuando el potencial hídrico del suelo se reduce. En este modelo, la presencia de micorrizas en las raíces de las plantas hospedadoras permitiría modular estos cambios entre las vías de transporte dependiendo no sólo de las fuerzas motoras (hidráulica u osmótica) sino también de la permeabilidad y resistencia de los componentes de estas vías, que se modifican con la presencia de los hongos MA en la raíz, permitiendo una mayor flexibilidad en la respuesta de estas plantas ante la escasez de agua de acuerdo con las demandas de la parte aérea, facilitando el flujo de agua por la vía apoplástica que presenta una menor resistencia que la vía célula a célula.

VII. CAPÍTULO 4



## 4. Identificación y caracterización de las acuaporinas de maíz reguladas por la simbiosis micorrízico arbuscular y sus posibles implicaciones en el desarrollo y fisiología de las plantas en condiciones de estrés hídrico.

### 4.1. INTRODUCCIÓN

La sequía es el estrés abiótico con mayor incidencia sobre los cultivos en todo el mundo. Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos que incrementan la eficiencia en el uso del agua por las plantas y la tolerancia a la sequía es fundamental para mejorar los rendimientos de las cosechas y garantizar la producción mundial de alimentos (Chaves y Oliveira, 2004).

Cuando los suelos comienzan a secarse, disminuye su potencial hídrico, y esto dificulta la absorción de agua por parte de las raíces de las plantas (Ouziad et al., 2006). Para hacer frente a esto, las plantas llevan a cabo una serie de cambios fisiológicos entre los que se incluyen la modificación de la **conductancia hidráulica radical** (Aroca et al., 2012), proceso en el que las **acuaporinas** juegan un papel fundamental (Javot y Maurel, 2002). El descubrimiento de las acuaporinas ha cambiado por completo nuestro conocimiento sobre las relaciones hídricas de las plantas y en los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo por conocer su función y regulación (Maurel et al., 2008). Así, se han encontrado altos niveles de expresión de acuaporinas en tejidos de la planta con alto flujo de agua tales como la epidermis y exodermis radicular, las células parenquimáticas adyacentes al xilema, células compañeras del floema o en las células guarda que regulan la apertura de los estomas, así como en zonas de rápido crecimiento de las plantas (Kjellbom et al., 1999; Javot y Maurel, 2002). Estos datos concuerdan con aquellas zonas en que el movimiento **vía célula a célula** es más limitante según el modelo compuesto de transporte de agua (Steudle, 2000), siendo fundamentales en condiciones de baja transpiración como en el caso de estrés hídrico y reduciendo considerablemente la resistencia de esta vía al transporte de agua (Katsuhara et al., 2008). A raíz de estos descubrimientos, las propiedades de estas proteínas, los genes que las codifican, su regulación funcional y sus implicaciones en el transporte de agua en plantas, han sido ampliamente estudiados (Ver revisiones Johansson et al., 2000; Katsuhara et al., 2008; Maurel et al., 2008). A pesar de ello, la relación que existe entre las acuaporinas y la respuesta de las plantas al déficit hídrico sigue sin ser concluyente y ha dado lugar a resultados contradictorios.

Por otro lado, la extraordinaria divergencia en los **filtros de selectividad** de las acuaporinas (Sui et al., 2001) sugiere una gran diversidad funcional de estas proteínas (Wallace et al., 2002; Bansal y Sankararamkrishnan, 2007) y es cada vez más patente que algunas acuaporinas no presentan una especificidad estricta para el agua, sino que son capaces de transportar gran cantidad de pequeños solutos neutros de relevancia fisiológica para las plantas. En particular, la capacidad



para transportar moléculas como **amonio** (Jahn et al., 2004; Loque et al., 2005) o **urea** (Gerbeau et al., 1999; Liu et al., 2003b) apunta a un importante papel de las acuaporinas en el metabolismo del nitrógeno. La difusión de CO<sub>2</sub> en las membranas celulares a través de estos poros (Uehlein et al., 2003) sugieren una función en la fotosíntesis. La capacidad para transportar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bienert et al., 2007) apunta a posibles papeles en la señalización y respuesta ante distintos tipos de estrés. El transporte de **boro** (Mitani et al., 2008) está muy relacionado con la nutrición y desarrollo estructural de las plantas y la implicación en la absorción y en el metabolismo del **silicio** (Ma y Yamaji, 2006) parece crucial en la respuesta de las plantas a estreses bióticos y abióticos (Maurel, 2007). El descubrimiento de un número cada vez mayor de moléculas complejas que pueden ser transportadas por acuaporinas (Bienert et al., 2008) las convierte en un punto clave en el estudio fisiológico y molecular del funcionamiento de las plantas.

Por su lado, la **simbiosis MA** es un claro ejemplo de los extensos cambios que se producen en las células de las raíces de la planta destinados a alojar al simbiote fúngico y muchos de estos cambios afectan directamente a las membranas celulares. Así pues, Krajinski y colaboradores (2000) propusieron que la formación de micorrizas podía generar variaciones en los patrones de expresión de genes codificantes de proteínas de membrana como las acuaporinas. Además, la simbiosis MA tiene la capacidad de alterar las propiedades hidráulicas de la raíz (Khalvati et al., 2005; Bárzana et al., 2012). Por lo tanto, sería de esperar que los hongos MA puedan también alterar la expresión de los genes de acuaporinas de las plantas o la acumulación de sus proteínas. De hecho, muchos estudios apuntan a que el control del transporte de agua a través de las acuaporinas puede ser el que condicione la conductancia hidráulica total de la planta micorrizada (Marjanovic et al., 2005; Lee et al., 2010) pudiendo ser aún más relevante su contribución en condiciones de sequía (Aroca et al., 2007; Ruiz-Lozano y Aroca, 2010). Hoy en día se ha sugerido la posible importancia de las acuaporinas para el intercambio, no sólo de agua, sino también de nutrientes entre ambos simbioses (Ruiz-Lozano y Aroca, 2010; Maurel y Plassard, 2011).

En cualquier caso, las implicaciones de esta regulación de acuaporinas por los hongos MA para la supervivencia de las plantas en condiciones de estrés no están claras. Los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación en los últimos años muestran que los genes de acuaporinas responden de manera diferente dependiendo de las condiciones específicas del estrés osmótico aplicado y la presencia o ausencia de hongos MA en las raíces de la planta hospedadora (Aroca et al. 2007; 2008b). La mayor dificultad para encontrar un patrón claro en el control de las acuaporinas radica en el gran número de isoformas que están presentes en los distintos tejidos y que son reguladas cada una de ellas de manera diferente (Valot et al., 2005). En cualquier caso, el número de acuaporinas analizadas en estos estudios ha sido muy limitado y se ha llevado a cabo en distintas plantas hospedadoras por lo que existe aún un gran desconocimiento sobre la modulación de la expresión de la mayor parte de las acuaporinas por las MA y su relación con los cambios en la

conductancia hidráulica, el estatus hídrico y la tolerancia de las plantas a la sequía (Ruiz-Lozano et al., 2006). De hecho, se ha sugerido que para llegar a conclusiones correctas sobre el papel de las acuaporinas en un ambiente particular es necesario el análisis de todos los miembros de esta familia presentes en dicha planta (Alexandersson et al., 2005; Maurel, 2007). Además, las respuestas de las plantas al estrés dependen en gran medida de las condiciones de cultivo y de la intensidad, tasa y duración de la exposición al estrés.

## 4.2. OBJETIVOS

Por todo ello, el primer objetivo que nos planteamos fue analizar como la simbiosis MA modula la expresión génica de todas y cada una de las acuaporinas presentes en plantas de maíz, tanto en condiciones óptimas como bajo distintas condiciones de estrés hídrico.

Por otro lado, para aquellos genes que mostrasen regulación por la simbiosis MA en condiciones de déficit hídrico y para los cuales pudimos diseñar anticuerpos específicos, determinamos el patrón de acumulación de las correspondientes proteínas en las raíces de maíz.

Por último, un objetivo adicional fue la caracterización funcional de las acuaporinas reguladas por las MA con el fin de obtener información sobre las moléculas que pueden estar implicadas en la respuesta de la simbiosis MA al estrés hídrico y cómo podrían afectar a la mayor tolerancia a la sequía de estas plantas, dando así respuesta a los objetivos específicos número 3, 4 y 5 de esta tesis doctoral.

## 4.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados llevamos a cabo dos experimentos independientes en los que las plantas fueron sometidas a estrés hídrico de diferente intensidad y duración. En el experimento 1 la mitad de las plantas se sometieron a un estrés por cese de riego durante 4 días, causando un estrés hídrico moderado y de corta duración. En el experimento 2 la mitad de las plantas se sometieron a un estrés hídrico más severo y mantenido durante 12 días, llevando el sustrato al 50-55% de la capacidad de campo (para más información, ver material y métodos).

### • Experimento 1

- Cww: Plantas control cultivadas en condiciones óptimas de riego.
- Riww: Plantas micorrizadas cultivadas en condiciones óptimas de riego.
- Cds: Plantas control sometidas a sequía durante 4 días.
- Rids: Plantas micorrizadas sometidas a sequía durante 4 días.

### • Experimento 2

- Cww: Plantas control cultivadas en condiciones óptimas de riego.
- Riww: Plantas micorrizadas cultivadas en condiciones óptimas de riego.
- Cds: Plantas control sometidas a sequía durante 12 días.
- Rids: Plantas micorrizadas sometidas a sequía durante 12 días.

## 4.4. RESULTADOS

### 4.4.1. Crecimiento y colonización radical de plantas de maíz.

En ambos experimentos, las plantas MA crecieron más que las plantas no MA (Tabla 1). En el experimento 1 de sequía corta, el aumento de la biomasa en las plantas MA respecto a las no MA fue un 40% y 35% superior en condiciones óptimas de riego y de estrés hídrico, respectivamente. En el experimento 2 de sequía sostenida, este incremento fue de un 56% en condiciones óptimas y de un 26% en condiciones de estrés hídrico. Las diferencias en la tasa global de crecimiento entre los dos experimentos están causadas por diferencias en el tipo de suelo y las condiciones de crecimiento utilizadas en los experimentos. Ninguno de los tratamientos de sequía influyó significativamente en el crecimiento de las plantas, independiente de la presencia de hongos MA.

Como era de esperar, las plantas no inoculadas no presentaron colonización (Tabla 4.1). En el experimento 1, las plantas MA exhibieron un mínimo del 69% de micorrización. En el experimento 2 mostraron más del 76% de micorrización. El tratamiento de riego no afectó a este parámetro en ninguno de los dos experimentos.

	Experimento 1	Experimento 2
<b>Tratamiento</b>	<b>PS parte aérea</b>	<b>PS parte aérea</b>
<b>Condiciones óptimas</b>		
Control	1,50 ±0,04b	3,48 ±0,4b
<i>R. intraradices</i>	2,11 ±0,05a	5,44 ±0,2a
<b>Sequía</b>		
Control	1,45 ±0,02b	3,78 ±0,5b
<i>R. intraradices</i>	1,95 ±0,03a	4,75 ±0,2a

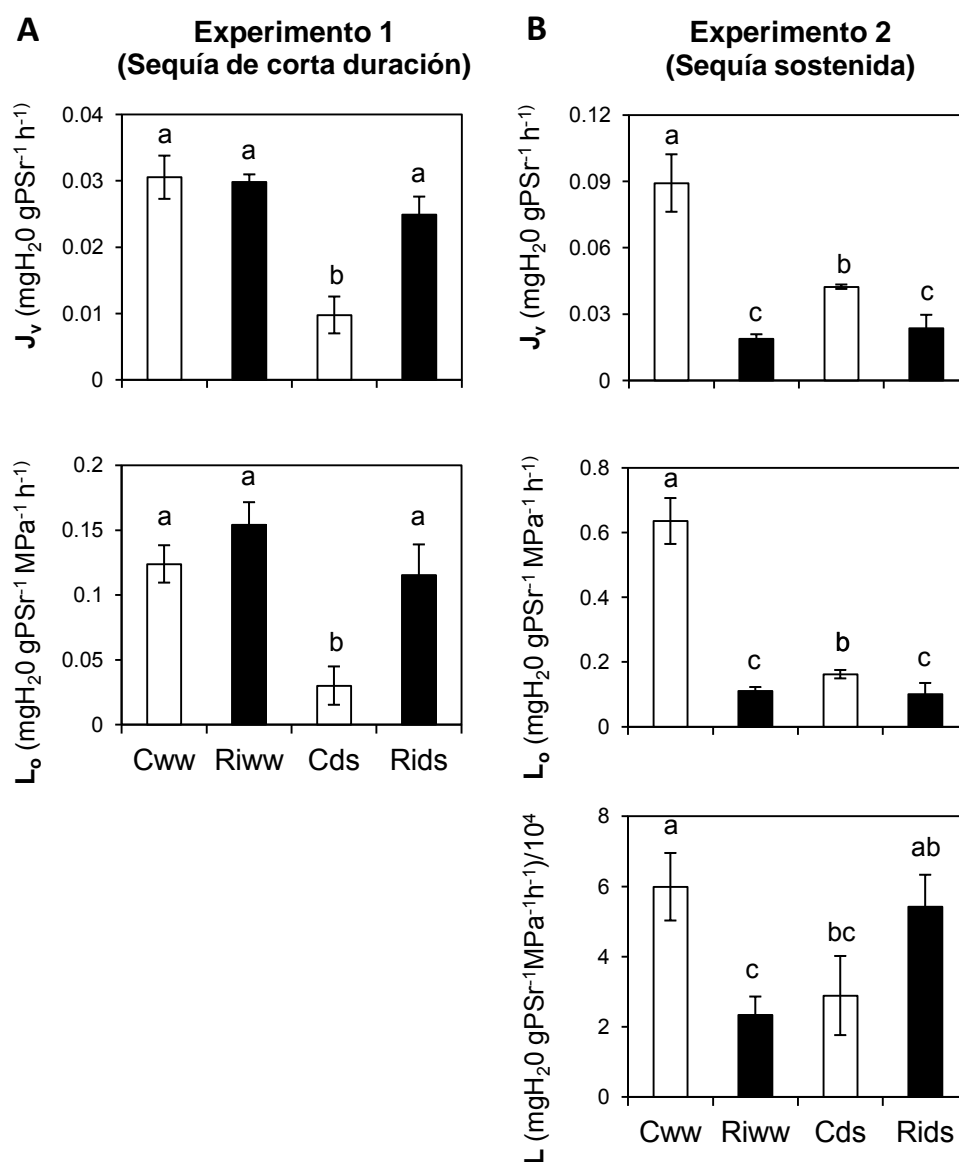
  

	MA (%)	MA (%)
<b>Condiciones óptimas</b>		
Control	0 ±0,0b	0 ±0,0b
<i>R. intraradices</i>	74 ±3,5a	76 ±1,2a
<b>Sequía</b>		
Control	0 ±0,0b	0 ±0,0b
<i>R. intraradices</i>	69 ±0,8a	78 ±1,7a

**Tabla 4.1.** Peso seco de parte aérea (g planta<sup>-1</sup>) y porcentaje de longitud de raíz micorrizada en dos experimentos de plantas de maíz cultivadas en condiciones óptimas de riego o sometidas a estrés hídrico (corto o sostenido). Medias seguidas por letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) según el test de LSD (n = 6).

### 4.4.2. Propiedades hidráulicas de las raíces de maíz.

En ambos experimentos, la sequía redujo la tasa de flujo de savia ( $J_v$ ) y la conductividad osmótica radical ( $L_o$ ) en las plantas no MA. Esta disminución fue de aproximadamente el 70% y 50% (experimentos 1 y 2) para  $J_v$  y del 75% para  $L_o$ , comparado con los valores en condiciones óptimas de riego. La micorrización generó efectos diferentes en ambos experimentos.



**Figura 4.1.** Tasa de flujo de savia libremente exudada, ( $J_v$ ) conductancia osmótica radical ( $L_o$ ) y conductancia hidrostática radical ( $L$ ) en plantas de maíz control sin inocular (C, barras blancas) o inoculadas con *R. intraradices* (Ri, barras negras). (A) Experimento 1, con plantas en condiciones óptimas de regadío (ww) o sometidas a estrés hídrico de corta duración (ds). (B) Experimento 2, con plantas en condiciones óptimas de regadío (ww) o sometidas a estrés hídrico sostenido (ds). Las barras representan el valor medio con su error estándar ( $n = 6$  para  $J_v$  y  $L_o$ ,  $n = 4$  para  $L$ ). Las distintas letras en las barras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) calculadas mediante el test de LSD.

En el experimento 1 no afectó a  $J_v$  y  $L_o$  en condiciones óptimas de riego. En condiciones de sequía corta, las plantas MA no redujeron  $J_v$  o  $L_o$  respecto a sus valores en condiciones óptimas, presentando en ambos casos valores muy superiores a los de las plantas no MA. En el experimento 2, la micorrización redujo fuertemente ambos parámetros bajo condiciones óptimas, sin que se produjesen cambios adicionales al aplicar sequía sostenida a estas plantas. Dada la fuerte disminución de la conductancia osmótica radical ( $L_o$ ) en este experimento sin que se viese por ello afectado el crecimiento de las plantas MA, decidimos medir la conductancia hidráulica radical ( $L$ )

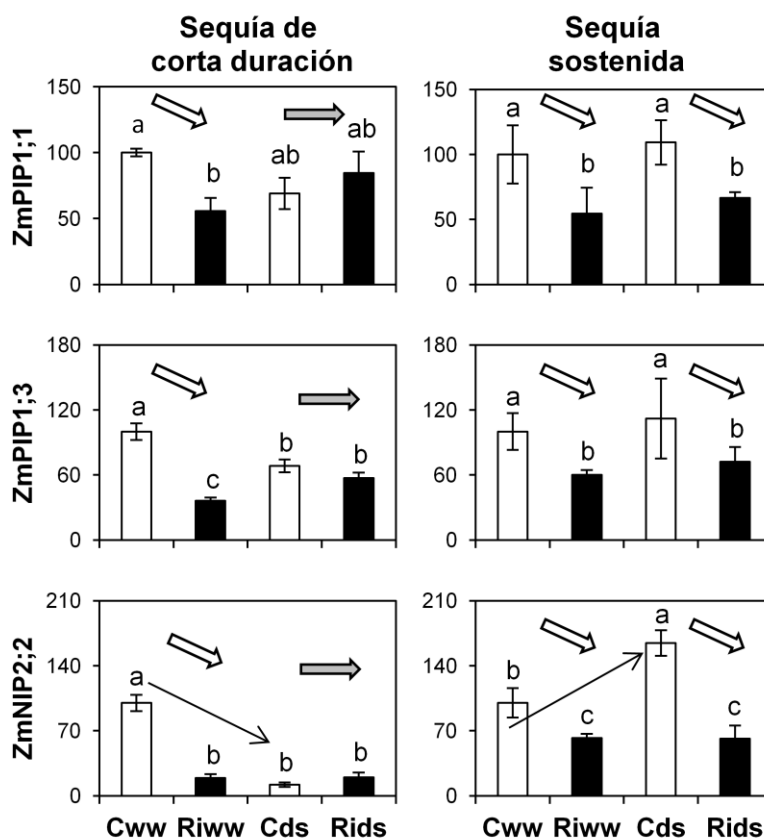
a fin de analizar la posible contribución de las distintas vías de transporte de agua en plantas MA y no MA. La inoculación con *R. intraradices* redujo L en aproximadamente un 60% bajo condiciones óptimas de riego, coincidiendo con la disminución observada en  $J_v$  y  $L_o$ . En condiciones de sequía sostenida, se produjo una reducción de L en plantas no MA de aproximadamente el 50%, mientras que en plantas MA se produjo un fuerte incremento de este parámetro, alcanzando valores similares a los encontrados en las plantas control sin micorizar en condiciones óptimas de riego.

#### 4.4.3. Expresión de las acuaporinas en raíces de maíz.

Los resultados del análisis de expresión de todas y cada una de las 31 acuaporinas de maíz revelaron que la expresión de muchas de ellas no está afectada por la simbiosis MA bajo ninguna de las condiciones de regadío aplicadas en ambos experimentos (datos no mostrados). Sin embargo, la expresión de 16 genes de acuaporinas fue regulada por las MA, aunque de manera diferente dependiendo del tratamiento de estrés hídrico aplicado. Así pues, estas 16 isoformas fueron clasificadas en seis grupos en función de los patrones de expresión de sus genes\*, e incluyen acuaporinas de todas las subfamilias descritas por Chaumont et al., (2001).

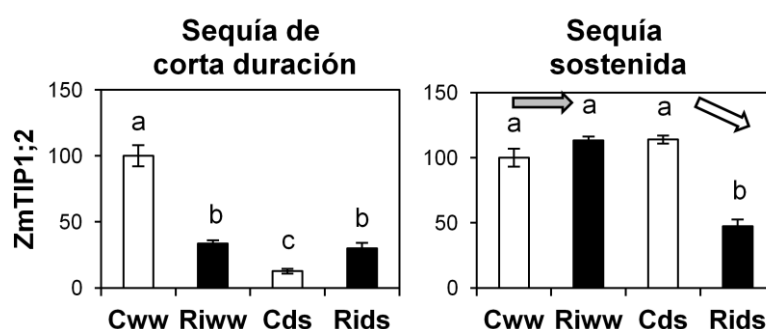
\*Las figuras de este apartado representan la distribución de las acuaporinas en estos seis patrones de expresión artificiales atendiendo a su diferente regulación por la simbiosis MA en los experimentos 1 y 2. Las barras blancas representan plantas control sin inocular (C), las barras negras representan plantas inoculadas con *R.intraradices* (Ri). Las plantas se sometieron a condiciones óptimas de riego (ww) o estrés hídrico (ds). Las flechas blancas representan una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en la expresión entre plantas MA y no MA, las flechas negras representan un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) en la expresión entre plantas MA y no MA, y las flechas grises representan una expresión no afectada por la micorización ( $P \geq 0,05$ ), determinado mediante el test de LSD.

#### Patrón 1.



Los genes *ZmPIP1;1*, *ZmPIP1;3* y *ZmNIP2;2* están incluidos dentro de este patrón. En ambos experimentos, la micorrización causó una inhibición de la expresión de estos genes en condiciones óptimas de riego. Bajo condiciones de estrés a corto plazo, no hubo cambios significativos en su expresión entre plantas MA y no MA. Por el contrario, bajo condiciones de estrés sostenido, la micorrización mantuvo bajos los niveles de expresión de estos genes respecto a las plantas no MA. Cabe destacar que la expresión de *ZmNIP2;2* en plantas no MA fue inhibida notablemente por la sequía corta, mientras que se indujo en estas plantas cuando se sometieron a estrés sostenido.

### Patrón 2.

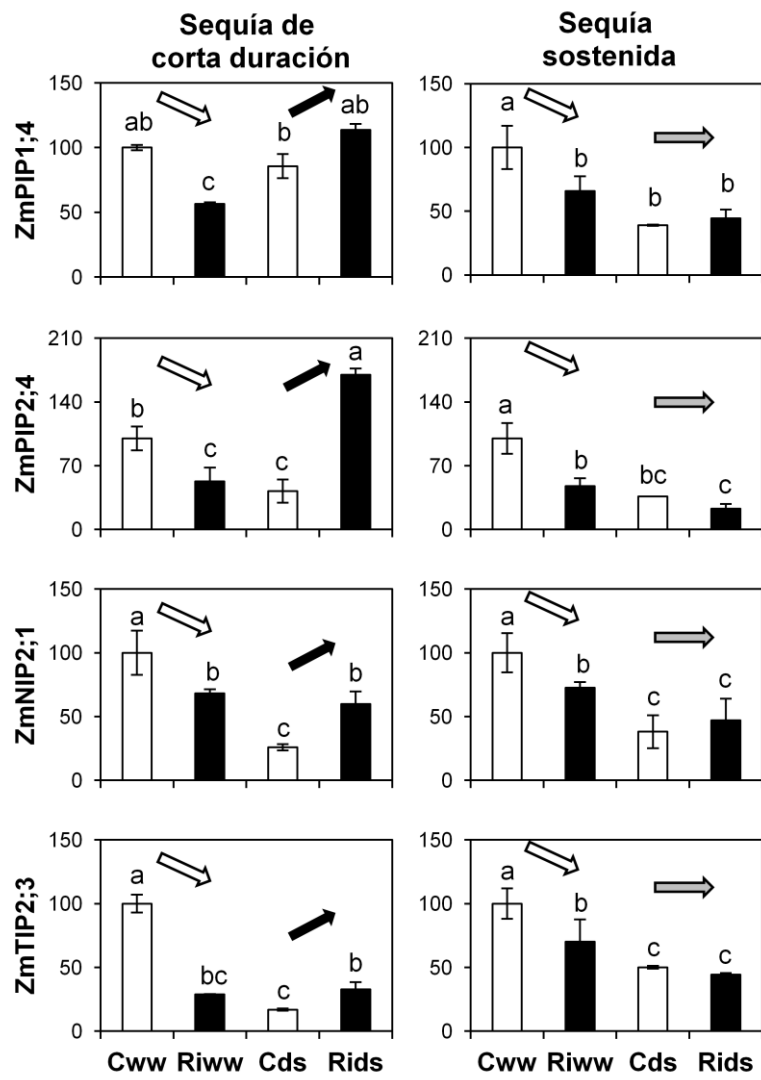


Sólo la acuaporina *ZmTIP1;2* siguió este patrón. En el experimento 1, el gen fue regulado negativamente tanto por la micorrización como por el estrés impuesto. Por el contrario, en las plantas MA, el estrés a corto plazo no modificó la expresión de este gen que, sin embargo, fue superior que en plantas no MA. En el experimento 2, los niveles de expresión de *ZmTIP1;2* fueron similares en plantas MA y no MA en condiciones óptimas de riego. El estrés prolongado no afectó a la expresión de este gen en plantas no MA pero lo redujo significativamente en plantas MA.

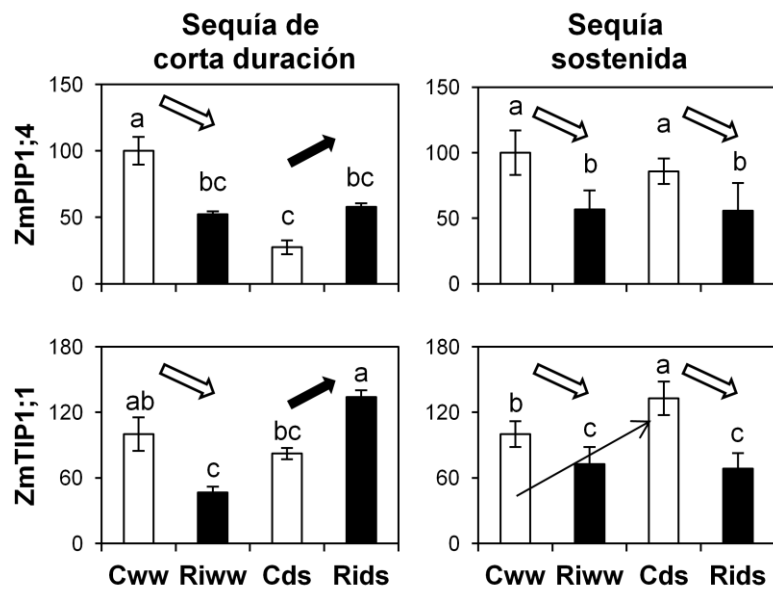
### Patrón 3.

Los genes *ZmPIP1;4*, *ZmPIP2;4*, *ZmNIP2;1* y *ZmTIP2;3* se encuentran dentro de este patrón. En ambos experimentos, la micorrización inhibió la expresión de estos genes cuando las plantas se cultivaron en condiciones óptimas. Cuando las plantas se sometieron a sequía de corta duración, la expresión de tres de los cuatro genes se redujo en plantas no MA, mientras que todos ellos presentaron mayor expresión en las plantas MA que en las no MA bajo estas condiciones. En el experimento 2, además de la disminución por micorrización en condiciones óptimas, el estrés sostenido también redujo la expresión de todos estos genes en plantas no MA y de tres de ellos en plantas MA (*ZmPIP2;4*, *ZmNIP1;1* y *ZmTIP2;3*) siendo los valores similares entre plantas MA y no MA.

Patrón 3.



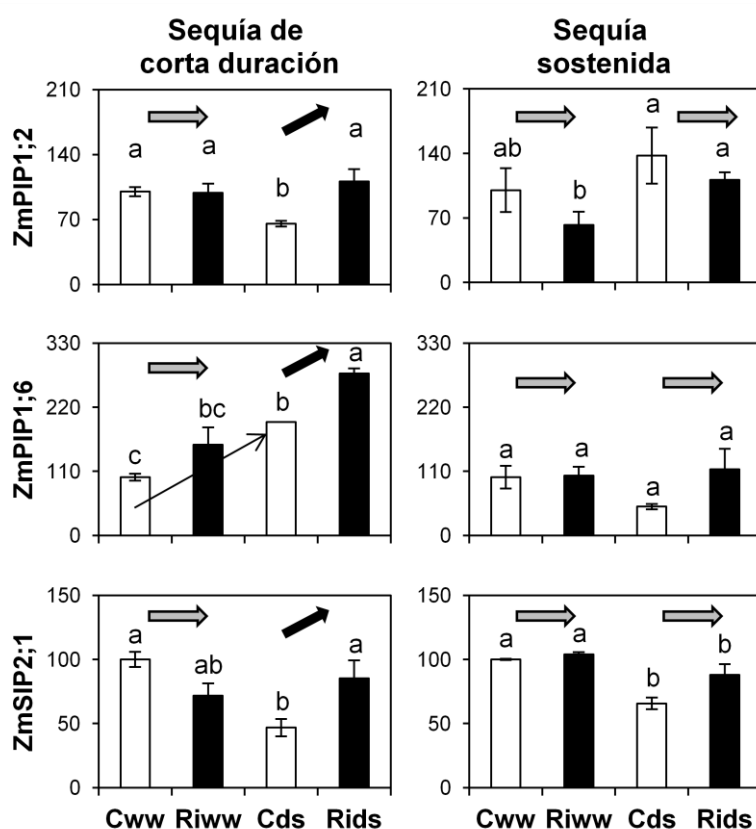
Patrón 4.



Los genes *ZmPIP2;2* y *ZmTIP1;1* son los representantes de este patrón.

En ambos experimentos, la micorrización redujo la expresión de ambos genes bajo condiciones óptimas de riego. La micorrización provocó el aumento de la expresión de estos genes en condiciones de estrés a corto plazo, encontrándose el efecto contrario en condiciones de estrés sostenido, donde se inhibieron significativamente con la micorrización. Las plantas no MA mostraron un aumento de la expresión de *ZmTIP1;1* cuando se sometieron a estrés sostenido.

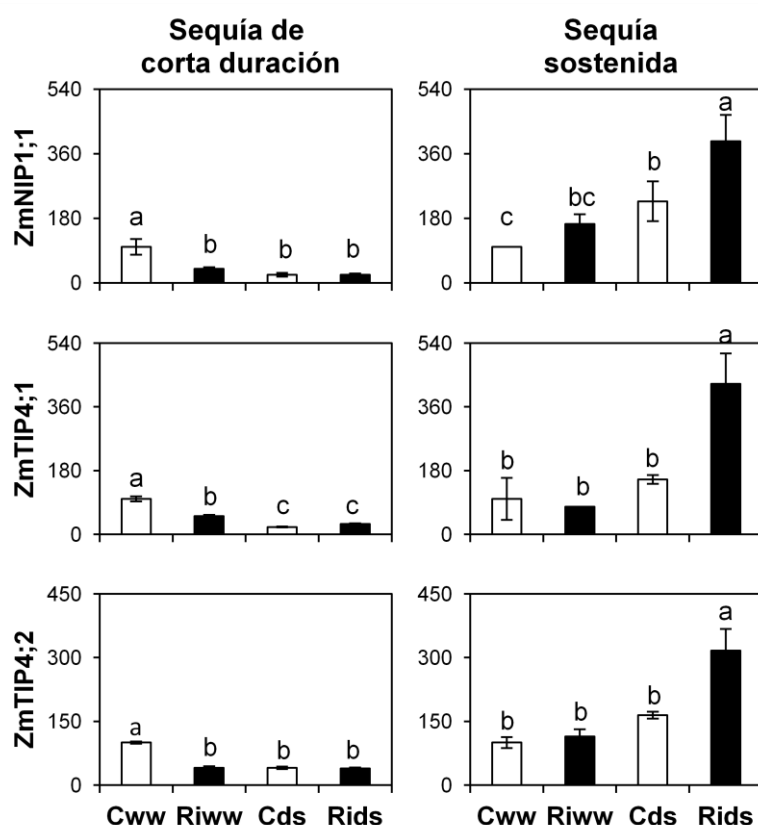
### Patrón 5.



Las acuaporinas *ZmPIP1;2*, *ZmPIP1;6* y *ZmSIP2;1* se agrupan dentro de este patrón de expresión. En ambos experimentos, la micorrización por sí misma no generó cambios significativos en la expresión de estos genes en condiciones óptimas de riego. Cuando las plantas se sometieron a estrés corto, la expresión de *ZmPIP1;2* y *ZmSIP2;1* disminuyó en plantas no MA, mientras que *ZmPIP1;6* aumentó su expresión en estas plantas. En cualquier caso, las raíces micorrizadas presentaron mayor expresión de estos tres genes que las no MA. Cuando las plantas se sometieron a estrés sostenido, la micorrización no produjo variaciones significativas en la expresión de estos genes.



























## Patrón 6.



Los genes *ZmNIP1;1*, *ZmTIP4;1* y *ZmTIP4;2* están incluidos en este grupo. En el experimento 1, la micorrización causó la disminución de la expresión de estos genes en condiciones óptimas de riego pero no produjo cambios significativos respecto a las plantas no MA en condiciones de estrés de corta duración. En el experimento 2, se observó un efecto contrario, sin cambios por micorrización en condiciones óptimas de riego y un aumento de la expresión de los tres genes por MA cuando las plantas se sometieron a estrés sostenido. Cabe destacar que estos genes fueron inhibidos por la sequía corta en plantas no MA pero no se vieron afectados por el estrés sostenido, salvo *ZmNIP1;1* que incluso aumentó su expresión bajo estas condiciones.

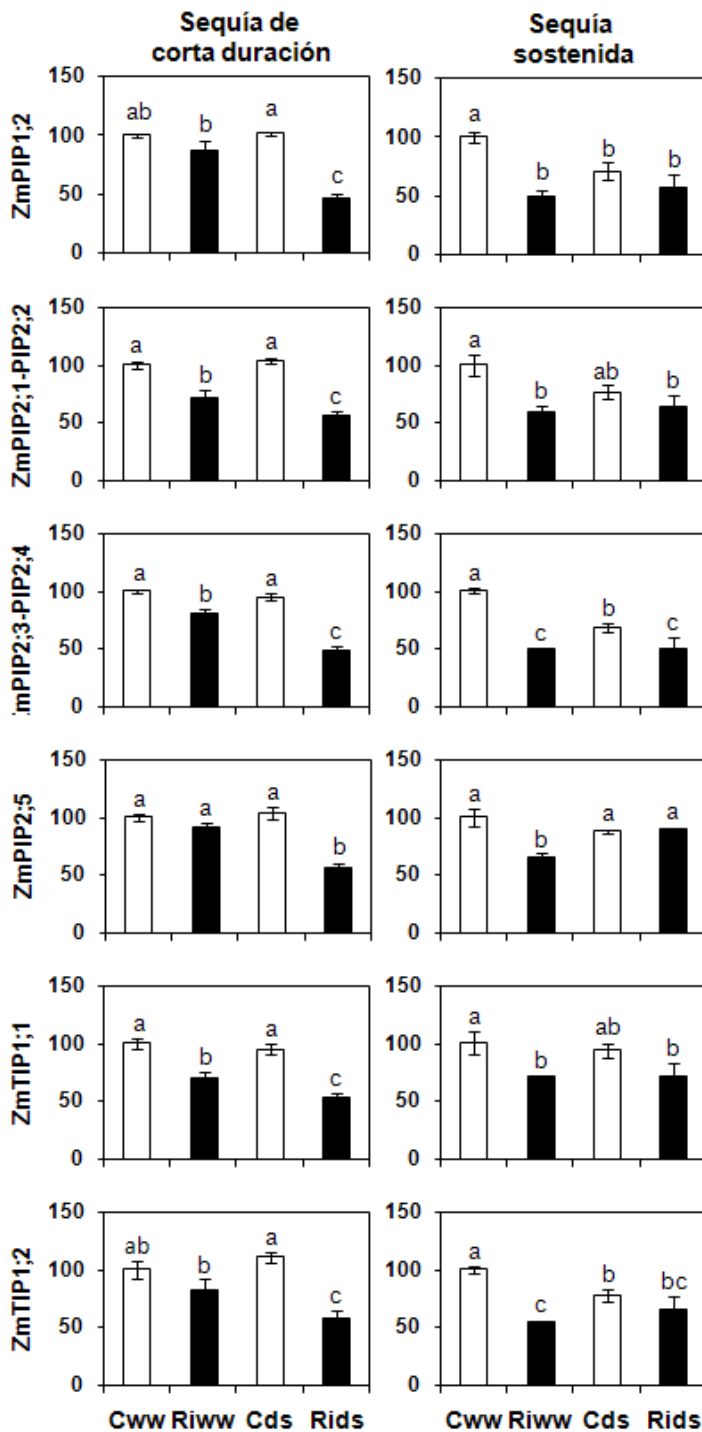
Como resumen de los datos de expresión encontramos claramente que las plantas no MA sometidas a ambos tipos de estrés mantuvieron o disminuyeron la expresión de la mayor parte de las acuaporinas analizadas en este estudio salvo las notables excepciones de las acuaporinas *ZmPIP1;6* (que aumentó con el estrés a corto plazo) y las *ZmTIP1;1*, *ZmNIP1;1* y *ZmNIP2;2* que aumentaron su expresión con la sequía sostenida. Por el contrario, las plantas MA mostraron una tendencia a aumentar la expresión de muchas de las acuaporinas en condiciones de sequía corta y a disminuir o mantener su expresión en condiciones de sequía sostenida, con la notable excepción de

las acuaporinas incluidas en el grupo de patrón de expresión número 6, como se muestra en la siguiente tabla resumen:

	Sequía de corta duración		Sequía sostenida		Genes
	CWW → RiWW	CDS → RiDS	CWW → RiWW	CDS → RiDS	
<b>Patrón 1</b>					ZmPIP1;1 ZmPIP1;3 ZmNIP2;2
<b>Patrón 2</b>					ZmTIP1;2
<b>Patrón 3</b>					ZmPIP1;4 ZmPIP2;4 ZmNIP2;1 ZmTIP2;3
<b>Patrón 4</b>					ZmPIP2;2 ZmTIP1;1
<b>Patrón 5</b>					ZmPIP1;2 ZmPIP1;6 ZmSIP2;1
<b>Patrón 6</b>					ZmNIP1;1 ZmTIP4;1 ZmTIP4;2

#### 4.4.4. Acumulación de acuaporinas en raíces de maíz.

Dentro de cada patrón de expresión, la acumulación de una o varias de las acuaporinas fue analizada, exceptuando los patrones 1 y 6 para los cuales no pudimos obtener anticuerpos adecuados. La selección de las acuaporinas se hizo basándose en sus elevados niveles de expresión y su posible relación con el transporte de agua. En el patrón 4, se incluyó además la ZmTIP1;1 por su elevadísima expresión y patrón de expresión particularmente interesante. También se añadió el análisis de la ZmPIP2;5, a pesar de no aparecer entre las 16 acuaporinas seleccionadas, por ser una de las acuaporinas más expresadas en raíces de maíz y ser reconocida como una de las mayores transportadoras de agua en raíces (Chaumont et al., 2000), utilizada por ello en múltiples estudios como control positivo para el análisis de transporte de esta molécula. Así, las proteínas ZmPIP1;2, ZmPIP2;1-PIP2;2, ZmPIP2;3-PIP2;4, ZmPIP2;5, ZmTIP1;1 y ZmTIP1;2 fueron analizadas. En el experimento 1, la micorrización en si misma redujo la acumulación de todas las acuaporinas analizadas, siendo esta disminución más notable en condiciones de estrés hídrico, mientras las



**Figura 4.2.** Patrón de acumulación de las proteínas ZmPIP1;2, ZmPIP2;1-PIP2;2, ZmPIP2;3-PIP2;4, ZmPIP2;5, ZmTIP1;1 y ZmTIP 1;2 en las membranas de raíces de maíz. Ver la leyenda de la Figura 4.1 para más detalles.

#### 4.4.5.1. Transporte de agua

La capacidad para transportar agua fue analizada en las acuaporinas ZmPIP2;2, ZmPIP1;3-PIP1;4, ZmPIP1;3 coexpresada con ZmPIP2;2, ZmTIP1;1, ZmTIP1;2, ZmNIP1;1, ZmNIP2;1 y ZmNIP2;2 utilizando la técnica de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*. Todas

plantas no MA no modificaron su contenido en proteínas a causa de la sequía manteniendo niveles siempre superiores a las plantas MA.

En el experimento 2, el mismo efecto de reducción se observó en las plantas MA en condiciones óptimas de regadío. En plantas no MA, el estrés hídrico sostenido redujo la acumulación de ZmPIP1;2, ZmPIP2;3-PIP2;4 y ZmTIP1;2. En plantas MA se produjo el aumento en la acumulación de ZmPIP2;5 y no afectó al resto de acuaporinas analizadas en condiciones de sequía.

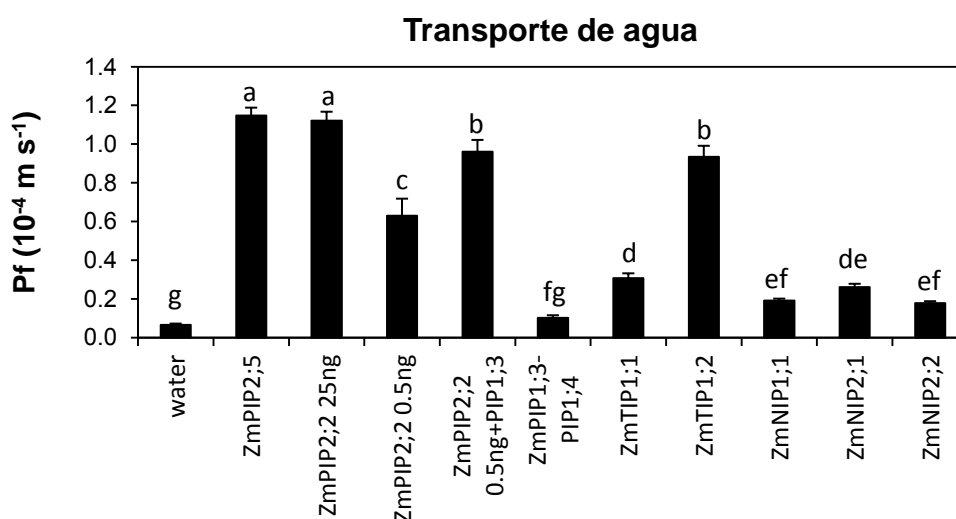
#### 4.4.5. Caracterización funcional de acuaporinas.

Dentro de cada grupo de expresión se realizó la caracterización funcional de diversas acuaporinas seleccionadas basándose en su elevada expresión, el interés particular de su patrón específico y el hecho de que no hubieran sido caracterizadas previamente por otros autores.

ellas salvo la ZmPIP1;3-PIP1;4 permitieron la difusión de agua a través de las membranas de los ovocitos. ZmPIP2;2 mostró una elevada capacidad para el transporte de agua con un coeficiente de permeabilidad osmótica (Pf) similar al del control positivo (ZmPIP2;5) (Chaumont et al., 2000). La inyección de 25ng de cRNA de la acuaporina ZmPIP1;3-PIP1;4 no produjo un incremento de Pf por sí misma, sin embargo, cuando evaluamos el efecto cooperativo de esta proteína con las proteínas PIP2 mediante la co-inyección con 0,5ng de cRNA de ZmPIP2;2, encontramos un aumento significativo del Pf en comparación con ovocitos inyectados con 0,5ng de ZmPIP2;2 solamente, confirmando que las proteínas ZmPIP1 necesitan de su coexpresión con las ZmPIP2 para que se detecte su actividad (Fetter et al., 2004).

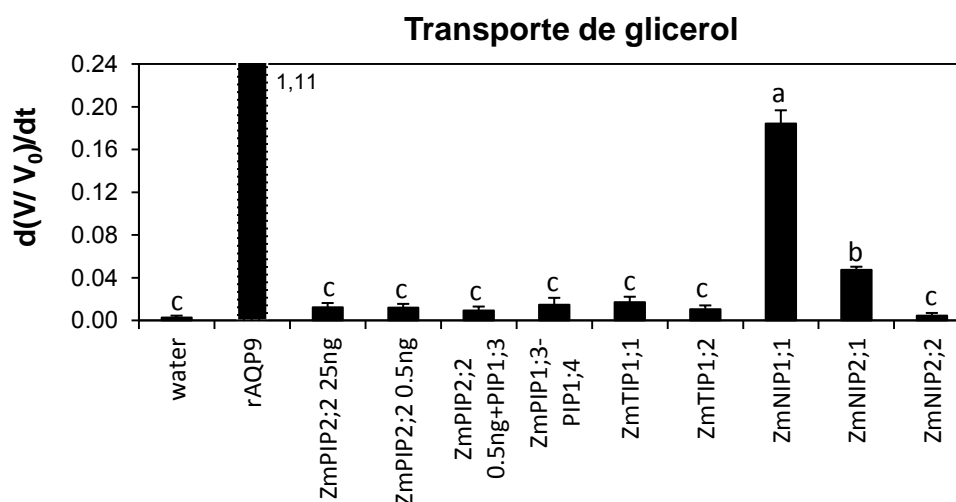
Dentro del subgrupo de las TIPs, ambas proteínas mostraron su capacidad para el transporte de agua con valores de Pf de  $0,93 \cdot 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$  para la ZmTIP1;2 y de 0,3 para la ZmTIP1;1. Los resultados no deben ser interpretados en términos de permeabilidad intrínseca por monómero de acuaporina puesto que pueden darse diferencias en la expresión entre las distintas isoformas en las membranas de los ovocitos.

Por otro lado, todas las NIPs mostraron también capacidad para transportar agua a través de las membranas, aunque, como esperábamos por los análisis de estructura del poro, en menor cantidad que otros subgrupos. ZmNIP2;1 mostró valores de Pf de aproximadamente  $0,26 \cdot 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$  mientras ZmNIP1;1 y ZmNIP2;2 mostraron valores de aproximadamente  $0,19 \cdot 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$ .



**Figura 4.3.** Transporte de agua en ovocitos de *X. laevis* inyectados con 25 ng de ZmPIP2;5 como control positivo, 25 o 0,5 ng de ZmPIP2;2, co-expresión de ZmPIP1;3 y 0,5 ng de ZmPIP2;2, o 25 ng de ZmPIP1;3-PIP1;4, ZmTIP1;1, ZmTIP1;2, ZmNIP1;1, ZmNIP2;1 y ZmNIP2;2. La inyección de agua fue utilizada como control negativo. Las barras representan el valor medio del coeficiente de permeabilidad al agua (Pf) con su error estándar (n = 10-20). Las distintas letras en las barras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) calculadas mediante el test de LSD.

## 4.4.5.2. Transporte de glicerol



**Figura 4.4.** Transporte de glicerol en ovocitos de *X. laevis* inyectados con 25 ng de rAQP9 como control positivo, 25 o 0,5 ng de ZmPIP2;2, co-expresión de ZmPIP1;3 y 0,5 ng de ZmPIP2;2, o 25 ng de ZmPIP1;3-PIP1;4, ZmTIP1;1, ZmTIP1;2, ZmNIP1;1, ZmNIP2;1 y ZmNIP2;2. La inyección de agua fue utilizada como control negativo. Las barras representan el valor medio de la variación de volumen a lo largo del tiempo ( $d(V/V_0)/dt$ ). Ver la leyenda de la Figura 3.3 para más detalles.

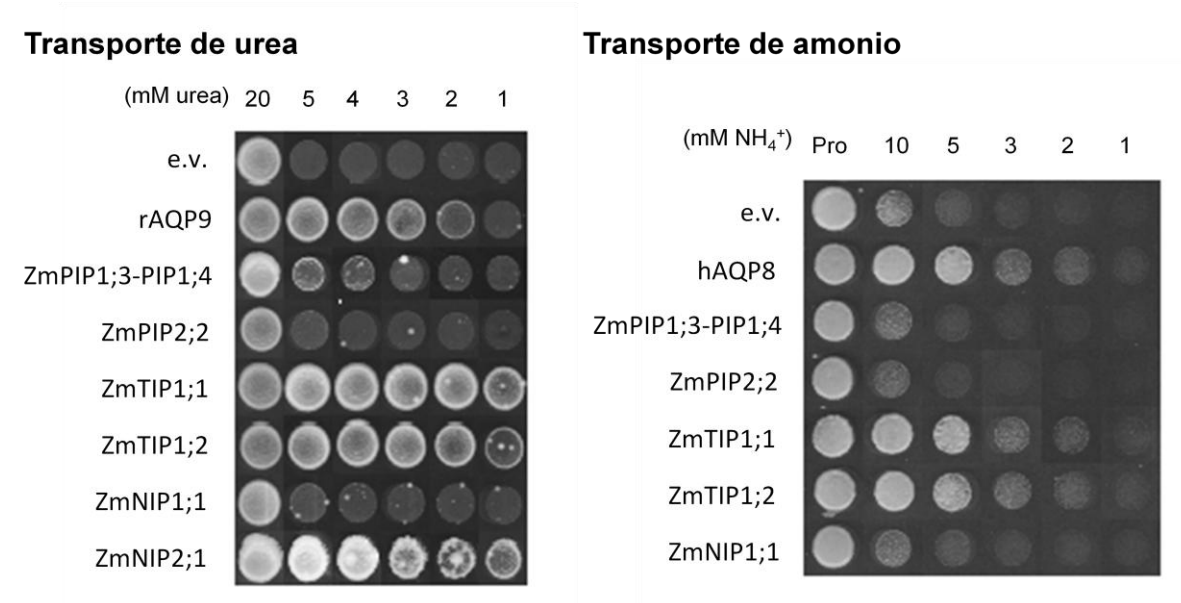
La capacidad para transportar glicerol fue testada en las acuaporinas ZmPIP1;3-PIP1;4, ZmPIP2;2, ZmPIP1;3 co-expresada con ZmPIP2;2, ZmTIP1;1, ZmTIP1;2, ZmNIP1;1, ZmNIP2;1 y ZmNIP2;2 mediante expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*. Aparte del control positivo (AQP9), sólo las ZmNIP1;1 y ZmNIP2;1 fueron capaces de transportar glicerol a través de las membranas de los ovocitos, mostrando la ZmNIP1;1 un mayor transporte ( $P_f = 0,210^{-4} \text{ m s}^{-1}$ ), como esperábamos atendiendo a su filtro de selectividad altamente especializado.

## 4.4.5.3. Transporte de compuestos nitrogenados

Para analizar el transporte de urea, la raza de levadura YNVW1 fue transformada con un vector vacío o vectores conteniendo las proteínas AQP9 (control positivo) ZmPIP1;3-ZmPIP1;4, ZmPIP2;2, ZmTIP1;1, ZmTIP1;2, ZmNIP1;1 o ZmNIP2;1. Las levaduras que contenían el vector vacío fueron incapaces de crecer en un medio con 1mM de urea, pero las células en las que se expresó ZmTIP1;1 o ZmTIP1;2 sí crecieron en este mismo medio, demostrando su capacidad estructural para transportar este compuesto. Sin embargo, en ovocitos sólo la ZmTIP1;2 mostró dicha capacidad (datos no presentados), por lo que los resultados de expresión heteróloga han de ser tomados siempre con cierta precaución. Por último, y de acuerdo con los resultados de Gu et al. (2012), la proteína ZmNIP2;1 también fue capaz de transportar urea.

Para testar la capacidad de las acuaporinas seleccionadas para transportar  $\text{NH}_3$ , la cepa de levaduras  $\Delta\text{mep1-3}$  fue transformada con un vector vacío o vectores conteniendo hAQP8 (control positivo), ZmPIP1;3-PIP1;4, ZmPIP2;2, ZmTIP1;1, ZmTIP1;2, o ZmNIP1;1.

Ninguna de las levaduras transformadas fue capaz de crecer en un medio suplementado con 1mM de ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) como única fuente de nitrógeno. Las levaduras que contenían vectores con las proteínas ZmTIP1;1 y ZmTIP1;2 fueron capaces de crecer a concentraciones de 2, 3 y 5 mM de ion amonio, indicando su permeabilidad al  $\text{NH}_3$ , mientras que las acuaporinas ZmPIP1;3-ZmPIP1;4, ZmPIP2;2 y ZmNIP1;1 no mostraron dicha capacidad.



**Figura 4.5.** Análisis del transporte de urea y amonio en sistemas de levaduras (razas YNVW1 para urea y  $\Delta\text{mep1-3}$  para amonio) transformadas con un vector vacío, rAQP9 (para urea) o hAQP8 (para amonio) como control positivo, ZmPIP1;3/PIP1;4, ZmPIP2;2, ZmTIP1;1, ZmTIP1;2, ZmNIP1;1 o ZmNIP2;1 (en el test de urea). Las levaduras crecieron en medios suplementados con distintas concentraciones de urea o amonio como única fuente de N. En el test de amonio, se incluyó además un medio suplementado en prolina como control positivo. Las imágenes fueron tomadas después de 9 días de crecimiento a 28 °C. Se llevaron a cabo un mínimo de dos experimentos independientes con resultados consistentes.

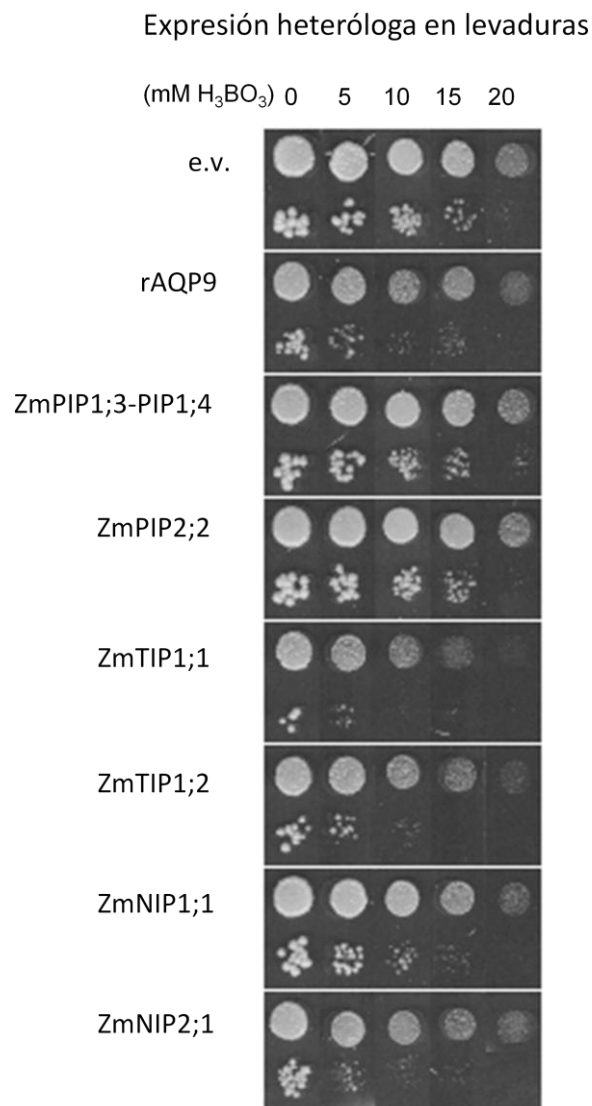
#### 4.4.5.4. Transporte de metaloides

El transporte de los metaloides B y Si fue testado mediante expresión heteróloga en levaduras basándose en la toxicidad de dichos compuestos para el crecimiento de las mismas.

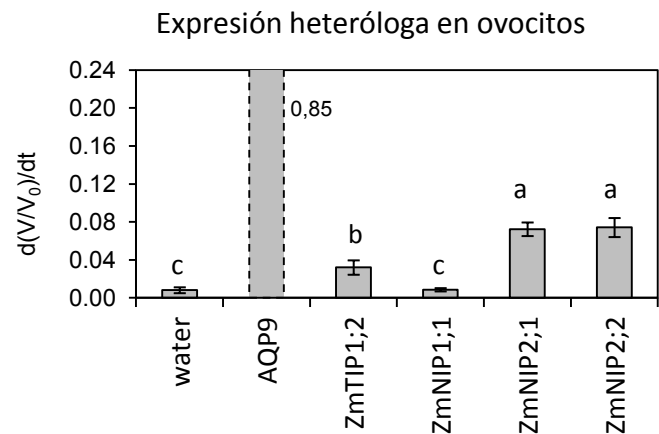
En el caso del boro, la cepa YNVW1 fue transformada con un vector vacío o con vectores conteniendo las proteínas rAQP9 (control positivo), ZmPIP1;3-PIP1;4, ZmPIP2;2, ZmTIP1;1, ZmTIP1;2, ZmNIP1;1 o ZmNIP2;1. Las levaduras transformadas con el vector vacío o conteniendo las proteínas ZmPIP1;3-PIP1;4 o ZmPIP2;2, no sufrieron el efecto del incremento del ácido bórico hasta la concentración de 15mM, indicando su incapacidad para transportar este compuesto. A 5mM de ácido bórico, la inhibición debida a la toxicidad del mismo apareció en los transformantes conteniendo el control positivo y las proteínas ZmNIP2;1, ZmTIP1;1, y ZmTIP1;2 y continuó incrementando a medida que aumentamos la concentración del mismo. En presencia de 20mM de ácido bórico, se produjo la inhibición prácticamente total del crecimiento de las levaduras que

contenían cualquiera de las proteínas ZmTIP, indicando una elevada capacidad para transportar este compuesto, incluso por enzima del control positivo. En el caso de ZmNIP1;1, la inhibición del crecimiento de las levaduras transformadas se observó sólo a partir de 10mM de ácido bórico, lo que apunta a una capacidad para transportar este compuesto pero a un nivel muy bajo. En cualquier caso, este transporte no fue corroborado por los ensayos con ovocitos, mientras que ZmNIP2;1, ZmTIP1;2 y ZmNIP2;2 sí mostraron esta capacidad para transportar boro en este sistema heterólogo.

### Transporte de ácido bórico



**Figura 4.6.** Análisis del transporte de boro mediante un test de supervivencia de levaduras YNVW1 transformadas con un vector vacío, rAQP9 (control positivo), ZmPIP1;3-PIP1;4, ZmPIP2;2, ZmTIP1;1, ZmTIP1;2, ZmNIP1;1 o ZmNIP2;1 en un medio con distintas concentraciones de ácido bórico. Las imágenes fueron tomadas después de 6 días de crecimiento a 28 °C. Se llevaron a cabo un mínimo de dos experimentos independientes con resultados consistentes.



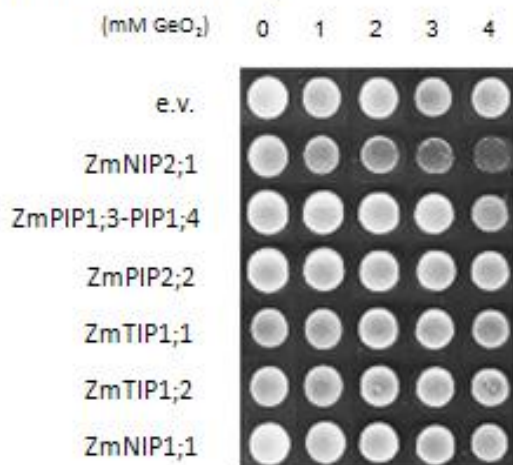
**Figura 4.7.** Transporte de boro en ovocitos de *X. laevis* inyectados con 25 ng de rAQP9 como control positivo o 25 ng de ZmTIP1;2, ZmNIP1;1, ZmNIP2;1 y ZmNIP2;2. Ver la leyenda de la Figura 3.3 para más detalles.

Para el análisis del transporte de silicio, utilizamos germanio en forma de dióxido de germanio (GeO<sub>2</sub>), un análogo químico del silicio (Ma and Yamaji, 2008; Mitani et al., 2008) tóxico para las levaduras (Tallberg et al., 2002). En el caso del silicio, las levaduras YNVW1 fueron transformadas con un vector vacío o con vectores conteniendo las proteínas ZmPIP1;3-PIP1;4, ZmPIP2;2,



ZmTIP1;1, ZmTIP1;2, ZmNIP1;1 o ZmNIP2;1 como control positivo ya que ha sido descrito como transportador de silicio tanto en el sistema heterólogo de los ovocitos (Mitani et al., 2009a) como en el de levaduras (Gu et al., 2012). Aparte del control positivo, ningún otro transformante mostró toxicidad al  $\text{GeO}_2$  en el rango de concentraciones utilizado, indicando que no transportaron Si.

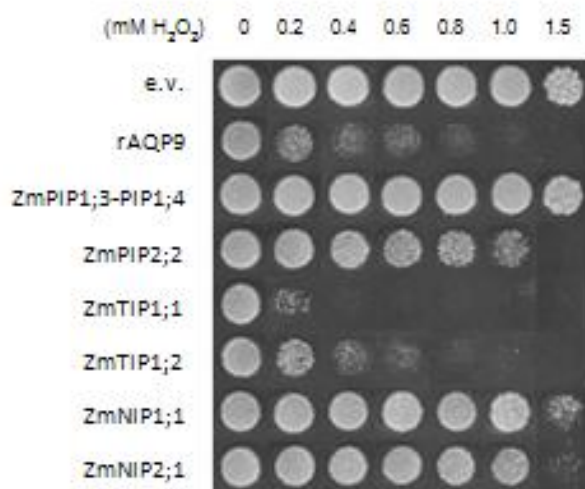
#### Transporte de $\text{GeO}_2$



**Figura 4.8.** Análisis del transporte de silicio mediante un test de supervivencia de levaduras YNVW1 transformadas con un vector vacío, ZmNIP2;1 (control positivo), ZmPIP1;3-PIP1;4, ZmPIP2;2, ZmTIP1;1, ZmTIP1;2 o ZmNIP1;1 en un medio suplementado con distintas concentraciones de  $\text{GeO}_2$  como análogo del silicio. Las imágenes fueron tomadas después de 6 días de crecimiento a 28 °C. Se llevaron a cabo un mínimo de dos experimentos independientes con resultados consistentes.

#### 4.4.5.5. Transporte de peróxido de hidrógeno

##### Transporte de peróxido de hidrógeno



**Figura 4.9.** Análisis del transporte de peróxido de hidrógeno mediante un test de supervivencia de levaduras YNVW1 transformadas con un vector vacío, rAQP9 (control positivo), ZmPIP1;3-PIP1;4, ZmPIP2;2, ZmTIP1;1, ZmTIP1;2, ZmNIP1;1 o ZmNIP2;1 en un medio con distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las imágenes fueron tomadas después de 6 días de crecimiento a 28 °C. Se llevaron a cabo un mínimo de dos experimentos independientes con resultados consistentes.

Los mutantes de levadura YNVW1 fueron transformados con un vector vacío o vectores conteniendo las proteínas rAQP9 (control positivo) ZmPIP1;3-ZmPIP1;4, ZmPIP2;2, ZmTIP1;1, ZmTIP1;2, ZmNIP1;1 o ZmNIP2;1.

Puesto que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es tóxico para las levaduras, aquellos transformantes que contengan proteínas capaces de transportar este compuesto no crecerán en un medio suplementado con esta especie reactiva de oxígeno. Como era de esperar, las levaduras que contenían el vector vacío



crecieron a todas las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplicado, al igual que las que contenían la proteína ZmPIP1;3-ZmPIP1;4, indicando su incapacidad para transportar este compuesto.

Las levaduras que expresaron el control positivo rAQP9 perdieron su capacidad de crecimiento a la concentración mínima aplicada (0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), al igual que las que contenían ZmTIP1;1 y ZmTIP1;2 indicando su alta capacidad para el transporte de esta molécula. Las levaduras con ZmPIP2;2, ZmNIP1;1, o ZmNIP2;1 no pudieron crecer en presencia de 1,5mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicando una cierta capacidad para transportar este compuesto.

	Agua	NH <sub>4</sub>	Urea	Boro	Silice	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Glicerol
ZmPIP1;3	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
ZmPIP2;2	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✗
ZmTIP1;1	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗
ZmTIP1;2	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗
ZmNIP1;1	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✓
ZmNIP2;1	✓	?	✓	✓	✓	✓	✓
ZmNIP2;2	✓	?	?	✓	?	?	✗

**Figura 4.10.** Tabla resumen de los resultados de caracterización de transporte de diversos compuestos en sistemas de expresión heteróloga. Los resultados se expresan en varios niveles: resultado negativo (cruces rojas), elevada capacidad de transporte (señales verde oscuro), baja capacidad de transporte (señales verde claro) y transporte no testado (símbolo de interrogación).

## 4.5. DISCUSIÓN

### Regulación de las acuaporinas y las relaciones hídricas de la planta por la simbiosis micorrícico arbuscular en distintas condiciones de estrés hídrico.

En este estudio, tanto la sequía de corta duración como el estrés sostenido generaron una disminución de  $J_v$  y  $L_o$  en las plantas de maíz. Con esta disminución, las plantas tratan generalmente de preservar la mayor cantidad de agua posible en sus tejidos y, en último término, evitan también la pérdida de agua desde las raíces hacia el suelo (Muhsin y Zwiazek, 2002; Aroca et al., 2007; Postaire et al., 2008). No obstante, la respuesta de las plantas MA fue diferente a la de las plantas no MA.

Es bien sabido que la simbiosis MA altera la tasa de movimiento de agua dentro, hacia y fuera de la planta (Augé, 2001) y que modifica los parámetros  $J_v$  y  $L_o$  (Aroca et al., 2007; Ruiz-Lozano et al., 2009). Las acuaporinas disminuyen la resistencia al paso del agua a través de las membranas, y puesto que su actividad puede ser regulada, esto proporciona a la planta un mecanismo muy fino de

control del transporte de agua a través de sus tejidos. Las isoformas PIPs y TIPs han sido reconocidas como las acuaporinas clave para el transporte transcelular e intracelular de agua (Maurel et al., 2008). Así pues, parece probable que la simbiosis MA origine cambios en la actividad de las acuaporinas de la planta hospedadora (Porcel et al., 2006; Uehlein et al., 2007; Aroca et al., 2007; Ruiz-Lozano et al., 2009) y que algunas de las acuaporinas estén implicadas en estas respuestas generadas por la micorrización.

Todas las PIPs analizadas en este estudio mostraron características típicas de acuaporinas transportadoras de agua (Sui et al., 2001; Wallace et al., 2002; Forrest y Bhave, 2007). De hecho, todas las PIP2s transportaron agua y la expresión de *ZmPIP2;2* en ovocitos resultó en una elevada permeabilidad al agua, especialmente en co-expresión con PIP1s. Las PIPs se han mostrado como las acuaporinas más importantes relacionadas con el transporte de agua en raíces de diversas plantas (Javot et al., 2003; Chaumont y Tyerman, 2014). Así pues, cabría pensar que la regulación de las PIPs puede ser un punto clave en la regulación del transporte de agua en las plantas por parte de la simbiosis MA.

Bajo condiciones de estrés de corta duración, las plantas MA mantuvieron unos valores de  $J_v$  y  $L_o$  superiores a las plantas no MA. Bajo condiciones de estrés sostenido, las reservas hídricas del suelo se redujeron significativamente y las plantas MA también disminuyeron sus valores de  $J_v$  y  $L_o$ . Este diferente comportamiento bajo las dos condiciones diferentes de estrés hídrico se correlacionó con el patrón de expresión de las PIPs que resultaron reguladas por la micorrización en este estudio. En condiciones de estrés de corta duración, casi todas las PIPs fueron inhibidas en las plantas no MA, mientras en las plantas MA la expresión de la mayoría de estas proteínas se mantuvo elevada o incluso aumentó (*ZmPIP1;1*, *ZmPIP1;2*, *ZmPIP1;3*, *ZmPIP1;4*, *ZmPIP1;6*, *ZmPIP2;2* y *ZmPIP2;4*), correlacionándose bien con los valores de  $J_v$  y  $L_o$ . En el experimento 2, observamos una inhibición por micorrización de un gran número de PIPs, incluidas la mayoría de las seleccionadas en este estudio (*ZmPIP1;1*, *ZmPIP1;3/ZmPIP1;4*, *ZmPIP2;2* y *ZmPIP2;4*) tanto en condiciones óptimas de riego como bajo condiciones de estrés sostenido, probablemente como mecanismo de prevención de la pérdida de agua (Porcel et al. 2006). Esta inhibición de la expresión, junto con la disminución en la acumulación de estas proteínas por micorrización, se correlacionó con el menor  $J_v$  y  $L_o$  medidos en plantas MA.

Bajo condiciones de estrés sostenido,  $L$  se mantuvo en niveles elevados en las plantas MA. Este efecto ha sido relacionado con un incremento en la superficie de absorción causada por el creciente micelio extraradical, combinado con la capacidad de los hongos MA para captar agua de los poros del suelo que son inaccesibles para las raíces de las plantas, ya que las hifas MA suponen una vía de baja resistencia al transporte de agua hacia las células de las raíces (Ruiz-Lozano, 2003; Allen, 2007; 2009; Lehto y Zwiazek, 2011). Además, se ha sugerido que las hifas de los hongos MA consiguen mantener la continuidad de líquidos en el suelo, disminuyendo la pérdida de

conductancia hidráulica producida por la formación de burbujas de aire en el suelo, que se generan normalmente bajo estas condiciones (Smith et al., 2010). Así pues, el movimiento de agua a través de los hongos MA bajo estas condiciones de estrés severo podría ser crítica para mejorar el aporte de agua a la planta, generando un aumento del transporte de agua por la vía apoplástica (Smith et al., 2010) que compensaría la disminución de  $J_v$  y  $L_o$  encontrada en estas plantas, y que permitiría mantener una conductancia hidráulica radical ( $L$ ) elevada.

Por otro lado, las acuaporinas del propio hongo MA se han visto relacionadas con el transporte de agua en el micelio extraradical, así como en la membrana periarbuscular (Li et al., 2013) por lo que su actividad podría estar relacionada con el aumento de los valores de  $L_o$  en condiciones de sequía de corta duración y de  $L$  en condiciones de sequía mantenida.

Aparte de la clara correlación existente entre los parámetros hidráulicos y la expresión de acuaporinas, existen también ciertas discrepancias. Los elevados valores de  $J_v$  y  $L_o$  en las plantas MA del experimento 1 en condiciones óptimas de riego contrasta con los cambios encontrados en la expresión y acumulación de las acuaporinas analizadas (exceptuando ZmPIP2;5). Esta discrepancia ha sido observada anteriormente (Aroca et al., 2007; Boursiac et al., 2005; Ruiz-Lozano et al., 2009) y puede ser debida a que la regulación de las acuaporinas no se restringe al nivel transcripcional sino que está sujeta a modificaciones post-traduccionales. Además, las acuaporinas no son el único modo de controlar  $L_o$ . El movimiento de agua simplástico que ocurre a través de los plasmodesmos puede contribuir significativamente a los niveles de  $L_o$  dependiendo de las condiciones ambientales específicas (Galmés et al., 2007). En relación a esto último, Blee y Anderson (1998) encontraron que el número de plasmodesmos se incrementó en los alrededores de las células arbusculadas, lo que podría contribuir a un mayor movimiento de agua por esta vía. Además, se ha propuesto la existencia de un mecanismo compensatorio entre las acuaporinas del hongo MA y las de la planta (Aroca et al., 2009), de manera que la reducción de las acuaporinas de la planta hospedadora puede ser compensada con una mayor actividad de las acuaporinas del hongo MA manteniendo así unos elevados valores de  $J_v$  y  $L_o$  en las raíces de plantas MA. Por último, también la cantidad de proteína ZmPIP2;5 es más elevada en estas plantas y ésta es una de las acuaporinas más abundantes en las raíces de maíz (Hachez et al., 2006), por lo que podría estar implicada es la elevada  $L_o$  encontrada en condiciones óptimas de riego tanto en plantas MA como no MA.

En el experimento 2, la sequía por sí misma afectó poco a la expresión y acumulación de PIPs. Sin embargo, tuvo un fuerte impacto sobre  $J_v$  y  $L_o$ , que disminuyeron significativamente. El mantenimiento de una elevada expresión bajo estas condiciones podría compensar parcialmente la disminución de  $L_o$ , tal y como ha sido descrito en olivo (Lovisoló et al., 2007). Por otro lado, la regulación post-traducciona puede tener un importante papel en condiciones de estrés. De hecho, existen evidencias de una regulación basada en el incremento de ROS producido en condiciones de

estrés abiótico y la internalización, cambios en la localización subcelular o el bloqueo directo de las PIPs (Ye y Steudle, 2006; Zelazny et al., 2007; Boursiac et al., 2008). Esto podría conducir a una disminución de  $L_o$  sin modificar la expresión y/o la acumulación de estas proteínas (Benabdellah et al., 2009c).

En este estudio, el patrón de expresión de algunas de las TIPs analizadas resultó especialmente interesante. Las proteínas ZmTIP1;1 y ZmTIP1;2 son estructuralmente capaces de transportar agua en grandes cantidades y, de hecho, se ha comprobado esta capacidad en diversas isoformas de TIPs de distintas especies de planta (Maurel et al., 1997; Chaumont et al., 1998; Gerbeau et al., 1999; Vera-Estrella et al., 2004). Las TIPs son las acuaporinas más abundantes en plantas y están asociadas principalmente al tonoplasto (Hunter et al., 2007). Puesto que el tonoplasto se ha mostrado más permeable al agua que la membrana plasmática (Maurel et al., 1997; Niemietz y Tyerman, 1997; Gerbeau et al., 1999), se ha propuesto que estas proteínas pueden proporcionar a la célula un mecanismo rápido de control del balance osmótico y turgor celular, al permitir el intercambio de agua entre la vacuola y el citosol (Sarda et al., 1997; Forrest y Bhave, 2007), jugando un papel fundamental en condiciones de estrés hídrico (Katsuhara et al., 2008; Vera-Estrella et al., 2004). Así pues, las TIPs han de tener también cierta influencia sobre  $L_o$  y  $J_v$  al afectar el intercambio de agua entre las vías transcelular y simplástica. En este estudio, ambas isoformas fueron altamente expresadas en todos los tratamientos y, en el sistema heterólogo en ovocitos, mostraron una elevada capacidad para el transporte de agua. La micorrización indujo la expresión de estas acuaporinas en condiciones de estrés de corta duración, pero fueron inhibidas en condiciones de estrés severo, correlacionándose en ambos casos con los parámetros  $J_v$  y  $L_o$ .

La correlación entre la expresión génica de las TIPs 1 y los parámetros  $J_v$  y  $L_o$  en plantas MA sometidas a sequía, parecen confirmar una implicación de estas proteínas en el control del transporte de agua transcelular en respuesta a la micorrización. Sin embargo, no encontramos dicha correlación al analizar el contenido de estas proteínas en las membranas. En este caso, observamos una disminución en plantas MA sometidas a sequía moderada y un mantenimiento elevado de las mismas en sequía severa. La ausencia de correlación entre la expresión génica y el contenido en proteínas ha sido observada en diversos estudios y puede explicarse en base a tres razones fundamentales: La primera es que los cambios de expresión génica son mucho más rápidos que los cambios en el contenido en proteínas. En este sentido, la expresión génica nos proporcionaría una idea de la dirección en la que se está produciendo la respuesta de la planta en un momento dado, mientras el contenido de proteínas refleja el estado actual de la misma y los cambios en este parámetro sólo podrán ser vistos a posteriori. En segundo lugar, las modificaciones post-traduccionales juegan un papel fundamental en el transporte de agua, teniendo más relevancia la actividad que la cantidad de acuaporinas presentes en un momento dado. Por último, la elevada especificidad en sus funciones puede llevar a que determinadas isoformas se expresen o estén

presentes en las membranas de tipos celulares específicos poco abundantes, apareciendo en menor cantidad relativa, pero sin dejar por ello de ejercer funciones fundamentales en dichos tejidos (Chaumont y Tyerman, 2014).

Por último, en el caso de *ZmTIP1;1* cabe señalar que, a diferencia de la mayor parte de las acuaporinas analizadas en este estudio, se produjo el aumento de su expresión en plantas no MA sometidas a estrés de larga duración y el mantenimiento de un elevado contenido de esta proteína en las membranas, contradiciendo el efecto observado de reducción de  $J_v$  y  $L_o$  en estas plantas. Esto sugiere que su función específica puede no estar directamente relacionada con el transporte de agua, aunque dicha función queda por ser establecida y será discutida en los apartados siguientes.

### Caracterización de las acuaporinas reguladas por MA para el transporte de diversos solutos con importancia fisiológica para las plantas.

Se ha propuesto que el papel de las acuaporinas en la simbiosis MA puede ir más allá de la simple regulación hídrica de la planta (Maurel y Plassard, 2011). Uehlein et al. (2007) describió una inducción causada por la simbiosis MA de isoformas específicas de los subgrupos de PIPs y NIPs capaces de transportar agua y amonio, respectivamente. Los autores propusieron que estas acuaporinas podrían estar involucradas en los procesos de intercambio simbiótico entre la planta y el hongo. Nuestros resultados apuntan en la misma dirección, ya que muchas de las acuaporinas reguladas por la simbiosis MA pueden transportar una variedad de compuestos de interés fisiológico para la planta.

### **Transporte de glicerol**

Como otros solutos compatibles, el glicerol ha de ser capaz de atravesar las membranas celulares rápidamente en respuesta a desequilibrios osmóticos. Algunas acuaporinas de plantas han sido caracterizadas como transportadoras de glicerol, la mayoría pertenecientes al subgrupo de las NIPs (Weig y Jakob, 2000; Cabello-Hurtado y Ramos, 2004). Las NIPs proceden originalmente de una transferencia genética horizontal desde bacterias a las plantas (Zardoya et al., 2002) y fueron posteriormente adaptadas para el transporte específico de glicerol, sugiriendo que este transporte hubo de suponer una ventaja evolutiva para las plantas (Gustavsson et al., 2005).

Nuestros estudios con ovocitos de *X. laevis* demuestran que tanto la *ZmNIP1;1* como la *ZmNIP2;1* son capaces de transportar glicerol.

Como era esperable en base a su filtro de selectividad altamente específico para el glicerol (Wallace et al., 2002; Wallace y Roberts, 2004), *ZmNIP1;1* demostró una elevada capacidad para transportar este compuesto, siendo capaz de transportar además otras moléculas de menor tamaño como ácido bórico, peróxido de hidrógeno y agua. La *ZmNIP1;1* es regulada de manera diferente a la mayoría de las acuaporinas analizadas, incrementando su expresión bajo estrés prolongado en

plantas no MA y aumentando aún más en plantas MA, apoyando su posible implicación en el transporte de agua bajo estas condiciones. Sin embargo, es remarcable el hecho de que, bajo condiciones óptimas de riego, las simbiosis MA afecta a la expresión de *ZmNIP1;1* de manera diferente en ambos experimentos, reduciéndose en el experimento 1 pero sin verse afectada en el experimento 2. Este efecto fue observado sólo en las acuaporinas agrupadas en el patrón 6 (*ZmNIP1;1*, *ZmTIP4;1* y *ZmTIP4;2*) y en la *ZmTIP1;2* (patrón 2), indicando que estas acuaporinas están reguladas muy finamente por la simbiosis y que esta regulación va más allá de las condiciones hídricas. También es interesante el hecho de que solamente las acuaporinas del patrón de expresión 6 (*ZmNIP1;1*, *ZmTIP4;1* y *ZmTIP4;2*) resultaron aumentadas en las plantas MA sometidas a estrés severo. Se ha sugerido que las isoformas TIP4, al igual que *ZmNIP1;1*, puedan estar relacionadas con el transporte de glicerol. Su filtro de selectividad contiene aminoácidos muy pequeños que originan un incremento del diámetro del poro, permitiendo el paso de esta molécula (Bansal y Sankararamakrishnan, 2007). Así mismo, la Arg en posición LE2 facilitaría el transporte de glicerol (Sui et al., 2001). Además, el filtro de selectividad no es adecuado para el transporte de agua (Wallace y Roberts, 2004; Bansal y Sankararamakrishnan, 2007), por lo que todo ello sugiere que las acuaporinas agrupadas en el patrón 6 deben desempeñar funciones específicas en el transporte de solutos, incluido el glicerol, que pueden ser importantes para la simbiosis MA o para la interacción planta-hongo (Dietz et al., 2011), especialmente en condiciones de estrés prolongado. El uso del glicerol es bien conocido en hongos. Sin embargo, no se le conocen funciones específicas en plantas (Dietz et al., 2011), por lo que las implicaciones fisiológicas de esta molécula en planta continúan siendo desconocidas. De hecho, el glicerol forma parte de moléculas de gran importancia en el metabolismo de los hongos como los triacilglicéridos, que suponen la mayor reserva de carbono de los hongos MA (Gaspar et al., 2001) y cuyos componentes (ácidos grasos y glicerol) no son sintetizados por los hongos MA, lo que ha llevado a sugerir que ésta puede ser una de las razones por las que los hongos MA son simbiosis obligados (Bago et al., 2000, 2002). Además, la concentración de glicerol aumenta drásticamente en procesos en los que se requiere una presión de turgor fuerte, como la germinación de esporas y la penetración del apresorio o en condiciones de estrés hídrico (de Jong et al., 1997). Por último, algunos estudios han mostrado que existe una transferencia de glicerol desde la planta hospedadora hacia hongos patógenos (Wei et al., 2004). Todo ello ha llevado a Gustavsson et al. (2005) a sugerir que la exportación de glicerol desde la planta puede ser igualmente importante en la simbiosis con hongos MA y que ésta pudo ser la razón por la cual los transportadores de glicerol fueron fijados en los genomas de las plantas. Esto explicaría tanto la fina regulación de *ZmNIP1;1*, *ZmTIP4;1* y *ZmTIP4;2* por la simbiosis MA en condiciones óptimas de riego como el que sean las únicas acuaporinas inducidas durante el estrés hídrico prolongado.

## Transporte de compuestos nitrogenados

El nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes para todos los organismos vivos, siendo imprescindible en la síntesis de compuestos esenciales para los procesos de crecimiento y desarrollo. El ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y su base conjugada amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) se consideran como las fuentes primarias de la nutrición nitrogenada de las plantas. En la simbiosis MA, se ha sugerido que el  $\text{NH}_4^+$  es el principal compuesto nitrogenado transferido a la planta hospedadora y que la urea juega un papel como compuesto intermediario que podría suponer una fuente adicional de N para la planta (Govindarajulu et al., 2005; Tian et al., 2010; Dietz et al., 2011; Pérez-Tienda et al., 2011).

Las acuaporinas se presentan como los canales de baja afinidad que actúan en la absorción, movilización y detoxificación del N durante el metabolismo nitrogenado de las plantas (Liu et al., 2003b), así como en la simbiosis MA (Uehlein et al., 2007; Pérez-Tienda et al., 2011). En maíz, muchas de las TIPs poseen una región Ar/R que permitiría a estas proteínas transportar  $\text{NH}_3$  y/o urea (Jahn et al. 2004; Ludewig et al., 2007; Gu et al., 2012). De hecho, muchas TIPs han sido caracterizadas como transportadoras de estos compuestos (Liu et al., 2003b; Jahn et al., 2004; Loque et al., 2005), incluyendo las proteínas *ZmTIP1;1* y *ZmTIP1;2* caracterizadas en este estudio.

Las proteínas TIPs aparecen normalmente asociadas al tonoplasto (Tyerman et al., 2002). Además se ha visto que, tanto el amonio como la urea, son acumulados en la vacuola central (Kojima et al. 2006; Ludewig et al., 2007). El transporte de  $\text{NH}_3$  o  $\text{NH}_4^+$  hacia el interior de la vacuola permitiría evitar su exceso en el citoplasma, especialmente en las zonas de intercambio simbiótico, donde el aporte masivo de estos compuestos podría generar toxicidad. También permitiría el almacenamiento del N sobrante (Britto et al., 2001a y b; Wang et al., 2008), de manera que cuando sea requerido, puede ser re-movilizado mediante transporte pasivo de baja afinidad como el que permiten las TIPs (Liu et al., 2003b).

En este estudio, la expresión de la mayor parte de las acuaporinas decreció en plantas no MA bajo condiciones de estrés hídrico de corta duración, mientras que en plantas MA, la expresión de muchas de las acuaporinas analizadas aumentó respecto a las no MA. Dicho aumento puede promover el transporte, no solo de agua, sino también de compuestos nitrogenados (Uehlein et al., 2007). El aumento de expresión de *ZmTIP1;1* y *ZmTIP1;2* en las plantas MA frente a las no MA podría estar facilitando la transferencia hacia la vacuola del exceso de compuestos nitrogenados bajo estas condiciones.

En condiciones de estrés hídrico prolongado, la expresión de la mayor parte de las acuaporinas y su acumulación disminuyó en plantas no MA, probablemente debido a una menor disponibilidad de nutrientes minerales para la planta. Por el contrario, la expresión de las TIPs1 se mantuvo elevada o incluso aumentó en el caso de *ZmTIP1;1*, que además mantuvo un elevado contenido en proteínas bajo estas condiciones. Una hipótesis plausible para explicar este aumento sería que, ante un menor aporte de nutrientes minerales debido a la sequía severa, la planta se ve obligada a



recurrir a los compuestos almacenados en la vacuola central, favoreciendo el mantenimiento de las TIPs. Sin embargo, las plantas MA sometidas a estrés prolongado redujeron la expresión de ambas isoformas respecto a las plantas no MA, dado que las plantas MA pueden recibir un aporte suficiente de nutrientes a través de los hongos MA. Esto haría innecesaria la removilización o detoxificación de los compuestos nitrogenados. En cualquier caso, esta hipótesis requiere de nuevos experimentos para confirmarse y la posibilidad de que exista una regulación post-traducciona no debe descartarse.

### Transporte de metaloides

El boro (B) y el silicio (Si) son metaloides que presentan cierta similitud. Ambos son moléculas no cargadas que en solución acuosa a pH neutro aparecen en forma de ácidos (Takahashi y Hino, 1978). No son metabolizadas por las plantas, razón por la cual se transportan en esta forma ácida (Miwa et al., 2009), utilizando sistemas de transporte de alta afinidad (BOR1 para B y Lsi2 para Si) que generan el gradiente de concentración necesario en las células de la raíz para permitir el flujo pasivo de entrada a través de acuaporinas (Mitani et al., 2009b).

El maíz tiene bajos requerimientos de B para mantener su crecimiento vegetativo, aunque necesita grandes cantidades en estado reproductivo (Blevins y Lukaszewski, 1998). Además, a altas concentraciones el B es tóxico, por lo que el maíz ha de tener un control fino sobre la distribución del mismo para mantener los niveles de B adecuados en sus células (Miwa et al., 2009). De hecho, en este estudio se ha encontrado un elevado número de acuaporinas (todas menos las PIPs) capaces de transportarlo.

En condiciones de estrés de corta duración, la mayor parte de las acuaporinas analizadas disminuyeron su expresión en plantas no MA, incluidas aquellas capaces de transportar B. Bajo estas condiciones las plantas tratan de preservar la mayor cantidad de agua y nutrientes posibles en sus células y el crecimiento disminuye, por lo que no es esperable una alta demanda de B. Sin embargo, cuando el estrés se prolonga y se hace más severo, las deficiencias de B pueden influir negativamente sobre el desarrollo de las plantas. De hecho, se ha descrito que la deficiencia en B puede afectar a la absorción de otros compuestos como el fósforo (Pollard et al., 1977; Power y Woods, 1997) así como al transporte de iones a través de las membranas celulares (Heyes et al., 1991; Blevins y Lukaszewski, 1998). Los requerimientos de B en plantas no MA bajo estas condiciones deben ser garantizados por las acuaporinas capaces de transportarlo (*ZmTIP1;1*, *ZmTIP1;2*, *ZmNIP1;1* y *ZmNIP2;2*), que, de hecho, fueron las únicas que mostraron una expresión más elevada en plantas no MA sometidas a estrés hídrico prolongado. Por el contrario, observamos que las plantas MA redujeron la expresión de casi todas las acuaporinas caracterizadas hasta la fecha como transportadoras de B (*ZmTIP1;1*, *ZmTIP1;2*, *ZmNIP1;1*, *ZmNIP2;1* y *ZmNIP2;2*) así como su contenido en las membranas. Esto puede ser debido al hecho de que el hongo MA provee



directamente este compuesto a la planta hospedadora (Letho et al., 2010) y por ello, la expresión y el contenido en acuaporinas transportadoras de B en las plantas MA puede reducirse sin generar un efecto negativo en la planta hospedadora.

Cabe destacar que dos de las acuaporinas analizadas no siguen este patrón de disminución. Estas acuaporinas son la *ZmTIP1;1* bajo condiciones de estrés de corta duración y la *ZmNIP1;1* en estrés mantenido, pero ambas acuaporinas parecen estar involucradas en el transporte de otros compuestos importantes para la planta, como ha sido propuesto en apartados anteriores. También es cierto que algunas de estas acuaporinas muestran mayor especificidad para otros compuestos, como la *ZmNIP2;1* y *ZmNIP2;2* para el Si (Mitani et al. 2009a; 2009b). Así pues, aunque es evidente que existe una implicación de muchas acuaporinas en el transporte del B, los resultados apuntan a que probablemente no sea específico de ninguna de ellas en concreto, sino más bien el resultado de la actividad conjunta de todas ellas.

El caso del Si es distinto porque es activamente absorbido y acumulado en grandes cantidades en los tejidos de las plantas de maíz (Ma y Takahasi, 2002), y se ha relacionado con la resistencia de las plantas a estreses abióticos (Ma y Yamaji, 2006; 2008). Tanto la *ZmNIP2;1* como la *ZmNIP2;2* han sido caracterizadas por Mitani et al. (2009b) como transportadores de Si, y en este estudio no hemos encontrado nuevas acuaporinas capaces de transportarlo. En las plantas no MA, la *ZmNIP2;1* sigue el mismo patrón que la mayoría de las acuaporinas analizadas, disminuyendo con el estrés hídrico en ambos experimentos. Sin embargo, la *ZmNIP2;2* mostró un comportamiento diferente en condiciones de estrés severo, siendo una de las pocas acuaporinas que aumentaron su expresión bajo estas condiciones. Como hemos visto, esta acuaporina no está relacionada directamente con el transporte de Si a toda la planta, sino que su función es especialmente importante en las raíces de anclaje, donde el Si juega un papel fundamental en la resistencia mecánica a la caída del tallo (Hochholdinger et al., 2004; Mitani et al., 2009b). Los beneficios de la acumulación de Si en estas raíces serán por ello mucho más importantes en estas condiciones (Ma et al. 2008), donde la deshidratación de los tejidos originaría la caída del tallo, especialmente en las plantas de maíz, poco resistente a la deshidratación.

En los dos experimentos descritos en este estudio, la micorrización redujo la expresión de *ZmNIP2;1* y *ZmNIP2;2* bajo condiciones óptimas de riego y sus niveles de expresión se mantuvieron bajos en condiciones de estrés hídrico. Esta disminución puede ir directamente asociada a la reducción de la densidad de raíces en plantas MA, ya que ambas proteínas aparece en las raíces seminales (Mitani et al., 2009a; 2009b). Por otro lado, puesto que el Si se acumula en estructuras por debajo de la cutícula, esto puede impedir mecánicamente la penetración del hongo (Ma et al., 2006). Mas aun, el Si soluble actúa como modulador de la resistencia a la infección y colonización fúngicos (Fauteux et al., 2005). Por todo ello, una disminución de la acumulación del Si en raíces es esperable en plantas MA.

### Transporte de peróxido de hidrógeno

A bajas concentraciones, el  $H_2O_2$  actúa como molécula señal (Bienert et al., 2006) controlando gran número de procesos esenciales para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Para revisión, leer Quan et al., 2008), pero también funciona como señal de defensa frente a estreses bióticos y abióticos (Bienert et al., 2006; Miller et al., 2010). Por otro lado, no deja de ser una molécula oxidante que reacciona con distintas dianas celulares causando daños y, a elevadas concentraciones, es capaz de generar la muerte celular programada (Dat et al., 2000; Bienert et al., 2006). Debido a estas funciones opuestas, el balance intracelular entre la producción y la eliminación de este compuesto debe estar altamente controlado en las células (Mittler et al., 2004) y las alteraciones de este balance son utilizadas por las plantas para activar la respuestas defensivas que le permiten adaptarse a los cambios ambientales (Quan et al., 2008).

El  $H_2O_2$  tiene un tamaño, propiedades electroquímicas y capacidad de formar puentes de hidrógeno similares a la molécula de agua (Bienert et al., 2007). De hecho, algunas acuaporinas han mostrado su capacidad para transportar  $H_2O_2$  (Bienert et al., 2007; Dynowski et al., 2008b) y, en este estudio, todas las acuaporinas capaces de transportar agua han sido capaces también de transportar peróxido de hidrógeno, especialmente la ZmTIP1;1. Bienert et al. (2006, 2007) propusieron que las TIPs 1 pueden jugar un importante papel en la detoxificación del exceso de  $H_2O_2$  generado en condiciones de estrés. De hecho, un incremento en la expresión de estas acuaporinas ha sido encontrado en *Arabidopsis* en condiciones de estrés, lo cual concuerda con la elevada expresión y contenido en proteínas de ZmTIP1;1 encontrados en este estudio bajo condiciones de estrés hídrico prolongado, apoyando esta hipótesis.

### Resumen de las hipótesis propuestas en este estudio (Figura 4.11).

Bajo condiciones de estrés de corta duración, la expresión de la mayor parte de las PIPs se mantuvo alta o incluso aumentó en plantas MA, mientras que en condiciones de estrés sostenido, la micorrización redujo su expresión, coincidiendo en ambos casos con los valores de  $J_v$  y  $L_o$ . El micelio extraradical de los hongos MA incrementó la superficie de absorción de estas plantas en el suelo. Ello, unido a la capacidad de los hongos para captar agua desde poros del suelo inaccesibles para las raíces, permitiría a las plantas MA mantener niveles altos de  $L_o$  bajo condiciones de estrés de corta duración, y  $L$  bajo condiciones de estrés sostenido, en comparación con las plantas no MA (flechas azules). Las flechas segmentadas representan valores de  $L$  esperados pero que no han sido medidos. También las acuaporinas del hongo MA podrían estar implicadas en el aporte de agua desde las hifas a las células del cortex o los espacios intercelulares del mismo, afectando igualmente al transporte de agua. Por último, las TIPs podrían tener una influencia sobre  $L_o$  afectando los intercambios de agua entre las vías transcelular y simplástica.

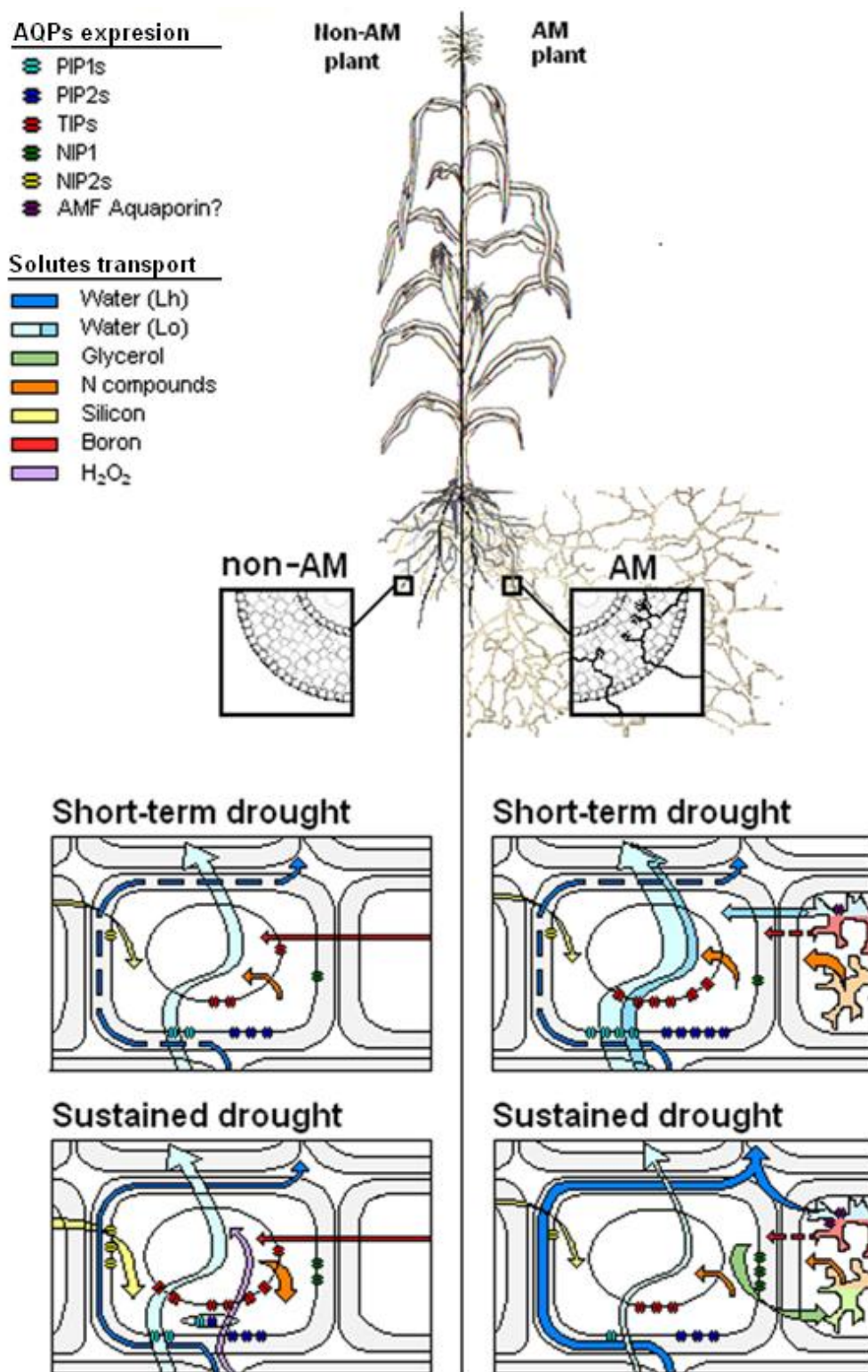


Imagen resumen de las hipótesis sobre los efectos de la simbiosis MA sobre el transporte de agua y solutos mediado por las acuaporinas y su posible implicación en la diferente movilización de los mismos en distintas condiciones de estrés hídrico. Se representa los distintos subgrupos de acuaporinas en base a sus resultados de expresión y los diferentes compuestos transportados con flechas de distintos colores, tal y como indica la leyenda.

Las acuaporinas reguladas por la simbiosis MA pueden transportar gran variedad de compuestos de importancia fisiológica para las plantas, incluyendo glicerol (flechas verdes) que podría ser importante para la interacción hongo-planta en condiciones de estrés hídrico mantenido como sugiere el aumento de expresión de las acuaporinas del patrón 6. Además, las acuaporinas han sido señaladas como canales de baja afinidad para el transporte de N en plantas y en la simbiosis MA. Los compuestos nitrogenados (flechas naranjas) aportados por las raíces y el hongo MA podrían ser transportado por *ZmTIP1;1* y *ZmTIP1;2* a la vacuola para su almacenaje. Bajo condiciones de estrés sostenido, una removilización del N vacuolar puede ser necesaria en las plantas no MA, aumentando por ello la expresión de *ZmTIP1;1* y *ZmTIP1;2*. Los requerimientos de B (flechas rojas) en las plantas no MA estarían garantizados por las acuaporinas capaces de transportarlo. En las plantas MA, el hongo MA podría proporcionar directamente el B a la planta en función de las necesidades de la misma (flechas rojas segmentadas), y así, las acuaporinas involucradas en dicho transporte serían inhibidas sin afectar negativamente a la planta. En las plantas, el Si impide mecánicamente la penetración de los hongos en las raíces, por lo que una disminución de la acumulación de Si en las raíces de plantas MA es esperable (flechas amarillas). Así pues, la micorrización reduce la expresión de los transportadores de Si *ZmNIP2;1* y *ZmNIP2;2*. En las plantas no MA, el aumento de expresión de *ZmNIP2;2* podría tener como objetivo proteger a la planta de la caída del tallo en condiciones de estrés prolongado. Por último, las TIPs1 (en particular *ZmTIP1;1*) podrían jugar un papel en la detoxificación del  $H_2O_2$  generado en condiciones de estrés hídrico. A su vez, la movilización del  $H_2O_2$  vía acuaporinas podría servir como mecanismo regulador de la actividad de las PIPs, promoviendo su internalización en condiciones de estrés sostenido (flechas rosas) con la consiguiente disminución del transporte de agua.



VIII.                      CAPÍTULO 5



## **5. Inmuno-localización de acuaporinas reguladas por la simbiosis micorrícico arbuscular en raíces de maíz en condiciones de déficit hídrico.**

### **5.1. INTRODUCCIÓN**

Las acuaporinas juegan un papel fundamental en el ajuste de la conductividad hidráulica de las raíces de las plantas cuando éstas se someten a déficit hídrico (Aroca et al., 2012; Javot y Maurel, 2002). En capítulos anteriores hemos visto que la modulación de las acuaporinas ocurre de manera diferente en plantas MA y no MA, dando flexibilidad al control de las vías de transporte de agua (Morillon y Chrispeels, 2001) que puede suponer una ventaja en la capacidad de transportar agua en condiciones de sequía. Además, numerosos estudios apuntan a que el control de las acuaporinas puede ser el que condicione la conductancia hidráulica total de la planta micorrizada (Marjanovic et al., 2005; Lee et al., 2010) pudiendo ser aún más relevante su contribución en condiciones de sequía (Aroca et al., 2007; Ruiz-Lozano y Aroca, 2010). Un control muy fino de la presencia y actividad de las distintas isoformas de acuaporinas en planta parece ser la clave de la mayor tolerancia al déficit hídrico de las plantas MA frente a las no MA. Más aún, la extraordinaria divergencia en los filtros de selectividad de las acuaporinas (Sui et al., 2001) permite una gran diversidad funcional de estas proteínas (Wallace et al., 2002; Bansal y Sankararamakrishnan, 2007) que pueden afectar, no solo al estatus hídrico de las plantas, sino también a la absorción y utilización de diversos compuestos que podrían estar jugando un papel fundamental en la tolerancia de estas plantas frente al estrés hídrico, tal y como sugieren nuestros resultados anteriores. Obviamente, la función que el transporte de solutos a través de las acuaporinas pueda ejercer en la defensa frente al estrés hídrico, ha de estar muy relacionada con su localización subcelular en los distintos tejidos de la planta. Numerosos estudios se han llevado a cabo sobre la localización de diversas acuaporinas en los tejidos y membranas celulares de la planta, encontrándose que las diversas isoformas aparecen fuertemente relacionadas con tejidos u órganos concretos (Sakurai et al., 2008). Así, por ejemplo, las PIPs aparecen fuertemente asociadas a la membrana plasmática de raíces y hojas, mientras los distintos grupos de TIPs han sido asociados a la membrana vacuolar de las mismas (Maurel et al., 2008). Las SIPs han sido localizadas en el retículo endoplasmático (Ishikawa et al., 2005) y las NIPs aparecen generalmente en la membrana plasmática y las distintas isoformas aparecen asociadas específicamente a órganos concretos (Wallace et al., 2006; Choi, 2009). También se han llevado a cabo un estudio sobre la localización de algunas isoformas concretas de acuaporinas en los distintos tejidos de la raíz en plantas MA de *Lotus japonicus*, encontrándose asociadas a células arbusculadas (Giovannetti et al., 2012). Estos estudios son escasos y se han llevado a cabo sólo en condiciones óptimas de crecimiento, de manera que existe



una falta de información acerca de la localización de acuaporinas en plantas MA bajo condiciones ambientales adversas como el estrés hídrico.

Considerando la importancia que la localización subcelular de las acuaporinas puede tener sobre las funciones que desempeñen las distintas isoformas y teniendo en cuenta la importancia de esta regulación para la propia tolerancia al estrés, parece probable que la micorrización afecte directamente a la regulación de la localización subcelular de las acuaporinas en respuesta al déficit hídrico.

## 5.2. OBJETIVO

Así pues, en este estudio preliminar, nos hemos propuesto analizar mediante inmunolocalización como afecta la simbiosis MA a la localización de diversas acuaporinas reguladas por la propia simbiosis MA en condiciones de estrés hídrico. Basándonos en los estudios previos, hemos seleccionado aquellas acuaporinas que resultaron más importantes por su elevada expresión en raíces de plantas MA y para las cuales pudimos obtener anticuerpos específicos que nos permitieran llevar a cabo el análisis. Resultados previos de caracterización funcional en sistemas heterólogos han confirmado además su influencia sobre el transporte de agua y de diversos compuestos de interés fisiológico para la planta que podrían resultar especialmente relevantes en condiciones de estrés hídrico. Obviamente, la localización no puede, por si misma, confirmar las funciones que dichas acuaporinas ejercen realmente en la planta, pero nos ayudará a obtener una visión más completa de los posibles procesos que regulan.

## 5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trata de un experimento factorial en el que plantas de maíz (*Zea mays*) se sometieron a distintos tratamientos de inoculación: control no inoculado (C) versus inoculación con *R. intraradices* (Ri) y dos tratamientos de riego: condiciones óptimas (WW) versus sequía durante 12 días (para más información, ver “Material y métodos”) (DS). El resultado combinado dio lugar a 4 tratamientos:

- Cww: Plantas control cultivadas en condiciones óptimas de riego.
- Riww: Plantas micorrizadas cultivadas en condiciones óptimas de riego.
- Cds: Plantas control sometidas a sequía durante 12 días.
- Rids: Plantas micorrizadas sometidas a sequía durante 12 días.

## 5.4. RESULTADOS

### 5.4.1. Crecimiento y colonización radical de plantas de maíz.

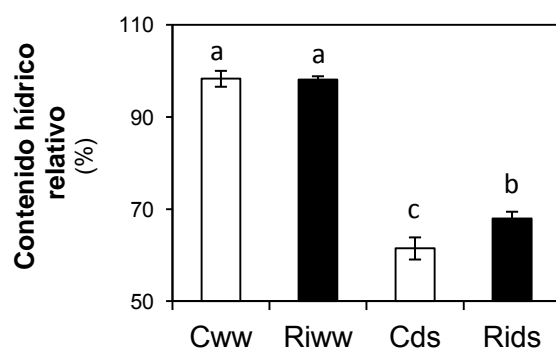
Como era de esperar, las plantas no inoculadas no presentaron colonización (Tabla 5.1). Las plantas micorrizadas exhibieron en torno a un 67% de longitud de raíz micorrizada, independientemente del tratamiento de riego.

Tratamiento	PSPA (g planta <sup>-1</sup> )	PSR (g planta <sup>-1</sup> )	MA (%)
CWW	3.07a	1.37a	0b
RiWW	3.14a	1.34a	67a
CDS	2.54b	1.32a	0b
RiDS	2.54b	1.28a	68a

**Tabla 5.1.** Peso seco de parte aérea (PSPA) y de raíz (PSR) y porcentaje de longitud de raíz micorrizada en plantas de maíz cultivadas en condiciones óptimas de riego (WW) o sometidas a estrés hídrico durante 12 días (DS). Medias seguidas por letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) según el test de LSD ( $n = 6$ ).

Las plantas no MA recibieron una aplicación de solución nutritiva, consiguiendo así plantas MA y no MA de tamaño similar antes del comienzo de los tratamientos de estrés. El estrés hídrico aplicado redujo el tamaño de las plantas (parte aérea) independientemente de la micorrización.

#### 5.4.2. Estatus hídrico de plantas de maíz.



**Figura 5.1.** Efecto de la simbiosis MA y el estrés hídrico sobre el contenido hídrico relativo en plantas de maíz control sin inocular (C, barras blancas) o inoculadas con *R. intraradices* (Ri, barras negras). Las plantas fueron cultivadas en condiciones óptimas de riego (ww) o sometidas a estrés hídrico (ds). Las barras representan el valor medio con su error estándar ( $n=6$ ). Las distintas letras en las barras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) calculadas mediante el test de LSD.

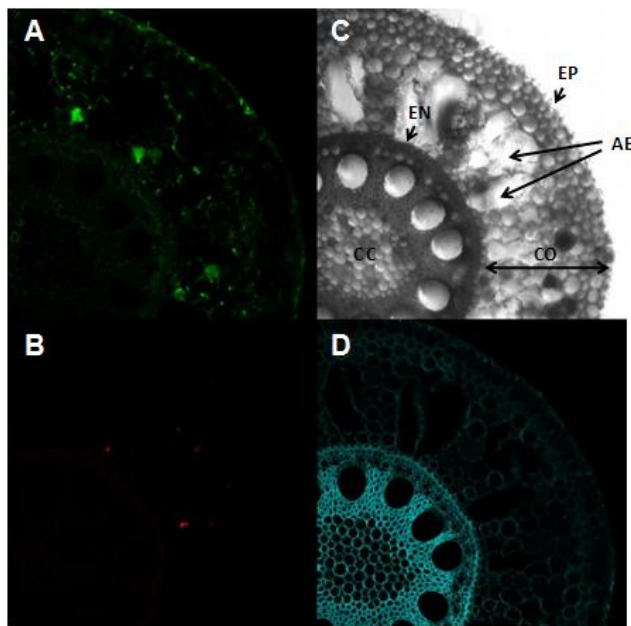
En condiciones óptimas de riego no hubo diferencias significativas en el contenido hídrico relativo entre plantas MA y no MA (Fig. 5.1). La sequía redujo el contenido hídrico relativo en ambos tipos de plantas, siendo los valores significativamente mayores en plantas MA que en plantas no MA sometidas a sequía.

#### 5.4.3. Inmuno-localización de la acuaporina ZmPIP1;3/PIP1;4 en raíces de plantas de maíz inoculadas con *R. intraradices*.

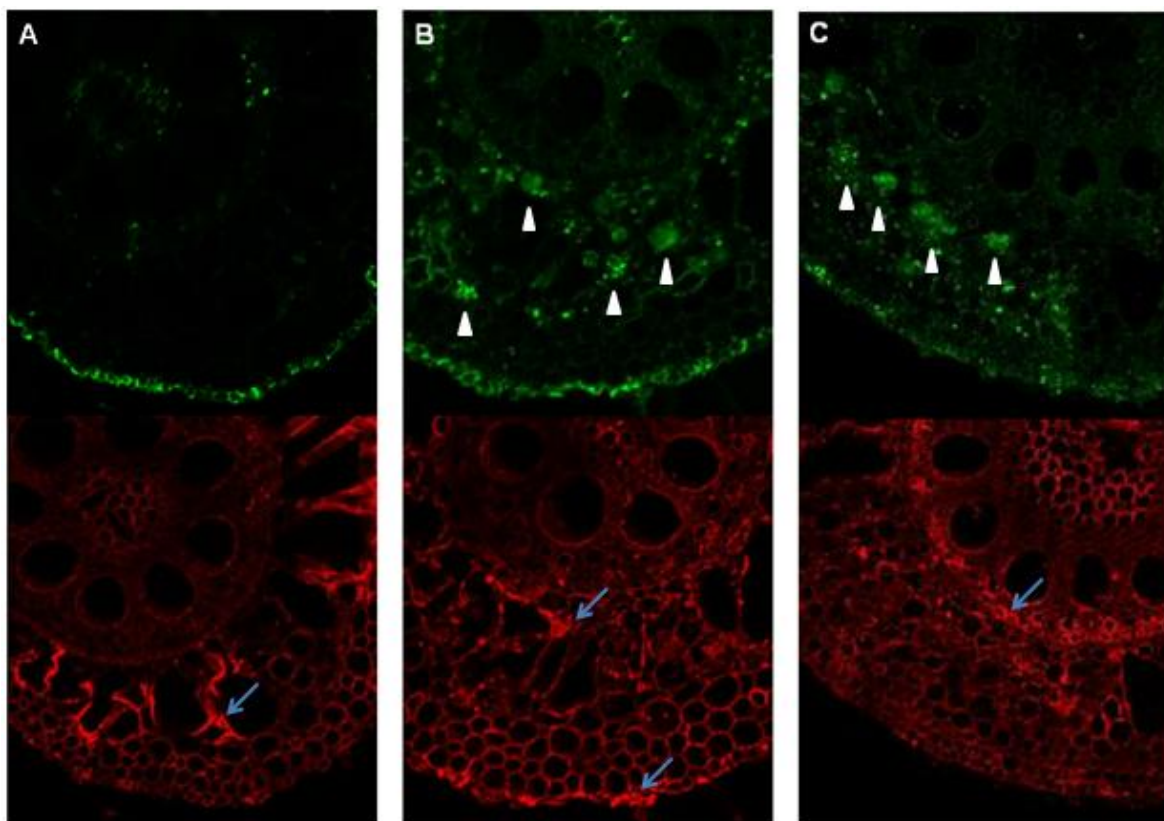
La ausencia de respuesta en el rango de luz correspondiente al rojo al utilizar suero pre-inmune en lugar de un anticuerpo específico, nos demuestra la efectividad del método para la detección de la proteína específica (Fig. 5.2B).

En las raíces de plantas MA se observó claramente la presencia de hifas intercelulares y arbusculos en las células del cortex radicular (Fig. 5.3B y C). Sin embargo, en ausencia de hongos MA, observamos que el marcador WGA-488 se acumuló fundamentalmente en el borde exterior de las raíces (Fig. 5.3A).

La proteína ZmPIP1;3/PIP1;4 apareció asociada a la membrana plasmática de las células de la raíz de la planta (datos no mostrados).



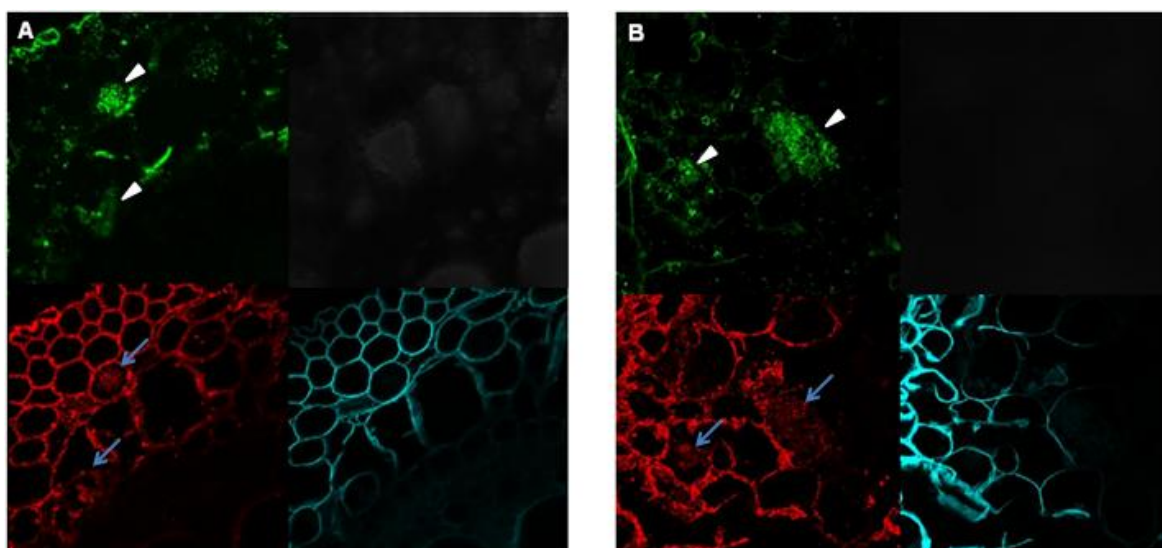
**Figura 5.2.** Inmuno-localización en cortes transversales (0,5mm de grosor) de raíz primaria de maíz previa eliminación de la parte apical y la parte superior próxima al tallo en (A) cortes tratados con WGA-488 (marcador del hongo MA), (B) cortes tratados con suero preinmune y anticuerpo secundario Alexa-Fluor 633 (dilución 1/100), (C) imagen tomada con luz visible. EP, epidermis; EN, endodermis; CO, córtex; AE, aerénquima; CC, cilindro central; y (D) imagen de autofluorescencia de las paredes celulares.



**Figura 5.3.** Inmuno-localización de la proteína ZmPIP1;3/PIP1;4 en cortes transversales (0,5mm) de raíz primaria de maíz en (A) plantas control en condiciones óptimas de riego, (B) plantas inoculadas con *R. intraradices* en condiciones óptimas de riego y (C) plantas inoculadas con *R. intraradices* en condiciones de sequía. La imagen en verde corresponde al WGA-488 (marcador del hongo MA). La imagen en rojo corresponde a la unión del anticuerpo secundario-Alexa Fluor 633 (dilución 1/100). Las flechas blancas señalan la presencia de células arbusculadas. Las flechas azules indican las zonas de mayor acumulación de la proteína ZmPIP1;3/PIP1;4.

El análisis cualitativo del patrón general de acumulación de la proteína ZmPIP1;3/PIP1;4 mostró que en las plantas no MA en condiciones óptimas de riego, la proteína se acumulaba en todos los tejidos de la raíz, siendo su presencia más abundante en el aerénquima lagunar. Por su lado, la micorrización dio lugar a un patrón de acumulación bastante similar al de las plantas no MA, pero presentó una mayor acumulación de esta proteína en la epidermis radicular. La aplicación de sequía a las plantas MA modificó este patrón, disminuyendo la presencia de ZmPIP1;3/PIP1;4 en la epidermis y el aerénquima, pero fomentando su acumulación en la endodermis.

El estudio detallado del cortex radical (Fig. 5.4) nos mostró que la presencia de ZmPIP1;3/PIP1;4 en las raíces de las plantas MA se mantuvo en las membranas plasmáticas que rodean los arbuscúlos, por lo que aparecen asociadas a los mismos. El estrés hídrico no afectó de manera significativa a la acumulación de esta proteína.

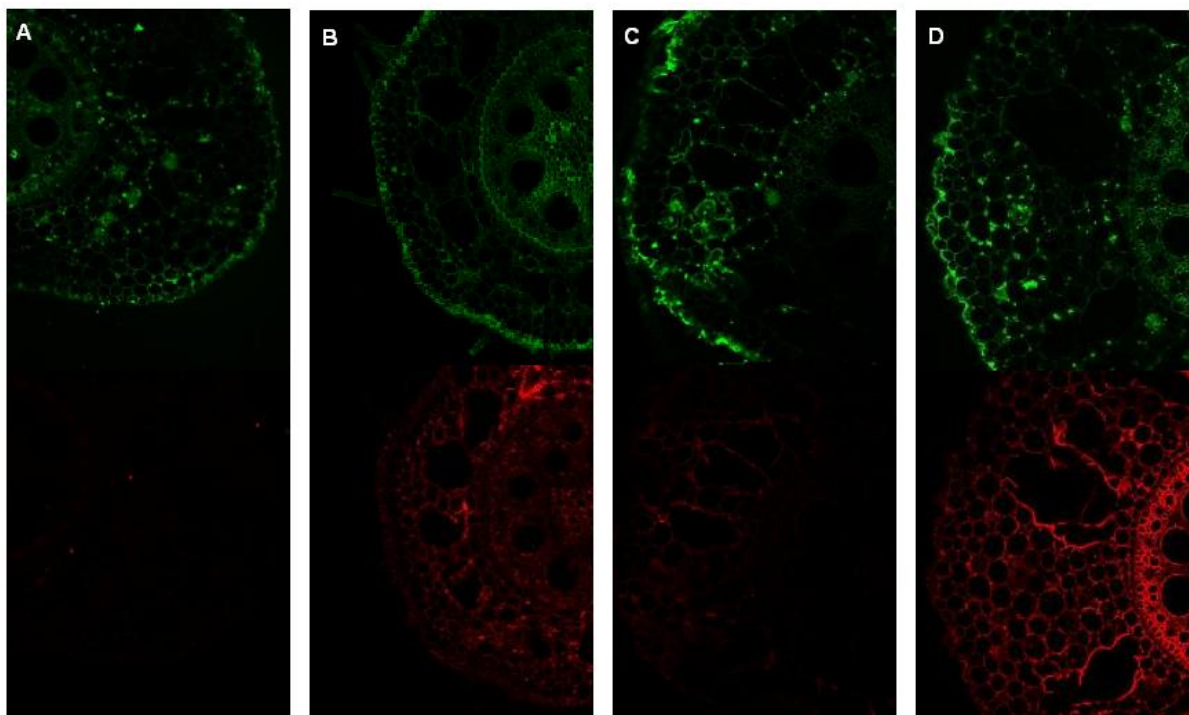


**Figura 5.4.** Inmuno-localización de la proteína ZmPIP1;3/PIP1;4 en cortes transversales (0,5mm) de raíz primaria de maíz en (A) plantas inoculadas con *R. intraradices* en condiciones óptimas de riego y (B) plantas inoculadas con *R. intraradices* en condiciones de sequía. La imagen en verde corresponde al WGA-488 (marcador del hongo MA). La imagen en rojo corresponde a la unión del anticuerpo secundario Alexa-Fluor 633 (dilución 1/100) que resalta la presencia del anticuerpos primarios específicos. La imagen en azul cian corresponde a la auto-fluorescencia de las paredes celulares de las células. La imagen tomada con luz visible aparece arriba a la derecha. Las flechas blancas señalan la presencia de células arbusculadas. Las flechas azules indican las zonas de acumulación de la proteína ZmPIP1;3/PIP1;4 coincidiendo con las células arbusculadas.

#### 5.4.4. Inmuno-localización de la acuaporina ZmPIP2;1/PIP2;2 en raíces de plantas de maíz inoculadas con *R. intraradices*.

La proteína ZmPIP2;1/PIP2;2 apareció también asociada a la membrana plasmática de las células de la raíz de la planta (datos no mostrados). El análisis cualitativo del patrón general de acumulación de ZmPIP2;1/PIP2;2 mostró que en las plantas no MA en condiciones óptimas de riego, la proteína ZmPIP2;1/PIP2;2 aparecía expresada en todos los tejidos de la raíz (Fig. 5.5B).

La micorrización dio lugar a una clara inhibición de acumulación de esta proteína en todos los tejidos cuando las plantas estaban en condiciones óptimas de riego (Fig. 5.5C). La aplicación de sequía a las plantas MA modificó el patrón de acumulación. La presencia de esta proteína aumentó considerablemente en todos los tejidos de la raíz, especialmente en la endodermis, al igual que ocurrió con la proteína ZmPIP1;3/PIP1;4.

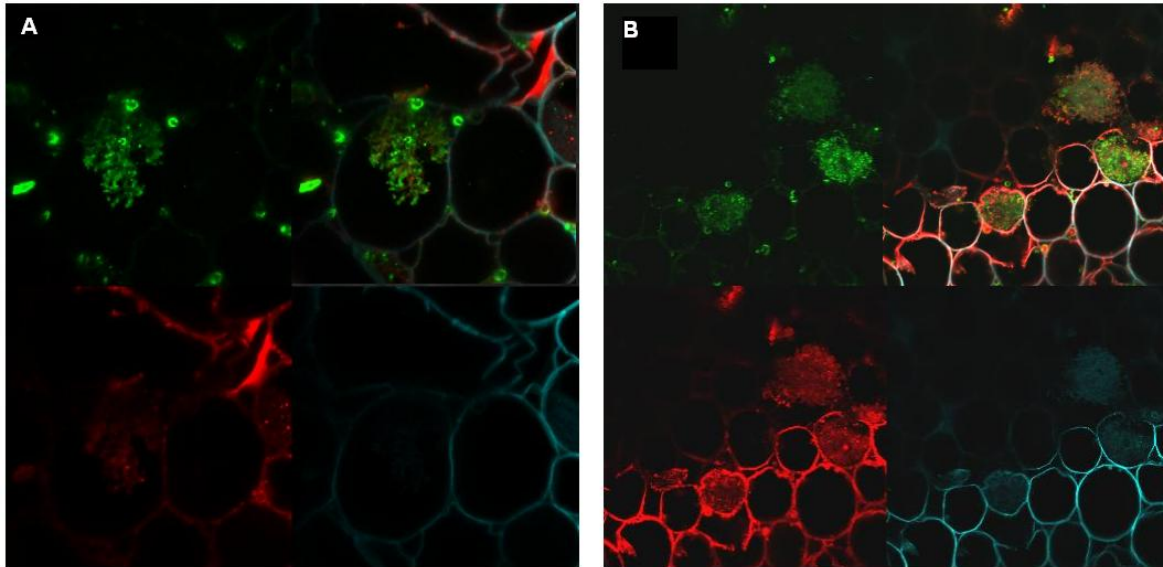


**Figura 5.5.** Inmuno-localización de la proteína ZmPIP2;1/PIP2;2 en cortes transversales (0,5mm) de raíz primaria de maíz en (A) muestras tratadas con suero preimmune, (B) plantas control en condiciones óptimas de riego (C) plantas inoculadas con *R. intraradices* en condiciones óptimas de riego y (D) plantas inoculadas con *R. intraradices* en condiciones de sequía. Ver la leyenda de la Figura 5.3 para más detalles.

La proteína ZmPIP2;1/PIP2;2 apareció también asociada a la membrana plasmática de las células de la raíz de la planta (datos no mostrados). El análisis cualitativo del patrón general de acumulación de ZmPIP2;1/PIP2;2 mostró que en las plantas no MA en condiciones óptimas de riego, la proteína ZmPIP2;1/PIP2;2 aparecía expresada en todos los tejidos de la raíz (Fig. 5.5B). La micorrización dio lugar a una clara inhibición de acumulación de esta proteína en todos los tejidos cuando las plantas estaban en condiciones óptimas de riego (Fig. 5.5C). La aplicación de sequía a las plantas MA modificó el patrón de acumulación. La presencia de esta proteína aumentó considerablemente en todos los tejidos de la raíz, especialmente en la endodermis, al igual que ocurrió con la proteína ZmPIP1;3/PIP1;4.

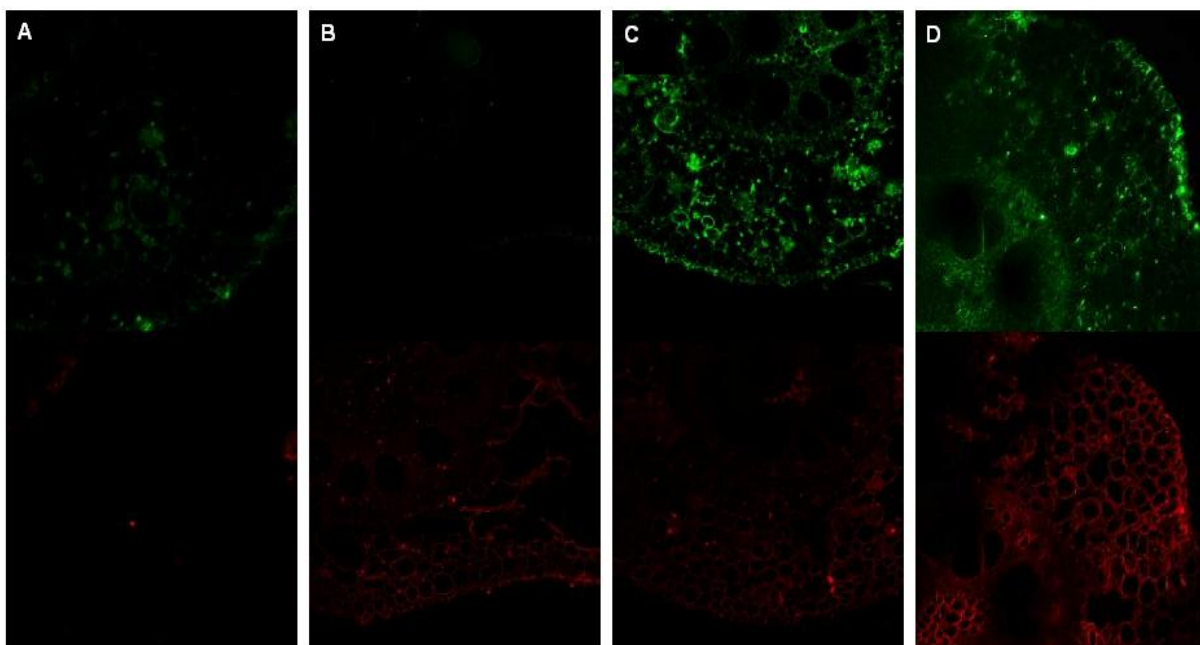
El estudio detallado del cortex radical nos mostró que la presencia de ZmPIP2;1/PIP2;2 en las raíces de las plantas MA en condiciones óptimas de riego se mantuvo en la membrana plasmática que rodea los arbusculos (Fig 5.6A) y se incrementó aún más su presencia en las plantas MA sometidas a sequía, tanto en las células arbusculadas como en las adyacentes (Fig. 5.6B).





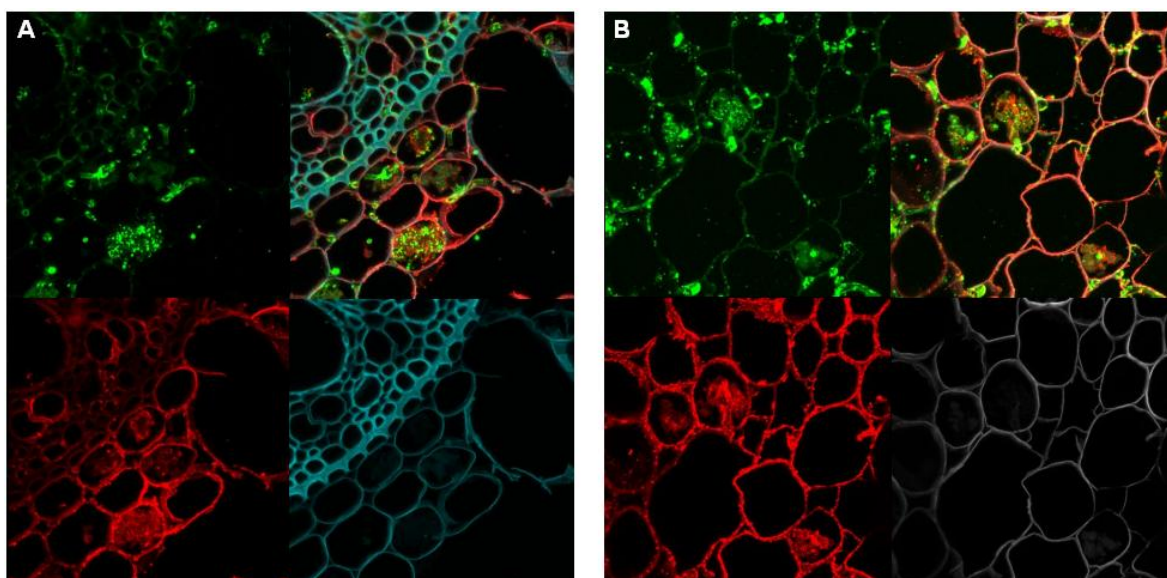
**Figura 5.6.** Inmuno-localización de la proteína ZmPIP2;1/PIP2;2 en cortes transversales (0,5mm) de raíz primaria de maíz en (A) plantas inoculadas con *R. intraradices* en condiciones óptimas de riego y (B) plantas inoculadas con *R. intraradices* en condiciones de sequía. La imagen en verde corresponde al WGA-488 (marcador del hongo MA). La imagen en rojo corresponde al la unión del anticuerpo secundario Alexa-Fluor 633 (dilución 1/100) que resalta la presencia del anticuerpos primarios específicos. La imagen en azul cian corresponde a la auto-fluorescencia de las paredes celulares de las células. La imagen combinada de las anteriores aparece arriba a la derecha.

#### 5.4.5. Inmuno-localización de la acuaporina ZmTIP1;1 en raíces de plantas de maíz inoculadas con *R. intraradices*.



**Figura 5.7.** Inmuno-localización de la proteína ZmTIP1;1 en cortes transversales (0,5mm) de raíz primaria de maíz en (A) muestras tratadas con suero preinmune, (B) plantas control en condiciones óptimas de riego (C) plantas inoculadas con *R. intraradices* en condiciones óptimas de riego y (D) plantas inoculadas con *R. intraradices* en condiciones de sequía. Ver la leyenda de la Figura 5.3 para más detalles.

La proteína ZmTIP1;1 en principio está asociada a la membrana vacuolar de las células (datos no mostrados). El análisis cualitativo del patrón general de acumulación de esta proteína no muestra variaciones significativas entre las plantas MA y no MA en condiciones óptimas de riego (Fig. 5.7B y C). Sin embargo, en condiciones de sequía, se produce un aumento de esta proteína en el tonoplasto de las células de plantas MA en comparación con las mismas plantas en condiciones óptimas de riego (Fig 5.7C y D), especialmente en el cortex y el cilindro central (Fig. 5.7D). Un análisis más detallado nos revela una acumulación de esta proteína alrededor de los arbusculos tanto en plantas MA en condiciones óptimas de riego como en condiciones de sequía (Fig. 5.8). En plantas MA en condiciones óptimas de riego, la localización se reduce a las células arbusculadas y adyacentes a las mismas, mientras que en plantas MA sometidas a sequía se produce un aumento generalizado de la presencia de esta proteína (Fig.5.8).



**Figura 5.8.** Inmuno-localización de la proteína ZmTIP1;1 en cortes transversales (0,5mm) de raíz primaria de maíz en (A) plantas inoculadas con *R. intraradices* en condiciones óptimas de riego y (B) plantas inoculadas con *R. intraradices* en condiciones de sequía. Ver la leyenda de la Figura 5.6 para más detalles.

## 5.5. DISCUSIÓN

Las plantas micorrizadas suelen presentar mayor resistencia al estrés hídrico que las plantas no micorrizadas gracias a su capacidad de alterar las propiedades hidráulicas de la raíz (Khalvati et al., 2005; Bárzana et al., 2012, Capítulo 3). De hecho, en este estudio, el CHR fue mayor en plantas MA que en plantas no MA sometidas a sequía, confirmando un mejor estatus hídrico y una mayor tolerancia al déficit hídrico de las plantas MA.

Desde hace tiempo se sabe que la simbiosis MA altera la tasa de movimiento de agua dentro, hacia y fuera de la planta hospedadora (Augé, 2001), modificando la conductancia hidráulica de las plantas (Aroca et al., 2007; Ruiz-Lozano et al., 2009) gracias (entre otros factores) a

modificaciones en la expresión o acumulación de las acuaporinas, tal y como observamos en el capítulo anterior. En este sentido, los análisis de inmunolocalización de las acuaporinas llevados a cabo en este estudio revelaron que la simbiosis MA altera, no solo el patrón de acumulación, sino también la distribución de las acuaporinas en los distintos tejidos de la raíz.

Hay que tener en cuenta que los análisis de acumulación de proteínas llevados a cabo en el capítulo 4 analizaban el contenido de acuaporinas en el total de la raíz de la planta, mientras que aquí estamos estudiando lo que ocurre con las acuaporinas de interés en cuanto a su localización en los distintos tipos de células que componen la raíz, comparando las células de raíces no MA con las de raíces MA sometidas o no a sequía. En este capítulo, la acumulación de la proteína ZmPIP2;1/ZmPIP2;2 se vio inhibida por la simbiosis MA en condiciones óptimas de riego. Esta reducción coincide con los resultados que obtuvimos en el capítulo 4, donde todas las acuaporinas analizadas se veían disminuidas por la simbiosis MA en condiciones óptimas de riego. Sin embargo, en este capítulo, no se observó dicha reducción de las proteínas ZmPIP1;3/PIP1;4 y ZmTIP1;1 (esta última analizada también en el capítulo anterior). Además, el análisis detallado de su localización en cortes de raíz reveló una mayor acumulación de las mismas en las células arbusculadas y células adyacentes a las mismas. La elevada especificidad en sus funciones puede llevar a que determinadas isoformas se expresen o estén presentes en las membranas de tipos celulares específicos poco abundantes, apareciendo en menor cantidad relativa, pero sin dejar por ello de ejercer funciones fundamentales en dichos tejidos (Chaumont y Tyerman, 2014).

En el presente estudio, se produjo una fuerte reducción del crecimiento de las plantas debida el estrés hídrico aplicado e independiente de la micorrización. Además, también observamos un CHR muy inferior en las plantas sometidas a sequía en comparación con las plantas en condiciones óptimas de riego. Estos datos en conjunto, nos indican que estas plantas se vieron sometidas a un nivel de estrés severo, más incluso que las plantas del capítulo 4, donde a pesar de someter a algunas de las plantas a sequía sostenida, ésta no tuvo repercusión significativa sobre la producción de biomasa de las plantas. En el capítulo 4 también observamos que el estrés hídrico afectaba a las plantas MA y no MA de manera distinta en función de la severidad del estrés, modificando los niveles de expresión y acumulación de acuaporinas. Los resultados obtenidos mostraron una disminución de la expresión de las acuaporinas y un aumento de su acumulación en las plantas MA a medida que se sometieron a un estrés hídrico más intenso. En este estudio, observamos que en plantas MA la sequía aumentó la acumulación subcelular de dos de las tres acuaporinas analizadas (ZmPIP2;1/PIP2;2 y ZmTIP1;1) a nivel de células arbusculadas y células adyacentes. En conjunto, ello parece indicar que efectivamente la elevada intensidad y la duración del estrés acentuaron el incremento de la presencia de estas acuaporinas en las raíces de plantas MA en respuesta al mismo. También observamos un claro efecto de la sequía sobre la distribución de las acuaporinas en los tejidos de las plantas MA. La sequía generó una mayor presencia de PIPs en la endodermis



radicular, mientras la ZmTIP1;1 aumentó más en el cortex y el cilindro central. Además, todas ellas aparecieron asociadas a las células arbusculadas y más concretamente, a las membranas que recubren los arbusculos de las plantas MA. Las PIPs se han mostrado como las acuaporinas más importantes relacionadas con el transporte de agua en raíces de diversas plantas (Javot et al., 2003; Chaumont y Tyerman, 2014), especialmente en los tejidos donde el transporte vía célula a célula es más limitante (Steudle, 2000). También hemos visto en capítulos anteriores su posible influencia en la conductancia osmótica radical de las plantas de maíz y el fuerte control que ejerce la simbiosis MA sobre ellas. Así pues, la gran acumulación de estas proteínas en la endodermis y alrededor de los arbusculos de las plantas MA sugiere un incremento del transporte de agua en estas plantas, que consiguieron así mantener un mayor CHR que las plantas no MA.

De otra parte, la acuaporina ZmTIP1;1 se ha mostrado como una gran transportadora de agua (Chaumont et al., 1998) y en el capítulo anterior vimos que era capaz además de transportar gran variedad de compuestos con interés fisiológico para las plantas, incluyendo urea, amonio, boro o peróxido de hidrógeno. Esta proteína aparece fundamentalmente en el tonoplasto vacuolar y se ha relacionado, junto a otras TIPs, con el ajuste osmótico (Tyerman et al., 2002; Sade et al., 2009). Además, hemos visto en el capítulo 4 cómo podrían influir en la mayor tolerancia de las plantas MA al déficit hídrico. Así pues, la acumulación de esta proteína en plantas MA sometidas a sequía en las células del cortex y especialmente alrededor de los arbusculos, apunta a una elevada actividad de las mismas, que podría responder a un incremento del intercambio de agua y solutos entre el hongo MA y la planta hospedadora.

## IX. DISCUSIÓN GENERAL



En la naturaleza las plantas están constantemente sometidas a presiones medioambientales, siendo la sequía la que afecta a una mayor cantidad de plantas cultivables en todo el mundo (Bray, 2004). El principal efecto de la sequía es la reducción de las cosechas, que oscila entre el 10 y el 90%, dependiendo de la severidad y del estadio de la planta en el momento de sufrir sus efectos (Porcel, 2006). El estrés hídrico produce cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan negativamente al crecimiento y desarrollo de las plantas (Wang et al., 2001), de manera que, casi todos los procesos de la planta se ven afectados directa o indirectamente por la falta de agua (Akinci y Losel, 2012).

La simbiosis micorrízica arbuscular protege a la planta frente a los efectos del déficit hídrico actuando sobre varios aspectos fundamentales de su fisiología: las relaciones hídricas de la planta, la fotosíntesis, el metabolismo y osmoregulación, las hormonas (especialmente el ABA) y los sistemas antioxidantes. Muchos de estos efectos tienen una clara relación con la expresión, acumulación y/o actividad de las acuaporinas, ya que éstas aparecen involucradas en una gran variedad de procesos relacionados con las propiedades hídricas y fisiología de las plantas. En esta tesis doctoral hemos profundizado en el conocimiento de las respuestas de las plantas micorrizadas al déficit hídrico y hemos comprobado que las acuaporinas juegan un papel fundamental en muchos de los procesos de respuesta al estrés hídrico de las plantas MA.

La acumulación de compuestos osmoreguladores como azúcares solubles y prolina es un mecanismo destinado a proteger los tejidos de las plantas de los efectos de la deshidratación, ya que consigue disminuir el potencial de solutos ( $\Psi_s$ ) favoreciendo la entrada de agua hacia las células. En el capítulo 1 vimos que las raíces de las plantas MA sometidas a sequía fisiológica (afectando a toda la raíz) acumularon más compuestos osmoreguladores como mecanismo para conseguir mantener el flujo de entrada de agua hacia las raíces cuando el potencial hídrico del suelo disminuyó (Porcel et al., 2004), lo que sugiere una capacidad de ajuste osmótico mayor que en las raíces de plantas no MA bajo estas mismas condiciones. Sin embargo, en hojas encontramos efectos muy diversos. En primer lugar, la sequía aplicada a uno solo de los compartimentos radicales (sequía no fisiológica) no generó un aumento de estos compuestos en hojas y, en condiciones de estrés hídrico moderado (Capítulo 2), la simbiosis MA contuvo el incremento en prolina, que sólo aumentó en las plantas no MA. Sin embargo, en condiciones de estrés más severo (afectando a toda la raíz) las plantas MA alcanzaron un nivel mayor de prolina y de azúcares solubles en hojas que las plantas no MA. Esto sugiere que las plantas MA consiguen evadir durante más tiempo el efecto negativo del estrés hídrico sobre su parte aérea, pero una vez que el estrés se acentúa y alcanza la parte aérea, estas plantas tienen una mayor capacidad de producción y acumulación de estos compuestos. También vimos que, si bien la acumulación de azúcares solubles en condiciones de sequía mostró tener un efecto sistémico, cuando la sequía afectaba solo a la mitad del sistema radical, la acumulación de prolina tuvo un efecto local, similar en plantas

micorrizadas y no micorrizadas. No obstante, cuando el estrés se acentuó y afectó a la totalidad de la raíz, originando un estrés fisiológico, la prolina mostró un efecto sistémico en plantas MA, afectando y protegiendo a toda la planta de los efectos de la deshidratación. El conjunto de estos datos podría explicar los resultados contradictorios sobre osmoregulación en plantas MA encontrados hasta la fecha (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004; Porcel et al., 2004), ya que los efectos que la simbiosis MA tiene sobre los mecanismos osmoreguladores de la planta dependen en gran medida de la intensidad del estrés impuesto.

Por otro lado, las plantas sometidas a estrés hídrico presentan un aumento en la acumulación de ROS, que generan un estrés oxidativo secundario en sus tejidos (Kramer y Boyer, 1995; Miller et al., 2010). Este efecto puede detectarse por el estudio del daño oxidativo a lípidos de membrana (DOL). Se ha visto que las plantas micorrizadas presentan menor DOL en condiciones de estrés hídrico que las plantas no MA (Ruiz-Lozano et al., 2001; Porcel et al., 2003). De hecho, en el capítulo 1 vimos como los niveles de DOL no aumentaron en las plantas micorrizadas sometidas a sequía y el aumento en las plantas con raíz parcialmente micorrizadas fue (en porcentaje) menor que en las plantas no micorrizadas. Además, las zonas micorrizadas de la raíz acumularon más glutatión a nivel local y menos ascorbato reducido, lo que en conjunto dio lugar a una menor acumulación de peróxido de hidrógeno en respuesta al estrés hídrico. Ello indica que las raíces micorrizadas tienen un sistema antioxidante más eficiente (Talaat y Shawky, 2011). De hecho, los efectos diferenciales en el daño oxidativo encontrados entre las plantas sometidas a sequía parcial nos indican claramente que cuando la sequía afectó a los compartimentos micorrizados, el daño tuvo un efecto localizado, restringiéndose a esa zona de las raíces pero manteniéndose en niveles normales en el resto de la planta. Por el contrario, cuando la sequía afectó a raíces no MA, la utilización y consiguiente disminución del ascorbato reducido no fue suficiente para evitar la acumulación de  $H_2O_2$  a nivel local en estas raíces, a pesar de una mayor actividad de la APX, por lo que se generó un DOL mayor que afectó a toda la planta por igual. De hecho, las plantas no micorrizadas sometidas a sequía parcial no fisiológica mostraron el mismo comportamiento que las sometidas a sequía total y fisiológica, demostrando más dificultades para enfrentarse al estrés hídrico desde el comienzo del mismo. Esto nos indica que los beneficios de la micorrización no se restringen a un menor estrés oxidativo secundario sino que favorece también su compartimentación, lo que permite a la planta continuar con sus procesos normales al limitar el daño localmente. Así, las plantas plenamente micorrizadas sometidas a sequía parcial consiguieron evadir el estrés hídrico en su parte aérea, manteniendo todos sus parámetros fisiológicos, así como los sistemas de protección osmóticos y antioxidantes, a niveles similares a los de las plantas cultivadas en condiciones óptimas.

El ABA es considerada la señal más importante en la respuesta al estrés, ya que regula importantes procesos relacionados con el estatus hídrico de las plantas como la conductancia

hidráulica radical ( $L_o$ ) o la tasa de transpiración (Wilkinson y Davies, 2002; Zhang et al., 2006; Aroca, 2006; Vandeleur et al., 2009), así como la inducción de genes que codifican enzimas y otras proteínas involucradas en la tolerancia a la deshidratación celular (Hirayama y Shinozaki, 2007; Costa y Lobato, 2011). Las simbiosis MA, por su parte, modula los mismos procesos fisiológicos que el ABA, mejorando la tolerancia al estrés hídrico (Ruiz-Lozano, 2003) y, aunque hasta la fecha se han llevado a cabo pocos estudio sobre la influencia combinada de ambos factores sobre las propiedades hidráulicas en plantas sometidas a estrés hídrico, sabemos que existe una fuerte relación entre la respuesta a la simbiosis MA y el contenido de ABA endógeno de la planta hospedadora, así como una diferente regulación del contenido en ABA en plantas MA y no MA (Aroca et al., 2008 a y b).

En el capítulo 2 encontramos que el contenido en ABA de las plantas de maíz no MA fue mayor que el de las plantas MA tanto en condiciones de sequía como tras su recuperación y se ha propuesto que las plantas MA pueden acumular menos ABA que las plantas no MA como consecuencia de la existencia de mecanismos primarios de evitación del estrés (Porcel et al., 2005; Ruiz-Lozano et al., 2006), como los explicados en los apartados anteriores. Además, estudios previos sugerían que las plantas MA regulan mejor y más rápido sus niveles de ABA que las plantas no MA, permitiendo un mejor equilibrio entre la tasa de transpiración y el movimiento de agua a través de las raíces en condiciones de estrés hídrico y tras su recuperación (Aroca et al., 2008b). En paralelo a estos resultados, los valores de  $L_o$  de las plantas MA fueron menores que los de las plantas no MA, especialmente cuando se aplicó ABA exógeno, que acentuó las diferencias de  $L_o$  entre ambos tipos de plantas, por lo que existe una evidente relación entre los niveles de ABA en plantas MA y no MA y sus efectos sobre  $L_o$ .

Por otro lado, encontramos que la aplicación de ABA exógeno aumentó  $L_o$  en todas las plantas independientemente del tratamiento de riego aplicado. El aumento de  $L_o$  por aplicación de ABA exógeno ha sido observado con anterioridad (Hose et al., 2000; Aroca, 2006). La regulación de la conductancia radical ha sido relacionada directamente con cambios en la presencia y actividad de las acuaporinas (Javot y Maurel, 2002; Luu y Maurel, 2005; Beaudette et al., 2007) por lo que se ha propuesto que la función de las acuaporinas y la señal de transducción del ABA puedan estar interconectadas (Kaldenhoff et al., 2008). En este estudio, también observamos que el efecto de ABA sobre la expresión de los genes de PIPs depende de la presencia o ausencia del hongo MA. Así pues, la diferente regulación del contenido en ABA por la simbiosis MA podría estar modificando  $L_o$  a través del control de las acuaporinas. De hecho, las modificaciones en  $L_o$ , especialmente en plantas suplementadas con ABA exógeno, están claramente relacionadas con la expresión de la mayor parte de las PIPs analizadas. También es remarcable el importante incremento en  $L_o$  y la expresión de las siete PIPs analizadas en plantas no MA sometidas a recuperación tras un periodo de sequía al aplicarles ABA exógeno, mientras que las

correspondientes plantas MA mostraron una clara reducción de  $L_o$  en paralelo a la reducida expresión de las PIPs. Una disminución de la expresión génica de PIPs en plantas MA sometidas a estrés hídrico ha sido interpretada habitualmente como un mecanismo conservativo que evita la pérdida de agua de las células (Porcel et al., 2006; Jang et al., 2007) y en los capítulos anteriores hemos visto que el fino control ejercido por las simbiosis MA sobre las acuaporinas de la planta hospedadora puede ser crucial en condiciones de estrés hídrico. En su conjunto, todos estos resultados sugieren que la combinación de ABA exógeno y simbiosis MA inhiben la expresión de las PIPs como estrategia de conservación de agua en la planta hospedadora, que permite a estas plantas mantener unos altos niveles de contenido hídrico relativo. Estos hallazgos sugieren también que la permeabilidad al agua de las plantas MA y no MA sometidas a estrés hídrico está dirigida por una compleja regulación de las acuaporinas, dependiendo de los papeles específicos que las distintas isoformas juegan en la planta (Alexandersson et al., 2005; Luu y Maurel, 2005), y que estas variaciones están muy relacionadas con el contenido en ABA de estas plantas (Aroca et al., 2008a).

La sequía lleva consigo la deshidratación de los tejidos debido a la descompensación entre el agua tomada por la raíz y la transpirada por las hojas (Aroca et al., 2001). Por esta razón, muchas de las adaptaciones fisiológicas de las plantas al estrés hídrico están encaminadas al control de la tasa de transpiración (Akinci y Losel, 2012) y al control de la conductancia hidráulica de sus raíces (Aroca et al., 2012) que, en conjunto, permitirían el mantenimiento de la turgencia celular y una fisiología adecuada para continuar con los procesos de crecimiento y desarrollo de la planta (Nayyar y Gupta, 2006). En este sentido, las plantas micorrizadas han demostrado una mayor capacidad fisiológica para hacer frente a la sequía que las no micorrizadas.

Los datos fisiológicos obtenidos a lo largo de los cinco capítulos de esta tesis mostraron que, cuando las plantas sin micorrizar se someten a estrés hídrico, comienzan un proceso de disminución de la conductancia hidráulica radical ( $L$ ) y de la transpiración, que dan lugar a una disminución del estatus hídrico general de estas plantas. También demuestran que estos efectos comienzan desde el inicio de la sequía, cuando ésta afecta sólo a algunas zonas del suelo, ya que su capacidad para absorber agua se ve rápidamente reducida. Por el contrario, las plantas micorrizadas han demostrado una mayor adaptabilidad al proceso de sequía de manera que, cuando ésta afecta sólo a algunas zonas del suelo, su mayor acceso al agua les permitió mantener durante más tiempo una elevada  $L$  y una elevada transpiración, de manera que consiguieron mantener el estatus hídrico y los procesos de desarrollo y crecimiento durante periodos más largos de sequía. Sin embargo, a medida que la sequía se hizo más severa, la eficiencia de la micorrización en la absorción de agua también alcanzó un límite, y las plantas MA comenzaron a percibir los efectos del estrés. Esto dio lugar a una reducción de la transpiración y del transporte de agua en las raíces, que tuvo como consecuencia una reducción del estatus hídrico general de la planta. A pesar de ello, las plantas

micorrizadas mostraron siempre valores superiores de contenido hídrico relativo que las plantas no micorrizadas.

Sabemos que el transporte radial de agua hacia los vasos xilemáticos de las plantas se produce mediante dos vías fundamentales, la vía célula a célula y la apoplástica (Steudle, 2000). La contribución relativa de cada vía puede variar notablemente dependiendo de las condiciones ambientales (Steudle, 2000; Martínez-Ballesta et al., 2003) y se asume que la vía célula a célula adquiere mayor relevancia en condiciones de transpiración reducida. Basándonos en este concepto consideramos que, en condiciones de sequía severa, cuando la transpiración se veía reducida, el mejor estatus hídrico de las plantas MA frente a las no MA podría deberse a un efecto directo de la simbiosis sobre el transporte de agua por la vía apoplástica, ya que estudios previos llevados a cabo en ectomicorrizas apuntaban a que esta vía se veía facilitada por la simbiosis micorrícica (Muhsin y Zwiazek, 2002; Smith et al., 2010). Los datos del capítulo 3 revelaron que, en efecto, las raíces de plantas MA aumentaron significativamente el flujo de agua por la vía apoplástica en comparación con las plantas no MA, tanto en condiciones óptimas de riego como en condiciones de sequía. Un aumento del transporte de agua por la vía apoplástica compensaría la disminución de  $L_o$  y permitiría mantener una  $L$  elevada, dando explicación a algunos de los resultados obtenidos en los diversos capítulos de esta tesis doctoral. También encontramos que la presencia de hongos MA en las raíces de la planta hospedadora puede modular la conmutación entre las vías de transporte de agua apoplástica y célula a célula, lo que permite a la planta responder mejor a las demandas de agua de la parte aérea, especialmente en condiciones de déficit hídrico (Bárzana et al., 2012).

Así pues, un estricto control en el transporte de agua de las plantas puede ser fundamental para la supervivencia en condiciones de estrés hídrico. En este sentido, es bien sabido que las acuaporinas juegan un papel fundamental en la regulación del transporte de agua por la vía célula a célula, que como hemos dicho, es la vía fundamental en condiciones de déficit hídrico. Las acuaporinas disminuyen la resistencia al paso del agua a través de las membranas, y puesto que su actividad puede ser regulada, esto proporciona a la planta un mecanismo muy fino de control del transporte de agua a través de sus tejidos. Así pues, parece probable que la simbiosis MA origine cambios en la actividad de las acuaporinas de la planta hospedadora (Porcel et al., 2006; Uehlein et al., 2007; Aroca et al., 2007) y que estos cambios estén directamente relacionados con las distintas respuestas al déficit hídrico generadas por la micorrización.

Los datos obtenidos en el capítulo 4 mostraron que la simbiosis micorrícica arbuscular regula la expresión de un amplio número de genes de acuaporinas de la planta hospedadora pertenecientes a todos los subgrupos de acuaporinas. Muchas de estas acuaporinas pueden transportar diversas moléculas fisiológicamente importantes para la planta además de agua. La regulación de estos genes depende de las condiciones de intensidad y duración del estrés impuesto. De hecho, bajo condiciones de estrés de corta duración, la simbiosis MA aumentó la expresión de los genes de



acuaporinas de los patrones 2, 3, 4 y 5, y solo las acuaporinas de los patrones 1 y 6 permanecieron inalteradas. Por el contrario, en condiciones de estrés mantenido, la simbiosis MA disminuyó la expresión de los genes de acuaporinas de los patrones 1, 2 y 4, mantuvo inalterados los genes de los patrones 3 y 5, y solo las acuaporinas correspondientes al patrón 6 aumentaron su expresión. Esto sugiere que, bajo condiciones de estrés hídrico de corta duración, la simbiosis MA puede aún estimular muchos de los procesos fisiológicos en los que participan las acuaporinas, quizás debido a que estas plantas tienen un mayor acceso a las reservas de agua del suelo inaccesibles para las plantas no MA. Por el contrario, cuando el estrés se vuelve más prolongado, la simbiosis MA restringe muchos de los procesos en los que participan las acuaporinas. En las plantas no MA, la respuesta es una reducción generalizada de la expresión de las acuaporinas y de los procesos en que éstas intervienen. Apoyando esta idea, encontramos que las plantas MA exhibieron una  $L_o$  mayor en condiciones de estrés hídrico de corta duración y menor en estrés hídrico sostenido, mientras las plantas no MA redujeron  $L_o$  en ambos tipos de estrés hídrico, coincidiendo en ambos casos con las variaciones de expresión de las acuaporinas analizadas.

Por otro lado, los niveles de acumulación de acuaporinas mostraron un patrón similar al de expresión génica en condiciones óptimas de riego, donde observamos una fuerte reducción de la expresión y de la presencia de acuaporinas en las raíces de las plantas MA en comparación con las no MA. Por el contrario, al someter las plantas a diferentes condiciones de sequía observamos un patrón diferente de acumulación de acuaporinas en plantas MA y no MA. En este sentido encontramos que, si bien en plantas no MA la sequía produjo una disminución en la acumulación y expresión de las acuaporinas al aumentar la duración del estrés, en las plantas MA se producía un aumento de la acumulación de estas proteínas y una reducción de su expresión génica a medida que se sometieron estas plantas a un estrés hídrico más prolongado e intenso. Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis sugieren que un menor contenido de acuaporinas en las plantas MA cuando crecen en condiciones óptimas de riego puede ser a su vez una ventaja cuando las condiciones ambientales cambian, ya que la planta está intrínsecamente preparada para la conservación de agua, mejorando la eficiencia en el uso de la misma. De hecho, diversos grupos de investigación han encontrado evidencias de que una estrategia de conservación y control del contenido en agua de las plantas en condiciones óptimas puede ser clave a la hora de enfrentarse al estrés hídrico (Hanba et al., 2004; Sade et al., 2010; Belko et al., 2012a y b). Además, los datos nos muestran que, cuando el estrés se hace más prolongado, las plantas MA están más capacitadas para reaccionar, aumentando su contenido en acuaporinas a medida que el estrés se vuelve más intenso, alcanzando mayores niveles de acumulación que las plantas no MA en condiciones de estrés severo. También se ha sugerido que la diferente eficiencia en el uso del agua de distintas variedades de una misma planta, está directamente relacionada con la presencia y actividad de las acuaporinas (Almeida-Rodriguez et al., 2010; Sade et al., 2010).

La falta de correlación entre ARNm y proteínas ha sido encontrada previamente en estudios sobre acuaporinas (López et al., 2003; Aroca et al., 2005; Boursiac et al., 2005) y puede explicarse en base a tres razones fundamentales: La primera es que los cambios de expresión génica son mucho más rápidos que los cambios en el contenido en proteínas. En este sentido, la expresión génica nos proporcionaría una idea de la dirección en la que se está produciendo la respuesta de la planta en un momento dado, mientras el contenido de proteínas refleja el estado actual de la misma y los cambios en este parámetro sólo podrán ser vistos a posteriori. En segundo lugar, las modificaciones post-traduccionales juegan un papel fundamental en el transporte de agua. En este sentido, los efectos de la micorrización parcial sobre la acumulación de PIPs2 fosforiladas en los compartimentos radicales bien hidratados cuando el otro compartimento radical estaba sometido a sequía, sugieren que las plantas micorrizadas ajustan de manera local, mediante modificaciones post-traduccionales, la actividad de las acuaporinas en función del grado de micorrización e intensidad del estrés. Por último, la elevada especificidad en sus funciones puede llevar a que determinadas isoformas se expresen o estén presentes en las membranas de tipos celulares específicos poco abundantes, apareciendo en menor cantidad relativa, pero sin dejar por ello de ejercer funciones fundamentales en dichos tejidos (Chaumont y Tyerman, 2014). Esto último parece confirmarse en los análisis de inmuno-localización de las acuaporinas llevados a cabo en el capítulo 5, donde se observa claramente que la simbiosis MA altera, no solo el patrón de acumulación, sino también la distribución de las acuaporinas a nivel subcelular. Así, encontramos que se produjo una acumulación de las acuaporinas alrededor de los arbusculos, que aumentó aún más en condiciones de estrés hídrico. También se vio que la distribución de las acuaporinas a nivel de tejidos de la raíz se modificaba en plantas MA al someterse a estrés hídrico, aumentando la presencia de PIPs en los tejidos donde la  $L_o$  es más limitante, apuntando claramente a un incremento del transporte de agua en estas plantas que, de nuevo, consiguieron mantener un estatus hídrico más elevado que las plantas no MA.

La conductancia estomática y la transpiración suelen aumentar en plantas MA, tanto en condiciones óptimas como de estrés hídrico (Augé, 2001). El hecho de que las plantas sometidas a sequía parcial variasen su conductancia estomática en función de si la sequía afectaba o no al compartimento micorrizado sugiere dos cosas: 1) la sequía afecta menos a las raíces de plantas que están micorrizadas y 2) Las plantas en las que las raíces micorrizadas tienen suficiente acceso a agua no son tan sensibles al estrés como aquellas en las que el aporte de agua depende exclusivamente de las raíces no micorrizadas.

El mantenimiento de una elevada conductancia estomática y tasa transpiratoria permite una mayor captación de  $CO_2$ , necesario para llevar a cabo la fotosíntesis (Allen et al., 1981; Davies et al., 1993; Sheng et al., 2008). Así pues, es esperable que al someter las plantas MA a déficit hídrico, el mantenimiento de la conductancia estomática durante más tiempo al inicio del estrés,

favorezca también una mayor actividad fotosintética y con ella un mayor metabolismo y crecimiento de estas plantas frente a las no MA. De hecho, en el capítulo 4, encontramos que las plantas MA continuaron creciendo más que las plantas no MA bajo condiciones de estrés, tanto de corta duración como sostenido (35% y 26%, respectivamente). También, en los capítulos 1 y 2, fue evidente que una de las mayores ventajas de las plantas micorrizadas frente a las no micorrizadas fue el mantenimiento de la eficiencia fotosintética tanto en condiciones óptimas como durante los periodos de sequía.

Es bien sabido que la micorrización estimula la actividad fotosintética de las plantas llevando a cabo lo que se conoce como “compensación fotosintética” (Jakobsen, 1995; Fester et al., 2005) y, como hemos visto en los capítulos 1 y 2, la conductancia estomática y eficiencia fotosintética fueron más elevadas en plantas MA sometidas a estrés hídrico que en plantas no MA. Esto ha sido relacionado con una menor resistencia al paso de CO<sub>2</sub> de las fases tanto gaseosa como líquida de las hojas, así como un incremento en el número de unidades fotosintéticas y concentración de clorofila (Allen et al., 1981; Davies et al., 1993). Las PIPs en hojas podrían estar desempeñando un papel crucial en el control del cierre y apertura estomáticos (Uehlein et al., 2003), así como en la conductancia del mesófilo (Flexas et al., 2006; López et al., 2013), controlando tanto el transporte de agua como de CO<sub>2</sub>, necesarios para la fotosíntesis (Katsuhara et al., 2008; Flexas et al., 2012). Así pues, no es de extrañar que la micorrización genere cambios en el contenido y actividad de las acuaporinas en las hojas. En este sentido, es especialmente interesantes el caso de las PIPs1, ya que se ha sugerido que su contenido en hojas está directamente relacionado con el transporte de CO<sub>2</sub> (Otto et al., 2010). En el capítulo 1 observamos que existía un mayor contenido en PIPs1 en plantas MA en condiciones óptimas de riego y de sequía parcial no fisiológica, coincidiendo con una elevada transpiración y eficiencia del PSII. Esto apoya la idea de que en condiciones de suficiente acceso a agua, las plantas micorrizadas mantienen un mayor transporte de CO<sub>2</sub> necesario para mantener unos elevados niveles fotosintéticos. Por otro lado, el aumento general de PIPs en condiciones de sequía parcial en hojas de plantas MA apunta de nuevo a un incremento del transporte de agua y/o CO<sub>2</sub> cuando la sequía comienza a afectar al suelo, especialmente cuando ésta afecta a las raíces micorrizadas y mayor aún si hay una colonización del sistema radical completo por el hongo MA. En estas plantas, el elevado contenido en PIPs coincidió con los valores más altos de eficiencia fotosintética, lo que sugiere que la acumulación de PIPs en las hojas y la eficiencia del sistema fotosintético pueden estar fuertemente relacionadas.

Por otro lado, cuando la sequía afectó a ambos compartimentos, vimos que las plantas micorrizadas sometidas a estrés mantuvieron casi el 100% de su eficiencia fotosintética respecto a las plantas con buen acceso a agua incluso a pesar de una reducida conductancia estomática y bajo potencial hídrico, lo que nos indica que los beneficios de la simbiosis van más allá del simple aporte de agua.

Uno de los efectos más claros de la simbiosis MA es el incremento de la adquisición de macronutrientes básicos para el desarrollo de la planta como el P y el N, pero también es fundamental para la captación de otros compuestos esenciales en pequeñas cantidades (Barea et al., 2005; Ike-Izundu, 2007). Estos nutrientes son transferidos a la planta hospedadora a través de las estructuras intraradicales especializadas llamadas arbusculos, siendo una estrategia evolutiva fundamental para el crecimiento de las plantas especialmente en ecosistemas de bajos recursos, como el caso de las zonas áridas y semiáridas (Allen, 2007). Así pues, no hay que descartar que la regulación que la simbiosis MA ejerce sobre las acuaporinas en raíces pueda estar influyendo en la adquisición de estos nutrientes, ya que hemos visto que muchas de ellas pueden transportar compuestos de interés fisiológico para la planta como el  $\text{NH}_3$ , Urea,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , B o Si.

En este sentido, las TIPs en las membranas vacuolares y algunas de las NIPs analizadas resultaron especialmente interesantes para el transporte de estos compuestos y parecen tener una fuerte influencia en la respuesta de las plantas al déficit hídrico. Así, en el capítulo 4 veíamos como las plantas no micorrizadas sometida a estrés hídrico, disminuyeron la expresión génica de casi todas las acuaporinas. También, el capítulo 1 mostró que, además de disminuir la expresión génica, a medida que el estrés fue más severo, disminuyó también el contenido y actividad de PIPs en las membranas celulares de estas plantas. Estos datos en conjunto muestran un mecanismo de prevención de la pérdida de agua y nutrientes celulares respondiendo a una estrategia de conservación de las plantas no MA. La estrategia de conservación, aunque efectiva en la defensa frente al estrés hídrico, también supone a su vez la paralización del metabolismo, y con él, de los procesos de desarrollo y crecimiento de estas plantas. Sin embargo, también vimos como la sequía prolongada mantuvo o incluso aumentó la expresión génica de ciertas isoformas específicas como ZmTIP1;1, ZmTIP1;2, ZmNIP1;1 o ZmNIP2;2. Dados los resultados de caracterización funcional del capítulo 4, sugeríamos que el aumento de las ZmTIPs1 podría tener una influencia importante en la removilización de compuestos como el N almacenados en la vacuola y necesarios para el correcto funcionamiento de las plantas bajo estas condiciones. Dado que hemos visto en el capítulo 1 las dificultades que encuentran las plantas no MA en la eliminación de ROS, el aumento de las TIPs1 también podría favorecer la detoxificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que se transportaría a las vacuolas evitando su exceso en el citosol (Bienert et al., 2007). Por otro lado, el aumento de ZmNIP2;2 podría suponer una ventaja para la acumulación de Si en las raíces de corona, mejorando la resistencia a la caída del tallo en condiciones de sequía severa (Hochholdinger et al., 2004). Por último, todas ellas podrían estar involucradas en el transporte de B, cuya deficiencia en condiciones de estrés severo podría tener graves consecuencias en la supervivencia de las plantas no MA (Power y Woods, 1997).

Por otro lado, la simbiosis MA modifica totalmente los patrones de expresión génica y acumulación de las acuaporinas en las plantas sometidas a déficit hídrico. Estas plantas mostraron el aumento de casi todas las acuaporinas en condiciones de estrés moderado, que les permitiría mantener los procesos fisiológicos de la planta el mayor tiempo posible mediante un incremento en la acumulación de agua y solutos del suelo. Esta estrategia permitiría a la planta absorber el agua residual y los nutrientes del suelo hasta que el estrés es más severo (Postaire et al., 2008). En este sentido, las PIPs estarían jugando un papel fundamental en la absorción y transporte de agua. Las NIPs aparecen generalmente en la membrana plasmática y las distintas isoformas aparecen asociadas específicamente a órganos concretos (Wallace et al., 2006; Choi, 2009) por lo que podrían facilitar la distribución de los diversos compuestos aportados por el hongo MA a los tejidos específicos donde fueran requeridos, mientras las TIPs serían fundamentales para el transporte del exceso de estos compuestos al interior de las vacuolas para su almacenamiento. Por el contrario, ante un estrés severo, las plantas micorrizadas redujeron la expresión de la mayor parte de las acuaporinas, mostrando una estrategia de conservación. Aún así, en el capítulo 5, veíamos un incremento de las acuaporinas ZmPIP2;1/ZmPIP2;2 y ZmTIP1;1 en el cortex de las raíces micorrizadas sometidas a sequía, especialmente en las células arbusculadas y adyacentes a las mismas. También observamos una modificación en la localización subcelular de las proteínas analizadas, lo que en conjunto parece indicar que a nivel subcelular sigue existiendo un intercambio muy activo de moléculas en estas zonas de la raíz debidas a la presencia y actividad de los hongos MA.

En cualquier caso, los datos obtenidos a lo largo de esta tesis doctoral sugieren que la simbiosis MA ejerce un fino control sobre las acuaporinas de la planta hospedadora y los procesos en los que estas intervienen. Esta modulación se ajusta a las condiciones ambientales y la severidad y duración del estrés, permitiendo una mayor flexibilidad en las respuestas de las plantas MA, lo que se traduce en una ventaja para hacer frente al estrés hídrico impuesto.

## X. CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

- 1.** La sequía afecta menos a las raíces de la planta que están micorrizadas, y en las plantas sometidas a sequía parcial en sólo una parte de la raíz, las plantas son menos sensibles al estrés cuando las raíces que tienen suficiente acceso al agua están micorrizadas que cuando el acceso al agua es a través de raíces no micorrizadas.
- 2.** Las plantas MA mantienen un control más eficiente de la producción y acumulación de osmoreguladores tanto en raíces como en hojas en función del estrés impuesto. Igualmente, las plantas MA ajustan su contenido de acuaporinas de manera local en función del grado de micorrización e intensidad del estrés. Además, los sistemas antioxidantes de las plantas MA actuaron a nivel local, afectando especialmente a las zonas de las raíces sometidas a estrés hídrico. Así, los beneficios de la micorrización incluyen la compartimentación de los daños causados por el estrés, lo que permite a la planta continuar con sus procesos fisiológicos por más tiempo, al limitar el daño localmente.
- 3.** La regulación del contenido en ABA por la simbiosis MA podría estar jugando un papel fundamental en el control de  $L_o$  a través de una respuesta dependiente de ABA de las acuaporinas involucradas. La combinación de ABA exógeno y simbiosis MA inhibe la expresión de las PIPs como estrategia de conservación de agua en la planta hospedadora, que permite a estas plantas mantener un elevado estatus hídrico tanto en condiciones óptimas como de sequía.
- 4.** La simbiosis MA aumenta significativamente el flujo relativo de agua por la vía apoplástica, tanto en condiciones óptimas de riego como en condiciones de sequía. La presencia del hongo MA en las raíces de la planta hospedadora flexibiliza la conmutación entre las vías apoplástica y célula a célula, lo que permite a la planta responder mejor a las demandas de agua de la parte aérea, especialmente en condiciones de déficit hídrico.



- 5.** La simbiosis MA regula la expresión y acumulación de un amplio número de acuaporinas de la planta hospedadora, incluyendo miembros de las diferentes subfamilias de acuaporinas, y alterando también la distribución de las mismas a nivel subcelular. Así, hemos observado una acumulación de acuaporinas en las membranas alrededor de las células arbusculadas, lo que indica su posible influencia en el intercambio de compuestos entre ambos simbioses.
  
- 6.** Las acuaporinas reguladas por la simbiosis MA pueden transportar agua y una serie de compuestos de importancia fisiológica para la planta. En condiciones de estrés moderado, la simbiosis MA es capaz de mantener elevada la expresión de la mayoría de estos genes y, posiblemente, de los procesos fisiológicos en los que están implicados estas acuaporinas. En condiciones de estrés más severo, las plantas MA inhiben estos procesos. En las plantas no MA, incluso ante un estrés moderado, la respuesta es una inhibición generalizada de las acuaporinas y, posiblemente, de los procesos en que éstas están implicadas. Por lo tanto, la simbiosis MA actúa sobre dichas acuaporinas de manera concertada y dependiendo de la intensidad del estrés, para alterar las relaciones hídricas y la fisiología de la planta, permitiéndole así responder mejor ante las condiciones ambientales adversas.

# XI. BIBLIOGRAFÍA



- Abdel-lateif K.**, Bogusz D. and Hocher V. (2012) *The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria*. *Plant Signaling and Behavior* 7, 6, 636-641.
- Abril M. and Hanano R.** (1998) *Ecophysiological responses of three evergreen woody Mediterranean species to water stress*. *Acta Oecologica* 19, 377-387.
- Agre P.**, Preston G.M., Smith B.L., Jung J.S., Raina S., et al. (1993) *Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel*. *Am. J. Physiol.* 265, 463-476.
- Agre P.**, Saboori A.M., Asimos A. and Smith B.L. (1987) *Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen*. *J. Biol. Chem.* 262, 17497-17503.
- Aimar D.**, Calafat M., Andrade A.M., Carassay L., Abdala G. and Molas M.L. (2011) *Drought Tolerance and Stress Hormones: From Model Organisms to Forage Crops*. Edited by Dr. Hemanth Vasanthaiha ISBN 978-953-307-779-6. Pp. 137-164
- Akinci S. and Lösel D.M.** (2012) *Plant water-stress response mechanisms*. Ed. by Ismail Md. Mofizur Rahman. InTech, Croatia. pp. 15-42.
- Akiyama K.**, Matsuzaki K. and Hayashi H. (2005) *Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi*. *Nature* 435, 824-827.
- Alexandersson E.**, Fraysse L., Sjövall-Larsen S., Gustavsson S., Fellert M., et al. (2005) *Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins*. *Plant Molecular Biology* 59, 469-484.
- Alguacil M.M.**, Hernández J.A., Caravaca F., Portillo B. and Roldán A. (2003) *Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semiarid soil*. *Plant Physiol* 118, 562-570.
- Allen M.F.** (2007) *Mycorrhizal fungi: highways for water and nutrients in arid soils*. *Vadose Zone J* 6, 291-297.
- Allen M.F.** (2009) *Bidirectional water flows through the soil-fungal-plant mycorrhizal continuum*. *New Phytol.* 182, 290-293.
- Allen M.F. and Boosalis M.G.** (1983) *Effects of two species of VA mycorrhizal fungi on drought tolerance of winter wheat*. *New Phytol* 93, 67-76.
- Allen M.F.**, Smith W.K., Moore T.S.J. and Christensen M. (1981) *Comparative water relations and photosynthesis of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Bouteloua gracilis* H.B.K.* *New Phytol* 88, 683-693.
- Almeida-Rodríguez A.M.**, Cooke J.E.K., Yeh F. and Janusz J. (2003) *Functional characterization of drought-responsive aquaporins in *Populus balsamifera* and *Populus simonii* × *balsamifera* clones with different drought resistance strategies*. *Physiologia Plantarum* 140, 321-333.
- Alscher R.G.**, Donahue J.L. and Cramer C.L. (1997) *Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells*. *Physiol Plant* 100, 224-233.
- Amerian M.R. and Stewart W.S.** (2001) *Effect of 2 species of arbuscular mycorrhizal fungi on growth assimilation and leaf water relations in maize (*Zea mays*)*. *Aspects of Applied Biology*. 63, 1-6.
- Angelard C.**, Colard A., Niculita-Hirzel H., Croll D. and Sanders I.R. (2010) *Segregation in a mycorrhizal fungus alters rice growth and symbiosis-specific gene transcription*. *Current Biology* 20, 1216-1221.
- Anjum S.A.**, Xie X., Wang L., Saleem M.F., Man C. and Lei W. (2011) *Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress*. *African Journal of Agricultural Research* 6, 9, 2026-2032.
- Antolín M.C. and Sánchez-Díaz M.** (1992) *Photosynthetic nutrient use efficiency, nodule activity and solute accumulation in drought stressed alfalfa plants*. *Photosynthetica* 27, 459-604.
- Aono T.**, Maldonado-Mendoza I.E., Dewbre G.R., Harrison M.J. and Saito M. (2004) *Expression of alkaline phosphatase genes in arbuscular mycorrhizas*. *New Phytologist* 162, 525-534.
- Apel K. and Hirt H.** (2004) *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.

- Arnon D.I. and Stout P.R.** (1939) *The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper*. *Plant Physiol.* 14, 371–375.
- Aroca R., Amodeo G., Fernandez-Illescas S., Herman EM., Chaumont F. and Chrispeels M.J.** (2005) *The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots*. *Plant Physiology* 137, 341–353.
- Aroca R., Aguacil M., Vernieri P. and Ruiz-Lozano J.M.** (2008a) *Plant responses to drought stress and exogenous ABA application are differently modulated by mycorrhization in tomato and an ABA- deficient mutant (sitiens)*. *Microb Ecol* 56, 704–719.
- Aroca R., Bago A., Sutka M., Paz J.A., Cano C., et al.** (2009) *Expression analysis of the first arbuscular mycorrhizal fungi aquaporin described reveals concerted gene expression between salt-stressed and nonstressed mycelium*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 1169–1178.
- Aroca R.** (2006) *Exogenous catalase and ascorbate modify the effects of abscisic acid (ABA) on root hydraulic properties in Phaseolus vulgaris L. plants*. *J Plant Growth Regul* 25, 10–17.
- Aroca R., Ferrante A., Vernieri P. and Chrispeels M.J.** (2006) *Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in Phaseolus vulgaris plants*. *Ann. Bot.* 98, 1301–1310.
- Aroca R., Porcel R. and Ruiz-Lozano J.M.** (2007) *How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in Phaseolus vulgaris under drought, cold or salinity stresses?* *New Phytologist* 173, 808–816.
- Aroca R., Porcel R. and Ruiz-Lozano J.M.** (2011) *Plant drought tolerance enhancement by arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Ed. by Fulton SM. Nova Science Publishers Inc, New York, pp. 229–240.
- Aroca R., Porcel R. and Ruiz-Lozano J.M.** (2012) *Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions*. *Journal of Experimental Botany.* 63, 1, 43–57.
- Aroca R., Tognoni F., Irigoyen J.J., Sánchez-Díaz M. and Pardossi A.** (2001) *Different root low temperature response of two maize genotypes differing in chilling sensitivity*. *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 1067–1073.
- Aroca R., Vernieri P., Irigoyen J.J., Sánchez-Díaz M., Tognoni F. and Pardossi A.** (2003) *Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (Zea mays L.) in avoiding chilling-induced water stress*. *Plant Sci* 165, 671–679.
- Aroca R., Vernieri P. and Ruiz-Lozano J.M.** (2008b) *Mycorrhizal and non mycorrhizal Lactuca sativa plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery*. *J Exp Bot* 59, 2029–2041.
- Asada K.** (1999) *The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50, 601–639.
- Ashraf M. and Foolad M.R.** (2007) *Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance*. *Environmental and Experimental Botany* 59, 206–216.
- Augé R.M.** (2001) *Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis*. *Mycorrhiza* 11, 3–42.
- Augé R.M.** (2004) *Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations*. *Can J Soil Sci* 84, 373–381.
- Augé R.M., Schekel K.A. and Wample R.L.** (1987) *Leaf water and carbohydrate status of VA mycorrhizal rose exposed to drought stress*. *Plant Soil* 99, 291–302.
- Augé R.M., Schekel K.A. and Wample R.L.** (1986) *Osmotic adjustment in leaves of VA mycorrhizal nonmycorrhizal rose plants in response to drought stress*. *Plant Physiol* 82, 765–770.
- Augé R.M., Stodola A.J.W., Ebel R.C. and Duan X.** (1994) *Nonhydraulic signalling of soil drying in mycorrhizal maize*. *Planta* 193, 74–82.
- Augé R.M., Stodola A. J.W., Ebel R.C. and Duan X.** (1995) *Leaf elongation and water relations of mycorrhizal sorghum in response to partial soil drying: two Glomus species at varying phosphorus fertilization*. *J. Exp. Bot.* 46, 297–307.

- Azcón-Aguilar C. and Barea J.M.** (1996) *Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne pathogens: an overview of the mechanisms involved*. *Mycorrhiza* 6, 457–464.
- Azcon-Bieto J. and Talon M.** (2002) *Fundamentos de biología vegetal*. McGraw-Hill interamericana, Madrid.
- Azcón R., Gomez M. and Tobar R.** (1996) *Physiological and nutritional responses by *Lactuca sativa* to nitrogen sources and mycorrhizal fungi under drought*. *Biol Fertil Soils* 22, 156–161.
- Bago B.** (2000) *Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi*. *Plant Soil* 226, 263–274.
- Bago B., Pfeffer P.E., Abubaker J., Jun J., Allen J.W., et al.** (2003) *Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid*. *Plant Physiol.* 131, 1496–1507.
- Bago B., Pfeffer P.E. and Shachar-Hill Y.** (2000) *Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas*. *Plant Physiology* 124, 949–958.
- Bago B., Pfeffer P. and Shachar-Hill Y.** (2001) *Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis?* *New Phytologist*, 149, 4–8.
- Bago B., Zipfel W., Williams R., Jun J., Arreola R., et al.** (2002) *Translocation and utilization of fungal lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis*. *Plant Physiol* 128, 108–124.
- Baier M.C., Keck M., Godde V., Niehaus K., Kuster H. and Hohnjec N.** (2010) *Knockdown of the symbiotic sucrose synthase *MtSucS1* affects arbuscule maturation and maintenance in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula**. *Plant Physiology* 152, 1000–1014.
- Balergue C., Peuch-Pagès V., Bécard G. and Rochange S.F.** (2011) *The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events*. *J Exp Bot* 62, 1049–1060.
- Bano A., Dörffing K., Bettin D. and Hahn H.** (1993) *Abscisic acid and cytokinins as possible root-to-shoot signals in xylem sap of rice plants in drying soil*. *Aust. J. Plant Physiol.* 20, 109–115.
- Bansal A. and Sankararamkrishnan R.** (2007) *Homology modeling of major intrinsic proteins in rice, maize and Arabidopsis: comparative analysis of transmembrane helix association and aromatic/arginine selectivity filters*. *BMC Structural Biology* 7, 27.
- Bapaume L. and Reinhardt D.** (2012) *How membranes shape plant symbioses: signaling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza*. *Front. Plant Sci.* 3, 223.
- Barea J.M.** (1991) *Advances Soil Science*. Springer Verlag. pp 1-10.
- Barea J.M. and Azcón-Aguilar C.** (1983) *Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants*. *Advances in Agronomy* 36, 1–54.
- Barea J.M. and Azcón-Aguilar C.** (2013) *Evolution, biology and ecological effects of arbuscular mycorrhizas*. Ed. by Comisao AF, Pedroso CC. Nova Science Publishers, New York.
- Barea J.M. and Honrubia M.** (2004) *La micorrización dirigida de la planta forestal*. Ed. by Vallejo, R., Alloza, J.A. Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo CEAM, Valencia, España, pp. 215-260.
- Barea J.M., Pozo M.J. and Azcón-Aguilar C.** (2005) *Microbial co-operation in the rhizosphere*. *Journal of Experimental Botany.* 56, 417, 1761-1778.
- Barlow E.W.R.** (1986) *Water relations of expanding leaves*. *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 45-58.
- Bartels D.** (2001) *Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance*. *Trends Plant Sci* 6, 284–286.
- Bartinicki-García A.** (1968) *Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi*. *Annu Rev Microbiol* 22, 87-108.
- Bárzana G., Aroca R., Paz J.A., Chaumont F., Martínez-Ballesta M.C., et al.** (2012) *Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic water flow in roots of the host plant under both well-watered and drought stress conditions*. *Ann. Bot.* 109, 1009-1017.
- Bates L.S., Waldren R.P. and Teare I.D.** (1973) *Rapid determination of free proline for water stress studies*. *Plant Soil* 39, 205–207.



- Beaudette P.C.**, Chlup M., Yee J. and Emery R.J. (2007) *Relationships of root conductivity and aquaporin gene expression in Pisum sativum: diurnal patterns and the response to HgCl<sub>2</sub> and ABA*. Journal of Experimental Botany 58, 1291–1300.
- Beguerisse-Díaz M.**, Hernández-Gómez M.C., Lizzul A.M., Barahona M. and Desikan R. (2012) *Compound stress response in stomatal closure: amathematical model of ABA and ethylene interaction in guard cells*. BMC Systems Biology 6, 146.
- Beitz E.**, Wu B., Holm L.M., Schultz J.E., and Zeuthen T. (2006) *Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons*. PNAS. 103, 2, 269–274.
- Belko N.**, Zaman-Allah M., Cisse N., Diop N.N., Zombre G., et al. (2012a) *Lower soil moisture threshold for transpiration decline under water deficit correlates with lower canopy conductance and higher transpiration efficiency in drought-tolerant cowpea*. Functional Plant Biology <http://dx.doi.org/10.1071/FP11282>.
- Belko N.**, Zaman-Allah M., Diop N.N., Cisse N., Zombre G., et al. (2012b) *Restriction of transpiration rate under high vapour pressure deficit and non-limiting water conditions is important for terminal drought tolerance in cowpea*. Plant Biology doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00642.x.
- Benabdellah K.**, Azcón-Aguilar C., Valderas A., Speziga D., Fitzpatrick T.B. and Ferrol N. (2009a). *GintPDX1 encodes a protein involved in vitamin B6 biosynthesis that is up-regulated by oxidative stress in the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices*. New Phytol. 184, 682–693.
- Benabdellah K.**, Merlos M.A., Azcon-Aguilar C. and Ferrol N. (2009b) *GintGRX1, the first characterized glomeromycotan glutaredoxin, is a multifunctional enzyme that responds to oxidative stress*. Fungal Genetics and Biology 46, 94-103.
- Benabdellah K.**, Ruiz-Lozano J. M. and Aroca R. (2009c) *Hydrogen peroxide effects on root hydraulic properties and plasma membrane aquaporin regulation in Phaseolus vulgaris*. Plant Mol. Biol. 70, 647-661.
- Benedetto A.**, Magurno F., Bonfante P. and Lanfranco L. (2005) *Expression profiles of a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus Glomus mosseae*. Mycorrhiza 15, 620–627.
- Bensmihen S.**, Rippa S., Lambert G., Jublot D., Pautot V., Granier F., et al. (2002) *The homologous ABI5 and EEL transcription factors function antagonistically to fine-tune gene expression during late embryogenesis*. Plant Cell 14, 1391–1403.
- Berger K.C.** (1949) *Boron in soils and crops*. In *Advances in Agronomy* 1. Ed. A.G. Norman. Academic Press, New York.
- Besserer A.**, Puech-Pages V., Kiefer P., Gomez-Roldan V., Jauneau A., et al. (2006) *Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria*. PLoS Biology 4, 226.
- Beuron F.**, Le Caherec F., Guillam M.T., Cavalier A., Garret A., et al. (1995) *Structural analysis of a MIP family protein from the digestive tract of Cicadella viridis*. J. Biol. Chem. 270, 17414–17422.
- Bever J.D.**, Pringle A. and Schultz P.A. (2002) *Dynamics within the plant-arbuscular mycorrhizal fungal mutualism: testing the nature of community feedback*. Ed. by van der Heijden MGA, Sanders IR. Springer, Berlin, pp. 267–292.
- Beyer W.F. and Fridovich I.** (1987) *Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions*. Analytical Biochemistry 161, 559–566.
- Bheemareddy V.S. and Lakshman H.C.** (2011) *Effect of AM fungus Glomus fasciculatum on metabolite accumulation in four varieties of Triticum aestivum L. under short-term water stress*. Vegetos 24, 41–49.
- Biela A.**, Grote K., Otto B., Hoth S., Hedrich R. and Kaldenhoff R. (1999) *The Nicotiana tabacum plasma membrane aquaporin NtAQPI is mercury-insensitive and permeable for glycerol*. Plant J. 18, 565-570.

- Bienert G.P.**, Bienert M.D., Jahn T.P., Boutry M. and Chaumont F. (2011) *Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates*. *Plant J.* 66, 306–317.
- Bienert G.P. and Jahn T.P.** (2010) *Major Intrinsic Proteins and Arsenic Transport in Plants: New Players and Their Potential Role*. Ed. by Jahn T.P. and Bienert G.P. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. pp. 112-125.
- Bienert G.P.**, Møller A.L.B., Kristiansen K.A., Schulz A., Møller I.A., et al. (2007) *Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes*. *The journal of biological chemistry*. 282, 2, 1183–1192.
- Bienert G.P.**, Schjoerring J.K. and Jahn T.P. (2006) *Membrane transport of hydrogen peroxide*. *Biochim. Biophys.* 1758, 994–1003.
- Bienert G.P.**, Schüssler M.D. and Jahn T.P. (2008) *Metalloids: essential, beneficial or toxic? Major intrinsic proteins sort it out*. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 33, 1, 20-26.
- Blee K.A. and Anderson A.J.** (1998) *Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant*. *Plant J.* 16, 523-530.
- Blee K.A. and Anderson A.J.** (2002) *Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules*. *Plant Mol Biol* 50, 197-211.
- Blevins D.G., and Lukaszewski K.M.** (1998) *Boron in plant structure and function*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 481-500.
- Blum A.**, Sinmena B., Mayer J., Golan G. and Shpiler L. (1994) *Stem reserve mobilization supports wheat-grain filling under heat stress*. *Australian Journal of Plant Physiology* 21, 771–781.
- Bochicchio A.**, Vernieri P., Puliga S., Calducci F. and Vazzana C. (1994) *Acquisition of desiccation tolerance by isolated maize embryos exposed to different conditions: the questionable role of endogenous abscisic acid*. *Physiol Plant* 91, 615–622.
- Bogeat-Triboulot M.B.**, Bartoli F., Garbaye J., Marmeisse R. and Tagu D. (2004) *Fungal ectomycorrhizal community and drought affect root hydraulic properties and soil adherence to roots of Pinus pinaster seedlings*. *Plant and Soil* 267, 213–223.
- Bonfante-Fasolo P.** (1984) *Anatomy and morphology of VA mycorrhizae*. Ed. by Powell, C.L., Bagyaraj, D.J. CRC Press, USA, pp. 5–34.
- Bonfante P. and Genre A.** (2008) *Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective*. *Trends Plant Sci* 13, 492–498.
- Bonfante P. and Genre A.** (2010) *Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis*. *Nat. Commun.* doi/10.1038/ncomms1046.
- Boomsma C.R. and Vyn T.J.** (2008) *Maize drought tolerance: Potential improvements through arbuscular mycorrhizal symbiosis?* *Field Crops Research* 108, 14-31.
- Borgnia M.**, Nielsen S., Engel A. and Agre P. (1999) *Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels*. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 425–458.
- Boursiac Y.**, Boudet J., Postaire O., Luu D-T., Tournaire-Roux C. and Maurel C. (2008) *Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization*. *The Plant Journal* 56, 207–218.
- Boursiac Y.**, Chen S., Luu D.T., Sorieul M., van den Dries N. and Maurel C. (2005) *Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression*. *Plant Physiol* 139, 790–805.
- Boyer J.S.** (1995) *Measuring the water status of plants and soils*. Academic Press, London, 1-12.
- Boyer J.S.** (1985). *Water transport*. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 473-516.
- Bradford M.M.** (1976) *A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bramley H.**, Turner N.C., Turner D.W., Tyerman S.D. (2007) *Comparison between gradient-dependent hydraulic conductivities of roots using the root pressure probe: the role of pressure propagations and implications for the relative roles of parallel radial pathways*. *Plant Cell Environ.* 30, 861-874.



- Bray E.A.** (2002) *Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the Arabidopsis genome*. Plant, Cell and Environment 25, 153–161.
- Bray E.A.** (2004) *Genes commonly regulated by water-deficit stress in Arabidopsis thaliana*. J. Exp. Bot. 55, 2331–2341.
- Breuninger M. and Requena N.** (2004) *Recognition events in AM symbiosis: analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage*. Fungal Genet. Biol. 41, 794–804.
- Britto D.T., Glass A.D.M., Kronzucker H.J. and Siddiqi M.Y.** (2001a) *Cytosolic Concentrations and Transmembrane Fluxes of  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ . An Evaluation of Recent Proposals*. Plant Physiology 125, 523–526.
- Britto D.T., Siddiqi M.Y., Glass A.D. and Kronzucker H.J.** (2001b) *Futile transmembrane  $\text{NH}_4^+$  cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 4255–4258.
- Brown P.H. and Hu H.** (1996) *Phloem mobility of boron is species dependent: evidence for phloemmobility in sorbitol-rich species*. Ann. Bot. 77, 497–505.
- Brown P.H. and Shelp B.J.** (1997) *Boron mobility in plants*. Plant and Soil 193, 85–101.
- Brundrett M.C.** (2002) *Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants*. New Phytol. 154, 275–304.
- Brundrett M.C.** (2009) *Mycorrhizal associations and other means of nutrition in vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis*. Plant and Soil 320, 37–77.
- Burgess S.O., Adams M.A., Turner N.C. and Ong C.K.** (1998) *The redistribution of soil water by tree root systems*. Oecologia 115, 306–311.
- Cabello-Hurtado F. and Ramos J.** (2004) *Isolation and functional analysis of the glycerol permease activity of two new nodulin-like intrinsic proteins from salt stressed roots of the halophyte Atriplex nummularia*. Plant Science 166, 633–640.
- Cakmak I., Kurz H. and Marschner H.** (1995) *Short-term effects of boron, germanium, and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower*. Physiol. Plant. 95, 11–18.
- Calamita G., Bishai W.R., Preston G.M., Guggino W.B. and Agre P.** (1995) *Molecular cloning and characterization of AQPz, a water channel from Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 270, 29063–29066.
- Caldwell M.M., Dawson T.E. and Richards J.H.** (1998) *Hydraulic lift: consequences of water efflux from the roots of plants*. Oecologia 131, 151–161.
- Calvo-Polanco M., Sánchez-Romera B. and Aroca R.** (2014) *Mild Salt Stress Conditions Induce Different Responses in Root Hydraulic Conductivity of Phaseolus vulgaris Over-Time*. PLoS ONE 9, 3, e90631.
- Campos M.K.F., de Carvalho K., de Souza F.S., Marur C.J., Pereira L.F.P., et al.** (2011) *Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic 'Swingle' citrumelo plants over-accumulating proline*. Environmental and Experimental Botany 72, 242–250.
- Capellazzo G., Lanfranco L., Fitz M., Wipf D. and Bonfante P.** (2008) *Characterization of an amino acid permease from the endomycorrhizal fungus Glomus mosseae*. Plant Physiol. 147, 429–37.
- Carlberg I. and Mannervik B.** (1985) *Glutathione reductase*. Methods in Enzymology 113, 484–489.
- Casey W.H., Kinrade S.D., Knight C.T.G., Rains D.W. and Epstein E.** (2003) *Aqueous silicate complexes in wheat, Triticum aestivum L.* Plant Cell Environ. 27, 51–54.
- Cecchini N.M., Monteoliva M.I. and Alvarez M.E.** (2011) *Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in Arabidopsis*. Plant Physiology 155, 1947–1959.
- Chalot M., Blaudez D. and Brun A.** (2006) *Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface*. Trends in Plant Science 11, 263–266.
- Chaplin M.** (2006) *Do we underestimate the importance of water in cell biology?* Nature Rev. Mol. Cell. Biol. 7, 861–866.

- Chaumont F.**, Barrieu F., Herman E.M. and Chrispeels M.J. (1998) *Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation*. *Plant Physiol.* 117, 1143–1152.
- Chaumont F.**, Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels M.J. and Jung R. (2001) *Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize*. *Plant Physiology* 125, 1206–1215.
- Chaumont F.**, Barrieu F., Jung R. and Chrispeels M.J. (2000) *Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity*. *Plant Physiol.* 122, 1025–1034.
- Chaumont F. and Tyerman S.D.** (2014) *Aquaporins: Highly Regulated Channels Controlling Plant Water Relations*. *Plant Physiology* DOI:10.1104/pp.113.233791.
- Chaves M.M.** (1991). *Effects of water deficits on carbon assimilation*. *J. Exp. Bot.*, 42, 1-16.
- Chaves M.M.**, Maroco J.P., Pereira J.S. (2003) *Understanding plant responses to drought: from genes to the whole plant*. *Functional Plant Biology* 30, 239–264.
- Chaves M.M. and Oliveira M.M.** (2004) *Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture*. *J. Exp. Bot.* 55, 2365–2384.
- Chen T.H.H. and Murata N.** (2002) *Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 250–257.
- Chen Z.**, Cuin T.A., Zhou M., Twomey A., Naidu B.P. and Shabala S. (2007) *Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance*. *Journal of Experimental Botany* 58, 4245–4255.
- Cherif M.**, Asselin A. and Belanger R. R. (1994) *Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by Pythium spp.* *Phytopathology* 84, 236–242.
- Chernys J.T. and Zeevaart J.A.** (2000) *Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado*. *Plant Physiology* 124, 343–353.
- Choi W-G.** (2009). *Nodulin 26-like Intrinsic Protein NIP2; 1 and NIP7; 1: Characterization of Transport Functions and Roles in Developmental and Stress Responses in Arabidopsis*. Tesis doctoral, University of Tennessee, Knoxville, E.E.U.U.
- Choi W-G. and Roberts D.M.** (2007) *Arabidopsis NIP2;1, a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress*. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 33, 24209–24218.
- Christmann A.**, Weiler E.W., Steudle E. and Grill E. (2007) *A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage*. *The Plant Journal* 52, 167–174.
- Clark A.J.**, Blissett K.J. and Oliver R.P. (2003) *Investigating the role of polyols in Cladosporium fulvum during growth under hyper-osmotic stress and in planta*. *Planta* 216, 614–619.
- Connor D.J.**, Legge N.J. and Turner N.C. (1977) *Water relations of mountain Ash (Eucalyptus regnans F. Muell.) forests*. *Australian Journal of Plant Physiology* 4, 5, 753–762.
- Cooper G.J. and Boron W.F.** (1998) *Effect of PCMBs on CO<sub>2</sub> permeability of Xenopus oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant*. *Am. J. Physiol.* 275, 1481–1486.
- Cornic G.** (2000). *Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis*. *Trends Plant Sci.* 5, 187–188.
- Corradi N. and Bonfante P.** (2012) *The Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Origin and Evolution of a Beneficial Plant Infection*. *PLoS Pathog.* 8, 4, e1002600.
- Costa R.C.L. and Lobato A.K.S.** (2011) *ABA-mediated proline synthesis in cowpea leaves exposed to water defi ciency and rehydration*. *Turk. J. Agric. For.* 35, 309–317.
- Croll D.**, Giovannetti M., Koch A.M., Sbrana C., Ehinger M., et al. (2009) *Nonsel f vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices*. *New Phytologist* 181, 924–937.
- Cruz C.**, Egsgaard H., Trujillo C., Ambus P., Requena N., et al. (2007) *Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi*. *Plant Physiol.* 144, 782–792.
- Dainty J.** (1985) *Water transport through the root*. *Acta Hort.* 171, 21–31.
- Daniels M.J.**, Chaumont F., Mirkov T.E. and Chrispeels M.J. (1996) *Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site*. *Plant Cell* 8, 587–599.

- Danielson J.A.H. and Johanson U.** (2008) *Unexpected complexity of the Aquaporin gene family in the moss Physcomitrella patens*. BMC Plant Biology 8, 45.
- Dat J.,** Vandenbeeke S., Vranova E., Van Montagu M., Inzé D. and Van Breusegem F. (2000) *Dual action of the active oxygen species during plant stress responses*. Cellular and Molecular Life Sciences 57, 779–795.
- Davies F.T.,** Potter J.R. and Linderman R.G. (1993) *Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P-concentration–response in gas exchange and water relations*. Physiol. Plant. 87, 45–53.
- Davies F.T.,** Potter J.R. and Linderman R.G. (1992) *Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development on pepper plants independent of plant size and nutrient content*. J. Plant Physiol. 139, 289–294.
- Davies W.J.,** Tardieu F. and Trejo C.L. (1994) *How do chemical signals work in plants that grow in drying soil?* Plant Physiol. 104, 309–314.
- Davies W.J. and Zhang J.** (1991) *Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil*. An. Review of Plant Physiol. and Molecular Biology 42, 55–76.
- Davis S.D. and Mooney H.A.** (1986) *Tissue water relations of four co-occurring chaparral shrubs*. Oecologia 70, 527–535.
- Davis S.D.,** Sperry J.S. and Hacke U.G. (1999) *The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing*. Am. J. Bot. 86, 1367–1372.
- Dean, R.M.,** Rivers, R.L., Zeidel, M.L. and Roberts, D.M. (1999) *Purification and functional reconstitution of soybean Nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties*. Biochemistry 38, 347–353.
- De Jong J.C.,** McCormack B.J., Smirnoff N., Talbot N.J. (1997) *Glycerol generates turgor in rice blast*. Nature 389, 244–245.
- De la Providencia E.G.,** De Souza F.A., Fernandez F., Delmas N.S. and Declerck S. (2005) *Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups*. New Phytol. 165, 261–271.
- Delauney A.J. and Verma D.P.S.** (1993) *Proline biosynthesis and osmoregulation in plants*. Plant J. 4, 215–223.
- Dell’Amico J.,** Torrecillas A., Rodríguez P., Morte A. and Sánchez-Blanco M.J. (2002) *Responses of tomato plants associated with the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus clarum during drought and recovery*. J. Agric. Sci. 138, 387–393.
- De Luis M.,** García-Cano M.F., Cortina J., Raventós J., González-Hidalgo J.C. y Sánchez J. R. (2001) *Climatic trends, disturbances and short-term vegetation dynamics in a Mediterranean shrubland*. Forest Ecology and Management 14, 25–37.
- Devers E.** (2011) *Phosphate homeostasis and novel micro RNAs are involved in the regulation of the arbuscular mycorrhizal symbiosis in Medicago truncatula*. Tesis Doctoral, Potsdam University, Alemania.
- Die J.V.,** Román B., Nadal S. and González-Verdejo C.I. (2010) *Evaluation of candidate reference genes for expression studies in Pisum sativum under different experimental conditions*. Springer. Planta 232, 145–153.
- Dietz S.,** Von Bülow J., Beitz E. and Nehls U. (2011) *The aquaporin gene family of the ectomycorrhizal fungus Laccaria bicolor: lessons for symbiotic functions*. New Phytologist 190, 927–940.
- Dixon H.H. and Joly J.** (1894) *On the ascent of sap*. Annals of Botany 8, 468–470.
- Dixon K.P.,** Xu J-R., Smirnoff N. and Talbot N.J. (1999) *Independent Signaling Pathways Regulate Cellular Turgor during Hyperosmotic Stress and Appressorium-Mediated Plant Infection by Magnaporthe grisea*. The Plant Cell 11, 2045–2058.
- Dordas C.,** Chrispeels M.J. and Brown P.H. (2000) *Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots*. Plant Physiology 124, 1349–1361.
- Douds D.D.,** Pfeffer P.E. and Shachar-Hill Y. (2000) *Carbon partitioning, cost and metabolism of Arbuscular Mycorrhizae*. Ed. by DD Douds, Y Kapulnik. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 107–130.

- Doussan C.**, Vercambre G. and Pages L. (1998) *Modelling of the hydraulic architecture of root systems: an integrated approach to water absorption – Distribution of axial and radial conductances in maize*. *Annals of Botany* 81, 225–232.
- Drew E.A.** (2002) *External AM hyphae: their growth and function in media of varying pore sizes*. Tesis doctoral, Adelaide University, Australia.
- Drew E.A.**, Murray R.S., Smith S.E. and Jakobsen I. (2003) *Beyond the rhizosphere: growth and function of arbuscularmycorrhizal external hyphae in sands of varying pore sizes*. *Plant Soil* 251, 105–114.
- Drossopoulos, J. B.**, Karamanos, A. J. and Niavis, C. A. (1987) *Changes in ethanol soluble carbohydrates during the development of two wheat cultivars subjected to different degrees of water stress*. *Annals of Botany* 59, 173–180.
- Dubos C. and Plomion C.** (2003) *Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots*. *Plant Molecular Biology* 51, 249–262.
- Dynowski M.**, Mayer M., Moran O. and Ludewig U. (2008a) *Molecular determinants of ammonia and urea conductance in plant aquaporin homologs*. *FEBS Lett.* 582, 2458–2462.
- Dynowski M.**, Schaaf G., Loque D., Moran O. and Ludewig U. (2008b) *Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*. *Biochem. J.* 414, 53–61.
- Ebel R.C.**, Stodola A.J.W., Duan X. and Augé R.M. (1994) *Non-hydraulic root-to-shoot signaling in mycorrhizal and non-mycorrhizal sorghum exposed to partial soil drying or root severing*. *New Phytol.* 127, 495–505.
- Ebel R.C.**, Welbaum G.E., Gunatilaka M., Nelson T. and Augé R.M. (1996) *Arbuscular mycorrhizal symbiosis and nonhydraulic signaling of soil drying in *Vigna unguiculata* (L.) Walp.* *Mycorrhiza* 6, 119–127.
- Estrada-Luna A.A. and Davies F.T.** (2003) *Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (*Capsicum annuum*) plantlets during acclimatization and post-acclimatization*. *J. Plant Physiol.* 160, 1073–1083.
- Evelin H.**, Kapoor R. and Giri B. (2009) *Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review*. *Ann. Bot.* 104, 1263–1280.
- Ezawa T.**, Cavagnaro T.R., Smith S.E., Smith F.A. and Ohtomo R. (2004) *Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system*. *New Phytol.* 161, 387–392.
- Ezawa T.**, Hayatsu M. and Saito M. (2005) *A new hypothesis on the strategy for acquisition of phosphorus in arbuscular mycorrhiza: up-regulation of secreted acid phosphatase gene in the host plant*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 18, 1046–1053.
- Faber B.A.**, Zasoski R.J., Munns D.N. and Shackel K. (1991) *A method for measuring hyphal nutrient and water uptake in mycorrhizal plants*. *Can. J. Bot.* 69, 87–94.
- Fauteux F.**, Rémus-Borel W., Menzies J.G. and Bélanger R.R. (2005) *Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 249, 1–6.
- Ferrol N.**, Barea J.M. and Azcon-Aguilar C. (2000) *The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae**. *Current Genetics* 37, 112–118.
- Fester T.**, Wray V., Nimtz M. and Strack D. (2005) *Is stimulation of carotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots a general phenomenon?* *Phytochemistry* 66, 1781–1786.
- Fetter K.**, Wider V.V., Moshelion M. and Chaumont F. (2004) *Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity*. *The Plant Cell* 16, 215–228.
- Finkelstein A.** (1987) *Water movement through lipid bilayers, pores, and plasma membranes. Theory and reality*. New York: Wiley.
- Fitter A.H.**, Graves J.D., Watkins N.K., Robinson D. and Scrimgeour C. (1998) *Carbon transfer between plants and its control in networks of arbuscular mycorrhiza*. *Func. Ecol.* 12, 406–412.



- Fitzpatrick K.L. and Reid R.J.** (2009) *The involvement of aquaglyceroporins in transport of boron in barley roots*. *Plant, Cell and Environment* 32, 1357–1365.
- Flexas J., Barbour M.M., Brendel O., Cabrera H.M., Carriqui M., et al.** (2012) *Mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub>: an unappreciated central player in photosynthesis*. *Plant Sci.* 193–194, 70–84.
- Flexas J., Bota J., Loreto F., Cornic G. and Sharkey T.D.** (2004) *Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C-3 plants*. *Plant Biology* 6, 269–279.
- Flexas J., Ribas-Carbó M., Hanson D.T., Bota J., Otto B., et al.** (2006). *Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> in vivo*. *Plant Journal* 48, 427–439.
- Flexas J., Scoffoni C., Gago J. and Sack L.** (2013) *Leaf mesophyll conductance and leaf hydraulic conductance: an introduction to their measurement and coordination*. *J. Exp. Bot.* 64, 3965–3981.
- Flowers T.J. and Colmer T.D.** (2008) *Salinity tolerance in halophytes*. *New Phytologist* 179, 945–963.
- Flowers T.J. and Yeo A.R.** (1986) *Ion relations of plant under drought and salinity*. *Aus. J. Plant Physiol.* 13, 75–91.
- Forrest K.L. and Bhavé M.** (2007) *Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype*. *Funct. Integr. Genomics.* 7, 263–289.
- Fotiadis D., Jenó P., Mini T., Wirtz S., Müller S.A., Frayssé L., Kjellbom P. and Engel A.** (2001) *Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes*. *J. Biol. Chem.* 276, 1707–1714.
- Frank A.B.** (1885) *On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi* (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* 15, 267–275.
- Franken P., Donges K., Grunwald U., Kost G., Rexer K. H., et al.** (2007) *Gene expression analysis of arbuscule development and functioning*. *Phytochemistry*, 68, 1, 68–74.
- Fricke W. and Pahlisch E.** (1990) *The effect of water stress on the vacuole-extravacuole compartmentation of proline in potato cell suspension cultures*. *Physiol. Plant.* 78, 3, 374–378.
- Fritz M. and Ehwald R.** (2011) *Mannitol permeation and radial flow of water in maize roots*. *New Phytologist.* 189, 210–217.
- Galmés J., Pou A., Alsina M.M., Tomás M., Medrano H. and Flexas J.** (2007) *Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (Vitis sp.): relationship with ecophysiological status*. *Planta* 226, 671–681.
- Gandolfi A., Sanders I.R., Rossi V. and Menozzi P.** (2003) *Evidence of recombination in putative ancient asexuals*. *Mol. Biol. Evol.* 20, 754–61.
- Gao Y-P., Young L., Bonham-Smith P. and Gusta L.V.** (1999) *Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of Brassica napus during germination under stress conditions*. *Plant Mol. Biol.* 40, 635–644.
- Garça J. and Santos S.** (2007) *Suberin: A biopolyester of plant's skin*. *Macromolecular Bioscience* 7, 128–135.
- García-Garrido J.M. and Ocampo J.A.** (2002) *Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis*. *Journal of Experimental Botany* 53, 373, 1377–1386.
- García-Rodríguez S.** (2006) *Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la regulación de genes implicados en el metabolismo carbonado en plantas de tomate (Solanum esculentum)*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada+CSIC, Granada.
- Garg N. and Manchanda G.** (2009) *Role of arbuscularmycorrhizae in the alleviation of ionic, osmotic and oxidative stresses induced by salinity in Cajanus cajan (l.) millsp. (pigeonpea)*. *Journal of Agronomy and Crop Sciences* 195, 110–123.
- Gaspar M., Bousser A., Sissoëff I., Roche O., Hoarau J. and Mahé A.** (2003) *Cloning and characterization of ZmPIP1-5b, an aquaporin transporting water and urea*. *Plant Science* 165, 21–31.

- Gaspar M.L.**, Pollero R. and Cabello M. (2001) *Biosynthesis and degradation of glycerides in external mycelium of Glomus mosseae*. Mycorrhiza 11, 257-261.
- Gauch H.G. and Dugger W.M.** (1953) *The role of boron in the translocation of sucrose*. Physiol. Plant. 28, 457.
- Gaude N.**, Bortfeld S., Duensing N., Lohse M. and Krajinski F. (2012) *Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development*. Plant Journal 69, 510–528.
- Gay-Lussac L.J. and von Humboldt A.** (1805) *Expérience sur les moyens oediométriques et sur la proportion des principes constituents de l'atmosphère*. Journal de Physique 60.
- Genre A.**, Chabaud M., Faccio A., Barker D.G. and Bonfante P. (2008) *Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both Medicago truncatula and Daucus carota*. Plant Cell 20, 1407–1420.
- Genre A.**, Chabaud M., Timmers T., Bonfante P. and Barker D.G. (2005) *Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in Medicago truncatula root epidermal cells before infection*. Plant Cell 17, 3489–3499.
- Gerbeau P.**, Güçlü J., Ripoche P. and Maurel C. (1999) *Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes*. The Plant Journal. 18, 6, 577-587.
- Ghanem M.E.**, Hichri I., Smigocki A.C., Albacete A., Fauconnier M-L., et al. (2011) *Root-targeted biotechnology to mediate hormonal signalling and improve crop stress tolerance*. Plant Cell Rep. 30, 807–823.
- Gianinazzi-Pearson V.**, Branzanti B. and Gianinazzi S. (1989) *In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by root exudates and plant flavonoids*. Symbiosis 7, 243–255.
- Gianinazzi-Pearson V. and Gianinazzi S.** (1978) *Enzymatic studies on the metabolism of vesicular- arbuscular mycorrhiza II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots*. Physiological Plant Pathology 12, 45-53.
- Gianinazzi-Pearson V.**, Gianinazzi S., Guillemin J.P., Trouvelot A. and Due G. (1991) *Genetic and cellular analysis of resistance to vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal fungi in pea mutants*. Ed. by Hennecke H., Verma D.P.S. Boston and London: Kluwer Academic Publishers, 336-342.
- Gibbs J.W.** (1931) *The collected works of J Willard Gibbs*. Vol1. Longmans, Green and Co. New York.
- Giordani T.**, Natali L., D'Ercole A., Pugliesi C., Fambrini M., et al. (1999) *Expression of a dehydrin gene during embryo development and drought stress in ABA-deficient mutants of sunflower (Helianthus annuus L)*. Plant Molecular Biology 39, 739–748.
- Giovannetti M.**, Balestrini R., Volpe V., Guether M., Straub D., et al. (2012) *Two putative-aquaporin genes are 1018 differentially expressed during arbuscular mycorrhizal symbiosis in Lotus 1019 japonicus*. BMC Plant Biology 12, 186.
- Giovannetti M. and Mosse B.** (1980) *An evaluation of techniques for measuring vesicular–arbuscular infection in roots*. New Phytol. 84, 489–500.
- Giovannetti M.**, Sbrana C., Avio L. and Strani P. (2004) *Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks*. New Phytol. 164, 175–181.
- Girousse C.**, Bournoville R. and Bonnemain J.L. (1996) *Water deficit-induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of alfalfa*. Plant Physiol. 111, 109- 113.
- Gobert A. and Plassard C.** (2008) *The beneficial effect of mycorrhizae on N utilization by the host-plant: myth or reality?* Ed. by Varma A. Springer, Berlin, pp. 209–240.
- Goicoechea N.**, Antolin M.C. and Sánchez-Díaz M. (1997) *Gas exchange is related to the hormone balance in mycorrhizal or nitrogen-fixing alfalfa subjected to drought*. Physiol. Plant. 100, 989–997.

- Goicoechea N.,** Antolín M.C., Strnad M. and Sánchez-Díaz M. (1996) *Root cytokinins, acid phosphatase and nodule activity in drought stressed mycorrhizal or nitrogen fixing alfalfa plants.* Journal of Experimental Botany 47, 683–686.
- Goicoechea N.,** Merino S. and Sánchez-Díaz M. (2004) *Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to the adaptations exhibited by the diciduous shrub Anthyllis cytisoides under water deficit.* Physiologia Plantarum. 122, 453-464.
- Govindarajulu M.,** Pfeffer P.E., Jin H.R., Abubaker J., Douds D.D., et al. (2005) *Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis.* Nature 435, 819–823.
- Guether M.,** Balestrini R., Hannah M.A., Udvardi M.K. and Bonfante P. (2009a) *Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in Lotus japonicus.* New Phytol. 182, 200–212.
- Guether M.,** Neuhauser B., Balestrini R., Dynowski M., Ludewig U. and Bonfante P. (2009b) *A mycorrhizal-specific ammonium transporter from Lotus japonicus acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi.* Plant Physiol. 150, 73–83.
- Gupta A.B. and Sankararamakrishnan R.** (2009) *Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant Populus trichocarpa: Characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective.* BMC Plant Biology 9, 134.
- Gu R.,** Chen X., Zhou Y. and Yuan L. (2012) *Isolation and characterization of three maize aquaporin genes, ZmNIP2;1, ZmNIP2;4 and ZmTIP4;4 involved in urea transport.* BMB reports 45, 2, 96-101.
- Gus-Mayer S.,** Naton B., Hahlbrock K. and Schmelzer E. (1998) *Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 8398–8403.
- Gustavsson S.,** Lebrun A.S., Nordén K., Chaumont F. and Johanson U. (2005) *A novel plant major intrinsic protein in Physcomitrella patens most similar to bacterial glycerol channels.* Plant Physiology 139, 287–295.
- Gutjahr C. and Parniske M.** (2013) *Cell and Developmental Biology of Arbuscular Mycorrhiza Symbiosis.* Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 29, 593–617.
- Hachez C.,** Moshelion M., Zelazny E., Cavez D. and Chaumont F. (2006) *Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers.* Plant Mol. Biol. 62, 305–323.
- HaiRu J.,** Jie L., Jing L. and XiaoWei H. (2012) *Forms of nitrogen uptake, translocation, and transfer via arbuscular mycorrhizal fungi: A review.* Sci. China Life Sci. 55, 6, 474–482.
- Hajiboland R.,** Aliasgharzadeh N., Laiegh S.F. and Poschenrieder C. (2010) *Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (Solanumlycopersicum L.) plants.* Plant and Soil 331, 313-327.
- Hamann T. and Møller B.L.** (2007) *Improved cloning and expression of cytochrome P450s and cytochrome P450 reductase in yeast.* Protein Express. Purif. 56, 121-127.
- Hamilton E.W. and Heckathorn S.A.** (2001) *Mitochondrial adaptations to NaCl: Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine.* Plant Physiology 126, 1266–1274.
- Hanba Y.T.,** Shibasaka M., Hayashi Y., Hayakawa T., Kasamo K., et al. (2004) *Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO(2) conductance and CO(2) assimilation in the leaves of transgenic rice plants.* Plant Cell Physiol. 45, 521–529.
- Hanson A.D.,** May A.M., Grumet R., Bode J., Jamieson G.C. and Rhodes D. (1985) *Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 2678-3682.
- Harley J.L. and Smith S.E.** (1983) *Mycorrhizal Symbiosis.* Academic Press, United Kingdom.
- Harrison M.J.** (1996) *A sugar transporter from Medicago truncatula: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations.* Plant Journal 9, 491-503.
- Harrison M.J.,** Dewbre G. and Liu J. (2002) *A phosphate transporter from Medicago truncatula involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi.* Plant Cell 14, 2413-2429.

- Harrison M.J.** (2005) *Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Annu. Rev. Microbiol. 59, 19–42.
- Harrison M.J. and Van Buuren M.L.** (1995) *A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus Glomus versiforme*. Nature 378, 626–629.
- Hartung W., Schraut D. and Jiang F.** (2005) *Physiology of abscisic acid (ABA) in roots under stress—a review of the relationship between root ABA and radial water and ABA flows*. Aust. J. Agric. Res. 56, 253–1259.
- Hause B., Mrosk C., Isayenkov S. and Strack D.** (2007) *Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions*. Phytochemistry 68, 101–110.
- Hauser F., Waadt R. and Schroeder J.I.** (2011) *Evolution of Abscisic Acid Synthesis and Signaling Mechanisms* Review. Current Biology, 21, 9, 346–355.
- Heckman D.S., Geiser D.M., Eidell B.R., Stauffer R.L., Kardos N.L. and Hedges S.B.** (2001) *Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants*. Science 293, 1129–1133.
- Hedfalk K., Tornroth-Horsefield S., Nyblom M., Johanson U., Kjellbom P. and Neutze R.** (2006) *Aquaporin gating*. Curr. Opin. Struct. Biol. 16, 447–456.
- Heinen R.B., Ye Q. and Chaumont F.** (2009) *Role of aquaporins in leaf physiology*. J. Exp. Bot. 60, 2971–2985.
- Helber N., Wippel K., Sauer N., Schaarschmidt S., Hause B. and Requena N.** (2011) *A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus sp is crucial for the symbiotic relationship with plants*. Plant Cell 23, 3812–3823.
- Heng L.K., Hsiao T., Evett S., Howell T. and Steduto P.** (2009) *Validating the FAO AquaCrop Model for irrigated and water deficient field maize*. Agron. J. 101, 488–498.
- Hewitt E.J.** (1952) *Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition*. Technical Communication 22. Farnham Royal, Bucks: Commonwealth Agricultural Bureau.
- He X., Gao L. and Zhao L.** (2011) *Effects of AM fungi on the growth and drought resistance of Seriphidium minchiinense under water stress*. Acta Ecol. Sinica. 31, 1029–1037.
- Heyes J.A., White P.J. and Loughman B.C.** (1991) *The role of boron in some membrane characteristics of plant cells and protoplasts*. In Current Topics in Plant Biochem. and Physiol. 10, 179–194.
- Higuchi M., Pischke M.S., Mahonen A.P., Miyawaki K., Hashimoto Y., et al.** (2004) *In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 8821–8826.
- Hijri M. and Sanders I.R.** (2005) *Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei*. Nature 433, 160–163.
- Hildebrandt U., Regvar M. and Bothe H.** (2007) *Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance*. Phytochemistry. 68, 139–46.
- Hine J.C. and Sprent J.I.** (1988) *Growth of Phaseolus vulgaris on various nitrogen sources: the importance of urease*. J. Exp. Bot. 39, 1505–1512.
- Hirayama T. and Shinozaki K.** (2007) *Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA*. Trends Plant Sci. 12, 343–351.
- Hoagland D.R. and Arnon D.I.** (1950) *The water culture method for growing plants without soil*. Calif. Agric. Exp. Stn. Circ. 347.
- Hochholdinger F., Woll K., Sauer M. and Dembinsky D.** (2004) *Genetic dissection of root formation in maize (Zea mays) reveals root-type specific developmental programmes*. Ann. Bot. 93, 359 – 368.
- Hodge A., Campbell C.D. and Fitter A.H.** (2001) *An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material*. Nature 413, 297–299.
- Hohnjec N., Perlick A.M., Puhler A. and Kuster H.** (2003) *The Medicago truncatula sucrose synthase gene MtSucS1 is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi*. Molecular Plant–Microbe Interactions 16, 903–915.



- Holbrook N.M.**, Shashidhar V.R., James R.A. and Munss R. (2002) *Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying*. J. Exp. Bot. 53, 1503–1514.
- Holm L.M.**, Jahn T.P., Møller A.L.B., Schjoerring J.K., Ferri D., et al. (2005) *NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeability in aquaporin-expressing Xenopus oocytes*. Pflügers Arch – Eur. J. Physiol. 450, 415–428.
- Hölmstrom K.O.**, Mantyla E., Welin B., Mandal A., Palva E.T., et al. (1996) *Drought tolerance in tobacco*. Nature 379, 683–684.
- Hong Z.**, Lakkineni K., Zhang Z. and Verma D.P.S. (2000) *Removal of feedback inhibition of 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress*. Plant Physiol. 122, 1129–1136.
- Honrubia M.** (2009) *The Mycorrhizae: a plant-fungus relation that has existed for more than 400 million years*. Anales del Jardín Botánico de Madrid 66, 133–144.
- Hopkins W.G. and Hüner N.P.** (2009) *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley and Sons Inc. NJ. USA. 503 pp.
- Hose E.**, Steudle E. and Hartung W. (2000) *Abscisic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a study using cell and root pressure probes*. Planta 211, 874–882.
- Hossain M.A. and Asada K.** (1984) *Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate*. Plant Cell Physiol. 25, 1285–1295.
- Hsiao T.C.** (1973) *Plant responses to water stress*. Annu Rev Plant Physiol 24, 519–570.
- Hua D.**, Wang C., He J., Liao H., Duang Y., et al. (2012) *A Plasma Membrane Receptor Kinase, GHRI, Mediates Abscisic Acid- and Hydrogen Peroxide-Regulated Stomatal Movement in Arabidopsis*. The Plant Cell Preview. doi/10.1105/tpc.112.100107.
- Huang R.S.**, Smith W.K. and Yost R.S. (1985) *Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth, water relations, and leaf orientation in Leucaena leucocephala (LAM.) De wit*. New Phytol. 99, 229–243.
- Hunter P.R.**, Craddock C.P., Di Benedetto S., Roberts L.M. and Frigerio L. (2007) *Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in Arabidopsis cells*. Plant Physiol. 145, 1371–1382.
- Iglesias-Acosta M.**, Martínez-Ballesta M. C., Teruel J. A. and Carvajal M. (2010). *The response of broccoli plants to high temperature and possible role of root aquaporins*. Environmental and Experimental Botany 68, 1, 83–90.
- Ike-Izundu N.E.** (2007) *Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and soil microbial populations in the rhizosphere*. Tesis Doctoral, Rhodes University, Sudáfrica.
- Ingram J. and Bartels D.** (1996) *The molecular basis of dehydration tolerance in plants*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 377–403.
- IPCC.** (2001) *Climate change 2001: the scientific basis*. edit. Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge.
- Irigoyen J.J.**, Emerich D.W. and Sánchez-Díaz M. (1992) *Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (Medicago sativa) plants*. Physiologia Plantarum 84, 67–72.
- Isayenkov S.**, Mrosk C., Stenzel I., Strack D. and Hause B. (2005) *Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of M. truncatula reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with Glomus intraradices*. Plant Physiol. 139, 1401–1410.
- Isayenkov S.V. and Maathuis F.J.M.** (2008) *The Arabidopsis thaliana aquaglyceroporin AtNIP7;1 is a pathway for arsenite uptake*. FEBS Letters 582, 1625–1628.
- Ishibashi K.** (2006) *Aquaporin superfamily with unusual NPA boxes: S-aquaporins (superfamily, sip-like and subcellular-aquaporins)*. Cell. Mol. Biol. 52, 20–27.
- Ishikawa F.**, Suga S., Uemura T., Sato M.H. and Maeshima M. (2005) *Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. 579, 5814–5820.
- Israelson O.W. and West F.L.** (1922) *Water holding capacity of irrigated soils*. Utah State, Agricultural Experiment Station Bull. 183, 1–24.

- Ito Y., Katsura K., Maruyama K., Taji T., Kobayashi M., et al. (2006) *Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice*. *Plant Cell Physiol.* 47, 141–153.
- Jahn T.P., Moller A.L., Zeuthen T., Holm L.M., Klaerke D.A., et al. (2004) *Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia*. *FEBS Letters* 574, 31–36.
- Jahromi F., Aroca R., Porcel R. and Ruiz-Lozano J.M. (2008) *Influence of salinity on the in vitro development of Glomus intraradices and on the in vivo physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants*. *Microb. Ecol.* 55, 45–53.
- Jakobsen I. (1995) *Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas*. Ed. by A. Varma & B. Hock. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 297–325.
- Jang J.K., Kim D.G., Kim Y.O., Kim J.S. and Kang H.S. (2004) *An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 54, 713–725.
- Jang J.Y., Lee S.H., Rhee J.Y., Chung G.C., Ahn S.J. and Kang H.S. (2007) *Transgenic Arabidopsis and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses*. *Plant Molecular Biology* 64, 621–632.
- Javot H., Lauvergeat V., Santoni V., Martin-Laurent F., Güçlü J., Vinh J., Heyes J., Franck K.I., Schäffner A.R., Bouchez D. and Maurel C. (2003) *Role of a single aquaporin isoform in root water uptake*. *The Plant Cell.* 15, 509–522.
- Javot H. and Maurel C. (2002) *The role of aquaporins in root water uptake*. *Annals of Botany* 90, 301–313.
- Javot H., Pumplin N. and Harrison M.J. (2007) *Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles*. *Plant, Cell and Environment* 30, 310–322.
- Jiang M. and Zhang J. (2002) *Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves*. *J. Exp. Bot.* 53, 2401–2410.
- Jiménez A., Hernández J.A., del Rio L.A. and Sevilla F. (1997) *Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves*. *Plant Physiol.* 114, 275–284.
- Jin H., Pfeffer P.E., Douds D.D., Piotrowski E., Lammers P.J. and Shachar-Hill Y. (2005) *The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis*. *New Phytologist* 168, 687–696.
- Johansen A., Finlay R.D. and Olsson P.A. (1996) *Nitrogen metabolism of the external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices*. *New Phytol.* 133, 705–712.
- Johansen A., Jakobsen I. and Jensen E.S. (1992) *Hypal transport of <sup>15</sup>N-labelled nitrogen by a vesicula-arbuscular mycorrhizal fungus and its effect on depletion of inorganic soil N*. *New Phytol.* 122, 281–288.
- Johanson U. and Gustavsson S. (2002) *A new subfamily of major intrinsic proteins in plants*. *Mol. Biol. Evol.* 19, 4, 456–461.
- Johansson I., Karlsson M., Johanson U., Larsson C. and Kjellbom P. (2000) *The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1465, 324–342.
- Johansson I., Karlsson M., Shukla V.K., Chrispeels M.J., Larsson C. and Kjellbom P. (1998) *Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation*. *The Plant Cell* 10, 451–459.
- Johansson I., Larsson C., Ek B. and Kjellbom P. (1996) *The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca<sup>2+</sup> and water potential*. *Plant Cell* 8, 1181–1191.
- Jones H.G. (2007) *Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance*. *J. Exp. Bot.* 58, 119–130.
- Judson O.P. and Normark B.B. (1996) *Ancient asexual scandals*. *Trends Ecol. Evol.* 11, 2, 41–46.

- Jung J.S.**, Preston G.M., Smith B.L., Guggino W.B. and Agre P. (1994) *Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP*. The Journal of Biological Chemistry 269, 20, 14648-14654.
- Kaldenhoff R.**, Bertl A., Otto B., Moshelion M. & Uehlein N. (2007) *Characterization of plant aquaporins*. Methods in Enzymology 428, 505–531.
- Kaldenhoff R.**, Kolling A. and Richter G. (1993) *A novel blue light- and abscisic acid-inducible gene of Arabidopsis thaliana encoding an intrinsic membrane protein*. Plant Mol. Biol. 23, 1187–1198.
- Kaldenhoff R.**, Kölling A. and Richter G. (1996) *Regulation of the Arabidopsis thaliana aquaporin gene AthH2 (PIP1b)*. J. Photochem. Photobiol. B. 36, 351–354.
- Kaldenhoff R.**, Ribas-Carbo M., Flexas J., Lovisoló C., Heckwolf M. and Uehlein N. (2008) *Aquaporins and plant water balance*. Plant Cell Environ. 31, 658–666.
- Kamaluddin M. and Zwiazek J.J.** (2001) *Metabolic inhibition of root water flow in red-osier dogwood (Cornus stolonifera) seedlings*. Journal of Experimental Botany 52, 739–745.
- Kamilla T. and Fujiwara T.** (2009) *Arabidopsis NIP1;1 Transports Antimonite and Determines Antimonite Sensitivity*. Plant Cell Physiol. 50, 11, 1977–1981.
- Kamiya T.**, Tanaka M., Mitani N., Ma J.F., Maeshima M. and Fujiwara T. (2008) *NIP1;1, an aquaporin homolog, determines the arsenite sensitivity of Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 284, 2114-2120.
- Kang J.**, Hwang J., Lee M., Kim Y., Assmann S.M., Martinoia E. and Lee Y. (2010) *PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107, 2355–2360.
- Karandashov V. and Bucher M.** (2005) *Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas*. Trends in Plant Science 10, 1, 22-29.
- Karandashov V.**, Nagy R., Wegmüller S., Amrhein N. and Bucher M. (2004) *Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 6258-6290.
- Katsuhara M.**, Hanba Y.T., Shiratake K. and Maeshima M. (2008) *Expanding roles of plant aquaporins in plasma membranes and cell organelles*. Functional Plant Biology. 35, 1–14.
- Katsuhara M.**, Koshio K., Shibasaka M., Hayashi Y., Hayakawa T. and Kasamo K. (2003) *Over-expression of a barely aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants*. Plant & Cell Physiology 44, 1378–1383.
- Kayingo G. and Wong B.** (2005) *The MAP kinase Hog1p differentially regulates stress-induced production and accumulation of glycerol and D-arabitol in Candida albicans*. Microbiology 151, 2987-2999.
- Kay R.**, Chau A. and Daly M. (1987) *Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plants genes*. Science 236, 1299–1302.
- Kenrick P. and Crane P.R.** (1997) *The origin and early evolution of plants on land*. Nature 389, 33-39.
- Kenrick P.** (2003) *Fishing for the first plants*. Nature 425, 248-249.
- Kerbiriou P.J.**, Stomph T.J., Van Der Putten P.E.L., Van Bueren E.T.L. and Struik P.C. (2013) *Shoot growth, root growth and resource capture under limiting water and N supply for two cultivars of lettuce (Lactuca sativa L.)*. Plant and soil 371, 1-2, 281-297.
- Khalvati M.A.**, Hu Y., Mozafar A. and Schmidhalter U. (2005) *Quantification of water uptake by arbuscular mycorrhizal hyphae and its significance for leaf growth, water relations, and gas exchange of barley subjected to drought stress*. Plant Biology 7, 706–712.
- Kiers E.T.**, Duhamel M., Beesetty Y., Mensah J.A., Franken O., et al. (2011) *Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis*. Science 333, 880–882.
- King L.S.**, Kozono D. and Agre P. (2004). *From structure to disease: The evolving tale of aquaporin biology*. Molecular cell biology 5, 687-698.
- Kishor P.B.**, Hong Z., Miao G.H., Hu C.A. and Verma D.P.S. (1995) *Overexpression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants*. Plant Physiology 108, 1387–1394.

- Kishor P.B. and Sreenivasulu N.** (2014) *Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue?* *Plant, Cell and Environment* 37, 300–311.
- Kjellbom P., Larsson C., Johansson I., Karlsson M. and Johanson U.** (1999) *Aquaporins and water homeostasis in plants.* *TRENDS in plant science.* 4, 8, 308-314.
- Kline K.G., Barrett-Wilt G.A. and Sussman M.R.** (2010) *In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 15986-15991.
- Kloppholz S., Kuhn H. and Requena N.** (2011) *A secreted fungal effector of Glomus intraradices promotes symbiotic biotrophy.* *Current Biology* 21, 1204–1209.
- Knipfer T. and Fricke W.** (2010) *Root pressure and a solute reflection coefficient close to unity exclude a purely apoplastic pathway of radial water transport in barley (Hordeum vulgare).* *New Phytologist* 187, 159–170.
- Kobae Y., Tamura Y., Takai S., Banba M. and Hata S.** (2010) *Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean.* *Plant Cell Physiol.* 51, 1411–1415.
- Koide R.T. and Mosse B.** (2004) *A history of research on arbuscular mycorrhiza.* *Mycorrhiza* 14, 145-163.
- Koiwai H., Nakaminami K., Seo M., Mitsuhashi W., Toyomasu T. and Koshiba T.** (2004) *Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in Arabidopsis.* *Plant Physiol.* 134, 1697–1707.
- Kojima S., Bohner A. and Von Wirén N.** (2006) *Molecular Mechanisms of Urea Transport in Plants.* *J. Membrane Biol.* 212, 83–91.
- Kosuta S., Chabaud M., Loughon G., Gough C., Denarie J., et al.** (2003) *A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of Medicago truncatula.* *Plant Physiology* 131, 952–962.
- Kosuta S., Hazledine S., Sun J., Miwa H., Morris R. J., et al.** (2008) *Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 9823–9828.
- Kozłowski T.T., Kramer P.J. y Pallardy S.G.** (1991) *The physiological ecology of woody plants.* Academic Press, Toronto.
- Krajinski F., Biela A., Schubert D., Gianinazzi-Pearson V., Kaldenhoff R. and Franken P.** (2000) *Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of Mtaqp1 encoding a mercury-insensitive aquaporin of Medicago truncatula.* *Planta* 211, 85–90.
- Kramer P.J. and Boyer J.S.** (1995) *Water relations of plants and soils.* Academic Press, San Diego, California.
- Kramer P.J.** (1980) *Drought, stress, and the origin of adaptations. Adaptations of plants to water and high temperature stress.* Ed. by Neil C. Turner, Paul J. Kramer. John-Wiley & Sons, New York. pp. 7- 20.
- Kramer P.J.** (1988) *Measurement of plant water status :Historical perspectives and current concerns.* *Irrig. Sci.* 9, 275-287.
- Kreslavski V.D., Los D.A., Allakhverdiev S.I. and Kuznetsov V.** (2012) *Signaling Role of Reactive Oxygen Species in Plants under Stress.* *Russian Journal of Plant Physiology* 59, 2, 141–154.
- Krochko J.E., Abrams G.D., Loewen M.K., Abrams S.R. and Cutler A.J.** (1998) *(+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase.* *Plant Physiol* 118, 849–860.
- Krüger M., Krüger C., Walker C., Stockinger H. and Schussler A.** (2012) *Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level.* *New Phytologist* 193, 970-984.
- Kuhn G., Hijri M. and Sanders I.R.** (2001) *Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi.* *Nature* 414, 745–748.
- Kuromori T., Miyaji T., Yabuuchi H., Shimizu H., Sugimoto E., et al.** (2010) *ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 2361–2366.



- Kushiro T.**, Okamoto M., Nakabayashi K., Yamagishi K., Kitamura S., et al. (2004) *The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism*. EMBO Journal 23, 1647–1656.
- Kyllo D.A.**, Velez V. and Tyree M.T. (2003) *Combined effects of arbuscular mycorrhizas and light on water uptake of the neotropical understory shrubs, Piper and Phytotria*. New Phytol. 160, 443–454.
- Lanfranco L.**, Novero M. and Bonfante P. (2005) *The mycorrhizal fungus Gigaspora margarita possesses a CuZn superoxide dismutase that is up-regulated during symbiosis with legume hosts*. Plant Physiol. 137, 1319–1330.
- Larcher W.** (1995) *Physiological plant ecology*. Third Edition. Springer-Verlag, Berlin.
- Larcher W.** (2003) *Physiological plant ecology: Ecophysiology and stress physiology of functional groups*. ISBM 3-540-43516-6 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Lavola A.**, Aphalo P.J. and Lehto T. (2011) *Boron and other elements in sporophores of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi*. Mycorrhiza 21, 155–165.
- Lee K.H.**, Piao H.L., Kim H.Y., Choi S.M., Jiang F., Hartung W., Hwang I., Kwak J.M., Lee I.J. and Hwang I. (2006) *Activation of Glucosidase via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid*. Cell 126, 1109–1120.
- Lee S.H.**, Calvo-Polanco M., Chung G.C. and Zwiazek J.J. (2010) *Cell water flow properties in root cortex of ectomycorrhizal (Pinus banksiana) seedlings*. Plant, Cell and Environment 33, 769–780.
- Lehmann S.**, Funck D., Szabados L. and Rentsch D. (2010) *Proline metabolism and transport in plant development*. Amino Acids 39, 949–962.
- Lehto T.**, Ruuhola T. and Dell B. (2010) *Boron in forest trees and forest ecosystems*. For. Ecol. Manage. 260, 2053–2069.
- Lehto T. and Zwiazek J.J.** (2011) *Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review*. Mycorrhiza 21, 71–90.
- Leipner J.**, Fracheboud Y. and Stamp P. (1997) *Acclimation by suboptimal temperature diminishes photooxidative damage in maize leaves*. Plant Cell Environ. 20, 366–372.
- Levitt J.** (1980) *Responses of plants to environmental stress: chilling, freezing and high temperature stresses*, 2nd ed.. New York: Academic Press.
- Levy Y. and Onuchic J.N.** (2006) *Water mediation in protein folding and molecular recognition*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35, 389–415.
- Levy Y.**, Syvertsen J.P. and Nemeč S. (1983) *Effect of drought stress and vesicular–arbuscularmycorrhiza on citrus transpiration and hydraulic conductivity of roots*. New Phytol. 93, 61–66.
- Lewis** (1980) *Boron, lignification and the origin of vascular plants: a unified hypothesis*. New Phytol. 84, 209–229.
- Lian H.L.**, Yu X., Lane D., Sun W.N., Tang Z.C. and Su W.A. (2006) *Upland rice and lowland rice exhibit different PIP expression under water deficit and ABA treatment*. Cell Res. 16, 651–660.
- Li G.W.**, Peng Y.H., Yu X., Zhang M.H., Cai W.M., et al. (2008) *Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice*. Journal of Plant Physiology 165, 1879–1888.
- Linderman R.G.** (1988) *Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect*. Phytopathology 78, 366–371.
- Lin S.I.**, Chiang S.F., Lin W.Y., Chen J.W., Tseng C.Y., et al. (2008) *Regulatory Network of Micro RNA399 and PHO2 by Systemic Signaling*. Plant Physiology 147, 732–746.
- Li T.**, Choi W-G., Wallace I.S., Baudry J. and Roberts D.M. (2011) *Arabidopsis thaliana NIP7;1: An Anther-Specific Boric Acid Transporter of the Aquaporin Superfamily Regulated by an Unusual Tyrosine in Helix 2 of the Transport Pore*. Biochemistry 50, 6633–6641.
- Li T.**, Hu Y-J., Hao Z-P, Li H., Wang Y-S and Chen B-D. (2013) *First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices*. New Phytologist. doi: 10.1111/nph.12011

- Liu L.-H.**, Ludewig U., Frommer W.B. and von Wirén N. (2003a) *AtDUR3 Encodes a New Type of High-Affinity Urea/H<sup>+</sup> Symporter in Arabidopsis*. *The Plant Cell* 15, 790–800.
- Liu I.-H.**, Ludewig U., Gassert B., Frommer W.B., and Von Wirén N. (2003b) *Urea transport by nitrogen-regulated Tonoplast Intrinsic Proteins in Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133, 1220–1228.
- Liu H.**, Trieu A.T., Blaylock L.A. and Harrison M.J. (1998) *Cloning and characterization of two phosphate transporters from Medicago truncatula roots: Regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 14–22.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D.** (2001) *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> method*. *Methods* 25, 402–408.
- Loewus F. and Loewus M.** (1980) *Biochemistry of myo-inositol*. Ed. by Stumpf P. y Conn E. New York. Academic Press, pp. 43.
- López D.**, Venisse J.-S., Fumanal B., Chaumont F., Guillot E., et al. (2013) *Aquaporins and Leaf Hydraulics: Poplar Sheds New Light*. *Plant Cell Physiol.* 0, 1–13.
- López F.**, Bousser A., Sissoëff I., Gaspar M., Lachaise B., et al. (2003) *Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins*. *Plant Cell Physiol.* 44, 1384–1395.
- López-Pedrosa A.**, González-Guerrero M., Valderas A., Azcón-Aguilar C. and Ferrol N. (2006) *GintAMT1 encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of Glomus intraradices*. *Fungal Genet. Biol.* 43, 102–110.
- López-Pérez L.**, Fernández-García N., Olmos E. and Carvajal M. (2007) *The phi thickening in roots of broccoli plants: an acclimation mechanisms to salinity?* *International Journal of Plant Sciences* 168, 1141–1149.
- López-Ráez J.A.**, Charnikhova T., Gómez-Roldán V., Matusova R., Kohlen W., et al. (2008) *Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation*. *New Phytol.* 178, 863–874.
- López-Ráez J.A.**, Verhage A., Fernández I., García J.M., Azcón-Aguilar C., et al. (2010) *Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway*. *Journal of Experimental Botany* 61, 2589–2601.
- Loque D.**, Ludewig U., Yuan L.X. and von Wiren N. (2005) *Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH<sub>3</sub> transport into the vacuole*. *Plant Physiology* 137, 671–680.
- Lovisolo C.**, Perrone I., Hartung W. and Schubert A. (2008) *An abscisic acid-related reduced transpiration promotes gradual embolism repair when grapevines are rehydrated after drought*. *New Phytol.* 180, 642–651.
- Lovisolo C.**, Secchi F., Nardini A., Salleo S., Buffa R. and Schubert A. (2007) *Expression of PIP1 and PIP2 aquaporins is enhanced in olive dwarf genotypes and is related to root and leaf hydraulic conductance*. *Physiol. Plant.* 130, 543–551.
- Ludewig U. and Dynowski M.** (2009) *Plant aquaporin selectivity: where transport assays, computer simulations and physiology meet*. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 3161–3175.
- Ludewig U.**, Neuhäuser B. and Dynowski M. (2007) *Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants*. *FEBS Letters* 581, 2301–2308.
- Ludwig-Müller J.** (2000) *Hormonal balance in plants during colonization by mycorrhizal fungi*. Ed. by Kapulnik Y, Douds DD. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands pp. 263–285.
- Luu D.-T. and Maurel C.** (2005) *Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status*. *Plant Cell Environ.* 28, 85–96.
- Luyten K.**, Albertyn J., Skibbe W.F., Prior B.A., Ramos J., et al. (1995) *Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress*. *EMBO J.* 14, 1360–71.
- Macey R.I.** (1984) *Transport of water and urea in red blood cells*. *Am. J. Physiol.* 246, 195–203.
- Maeshima M. and Ishikawa F.** (2008) *ER membrane aquaporins in plants*. *Eur. J. Physiol.* 456, 709–716.

- Mahdieh M. and Mostajeran A.** (2009) *Abscisic acid regulates root hydraulic conductance via aquaporin expression modulation in Nicotiana tabacum*. Journal of Plant Physiology 166, 1993–2003.
- Maheras P.** (1988) *Changes in precipitation conditions in the western Mediterranean over the last century*. Journal of Climatology, 179-189.
- Maillet F.,** Poinso V., André O., Puech-Pagès V., Haouy A., et al. (2011) *Fungal lipochito-oligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza*. Nature 469, 58-63.
- Ma J.F.** (2004) *Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses*. Soil Sci. Plant Nutr. 50, 11–18.
- Ma J.F. and Takahasi E.** (2002) *Soil, Fertilizer, and Plant Silicon Research in Japan*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Ma J.F.,** Tamai K., Yamaji N., Mitani N., Konishi S., et al. (2006) *A silicon transporter in rice*. Nature 440, 688–691.
- Ma J.F. and Yamaji N.** (2008) *Functions and transport of silicon in plants*. Cell. Mol. Life Sci. 65, 3049–3057.
- Ma J.F.,** Yamaji N., Mitani N. et al. (2008) *Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 105, 9931-9935.
- Ma J.F. and Yamaji N.** (2006) *Silicon uptake and accumulation in higher plants*. Cell. Mol. Life Sci. 65, 3049–3057.
- Maldonado-Mendoza I.E.,** Dewbre G.R. and Harrison M.J. (2001) *A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices is regulated in response to phosphate in the environment*. Molecular Plant-Microbe Interactions 14, 1140–1148.
- Malloch D.W.,** Pirozynski K.A. and Raven P.H. (1980) *Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A review)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 2113–2118.
- Manivannan P.,** Jaleel C.A., Sankar B., Kishorekumar A., Somasundaram R., et al. (2007) *Growth, biochemical modifications and proline metabolism in Helianthus annuus L. as induced by drought stress*. Colloids Surf. B: Biointerf. 59, 141-149.
- Mansfield T.A.,** Hetherington A.M. and Atkinson C.J. (1990) *Some current aspects of stomatal physiology*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41, 55–75.
- Mariaux J.B.,** Bockel C., Salamini F. & Bartels D. (1998) *Dessication and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic propeins (MIPs) from the resurrection plant Craterostigma plantagineum*. Plant Molecular Biology 38, 1089– 1099.
- Marini A.M.,** Soussi-Boudekou S., Vissers S. and Andre B. (1997) *A family of ammonium transporters in Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 17, 4282–4293.
- Marini A.M.,** Vissers S., Urrestarazu A. and Andre B. (1994) *Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 13, 3456–3463.
- Marjanovic Z.,** Uehlein N., Kaldenhoff R., Zwiazek J.J., Weiß M., et al. (2005) *Aquaporins in poplar: what a difference a simbiote makes!* Planta 222, 258–268.
- Martínez-Ballesta M.C.,** Aparicio F., Pallás V., Martínez V. and Carvajal M. (2003) *Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in Arabidopsis*. J. Plant Physiol. 160, 689–697.
- Martínez-Vilalta J.,** Piñol J. y Beven K. (2002) *A hydraulic model to predict drought-induced mortality in woody plants: an application to climate change in the Mediterranean*. Ecological Modelling 155, 127-147.
- Martre P.,** Morillon R., Barrieu F., North G.B., Nobel P.S., and Chrispeels M.J. (2002) *Plant Physiology*. 130, 2101–2110.
- Marulanda A.,** Azcon R., Chaumont F., Ruiz-Lozano J.M. and Aroca R. (2010) *Regulation of plasma membrane aquaporins by inoculation with a Bacillus megaterium strain in maize (Zea mays L.) plants under unstressed and salt-stressed conditions*. Planta 232, 533–543.

- Marulanda A.**, Azcon R. and Ruiz-Lozano J.M. (2003) *Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by Lactuca sativa plants under drought stress*. *Physiol. Plant.* 119, 526–533.
- Mathai J.C. and Sitaramam V.** (1994) *Stretch sensitivity of transmembrane mobility of hydrogen peroxide through voids in the bilayer*. *J. Biol. Chem.* 269, 17784–17793.
- Ma T.**, Yang B. and Verkman A.S. (1996) *cDNA cloning of a functional water channel from toad urinary bladder epithelium*. *Am. J. Physiol.* 271, 1699–1704.
- Maurel C.**, Chrispeels M., Lurin C., Tacnet F., Geelen D., et al. (1997) *Function and regulation of seed aquaporins*. *Journal of Experimental Botany* 48, 421–430.
- Maurel C.**, Javot H., Lauvergeat V., Gerbeau P., Tournaire C., et al. (2002) *Molecular physiology of aquaporins in plants*. *Int. Rev. Cytol.* 215, 105–148.
- Maurel C.**, Kado R.T., Guern J. and Chrispeels M.J. (1995) *Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin  $\alpha$ -TIP*. *The EMBO Journal* 14, 3028–3035.
- Maurel C.** (2007) *Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties*. *FEBS Letters* 581, 2227–2236.
- Maurel C. and Plassard C.** (2011) *Aquaporins: for more than water at the plant-fungus interface?* *New Phytol.* 190, 815–817.
- Maurel C.**, Reizer J., Schroeder J.I., Chrispeels M.J. and Saier J.M.H. (1994) *Functional characterization of the Escherichia coli glycerol facilitator, GlpF, in Xenopus oocytes*. *Journal of Biological Chemistry* 269, 11869–11872.
- Maurel C.**, Reizer J., Schroeder J.I. and Chrispeels M.J. (1993) *The vacuolar membrane protein  $\gamma$ -TIP creates water specific channels in Xenopus oocytes*. *EMBO Journal.* 12, 2241–2247.
- Maurel C.**, Verdoucq L., Luu D.T. and Santoni V. (2008) *Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 595–624.
- Maynard Smith J.** (1986) *Evolution-contemplating life without sex*. *Nature* 324, 300–1.
- Ma Y.**, Szostkiewicz I., Korte A., Moes D., Yang Y., Christmann A. and Grill E. (2009) *Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors*. *Science* 324, 1064–1068.
- McCue K.F. and Hanson A.D.** (1990) *Drought and salt tolerance: towards understanding and application*. *Trends Biotechnol.* 8, 358–363.
- Mifflin B.J. and Habash D.Z.** (2002) *The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for the improvement in the nitrogen utilization of crops*. *J. Exp. Bot.* 53, 979–987.
- Mikkelsen B.L.**, Rosendahl S. and Jakobsen I. (2008) *Underground resource allocation between individual networks of mycorrhizal fungi*. *New Phytol.* 180, 890–898.
- Miller G.**, Honig A., Stein H., Suzuki N., Mittler R. and Zilberstein A. (2009) *Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes*. *Journal of Biological Chemistry* 284, 26482–26492.
- Miller G.**, Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S. and Mittler R. (2010) *Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses*. *Plant Cell Environ.* 33, 453–467.
- Miller R.M.**, Reinhardt D.R. and Jastrow J.D. (1995) *External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tall grass prairie communities*. *Oecologia* 103, 17–23.
- Minotti G. and Aust D.** (1987) *The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide*. *Journal of Biological Chemistry* 262, 1098–1104.
- Mitani N.**, Chiba Y., Yamaji N. and Ma J.F. (2009a) *Identification and Characterization of Maize and Barley Lsi2-Like Silicon Efflux Transporters Reveals a Distinct Silicon Uptake System from That in Rice*. *The Plant Cell* 21, 2133–2142.
- Mitani N. and Ma J.F.** (2005) *Uptake system of silicon in different plant species*. *Journal of Experimental Botany* 56, 414, 1255–1261.
- Mitani N.**, Yamaji N. and Ma J.F. (2008) *Characterization of substrate specificity of a rice silicon transporter, Lsi1*. *Eur. J. Physiol.* 456, 679–686.
- Mitani N.**, Yamaji N. and Ma J.F. (2009b) *Identification of Maize Silicon Influx Transporters*. *Plant Cell Physiol.* 50, 1, 5–12.



- Mittler R.** (2002). *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. Trends Plant Sci. 7, 405-410.
- Mittler R.**, Vanderauwera S., Gollery M. and Van Breusegem F. (2004) *Reactive oxygen gene network of plants*. Trends in Plant Science 9, 490–498.
- Miwa K. and Fujiwara T.** (2010) *Role of Boron in Plant Growth and its Transport Mechanisms*. Plant Cell Monographs 17. DOI 10.1007/978-3-642-10613-2\_1.
- Miwa K.**, Kamiya T. and Fujiwara T. (2009) *Homeostasis of the structurally important micronutrients, B and Si*. Current Opinion in Plant Biology 12, 307–311.
- Moghaieb R.**, Saneoka H., Fujita K. (2004) *Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants, Salicornia europaeae and Suaeda maritime*. Plant Sci. 166, 1345-1349.
- Morgan J.M.** (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. Annu. Rev. Plant Phys. 33, 299-319.
- Morillon R. and Chrispeels M.J.** (2001) *The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98, 14138–14143.
- Muhsin T.M. and Zwiazek J.J.** (2002) *Ectomycorrhizas increase apoplastic water transport and hydraulic conductivity in Ulmus americana seedlings*. New Phytol. 153, 153–158.
- Munkvold L.**, Kjølner R., Vestberg M., Rosendahl S. and Jakobsen I. (2004) *High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi*. New Phytol. 164, 357–364.
- Murata K.**, Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., et al. (2000) *Structural determinants of water permeation through aquaporin-1*. Nature 407, 599–605.
- Nagy R.**, Drissner D., Amrhein N., Jakobsen I. and Bucher M. (2009) *Mycorrhizal phosphate uptake pathway in tomato is phosphorus-repressible and transcriptionally regulated*. New Phytol. 181, 950–959.
- Naidu S.G.** (1998) *Haemolymph Amino Acid, Sugar and Glycerol Levels in the Namib Desert Tenebrionid Stips stali During Dehydration and Rehydration*. Comp. Biochem. Physiol. 119, 2, 477–484.
- Nanjo T.**, Kobayashi M., Yoshida Y., Sanada Y., Wada K., et al. (1999) *Biological functions of proline biosynthesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic Arabidopsis thaliana*. Plant J. 18, 185–93.
- Nayyar H. and Gupta D.** (2006) *Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: association with oxidative stress and antioxidants*. Environ. Exp. Bot. 58, 106–113.
- Neill S.**, Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., et al. (2008) *Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress*. Journal of Experimental Botany 59, 165–176.
- Neill S.J.**, Desikan R., Clarke A., Hurst R.D. and Hancock J.T. (2002) *Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants*. Journal of Experimental Botany 53, 372, 1237-1247.
- Netting A.G.** (2000) *pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions: cellular responses to stress and their implication for plant water relations*. J. Exp. Bot. 51, 147–158.
- Newman E.I.** (1966) *A method of estimating the total length of root in a sample*. J. App. Ecol. 3, 139–145.
- Nielsen S.**, Smith B.L., Christensen E.I., Knepper M.A. and Agre P. (1993) *CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron*. J. Cell Biol. 120, 371–383.
- Niemietz C.M. and Tyerman S.D.** (1997) *Characterization of water channels in wheat root membrane vesicles*. Plant Physiology 115, 561–567.
- Niemietz C.M. and Tyerman S.D.** (2002) *New potent inhibitors of aquaporins: silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin*. FEBS Letters 531, 443- 447.
- Nobel P.S. and Cui M.** (1992) *Hydraulic conductances of the soil, the root-soil air gap, and the root: changes for desert succulents in drying soil*. J. Exp. Bot. 43, 319–326.

- Nour-Eldin H.H.**, Hansen B.G., Norholm M.H., Jensen J.K. and Halkier B.A. (2006) *Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments*. Nucleic Acids Res. 34, e122.
- Ober E.S. and Sharp R.E.** (1994) *Proline accumulation in maize (Zea mays L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased levels of abscisic acid*. Plant Physiology 105, 981–987.
- Ogawa A. and Yamauchi A.** (2006) *Root osmotic adjustment under osmotic stress in maize seedlings. 2. Mode of accumulation of several solutes for osmotic adjustment in the root*. Plant Prod. Sci. 9, 39–46.
- Ohtomo R. and Saito M.** (2005) *Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus*. New Phytol. 167, 571–578.
- Okamoto M.**, Min X., Seo M., Nakabayashi K. and Kamiya Y. (2002) *Complementation of a tomato ABA-deficient Sitiens mutant by an Arabidopsis aldehyde oxidase gene, AAO3*. Plant and Cell Physiology 43, S42.
- Olsson P.A.**, Van Aarle I.M., Allaway W.G., Ashford A.E. and Rouhier H. (2002) *Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures*. Plant Physiol. 130, 1162–1171.
- O'Neill M.A.**, Ishii T., Albersheim P., Darvill A.G. (2004) *Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide*. Annu. Rev. Plant Biol. 55, 109–139.
- Otto B.**, Uehlein N., Sdorra S., Fischer M., Ayaz M., et al. (2010) *Aquaporin tetramer composition modifies the function of tobacco aquaporins*. J. Biol. Chem. 285, 31253–31260.
- Ouziad F.**, Wilde P., Schmelzer E., Hildebrandt U. and Bothe H. (2006) *Analysis of expression of aquaporins and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> transporters in tomato colonized by arbuscular mycorrhizal fungi and affected by salt stress*. Environ. Exp. Bot. 57, 177–186.
- Oxborough K. and Baker N.R.** (1997) *Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo'*. Photosynthesis Research 54, 135–142.
- Ozden M.**, Demirel U. and Kahraman A. (2009) *Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (Vitis vinifera L.) exposed to oxidative stress by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*. Scientia Horticulturae 119, 163–168.
- Pandey S.**, Nelson D.C. and Assmann S.M. (2009) *Two novel GPCR- type G proteins are abscisic acid receptors in Arabidopsis*. Cell 136, 136–148.
- Pang Y.**, Li L., Ren F., Lu P., Wei P., et al. (2010) *Overexpression of the tonoplast aquaporin AtTIP5;1 conferred tolerance to boron toxicity in Arabidopsis*. Journal of Genetics and Genomics 37, 389–397.
- Parent B.**, Hachez C., Redondo E., Simonneau T., Chaumont F. and Tardieu F. (2009) *Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach*. Plant Physiol. 149, 2000–2012.
- Parker J.** (1968) *Drought-resistance mechanisms*. Water deficits and plant growth. Vol. I. Ed. by T.T. Kozlowski. Academic press, New York. pp. 195–234.
- Park S.Y.**, Fung P., Nishimura N., Jensen D.R., Fujii H., et al. (2009) *Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins*. Science 324, 1068–1071.
- Park W.**, Scheffler B.E., Bauer P.J. and Campbell B.T. (2010) *Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (Gossypium hirsutum L.)*. BMC Plant Biology 10, 142.
- Parniske M.** (2008) *Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses*. Nature reviews Microbiology 6, 763–775.
- Paszkowski U.**, Kroken S., Roux C. And Briggs S.P. (2002) *Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 13324–13329.

- Patterson B.D.**, MacRae A. and Ferguson I.A. (1984) *Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV)*. Analytical Biochemistry 139, 2, 487–492.
- Paul E.A. and Clark F.E.** (1989) *Soil biology and biochemistry*. Academic Press, San Diego.
- Pawlowska T.E. and Taylor J.W.** (2004) *Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi*. Nature 427, 733–737.
- Pei Z.M.**, Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., et al. (2000) *Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells*. Nature 406, 731–734.
- Peleg Z. and Blumwald E.** (2011) *Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants*. Current Opinion in Plant Biology 14, 1–6.
- Pérez-Tienda J.**, Testillano P.S., Balestrini R., Fiorilli V., Azcon-Aguilar C. and Ferrol N. (2011) *GintAMT2, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices*. Fungal Genet. Biol. 48, 1044–1055.
- Pfeffer P.E.**, Douds D.D., Becard G. and Shachar-Hill Y., (1999) *Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza*. Plant Physiology 120, 587–598.
- Phillips J.M. and Hayman D.S.** (1970) *Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection*. Transactions of the British Mycological Society 55, 158–160.
- Pirozynski K.A. and Malloch D.W.** (1975) *The origin of land plants: A matter of mycotropism*. Biosystems 6, 153–164.
- Plamboeck A.H.**, Dawson T.E., Egerton-Warburton L.M., North M., Bruns T.D. and Querejeta J.I. (2007) *Water transfer via ectomycorrhizal fungal hyphae to conifer seedlings*. Mycorrhiza 17, 439–447.
- Pollard A.S.**, Parr A.J. and Loughman B.C. (1977) *Boron in relation to membrane function in higher plants*. J. Exp. Bot. 28, 831–41.
- Porcel R.**, Aroca R., Azcón R., Ruiz-Lozano J.M. (2006) *PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal Glycine max and Lactuca sativa plants in relation to drought stress tolerance*. Plant Mol. Biol. 60, 389–404.
- Porcel R.**, Azcón R. and Ruiz-Lozano J.M. (2005) *Evaluation of the role of genes encoding for dehydrin proteins (LEA D-11) during drought stress in arbuscular mycorrhizal Glycine max and Lactuca sativa plants*. J. Exp. Bot. 56, 1933–1942.
- Porcel R.**, Azcón R. and Ruiz-Lozano J.M. (2004) *Evaluation of the role of genes encoding for  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) during drought stress in arbuscular mycorrhizal Glycine max and Lactuca sativa plants*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 65, 211–221.
- Porcel R.**, Barea J.M. and Ruiz-Lozano J.M. (2003) *Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence*. New Phytol. 157, 135–143.
- Porcel R.** (2006) *Evaluación de la participación de genes de respuesta al déficit hídrico en el aumento de tolerancia de las plantas micorrizadas frente a la sequía*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada+CSIC, Granada.
- Porcel R. and Ruiz-Lozano J.M.** (2004) *Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress*. Journal of Experimental Botany 55, 1743–1750.
- Postaire O.**, Tournaire-Roux C., Grondin A., Boursiac Y., Morillon R., et al. (2010) *A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of Arabidopsis*. Plant Physiology 152, 1418–1430.
- Postaire O.**, Verdoucq L., Cnrs S., Um I., Viala P. and Cedex F.M. (2008). *Aquaporins in Plants: From Molecular Structure to Integrated Functions*. DOI: 10.1016/S0065-2296(07)46003-7
- Pou A.**, Medrano H., Flexas J. and Tyerman S.D. (2013) *A putative role for TIP and PIP aquaporins in dynamics of leaf hydraulic and stomatal conductances in grapevine under water stress and re-watering*. Plant Cell Environ. 36, 828–843.

- Power P.P. and Woods W.G.** (1997) *The chemistry of boron and its speciation in plants*. Plant and Soil 193, 1–13.
- Pozo M.J. and Azcón-Aguilar C.** (2007) *Unraveling mycorrhiza-induced resistance*. Current Opinion in Plant Biology 10, 393–398.
- Prak S., Hem S., Boudet J., Viennois G., Sommerer N., et al.** (2008) *Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins: role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress*. Mol. Cell Proteomics 7, 1019–1030.
- Preston G.M. and Agre P.** (1991) *Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kD: Member of an ancient channel family*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 11110–11114.
- Preston G.M., Carroll T.P., Guggino W.B. and Agre P.** (1992) *Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 Protein*. Science 256, 385–387.
- Preston G.M., Jung J.S., Guggino W.B. and Agre P.** (1993) *The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel*. J. Biol. Chem. 268, 1, 17–20.
- Pumplin N. and Harrison M.J.** (2009) *Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in Medicago truncatula roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Plant Physiol. 151, 809–819.
- Pumplin N., Mondo S.J., Topp S., Starker C.G., Gantt J.S. and Harrison M.J.** (2010) *Medicago truncatula Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Plant Journal 61, 482–494.
- Qin X. and Zeevaart J.A.D.** (2002) *Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in Nicotiana plumbaginifolia increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance*. Plant Physiol. 128, 544–551.
- Quan L.J., Zhang B., Shi W-W. and Li H-Y.** (2008) *Hydrogen Peroxide in Plants: a Versatile Molecule of the Reactive Oxygen Species Network*. Journal of Integrative Plant Biology 50, 1, 2–18.
- Querejeta J.I., Barea J.M., Allen M.F., Caravaca F. and Roldan A.** (2003) *Differential response of delta C-13 and water use efficiency to arbuscular mycorrhizal infection in two aridland woody plant species*. Oecologia 135, 510–5.
- Querejeta J.I., Egerton-Warburton L.M., Prieto I., Vargas R. and Allen M.F.** (2012) *Changes in soil hyphal abundance and viability can alter the patterns of hydraulic redistribution by plant roots*. Plant Soil 355, 1-2, 63-73.
- Quick W.P., Chaves M.M., Wendler R., David M.M., Rodrigues M.L., et al.** (1992) *The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions*. Plant, Cell and Environment 15, 25–35.
- Radin J.W.** (1984) *Stomatal responses to water stress and to abscisic acid in phosphorus-deficient cotton plants*. Plant Physiol. 76, 392–395.
- Rai V.K.** (2002) *Role of amino acids in plant responses to stresses*. Biologia Plantarum 45, 481–487.
- Rambal S. and Debussche G.** (1995) *Water balance of Mediterranean ecosystems under a changing climate*. Ed. by J.M. Moreno y W.C. Oechel. Springer Verlag, New York. pp. 386–407.
- Ranathunge K., Kotula L., Steudle E. and Lafitte R.** (2004) *Water permeability and reflection coefficient of the outer part of young rice roots are differently affected by closure of water channels (aquaporins) or blockage of apoplastic pores*. Journal of Experimental Botany 55, 433–447.
- Rasmussen N., Lloyd D.C., Ratcliffe R.G., Hansen P.E. and Jakobsen I.** (2000) *P-31NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi*. Plant and Soil 226, 245–253.
- Rausch C., Daram P., Brunner S., Jansa J., Lalió M., et al.** (2001) *A phosphate transporter expressed in arbuscular-containing cells in potato*. Nature 414, 462–466.
- Ravnskov S., Wu Y. and Graham J.H.** (2003) *Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect expression of genes coding for sucrose synthases in maize roots*. New Phytol. 157, 539–545.



- Recorbet G.,** Abdallah C., Renaut J., Wipf D. and Dumas-Gaudot E. (2013) *Protein actors sustaining arbuscular mycorrhizal symbiosis: underground artists break the silence*. *New Phytologist* 199, 26–40.
- Reichstein M.,** Tenhunen J.D., Rouspard O., Ourcival J.M., Rambal S., et al. (2002) *Severe drought effects on ecosystem CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O fluxes at three Mediterranean evergreen sites: revision of current hypotheses*. *Global Change Biology* 8, 999–1017.
- Reizer J.,** Reizer A. and Saier M.H. (1993) *The MIP family of integral membrane channel proteins: Sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the Proteins*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 28, 3, 235–257.
- Remakers C.,** Ruijter J.M., Deprez R.H.L. and Moorman A.F.M. (2003) *Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data*. *Neurosci. Lett.* 339, 62–66.
- Remus-Borel W.,** Menzies J.G. and Belanger R.R. (2005) *Silicon induces antifungal compounds in powdery mildew-infected wheat*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 66, 108–115.
- Remy W.,** Taylor T.N., Hass H. and Kerp H. (1994) *Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae*. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA.* 91, 11841–11843.
- Ren H.B.,** Wei K., Jia W., Davies W.J. and Zhang J. (2007) *Modulation of root signals in relation to stomatal sensitivity to root-sourced abscisic acid in drought-affected plants*. *J. Integr. Plant Biol.* 40, 1410–1420.
- Requena N.,** Breuninger M., Franken P. and Ocon A. (2003) *Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae**. *Plant Physiology* 132, 1540–1549.
- Requena N.,** Serrano E., Ocon A. and Breuninger M. (2007) *Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment*. *Phytochemistry* 68, 33–40.
- Riera M.,** Valon C., Fenzi F., Giraudat J. and Leung J. (2005) *The genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid- dependent and abscisic acid-independent signalling components*. *Physiologia Plantarum* 123, 111–119.
- Rillig M.C.,** Wright S.F., Nichols K.A., Schmidt W.F. and Torn M.S. (2001) *Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils*. *Plant Soil* 233, 167–177.
- Rivers R.L.,** Dean R.M., Chandy G., Hall J.E., Roberts D.M. and Zeidel M.L. (1997) *Functional analysis of Nodulin 26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes*. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 26, 16256–16261.
- Rodrigues F.A.,** Jurick W.M., Datnoff L.E., Jones J.B. and Rollins J.A. (2005) *Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 66, 144–159.
- Rodrigues F.A.,** McNally D.J., Datnoff L.E., Jones J.B., Labbé C., et al. (2004) *Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance*. *Phytopathology* 94, 177–183.
- Rodríguez R.L. and Tait R.C.** (1983) *Recombinant DNA techniques*. Addison-Wesley Publishing.
- Rook F.,** Corke F., Card R., Munz G., Smith C., Bevan M.W. (2001) *Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signaling*. *Plant J.* 26, 421–433.
- Rosendahl D. and Taylor J.W.** (1997) *Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP<sup>TM</sup>*. *Mol. Ecol.* 6, 821–829.
- Rosendahl S. and Stukenbrock E.H.** (2004) *Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences*. *Mol. Ecol.* 13, 3179–3186.
- Ruiz-Lozano J.M.,** Alguacil M.M., Bázquez G., Vernieri P. and Aroca R. (2009) *Exogenous ABA accentuates the differences in root hydraulic properties between mycorrhizal and non mycorrhizal maize plants through regulation of PIP aquaporins*. *Plant Molecular Biology* 70, 565–579.

- Ruiz-Lozano J.M.** (2003) *Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies.* Mycorrhiza 13, 309–317.
- Ruiz-Lozano J.M. and Aroca R.** (2010) *Modulation of aquaporin genes by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in relation to osmotic stress tolerance.* Ed. by J. Seckbach and M. Grube. Springer Science+Business Media. pp. 357–374.
- Ruiz-Lozano J.M. and Azcón R.** (1997) *Effect of calcium application on the tolerance of mycorrhizal lettuce plants to polyethylene glycol-induced water stress.* Symbiosis 23, 9–21.
- Ruiz-Lozano J.M., Azcón R. and Gómez M.** (1995) *Effects of arbuscular mycorrhizal Glomus species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses.* Appl. Environ. Microbiol. 61, 456–460.
- Ruiz-Lozano J.M. and Azcón R.** (1995) *Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status.* Physiologia Plantarum 95, 472–478.
- Ruiz-Lozano J.M. and Azcón R.** (1996) *Mycorrhizal colonization and drought stress as factors affecting nitrate reductase activity in lettuce plants.* Agric. Ecosyst. Environ. 60, 175–181.
- Ruiz-Lozano J.M., Azcón R. and Palma J.M.** (1996). *Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal Lactuca sativa plants subjected to drought stress.* New Phytologist 134, 327–333.
- Ruiz-Lozano J.M., Collados C., Barea J.M. and Azcón R.** (2001) *Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants.* New Phytol. 151, 493–502.
- Ruiz-Lozano J.M., Porcel R. and Aroca R.** (2006) *Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit involve modulation of drought-induced plant genes?* New Phytol. 171, 693–698.
- Ruiz-Lozano J.M., Porcel R., Bárzana G., Azcón R. and R. Aroca** (2012) *Contribution of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis to Plant Drought Tolerance: State of the Art.* DOI: 10.1007/978-3-642-32653-0\_13.
- Ruiz-Sánchez M., Armada E., Muñoz Y., García de Salamone I., Aroca R., et al.** (2011) *Azospirillum and arbuscular mycorrhizal colonization enhanced rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions.* J. Plant Physiol. 168, 1031–1037.
- Ruiz-Sánchez M., Aroca R., Muñoz Y., Polón R. and Ruiz-Lozano J.M.** (2010) *The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress.* J. Plant Physiol. 167, 862–869.
- Ruth B., Khalvati M. and Schmidhalter U.** (2011) *Quantification of mycorrhizal water uptake via high-resolution on-line water content sensors.* Plant Soil 342, 459–468.
- Sade N., Gebretsadik M., Seligmann R., Schwartz A., Wallach R. and Moshelion M.** (2010) *The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress.* Plant Physiology 152, 245–254.
- Sade N., Vinocur B.J., Diber A., Shatil A., Ronen G., et al.** (2009) *Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SITIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion?* New Phytologist 181, 651–661.
- Sakurai J., Ahamed A., Murai M., Maeshima M. and Uemura M.** (2008) *Tissue and cell-specific localization of rice aquaporins and their water transport activities.* Plant Cell. Physiol. 49, 30–39.
- Sakurai J., Ishikawa F., Yamaguchi T., Uemura M. and Maeshima M.** (2005) *Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function.* Plant & Cell Physiology 46, 1568–1577.
- Sánchez-Blanco M.J., Ferrández T., Morales M.A., Morte A. and Alarcón J.J.** (2004) *Variations in water status, gas exchange, and growth in Rosmarinus officinalis plants infected with Glomus deserticola under drought conditions.* J. Plant Physiol. 161, 675–682.

- Sánchez-Díaz M.**, Pardo M., Antolm M., Pena J. and Aguirreolea J. (1990) *Effect of water stress on photosynthetic activity in the Medicago-Rhizobium-Glomus symbiosis*. *Plant Sci.* 71, 215-221.
- Sánchez-Romera B.**, Ruiz-Lozano J.M., Li G., Luu D-T, Martínez-Ballesta M.C., et al. (2014) *Enhancement of root hydraulic conductivity by methyl jasmonate and the role of calcium and abscisic acid in this process*. *Plant, Cell and Environment* 37, 995–1008.
- Sanders F.E.**, Tinker B.P., Black R.L.B. and Palmerly S.M. (1977) *The development of endomycorrhizal root systems. I. Speed of infection and growth-promoting effects with four species of vesicular–arbuscular endophyte*. *New Phytol.* 78, 257–268.
- Sanders I.R. and Croll D.** (2010) *Arbuscular mycorrhiza: the challenge to understand the genetics of the fungal partner*. *Annual Review of Genetics* 44, 271–292.
- Sanders I.R.** (2002) *Specificity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Ed. by van der Heijden MGA, Sanders IR. Springer, Berlin, pp. 415-437.
- Santner A. and Estelle M.**, (2010). *The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling*. *The Plant Journal* 61, 1029–1040.
- Santos-Gonzalez J.C.**, Finlay R.D. and Tehler A. (2007) *Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots in a seminatural grassland*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5613–5623.
- Sarda X.**, Tousch D., Ferrare K., Legrand E., Dupuis J.M., et al. (1997) *Two TIP-like encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells*. *Plant J.* 12, 1103–1111.
- Savoure A.**, Hua X.J., Bertauche N., Van Montagu M. and Verbruggen N. (1997) *Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 254, 104–109.
- Schaarschmidt S.**, Gonzalez M.C., Roitsch T., Strack D., Sonnewald U. and Hause B. (2007) *Regulation of arbuscular mycorrhization by carbon. The symbiotic interaction cannot be improved by increased carbon availability accomplished by root-specifically enhanced invertase activity*. *Plant Physiology* 143, 1827–1840.
- Schnurbusch T.**, Hayes J., Hrmova M., Baumann U., Ramesh S.A., et al. (2010) *Boron Toxicity Tolerance in Barley through Reduced Expression of the Multifunctional Aquaporin HvNIP2;1*. *Plant Physiology* 153, 1706–1715.
- Schobert B. and Tschesche H.** (1978) *Unusual solution properties of proline and its interactions with proteins*. *Biochem. Biophys. Acta.* 541, 270-277.
- Schraut D.**, Heilmeyer H. and Hartung W. (2005) *Radial transport of water and abscisic acid (ABA) in roots of Zea mays under conditions of nutrient deficiency*. *J. Exp. Bot.* 56, 879–886.
- Schüßler A.**, Martin H., Cohen D., Fitz M. and Wipf D. (2006) *Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi*. *Nature* 444, 933-936.
- Schüßler A. and Walker C.** (2011) *Evolution of the 'plant-symbiotic' fungal phylum, Glomeromycota*. Ed. by Pöggeler S, Wöstemeyer J. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 163-185.
- Schuermans J.A.M.J.**, Joost T. van Dongen J.T., Rutjens B.P.W., Alex Boonman A., et al. (2003) *Members of the aquaporin family in the developing pea seed coat include representatives of the PIP, TIP, and NIP subfamilies*. *Plant Molecular Biology* 53, 655–667.
- Seiler Ch.**, Harshavardhan V.T., Rajesh K., Sudhakar P., Strickert M., et al. (2011) *ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions*. *Journal of Experimental Botany* 62, 8, 2615–2632.
- Seki M.**, Kamei A., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (2003) *Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection*. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 194–199.
- Seki M.**, Umezawa T., Urano K. and Shinozaki K. (2007) *Regulatory metabolic networks in drought stress responses*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 296-302.
- Shamshad S. and Naqvi M.** (1999) *Plant Hormones and Stress Phenomena*. Ed. By Pessarakli M. ISBN: 0-8247-1948-4. pp. 709-730.

- Shapiro R.E.**, Armiger W.H. and Fried M. (1960) *The effect of soil water movement vs. phosphate diffusion on growth and phosphorus content of corn and soybeans*. Soil Science Society of America Proceedings 24, 161–164.
- Sharadi A. and Sharadi P.P.** (1991) *Proline accumulation under heavy metal stress*. J Plant Physiol. 138, 554-558.
- Sharma S.S.**, Schat H., Vooiks R. (1998) *In vitro alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline*. Phytochemistry 49, 1531.
- Sharma S. and Verslues P.E.** (2010) *Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery*. Plant, Cell & Environment 33, 1838–1851.
- Sharma S.**, Villamor J.G. and Verslues P.E. (2011) *Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential*. Plant Physiology 157, 292–304.
- Sharp R.E.**, Wu Y., Voetberg G.S., Saab I.N. and LeNoble M.E. (1994) *Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials*. Journal of Experimental Botany 45, 1743–1751.
- Sheng M.**, Tang M., Chen H., Yang B.W., Zhang F.F. and Huang Y.H. (2008) *Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress*. Mycorrhiza 18, 287-296.
- Shen Y.**, Wang X., Wu F., Du S., Cao Z., Shang Y., et al. (2006) *The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor*. Nature 443, 823–826.
- Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K.** (1997) *Gene expression and signal transduction in water-stress response*. Plant Physiology 115, 327–334.
- Shinozaki K.**, Yamaguchi-Shinozaki K., Mizoguchi T., Urao T., Katagiri T., et al. (1998) *Molecular responses to water stress in Arabidopsis thaliana*. J. Plant Res. 111, 345–351.
- Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K.** (2000) *Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways*. Current Opinion in Plant Biology 3, 217–223.
- Siciliano V.**, Genre A., Balestrini R., Dewit P.J. and Bonfante P. (2007) *Pre-penetration apparatus formation during AM infection is associated with a specific transcriptome response in epidermal cells*. Plant Signaling and Behavior 2, 533–535.
- Sidel V.W. and Solomon A.K.** (1957) *Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient*. J. gen. Physiol. 41, 243-257.
- Siefritz F.**, Biela A., Eckert M., Otto B., Uehlein N. and Kaldenhoff R. (2001) *The tobacco plasma membrane aquaporin NtAQPI*. J. Exp. Bot. 52, 1953–1957.
- Siemens J.A. and Zwiazek J.J.** (2003) *Effects of water deficit stress and recovery on the root water relations of trembling aspen (Populus tremuloides) seedlings*. Plant Science 165, 113–120.
- Six J.**, Elliott E.T. and Paustian K. (2000) *Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no tillage agriculture*. Soil Biol. Biochem. 32, 2099–2103.
- Skriver K. and Mundy J.** (1990) *Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress*. Plant Cell 2, 503-512.
- Slatyer R.O.** (1967) *Plant-water relationships*. New York Academic Press Inc., 274-282.
- Smart L.B.**, Moskai W.A., Cameron K.D. and Bennet A.B. (2001) *MIP genes are down-regulated under drought stress in Nicotiana glauca*. Plant and Cell Physiology 42, 686–693.
- Smirnoff N. and Cumbes Q.J.** (1989) *Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes*. Phytochemistry 28, 1057–1060.
- Smirnoff N.** (1998) *Plant resistance to environmental stress*. Current Opinion in Biotechnology 9, 214–219.
- Smith C.A. and Wood E.J.** (1991) *Lipids*. Eds. Biological molecules. London, UK: Chapman and Hall, 147–153.



- Smith F.A.**, Grace E.J. and Smith S.E. (2009) *More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses*. *New Phytologist* 182, 347–358.
- Smith I.K.** (1985) *Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors*. *Plant Physiol.* 79, 1044–1047.
- Smith S.E.**, Facelli E., Pope S. and Smith F.A. (2010) *Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas*. *Plant Soil* 326, 3–20.
- Smith S.E. and Read D.J.** (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, San Diego.
- Smith S.E. and Read D.J.** (2008) *Mycorrhizal symbiosis*, 3 rd ed. Academic Press, New York.
- Smith S.E.**, Smith F.A. and Jakobsen I. (2004) *Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake*. *New Phytologist* 162, 511–524.
- Smith S.E.**, Smith F.A. and Jakobsen I. (2003) *Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses*. *Plant Physiology* 133, 16–20.
- Smith S.E. and Smith F.A.** (2011) *Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales*. *Annual Review of Plant Biology* 62, 227–250.
- Solla A. and Gil L.**, (2002) *Influence of water stress on Dutch elm disease symptoms in *Ulmus minor**. *Can. J. Bot.* 80, 810–817.
- Solomon A.K.** (1968) *Characterization of biological membranes by equivalent pores*. *J. Gen. Physiol.* 51, 335–364.
- Sonmez O.**, Aydemir S. and Kaya C. (2009) *Mitigation effects of mycorrhiza on boron toxicity in wheat (*Triticum durum*) plants*. *N. Z. J. Crop Horti. Sci.* 37, 99–104.
- Sousa-Lopes A.**, Antunes F., Cyrne L. and Marinho H.S. (2004) *Decreased cellular permeability to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> protects *Saccharomyces cerevisiae* in stationary phase against oxidative stress*. *FEBS Lett.* 578, 152–156.
- Sreenivasulu N.**, Altschmied L., Panitz R., Hahnel U., Michalek W., et al. (2002) *Identification of genes specifically expressed in maternal and filial tissues of barley caryopses: a cDNA array analysis*. *Molecular Genetics and Genomics* 266, 758–767.
- Stedule E. and Peterson C.A.** (1998) *How does water get through roots?* *Journal of Experimental Botany* 49, 332, 775–788.
- Stedule E.** (2001). *The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots*. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 847–875.
- Stedule E.** (1994) *Water transport across roots*. *Plant and Soil* 167, 1, 79–90.
- Stedule E.** (2000) *Water uptake by plant roots: an integration of views*. *Plant and Soil* 226, 45–56.
- Stewart C.R.** (1971) *Effect of wilting on carbohydrates during incubation of excised bean leaves in the dark*. *Plant Physiol.* 48, 792–794.
- Strack D. and Fester T.** (2006) *Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots*. *New Phytologist* 172, 22–34.
- Subramanian K.S. and Charest C.** (1999) *Acquisition of N by external hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus and its impact on physiological responses in maize under drought-stressed and well-watered conditions*. *Mycorrhiza* 9, 69–75.
- Subramanian K.S. and Charest C.** (1998) *Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery*. *Physiol. Plant.* 102, 285–296.
- Subramanian K.S.**, Charest C., Dwyer L.M. and Hamilton R.I. (1995) *Arbuscular mycorrhizas and water relations in maize under drought stress at tasselling*. *New Phytol.* 129, 643–650.
- Subramanian K.S.**, Charest C., Dwyer L.M. and Hamilton R.I. (1997) *Effects of arbuscular mycorrhizae on leaf water potential, sugar content, and P content during drought and recovery of maize*. *Can. J. Bot.* 75, 1582–1591.
- Subramanian K.S. and Charest C.** (1995) *Influence of arbuscular mycorrhizae on the metabolism of maize under drought stress*. *Mycorrhiza* 5, 273–278.

- Subramanian K.S. and Charest C.** (1997) *Nutritional, growth, and reproductive responses of maize (*Zea mays* L.) to arbuscular mycorrhizal inoculation during and after drought stress at tasselling.* Mycorrhiza 7, 25–32.
- Suga S., Komatsu S. and Maeshima M.** (2002) *Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings.* Plant and Cell Physiology 43, 1229–1237.
- Sui H., Han B., Lee J., Walian P. and Jap B.** (2001) *Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel.* Nature 414, 872–878.
- Szabados L. and Savoure A.** (2009) *Proline: a multifunctional amino acid.* Trends in Plant Science 15, 89–97.
- Taiz L. and Zeiger E.** (2006) *Fisiología Vegetal.* Publicacions de la Universitat Jaume I.D.L., Catelló de la Plana.
- Tajkhorshid E., Nollert P., Jensen M., Miercke L., O'Connell J., et al.** (2002) *Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning.* Science 296, 525–530.
- Takahashi E. and Hino K.** (1978) *Silica uptake by plant with special reference to the forms of dissolved silica.* J. Soil Sci. Manure Jpn. 49, 357–360.
- Takano J., Wada M., Ludewig U., Schaaf G., vonWirén N. and Fujiwara T.** (2006) *The Arabidopsis Major Intrinsic Protein NIP5;1 Is Essential for Efficient Boron Uptake and Plant Development under Boron Limitation.* The Plant Cell 18, 1498–1509.
- Takeda N., Sato S., Asamizu E., Tabata S. and Parniske M.** (2009) *Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in Lotus japonicus.* Plant Journal 58, 766–777.
- Talaat N.B. and Shawky B.T.** (2011) *Influence of arbuscularmycorrhizae on yield, nutrients, organic solutes, and antioxidant enzymes of two wheat cultivars under salt stress.* Journal of Plant Nutrition and Soil Science 174, 283–291.
- Tallberg P., Koski-Vahala J. and Hartikainen H.** (2002) *Germanium-68 as a tracer for silicon fluxes in freshwater sediment.* Water Res. 36, 956–962.
- Tanaka M., Wallace I.S., Takano J., Roberts D.M. and Fujiwara T.** (2008) *NIP6;1 Is a Boric Acid Channel for Preferential Transport of Boron to Growing Shoot Tissues in Arabidopsis.* The Plant Cell 20, 2860–2875.
- Tanaka Y. and Yano K.** (2005) *Nitrogen delivery to maize via mycorrhizal hyphae depends on the form of N supplied.* Plant Cell Environ. 28, 1247–1254.
- Tang W., Peng X., Newton R.J.** (2005) *Enhanced tolerance to salt stress in transgenic loblolly pine simultaneously expressing two genes encoding mannitol-1-phosphate dehydrogenase and glucitol-6-phosphate dehydrogenase.* Plant Physiol. Biochem. 43, 139–146.
- Thompson A.J., Andrews J., Mullholland B.J. et al.** (2007) *Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion.* Plant Physiology 143, 1905–1917.
- Thompson D.S., Wilkinson S., Bacon M.A. and William J.D.** (1997) *Multiple signals and mechanisms that regulate leaf growth and stomatal behavior during water deficit.* Physiol. Plant. 100, 303–313.
- Tian C., Kasiborski B., Koul R., Lammers P.J., Bucking H. and Shachar-Hill Y.** (2010) *Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: gene characterization and the coordination of expression with nitrogen flux.* Plant Physiology 153, 1175–1187.
- Timpa J.D., Burke J.B., Quisenberry J.E. and Wendt C.W.** (1986) *Effects of water stress on the organic acid and carbohydrate compositions of cotton plants.* Plant Physiol. 82, 724–728.
- Tisserant E., Kohler A., Dozolme-Seddas P., Balestrini R., Benabdellah K., et al.** (2012) *The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont.* New Phytologist 193, 755–769.
- Törnroth-Horsefield S., Wang Y., Hedfalk K., Johanson U., Karlsson M., et al.** (2006) *Structural mechanism of plant aquaporin gating.* Nature 439, 688–94.
- Tournaire-Roux C., Sutka M., Javot H., Gout E., Gerbeau P., et al.** (2003) *Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins.* Nature 425, 393–397.

- Toussaint J.P.**, St-Arnaud M. and Charest C. (2004) *Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith and Ri T-DNA roots of *Daucus carota* L. in an in vitro compartmented system.* Can. J. Microbiol. 50, 251–260.
- Towbin H.**, Staehelin T. and Gordon J. (1979) *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 4350–4354.
- Trappe J.M.** (1986) *Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in angiosperms from an evolutionary stand point.* Ed. by Safir GR. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 5-25.
- Trejo C.L. and Davies W.J.** (1991) *Drought-induced closure of *Phaseolus vulgaris* L. stomata precedes leaf water deficit and any increase in xylem ABA concentration.* J. Exp. Bot. 42, 1507–1516.
- Tyerman S.D.**, Niemietz C.M. and Bramley H. (2002) *Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles.* Plant, Cell and Environment 25, 173–194.
- Tyree M.T. and Jarvis P.G.** (1982) *Water in tissues and cells.* Physiological plant ecology II, 35–77.
- Tyree M.T.**, Patiño S., Bennink J. and Alexander J. (1995) *Dynamic measurements of roots hydraulic conductance using a high-pressure flow meter in the laboratory and field.* Journal of Experimental Botany 46, 83–94.
- Uehlein N.**, Fileschi K., Eckert M., Bienert G., Bertl A. and Kaldenhoff R. (2007) *Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression.* Phytochemistry 68, 122–129.
- Uehlein N.**, Lovisoló C., Siefert F. & Kaldenhoff R. (2003) *The tobacco aquaporin *NtAQP1* is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions.* Letters to Nature 425, 734-736.
- Uehlein N.**, Otto B., Hanson D.T., Fischer M., McDowell N. and Kaldenhoff R. (2008) *Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO<sub>2</sub> permeability.* Plant Cell. 20, 648–657.
- Uematsu M. and Franck E.U.** (1980) *Static dielectric constant of water and steam.* J. Phys. Chem. 9, 4.
- Valladares F. and Pugnaire F.I.** (1999) *Tradeoffs between irradiance capture and avoidance in semiarid environments simulated with a crown architecture model.* Annals of Botany 83, 459-470.
- Valladares F.**, Vilagrosa A., Peñuelas J., Ogaya R., Julio J., et al. (2004) *Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía.* Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S.A., pp. 163-190.
- Valot B.**, Dieu M., Recorbet G., Raes M., Gianinazzi S. and Dumas-Gaudot E. (2005) *Identification of membrane-associated proteins regulated by the arbuscular mycorrhizal symbiosis.* Plant Mol. Biol. 59, 565–580.
- Vandeleur R.K.**, Mayo G., Sheldon M.C., Gilliam M., Kaiser B.N. and Tyerman S.D. (2009) *The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine.* Plant Physiology 149, 445–460.
- Vandeleur R.K.**, Sullivan W., Athman A., Jordans C., Gilliam M., et al. (2014) *Rapid shoot-to-root signalling regulates root hydraulic conductance via aquaporins.* Plant Cell. Environ. 37, 520-538.
- Van den Honert T.H.** (1948) *Water transport as a catenary process.* Faraday Discussion Chem. Soc. 3, 146.
- Vandenkoornhuysen P.**, Ridgway K.P., Watson I.J., Fitter A.H. and Young J.P.W. (2003) *Coexisting grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities.* Mol. Ecol. 12, 3085–3095.
- Van der Heijden M.G.A.**, Klironomos J.N., Ursic M., Moutoglou P., Streitwolf-Engel R., Boller et al. (1998) *Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity.* Nature 396, 69–72.

- Van Heerden P.D.R. and Kruger G.H.J.** (2002) *Separately and simultaneously induced dark chilling and drought stress effects on photosynthesis, proline accumulation and antioxidant metabolism in soybean*. J. Plant Physiol. 159, 1077-1086.
- Varma A.** (2008) *Mycorrhiza. State of the art, genetics and molecular biology, eco-funcion, biotecnology, eco-physiology, structure and systematics*. Third Edition. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Vendruscolo E.C.G., Schuster I., Pileggi M., Scapim C.A., Molinari H.B.C., et al.** (2007) *Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat*. J. Plant Physiol. 164, 1367-1376.
- Vera-Estrella R., Barkla B.J., Bohnert H.J. and Pantoja O.** (2004) *Novel regulation of aquaporins during osmotic stress*. Plant Physiol. 135, 2318-2329.
- Veresoglou S.D. and Rillig M.C.** (2012) *Suppression of fungal and nematode plant pathogens through arbuscular mycorrhizal fungi*. Biol. Lett. 8, 214-217.
- Verslues P.E. and Sharp R.E.** (1999) *Proline accumulation in maize (Zea mays L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone*. Plant Physiol. 119, 1349-1360.
- Vilagrosa A., Bellot J., Vallejo V.R. and Gil-Pelegrin E.** (2003) *Cavitation, stomatal conductance, and leaf dieback in seedlings of two co-occurring Mediterranean shrubs during an intense drought*. Journal of Experimental Botany 54, 2015-2024.
- Vilagrosa A., Chirino E., Peguero-Pina J.J., Barigah T.S., Cochard H. and Gil-Pelegrín E.** (2012) *Xylem Cavitation and Embolism in Plants Living in Water-Limited Ecosystems*. Ed. by Aroca R. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp: 63-109.
- Voicu M.C., Cooke J.E.K. and Zwiazek J.J.** (2009) *Aquaporin gene expression and apoplastic water flow in bur oak (Quercus macrocarpa) leaves in relation to the light response of leaf hydraulic conductance*. Journal of Experimental Botany 60, 4063-4075.
- Voicu M.C. and Zwiazek J.J.** (2004) *Cycloheximide inhibits root water flow and stomatal conductance in aspen (Populus tremuloides) seedlings*. Plant Cell. Environ. 27, 199-208.
- Walker S.A., Viprey V. and Downie A.** (2000) *Dissection of nodulation signalling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 21, 13413-13418.
- Walker-Simmons M.** (1987) *ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars*. Plant Physiol. 84, 61-66.
- Wallace I.S., Choi W.G. and Roberts D.M.** (2006) *The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins*. Biochim. Biophys. Acta. 1758, 1165-1175.
- Wallace I.S. and Roberts D.M.** (2004) *Homology modeling of representative subfamilies of Arabidopsis major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter*. Plant Physiol. 135, 1059-1068.
- Wallace I.S., Wills D.M., Guenther J.F. and Roberts D.M.** (2002) *Functional selectivity for glycerol of the nodulin 26 subfamily of plant membrane intrinsic proteins*. FEBS Letters 523, 109-112.
- Wallace S., Choi W-G. and Roberts D.M.** (2006) *The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins*. Biochimica et Biophysica Acta. 1758, 1165-1175.
- Wallace S. and Roberts D.M.** (2005) *Distinct Transport Selectivity of Two Structural Subclasses of the Nodulin-like Intrinsic Protein Family of Plant Aquaglyceroporin Channels*. Biochemistry 44, 16826-16834.
- Walter M.H., Floss D.S., Hans J., Fester T. and Strack D.** (2007) *Apocarotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots: contributions from methylerythritol phosphate pathway isogenes and tools for its manipulation*. Phytochemistry 68, 130-138.
- Walter M.H., Floss D.S. and Strack D.** (2010) *Apocarotenoids: hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles*. Planta 232, 1-17.
- Wang B. and Qiu Y.L.** (2006) *Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants*. Mycorrhiza 16, 299-363.



- Wang W.-H.**, Köhler B., Cao F.-Q., Liu L.-H. (2008) *Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants*. *Plant Science* 175, 467–477.
- Wang W.X.**, Vinocur B., Shoseyov O. and Altman A. (2001) *Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations*. *Acta Hort.* 560, 285–292.
- Wang Y.**, Schulten K. and Tajkhorshid E. (2005) What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. *Structure* 13, 1107–1118.
- Wang Y.**, Suo H., Zheng Y., Liu K., Zhuang C., Kahle K.T., Ma H. and Yan X. (2010) *The soybean root-specific protein kinase GmWNK1 regulates stress-responsive ABA signaling on the root system architecture*. *Plant J.* 64, 230–242.
- Wan X.C. and Zwiazek J.J.** (1999) *Mercuric chloride effects on root water transport in Aspen seedlings*. *Plant Physiol.* 121, 939–946.
- Wan X.**, Steudle E. and Hartung W. (2004) *Gating of water channels (aquaporins) in cortical cells of young corn roots by mechanical stimuli (pressure pulses): effects of ABA and HgCl<sub>2</sub>*. *J. Exp. Bot.* 55, 411–422.
- Watson C.J.**, Miller H., Poland P., Kilpatrick D.J., Allen M.B.D., Garret M.K. and Christianson C.B. (1994) *Soil properties and the ability of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (nBTPT) to reduce ammonia volatilization from surface-applied urea*. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1165–1171.
- Weatherley P.E.** (1982) *Water uptake and flow into roots*. Ed. by Lange O L, Nobel P S, Osmond C B, Ziegler H. Springer-Verlag, Berlin. pp. 79–109.
- Weig A.R. and Jakob C.** (2000) *Functional identification of the glycerol permease activity of Arabidopsis thaliana NLM1 and NLM2 proteins by heterologous expression in Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 481, 293–298.
- Weiss D. and Ori N.** (2007) *Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones*. *Plant Physiology* 144, 1240–1246.
- Wei Y.**, Shen W., Dauk M., Wang F., Selvaraj G. and Zou J. (2004) *Targeted gene disruption of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in Colletotrichum gloeosporioides reveals evidence that glycerol is a significant transferred nutrient from host plant to fungal pathogen*. *J. Biol. Chem.* 279, 429–435.
- Wilkinson S. and Davies W.J.** (2002) *ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants*. *Plant Cell. Environ.* 25, 195–210.
- Wilkinson S.** (1999) *pH as a stress signal*. *Plant Growth Regul.* 29, 87–99.
- Wilson M.R. and Walker N.A.** (1988) *The transport and metabolism of urea in Chara australis: I. Passive diffusion, specific transport and metabolism of urea, thiourea and methylurea*. *Journal of Experimental Botany* 39, 739–751.
- Wolfe B.E.**, Husband B.C. and Klironomos J.N. (2005) *Effects of a belowground mutualism on an aboveground mutualism*. *Ecology Letters* 8, 218–223.
- Wright S.F.**, Upadhyaya A. and Buyer J.S. (1998) *Comparison of N-linked oligosaccharides of glomalalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soils by capillary electrophoresis*. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1853–1857.
- Xiong L.**, Schumaker K.S. and Zhu J.K. (2002) *Cell signaling during cold, drought, and salt stress*. *Plant Cell* 14, 165–183.
- Xu X.Y.**, McGrath S.P. and Zhao F.J. (2007) *Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots*. *New Phytol.* 176, 590–599.
- Yamada S.**, Komori T., Myers P.N., Kuwata S., Kubo T. and Imaseki H. (1997) *Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiol.* 38, 1226–1231.
- Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K.** (2005) *Organization of cis- acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters*. *Trends Plant Sci.* 10, 88–94.
- Yancey P.H.** (1984) *Compatible and counteracting solutes*. Ed. by S.K. Strange, CRC Press, Boca Raton FL. pp. 88.
- Yang C.-J.**, Zhang C., Lu Y.-N., Jin J.-Q. and Wang X.-L. (2011) *The Mechanisms of Brassinosteroids' Action: From Signal Transduction to Plant Development*. *Molecular Plant* doi: 10.1093/mp/ssr020

- Yang S.-Y.**, Grønlund M., Jakobsen I., Grotemeyer M.S., Rentsch D., et al. (2012) *Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the PHOSPHATE TRANSPORTER1 gene family*. *Plant Cell*. 24, 4236–51.
- Ye Q. and Steudle E.** (2006) *Oxidative gating of water channels (aquaporins) in corn roots*. *Plant Cell Environ.* 29, 459–470.
- Yoshida S.** (1965) *Chemical aspects of the role of silicon in physiology of the rice plant*. *Bull. Natl Inst. Agric. Sci. B.* 15, 1–58.
- Yoshihara Y.**, Kiyosue T., Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1997) *Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress*. *Plant, Cell & Physiology* 38, 1095–1102.
- Zardoya R.**, Ding X., Kitagawa Y. and Chrispeels M.J. (2002) *Origin of plant glycerol transporters by horizontal gene transfer and functional recruitment*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 14893–14896.
- Zeevaart J.A.D.** (1980) *Changes in the levels of abscisic acid and its metabolites in excised leaf blades of Xanthium strumarium during and after water stress*. *Plant Physiol.* 66, 672–678.
- Zeidel M.L.**, Ambudkar S.V., Smith B.L. and Agre P. (1992) *Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein*. *Biochemistry* 31, 7436–7440.
- Zelazny E.**, Borst J.W., Muylaert M., Batoko H., Hemminga M.A. and Chaumont F. (2007) *FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localisation*. *PNAS*. 104, 30, 12359–12364.
- Zhang J.**, Jia W., Yang J. and Ismail A.M. (2006) *Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses*. *Field Crops Research* 97, 111–119.
- Zhang Q.**, Blaylock L.A. and Harrison M.J. (2010) *Two Medicago truncatula half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis*. *Plant Cell* 22, 1483–1497.
- Zhang R. and Verkman A.S.** (1991) *Water and urea permeability properties of Xenopus oocytes: expression of mRNA from toad urinary bladder*. *Am. J. Physiol.* 260, 26–34.
- Zhang S.B.** (2010) *Temperature acclimation of photosynthesis in Meconopsis horridula var. racemosa Prain*. *Chinese Source* 51, 457–464.
- Zhu C.**, Schraut D., Hartung W. and Schäffner A.R. (2005) *Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA*. *Journal of Experimental Botany* 56, 2971–2981.
- Zhu G.L. and Steudle E.** (1991) *Water transport across maize roots*. *Plant Physiol.* 95, 305–315.
- Zimmermann H.M. and Steudle E.** (1998) *Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis*. *Planta* 206, 7–19.