



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LA PLANTA HALÓFITA *Salicornia neei*
PARA SU USO EN SISTEMAS INTEGRADOS DE ACUICULTURA MARINA EN
TIERRA**

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Mónica Rocío de las Mercedes Díaz Silva

Director de tesis: Dr. José Andrés Gallardo Matus

Co-director: Dr. Herman Silva

2021

COMISIÓN EVALUADORA INTEGRADA POR

Dr. Michael Seeger Pfeiffer _____

Dra. Vitalia Henríquez Quesada _____

Dr. Pablo Conejeros Abraham _____

DIRECTOR DBT Dr. Michael Seeger Pfeiffer _____

DEDICATORIA

A mi hijo Christopher, un guerrero

RESUMEN

Lograr sistemas de recirculación para la acuicultura en tierra ambientalmente sostenibles, es posible mediante la implementación de estrategias dirigidas al manejo responsable de los desechos contaminantes. En el caso del manejo de los efluentes, la integración de humedales artificiales plantados con halófitas capaces de crecer en altas concentraciones de salinidad, se ha convertido en una alternativa factible para el tratamiento de las aguas residuales. *Salicornia neei* es una planta halófita de amplia distribución en Sudamérica que ha sido propuesta como biofiltro de aguas provenientes de la acuicultura, debido a su importante valor económico y amplia distribución. Si bien existen estudios realizados en plantas halófitas similares, aún no se conoce si *S. neei* tiene el potencial necesario para adaptarse con éxito a los sistemas integrados de acuicultura marina en Chile. Por tanto, surgió el interrogante de si *S. neei*, tiene el potencial necesario para adaptarse con éxito a los sistemas integrados de acuicultura marina.

La **hipótesis de investigación** que se sometió a prueba es: *Salicornia neei* tiene la capacidad de producir biomasa, remover N y activar la maquinaria molecular de tolerancia a salinidad y nitrógeno en respuesta a efluentes similares a los de la acuicultura marina en tierra. El **objetivo general** de esta tesis fue evaluar el potencial biotecnológico de la planta halófita *S. neei* para su uso en sistemas integrados de acuicultura marina. Para alcanzar este objetivo general se propusieron los siguientes **objetivos específicos**: 1) Caracterizar la producción de biomasa de la planta halófita *Salicornia neei* en concentraciones de salinidad de 35 g L^{-1} en combinación con 1 mg L^{-1} NAT + 100 mg L^{-1} de NO_3 (Nit + Amm) y 100 mg L^{-1} $\text{NO}_3 \text{ mg L}^{-1}$ (Nit). 2) Caracterizar la capacidad de la planta halófita *Salicornia neei* para remover nitrógeno de concentraciones de salinidad de 35 g L^{-1} en combinación con 100 mg L^{-1} $\text{NO}_3 \text{ mg L}^{-1}$ y 1 mg L^{-1} NAT + 100 mg L^{-1} de NO_3 . 3) Identificar señales de transducción de *Salicornia neei*, en respuesta a concentraciones de salinidad de 35 g L^{-1} en combinación con 3mM de NH_4Cl .

Para desarrollar estos objetivos se colectaron plantas silvestres en las Salinas de Puyalli (Valparaíso), las cuales fueron procesadas para producir plántulas debidamente aclimatadas para utilizarlas posteriormente en los ensayos. 36 plántulas se cultivaron durante 74 días en humedales bajo tres tratamientos de agua de mar fertilizada con: (1) Nit + Amm, (2) Nit, o (3)

sin fertilizante (Control). Se encontró una alta tasa de remoción de nitrógeno (Nit + Amm = $89,6\% \pm 1,0\%$; Nit $88,8\% \pm 0,9\%$) y una producción significativa de biomasa (Nit + Amm = $11,3 \pm 2,0 \text{ kg m}^{-2}$; Nit = $10,0 \pm 0,8 \text{ kg m}^{-2}$; Control = $4,6 \pm 0,6 \text{ kg m}^{-2}$). Para identificar los mecanismos moleculares relacionados con la respuesta al amonio, se utilizaron 24 plántulas divididas en 2 tratamientos de acuaponía que contenían 0 y 3 mM de NH₄Cl. El análisis bioinformático arrojó un total de 45327 genes anotados (51,2%). De estos, 9140 genes se expresaron diferencialmente en respuesta al amonio en agua salina. Un conjunto de 72 genes participaron directamente en el metabolismo del amonio, incluida GLN1, GS1 y Fd-GOGAT. Nuestros resultados demuestran que *S. neei* se puede utilizar eficientemente para el tratamiento de aguas residuales en la acuicultura salina en América del Sur, obteniendo aguas filtradas y abundante biomasa. Además, el sistema de desintoxicación de amonio mediado por glutamina y glutamato sintasa activado presencia amonio y agua salina, demuestra la capacidad de la planta para tolerar estrés. Finalmente, este perfil del transcriptoma actual podría ser útil para investigar la respuesta de las plantas halófitas a las aguas residuales salinas de la acuicultura terrestre.

AGRADECIMIENTOS

Durante estos años tuve la oportunidad de conocer valiosas personas que de una u otra manera hoy son la razón para concluir esta tesis. A todos ellos quiero expresarles mi más sincera gratitud.

A mí amada familia colombiana: mis padres Fanny y Alfredo, quienes siempre me enseñaron el valor de la lucha y perseverancia y a mis hermanos Carmen, Carolina, Martha y Ramón que creyeron en mí. A mi amor Álvaro y a mi hijito Christopher que son mis motores y me impulsan a buscar un mejor futuro. A mi familia chilena que me acogieron como parte de ellos.

Agradezco a mi profesor José Gallardo, que confió en mí y me apoyó para alcanzar este sueño, y que con su experiencia académica orientó este trabajo doctoral. Agradezco también a todos los investigadores y tesistas del laboratorio de genética y genómica aplicada LGA que contribuyeron en términos técnicos a la elaboración de esta tesis. A Carolina, Pamela, Javier y Paola.

Al profesor Herman Silva (co -director) y Jonatan Maldonado del Laboratorio de Genómica Funcional y Bioinformática de la Universidad de Chile, que han aportado sus valiosos conocimientos en el desarrollo esta tesis.

A la Universidad Federico Santa María por la beca de sostenimiento.

A los compañeros del doctorado 2014, grandes personas.

A Dios que me sostiene en su mano y me permite alcanzar mis metas.

ÍNDICE DE GENERAL

| | Contenido |
|--|-----------|
| DEDICATORIA | iii |
| RESUMEN | iv |
| AGRADECIMIENTOS | vi |
| ÍNDICE DE GENERAL | 7 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 10 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 11 |
| CAPÍTULO 1 | 13 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 13 |
| CAPÍTULO 2 | 14 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 2.1. Sistemas de recirculación para acuicultura: caracterización, impacto de los efluentes y normativa14 | |
| 2.1.1. Caracterización de los efluentes | 14 |
| 2.1.2. Impacto de los efluentes contaminados en los organismos acuáticos | 16 |
| 2.1.3. Normativa de descarga de efluentes | 16 |
| 2.2. Halófitas: <i>Salicornia neei</i> y humedales artificiales | 18 |
| 2.3. Recursos genéticos: salinidad y asimilación de nitrógeno en plantas halófitas | 20 |
| 2.3.1. Nutrición basada en amonio | 23 |
| 2.3.2. Nutrición basada en nitrato | 25 |
| 2.3.3. Señalización y respuesta a salinidad en plantas halófitas | 27 |
| 2.4. Estrategias adaptativas de plantas bajo estrés inducido por amonio | 31 |
| 2.4.1. Respuesta de la pared celular bajo estrés inducido por nutrición con amonio | 31 |
| 2.4.2. Respuesta vacuolar y de otros orgánulos subcelulares en altas concentraciones de amonio citosólico..... | 32 |
| 2.5. Bioinformática -transcriptómica y análisis de rna-seq..... | 32 |
| CAPÍTULO 3 | 35 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 35 |
| 3.1. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 36 |
| CAPÍTULO 4 | 37 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 37 |
| 4.1. Materiales y métodos objetivos 1 y 2..... | 37 |
| 4.1.1. Colección de material vegetal y aclimatación | 37 |
| 4.1.2. Diseño de los sistemas | 37 |
| 4.1.3. Funcionamiento de los sistemas | 39 |
| 4.1.4. Medición de parámetros fisicoquímicos en el efluente | 40 |
| 4.1.5. Cálculo de la biomasa formada..... | 40 |
| 4.1.6. Medición de nitrato disuelto en el efluente | 40 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| 4.1.7. | Análisis estadístico..... | 41 |
| 4.2. | Materiales y métodos objetivo 3 | 42 |
| 4.2.1. | Material vegetal..... | 42 |
| 4.2.2. | Instalación de experimento y biocinética de eliminación de amonio- Michaelis-Menten (M-M)43 | |
| 4.2.3. | Instalación de experimento, extracción de ARN y preparación de librerías..... | 45 |
| 4.2.4. | Procesamiento bioinformático de las secuenciaciones..... | 47 |
| 4.2.5. | Resumen de etapas de trabajo | 50 |
| CAPÍTULO 5..... | | 51 |
| 5. | RESULTADOS..... | 51 |
| 5.1. | Resultados objetivos 1 y 2 | 51 |
| 5.1.1. | Condiciones ambientales del sistema y del efluente | 51 |
| 5.1.2. | Crecimiento y formación de biomasa | 52 |
| 5.1.3. | Eficiencia de <i>Salicornia neei</i> en el tratamiento de efluentes salinos ricos en nitrógeno | 53 |
| 5.2. | Resultados objetivo 3..... | 55 |
| 5.2.1. | Cinética de remoción de amonio..... | 55 |
| 5.2.2. | Secuenciación y ensamble de novo..... | 56 |
| 5.2.3. | Visión general de la anotación de genes | 57 |
| 5.2.4. | Genes expresados diferencialmente..... | 58 |
| 5.2.5. | Asignación de terminología GO a genes | 61 |
| 5.2.6. | Ontología génica (GO) de genes expresados diferencialmente | 63 |
| 5.2.7. | Ánalisis de enriquecimiento de genes expresados diferencialmente..... | 65 |
| 5.2.8. | Anotación funcional de rutas metabólicas en KEGG | 68 |
| CAPÍTULO 6..... | | 71 |
| 6. | DISCUSIÓN | 71 |
| 6.1. | Discusión de objetivos 1 y 2 | 71 |
| 6.2. | Discusión objetivo 3 | 76 |
| CAPITULO 7 | | 83 |
| 7. | CONCLUSIONES | 83 |
| CAPÍTULO 8 | | 84 |
| 8. | RECOMENDACIONES | 84 |
| ABREVIATURAS | | 85 |
| REFERENCIAS | | 90 |
| APÉNDICES | | 104 |
| Apéndice 1 | | 104 |
| Apéndice 2 | | 105 |
| Apéndice 3 | | 106 |

| | |
|-------------------|-----|
| Apéndice 4 | 107 |
| Apéndice 5 | 108 |
| Apéndice 6 | 109 |
| Apéndice 7 | 110 |
| Apéndice 8 | 113 |
| Apéndice 9 | 118 |
| Apéndice 10 | 119 |
| Apéndice 11 | 122 |
| Apéndice 12 | 126 |
| Apéndice 13 | 128 |
| Apéndice 14 | 130 |
| Apéndice 15 | 131 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|------|
| Tabla 2.1 Remoción de NI en diferentes rangos de salinidad..... | 222 |
| Tabla 2.2 Principales genes encontrados en plantas involucrados en la respuesta a salinidad | 287 |
| Tabla 2.3 Principales genes reguladores de respuesta a estrés oxidativo en plantas | 309 |
| Tabla 5.1 Parámetros fisicoquímicos medidos en el efluente de cada tratamiento..... | 5150 |
| Tabla 5.2 Concentración de nitrato-nitrógeno ($\text{NO}_3^- \text{N}$) en el agua afluente..... | 564 |
| Tabla 5.3 Resumen de RNA-Seq. | 566 |
| Tabla 5.4 Resumen de la construcción de transcritos..... | 576 |
| Tabla 5.5 Top diez DEG implicados en la homeostasis del amonio y el metabolismo de las poliaminas en <i>Salicornia neei</i> | 598 |
| Tabla 5.6 Top cinco de DEG relacionados con la respuesta hormonal ABA y ET en <i>Salicornia neei</i> | 60 |
| Tabla 5.7. Top diez de rutas con mayor número de transcritos asociados..... | 698 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 2.1 Representación esquemática de un sistema de recirculación de acuicultura (Adaptado de Zhong et al.) ³⁰ | 17 |
| Figura 2.2 Asimilación de amonio | 25 |
| Figura 2.3 Esquema de la asimilación de nutrientes nitrogenados en plantas (Nitrato)..... | 27 |
| Figura 2.4 Detección de NaCl y aumento de calcio citosólico..... | 29 |
| Figura 2.5 Cascada de señalización durante el estrés por salinidad | 29 |
| Figura 4.1 Diseño de humedales artificiales | 387 |
| Figura 4.2 Instalación de lisímetro | 398 |
| Figura 4.3 Diagrama de flujo | 443 |
| Figura 4.4 Diagrama de flujo | 476 |
| Figura 4.5 Diagrama de flujo | 509 |
| Figura 5.1 Producción de biomasa de <i>Salicornia neei</i> por tratamiento | 521 |
| Figura 5.2 Imagen de dos humedales artificiales plantados con <i>Salicornia neei</i> al final del experimento (día 74) | 532 |
| Figura 5.3 Eliminación de nitrógeno por cada tratamiento | 53 |
| Figura 5.4 Biocinética de consumo de amonio | 565 |
| Figura 5.5 Diagrama de Venn de anotación de secuencias de <i>S. neei</i> | 587 |
| Figura 5.6 Posible modelo de biosíntesis de poliaminas y metabolismo del amonio <i>Salicornia neei</i> | 609 |
| Figura 5.7 Histograma de la clasificación de ontología génica (GO)..... | 632 |
| Figura 5.8 Histograma de clasificación de ontología génica de los genes con expresión diferencial de <i>S. neei</i> | 64 |
| Figura 5.9 Procesos biológicos enriquecidos en el tratamiento de 3-mM-NH ₄ Cl | 66 |
| Figura 5.10 Componentes celulares enriquecidos en tratamiento 3-mM-NH ₄ Cl | 67 |
| Figura 5.11 Funciones moleculares enriquecidos en tratamiento 3-mM-NH ₄ Cl | 67 |
| Figura 5.12 Procesos biológicos enriquecidos en el control 0-mM-NH ₄ Cl | 68 |
| Figura 5.13 Histograma de la clasificación COG | 70 |

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura proporciona casi el 50% de la producción pesquera mundial, y aumentará al 60% para 2030 debido a la creciente demanda de productos pesqueros marinos^{1, 2}. Por tanto, se espera que la instalación de sistemas de recirculación acuícola (SRA) marina en tierra impulse la producción pesquera, permitiendo satisfacer la creciente demanda bajo un enfoque ambiental sostenible^{3, 4}. Sin embargo, este tipo de producción acuícola terrestre se encuentra limitada por la dificultad para tratar eficientemente el agua residual salina rica en compuestos nitrogenados inorgánicos⁴⁻⁶. Por lo cual, la instalación de humedales artificiales (HA) plantados con halófitas se ha propuesto como solución a esta problemática. Siendo, las plantas del género *Salicornia*, caracterizadas por ser amonio y nitrógeno-extractivas, las que tienen mayor potencial para ser usadas en los humedales artificiales⁷. En este estudio se evaluó el potencial agrobiotecnológico que ofrece la planta *Salicornia neei* para ser utilizada en sistemas integrados de acuicultura marina, verificando entre otros el potencial de absorción de N de la planta, la cinética de consumo y su crecimiento en humedales salinos con una concentración simulada de amonio-N (Amm) y nitrato-N (Nit), similar a los efluentes de acuicultura marina en tierra. Esta información es importante para establecer un humedal de tratamiento exitoso. Adicional a esto, considerando las habilidades competitivas de este tipo de plantas se estudiaron las respuestas moleculares que, la mayoría de veces, coordinan procesos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos y que pueden determinar la eficiencia de eliminación de nitrógeno en los humedales artificiales. Asimismo, estas plantas halófitas recientemente se han convertido en muy buenos sistemas modelos experimentales para comprender los mecanismos moleculares de la tolerancia a condiciones de salinidad y ahora con este estudio, a condiciones altas de amonio. Para determinar la maquinaria molecular expresada en *S. neei*, se utilizaron técnicas transcriptómicas bajo un enfoque de RNA-seq y análisis bioinformático, los cuales revelaron posibles rutas moleculares que confieren especiales capacidades a las plantas halófitas, que probablemente sea la respuesta a varios interrogantes relacionados con este grupo especial de plantas. Este conocimiento posiblemente permita identificar genes candidatos para la ingeniería de tolerancia a estrés en otros cultivos convencionales y pueda explicar las ventajas competitivas que les permite a estas plantas sobrevivir en ambientes de alto estrés.

CAPÍTULO 2

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sistemas de recirculación para acuicultura: caracterización, impacto de los efluentes y normativa

Para suprir la demanda mundial por productos marinos y a la vez ofrecer una tecnología de producción acoplada a las regulaciones ambientales, se propuso la instalación de sistemas de recirculación para acuicultura (SRA), pues son una manera más sustentable de producción respecto de la acuicultura marina en el Océano^{3, 4, 8}. Los SRA son sistemas acuáticos en tierra donde el agua de cultivo es recirculada a través de filtros de tratamiento mecánico y biológico, que confiere al agua una calidad apropiada para ser utilizada nuevamente en el cultivo⁹. Además, el restablecimiento de la calidad del agua alcanzado con los filtros, sugiere únicamente una tasa de renovación de agua menor al 1% al día^{10, 11}. Con los SRA no solo se favorece el reúso de agua de cultivo, sino también la cría de diversos organismos marinos, pues es posible mantener las condiciones selectivas para cada especie cultivada¹⁰. Las principales especies criadas a nivel mundial en SRA son tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y en Chile salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y jurel (*Seriola lalandi*)¹⁰. Aunque la tecnología SRA ha sido primordial para que la producción acuícola actual se desarrolle de forma sostenible, aún persisten la preocupación por la capacidad contaminante de esta actividad, porque los nutrientes liberados a través de los efluentes pueden contribuir, junto con otras formas de contaminación puntuales o difusas, a la atrofia de los cuerpos de agua receptores^{4, 12}.

2.1.1. Caracterización de los efluentes

Los efluentes del SRA están usualmente compuestos por materia orgánica particulada y disuelta (DOM y POM, por sus siglas en inglés), sólidos totales suspendidos (TSS), nutrientes inorgánicos nitrogenados como nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$), nitrito ($\text{NO}_2\text{-N}$), amoníaco ($\text{NH}_3\text{-N}$), amonio ($\text{NH}_4\text{-N}$) y fosfatados como PO_4^3-P , además de otros compuestos orgánicos e inorgánicos específicos². En los sistemas de acuicultura marina en tierra, los efluentes se contaminan rápidamente debido a las prácticas de manejo que obligan a usar gran cantidad

de alimento para satisfacer la ración diaria del cultivo. Estudios han demostrado que para poder distribuir el alimento a todo el cultivo se debe utilizar hasta un 50 % más del alimento realmente necesario para el sostenimiento del cultivo. Causando un elevado coste económico que oscila entre el 40% y 60% del total de producción y un gran desperdicio^{7, 13}.

Adicionalmente, el alimento suministrado solo logra fijarse en forma de biomasa entre el 25 y 30% del nitrógeno y fosforo contenidos en la dieta^{1, 13, 14}. El resto (cerca del 70%), es acumulado en el agua y depositado en el fondo, en forma de compuestos orgánicos (alimento no consumido, heces y otros productos de excreción) y compuestos inorgánicos (nitrógeno inorgánico y fosfatos)¹⁵. En consecuencia, los efluentes resultantes acumulan altas concentraciones de desechos como dióxido de carbono y amoniaco-N, lo que aumenta el consumo de oxígeno, a la vez que se promueve la descomposición bacteriana. En síntesis, características que resultan altamente perjudiciales para el cultivo de organismos acuáticos.

Si bien la acumulación de compuestos en los efluentes de acuicultura marina es variable¹⁶, estudios indican que por cada tonelada de pescado producida, se liberan 133 kg nitrógeno (N) y 25 kg de fósforo (P) al medio de cultivo¹⁷. Solo en el año 2008, la producción acuícola mundial de peces y crustáceos dejó como resultado una carga ambiental de 1,7 millones de toneladas métricas de nitrógeno y 0,46 millones toneladas métricas de fósforo¹⁸. En soluciones acuosas, el nitrógeno amoniacial total (NAT) está presente como amoniaco no ionizado (NH_3) y amonio ionizado (NH_4^+), y su equilibrio depende del pH, la temperatura y la salinidad^{19, 20}. Un pH cercano a 7.0 solo el ~1% se encuentra en forma de NH_3 , mientras que el resto está presente principalmente como NH_4^+ ²¹. No obstante, pequeños cambios en el pH dan como resultado aumentos drásticos de la fracción de NH_3 ²², siendo este el más perjudicial para los organismos acuáticos.

Cerca del 85% del nitrógeno acumulado en los efluentes de la acuicultura marina corresponde al alimento suministrado, que como se mencionó anteriormente no es aprovechado en su totalidad por los peces del cultivo. Interesantemente, si esos efluentes ricos en N se hacen pasar a través un sistema de humedales es posible remover de los efluentes hasta un 90% de los compuestos nitrogenados gracias a las interacciones

biológicas que se promueven en estos sistemas. Considerando esto, si se integran HA a los sistemas de acuicultura marina en tierra la remoción de tales compuestos podría llevarse a cabo de un modo económico y sostenible en el tiempo.

2.1.2. Impacto de los efluentes contaminados en los organismos acuáticos

En la actualidad existe gran preocupación por la contaminación que genera la liberación sin tratamiento de efluentes con altas cargas de nutrientes inorgánicos a cuerpos de aguas receptores. Debido a que afectan negativamente la capacidad de los organismos acuáticos para sobrevivir, crecer y reproducirse; y porque la fácil disponibilidad de nutrientes aumenta severamente la producción primaria, conduciendo a procesos de eutrofización que afectan el nivel de oxígeno disuelto en el agua receptora²³.

El amonio y el nitrito en los efluentes contaminados genera la mayoría de efectos tóxicos sobre especies acuáticas²⁴. El NH₃ tiene una elevada solubilidad en lípidos lo que facilita su paso a través de las membranas biológicas, causando daños en las superficies respiratorias mientras que el NH₄⁺, es menos permeable^{20, 21}. Diversos autores han realizado estudios para identificar los efectos producidos en peces por diferentes concentraciones de NH₃. Estos señalan que la toxicidad está particularmente relacionada con la concentración de NH₃, siendo aguda para peces y organismos acuáticos cuando se eleva al rango de 0.09–3.35 mg/L de NH₃-N^{25, 26}. La toxicidad de la exposición crónica ocurre a concentraciones más bajas de NH₃, en el rango de 5 a 10% de tolerancia aguda²⁰. Por otro lado, las concentraciones superiores 1.000 mg/L NO₃-N en el agua parecen no imponer una amenaza directa a la vida de la mayoría de los organismos cultivados²⁶⁻²⁸. Sin embargo, se ha reportado que ciertas especies de importancia acuícola han mostrado tener menos tolerancia a altas concentraciones de nitrato. Pierce et al.²⁹, reportaron concentraciones tolerables para peces acuáticos cercanas a 500 mg/L, mientras Orellana et al.¹⁰, identificaron concentraciones tolerables para *Seriola lalandi* de tan solo 160 mg/L.

2.1.3. Normativa de descarga de efluentes

En Chile, la normativa sanitaria para actividades acuícolas es regida por el artículo nº 23 del Decreto nº 319/2001 que establece las medidas de protección y control para evitar la introducción de enfermedades de alto riesgo que afectan a las especies hidrobiológicas. El

Decreto 90/2000 del Ministerio de Medio Ambiente que establece la norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales; y el artículo nº 8 del Reglamento Ambiental para la Acuicultura (RAMA) del 2001, que determina el modo específico de las descargas máximas permitidas para instalaciones acuícolas en tierra.

En la actualidad, las regulaciones ambientales cada vez más estrictas obligan a las pisciculturas a realizar un manejo adecuado de los efluentes, antes de su descarga en los ecosistemas receptores. Existen diversos sistemas de tratamientos de efluentes, pero uno de los menos utilizados a la fecha son los sistemas de humedales artificiales. Como se explicó anteriormente, estos promueven la eliminación de contaminantes nitrogenados, protegen el medio acuático receptor, permiten la recuperación y la reutilización efectiva del agua de desecho. En la figura 2.1 se muestra la conformación de un sistema de humedales artificiales, instalados para capturar el nitrógeno inorgánico disuelto en las aguas de descarga de un sistema de recirculación de acuicultura.

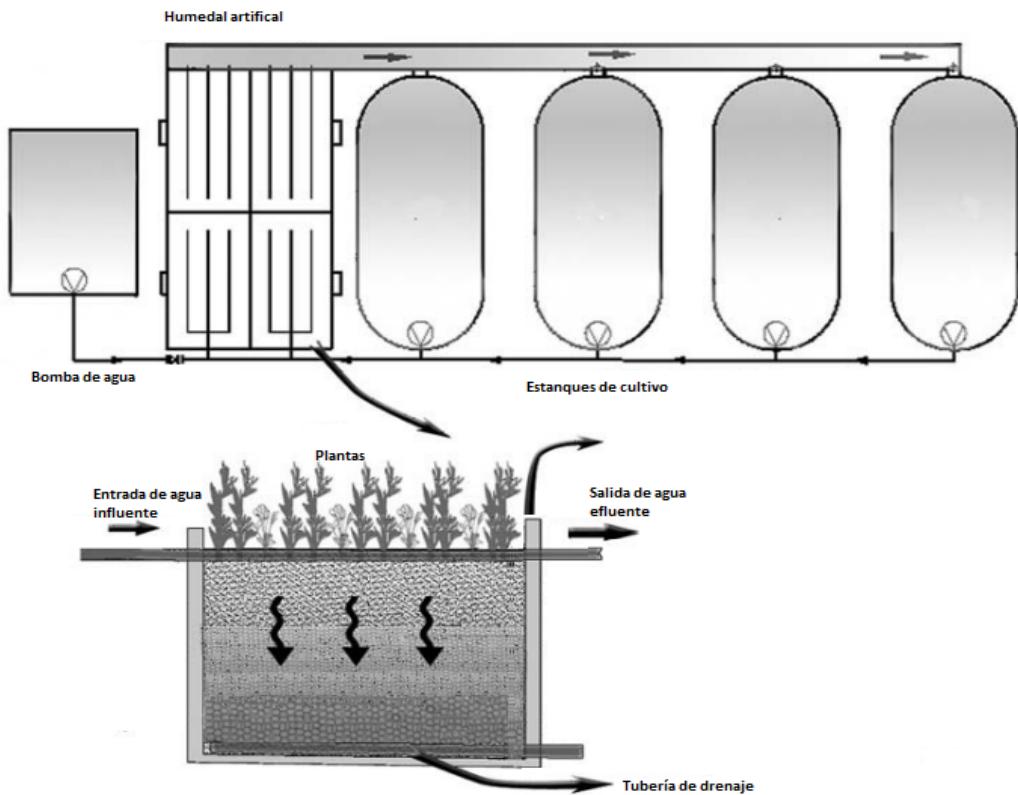


Figura 2.1 Representación esquemática de un sistema de recirculación de

acuicultura (Adaptado de Zhong et al.)³⁰.

2.2. Halófitas: *Salicornia neei* y humedales artificiales

La integración de humedales artificiales a los SRA marinos se ha convertido en una interesante propuesta para el desarrollo sostenible de la acuicultura, pues permite el tratamiento de sus efluentes salinos ricos en compuestos nitrogenados de forma rentable, energéticamente eficiente y respetuosa con el medio ambiente^{10, 31-33}. Los HA son sistemas biológicos robustos que se pueden aplicar para el tratamiento de varios tipos de agua contaminada³⁴. Estas construcciones recrean de manera artificial las interacciones entre vegetación, sedimentos y conjuntos microbianos que se presentan en la naturaleza^{32, 35}. Un flujo de agua residual se hace recorrer lentamente a través de estas estructuras, de forma de capturar la mayor cantidad de compuestos inorgánicos disueltos para la producción de biomasa³⁶. Los HA integran procesos físicos, químicos y biológicos, y cuentan con ventajas sustanciales como eficacia de funcionamiento estable, menores costos de operación, fácil operación, características ecológicas importantes y altos valores estéticos³⁷.

La selección de las plantas es crucial en el establecimiento de un humedal artificial exitoso, y depende del origen y de las características de las aguas residuales y sus necesidades de tratamiento. Las características deseables de una planta utilizada en HA para la asimilación y el almacenamiento de nutrientes, incluyen crecimiento rápido, fuerte desarrollo radicular, alto contenido de nutrientes en los tejidos, capacidad de obtener una cosecha de alto rendimiento y alto valor económico³⁴. Por ejemplo, para tratar efluentes de acuicultura marina se debe elegir vegetación halofita capaz de crecer con gradientes de salinidad variables, además de considerar la capacidad extractiva de la planta para hacer captura y posterior uso eficiente de los nutrientes disponibles⁷. Varios investigadores han sugerido a diferentes especies halófitas para tratar aguas residuales de cultivos marinos, como Brown et al., quienes investigaron la utilización de las especies halófitas *Suaeda esteroa*, *Salicornia bigelovii* y *Atriplex barclayana* como biofiltros para eliminar los nutrientes de las aguas residuales salinas del cultivo de camarón marino³¹. Buhmann y Papenbrock revisaron los conceptos básicos, las aplicaciones actuales y perspectivas futuras de plantas halófitas para biofiltrar efluentes de acuicultura³³. Mientras que Buhmann et al.³⁸, estudiaron la optimización de las condiciones de cultivo y la selección de especies y el uso de halófitas como biofiltros para

agua salina rica en nutrientes. Webb et al.³⁶, también utilizaron *Salicornia europaea* como biofiltros para eliminar nutrientes de aguas residuales salinas en granjas de acuicultura marina.

Las halófitas son un grupo muy versátil de plantas, que ha desarrollado especiales ventajas competitivas que les permite crecer en tierras afectadas por la salinidad y donde las glicófitas no pueden prosperar³⁹. Esta adaptación incluye diversos mecanismos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares⁴⁰, que permiten hacer frente a daños estructurales y funcionales causados por el estrés salino⁴¹⁻⁴⁴. Las halófitas son capaces de completar su ciclo de vida en concentraciones que oscilan entre 5 g/L y 25 g/L de NaCl, a diferencia de otras que pueden llegar a tolerar hasta 35 g/L⁴⁵. Así hay especies halófitas muy tolerantes y otras moderadamente tolerantes^{45, 46}. Por ejemplo *Salicornia bigelovii* y *Artiplex spongiosa* que tienen un rango de tolerancia a salinidad entre 10 y 12 g/L^{47, 48}, mientras que *Salicornia fruticosa* y *Arthroceratum macrostachyum* son capaces de soportar hasta 30 g/L de NaCl⁴⁹. Su marcada adaptabilidad a un amplio rango de salinidad posibilita el uso para la recuperación de efluentes altamente salinos de acuicultura marina^{4, 38, 50, 51}.

Adicionalmente, estas plantas pueden hacer uso de diferentes fuentes nitrogenadas de nutrición dependiendo de la disponibilidad, de la concentración de CO₂, y su sofisticada respuesta molecular frente a compuestos difíciles como el amonio⁵²⁻⁵⁴. Estas características se relacionan comúnmente con plantas que por competencia han colonizado áreas con disponibilidad de nutrientes cambiantes. Por ejemplo, algunas especies del género *Spartina* muestran una mayor afinidad por el consumo de NH₄⁺, en tanto que otras como *Juncus maritimus*, tienen una marcada preferencia por el NO₃⁻, incluso en sustratos que contienen alta disponibilidad de NH₄⁺^{55, 56-57}. Se ha observado que plantas con amplio rango de tolerancia ambiental y nutricional cultivadas en HA, establecen un potencial sinérgico para la captura de los compuestos nitrogenados y la producción de biomasa, la cual puede utilizarse como alimento para humanos o animales^{58, 59}, y para la producción de biocombustibles y/o subproductos de interés para la industria farmacéutica^{5, 16, 32}, entre otros.

La planta de estudio *Salicornia neei* (espárrago de mar), pertenece al género *Salicornia*

(Salicornioideae, Amaranthaceae), que se caracteriza por tener una gran tolerancia a la salinidad y especial ventaja competitiva para sobrevivir no sólo en condiciones salinas, sino también en otros tipos de estrés, como: sequía, calor, inundaciones, cambios en la disponibilidad de nutrientes, etc^{46, 60}. El espárrago de mar es una planta de hábito herbáceo, originaria de Sudamérica y abundantemente distribuida en la costa del Pacífico Sur, donde se concentra gran parte de la producción acuícola marina en Sudamérica⁶¹. En Chile, se distribuye en más de 2.600 kilómetros de costa desde la región de Antofagasta (22 ° 5' 19 " S, 70 ° 11' 45 " W) hasta la región de Los Lagos (43 ° 45' 25 " S, 72 ° 59' 01 " W)⁶². Al igual que otras especies relacionadas de Europa y América del Norte, *S. neei* ha despertado un gran interés por su potencial como alimento de hoja verde, porque contiene cantidades importantes de nutrientes y metabolitos funcionales^{59, 63}. Por este motivo, recientemente se ha evaluado su potencial para germinar y ser cultivado en diferentes gradientes de salinidad, incluyendo su potencial para integrarse en sistemas de cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), utilizando los desechos nitrogenados de esta especie como fertilizante^{64, 65}.

2.3. Recursos genéticos: salinidad y asimilación de nitrógeno en plantas halófitas

Las plantas tolerantes a la salinidad son organismos altamente evolucionados y especializados con características fisiológicas y morfológicas específicas que les permiten crecer en suelos salinos. Entre los principales desafíos que las plantas halófitas enfrentan en suelos salinos son las elevadas concentraciones de salinidad, déficit hídrico e inestabilidad en la disponibilidad de nutrientes. Estas plantas se pueden clasificar según su mecanismo para tolerar las sales en halófitas, excluyentes si tienen un mecanismo de ultrafiltración en su sistema radicular que evita la entrada de sales a la planta. En halófitas excretoras, si poseen un sistema excretor de sal, que regule los niveles de salinidad internos a través de glándulas foliares, y en halófitas acumuladoras de sal, si acumulan altos contenidos de salinidad en sus células y aumentan su tolerancia a través del desarrollo de succulencia⁶⁶.

Se ha observado que la respuesta molecular a altas salinidades puede ser mejorada por altas concentraciones de N (NH_4^+ específicamente) y viceversa; el mantenimiento de

homeostasis de amonio y tolerancia al amonio es positivamente aliviada por los mismos mecanismos de respuesta a la salinidad⁶⁷. Por ejemplo, en plantas nutridas con amonio muestran reacomodación del sistema radicular, reducción del tamaño de los brotes⁶⁸, alcalinización del citosol, cambios de pH intracelular, homeostasis y compartimentalización de iones⁶⁹. De la misma forma, las plantas creciendo en sustratos salinos muestran cambios fisiológicos y bioquímicos similares a los comentados anteriormente relacionados con homeostasis y compartimentalización de iones de Na^+ y Cl^- en la vacuola, cambios en el pH y síntesis de solutos compatibles^{41, 44, 70-74}. Adicionalmente, los mecanismos moleculares observados en respuesta a salinidad incluyen, regulación de la expresión genética, síntesis de factores de transcripción (TF, siglas en inglés) de respuesta a estrés (bZIP, WRKY, AP2, NAC, y DREB). Mientras que en respuesta a amonio se aumenta significativamente los genes implicados en la regulación transcripcional, genes que inducen defensa e inmunidad y genes implicados en los procesos metabólicos⁷⁵.

Tanto glicófitas como halófitas consumen nitrógeno, principalmente en forma de NH_4^+ o NO_3^- para la formación de biomasa⁷⁶, o para llevar a cabo procesos de síntesis de solutos compatibles⁴⁶. Su eficiencia de consumo depende de las fuentes de nitrógeno disponibles, de la expresión de las enzimas catalizadoras específicas y de las condiciones del suelo como salinidad, conductividad, temperatura y humedad^{4, 77-81}. Por ejemplo, en la mayoría de las plantas glicófitas, los suelos altamente salinos alteran el metabolismo del N. Principalmente debido a la disminución de la actividad de la enzima nitrato reductasa y las enzimas de asimilación glutamina sintetasa y glutamato sintasa, lo que lleva a una disminución severa en el crecimiento de las plantas. A diferencia de las glicófitas, las plantas halófitas tienen el potencial enzimático para sintetizar glutamina sintetasa (GS), glutamina 2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT) y glutamato deshidrogenasa (GDH) para asimilar directamente amonio en condiciones salinas⁸². Estas enzimas no solo inducen la asimilación de N, sino que son potentes reguladores de la expresión génica y pueden estar implicadas en diversas respuestas al estrés⁸³. A través de la inducción de la síntesis de compuestos nitrogenados como prolina, glicina betaína, pinitol, mioinositol, manitol y poliaminas como putrescina (Put), espermina (Spm) y espermidina (Spd), que son reconocidos como inductores de la tolerancia a diversos tipos de estrés^{82, 84, 85}. En la Tabla 2.1 se muestra la capacidad de algunas plantas haloresistentes para consumir nitrógeno inorgánico (NI) de sustratos salinos ricos en nutrientes. Los valores, sugieren que las concentraciones altas y bajas de salinidad, por

fueras del óptimo, pueden afectar la capacidad para remover el N del sustrato⁴³.

Tabla 2.1 Remoción de NI en diferentes rangos de salinidad. Evaluación del comportamiento de algunas especies halófitas frente a distintas concentraciones de salinidad y su relación con la capacidad para remover nitrógeno inorgánico del medio.

| Especie | Salinidad | Remoción de NI (%) |
|---|-----------|--------------------|
| <i>Salicornia bigelovii</i> ³¹ | | 23 |
| <i>Suaeda esteroa</i> | 35 | 22 |
| <i>Atriplex barclayana</i> | | 18 |
| <i>Juncus kraussii</i> ⁸⁶ | 25 | 69 |
| <i>Salicornia europeae</i> ³² | 22±4 | 91-98 |
| <i>Salicornia bigelovii</i> ³¹ | | 42 |
| <i>Suaeda esteroa</i> | 10 | 42 |
| <i>Atriplex barclayana</i> | | 42 |
| <i>Typha angustifolia</i> ⁸⁷ | | 75 |
| <i>Brachiaria mutica</i> | | 68 |
| <i>Digitaria bicornis</i> | | 70 |
| <i>Vetiveria zizanioides</i> | 10 | 77 |
| <i>Spartina patens</i> | | 68 |
| <i>Leptochloa fusca</i> | | 75 |
| <i>Salicornia bigelovii</i> ³¹ | | 38 |
| <i>Suaeda esteroa</i> | | 48 |
| <i>Atriplex barclayana</i> | 0,5 | 50 |

*NI: Nitrógeno del amonio ($\text{NH}_4\text{-N}$) y nitrógeno del nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$). Las concentraciones de nitrógeno son diferentes en cada experimento.

La asimilación de N implica absorción, transporte, y utilización a nivel celular para la biosíntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos⁸⁸⁻⁹⁰. En ciertas plantas halófitas se observa una gran afinidad por el amonio (NH_4^+), mientras que el nitrato (NO_3^-), puede tener un rol menor en la nutrición de la planta^{21, 91-93}. Sin embargo, cuando está disponible las plantas muestran la capacidad de asimilarlo⁹⁴. Por ejemplo, *Salicornia bigelovii* creciendo en altas concentraciones de NaCl, muestra mayor utilización de amonio en comparación con nitrato, cuando estos se encuentran en bajas concentraciones. Sin embargo, cuando las concentraciones de NH_4^+ y NO_3^- aumentan, el consumo de las dos fuentes se torna similar⁹⁵. Otras halófitas muestran otros patrones de consumo, por ejemplo, cuando crecen ante la presencia exclusiva de amonio (NH_4^+) el crecimiento se inhibe, pero cuando crecen con NO_3^- ,

o bien, mezclas de fuentes de nitrato-amonio, las plantas crecen normalmente⁷⁸. Esta preferencia por NO_3^- fue observada en la planta halófita *Salicornia europeae*, que crece más con nitrato de amonio (NH_4NO_3) o NO_3^- que con NH_4^+ . Mientras que *Aster tripolium* crece de manera similar en NH_4^+ , NH_4NO_3 y NO_3^- ⁴. Conocer las condiciones de crecimiento de las plantas halófitas cuando se exponen a diferentes fuentes de nitrógeno es importante pues permite predecir el comportamiento de la planta cuando es integrada a sistemas de tratamientos de aguas de la acuicultura marina^{32, 33}.

2.3.1. Nutrición basada en amonio

La absorción de iones de amonio por las raíces implica un conjunto complejo de sistemas de transporte de membrana que incluye transportadores de alta y baja afinidad. En estudios moleculares se han identificado y caracterizado los transportadores de NH_4^+ , estableciéndose que estos mecanismos operan a concentraciones externas bajas y altas⁵². Estos transportadores de membrana se conocen como sistemas de transporte de alta afinidad (HATS) y sistemas de transporte de baja afinidad (LATS). Investigaciones anteriores han demostrado que la detección de la dosis del N permite a las plantas reprogramar tanto sus patrones de expresión génica⁹⁶, como algunos transportadores que son inducidos por el NI externo (por lo tanto, iHATS sería un mecanismo de HATS inducido). Mientras que otros transportadores mantienen una actividad constante, independientemente de las condiciones externas (sistemas constitutivos, por lo que cLATS es un mecanismo constitutivo de LATS)⁹⁷.

El amonio en las células puede inducir marcados efectos tóxicos como desequilibrio iónico y la alteración del pH intercelular^{53, 78}. Sin embargo, algunas plantas prefieren su consumo directo porque supone menor gasto energético, debido a que la energía requerida para la reducción de NO_3^- a nitrito NO_2^- , y su posterior conversión a NH_4^+ , es economizada por la incorporación directa del amonio externo^{81, 98, 99}. Los síntomas de negativos por el exceso de amonio son reducción en la formación de biomasa, desequilibrio iónico y homeostático, y desregulación hormonal que repercuten negativamente en la formación de biomasa^{68, 78}.

Convencionalmente, se considera que suministros externos bajos de amonio no son perjudiciales para las plantas, mientras que suministros externos altos si pueden provocar toxicidad. Sin embargo, no se puede determinar su toxicidad únicamente basado en los

suministros, pues estudios han encontrado que el grado de estrés es variable y depende del genotipo y de las variables ambientales^{100, 101}. Por ejemplo, las plantas que evidencian menores síntomas de toxicidad tienen la capacidad para expresar abundantemente GS y GOGAT, enzimas que mantienen la homeostasis a través de la fijación en tejidos y órganos^{102, 103}. Aunque el estrés por amonio afecta prácticamente a todas las especies de plantas, ciertas plantas como el arroz y coníferas, que crecen en suelos con bajas tasa de nitrificación están adaptadas para tolerar la nutrición con amonio¹⁰⁴. De igual forma, las halófitas que han colonizado suelos salinos con altas concentraciones de cloruro (Cl^-), la absorción de NH_4^+ predomina estimulado por la misma salinidad, mientras la asimilación de NO_3^- es inhibido debido al efecto antagónico del Cl^- ^{95, 105}.

El amonio, ya sea tomado directamente del suelo, convertido a partir de nitrato o generado mediante el recambio de proteínas durante la senescencia o la germinación de las semillas, es asimilado por la acción de las mismas enzimas tanto en halófitas como en glicofitas¹⁰⁶. La asimilación de amonio puede tomar dos vías, la más común es conformada por las enzimas GS, GOGAT. Mientras que la segunda vía es coordinada por glutamato deshidrogenasa GDH¹⁰⁷. Las dos isoformas GS1 y GS2 usan como sustrato el amonio, catalizando la amidación del amonio a glutamina en el citosol a través de GS1 o GS2 en el plastidio¹⁰⁸. Seguidamente, GOGAT utiliza como sustrato la glutamina disponible y 2-oxoglutarato para generar glutamato^{108, 109}. La otra vía alternativa que participa en la asimilación del amonio es GDH, la cual cataliza la reacción de desaminación del glutamato⁶⁷ (Figura 2.2)

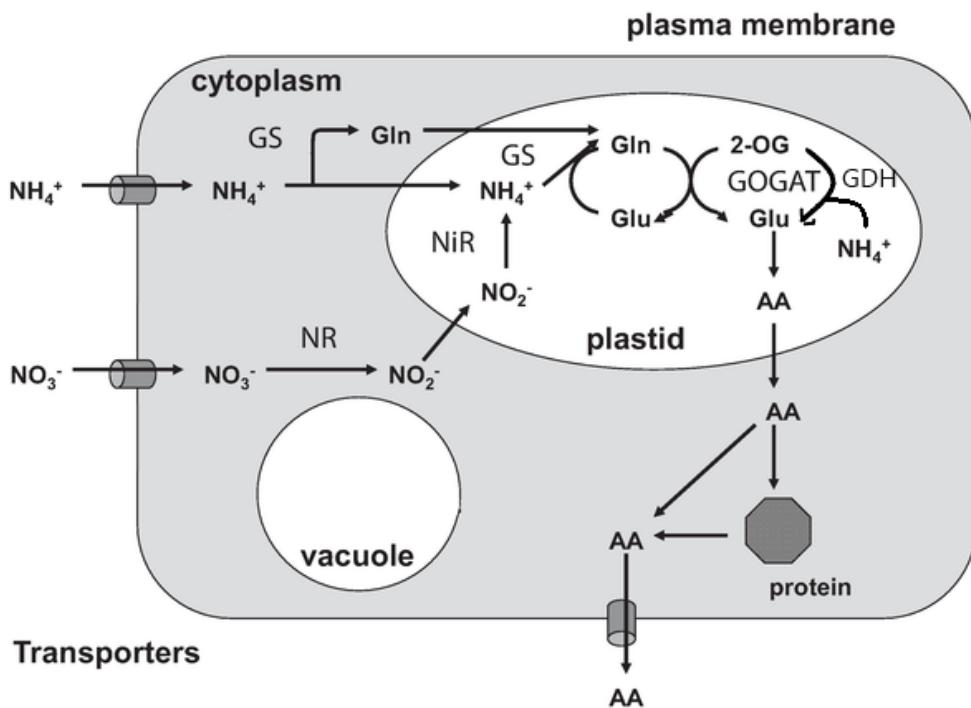


Figura 2.2 Asimilación de amonio. El ion amonio es transportado directamente desde el suelo a través de transportadores de amonio (AMT). Luego es incorporado en el ciclo glutamina sintetasa / glutamina 2-oxoglutarato aminotransferasa (GS / GOGAT) en los plastidos. La enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) también participa en la asimilación catalizando la aminación reversible de 2-oxoglutarato y amonio para formar glutamato (Fuente: elaboración propia).

Plantas del género *Salicornia*⁶⁷, y otras plantas halófitas que crecen en concentraciones de salinidad altas y con amonio como fuente de N, han mostrado una mayor abundancia relativa de GS, GOGAT y GDH en la parte aérea y una reducción en la zona de las raíces^{67, 79, 110}. El aumento de la actividad enzimática en los brotes mejora la síntesis de aminoácidos, al tiempo que mantiene los niveles de amonio por debajo de los límites de toxicidad^{67, 82, 110}. Además, la expresión de tales aminotransferasas, se han relacionado con la regulación de la expresión génica y la respuesta a estrés abiótico por salinidad⁸³.

2.3.2. Nutrición basada en nitrato

En suelos salinos la disponibilidad de NO_3^- -N se reduce debido a que los procesos biológicos/microbianos responsables de mantener el equilibrio $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ son lentificados por las condiciones de salinidad^{111, 112}. Investigaciones muestran que altas concentraciones de salinidad causa la inhibición del primer paso de la nitrificación, lo que conduce a otras formas de nitrógeno estables en el suelo, como el amonio^{111, 113-115}. Paralelamente, en suelos

salinos se produce una inhibición competitiva de la absorción de NO_3^- por el Cl^- , deteriorando aun más la nutrición basada en nitrato y resultando en la conclusión que la utilización NO_3^- no es la principal forma de nutrición en las halofitas.

No obstante, las plantas halófitas sintetizan nitrato reductasa (NR), que varía de acuerdo a la disponibilidad de NO_3^- en el suelo⁷⁹. Por ejemplo, en plantas con poca disponibilidad de nitrato, la concentración de la enzima NR, es tres veces más baja, que en plantas con una disponibilidad alta de NO_3^- . Por tanto, si no hay disponibilidad de NO_3^- , no es necesario la síntesis de la enzima, pero si su disponibilidad aumenta lo suficiente, los niveles de expresión de NR aumentarán⁷⁹.

NR y NiR están codificadas por una gran diversidad de familias de genes que se expresan cuidadosamente para controlar su síntesis y actividad¹¹⁶. Dos enzimas importantes para la asimilación del nitrato y nitrito, son las enzimas nitrato reductasa ubicada en el citosol y la enzima nitrito reductasa ubicada en el plastídio¹¹⁷. Éstas son codificadas por los genes *nr* y *nir*, que a su vez, son controlados por los factores de transcripción NLP6 y NLP7, que se activan en presencia de nitrato, incrementando coordinadamente la expresión de las enzimas NR y NiR (nitrito reductasa)¹¹⁸. La enzima NR, es la primera enzima en la vía de asimilación de nitratos, catalizando la reducción de NO_3^- a nitrito NO_2^- , en el citoplasma de células vegetales^{116, 118}. Posteriormente, la enzima NiR cataliza la reducción del nitrito (NO_2^-), a amonio (NH_4^+), en los plastídios^{80, 109} también llamados cloroplastos (Figura 2.3).

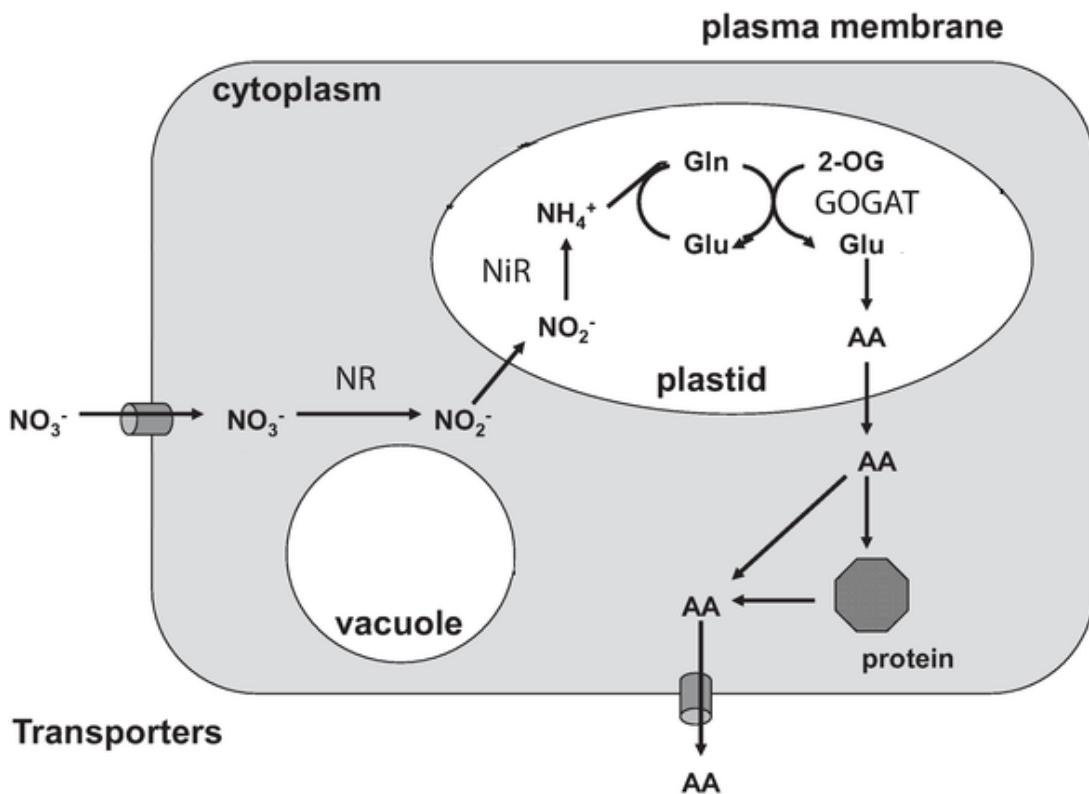


Figura 2.3 Esquema de la asimilación de nutrientes nitrogenados en plantas (Nitrato). La enzima nitrato reductasa (NR), cataliza la reducción de nitrato (NO_3^-) a NO_2^- en el citosol. Luego NO_2^- atraviesa la membrana plastidial donde es reducido a amonio por la acción de la enzima nitrito reductasa (NiR), el amonio resultante es luego catalizado por aminotransferasas (Fuente: elaboración propia).

2.3.3. Señalización y respuesta a salinidad en plantas halófitas

Percibir la concentración de salinidad es la primera estrategia para combatir el estrés salino^{119, 120}. Un sensor membranal detecta la salinidad induciendo “segundos mensajeros” que activa la enzima fosfolipasa C (PLC) (ver figura 2.4). PLC realiza una reacción de hidrólisis sobre fosfatidilinositol di-fosfato (PIP_2), la cual produce IP_3 (inositol-trifosfato), y diacil glicerol (DAG)¹²⁰. Luego IP_3 actúa como regulador de las concentraciones de calcio citoplasmático [$\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$] desde el apoplasto hacia el citoplasma, o por la liberación a partir de fuentes intracelulares como el retículo endoplasmático y las vacuolas provocando un aumento de calcio citoplasmático^{44, 121}. Este trascendental incremento de Ca^{2+} citosólico es detectado por la proteína de unión a calcio SOS3, que forma un complejo con la proteína cinasa SOS2¹¹⁹.

Este complejo SOS3/SOS2¹²², es dirigido hacia la membrana plasmática donde activa el antiportador Na^+/H^+ de unión a membrana SOS1, restringiendo la entrada de Na^+ al citosol¹²³

(ver figura 2.5). Por otro lado, SOS2 también está involucrado en la inhibición del transportador de sodio HKT1 que media la entrada de Na^+ al citoplasma, y en la activación del transportador de membrana vacuolar K^+ , Na^+/H^+ (NHX1), que promueve la compartimentalización de Na^+ dentro de la vacuolas^{119, 124}. En la Tabla 2.2, se muestran los genes que codifican para la síntesis de las principales enzimas antioxidantes producidas durante el estrés salino.

Tabla 2.2 Principales genes encontrados en plantas involucrados en la respuesta a salinidad

| Gen | Nombre | Función biológica |
|--------------------------------|---|---|
| <i>nhx1</i> | Transportadores vacuolares Na^+/H^+ | Funcionan intercambiando iones de Na^+ por H^+ junto con K^+ a nivel vacuolar. Detoxifican la planta de contenidos de sodio a través de la compartimentalización en las vacuolas ^{125, 126} . |
| <i>sos1, sos2, sos3</i> | Complejo sensor de salinidad | La ruta SOS es uno de los principales mecanismos que mantiene la homeostasis iónica en el citoplasma y conduce a la tolerancia a la salinidad ^{123, 125, 127} . |
| <i>hkt</i> | Transportadores HKT | Los transportadores HKT proveen un potente mecanismo para la tolerancia a la salinidad en plantas. La inhibición de este transportador evita la entrada de sodio a los tejidos ¹²⁸ |
| <i>ccx</i> | Familia de intercambiador de catión/calcio | Componente esencial en la ruta de señalización de SOS. Transporta Ca^{2+} citosólico a través de membranas, la expresión de este gen es aumentada en plantas sometidas a estrés por salinidad. Ha sido caracterizada en varias especies, particularmente en plantas y levaduras ¹²⁹ . |
| <i>cax</i> | Familia de Intercambio catión | La expresión de este gen es aumentada en plantas sometidas a estrés por salinidad. Estos transportadores se localizan predominantemente en la membrana vacuolar ^{129, 130} . |
| <i>aba</i> | Ácido abscísico | La biosíntesis de la hormona ABA induce una gran variedad de genes importantes durante el estrés salino, también la acción de ABA ha sido identificada durante el estrés por deshidratación y bajas temperaturas ¹³¹ . |

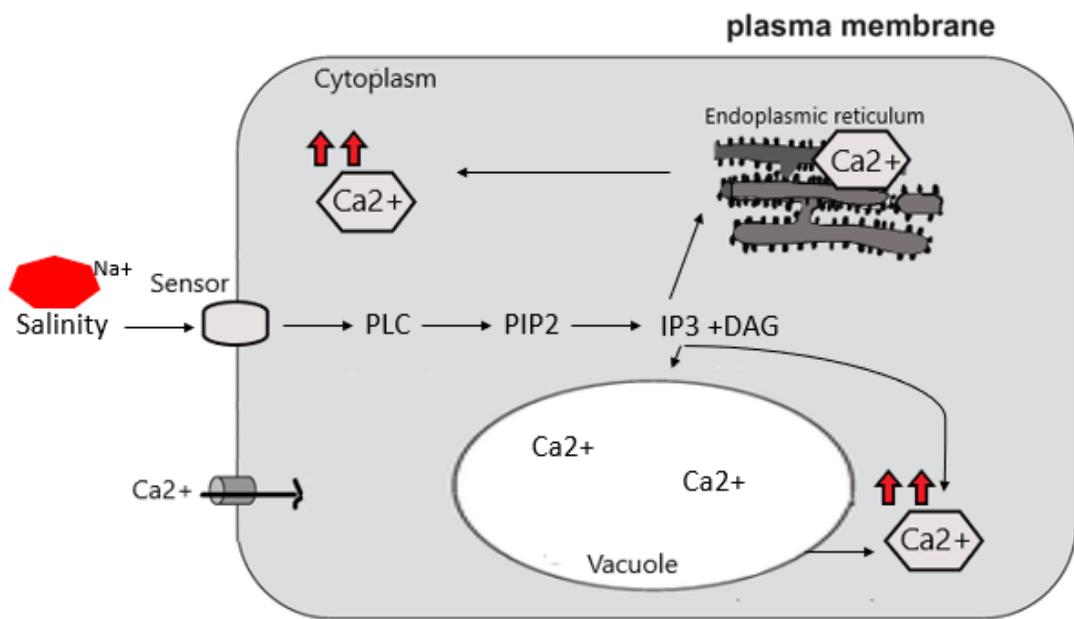


Figura 2.4 Detección de NaCl y aumento de calcio citosólico. La señalización de NaCl se produce por la detección de concentraciones de salinidad en el medio extracelular, seguidamente, esto tiene una respuesta a nivel celular con la activación de PLC y la posterior hidrólisis de PIP₂, para producir PIP₃ y DAG. PIP₃ actúa como un estimulante para permitir el aumento de Ca^{2+} de fuentes internas como la vacuola y RE, y el ingreso a través de canales de Ca^{2+} membranales desde el apoplato (Fuente: elaboración propia).

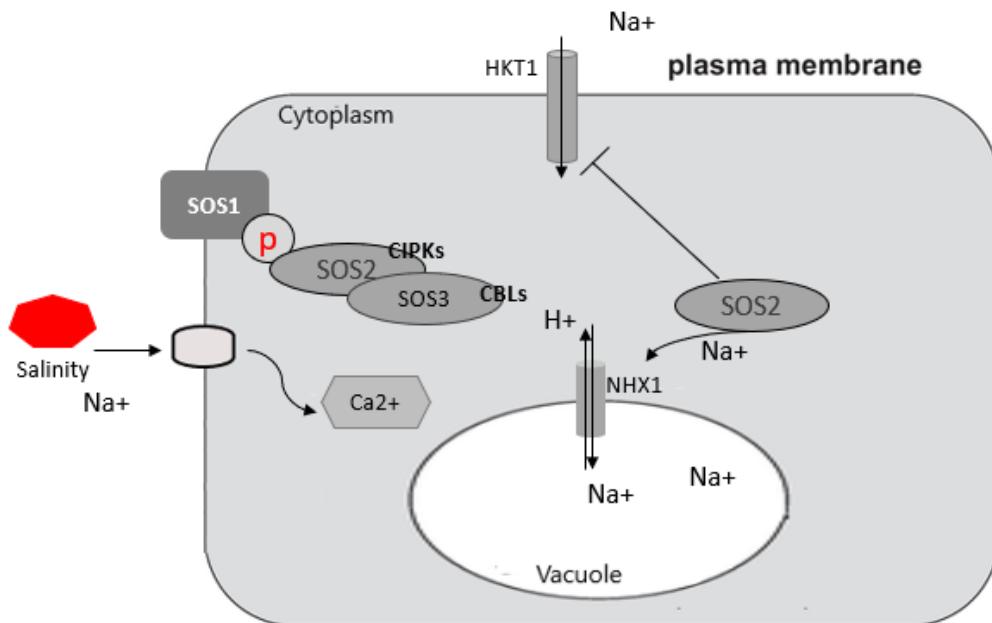


Figura 2.5 Cascada de señalización durante el estrés por salinidad. Una vez que el aumento de Ca^{2+} es reconocido por SOS3, se forma un complejo SOS3-SOS2 que inhibe la actividad HKT, restringiendo la entrada de Na^+ al citosol y activa los antiportadores Na^+/H^+ de la membrana plasmática, SOS1, y de la vacuola, NHX, provocando el eflujo de Na^+ y su acumulación vacuolar (Fuente: elaboración propia).

La continua expresión de genes altamente relacionados con la respuesta al estrés salino como NHX (transportador vacuolar K⁺, Na⁺/H⁺), HKT (transportador membranal Na⁺), CCX (intercambiador de catión calcio), CAX (intercambiador de catión)^{120, 130}, ABA (ácido abscísico), dirigen toda una maquinaria molecular previniendo daños estructurales y funcionales⁴⁴. Conduciendo la planta al restablecimiento de las condiciones homeostáticas necesarias para la absorción de nutrientes y la mantención del flujo neto de agua, permitiendo así, mantener la turgencia a nivel celular y la transpiración de la planta entera⁴³. En la Tabla 2.3 se muestran algunos genes involucrados en la síntesis de enzimas antioxidantes en respuesta a estrés.

Tabla 2.3 Principales genes reguladores de respuesta a estrés oxidativo en plantas

| Gen putativo | Nombre | Función biológica |
|---------------------|-----------------------|--|
| <i>cat</i> | Catalasa | Gen que codifica para la enzima antioxidante catalasa, que cataliza la conversión del peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂) a H ₂ O y O ₂ , está localizada en los sitios de producción H ₂ O ₂ , como peroxisoma, mitocondria y cloroplasto ¹³⁴ |
| <i>sod</i> | Super oxido-dismutasa | Genes que codifican para la enzima antioxidante superóxido dismutasa, constituye la primera línea de defensa en contra del estrés oxidativo. Cataliza la disminución del superóxido a oxígeno y peróxido de hidrogeno H ₂ O ₂ ¹³⁵ |
| <i>apx</i> | Ascorbato peroxidasa | Gen que codifica para ascorbato peroxidasa, junto con SOD, detiene los primeros signos de estrés oxidativo, cataliza la conversión de H ₂ O ₂ a agua y oxígeno con el poder reductor del ascorbato ^{135, 136} |
| <i>gp</i> | Guaicrol peroxidasa | Codifica para la isoenzima Guaicrol peroxidasa que cataliza la conversión de H ₂ O ₂ en agua y oxígeno ¹³⁷ |
| <i>p5cs</i> | Prolina | Codifica la biosíntesis de prolina. Durante el estrés abiótico la prolina es sumamente común, realiza múltiples funciones antioxidantes como: 1) disminuye y atrapa O ₂ , H ₂ O ₂ y OH; 2) estabiliza enzimas limpiadoras de especies reactivas de oxígeno (ERO); 3) mantiene niveles bajos de NADPH a NADP, disminuyendo la formación de 1O ₂ en el fotosistema I; 4) estabiliza la respiración mitocondrial; 5) disminuye los efectos nocivo de O ₂ y OH en el fotosistema II ^{140, 141} |
| <i>gr</i> | Glutation reductasa | Codifica para la enzima Glutation reductasa que reacciona químicamente con superóxido y radicales hidroxilo captando los radicales libres. Importante protección contra el estrés oxidativo ¹³² |

2.4. Estrategias adaptativas de plantas bajo estrés inducido por amonio

Diversas alteraciones a nivel celular y transcripcional, se relacionan con la capacidad de ciertas plantas para sobrevivir con éxito en entornos desafiantes¹³³. Estudios revelan que los tejidos vegetales que inicialmente detectan cambios en las condiciones ambientales pueden sufrir un mayor número de cambios transcriptómicos en relación con los tejidos que detectan el estrés en una etapa posterior. Por ejemplo, las primeras etapas de estrés por salinidad o elevadas concentraciones de amonio en el suelo, son percibidas principalmente por las raíces, mientras que el estrés por calor o frío es detectado inicialmente por los brotes^{67, 134}. A nivel celular ocurre un hecho similar, la pared celular es el primer orgánulo que detecta el estrés extracelular, experimentando varios cambios estructurales durante el estímulo. Inmediatamente después o simultáneamente, se pueden observar rápidos ajustes transcriptómicos o metabólicos en orgánulos subcelulares que desencadenan la respuesta de defensa primaria de las plantas^{135, 136}.

2.4.1. Respuesta de la pared celular bajo estrés inducido por nutrición con amonio

Cuando la pared celular es sometida a diferentes tensiones, los genes codifican enzimas capaces de sintetizar o hidrolizar componentes que pueden remodelar su estructura. Esos genes de pared celular, muestran una expresión diferencial cuando se someten a diferentes tensiones, lo que sugiere que pueden facilitar la tolerancia al estrés a través de cambios en la composición de la pared celular^{135, 137}. La pared celular primaria de las plantas en crecimiento se compone principalmente de polisacáridos como celulosa, hemicelulosa y pectina; iones unidos covalentemente (calcio y boro) y varias proteínas como glicoproteínas estructurales, enzimas y expansinas. Su ordenación es esencial para permitir resistencia, soporte estructural y crecimiento de las células vegetales¹³⁸. Un desequilibrio de nutrientes en el suelo puede ser un factor de estrés abiótico importante que afecta la pared celular de las células de las raíces y la del tejido aéreo. Por ejemplo, Walch-Liu et al.¹³⁹, observaron una disminución en el crecimiento de las hojas, y un tamaño celular más pequeño en hojas de tabaco tratado con NH₄⁺. La pared celular conserva cierta flexibilidad, de modo que cuando se somete a estímulos bióticos o abióticos, se puede remodelar rápidamente dirigida por diversos patrones de expresión¹³⁵. En una nutrición con amonio, las enzimas reguladoras de pared celular como expansina (EXP) y xiloglucano endotransglucosilasa / hidrolasas (XTH / XET) a menudo muestran una expresión diferencial a la baja, reflejándose en una pared

celular más rígida que restringe el crecimiento celular en comparación con una pared celular no estresada^{135, 138-140}. También se observó una tendencia similar en la expresión de genes reguladores de pared celular en plantas de trigo estresadas por sequía. Abebe et al.¹⁴¹, encontró que los genes que codifican miembros de familia celulosa sintasa (GT2, CesA), UDP-xilosiltransferasa, glicosil hidrolasa 1 (GH1), endo-beta-1,4-glucanasa (GH9) y xiloglucano endotransglucosilasa (GH16, XTH / XET) fueron regulados a la baja. No obstante, los genes reguladores de pared celular pueden ser subexpresados o sobreexpresados dependiendo del tipo de estrés y del área de la planta.

2.4.2. Respuesta vacuolar y de otros orgánulos subcelulares en altas concentraciones de amonio citosólico

El amonio es una fuente importante de nitrógeno para las plantas. Es captado por las células vegetales a través de transportadores de amonio en la membrana plasmática y luego, distribuido y metabolizado en compartimentos como cloroplastos, mitocondrias y retenido en compartimentos ácidos como la vacuolas probablemente a través de diferentes transportadores en cada caso^{97, 142}. Para evitar los efectos negativos del amonio citosólico, las moléculas de amonio son almacenadas y retenidas por la vacuola¹⁴³, donde sus concentraciones pueden alcanzar hasta 1 mM de amonio para mantener concentraciones por debajo de 15 µM de amonio en el citosol¹⁴⁴. La acumulación de amonio en las vacuolas no solo corresponde a moléculas de amonio libres en el citosol, sino también a recursos almacenados en hojas y tejidos en senescencia, que de otro modo se perderían como desechos.

2.5. Bioinformática -transcriptómica y análisis de rna-seq

Con las nuevas técnicas de secuenciación masiva, que generan una gran cantidad de datos, se ha hecho cada vez más importante el desarrollo y aplicación de nuevas herramientas bioinformáticas que permitan el análisis exhaustivo y la comprensión de la información para obtener una respuesta o visión del comportamiento molecular de un organismo frente a un estadio específico de desarrollo o condición fisiológica¹⁴⁵. Los datos generados con la secuenciación corresponde al conjunto completo de transcritos o transcriptoma (secuencias de RNA que existe en la célula, tejido u órgano). Los objetivos de la transcriptómica son

catalogar todos los transcritos que incluyen RNA mensajero (ARNm), ARN no codificante y ARN pequeños, determinar la estructura transcripcional de los genes (dirección 5' y 3'), determinar patrones de empalme y modificaciones post-transcripcional, y cuantificar los niveles de expresión bajo diferentes condiciones¹⁴⁶.

El análisis de RNA- sequencing (RNA-seq) es una herramienta eficaz para estudiar cambios en la transcripción de genes en todo el genoma y para examinar los recursos genéticos existentes. Esta herramienta es una poderosa técnica con una gama de aplicaciones notablemente diversa, que permite realizar estudios detallados de procesos biológicos a nivel de tipo celular específico, hasta proporcionar conocimientos sobre cuestiones fundamentales de la biología vegetal en una escala de tiempo evolutiva. Sus aplicaciones incluyen la generación de datos genómicos para organismos no modelo; la determinación de genes estructurales y reguladores que revelan cómo las plantas responden a señales de desarrollo y adaptaciones a estrés biótico y abiótico, entre otras aplicaciones. En la actualidad, existen diversos estudios basados en enfoques transcriptómicos que han revelado mecanismos moleculares claves relacionados con la tolerancia al estrés abiótico en plantas haloresistentes y amonioresistentes.

En 2015, Diray et al.¹⁴⁷, caracterizaron el transcriptoma de *Suaeda fruticosa* con el objetivo de identificar los genes relacionados con funciones celulares en respuesta a altas concentraciones de estrés salino. El estudio utilizó una tecnología de secuenciación de alto rendimiento seguida por la construcción del ensamblaje de *novo* del transcriptoma y su respectivo análisis. Como resultado del análisis bioinformático, identificaron genes potenciales involucrados en la tolerancia a la salinidad en *S. fruticosa* y proporcionaron un ensamble de referencia que puede servir para el estudio de otras halófitas suculentas.

En el siguiente año, Skorupa et al.¹⁴⁸, encontraron importantes características adaptativas en el transcriptoma de la planta haloresistente *Beta vulgaris* ssp. Marítima, al estrés salino agudo. La secuenciación fue realizada utilizando la Illumina MiSeq, con la que se generó las bibliotecas para la condición control y para las condiciones media y alta salinidad. Los investigadores encontraron genes expresados diferencialmente que se encuentran relacionados con varias funciones celulares, como el transporte de membranas, la osmoprotección, el acompañamiento molecular, el metabolismo redox o la síntesis de

proteínas y genes relacionados con la fijación fotosintética del carbono, la biogénesis de los ribosomas, la formación de paredes celulares y la expansión de la pared celular. Además, varias transcripciones novedosas y no descritas respondieron a la salinidad en las hojas de la remolacha marina.

Recientemente Massumeh et al.¹⁴⁹, estudiaron la planta halófita *Salicornia persica* para investigar los mecanismos moleculares que controlan la adaptación a la salinidad en esta halófita. La secuenciación se llevó a cabo con la plataforma Illumina y como es común en este tipo de estudios, las bibliotecas generadas corresponden a una condición control o sin estrés y una condición inductora de estrés. Los investigadores reportaron varios factores de transcripción, proteínas quinasas y transportadores. Encontraron genes relacionados que sugirieron la activación de la homeostasis energética y la síntesis de metabolitos primarios juegan un papel clave para la adaptación de la salinidad en *S. persica*.

Estos antecedentes demuestran el impacto que puede llegar a tener, en diferentes campos de investigación, el combinar dos poderosas herramientas como lo son las técnicas de secuenciación masiva y la bioinformática. Estas nuevas técnicas de secuenciación disponibles han facilitado información valiosa sobre cómo las plantas halófitas mediante la regulación orquestada de muchos genes, responden, prosperan y sobreviven a ambientes que ofrecen diversos tipos de estrés abiótico. Estas metodologías proporcionan información sobre las rutas novedosas inducidas en las plantas para posiblemente ser aplicadas en diversos campos de la ciencia como agricultura, farmacéutica, alimentaria, entre otros.

CAPÍTULO 3

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tratamiento efectivo de las aguas salinas de desecho son una de las barreras críticas para el desarrollo sustentable de la acuicultura marina en tierra. Debido a que estas aguas contienen elevadas concentraciones de nitrógeno estas pueden además resultar perjudiciales en los ecosistemas receptores o en los sitios de disposición autorizados por la ley. Las altas concentraciones de nitrógeno acumuladas en las aguas de desecho provienen de los procesos metabólicos y catabólicos que se producen por el consumo del alimento (heces, y otros productos de excreción), y por el alimento no consumido de los peces; el cual termina perdiéndose en el fondo de las piscinas de cultivo. La disposición sin tratamiento de las aguas de desecho en los ecosistemas circundantes desencadena fuertes impactos negativos relacionados con procesos de enriquecimiento de aguas (Ejemplo: explosión de algas). Que propician alteraciones en las condiciones fisicoquímicas del agua y en las comunidades biológicas existentes. Por lo tanto, la legislación ambiental chilena, ha establecido ciertas normas que rigen los niveles de emisión de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas receptoras.

Tal normativa fija los límites máximos permisibles para la descarga de residuos líquidos, previniendo así de la contaminación de dichos cuerpos de agua. No obstante, en los sistemas de recirculación para la acuicultura marina en tierra las concentraciones de contaminantes en las aguas de desecho superan a menudo los límites máximos permitidos. La selección de la planta *S. neei* para integrarla a HA, se basó principalmente en su natural capacidad para sobrevivir en condiciones salinas, en la abundancia de la planta en el país, en sus necesidades climáticas y en su alto valor económico. No obstante, el conocimiento es limitado pues no se conocen cuáles son los requisitos de absorción de N de la planta, la cinética de consumo y ni su crecimiento. Ni tampoco las respuestas moleculares que en la mayoría de veces coordinan procesos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos que son los que determinan la eficiencia de eliminación en los HA.

3.1. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo

Salicornia neei produce biomasa y activa señales de transducción que expresan novedosos transcriptos en respuesta a nitrógeno y salinidad.

Objetivo general

Evaluar el potencial biotecnológico de la planta halófita *Salicornia neei* para su uso en sistemas integrados de acuicultura marina en tierra.

Objetivos específicos

- 1) Caracterizar la producción de biomasa de la planta halófita *Salicornia neei* en concentraciones de salinidad de 35 g L^{-1} en combinación con 1 mg L^{-1} NAT + 100 mg L^{-1} de NO_3 (Nit + Amm) y 100 mg L^{-1} NO_3 mg L^{-1} (Nit).
- 2) Caracterizar la capacidad de la planta halófita *Salicornia neei* para remover nitrógeno de concentraciones de salinidad de 35 g L^{-1} en combinación con 100 mg L^{-1} NO_3 mg L^{-1} y 1 mg L^{-1} NAT + 100 mg L^{-1} de NO_3 .
- 3) Identificar señales de transducción de *Salicornia neei*, en respuesta a concentraciones de salinidad de 35 g L^{-1} en combinación con 3mM de NH_4Cl .

CAPITULO 4

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales y métodos objetivos 1 y 2

4.1.1. Colección de material vegetal y aclimatación

Se recolectaron 100 plantas de *Salicornia neei* con raíces y brotes completamente desarrollados en el humedal “Salinas de Pullally”, ubicado en la comuna de Papudo, Región de Valparaíso, Chile ($32^{\circ} 24'54''$ S, $71^{\circ} 22'43''$ W), en el mes de julio de 2014. Posteriormente trasladado al “Laboratorio Experimental de Acuicultura” de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, en Valparaíso, Chile ($33^{\circ} 1'21''$ S, $71^{\circ} 37'57''$ W). Las plantas se aclimataron en lechos de arena esterilizada y se alimentaron con solución Hoagland¹⁵⁰ disuelto en solución salina de 200 mM de NaCl, una vez por semana durante 10 semanas. Luego que las plantas se adaptaron y recuperaron su vigor, fueron trasladadas a la unidad experimental.

4.1.2. Diseño de los sistemas

Con el fin de evaluar el potencial de *S. neei* para la producción de biomasa y la remoción de compuestos nitrogenados disueltos en aguas altamente salina con altas cargas de compuestos nitrogenados, se diseñaron e implementaron tres sistemas de recirculación separados entre sí (uno por cada tratamiento), y conectados a HA por triplicado (Figura 4.1).

El sistema se evaluó durante 74 días, los tratamientos propuestos corresponden a las cargas de promedio típicas de amonio-N ($\text{NH}_4\text{-N}$) y nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) reportadas en el efluente de la acuicultura marina terrestre^{10, 11}.

Tratamientos:

- Control = Agua de mar
- Tratamiento 1 (Nit+Amm) = Agua de mar + 1 mgL^{-1} NAT y 100 mgL^{-1} $\text{NO}_3\text{-N}$
- Tratamiento 2 (Nit) = Agua de mar + 100 mgL^{-1} $\text{NO}_3\text{-N}$

La solución nutritiva para cada sistema de recirculación se preparó directamente en cada tanque de tratamiento y se renovó por completo cada 14 a 15 días. Se realizaron cinco fertilizaciones.

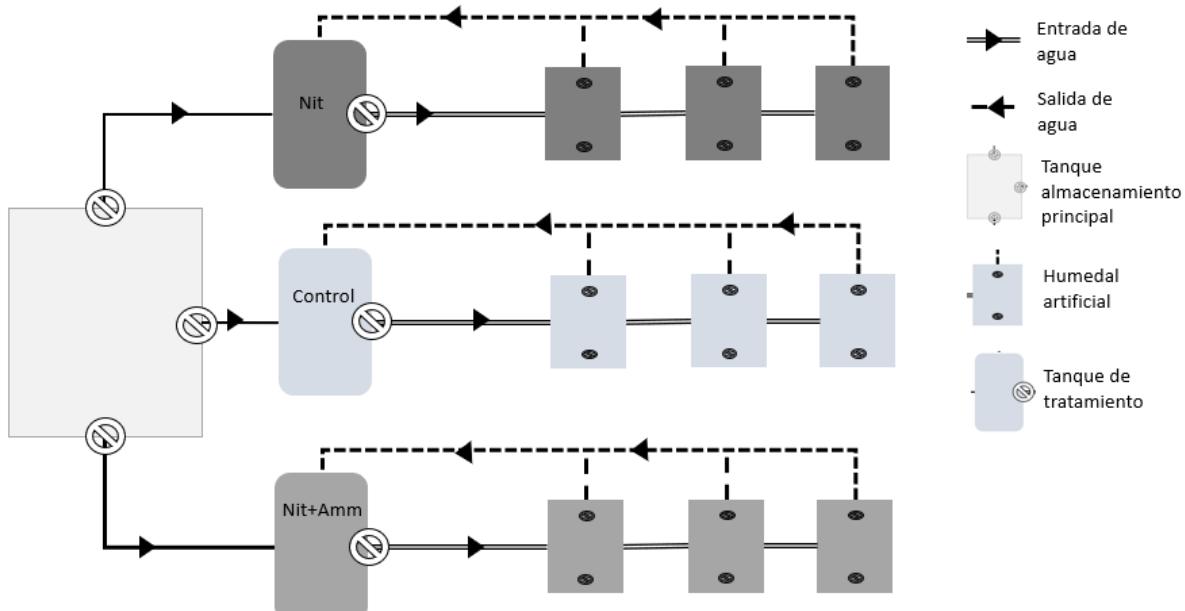


Figura 4.1 Diseño de humedales artificiales

Para la construcción de los HA se utilizaron recipientes de polietileno de las siguientes dimensiones $0.5 \times 0.6 \times 0.6$ m y volumen de $0,18 \text{ m}^3$ (largo x ancho x altura) (Figura 4.2). Cada recipiente de polietileno tenía un área (A) utilizable para siembra de $0,3 \text{ m}^2$ y un área total correspondiente a $0,9 \text{ m}^2$ (calculada así: área de HA x número de HA de cada tratamiento). En el fondo de cada humedal artificial, se instaló un sistema de recolección de lixiviados, consistente en una tubería perforada para recolectar el agua, seguidamente se puso una capa de grava con diámetro de 0.5 cm hasta alcanzar una altura de 15 cm. Encima de la grava se instaló una malla de polietileno con tamaño de poro de 0.3 mm. Este sistema se instaló al aire libre en dependencias de la Escuela de Ciencias del Mar de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Finalmente se rellenó con arena gruesa desinfectada y esterilizada hasta alcanzar una altura de 35 cm. La forma como se dispuso este sistema corresponde a la disposición de un lisímetro de drenaje para recolección de agua o lixiviados (Figura 4.2). Las plantas

seleccionadas para este estudio se enjuagaron y se secaron suavemente. Posteriormente las plantas se pesaron utilizando balanza de precisión (Jadever, JWE-6K), y se separaron en grupos de 4 plantas hasta alcanzar 1 Kg de peso total, las plantas se sembraron en cada HA instalado.

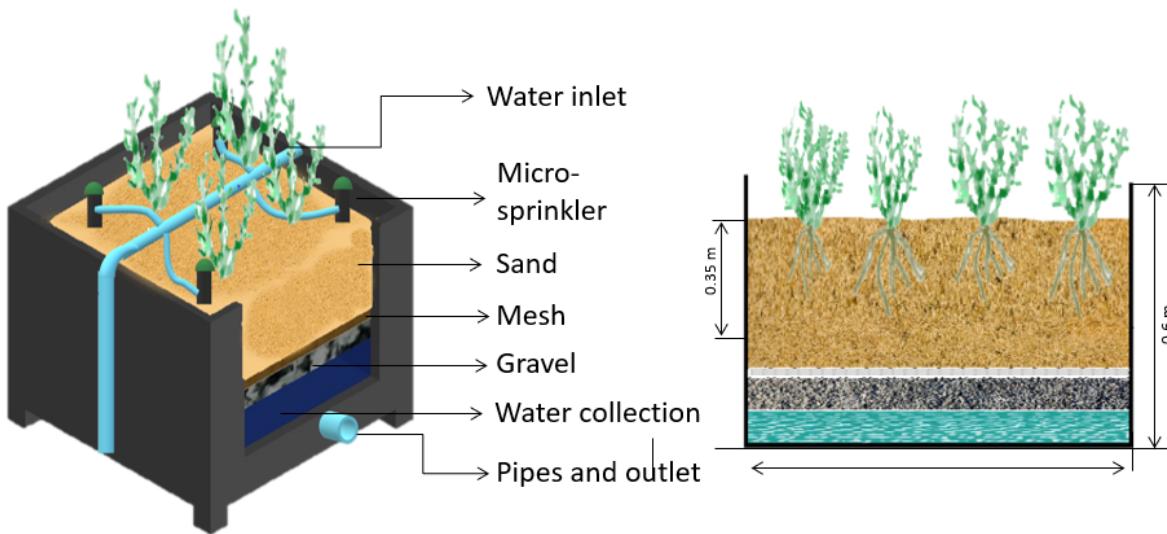


Figura 4.2 Instalación de lisímetro. El diagrama muestra el diseño de un lisímetro, mostrando la construcción general, entrada y salida de agua, sustrato (arena y grava separados por una malla) y microaspersores de riego.

Cada sistema de recirculación se conectó a un tanque reservorio de tratamiento que contenía solución nutritiva constituida (agua fertilizada) de acuerdo a cada tratamiento seleccionado (control, Nit, Nit + Amm). Los tanques reservorios estaban a su vez conectados a un tanque de almacenamiento principal que abasteció de agua de mar filtrada a cada sistema de recirculación. El tanque reservorio de tratamiento se equipó con una bomba de aireación (Sunsun HT -500) para promover los procesos de nitrificación biológica. El suministro de agua (influente) para cada humedal artificial se realizó con una bomba centrífuga de 0.5 HP (Humboldt, TPM60) instalada en cada tanque de tratamiento.

4.1.3. Funcionamiento de los sistemas

Cada humedal artificial fue suministrado diariamente con 30 L d^{-1} de agua fertilizada mediante un sistema de riego por aspersión, programado para funcionar durante 15 min. a las 09:00 y a las 17:00 h. Esto garantizó que una gran proporción del agua de riego penetre y se pueda recolectar en el fondo del lisímetro. El agua de drenaje (efluente) se devolvió a los respectivos tanques de recolección de cada sistema para cerrar el circuito de agua de

recirculación.

4.1.4. Medición de parámetros fisicoquímicos en el efluente

Los parámetros temperatura, oxígeno, salinidad y pH fueron registradas diariamente para determinar la calidad del agua. Las mediciones se efectuaron durante los ocho días consecutivos, después de la adición de nutrientes. Para medir la concentración de oxígeno disuelto, temperatura y pH del efluente se utilizó una sonda portátil multiparámetro (Hach HQ40D). Mientras que, para la salinidad se utilizó un refractómetro (RHS10ATC). Los equipos de medición fueron operados de acuerdo al manual de uso del fabricante. Los datos de temperatura ambiental, precipitaciones y humedad relativa se obtuvieron de los registros climáticos de la Oficina Meteorológica de Chile (Estación Torquemada-Viña del Mar) (Apéndice 1).

4.1.5. Cálculo de la biomasa formada

Para calcular el incremento de biomasa en las plantas de *S. neei*, se calculó la biomasa en inicio del ensayo (día 0) y la biomasa al final del ensayo (día 74). Para el cálculo de la biomasa al inicio y al final se utilizó una balanza de precisión (Jadever, JWE-6K). La formación de biomasa se calculó como¹⁵¹:

$$\mu = \frac{P_f - P_i}{t} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Dónde:

μ = Tasa absoluta de crecimiento (días^{-1})

P_i = peso fresco promedio inicial (g)

P_f = peso fresco promedio final (g)

t = tiempo en días

4.1.6. Medición de nitrato disuelto en el efluente

La concentración de componentes nitrogenados inorgánicos del efluente fue determinada

con un espectrofotómetro (Hach DR-3900). EN cuanto a la medición del nitrato (NO_3^- -N), se utilizó el método de reducción de cadmio (Hach8192), de acuerdo a manual del fabricante. Las mediciones del contenido de compuestos nitrogenados se realizaron inmediatamente tomadas las muestras de cada efluente, con el fin de evitar variaciones en los contenidos. La eficiencia de remoción de NO_3^- -N (ER) se calculó como³⁶:

$$ER = \frac{(C_i - C_o)}{C_i \times 100} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Dónde:

ER = Eficiencia de remoción

C_i = concentración de NO_3^- - N en el agua afluente el día 1

C_o = concentración de NO_3^- - N en el agua efluente el día 8 después de cada fertilización.

4.1.7. Análisis estadístico

Para comparar el aumento de la biomasa en el tiempo en cada uno de los tratamientos, los datos se analizaron utilizando un ANOVA de dos factores para observar la interacción entre los factores tratamientos (3 niveles: Nit + Amm, Nit y Control) y los días de cultivo (dos niveles: 0 y 74 días), con nivel de significancia de $p < 0,05$, después de confirmar la homogeneidad de la varianza. Adicionalmente, se llevó a cabo una prueba de Tukey post hoc con nivel de confiabilidad de 95% para comparar subconjuntos homogéneos. Se utilizó el software estadístico R¹⁵², ver *script* en apéndice 2, prueba ANOVA en apéndice 3 y prueba Tukey en apéndice 4 .

Para calcular la tasa de remoción del nitrato-nitrógeno (NO_3^- -N) en cada uno de los tratamientos, se realizaron modelos de regresión lineal con una variable dependiente de concentración de nitrógeno-nitrato (NO_3^- -N) y variables independientes días de cultivo y concentraciones simuladas de nitrógeno, utilizando la función “lm” en el software estadístico R¹⁵². Dado que la remoción del NO_3^- -N no fue lineal durante cada periodo de fertilización, se procedió a calcular la tasa de remoción para los días 1 a 4 separadamente de los días 5 a 8.

La mayor remoción de compuestos nitrogenados se presenta durante los primeros días cuando el efluente tiene mayor carga de nutrientes, relacionándose esto con una remoción dependiente de la concentración¹⁵³. Se consideraron significativas las probabilidades de p <0,05 (ver script de R en apéndice 2).

4.2. Materiales y métodos objetivo 3

4.2.1. Material vegetal

Recolección de material vegetal

Se recolectaron 60 plantas jóvenes silvestres de *Salicornia neei* en las salinas “Pullally” (Papudo, Chile; latitud, 32°24'50"S; longitud, 71°23'35" W) y posteriormente, se trasladaron a las instalaciones de Marine Farms Inc. (Laguna Verde, Chile, latitud 33°6'36" S; longitud 71°40'48" O). Finalmente, se desinfectó el material vegetal para evitar propagación de enfermedades en Marine Farms Inc.

Preparación de esquejes

De las plantas colectadas, se seleccionaron 54 plantas madre sanas para la extracción de esquejes de 10 a 15 cm de longitud. Todos los esquejes fueron preparados dentro de las 48 h de la recolección. AL finalizar este proceso, se produjeron 180 esquejes viables que fueron dispuestos en sistema acuaponico durante 6 meses con la especie langosta (*Jasus frontalis*) hasta alcanzar un sistema radicular fuerte.

Aclimatación de esquejes

155 esquejes lograron formar raíces los cuales fueron trasladados al laboratorio Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (Valparaíso, Chile, latitud 33 ° 1 ' 21 " S, longitud 71 ° 37 ' 57 " W), para su continuar con la aclimatación en condiciones controladas. Durante los 10 días posteriores al traslado, las plantas fueron sembradas en macetas de cultivo hidropónico con 500 mL agua de mar (600 mM de salinidad), filtrada con concentración de amonio basal de $28 \pm 6,5 \mu\text{M}$ y desinfectada luz ultravioleta para eliminar impurezas.

4.2.2. Instalación de experimento y biocinética de eliminación de amonio- Michaelis-Menten (M-M)

Diseño experimental

60 esquejes de los obtenidos en el punto anterior fueron utilizados para caracterizar la biocinética de eliminación de amonio de acuerdo a Michaelis-Menten. 4 plántulas o esquejes de peso promedio de $21,8 \pm 9,9$ g cada una, se distribuyeron aleatoriamente entre cinco tratamientos con 3 réplicas cada uno (ver figura 4.3). Se incluyó un blanco por cada tratamiento como control.

- Control: 500 mL Agua de mar + 0 mM L⁻¹ de NH₄Cl
- Tratamiento 1: 500 mL Agua de mar + 1 mM L⁻¹ de NH₄Cl
- Tratamiento 2: 500 mL Agua de mar + 2 mM L⁻¹ de NH₄Cl
- Tratamiento 3: 500 mL Agua de mar + 3 mM L⁻¹ de NH₄Cl
- Tratamiento 4: 500 mL Agua de mar + 4 mM L⁻¹ de NH₄Cl

La remoción de amonio se muestreó cada 60 min durante un período de 5 h. En cada punto de tiempo, se tomaron dos muestras de 1.5 mL de los tratamientos y control y se almacenaron en tubos Eppendorf para su posterior análisis de contenidos de amonio.

Determinación de la concentración de nitrógeno amoniacal total (NAT)

Para determinar la concentración del nitrógeno amoniacal total, se aplicó el método de Nessler (8038), y se utilizó un espectrofotómetro (HACH DR2800 a 452 + 2nm). Este método forma un color amarillo proporcional a la concentración de amoniaco presente en la muestra. El análisis implica los siguientes pasos:

1. Iniciar programa Ammonia Ness 380.
2. Llenar dos probetas graduadas de 25 ml, una con la muestra y otra con agua desionizada (blanco), agregando a cada una 3 gotas de mineral estabilizador, 3 gotas de alcohol de polivinilo y 1 ml de Reactivo de Nessler.
3. Invertir varias veces para mezclar, dejando un tiempo de reacción de 1 minuto.
4. Vertir 10 ml de solución de cada probeta en una celda por separado.

5. Insertar por separado ambas celdas en el soporte Hatch, donde las lecturas se expresaron en mg/L de NH₃-N

La tasa de absorción de amonio se expresó en $\mu\text{M NH}_4\text{Cl g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$. Después de la absorción, también se registraron los pesos frescos de las raíces.

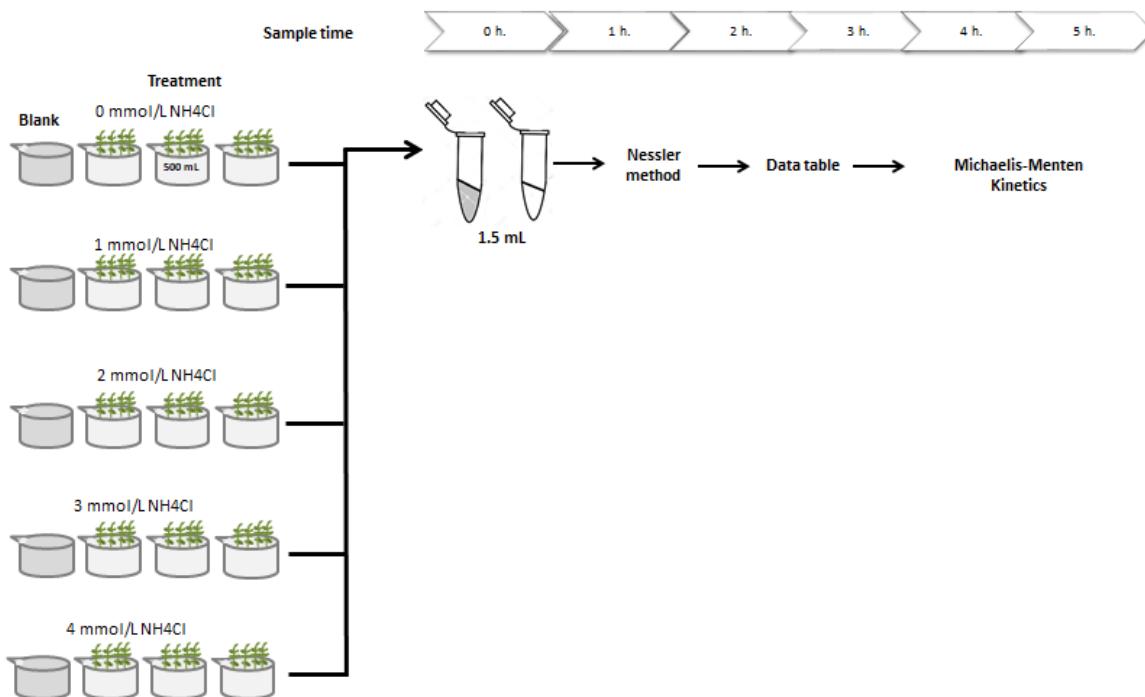


Figura 4.3 Diagrama de flujo. Configuración experimental utilizada para recolectar la muestra de solución para mediciones cuantitativas de cambios en la cinética del amonio

Biocinética de eliminación de amonio- Michaelis-Menten

La relación de Michaelis-Menten describe el transporte de iones mediado por portadores en términos de dos parámetros cinéticos V_{max} (tasa máxima de absorción) y K_m (concentración de sustrato donde la absorción procede a la mitad de la tasa máxima). La relación V_{max}/K_m , definida como la afinidad (A) incorpora ambos parámetros y es la pendiente inicial de la curva de la tasa de absorción frente a la concentración de sustrato. La afinidad proporciona un índice que describe las tasas de absorción frente a la concentración de sustrato a ventaja competitiva y una mayor afinidad¹⁵⁴.

La relación regresiva entre la tasa de absorción y la concentración de amonio en la solución

externa se ilustró con la ecuación de regresión de Michaelis-Menten.

$$I = \frac{Imax[C]}{Km+[C]} \quad Ecuación (3)$$

Utilizando esta ecuación de regresión, se estimó la tasa máxima (Imax) y la constante de saturación media (Km) de la absorción de amonio, y se construyó la representación gráfica del modelo.

Dónde:

I = tasa de absorción

$Imax$ = tasa de absorción máxima

Km = la media constante de saturación (constante de Michaelis-Menten)

C = concentración de iones en solución.

4.2.3. Instalación de experimento, extracción de ARN y preparación de libreras

Diseño experimental

24 esquejes previamente aclimatados en laboratorio en condiciones controladas fueron seleccionados y se sometieron a dos gradientes de NH₄Cl, considerando las concentraciones de amonio típicas en efluentes de acuicultura marina en tierra

- Control: 500 mL Agua de mar + 0 mM L⁻¹ de NH₄Cl
- Tratamiento: 500 mL Agua de mar + 3 mM L⁻¹ de NH₄Cl

Cada tratamiento se compuso de 3 macetas de plástico de cultivo hidropónico con 4 esquejes de peso promedio 21.8 ± 9.9 g. En todos los tratamientos se realizaron cosechas a las 0 - 0.5 - 1.5 - 2.5 y 5 hrs. De las plántulas cosechadas se extrajo aproximadamente 300 mg de tejido del tallo, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 ° C hasta la extracción del ARN total.

Extracción de ARN total

Una vez finalizado el muestreo de cada tratamiento, se procedió a realizar las extracciones

de ARN siguiendo el método de extracción “pine-trees” descrito anteriormente por Chang y colaboradores¹⁵⁵, con incremento de β-mercaptoetanol de acuerdo a Lal y colaboradores¹⁵⁶. El aumento β-mercaptoetanol en el buffer de extracción produce ARN no degradado y libre de fenólicos, alcanzando mayor purificación de las muestras. Seguidamente se continúo con los pasos propios del procedimiento con TRIzol Reagent (InvitrogenTM, Life Technologies). Este reactivo mantiene la integridad del ARN durante la homogeneización de los tejidos, y al mismo tiempo rompe las células y componentes celulares del tejido vegetal. En apéndice 5 se presenta el protocolo de extracción usado.

El ARN total aislado del tallo de las plantas de *S. neei*, se trató con DNase I para remover el ADN genómico. La concentración y pureza de ARN se midió usando NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), y la integridad del ARN se determinó electroforéticamente por medio de geles de agarosa al 1% como se describe en Meisel y colaboradores¹⁵⁷. En el apéndice 6, se describe los resultados de la medición de la concentración y pureza y el cálculo del número de integridad de ARN (RIN).

Librerías y secuenciación

Para llevar a cabo el análisis de RNA-seq se seleccionó una condición control fijada en 0 h con 0 mM de NH₄Cl, considerada sin estrés y otra condición considerada como estresante fijada a tiempo 2,5 h con 3 mM NH₄Cl (Figura 4.4). La construcción de las librerías de ARN mensajero y su posterior secuenciación fueron realizadas en Macrogen (Inc. Seúl, Corea del Sur) de acuerdo a protocolos. La construcción de las librerías fue llevada a cabo con el kit TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 para aplicaciones de extremo emparejado (paired-end), de Illumina. Mientras que la secuenciación se realizó utilizando la plataforma Solexa HiSeq2000.

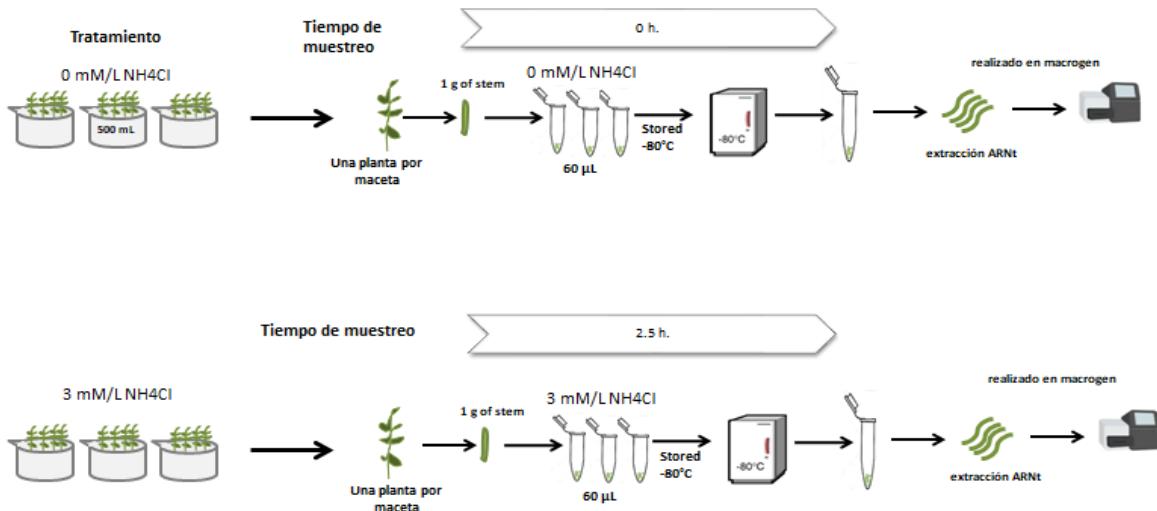


Figura 4.4. Diagrama de flujo. Configuración experimental usada para la colección de muestras de *S. neei* para la secuenciación.

El protocolo para la preparación del RNA-Seq de Illumina incluye aislación del RNA mensajero, fragmentación, síntesis de ADNc, ligación de adaptadores y selección del tamaño.

4.2.4. Procesamiento bioinformático de las secuenciaciones

Determinación calidad de las secuencias

Los datos de secuenciación masiva obtenidos, se analizaron con el software CLC Genomics Workbench v8.0 (CLC bio, Dinamarca). La data cruda (Raw Data) se filtró por calidad de las bases en cada posición, eliminando lecturas de baja calidad (Phred score, $Q \leq 20$). Se eliminaron lecturas con segmentos poli-N (lecturas que contienen más del 50% de bases desconocidas), lecturas cortas (< 50 pb) y por contenido de Guanina-Citosina (CG). También se procedió a la eliminación de secuencias adaptadoras usadas para secuenciación. Con las lecturas procesadas se continuó a la construcción del ensamblaje de *novo*.

Ensamblaje de *novo* y alineamiento de las secuencias

El ensamblaje de *novo* fue realizado a partir de una combinación de todos los datos de lectura-corta (short-read) con extremo emparejado (ensamblaje híbrido). Para esto se utilizó el algoritmo scaffolding-contig disponible en la función *de novo assembly* del programa CLC v 8.0 y se aplicó los siguientes parámetros: similarity fraction = 0.9; length fraction = 0.6; insertion/deletion cost = 3; mismatch cost = 3. Los datos brutos obtenidos de la

secuenciación se depositaron en la base de datos NCBI Short Read Archive (SRA) con el código de acceso SRR9694999 y se asignó el acceso de BioProject PRJNA554118.

Determinación de transcritos expresados diferencialmente

Para el análisis de la expresión diferencial se consideró como tratamientos, las lecturas del control (0mM NH₄Cl) y la condición estresante (3 mM NH₄Cl), fueron mapeados separadamente al recién ensamblado transcriptoma de *S. neei*, usando CLC Genomics Workbench, v.8.0, con los siguientes parámetros similarity = 0.9; length fraction = 0.6; maximum mismatches = 2; unspecific match limit = 10. Las expresiones génicas se basaron en lecturas por kilobase de transcripto por millón de lecturas mapeadas (RPKM).

Los niveles de transcripción relativa se definieron como el número de lecturas asignadas de forma única al gen. Mientras que los niveles de expresión se compararon utilizando una prueba Z¹⁵⁸ con la muestra 0 mM-NH₄Cl como referencia. Esta prueba compara conteos considerando las proporciones que componen la suma total de conteos en cada muestra, corrigiendo los datos por tamaño de muestra.

Para la inspección visual, los valores de expresión originales se transformaron mediante el método Log10 y luego se normalizaron mediante el método *Quantile* que era el mejor para ajustarse a los resultados¹⁵⁹. Como umbral significativo para la selección de genes con expresión diferencial, se adoptó un valor de p ajustado, utilizando la corrección de la tasa de descubrimiento falso FDR <0,001, valor absoluto de *fold change* 2,0 y p-value < 0,001.

Los genes con valor de *fold change* mayor a 2,0 se les consideró como genes sobreexpresados y aquellos con valor de *fold change* menor a -2,0 se consideró como genes reprimidos. Además, el p-value restringido solo permitió una probabilidad de encontrar 1% de falsos positivos.

Anotación funcional

El análisis funcional del conjunto de datos de *S. neei* se realizó mediante la búsqueda de la funcionalidad en la base de datos no redundante (nr) albergada en NCBI (National center for biotechnology information)¹⁶⁰, configurando los parámetros de la herramienta BlastX (el cual traduce las secuencias nucleotídicas a secuencias de aminoácidos), con un valor de corte e-

value < 1x10⁻⁵.

El análisis con BLASTX, permitió identificar las secuencias potencialmente homólogas, comparando la secuencias de nucleótidos traducida para todos los marcos de lectura frente a una base de datos de secuencias de proteínas. Seguidamente, debido a que el género *Salicornia* está pobemente representado en las bases de datos de proteínas, los contigs se alinearon con las bases de datos de nucleótidos NCBI de *Salicornia* (NT-Salicornia) usando BlastN con un valor de corte e-value < 1x10⁻⁶. Todo el análisis de anotación funcional se realizó con el software BLAST2GO¹⁶¹.

Análisis de enriquecimiento funcional

Para descubrir cuáles categorías se encuentran más representadas se procedió a realizar el análisis de enriquecimiento funcional del conjunto de datos de *S.neei*, mediante la prueba exacta de Fischer utilizando el software BLAST2GO¹⁶¹. Una vez anotados, se llevó a cabo el “mapping gene ontology” para alinear todos los Identificadores (IDs) de las secuencias obtenidas durante el “blast” contra la base de datos “Gene Ontology Annotation”. Una vez concluido el mapeo se efectuó el proceso de anotación, evaluándose información obtenida en el “blast” y “mapping” y asignándose los términos de ontología génica (GO). En este proceso, se recuperaron los términos ontológicos más fiables, teniendo en cuenta la jerarquía GO, la similaridad de las secuencias, la abundancia y calidad de la fuente de anotación. La calidad de la anotación se mejoró con la herramienta InterProScan en BLAST2GO, en la que los términos GO ya existentes se unen con los términos GO nuevos proveídos por la base de datos de IterProScan¹⁶². Posteriormente, los resultados fueron mapeados a la base de datos de vías de señalización de la Enciclopedia Kioto de Genes y Genomas (KEGG), obteniendo información de las principales vías metabólicas expresadas, en las que participan sus productos génicos. Se usó un valor de corte e-value < 1x10⁻⁵. En los análisis de enriquecimiento de GO y KEGG se incluyeron transcripciones con valores FDR <0,001 y con un nivel de expresión >2X o < -2X.

4.2.5. Resumen de etapas de trabajo

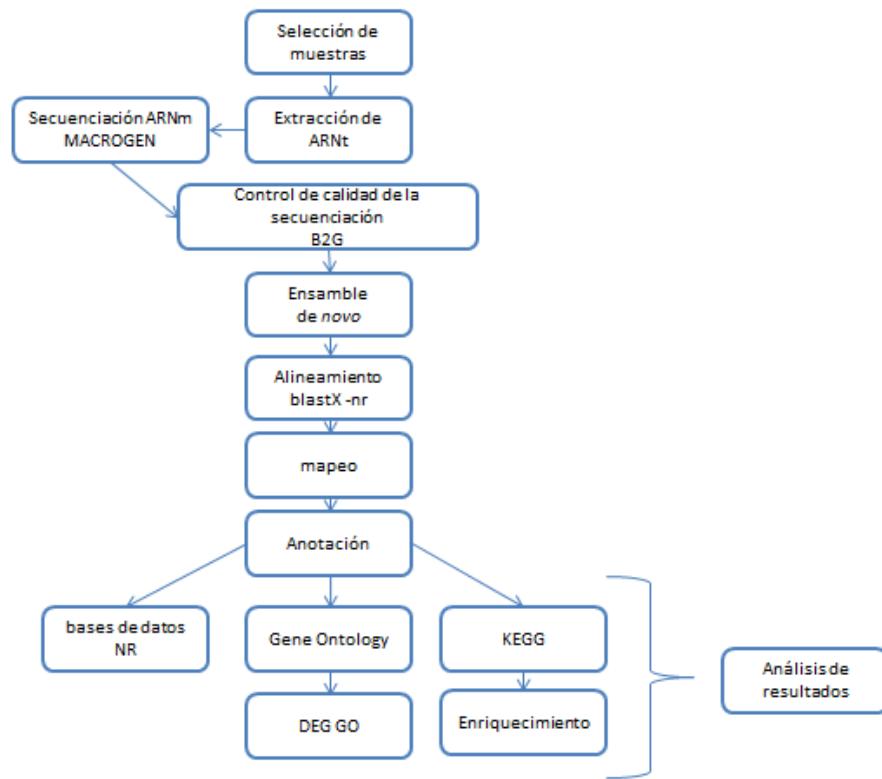


Figura 4.5 Diagrama de flujo. Se ilustran las etapas de trabajo y orden en el que fueron llevadas a cabo.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS

5.1. Resultados objetivos 1 y 2

5.1.1. Condiciones ambientales del sistema y del efluente

Los resultados de temperatura ambiental y humedad relativa se registraron durante 74 días, en el anexo 4, se observa la tendencia de las condiciones ambientales a través del periodo de tiempo evaluado. La temperatura media ambiental fue 16 ± 4 °C, siendo muy variable durante el día, con valores extremos de 9 y 31 °C y la humedad relativa (RH) fue de $77,8\% \pm 8,7\%$, con valores extremos de 60% y 95%. En el efluente, la temperatura fue generalmente superior a la temperatura ambiental, con una media de 20.5 ± 1.24 °C y un rango de 19.1 a 21.7 °C, y no se observaron diferencias entre tratamientos. El pH se mantuvo relativamente constante y sin diferencias entre tratamientos, mientras que la salinidad tuvo un aumento notable de una media de 40 g L^{-1} de NaCl el día 1 a una media de $51,5 \pm 0,19 \text{ g L}^{-1}$ de NaCl al final del experimento (Tabla 5.1). No se observaron diferencias significativas en la salinidad entre tratamientos ($p < 0.05$), ver apéndice 7.

Tabla 5.1 Parámetros fisicoquímicos medidos en el efluente de cada tratamiento. Temperatura, pH y salinidad (media \pm SE) registrados para el efluente de los sistemas de cultivo con *Salicornia neei*. La salinidad se expresa en gramos de cloruro de sodio por litro g L^{-1} . Los tratamientos se regaron con nitrato-N y amonio-N (Nit + Amm), nitrato-N (Nit), o solo con agua de mar (grupo de control). Cada entrada corresponde a un nuevo riego con nitrato-N y amonio-N (Nit + Amm), o nitrato-N (Nit). Se muestran los valores medios de tres humedales artificiales por tratamiento (\pm EE).

| Tratamiento | Input | Temperatura (°C) | pH | Salinidad (g L^{-1}) |
|-------------|-------|---------------------|---------------|------------------------------------|
| Nit + Amm | 1 | 18.2 ± 4.2 | 8.2 ± 0.1 | 40.6 ± 2.2 |
| | 2 | 18.8 ± 1.6 | 8.1 ± 0.1 | 44.9 ± 2.3 |
| | 3 | 20.8 ± 0.6 | 7.9 ± 0.1 | 48.5 ± 2.5 |
| | 4 | 20.2 ± 1.2 | 8.0 ± 0.1 | 47.5 ± 1.9 |
| | 5 | 20.6 ± 0.6 | 8.0 ± 0.1 | 48.0 ± 2.2 |
| Nit | 1 | 19.5 ± 4.7 | 8.2 ± 0.1 | 41.3 ± 1.9 |
| | 2 | 21.7 ± 3.3 | 8.1 ± 0.1 | 48.4 ± 2.2 |
| | 3 | 21.2 ± 0.8 | 7.9 ± 0.1 | 48.8 ± 3.2 |
| | 4 | 20.6 ± 1.4 | 8.0 ± 0.1 | 47.5 ± 2.1 |
| | 5 | 20.9 ± 0.7 | 7.9 ± 0.1 | 47.7 ± 2.4 |
| Control | 1 | 19.1 ± 4.3 | 8.2 ± 0.1 | 40.0 ± 0.0 |
| | 2 | 18.6 ± 1.5 | 8.0 ± 0.1 | 43.6 ± 2.1 |
| | 3 | 20.8 ± 0.5 | 8.0 ± 0.1 | 43.6 ± 2.1 |
| | 4 | 20.3 ± 1.2 | 8.2 ± 0.1 | 46.5 ± 2.6 |
| | 5 | 20.7 ± 0.5 | 8.2 ± 0.1 | 46.5 ± 1.6 |

5.1.2. Crecimiento y formación de biomasa

La producción de biomasa en los tratamientos Nit+Amm y Nit mostraron un aumento significativo en el peso fresco de 3.0 ± 0.6 g 11.3 ± 2.0 kg m $^{-2}$ y de 3.4 ± 0.1 g a 10.0 ± 0.8 kgm $^{-2}$, respectivamente (Figura 5.1).

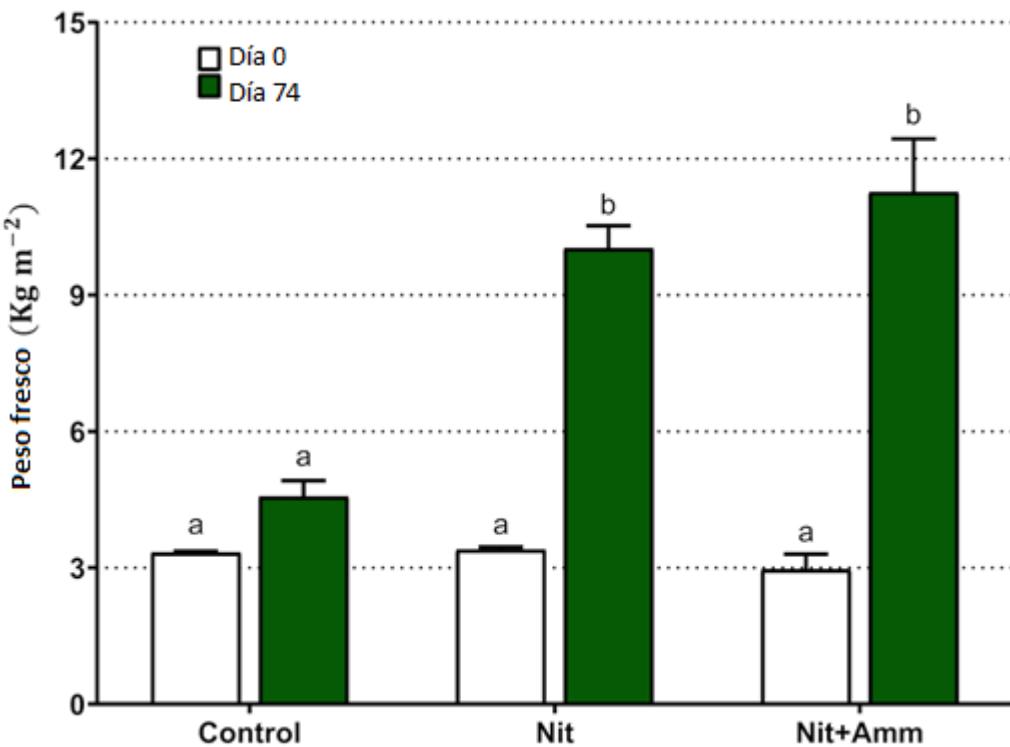
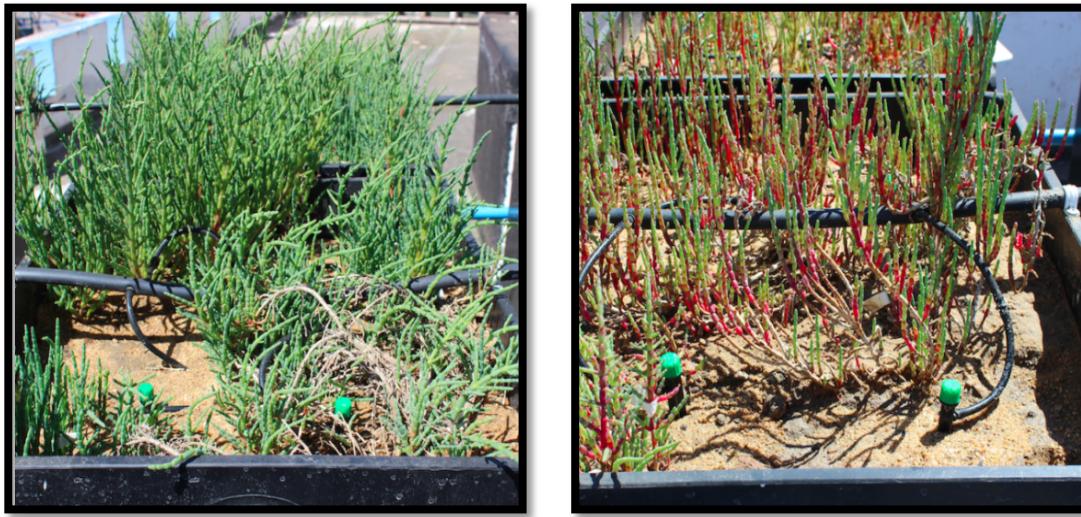


Figura 5.1 Producción de biomasa de *Salicornia neei* por tratamiento. Se expresa como rendimiento de peso fresco por unidad de área kg m $^{-2}$. Nit + Amm: corresponde a los tratamientos regados con nitrato-N y amonio-N, Nit: regado con nitrato-N, Control: tratamiento regado con agua de mar únicamente. Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre tratamientos. Se muestran los valores medios de tres lisímetros por tratamiento (\pm EE).

Aunque las plantas crecieron en el grupo de control, tal aumento de biomasa no fue significativo ($p = 0,61$). Las plantas regadas con agua de mar presentaron clorosis y acumulación de pigmento en tejido foliar, probablemente antocianina, lo que indicó estrés moderado en la planta, sin embargo, este fenómeno no se observó en ninguno de los dos tratamientos nitrogenados (Figura 5.2).



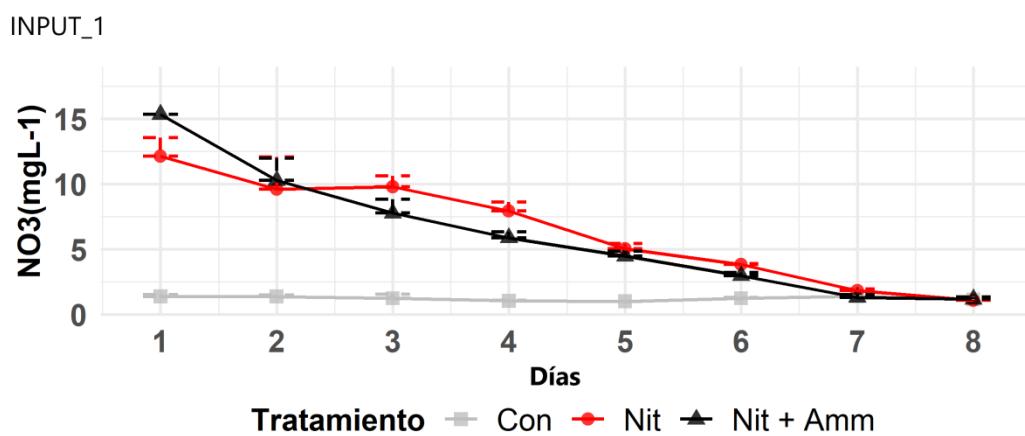
(a)

(b)

Figura 5.2 Imagen de dos humedales artificiales plantados con *Salicornia neei* al final del experimento (día 74). Imagen (a) plantas irrigadas con nitrato y amonio (Nit + Amm). Imagen (b) plantas regadas con agua de mar (Control).

5.1.3. Eficiencia de *Salicornia neei* en el tratamiento de efluentes salinos ricos en nitrógeno

Los datos de remoción de nitrato-N tomados en el efluente, mostraron una tendencia dependiente de la concentración no lineal (Figura 5.3). Se observó que las tasas de remoción de nitrato-N, disminuyeron cuando la carga de nitrógeno se redujo de $2,9 \pm 0,3 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (RR día 1-4) a $0,8 \pm 0,2 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (RR día 5-8) en el tratamiento Nit + Amm, y de $2,4 \pm 0,5 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (RR día 1-4) a $1,0 \pm 0,2 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ (RR día 5-8) en el tratamiento Nit (Tabla 4.2). El apéndice 8 se muestra el análisis de regresión lineal entre los días 1 -4 y los días 5 - 8.



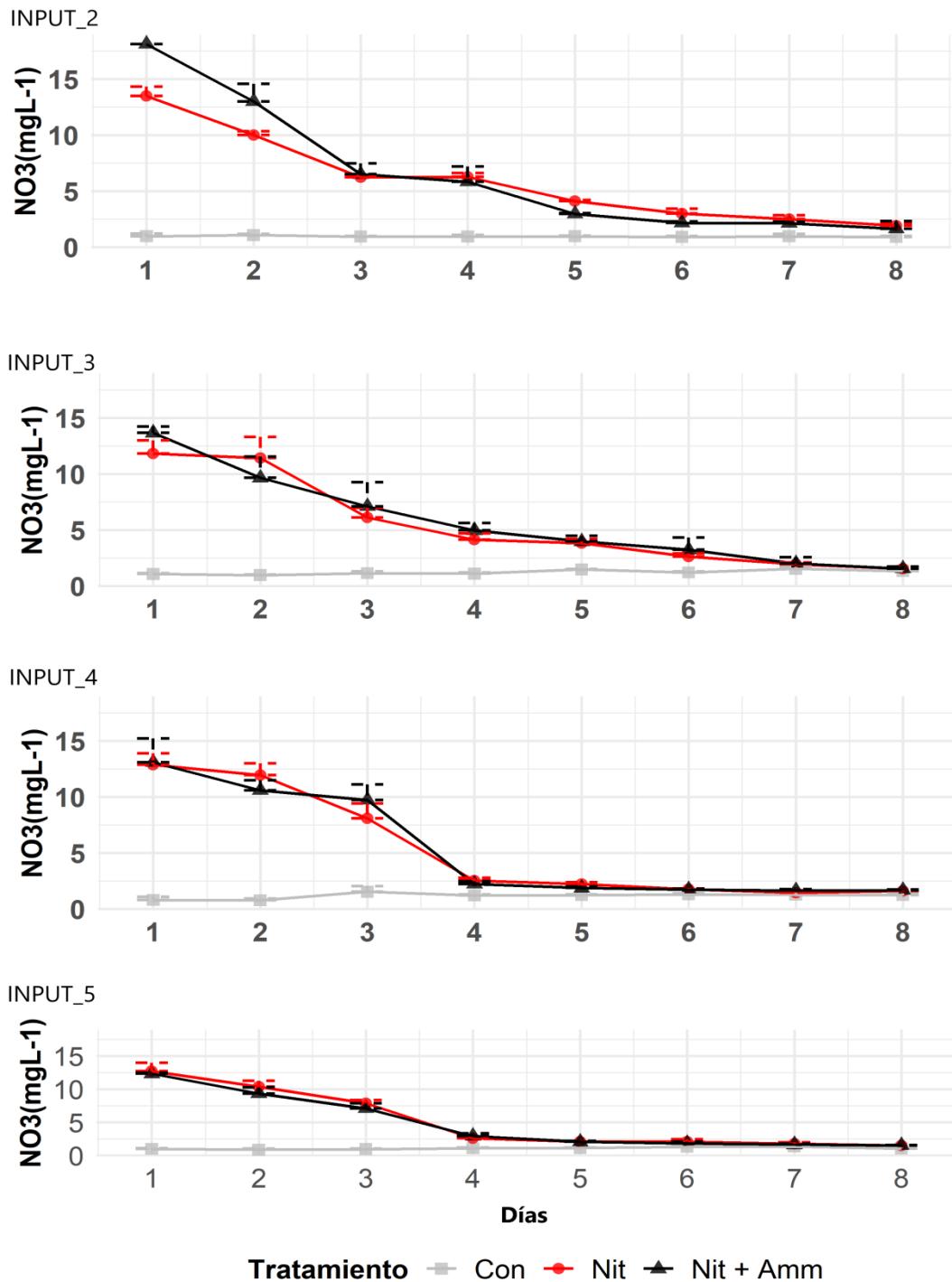


Figura 5.3 Eliminación de nitrógeno por cada tratamiento. La concentración de nitrato-nitrógeno (NO_3^-) en cada tratamiento se expresa en mg L^{-1} y se mide durante un período de 8 días a partir de la entrada de nutrientes durante 74 días de experimentación. Los tratamientos se regaron con nitrato-N y amonio-N (Nit + Amm), nitrato-N (Nit) o solo con agua de mar (grupo de control). Cada entrada corresponde a un nuevo riego con nitrato-N y amonio-N (Nit + Amm) o nitrato-N (Nit). Se muestran los valores medios de tres lisímetros por tratamiento ($\pm \text{SE}$).

La eficiencia de remoción de nitrógeno fue alta en cada tratamiento y durante todo el cultivo, manteniéndose entre 87% y 92% (Tabla 5.2). La salinidad del efluente aumentó de 40,6 a 49,4 gL⁻¹ durante el experimento, sin efectos perjudiciales observados en las tasas de eliminación de nitrato-N o en la eficiencia de eliminación de nitrógeno.

Tabla 5.2 Concentración de nitrato-nitrógeno (NO₃⁻N) en el agua afluente. El día 1 (Ci) y en el efluente el día 8 (Co), eficiencia de remoción (ER) y tasa de remoción (TR) para cada tratamiento regado con nitrato-N + amonio-N (Nit + Amm) y nitrato-N (Nit). Cada Input corresponde a un nuevo establecimiento de la fertilización directamente en cada tanque de tratamiento. Los sistemas de recirculación se encuentran asociados a tres humedales artificiales. Se muestran los valores medios de tres humedales por tratamiento (\pm EE).

| Tratamiento | Input | Ci (mg L ⁻¹) | Co (mg L ⁻¹) | ER (%) | TR Día 1–4 (mg L ⁻¹ d ⁻¹) | TR Día 5–8 (mg L ⁻¹ d ⁻¹) |
|-------------|-------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|--|--|
| Nit + Amm | 1 | 14.0 \pm 4.2 | 1.2 \pm 0.1 | 91.4 | 2.9 \pm 0.5 | 1.2 \pm 0.1 |
| | 2 | 17.7 \pm 2.2 | 1.8 \pm 0.7 | 89.8 | 2.0 \pm 0.3 | 0.3 \pm 0.1 |
| | 3 | 13.5 \pm 0.6 | 1.1 \pm 0.05 | 91.9 | 3.1 \pm 0.3 | 0.8 \pm 0.1 |
| | 4 | 12.9 \pm 2.1 | 1.7 \pm 0.1 | 86.8 | 3.6 \pm 0.5 | 0.0 \pm 0.0 |
| | 5 | 12.4 \pm 0.1 | 1.5 \pm 0.1 | 87.9 | 3.0 \pm 0.2 | 0.0 \pm 0.0 |
| | | Media | | 89.6 \pm 1.0 | 2.3 \pm 0.4 | 0.5 \pm 0.2 |
| Nit | 1 | 12.0 \pm 1.4 | 1.1 \pm 0.1 | 90.8 | 1.1 \pm 0.5 | 1.4 \pm 0.1 |
| | 2 | 13.3 \pm 0.8 | 1.8 \pm 0.2 | 86.5 | 1.2 \pm 0.3 | 0.6 \pm 0.1 |
| | 3 | 12.4 \pm 1.2 | 1.2 \pm 0.15 | 90.3 | 2.8 \pm 0.3 | 0.7 \pm 0.1 |
| | 4 | 13.2 \pm 1.0 | 1.6 \pm 0.1 | 87.9 | 3.7 \pm 0.5 | 0.2 \pm 0.0 |
| | 5 | 13.0 \pm 1.3 | 1.5 \pm 0.0 | 88.5 | 3.3 \pm 0.2 | 0.0 \pm 0.0 |
| | | Media | | 88.8 \pm 0.9 | 2.9 \pm 0.5 | 0.4 \pm 0.2 |

5.2. Resultados objetivo 3

5.2.1. Cinética de remoción de amonio

La tasa de remoción de amonio fue significativamente diferente de cero en todos los tratamientos, excepto en el control (ver Apéndice 9). La tasa de absorción de amonio aumentó con el aumento de la concentración de amonio en la solución externa y tendió a la saturación principalmente en el rango de 3 y 4 mM (Figura 5.4). Con el análisis de regresión, se encontró que las características cinéticas de la absorción de amonio por *S. neei* podrían ilustrarse con la ecuación de Michaelis-Menten al nivel significativo de p <0,001. Ver script en Apéndice 2.

Los parámetros cinéticos para la absorción de amonio se estimaron como la tasa máxima (I_{max}) = $6,91 \pm 0,32$ y la constante de saturación media (K_m) = $807,81 \pm 142,31$.

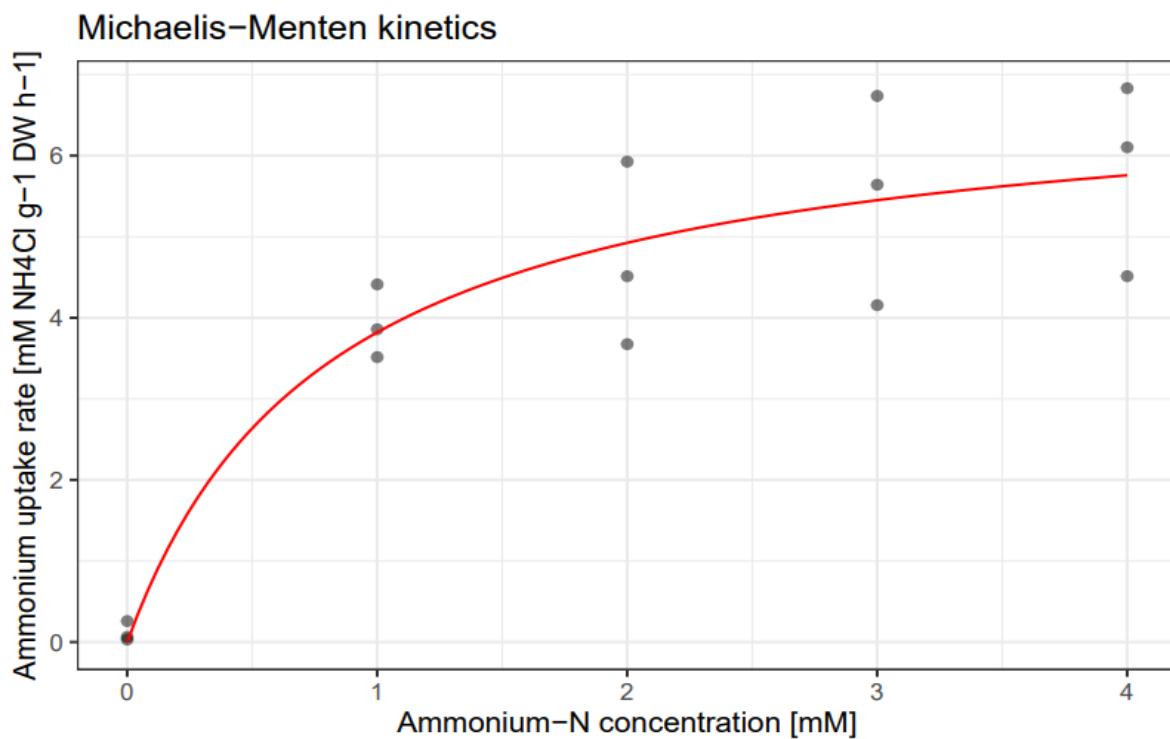


Figura 5.4 Biocinética de consumo de amonio. Ecuación de Michaelis-Menten, muestra la tasa de absorción de amonio en función de la concentración de amonio disponible.

5.2.2. Secuenciación y ensamble de novo

En la Tabla 5.3 se muestra los resultados que se obtuvieron de la limpieza de las lecturas con el software CLC Genomics Workbench v8.0. El total de lecturas crudas que se obtuvieron después de la secuenciación por la librería 0 mM y 3 mM NH₄Cl fueron 149.730.784. Luego del procesamiento por calidad se obtuvo un total de 146,780,108 lecturas limpias. Las lecturas de alta calidad se ensamblaron en transcritos o contiguos (contigs) utilizando lecturas de extremos emparejados, lo que resultó en 129,772 transcritos. Seguidamente se aplicó el criterio de calidad de N50 para seleccionar los mejores ensambles, terminando con la producción de 96,336 contigs no redundantes con una longitud promedio de 586 (Tabla 5.3 y 5.4).

Tabla 5.3 Resumen de RNA-Seq.

| Items | Librería 0mM NH ₄ Cl | Librería 3mM NH ₄ Cl |
|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Total bases | 7,251,152,186 | 7,573,638,722 |
| Total de lecturas crudas | 73,155,208 | 76,575,576 |
| Total de lecturas limpias | 71,793,586 | 74,986,522 |
| Longitud promedio por lectura | 101 | 101 |
| Contenido GC | 43.21% | 43.15% |
| %>Q30 | 93.76% | 93.47% |
| Total de contiguos | 96,336 | 96,336 |
| Longitud total de contig (pb) | 65,060,370 | 65,060,370 |
| Longitud promedio por contiguo (pb) | | 77 a 264 pb |

Tabla 5.4 Resumen de la construcción de transcritos.

| | Recuento | Longitud promedio en pares de bases (bp) | Total de pares de bases (bp) |
|------------------------|------------|--|------------------------------|
| Lecturas | 14,680,108 | 170 | 1,482,690,908 |
| Con matched | 13,106,972 | 101 | 1,323,804,172 |
| Sin match | 1,573,136 | 101 | 158,886,736 |
| Contigs crudos | 129,772 | 586 | 76,046,392 |
| Contigs no redundantes | 96,336 | 586 | 56,452,896 |

5.2.3. Visión general de la anotación de genes

Mediante BLASTX de los ensambles de *S. neei* provenientes de la condición control e inductora de estrés contra la base de datos nr albergada en NCBI, mostró la presencia de 10.316 genes contaminantes pertenecientes al género *Spodoptera* que fueron eliminadas del conjunto de 96.336 genes, resultando entonces en 86.020 genes de *S. neei*. De estas, 45.327 fueron anotadas con la base de datos nr de NCBI, 20.047 fueron anotados con la base de datos de COG y 37.784 fueron anotadas con GO (transcripciones). Además, mediante BLASTN, 32.609 genes se anotaron contra las secuencias de NT de *Salicornia* sp. Finalmente, un total de 13.906 fueron considerados como secuencias novedosas propias de *S. neei* que no encontró similitud con las con otras bases de datos (Figura 5.5).

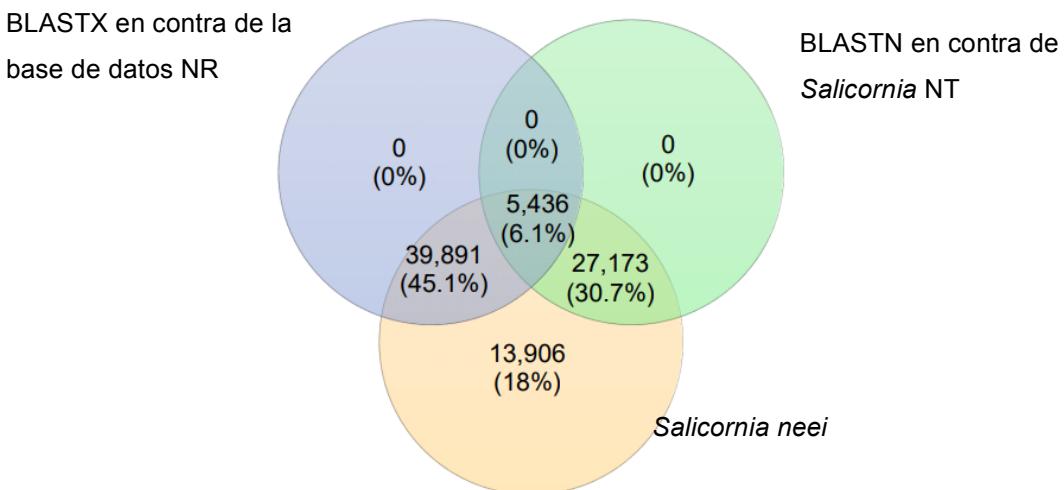


Figura 5.5 Diagrama de Venn de anotación de secuencias de *S. neei*. Se muestran blast significativos en contra de la base de datos nr (azul), secuencias NT - *Salicornia* (verde) y nuevas secuencias de *S. neei* que no coincidían con otras bases de datos (naranja).

5.2.4. Genes expresados diferencialmente

Para el análisis de la expresión diferencial del transcriptoma global de *S. neei* (86.020 contigs), se consideró la expresión de los genes bajo el tratamiento de 0 mM y 3mM de NH₄Cl y el parámetro de corte $\geq 2\text{-fold}$; $p<0.001$. Este análisis arrojó 9.140 genes expresados diferencialmente (DEGs, por sus siglas en inglés), de estos 7.040 genes fueron reguladas positivamente (sobreexpresados) y 2.100 reguladas a negativamente (subexpresados) en respuesta a la concentración de amonio en agua salina.

De los genes sobreexpresados diferencialmente, se identificaron genes relacionados con el mantenimiento de la homeostasis del amonio y metabolismo del amonio. En la Tabla 5.5, se presenta 10 genes reconocidos por estar involucrados en la homeostasis de niveles de amonio y biosíntesis de poliaminas con Log₂-fold change más alto.

Tabla 5.5 Top diez DEG implicados en la homeostasis del amonio y el metabolismo de las poliaminas en *Salicornia neei*.

| NCBI Accession | Differentially expressed protein -coding genes- | Rol | Log2-fold change |
|---|---|--|------------------|
| Ammonium homeostasis and polyamine metabolism | | | |
| GHTP01016006.1 | glutamine synthetase-GLN1 | Plays an essential role in the metabolism of nitrogen by catalyzing the condensation of glutamate and ammonia to form glutamine | 100,000 |
| GHTP01002667.1 | ammonium transporter 3 member 1-like AMT3.1 | Involved in ammonium transpor | 7,75 |
| GHTP01006207.1 | pyrroline-5-carboxylate synthetase P5CS | Plays a key role in proline biosynthesis, leading to osmoregulation in plants | 5,68 |
| GHTP01009881.1 | glutamate synthase 1 [NADH], chloroplastic isoform X1 | Catalyze reactions that convert α -ketoglutarate and ammonia to glutamate, which is then used in a wide variety of biosynthetic reactions | 5.19 |
| GHTP01037737.1 | ferredoxin-dependent glutamate synthase, chloroplastic Fd-GOGAT | Has a primary role in photosynthetic tissues | 4.29 |
| GHTP01000190.1 | high affinity nitrate transporter 2.5-like NRT2.5 | Might be involved in the transfer of nitrate from stored pools to cytoplasm | 4.18 |
| GHTP01019462.1 | arginine decarboxylase ADC | Important enzyme responsible for putrescine biosynthesis | 2.36 |
| GHTP01012076.1 | S-adenosylmethionine decarboxylase | Key enzyme in higher polyamine (PA) biosynthesis | 2.25 |
| GHTP01012076.1 | adenosylmethionine decarboxylase proenzyme SAMDC1 | Plays an essential regulatory role in the polyamine biosynthetic pathway | 2.25 |
| GHTP01019486.1 | polyamine oxidase 1 PAO1 | Involved in the production of hydrogen peroxide in response to salt and cold stresses | 2,04 |

De acuerdo al análisis bioinformático del transcriptoma de brotes de *S. neei* bajo estrés nutricional por amonio, se identificaron los genes relacionados con el mantenimiento de la homeostasis del amonio y sus respuestas moleculares de tolerancia. Se identificó un conjunto de 91 regulados diferencialmente involucrados en el metabolismo del amonio, de los cuales 72 genes fueron regulados positivamente y 19 regulados negativamente. Se encontraron glutamato sintasa dependiente de ferredoxina, cloroplástica 4,29-fold (Fd-GOGAT), glutamina sintasa 10000-fold, 2-oxoglutarato dehidrogenasa 2,34-fold y con estos

transportadores de amonio (AMT-1) 7,75-fold implicados directamente en la entrada de amonio y en su regulación al interior de la célula. Otros genes sobreexpresados que se encuentran relacionados en el metabolismo del nitrógeno fueron delta-1-pirrolina-5-carboxilato sintasa 5,68-fold y glutamina sintasa (GS) 100.000-fold esta última expresada únicamente en la condición con amonio (Apéndice 10).

Adicionalmente, encontramos genes sobreexpresados positivamente que se encuentran en las rutas de la biosintéticas y metabólicas de poliaminas, entre estos genes que alcanzaron en log₂-fold change > 2 y P-value = 0.001 fueron arginina descarboxilasa-1 (ADC1) 2.36-fold, Proenzima de S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC1) 2.25-fold, poliamina oxidasa-1 (PAO-1) 4,6-fold. Con esta información se construyó una posible ruta de respuesta a altas concentraciones de amonio en *S.neci* (Tabla 5.5, Figura 5.6)

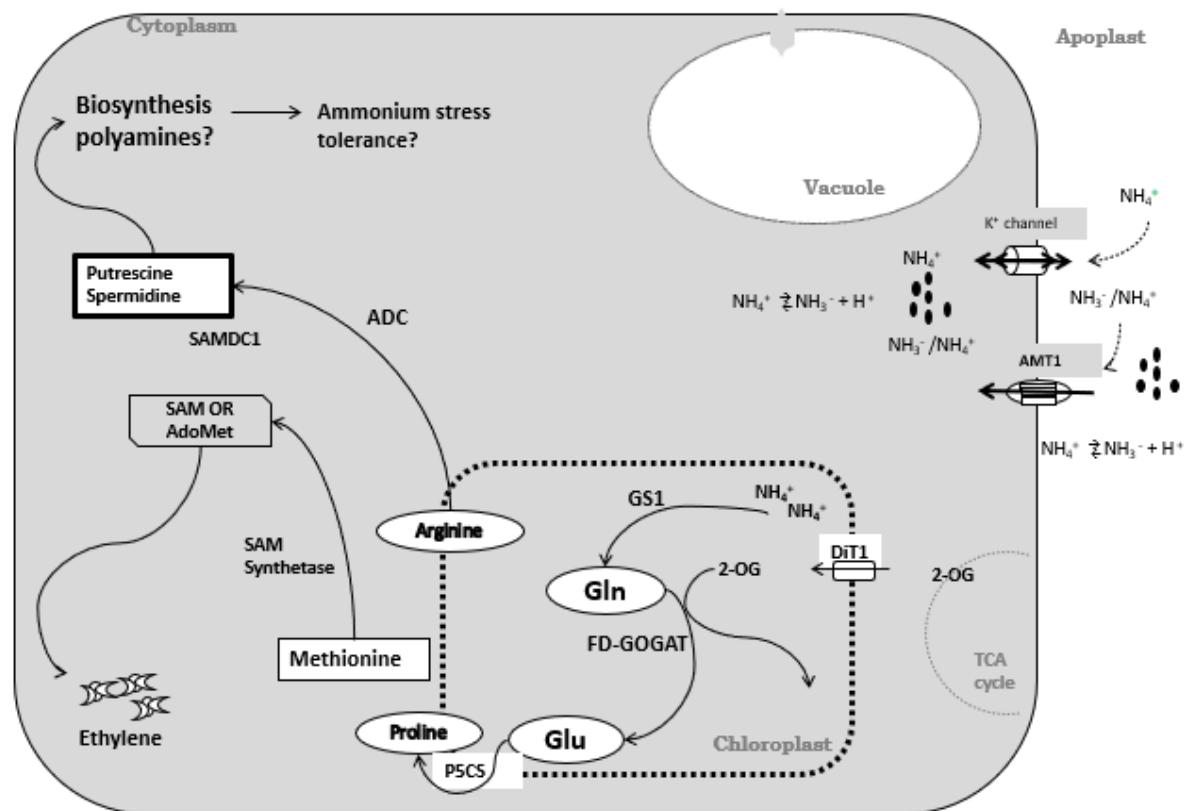


Figura 5.6 Posible modelo de biosíntesis de poliaminas y metabolismo del amonio en *Salicornia neei*. Los DEG principales que fueron modulados por NH₄⁺: transportador de amonio 1 (AMT1), glutamina sintetasa 1 (GS1), glutamato sintasa dependiente de ferredoxina (Fd-GOGAT), glutamato (Glu), glutamina (Gln), pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS), 2-oxoglutarato (2-OG), transportador de

dicarboxilato 1 (DiT1), arginina descarboxilasa (ADC), S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC1), ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y canal de potasio K.

Continuando con el análisis, al explorar las respuestas comunes y específicas de los brotes de *S. neei* al estrés por amonio, investigamos a través de DEG regulados al alza pero ahora con énfasis en la activación de hormonas vegetales de respuesta a estrés. Un total de 102 genes regulados positivamente y 17 regulados negativamente se encontraron relacionados con la biosíntesis de ácido abscísico (ABA) y etileno (ET) alcanzaron Log₂-fold change superior a 2-fold (Tabla 5.6, Apéndice 11).

Tabla 5.6 Top cinco de DEG relacionados con la respuesta hormonal ABA y ET en *Salicornia neei*.

| NCBI Accession | Differentially expressed protein - coding genes- | Role | Log2-fold change |
|------------------------------|---|--|------------------|
| Crosstalk between ABA and ET | | | |
| GHTP01022642.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF109-like | May be involved in the regulation of gene expression by stress factors and by components of stress signal transduction pathways | 100,000 |
| GHTP01045464.1 | heat stress transcription factor A-3 HsfA3 | Conferring salt tolerance | 4.93 |
| GHTP01059070.1 | ABA responsive element binding factor | Transcription factors that regulate expression of target genes involved in plant tolerance to drought, high salinity, and osmotic stress | 4,2 |
| GHTP01023420.1 | ethylene-insensitive protein 2 isoform X1 EIN2 | Might take part in multiple hormone signalling pathways and in response to pathogens as demonstrated by recent genetic and biochemical studies | 2.39 |
| GHTP01022623.1 | Dehydration-responsive element-binding protein DREB2A | Play a critical role in plant development and abiotic stress-mediated gene expression | 2.05 |

5.2.5. Asignación de terminología GO a genes

Se asignó un total de 150.944 términos GO a 37.784 (43,9%), en varios casos las secuencias obtuvieron varios términos (media = 4, DS = 2,6). En total se asignaron 11 términos GO a procesos biológicos, 10 a funciones moleculares y 7 términos GO a componentes celulares. En la categoría de procesos biológicos (BP), los términos con mayor frecuencia fueron procesos metabólicos de sustancias orgánicas, procesos metabólicos celulares (GO:0044237, 17.526), procesos metabólicos primarios

(GO:0044238, 17.076), procesos metabólicos de compuestos nitrogenados (GO:0006806, 15.136). Se resalta la presencia de este último término, debido a que los genes asignados con este término GO se relaciona con las reacciones químicas y las rutas metabólicas que involucran compuestos orgánicos e inorgánicos que contienen nitrógeno. Como fijación del nitrógeno, nitrificación, desnitrificación, procesos de asimilación y reducción del nitrógeno, inter-conversión del nitrógeno orgánico y amonio.

En función molecular, la mayor de frecuencia fue en unión de compuestos cíclicos (GO:0097159, 12.347), de heterocíclicos (GO:1901363,12.307) y de iones (GO:0043167, 10.078), seguidos por actividad de transferasa (GO 0016740, 8.257) que está especialmente involucrado con la catálisis de la transferencia de grupos metilo, grupos glicosilo, grupos acilo, que contienen fósforo u otros grupos de compuestos donantes a otro compuestos aceptores. Además, algunos genes asignados con este término GO están involucrados en la transferencia de grupos nitrogenados, particularmente aminotransferasas o transaminasas. El componente celular (CC) más representado fue estructura anatómica intracelular (GO:005622, 18.042), orgánulo (GO:0043226, 15.242) y membrana (GO:0016020 ,13.249), que consiste en productos de genes y complejos proteicos que están en la región hidrofóbica de la membrana (ver Figura 5.7).

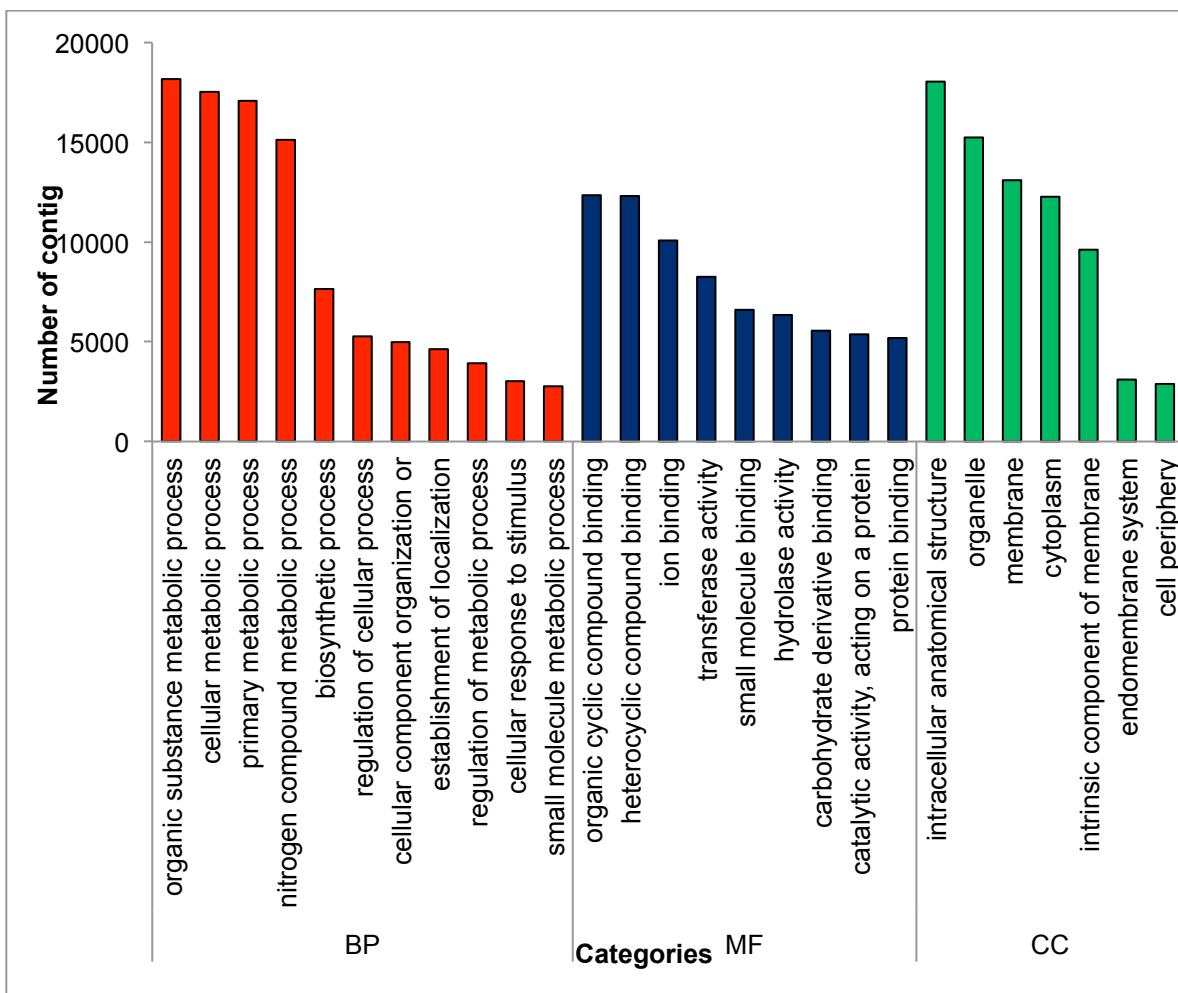


Figura 5.7 Histograma de la clasificación de ontología genética (GO). 37,784 secuencias de *S. neei* fueron asignadas a las tres categorías principales: proceso biológico, componente celular y función molecular.

5.2.6. Ontología génica (GO) de genes expresados diferencialmente

La recuperación de términos GO para los genes expresados diferencialmente arrojó un total de 4.850 DEG de *S. neei*. De estos 3.721 corresponden a genes sobreexpresados y 1.129 genes subexpresados. En la Figura 5.8 se muestran los genes con ≥ 3 -fold, lo cual indica tres veces más genes regulados al alza a 3 mM de amonio, en comparación con 0 mM de amonio. Los términos recuperados se dividieron en 67 términos en tres categorías, los cinco primeros termino GO con mayor frecuencia fueron entidad anatómica celular (GO:0110165, 2.579), procesos celulares (GO:0009987, 2.335), procesos metabólicos (GO:0008152, 2.010), actividad catalítica (GO:0003824, 1.852) y procesos metabólicos de sustancias orgánicas (GO:0071704, 1.748).

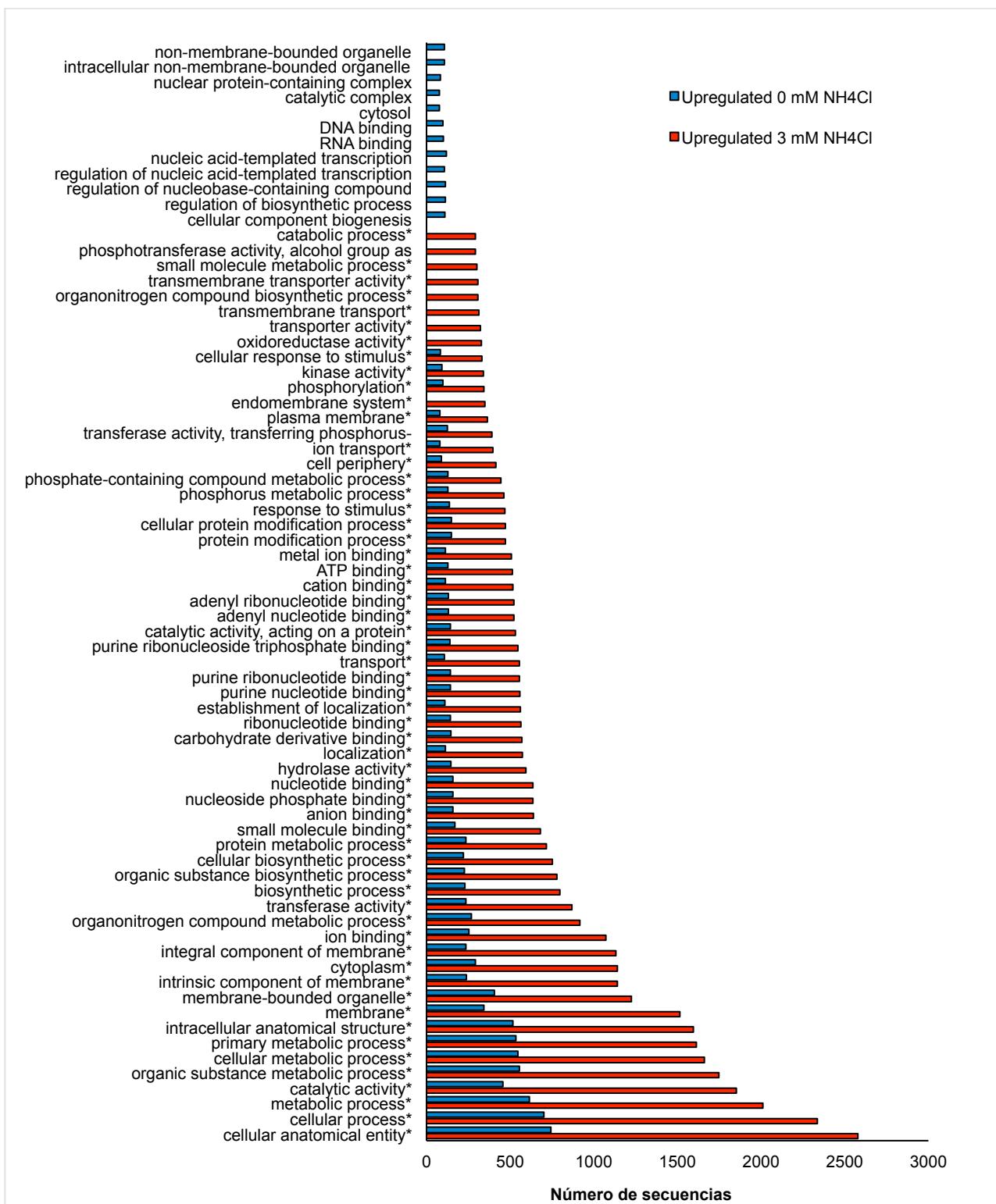


Figura 5.8 Histograma de clasificación de ontología genética de los genes con expresión diferencial de *S. neei*. El asterisco (*) indica tres veces más transcripciones reguladas al alza a 3-mM de amonio en comparación con 0-mM de amonio.

Además, los términos GO expresados de forma única bajo la nutrición con amonio (3 mM-NH₄Cl) en la comparación con el control (0 mM-NH₄Cl) fueron actividad oxidorreductasa (GO:0016491, 328), actividad transportadora (GO:0005215, 321) y transporte transmembrana (GO:0055085, 313). Los genes asignados con estos dos últimos términos se relacionan principalmente con el transporte de sustancias o solutos a través de poros en la membrana lipídica.

5.2.7. Análisis de enriquecimiento de genes expresados diferencialmente

Todos los genes expresados diferencialmente (DEG) se analizaron mediante análisis de enriquecimiento de términos de ontología génica (GO). Este análisis de enriquecimiento se realizó por separado para los genes regulados positivamente en 3 mM- NH₄Cl y para los genes regulados en 0 mM- NH₄Cl. Permitiendo mejorar la compresión de los aspectos moleculares de respuesta a frente a una condición control y una condición estresante para la planta *S. neei*.

En la categoría de procesos biológicos, los genes fueron asignados en las funciones transporte transmembrana (GO:0055085, FDR=1.77E-09), actividad transportadora (GO:0005215, FDR=1.09E-11), transporte de iones transmembrana (GO:0034220, FDR= 1.77E-09), procesos metabólicos celulares del glucano (GO:0006073, FDR=5.55E-09) (Figura 5.9, Apéndice 12. Estas funciones de genes pueden ayudar a la célula a cambiar la presión osmótica mediante el transporte de sustancias, mejorando la capacidad de respuesta a estrés.

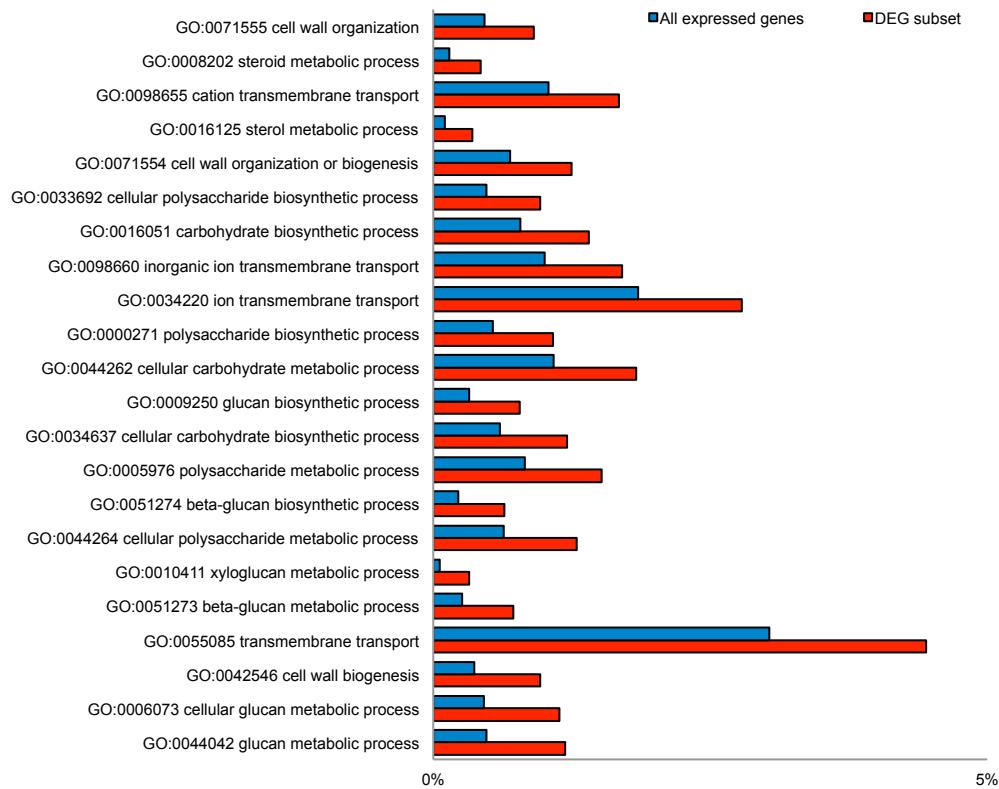


Figura 5.9 Procesos biológicos enriquecidos en el tratamiento de 3-mM-NH₄Cl. Número de genes enriquecidos en cada categoría de GO expresado como porcentaje del número total de genes expresados FDR <= 0,001.

En componentes celulares, la función de genes principalmente incluye membrana (GO:0016021, 1.83E-11) y periferia celular (GO:0071944, FDR= 4.38E-14) (Figura 5.10). En la categoría función molecular, los genes fueron principalmente distribuidos en actividad de transportador de membrana (GO:0022857, FDR= 1.21E-11), actividad transportadora (GO:0005215, FDR= 1.09E-11), actividad transportadora de iones transmembrana (GO:0015075 , FDR=1.09E-11) (Figura 5.11, Apéndice 13) . Estos términos enriquecidos frecuentemente se asocian con procesos fisiológicos indispensables en las plantas como nutrición mineral, almacenamiento de solutos, metabolismo celular, señalización celular, osmoregulación, crecimiento celular y respuesta a estrés.

Los términos enriquecidos en el control en la categoría de procesos biológicos fueron procesos metabólicos del ácido nucleico (GO:0090304, FDR= 9.75E-9), expresión génica (GO:0010467, FDR= 1.57E-5), procesos metabólicos del ARN (GO:0016070, FDR=4.01E-5) (Figura 5.12). No se observaron componentes celulares ni funciones biológicas enriquecidas

en el control.

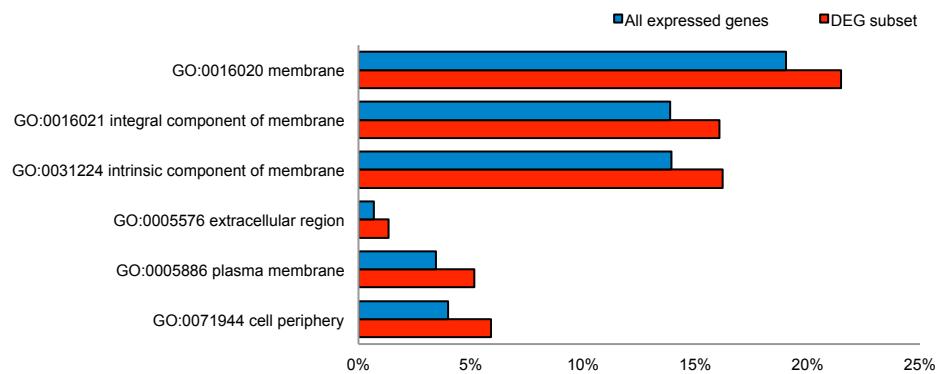


Figura 5.10 Componentes celulares enriquecidos en tratamiento 3-mM-NH₄Cl. Número de genes enriquecidos en cada categoría de GO expresado como porcentaje del número total de genes expresados FDR <= 0,001.

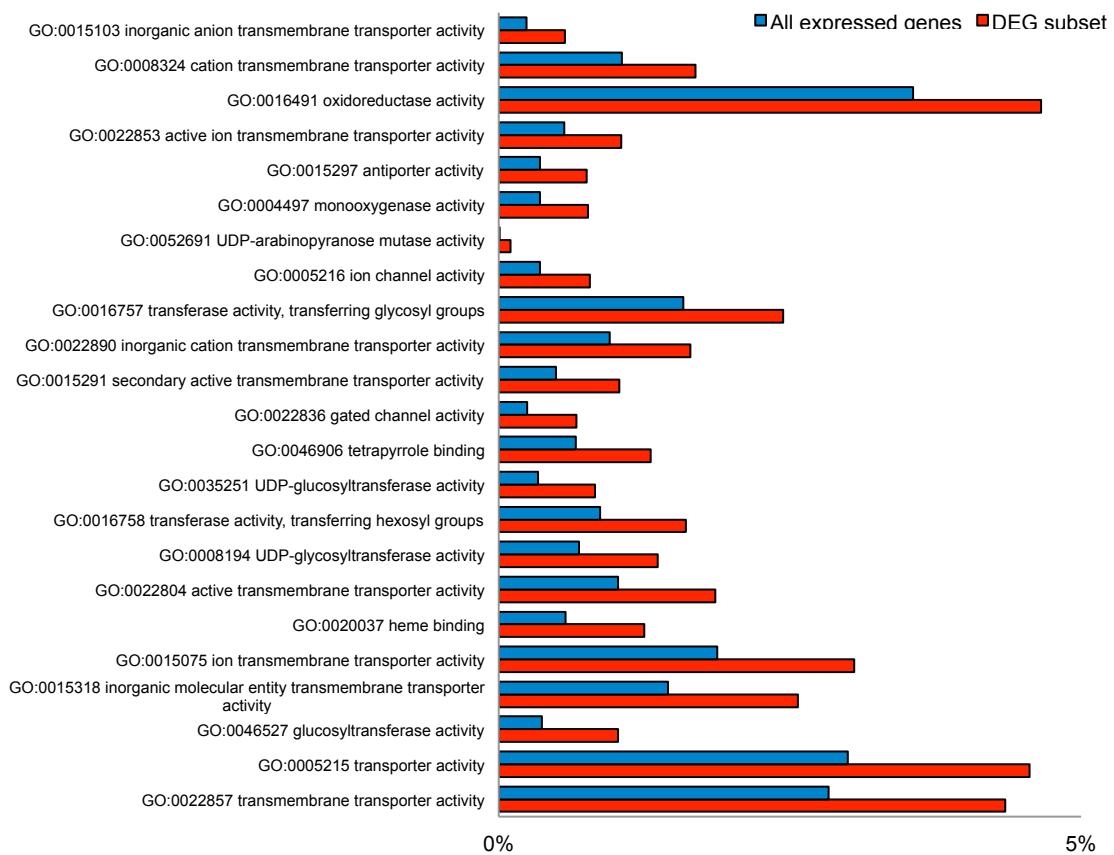


Figura 5.11 Funciones moleculares enriquecidos en tratamiento 3-mM-NH₄Cl. Número de genes enriquecidos en cada categoría de GO expresado como porcentaje del número total de genes expresados FDR <= 0,001.

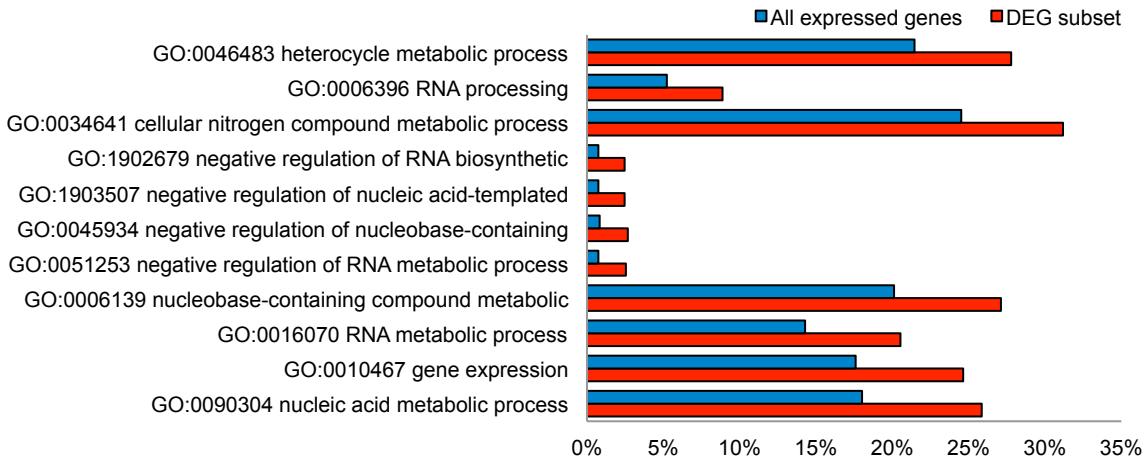


Figura 5.12 Procesos biológicos enriquecidos en el control 0-mM-NH₄Cl. Número de genes enriquecidos en cada categoría de GO expresado como porcentaje del número total de genes expresados FDR <= 0,001.

5.2.8. Anotación funcional de rutas metabólicas en KEGG

Para visualizar las rutas metabólicas involucradas, se utilizó la base de datos KEGG que permitió obtener información del potencial metabólico de la planta codificado en el genoma. El 23% de las secuencias correspondientes a los genes sobreexpresados en 3mM NH₄Cl (7.040), obtuvieron significancia en diversas rutas metabólicas. Las rutas globales con mayor número de genes sobreexpresados fueron biosíntesis de metabolitos secundarios (31.2%), biosíntesis de aminoácidos (11.4%), biosíntesis de cofactores (12.5%). También las rutas metabólicas de carbohidratos (9.7%), metabolismo energético (4.8%) mostraron varios genes sobreexpresados. En la Tabla 5.7 se resume las rutas metabólicas que tuvieron mayor número de genes asociados.

Los genes sobreexpresados (2.100) en 0 mM NH₄Cl, el 18.7% están involucrados principalmente en el metabolismo de purinas y tiaminas; y Transducción de señales de hormonas vegetales.

Tabla 5.7. Top diez de rutas con mayor número de transcritos asociados. Resumen de la distribución de las vías encontradas en KEGG.

| Ruta metabólica | KEGG Pathway | Secuencias asociadas |
|------------------------------------|--------------|----------------------|
| Thiamine metabolism | map00730 | 171 |
| Purine metabolism | map00230 | 175 |
| Biosynthesis of antibiotics | map01130 | 114 |
| Starch and sucrose metabolism | map00500 | 70 |
| Plant hormone signal transduction | map04075 | 53 |
| Phenylpropanoid biosynthesis | map00940 | 52 |
| Drug metabolism - other enzymes | map00983 | 35 |
| Arginine and proline metabolism | map00330 | 28 |
| Cysteine and methionine metabolism | map00270 | 32 |
| Nitrogen metabolism | map00910 | 25 |

Mediante una búsqueda en la base de datos COG, se identificaron 20.047 (23,3%) secuencias asignadas a 25 grupos funcionales específicos. Los tres grupos más altos fueron "S: Función desconocida" (9.012, 44,9%), "Mecanismos de transducción de señales" (3.031, 15,1%) y "O: Modificación postraduccional, recambio de proteínas, acompañantes" (2948, 14,7%). Además, otros grupos importantes, estrechamente relacionados con la respuesta nutricional del amonio y la respuesta al estrés fueron "E: transporte y metabolismo de aminoácidos" (1391, 6,9%), "Q: Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios" (883, 4,4%), "M: pared celular / membrana / biogénesis de la envoltura" (486), "V: Mecanismos de defensa" (259, 1,2%) (ver Figura 5.13).

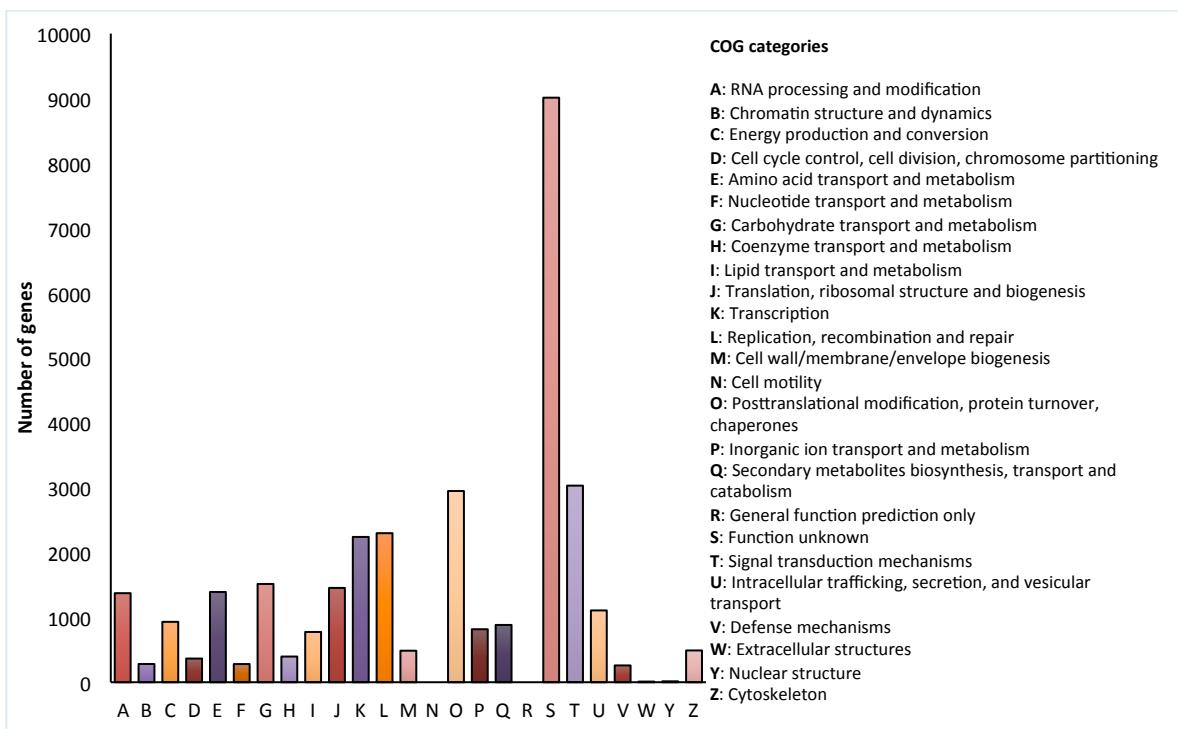


Figura 5.13 Histograma de la clasificación COG. Se asignó un total de 20.047 *Salicornia neei* contigs a una o más categorías funcionales del COG. Las letras en el eje x representan diferentes categorías COG. El eje y representa el número de contigs que participan en diferentes categorías de COG.

CAPÍTULO 6

6. DISCUSIÓN

En la primera parte de la tesis se evaluó el desempeño de los HA plantados con *S. neei*, para utilizarlos, como sumideros de nitrógeno en el tratamiento de efluentes salinos contaminados con altas cargas de compuestos nitrogenados provenientes de la acuicultura marina en tierra. Paralelamente, en esta primera parte se determinó la producción de biomasa cuando *S. neei* es nutrida con una fuente de nitrato (Nit) o nitrato + amonio (Nit + Amm). En la segunda parte de la tesis, mediante un análisis transcripcional y bajo un enfoque de RNA-Seq, se realizó un acercamiento para comprender los mecanismos moleculares de *S. neei* de tolerancia que le permiten sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de salinidad y utilizar amonio como fuente de nutrición, dos condiciones consideradas como inductoras de estrés en las plantas.

6.1. Discusión de objetivos 1 y 2

Las tecnologías ecológicas aumentan constantemente en respuesta a los procesos degenerativos de los ecosistemas. En este sentido, la utilización de plantas halófitas como biofiltros de compuestos nitrogenados acumulados en los efluentes salinos provenientes de sistemas de recirculación en la acuicultura marina, ha sido propuesto como una alternativa adecuada viable para asegurar el desarrollo sostenible de la acuicultura marina en tierra para la gestión de las aguas residuales¹⁶³. Estudios han señalado que especialmente plantas del género *Salicornia* y *Sarcocornia*, funcionan como biofiltros eficientes para la eliminación de nutrientes de los efluentes de la acuicultura marina en tierra. Además, estas plantas cuentan con un gran valor económico porque producen altos rendimientos de valiosos subproductos vegetales, semillas oleaginosas y variedad de materias primas para la industria farmacéutica⁷. Recientemente, se demostró experimentalmente que algunas halófitas incluyendo *S. neei*, tienen el potencial para extraer contaminantes inorgánicos de las aguas residuales salinas, como nitratos y fosfatos^{33, 163} y en el caso de *S. neei*, podría ser eficientemente utilizada para el tratamiento de efluentes desechados de la acuicultura marina en tierra en Suramérica¹⁶³.

Parámetros fisicoquímicos del efluente

Los HA se encuentran influenciados por el clima, lo que provoca patrones recurrentes en la evapotranspiración, la fotosíntesis y la actividad microbiana¹⁶⁴. En estos sistemas los parámetros fisicoquímicos del efluente, como la temperatura, el pH y la salinidad son especialmente importantes en el tratamiento de aguas residuales salinas porque afectan los procesos determinantes en la remoción de compuestos nitrogenados¹⁶⁵.

El efecto de la temperatura se refleja principalmente en el confort de los macrófitos (plantas) y en la población microbiana que realizan los procesos de eliminación de nutrientes. Akpor et al.¹⁶⁶, informaron que la eliminación de nutrientes se produce a una temperatura óptima de 30 ° C. Mientras que Song et al.¹⁶⁷, observaron que la eficiencia de remoción de nutrientes fue mayor en las temporadas de verano y primavera (66.3 y 65.4%, respectivamente) en comparación con las temporadas de invierno y otoño (59.4 y 61.1% respectivamente). De la misma forma, Lee et al.¹⁶⁸, informó que los procesos de desnitrificación en sistemas de humedales, la temperatura óptima oscila entre 20 y 40°C, y según Phipps et al.¹⁶⁹, específicamente entre 20 y 25°C. Estos estudios sugieren que existe una relación directa entre la temperatura y la actividad planta/microbios y el consiguiente impacto en la eficiencia de eliminación de contaminantes. En este estudio, la temperatura se mantuvo dentro de los rangos óptimos (20–21°C) y por lo tanto no afectaron los procesos de remoción de nutrientes (Tabla 4.1). De acuerdo a estos resultados, se estima que los valores de eliminación de contaminantes se encuentran entre los más altos posibles para este tipo de sistema y región, dado que este experimento se llevó principalmente en la época más cálida del año.

El pH de las aguas residuales también es un aspecto vital que afecta la eficiencia de los de los HA principalmente en relación con la remoción de nitrógeno y materia orgánica. Se sabe que las bacterias desnitrificantes sobreviven a valores de pH en el rango de 6,5 a 8.0, a estos valores se mantienen estables los procesos de eliminación de NH₄-N en el humedal artificial³⁴. Similarmente Seo et al.¹⁷⁰, observaron en HA la adsorción máxima de NH₄-N tuvo lugar a pH neutro. Estudios indican que en pH inferiores a 5.0 en los HA, los procesos degradación anaeróbica quedan incompletos, dando lugar a la producción de ácidos grasos volátiles y su acumulación en el sistema, lo que provoca una caída mayor del pH¹⁷¹. Mientras que en pH superiores a 9.5 el porcentaje de NH₃-N (amonio no ionizado) se incrementa, influyendo negativamente en la disponibilidad de nutrientes y por tanto en la remoción de N y

crecimiento de las plantas del humedal¹⁶⁴.

Las mediciones de pH en este estudio no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ni entre los períodos evaluados. Los valores del pH durante el estudio alcanzaron el límite máximo considerado como óptimo para la operación del humedal artificial (Tabla 5.1). No obstante, se concluyó que estos altos valores no influyeron en la disponibilidad de nutrientes para las plantas. Considerando que las plantas no desarrollaron características de estrés por falta de nutrientes a excepción de las plantas del control que no fueron fertilizadas y presentaron coloraciones de color rojo.

En relación a los niveles de salinidad en los efluentes, investigadores han informado que la alta salinidad puede afectar negativamente las plantas y los microorganismos en los HA. Por ejemplo, Klomjek y Nitisoravut encontraron que algunas especies de plantas utilizadas en los HA se vieron afectadas negativamente por la alta salinidad en las aguas residuales⁸⁷. Similarmente Gao et al.¹⁷², encontraron que luego de un aumento en el nivel de salinidad, la eficiencia del tratamiento comenzó a disminuir y las plantas mostraron signos de estrés típicos de altas salinidades. Con respecto a la población microbiana, varios investigadores han reportado que las altas concentraciones de sales pueden causar una alta presión osmótica, que tiene un efecto tóxico sobre los microorganismos, provocando deshidratación y desactivación celular¹⁷³. Por lo tanto, se reduce la concentración de microorganismos en el sustrato, conduciendo a la inhibición o disminución de los procesos de degradación microbiana en los sistemas de tratamiento de aguas residuales^{174, 175}.

En el presente estudio se observó un drástico aumento en la concentración de la salinidad desde el principio (hasta 50 gL⁻¹) (Tabla 5.1). Estos resultados se explicaron principalmente con las condiciones ambientales de evapotranspiración del sistema, en concordancia con Freedman et al.¹⁷⁶, que indica, a pesar de la absorción de sal por las plantas, el aumento de la salinidad de aguas tratadas con HA corresponde a los procesos de evaporación del suelo y la transpiración de las plantas. De acuerdo con los resultados del desempeño de humedal y las características saludables de las plantas luego de los tratamientos. Se determinó que la salinidad no afectó los procesos de remoción propios de las plantas. Esta característica inherente de las halófitas resalta los poderosos mecanismos de respuesta al estrés abiótico desencadenado por *S. neei*, reforzando la viabilidad de incluir esta planta para el tratamiento de efluentes acuáticos.

Formación de biomasa

La formación de biomasa de *S. neei* durante el período de evaluación alcanzó un peso neto total de 7-8 kg m⁻² durante un período de once semanas en los tratamientos con riego Nit y Nit + Amm respectivamente. Estos altos rendimientos en la producción de biomasa son comparables a los obtenidos por Ventura et al.¹⁷⁷, cuyos rendimientos de *Salicornia persica* alcanzaron 16 kg m⁻² en un lapso de 24 semanas y con los obtenidos por Ventura y Sagi que encontraron que plantas del género *Salicornia* alcanzaron rendimientos promedios de 18,6 ± 0,9 kg m⁻² de biomasa fresca durante cinco meses de cultivo¹⁷⁸. Teniendo en cuenta los valores de crecimiento y formación de biomasa alcanzado en el presente estudio, se espera que las plantas de *S. neei* alcancen una alta producción con consecuente remoción de N de sistemas con efluentes con concentraciones altas de N, mientras se genera un coproducto de alto valor económico.

Remoción de compuestos nitrogenados del efluente

Varios investigadores han estudiado la tasa de remoción de diferentes compuestos nitrogenados a través de diversos sistemas de HA asociados a plantas halófitas o a algas. Al considerar las fuentes de nutrición amonio-nitrato y la nutrición solo nitrato, se encontró que existía una mejor remoción del N en el tratamiento amonio/nitrato en comparación con el tratamiento solo nitrato suministrado como fuente de nutrición. Esta interacción positiva se debió a la contribución del ion nitrato que como señala Raab y Terry¹⁷⁹, el ion nitrato actúa como un anión osmótico importante para la expansión de las células foliares facilitando mayor consumo de nitrógeno. Similarmente, Britto y Kronzucker⁷⁸ señalan que el suministro conjunto de nitrato y amonio estimula el crecimiento de las plantas más allá del observado con cualquier fuente de N suministrada sola.

Al analizar la capacidad de eliminación de N a través del paso de las aguas por HA plantados con *S. neei*. Se encontró que los humedales plantados con *S. neei*, pueden remover una media diaria de 2.3±0.4 y 2.9±0.5 mgL⁻¹d⁻¹, dependiendo de la fuente de los compuestos nitrogenados y de la cantidad suministrada (Tabla 5.2). Además, se observó que el mayor porcentaje de eliminación se da durante los primeros 5 días de cada re-fertilización (Input), donde los valores de desaparición de los compuestos nitrogenados añadidos fueron de aproximadamente el 90%. Esta capacidad de remoción y su particularidad al inicio de cada tratamiento dependió de la cantidad de biomasa sembrada y de la disponibilidad del

nutriente en el agua. Estudios recientes realizados por Wang et al.¹⁸⁰, encuentran similares resultados utilizando sistemas de HA (98% de remoción), sin embargo, los investigadores mejoran el desempeño del humedal a través de la inoculación con bacterias halófitas nitrificantes (bioaumentación) en los sistemas de humedales. Por su parte, Liang et al.¹⁵³, encuentra que sistemas asociados con plantas haloresistentes pueden remover hasta el 80% de las cargas de compuestos nitrogenadas del influente cuando la carga es alta. Además, se observó que la principal remoción se dio durante los primeros días cuando la carga de nutriente fue más alta.

No obstante, algunos investigadores creen actualmente que la absorción real por parte de las plantas puede representar solo una fracción relativamente pequeña de la tasa global de eliminación de nitrógeno (N) , y los microorganismos tienen el papel más importante en el uso y transformación del componente de nitrógeno¹⁸¹. Estas determinaciones se encuentran en concordancia con Tanner et al.¹⁶⁵, quienes encontraron que del nitrógeno total eliminado por los sistemas de humedales plantados, solo el 25% correspondía a la fijación en las plantas. Del mismo modo, Lin et al.¹⁸², observaron que del 73% de nitrógeno eliminado, solo el 11% se fijó en las plantas. En contraposición Webb et al.³⁶, observaron que existían diferencias significativas entre la capacidad de remoción de nitrógeno en camas plantadas con y sin halófitas. En su estudio, demostraron un mayor rendimiento de remoción en lechos plantados ($62,0 \pm 34,6 \text{ mM N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) que en lechos no plantados ($23,0 \pm 26,8 \text{ mM N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). Por tanto, no se puede atribuir la desaparición de amonio exclusivamente a las plantas, sino que es perfectamente viable que el fuerte sistema de raíces formado por esta clase de plantas apoye el establecimiento de ciertos microorganismos que mejoran la tasa de eliminación de las cargas de nitrógeno al actuar de forma sinérgica.

La fijación de N en los tejidos es un aspecto importante para determinar la capacidad de extractiva de nutrientes inorgánicos nitrogenados en las plantas del humedal artificial. Aunque la bioacumulación de nitrógeno no se determinó empíricamente en este estudio, se derivó de Riquelme et al.⁵⁹, que junto con su equipo de trabajo determinaron que el total de N fijado en la parte aérea de *S. neei* correspondía a $1,76 \pm 0,08 \text{ g}$ por 100 g de peso fresco. Similarmente Rathore et al.¹⁸³, encontraron resultados similares en *Salicornia brachiata* de la India. De acuerdo con lo anterior, se sugiere que el total de nutrientes nitrogenados fijados en *S. neei* al final del ensayo estaría entre 46 y 103,9 g para el tratamiento con Nit, mientras

que para Nit + Amm, la fijación estaría entre 57,8 y 130,1 g de N para la biomasa total formada por este tratamiento, lo que indica que *S. neei* pudo haber asimilado la mayor parte del nitrógeno disponible en esta prueba. De acuerdo con estos resultados, también se puede sugerir que *S. neei* puede almacenar amonio-N, si se consideran las diferencias de las estimaciones en los dos tratamientos (aproximadamente un 20% más de N con el tratamiento Nit + Amm). Esto refleja la sinergia producida por estos dos compuestos cuando se consumen al mismo tiempo¹⁸⁴.

6.2. Discusión objetivo 3

Los mecanismos moleculares por los cuales las plantas halófitas pueden absorber y usar estos compuestos en ambientes altamente salinos son poco conocidos^{185, 186}. En este trabajo se realizó un análisis del transcriptoma de *S. neei*, con el objetivo de identificar aquellos genes diferencialmente regulados que cambian su expresión en concentraciones altas de amonio y que podrían estar involucrados en la capacidad para tolerar y utilizar el amonio como única fuente de nutrición. En este análisis se consideraron posibles mecanismos como mantenimiento de la homeostasis del amonio a través de su metabolismo, encapsulación del amonio en vacuolas para evitar el aumento de acidez en el citoplasma, biosíntesis de poliaminas, producción de fitohormonas y la biosíntesis de polímeros de pared celular como respuesta al estrés abiótico. Adicionalmente, se estudió la cinética de la absorción de amonio en concentración escalonadas para demostrar la actividad de los HATS (Sistemas de transporte de alta afinidad), que se relacionan principalmente con la entrada de amonio en la célula y por tanto la desaparición de amonio en el sustrato.

Cinética de remoción de amonio

Los parámetros cinéticos de absorción de NH₄-N no se han determinado previamente para *S. neei*. En esta investigación los datos de la cinética de remoción de NH₄ en plantas de *S. neei* incubadas a diferentes concentraciones mostraron un ajuste perfecto al modelo de Michaelis-Menten hasta 4 mM L⁻¹ (Figura 5.4). Observaciones anteriores han demostrado que los sistemas de transporte de alta afinidad son típicamente descritos por la ecuación de Michaelis-Menten. Quinta y colaboradores⁴ encontraron que las tasas de remoción de amonio en *S. europeae*, se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten hasta 2 mM de NH₄⁺L⁻¹. Los autores indican que, en esta planta los transportadores de alta afinidad (HATS) son los

responsables de la desaparición de nitrógeno en el sustrato en las concentraciones probadas.

Los cambios en la absorción de amonio descritos por las ecuaciones de Michaelis-Menten, como su Km y Vmax, permiten conocer cuál es el desempeño de la planta frente a concentraciones variables de nutrientes. Se encontró que *S. neei* tiene una alta afinidad por el sustrato ($K_m = 0,807 \pm 0,142$ mM N L-1), lo que indica que esta planta puede funcionar bien en sustratos con altas concentraciones de amoniaco. Además, para aguas residuales de acuicultura con concentraciones iguales o superiores a 4 mM NH4Cl L-1 la velocidad de desaparición del sustrato será de hasta $6,91 \pm 0,32$ mM N g-1 FW h-1. Se ha sugerido que, debido a las características cinéticas de la absorción de N en las plantas, deberían preferirse las especies con tasas máximas de absorción altas para limpiar aguas residuales con altas concentraciones de nutrientes⁴.

Metabolismo del N bajo altas concentraciones de NH₄⁺

Teniendo en cuenta el posible estrés abiótico inducido por la nutrición con amonio, se buscaron procesos activados o inducidos en *S.neei* que puedan evitar la acumulación de amonio o mitigar sus efectos. Se encontró que, un conjunto de 72 genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno fueron regulados positivamente en el tratamiento con amonio, aún con simultáneas concentraciones de salinidad. Con este grupo de genes se propuso una ruta basada en varios genes regulados positivamente como GS, 2-oxoglutarato deshidrogenasa (2-OGD), y Fd-GOGAT (Tabla 5.5, Figura 5.6 y Apéndice 10), los cuales pueden llevar a cabo la biosíntesis de glutamina y glutamato que son importantes precursores para la síntesis de otros aminoácidos, así como de casi todos los compuestos nitrogenados. En el apéndice 14 se observa los genes con expresión diferencial incluidos en la ruta del metabolismo de acuerdo a KEGG.

En estudios similares en la planta halófita *Salicornia Europeae*, se observó una alta actividad de GS en plantas alimentadas con amonio y bajo concentraciones de salinidad altas⁶⁷. Los investigadores señalaron que las plantas de *Salicornia* alimentadas con amonio crecían mejor en concentraciones de salinidad de 200 mM de NaCl o más. Señalando que en esta planta, la salinidad no interrumpe la actividad de las enzimas asimiladoras, ni tampoco el crecimiento. Por otro lado, en la planta *Solanum tuberosum* una planta con moderada

tolerancia a la salinidad mostró una baja acumulación de GS en el tejido cuando expuesta a concentraciones de 100 y 200 mM de salinidad. Además, los autores observaron signos de estrés como reducción en la biomasa vegetal y escasa producción de tubérculos¹⁸⁷.

En *S. neei*, la actividad de GS y GOGAT, no son perjudicadas por las altas concentraciones de salinidad, como lo que ocurre en otras plantas menos tolerantes, siendo esto una de las características más importantes que las plantas halófitas han desarrollado para sobrevivir en ambientes donde la salinidad es alta y el amonio es la forma común de nutriente. Anteriormente se había revelado que algunas plantas de humedales y otras especies marinas que crecen en hábitats terrestres donde prevalece la forma NH₄⁺ sobre NO₃⁻ tienen una preferencia especial por el amonio¹⁸⁸.

Biosíntesis de poliaminas en respuesta a estrés

En las plantas, las poliaminas (PA) juegan un complejo papel en respuesta al estrés oxidativo, a través del aumento de la actividad de varias enzimas antioxidantes que intervienen en mecanismos de adaptación. En este estudio la presencia de ADC1, SAMDC1, PAO-1 indicaron una posible biosíntesis de PA inducida por las concentraciones de amonio. Según Navin et al.¹⁸⁹, la biosíntesis de Put, Spd y Spm están involucradas en la mejora de la respuesta a estrés a sequía, salinidad, frío y calor (Tabla 5.5 y Figura 5.6). Investigaciones han señalado que las poliaminas se unen a los ácidos nucleicos, proteínas, membranas celulares estabilizando sus estructuras, además se les ha atribuido funciones en la fosforilación de proteínas y como generador de modificaciones postranscripcionales para aumentar la tolerancia. Bouchereau et al.¹⁹⁰, afirman que la nutrición con NH₄⁺ está asociada con cambios significativos en el contenido de poliaminas libres en los brotes o raíces de las plantas, lo que podría ser un factor protector clave para la célula estresada. La presencia de rutas de biosíntesis de PA en *S. neei*, se sugiere que al igual que la salinidad, la producción de PA aumenta la tolerancia al amonio.

Compartimentalización en las vacuolas y activación de complejo vacuolar

La mayor incorporación de amonio desde el entorno externo se produce en la rizósfera, a través de transportadores de amonio ubicados en la membrana plasmática de las células de

la raíces⁵². Cuando el amonio alcanza el citoplasma, las altas concentraciones de amonio desencadenan estrés oxidativo. No obstante, el NH₄⁺ pierde un protón H⁺ (desprotonación), acidificando aún más el citosol. Un citosol ácido induce la acidificación vacuolar, ya sea por la entrada del propio NH₄⁺ u otros ácidos débiles a la vacuola, esta acidificación puede ser hasta 5 veces más alta que en el citoplasma^{191, 192}. El objetivo de la encapsulación de iones potencialmente tóxicos dentro de la vacuola es disminuir la interacción negativa con enzimas en solución, solutos compatibles y osmolitos; y posteriormente tal contenido vacuolar es desecharido a través de hidrolisis o proteólisis¹⁹³. En el caso de los iones de amonio pueden ser mantenidos temporalmente en la vacuola hasta su removilización hacia órganos sumideros como semillas^{97, 194}.

Aún no existe consenso sobre la forma como los iones de amonio son ingresados a la vacuola. Howitt et al.⁹⁷, descartan tanto los mecanismos de transporte pasivo como los mecanismos transporte activo de NH₄⁺, por aspectos relacionados con el gradiente eléctrico del citoplasma y apoplasto. No obstante, los mismos investigadores sugieren que el ingreso de amonio puede más bien darse mediante el transporte pasivo de NH₃ acoplado a un mecanismo de trampa de ácido. Estudios similares han propuesto que el transporte de amonio hacia el espacio vacuolar, puede ser facilitado a través de la activación de señalizadores CAP1, que pueden detectar altas concentraciones de amonio y eventualmente activar transportadores vacuolares hasta ahora desconocidos¹⁹⁵.

En el transcriptoma de *S. neei*, no se encontró evidencia de los transportadores o señalizadores mencionados anteriormente. Sin embargo, se observó la presencia de genes de ATPasa Vacuolar (V-ATPasa) sobreexpresados, bajo el tratamiento con amonio que podrían estar involucrados en el control del pH intracelular, a través del envío del amonio citosólico a la vacuola. La ATPasa Vacuolar es una bomba de protones encargada de controlar el pH intracelular y extracelular en las células¹⁹⁶. Probablemente la sobreexpresión de estos genes evita la acidificación citoplasmática que genera estrés y senescencia foliar y por tanto sería una forma de la planta para sobrevivir a condiciones estresantes por el amonio.

Adicionalmente, se encontró la presencia de genes regulados positivamente relacionados con la formación de vesículas autofágicas especializadas como ATG9 y ATG2, que junto con el gen ATG18 (no observado en este estudio) forman el "complejo ATG9" que ha sido descrito como el único complejo integral necesario para la formación de la membrana autofagosomal¹⁹⁷. La autofagia, un sistema altamente conservado utilizado para degradar componentes intracelulares en células eucariotas, siendo responsable de degradar cloroplastos, proteínas averiadas, iones y otras sustancias tóxicas producidas durante períodos de estrés^{53, 68, 75}. En estudios realizados en *Arabidopsis*, se observó que la autofagia puede regular el estrés iónico causado por la salinidad al secuestrar sodio (Na^+) acumulado en el citoplasma¹⁹⁸. Luo et al.¹⁹⁸, reportaron que la formación de autofagosomas se induce poco después del tratamiento con sal, alcanzando su punto máximo dentro de los 30 minutos de estrés salino, después de esto se establece una nueva homeostasis en la planta, aliviándose el estrés por salinidad.

De manera análoga, se ha sugerido recientemente que la respuesta a concentraciones elevadas de amonio y salinidad en plantas resistentes a la salinidad pueden ser similares entre sí, desencadenando procesos de tolerancia a estrés afines^{101, 199}. Se sugiere que en la planta halófita *S. neei*, el proceso de autofagia es inducido como respuesta a las altas concentraciones de amonio, de tal forma que es capturado por autofagosomas especializados y conducidos a la vacuola donde puede ser almacenado estableciéndose la homeostasis celular.

Biosíntesis de pared celular en respuesta a condiciones estresantes

La pared celular juega un papel importante en la percepción del estrés al facilitar la activación de vías de señalización y remodelar las estrategias de crecimiento en respuesta al estrés. Esta estructura constituye la primera línea de defensa contra las influencias ambientales bióticas y bióticas a través del refuerzo de la pared, en la que se ha documentado deposición de callos¹³⁵.

En este estudio, el análisis del transcriptoma reveló un grupo de genes regulados positivamente que se encuentran relacionados con el mantenimiento, remodelación y

biosíntesis de la pared celular (Apéndice 15). Los genes hallados sugieren cambios en la composición de la pared celular causados por las condiciones de nutrición. Se registró sobreexpresión de los polímeros pécticos de rhamnogalacturonano I (RGI), que son parte fundamental de la pared celular y son responsables del nivel de hidratación. Estudios han reportado que el aumento de compuestos de peptina en plantas otorga tolerancia a la salinidad y sequía^{200, 201}. De igual forma, Wang et al.²⁰², demostraron que las modificaciones de la pared celular eran muy activas en respuesta al estrés salino en el algodón. Adicionalmente en este estudio, se registró niveles aumentados de xiloglucano endotransglucosilasa / hidrolasa (XTH) y proteínas expansinas. Investigadores han señalado que el aumento de estos polisacáridos asociados con rhamnogalacturonano I pueden mantener la plasticidad de la pared celular en respuesta a condiciones de estrés^{203, 204}. Además, otros genes que son indispensables para inducir la biogénesis y modificación de la pared celular en respuesta a estrés son, el gen que codifica la UDP-D-xilosa sintasa y el gen que codifica la proteína COBRA^{205, 206}. Aunque UDP-D-xilosa sintasa no fue encontrada en este transcriptoma, el gen relacionado con el transporte de UDP-xilosa que es sintetizada por UDP-D-xilosa sintasa fue observada, sugiriendo la presencia de la enzima.

Estudios han informado que los genes relacionados con el mantenimiento de la pared celular se enriquecen significativamente en tratamientos que inducen estrés biótico o abiótico²⁰⁷. Varios de los genes expresados positivamente relacionados con pared celular, contribuyeron al enriquecimiento de funciones asociadas a pared celular en *S. neei*, que sugieren que el amonio indujo la biogénesis o la modificación de la pared celular por acumulación de los iones de amonio (Figura 5.9 y Apéndice 12). Esto puede ser interesante para comprender como las plantas competitivas como las halófitas pueden adaptarse en condiciones donde la disponibilidad de nutrientes es cambiante. Es decir, en periodos con alta disponibilidad de nutrientes las plantas acumulan nutrientes para usarlos en otros periodos donde la disponibilidad sea escasa. En este estudio, encontramos genes regulados positivamente relacionados con el proceso metabólico del xiloglucano, el proceso metabólico del glucano celular y las categorías del proceso metabólico de polisacáridos celulares (Figura 5.9) que pueden regular varias respuestas fisiológicas de las plantas a través de la remodelación de la pared celular en *S. neei*.

Señalizadores de estrés

En este estudio, encontramos varios genes regulados positivamente que codifican proteínas involucradas en la señalización que potencialmente podrían inducirse como señalizadores para estimular respuesta al tratamiento con amonio impuesto. Entre los genes de señalización identificados se encuentran los receptores de glutamato 3.2, 3.3, 3.6-like (GLR3.2), (GLR3.3) y (GLR3.6), lo cual sugiere que el glutamato (principal precursor de prolina, arginina y ornitina), juega un papel como molécula de señalización en respuesta al estrés ambiental²⁰⁸. Aunque la función de los GLR no se conoce bien, un estudio reciente mostró que GLR3 está involucrado en la respuesta al estrés salino en *Arabidopsis*²⁰⁶. También encontramos que el transportador GABA 1, 2 (GAT1, GAT2) media el transporte del ácido γ-aminobutírico (GABA), un aminoácido no proteico que se acumula rápidamente en los tejidos vegetales en respuesta al estrés biótico y abiótico²⁰⁹. La sobre-expresión de los transportadores de GABA puede aumentar el grosor de las paredes celulares del xilema tanto en *Arabidopsis* como en el álamo y mejorar el contenido de lignina de los tejidos del xilema y la acumulación de prolina en las hojas del álamo, todo lo cual puede mejorar la tolerancia al estrés por sal / sequía de los álamos del desierto²¹⁰. GABA podría actuar como una señal del estado de N en las plántulas en germinación. Kinnersley y Lin han informado que tanto el GABA como el glutamato estimularon el crecimiento de *Lemna*²¹¹.

Biosíntesis de fitohormonas

Estudios indican que la nutrición con amonio activa específicamente los genes involucrados en la señalización hormonal de las respuestas de defensa subyacentes, sugiriendo que podría influir positivamente en la respuesta a tolerancia a diversos tipos de estrés⁸⁸. En este estudio, la biosíntesis de etileno (ET) y la biosíntesis del ácido abscísico (ABA) se ubicaron dentro de las 10 rutas KEGG con mayor número de secuencias asociadas (transducción de señales de hormonas vegetales y metabolismo de cisteína y metionina). Según Verma et al.²¹², se sabe que las vías de señalización de ABA, ET y otras hormonas vegetales interactúan entre sí en varios nodos, mejorando la respuesta de tolerancia al estrés por sequía, oxidación y altas temperaturas²¹³. En este estudio, genes implicados en la biosíntesis de ABA y ET fueron sobreexpresados, indicando que la respuesta a estrés por amonio en *S. neei*, también induce estas hormonas para mejorar respuesta de tolerancia.

CAPITULO 7

7. CONCLUSIONES

- *Salicornia neei* demostró crecimiento y absorción de N, indicando que es una planta de adecuada selección para usarla como biofiltro de compuestos nitrogenados de efluentes de la acuicultura marina en tierra.
- El análisis de la cinética de absorción de amonio en *S. neei* siguió la curva del modelo Michaelis-Menten, la cual demostró una alta afinidad por el sustrato en condiciones de ensayo.
- El sistema de desintoxicación de amonio en *S. neei* involucra activación de glutamina y glutamato sintetasa, biosíntesis de poliaminas y reacomodación de la pared celular.

CAPÍTULO 8

8. RECOMENDACIONES

En cuanto al desempeño de la planta como biofiltro, se recomienda:

- ✓ Evaluar el desempeño de humedales artificiales plantados con *S. neei* en campo y utilizando riegos directos de efluentes de las pisciculturas.
- ✓ Evaluar experimentalmente la fijación real de N en la planta.
- ✓ Planificar el tratamiento de la biomasa producida.

En cuanto al estudio a nivel molecular, se recomienda:

- ✓ Confirmar la expresión de genes mediante RT-QPCR.
- ✓ Caracterizar otras vías de tolerancia en la planta.

ABREVIATURAS

[Ca²⁺+cit]: calcio citoplasmático

µM: Micromolar

2-OGD: 2-oxoglutarato deshidrogenasa

ABA: Ácido abscísico

ADC: Arginina descarboxilasa

ADNc: ADN complementario

AMT: transportadores de amonio

apx: ascorbato peroxidasa

ARNm: mensajero

ATG: proteína relacionada con autofagia

BLASTN: alineación nucleótido-nucleotido

BLASTX: alineación nucleótido -protieina

C/N: relación carbono-nitrógeno

C: carbono

°C: centigrados

CAP1: Proteína asociada a ciclase 1

cat: catalasa

CAX: intercambiador de catión

CCX: intercambiador de catión calcio

Cl⁻: ion cloruro

cm: centímetro

COG: Clusters of Orthologous Groups of proteins

DAG: diacil glicerol

DcSAM: S-adenosilmetionina descarboxilada

DIN: nitrógeno inorgánico disuelto

DOM: materia orgánica disuelta

EE: error estándar

ET: Etileno

EXP: expansina

Fd-GOGAT: Glutamato sintasa ferredoxina dependiente, cloroplástica

GLT1:

g: gramo

GABA: Ácido gamma aminobutírico

GDH: glutamato deshidrogenasa

gL: gramos por litro

GLR: receptores de glutamato

GO: Ontología génica

GOGAT: glutamina 2-oxoglutarato aminotransferasa

gp: guaiacol peroxidasa

gr: glutation reductasa

GR: glutatión reductasa

GS: glutamina sintetasa

GS: Glutamina sintetasa

HA: humedales artificiales

HATS: transportador de alta afinidad

HKT: transportador membranal Na⁺

iHATS: HATS inducido

I_{max}: tasa máxima

IP3: inositol-trifosfato

KEGG: Enciclopedia de genes y genomas de Kioto

kg/m³ : kilogramo por metro cúbico

kg: kilogramo

Km: constante de saturación media

LATS: sistemas de transporte de baja afinidad

m²: metro cuadrado

m³: metro cúbico

membrana vacuolar K⁺, Na⁺/H⁺ (NHX1

mg L⁻¹: miligramos por litro

mM: milimolar

ml: mililitro

N: nitrógeno

Na⁺: sodio

NCBI: National center for biotechnology information

NAT: nitrógeno amoniacial total

NH3⁻: amoníaco

NH3⁻: amoniaco no ionizado

NH3-N: amonio no ionizado

NH4⁺: amonio ionizado

NH4Cl: Cloruro de amonio

NH4NO₃: Nitrato de amonio

NHX: transportador vacuolar K⁺, Na⁺/H⁺

NiR: nitrito reductasa

Nit: nitrógeno

Nit+Amm: combinación de nitrógeno y amonio

nitrógeno inorgánico (NI)

NO₂ - : nitrito

NO₂-N: nitrito del nitrógeno

NO₃ - : nitrato

NO₃-N: nitrato del nitrógeno

NR: nitrato reductasa

nr: base de datos no redundante

O₂: oxígeno

C: grados centígrados o grados Celsius

ODC: Ácido descarboxílico de ornitina

P: fósforo

p5cs: prolina/pirrolina

PA: poliamina

PAO-1: poliamina oxidasa-1

PIP2: fosfatidilinositol di-fosfato

PLC: enzima fosfolipasa C

PO₄-P: orto-fosfatados

POM: materia orgánica partículada

Put: putrescina

RAMA: Reglamento Ambiental para la Acuicultura

RGI: Polímeros pécticos de rhamnogalacturonano

RNA-seq: secuenciación de RNA

RPKM: lecturas por kilobase de transcripto por millón de lecturas mapeadas

RR: removal rate

SAM: S-adenosilmetionina

SAMDC-1 S-adenosilmetionina descarboxilasa

SAMS: S-adenosilmetionina sintetasa

SD: desviación estándar

sod: super oxido-dismutasa

SOS2: Salt overly sensitivity 2

SOS3: Salt overly sensitivity 3

Spd: espermidina

Spm: espermina

SRA: sistemas de recirculación para acuicultura

SRA: Short Read Archive

V-ATPasa: ATPasa vacuolar

XTH / XET: xiloglucano endotransglucosilasa / hidrolasas

REFERENCIAS

1. Tovar A, Moreno C, Manuel-Vez MP, et al. Environmental impacts of intensive aquaculture in marine waters. *Water Research* 2000;34(1):334-342.
2. Piedrahita RH. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture* 2003;226(1-4):35-44.
3. De Lange HJ, Paulissen M, Slim PA. 'Halophyte filters': the potential of constructed wetlands for application in saline aquaculture. *International Journal of Phytoremediation* 2013;15(4):352-364.
4. Quinta R, Santos R, Thomas DN, et al. Growth and nitrogen uptake by *Salicornia europaea* and *Aster tripolium* in nutrient conditions typical of aquaculture wastewater. *Chemosphere* 2015;120:414-421.
5. Boxman SE, Nystrom M, Capodice JC, et al. Effect of support medium, hydraulic loading rate and plant density on water quality and growth of halophytes in marine aquaponic systems. *Aquaculture Research* 2017;48(5):2463-2477.
6. Vymazal J. Constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters: A review. *Ecological Engineering* 2014;73:724-751.
7. Shpigel M, Ben-Ezra D, Shauli L, et al. Constructed wetland with *Salicornia* as a biofilter for mariculture effluents. *Aquaculture* 2013;412:52-63.
8. Yoge U, Sowers KR, Mozes N, et al. Nitrogen and carbon balance in a novel near-zero water exchange saline recirculating aquaculture system. *Aquaculture* 2017;467:118-126.
9. Zhang SY, Li G, Wu HB, et al. An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: The effects on water quality and fish production. *Aquacultural Engineering* 2011;45(3):93-102.
10. Orellana F, Waller U, Wecker B. Culture of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) in a marine recirculating aquaculture system (RAS) with artificial seawater. *Aquacultural Engineering* 2014;58:20-28.
11. Waller U, Buhmann AK, Ernst A, et al. Integrated multi-trophic aquaculture in a zero-exchange recirculation aquaculture system for marine fish and hydroponic halophyte production. *Aquaculture International* 2015;23(6):1473-1489.
12. Coldebella A, Gentelini AL, Piana PA, et al. Effluents from Fish Farming Ponds: A View from the Perspective of Its Main Components. *Sustainability* 2018;10(1).
13. Shimoda T, Fujioka Y, Srithong C, et al. Effect of water exchange with mangrove enclosures based on nitrogen budget in *Penaeus monodon* aquaculture ponds. *Fisheries Science* 2007;73(2):221-226.
14. Lupatsch I, Kissil GW. Predicting aquaculture waste from gilthead seabream (*Sparus aurata*) culture using a nutritional approach. *Aquatic Living Resources* 1998;11(4):265-268.
15. Hargreaves JA. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture* 1998;166(3-

- 4):181-212.
16. Turcios AE, Papenbrock J. Sustainable Treatment of Aquaculture Effluents-What Can We Learn from the Past for the Future? *Sustainability* 2014;6(2):836-856.
 17. Islam MS. Nitrogen and phosphorus budget in coastal and marine cage aquaculture and impacts of effluent loading on ecosystem: review and analysis towards model development. *Marine Pollution Bulletin* 2005;50(1):48-61.
 18. Verdegem MCJ. Nutrient discharge from aquaculture operations in function of system design and production environment. *Reviews in Aquaculture* 2013;5(3):158-171.
 19. Soderberg RW, Meade JW. The effects of ionic-strength on un-ionized ammonia concentration. *Progressive Fish-Culturist* 1991;53(2):118-120.
 20. Eddy FB. Ammonia in estuaries and effects on fish. *Journal of Fish Biology* 2005;67(6):1495-1513.
 21. Miller AJ, Cramer MD. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil* 2005;274(1-2):1-36.
 22. van der Meeran T, Mangor-Jensen A. Tolerance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae to acute ammonia exposure. *Aquaculture International* 2020;28(4):1753-1769.
 23. Seitzinger SP, Sanders RW, Styles R. Bioavailability of DON from natural and anthropogenic sources to estuarine plankton. *Limnology and Oceanography* 2002;47(2):353-366.
 24. Vanrijn J, Fonarev N, Berkowitz B. Anaerobic treatment of intensive fish culture effluents - digestion of fish feed and release of volatile fatty-acids. *Aquaculture* 1995;133(1):9-20.
 25. Handy RD, Poxton MG. Nitrogen pollution in mariculture - toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 1993;3(3):205-241.
 26. Camargo JA, Alonso A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International* 2006;32(6):831-849.
 27. Kajimura M, Croke SJ, Glover CN, et al. Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: The effect of feeding and fasting on the excretion of ammonia, urea and other nitrogenous waste products in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 2004;207(12):1993-2002.
 28. Molleda MI, Thorarensen H, Johannsson R. Water Quality in Recirculating Aquaculture Systems for Arctic Charr (*Salvelinus alpinus* L.) Culture. UNU-Fisheries Training Programme Final Project 2007:1 - 54.
 29. Pierce RH, Weeks JM, Prappas JM. Nitrate toxicity to five species of marine fish. *Journal of the World Aquaculture Society* 1993;24 (Wiley Online Library):105 - 107.
 30. Zhong F, Liang W, Yu T, et al. Removal efficiency and balance of nitrogen in a recirculating aquaculture system integrated with constructed wetlands. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 2011;46(7):789-794.
 31. Brown JJ, Glenn EP, Fitzsimmons KM, et al. Halophytes for the treatment of saline

- aquaculture effluent. *Aquaculture* 1999;175(3-4):255-268.
32. Webb JM, Quinta R, Papadimitriou S, et al. Halophyte filter beds for treatment of saline wastewater from aquaculture. *Water Research* 2012;46(16):5102-5114.
 33. Buhmann A, Papenbrock J. Biofiltering of aquaculture effluents by halophytic plants: Basic principles, current uses and future perspectives. *Environmental and Experimental Botany* 2013;92:122-133.
 34. Vymazal J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment* 2007;380(1-3):48-65.
 35. Vymazal J. Constructed wetlands for wastewater treatment. *Ecological Engineering* 2005;25(5):475-477.
 36. Webb JM, Quinta R, Papadimitriou S, et al. The effect of halophyte planting density on the efficiency of constructed wetlands for the treatment of wastewater from marine aquaculture. *Ecological Engineering* 2013;61:145-153.
 37. Zhu H, Yan BX, Xu YY, et al. Removal of nitrogen and COD in horizontal subsurface flow constructed wetlands under different influent C/N ratios. *Ecological Engineering* 2014;63:58-63.
 38. Buhmann AK, Waller U, Wecker B, et al. Optimization of culturing conditions and selection of species for the use of halophytes as biofilter for nutrient-rich saline water. *Agricultural Water Management* 2015;149:102-114.
 39. Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 2000;51:463-499.
 40. Shabala S, Mackay A. Ion Transport in Halophytes. *Plant Responses to Drought and Salinity Stress: Developments in a Post-Genomic Era* 2011;57:151-199.
 41. Parida AK, Das AB. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2005;60(3):324-349.
 42. Galpaz N, Reymond M. Natural Variation in *Arabidopsis thaliana* Revealed a Genetic Network Controlling Germination Under Salt Stress. *Plos One* 2010;5(12).
 43. Rozema J, Schat H. Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. *Environmental and Experimental Botany* 2013;92:83-95.
 44. Zhu JK. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2003;6(5):441-445.
 45. Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR. Mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1977;28:89-121.
 46. Flowers TJ, Colmer TD. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* 2008;179(4):945-963.
 47. Storey R, Wynjones RG. Responses of *triplex-spongiosa* and *suaeda-monoica* to salinity. *Plant Physiology* 1979;63(1):156-162.

48. Neales TF, Sharkey PJ. Effect of salinity on growth and on mineral and organic-constituents of the halophyte *disphyma-australe* (soland.) black,J.M. Australian Journal of Plant Physiology 1981;8(2):165-179.
49. Redondo-Gomez S, Wharmby C, Castillo JM, et al. Growth and photosynthetic responses to salinity in an extreme halophyte, *Sarcocornia fruticosa*. *Physiologia Plantarum* 2006;128(1):116-124.
50. Quinta R, Hill PW, Jones DL, et al. Uptake of an amino acid (alanine) and its peptide (trialanine) by the saltmarsh halophytes *Salicornia europaea* and *Aster tripolium* and its potential role in ecosystem N cycling and marine aquaculture wastewater treatment. *Ecological Engineering* 2015;75:145-154.
51. Steffen S, Ball P, Mucina L, et al. Phylogeny, biogeography and ecological diversification of *Sarcocornioideae*, *Amaranthaceae*. *Annals of Botany* 2015;115(3):353-368.
52. Forde BG, Clarkson DT. Nitrate and ammonium nutrition of plants: Physiological and molecular perspectives. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*, Vol 30 1999;30:1-90.
53. Coleto I, Bejarano I, Marín-Peña AJ, et al. *Arabidopsis thaliana* transcription factors MYB28 and MYB29 shape ammonium stress responses by regulating Fe homeostasis.
54. Bloom AJ, Burger M, Rubio-Asensio JS, et al. Carbon Dioxide Enrichment Inhibits Nitrate Assimilation in Wheat and *Arabidopsis*. *Science* 2010;328(5980):899-903.
55. Cott GM, Caplan JS, Mozdzer TJ. Nitrogen uptake kinetics and saltmarsh plant responses to global change. *Scientific Reports* 2018;8.
56. Hessini K, Ben Hamed K, Gandour M, et al. Ammonium nutrition in the halophyte *Spartina alterniflora* under salt stress: evidence for a priming effect of ammonium? *Plant and Soil* 2013;370(1-2):163-173.
57. Jesus JM, Cassoni AC, Danko AS, et al. Role of three different plants on simultaneous salt and nutrient reduction from saline synthetic wastewater in lab-scale constructed wetlands. *Science of the Total Environment* 2017;579:447-455.
58. Panta S, Flowers T, Lane P, et al. Halophyte agriculture: Success stories. *Environmental and Experimental Botany* 2014;107:71-83.
59. Riquelme J, Olaeta JA, Galvez L, et al. Nutritional and functional characterization of wild and cultivated *Sarcocornia neei* grown in Chile. *Ciencia E Investigacion Agraria* 2016;43(2):283-293.
60. Ben Hamed K, Ellouzi H, Talbi OZ, et al. Physiological response of halophytes to multiple stresses. *Functional Plant Biology* 2013;40(8-9):883-896.
61. Valladao GMR, Gallani SU, Pilarski F. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 2018;10(2):351-369.
62. Alonso MA, Crespo MB. Taxonomic and nomenclatural notes on South American taxa of *Sarcocornia* (*Chenopodiaceae*). *Annales Botanici Fennici* 2008;45(4):241-254.
63. Alonso MF, Orellana C, Valdes S, et al. Effect of salinity on the germination of *Sarcocornia*

- neei (Chenopodiaceae) from two contrasting habitats. *Seed Science and Technology* 2017;45(1):252-258.
64. Boer B, Ozturk M, Clusener-Godt M, et al. *Sabkha Ecosystems: Volume V: The Americas*. Vol V. Cham, Switzerland 2016.
 65. de Souza MM, Mendes CR, Doncato KB, et al. Growth, Phenolics, Photosynthetic Pigments, and Antioxidant Response of Two New Genotypes of Sea Asparagus (*Salicornia neei* Lag.) to Salinity under Greenhouse and Field Conditions. *Agriculture-Basel* 2018;8(7).
 66. Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam MM, et al. Potential Use of Halophytes to Remediate Saline Soils. *Biomed Research International* 2014;2014.
 67. Ma JB, Cirillo V, Zhang DY, et al. Regulation of Ammonium Cellular Levels is An Important Adaptive Trait for the Euhalophytic Behavior of *Salicornia europaea*. *Plants-Basel* 2020;9(2).
 68. Liu Y, von Wieren N. Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *Journal of Experimental Botany* 2017;68(10):2581-2592.
 69. Kosegarten H, Grolig F, Wieneke J, et al. Differential ammonia-elicited changes of cytosolic pH in root hair cells of rice and maize as monitored by 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5 (and -6)-carboxyfluorescein-fluorescence ratio. *Plant Physiology* 1997;113(2):451-461.
 70. Tipirdamaz R, Gagneul D, Duhaize C, et al. Clustering of halophytes from an inland salt marsh in Turkey according to their ability to accumulate sodium and nitrogenous osmolytes. *Environmental and Experimental Botany* 2006;57(1-2):139-153.
 71. Gil R, Boscaiu M, Lull C, et al. Are soluble carbohydrates ecologically relevant for salt tolerance in halophytes? *Functional Plant Biology* 2013;40(8-9):805-818.
 72. Negrao S, Cecilia Almadan M, Pires IS, et al. New allelic variants found in key rice salt-tolerance genes: an association study. *Plant Biotechnology Journal* 2013;11(1):87-100.
 73. Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2014;21:133-139.
 74. Chen Y, Zong J, Tan Z, et al. Systematic mining of salt-tolerant genes in halophyte-Zoysia matrella through cDNA expression library screening. *Plant Physiology and Biochemistry* 2015;89:44-52.
 75. Patterson K, Cakmak T, Cooper A, et al. Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. *Plant Cell and Environment* 2010;33(9):1486-1501.
 76. Anon. *Introduction of salt-tolerant forage production systems to salt-affected lands in Sinai Peninsula in Egypt: a pilot demonstration project.*: Final Report, DRC, Egypt—ICBA, UAE.;2009.
 77. Eddin RS, Doddema H. Effects of nacl on the nitrogen-metabolism of the halophyte arthrocnemum-fruticosum (l) moq grown in a greenhouse. *Plant and Soil* 1986;92(3):373-385.
 78. Britto DT, Kronzucker HJ. NH4+ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* 2002;159(6):567-584.

79. Stewart G, Lee J, Orebamjo T. Nitrogen Metabolism of Halophytes. I. Nitrate Reductase Activity in *Suaeda maritima*. *New Phytologist* 1972(JSTOR):263-267.
80. Hoff T, Truong HN, Caboche M. The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant Cell and Environment* 1994;17(5):489-506.
81. Sivasankar S, Oaks A. Nitrate assimilation in higher plants: The effect of metabolites and light. *Plant Physiology and Biochemistry* 1996;34(5):609-620.
82. Stewart GR, Rhodes D. Nitrogen-metabolism of halophytes .3. enzymes of ammonia assimilation. *New Phytologist* 1978;80(2):307-316.
83. Gutierrez RA, Stokes TL, Thum K, et al. Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105(12):4939-4944.
84. Yokoishi T, Tanimoto S. Seed-germination of the halophyte *suaeda-japonica* under salt stress. *Journal of Plant Research* 1994;107(1088):385-388.
85. Kumari A, Das P, Parida AK, et al. Proteomics, metabolomics, and ionomics perspectives of salinity tolerance in halophytes. *Frontiers in Plant Science* 2015;6.
86. Lymbery AJ, Doupe RG, Bennett T, et al. Efficacy of a subsurface-flow wetland using the estuarine sedge *Juncus kraussii* to treat effluent from inland saline aquaculture. *Aquacultural Engineering* 2006;34(1):1-7.
87. Klomjek P, Nitisoravut S. Constructed treatment wetland: a study of eight plant species under saline conditions. *Chemosphere* 2005;58(5):585-593.
88. Ravazzolo L, Trevisan S, Forestan C, et al. Nitrate and Ammonium Affect the Overall Maize Response to Nitrogen Availability by Triggering Specific and Common Transcriptional Signatures in Roots. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21(2).
89. van Wijnen HJ, Bakker JP. Nitrogen and phosphorus limitation in a coastal barrier salt marsh: the implications for vegetation succession. *Journal of Ecology* 1999;87(2):265-272.
90. Sanchez E, Avila-Quezada G, Gardea AA, et al. Nitrogen metabolism in roots and leaves of green bean plants exposed to different phosphorus doses. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 2009;78:11-16.
91. Simas TC, Ferreira JG. Nutrient enrichment and the role of salt marshes in the Tagus estuary (Portugal). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 2007;75(3):393-407.
92. Jampeetong A, Brix H. Effects of NH₄⁺ concentration on growth, morphology and NH₄⁺ uptake kinetics of *Salvinia natans*. *Ecological Engineering* 2009;35(5):695-702.
93. Konnerup D, Brix H. Nitrogen nutrition of *Canna indica*: Effects of ammonium versus nitrate on growth, biomass allocation, photosynthesis, nitrate reductase activity and N uptake rates. *Aquatic Botany* 2010;92(2):142-148.
94. Mendelssohn IA. Nitrogen-metabolism in the height forms of *spartina-alterniflora* in north-carolina. *Ecology* 1979;60(3):574-584.

95. Kudo N, Fujiyama H. Responses of Halophyte *Salicornia bigelovii* to Different Forms of Nitrogen Source. *Pedosphere* 2010;20(3):311-317.
96. Yang XFS, Wu JR, Ziegler TE, et al. Gene Expression Biomarkers Provide Sensitive Indicators of Plant Nitrogen Status in Maize. *Plant Physiology* 2011;157(4):1841-1852.
97. Howitt SM, Udvardi MK. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 2000;1465(1-2):152-170.
98. Cohen RA, Fong P. Nitrogen uptake and assimilation in *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link (Chlorophyta): using N-15 to determine preference during simultaneous pulses of nitrate and ammonium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2004;309(1):67-77.
99. Caetano M, Vale C, Cesario R, et al. Evidence for preferential depths of metal retention in roots of salt marsh plants. *Science of the Total Environment* 2008;390(2-3):466-474.
100. Carballeira C, De Orte MR, Viana IG, et al. Implementation of a minimal set of biological tests to assess the ecotoxic effects of effluents from land-based marine fish farms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2012;78:148-161.
101. Marino D, Moran JF. Can Ammonium Stress Be Positive for Plant Performance? *Frontiers in Plant Science* 2019;10.
102. Lea PJ, Miflin BJ. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 2003;41(6-7):555-564.
103. Cruz C, Bio AFM, Dominguez-Valdivia MD, et al. How does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium? *Planta* 2006;223(5):1068-1080.
104. Wood CC, Poree F, Dreyer I, et al. Mechanisms of ammonium transport, accumulation, and retention in oocytes and yeast cells expressing *Arabidopsis AtAMT1*; 1. *Febs Letters* 2006;580(16):3931-3936.
105. Camalle M, Standing D, Jitan M, et al. Effect of Salinity and Nitrogen Sources on the Leaf Quality, Biomass, and Metabolic Responses of Two Ecotypes of *Portulaca oleracea*. *Agronomy-Basel* 2020;10(5).
106. Joy KW. ammonia, glutamine, and asparagine - a carbon nitrogen interface. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 1988;66(10):2103-2109.
107. Meng XQ, Zhou J, Sui N. Mechanisms of salt tolerance in halophytes: current understanding and recent advances. *Open Life Sciences* 2018;13(1):149-154.
108. Temple SJ, Vance CP, Gantt JS. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends in Plant Science* 1998;3(2):51-56.
109. Krapp A. Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current Opinion in Plant Biology* 2015;25:115-122.
110. Kosova K, Prasil IT, Vitamvas P. Protein Contribution to Plant Salinity Response and Tolerance Acquisition. *International Journal of Molecular Sciences* 2013;14(4):6757-6789.
111. Akhtar M, Hussain F, Ashraf MY, et al. Influence of Salinity on Nitrogen Transformations in Soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 2012;43(12):1674-1683.

112. Lodhi A, Arshad M, Azam F, et al. Changes in mineral and mineralizable n of soil incubated at varying salinity, moisture and temperature regimes. *Pakistan Journal of Botany* 2009;41(2):967-980.
113. Cantera R, Urdaniz, Lerga J, et al. Acidifying product as a source of stabilized ammonia nitrogen under greenhouse conditions. *Soils with Mediterranean type of climate* 1999;233-235.
114. McClung G, Frankenberger WT. Nitrogen mineralization rates in saline vs salt-amended soils. *Plant and Soil* 1987;104(1):13-21.
115. Peinemann N, Guggenberger G, Zech W. Soil organic matter and its lignin component in surface horizons of salt-affected soils of the Argentinian Pampa. *Catena* 2005;60(2):113-128.
116. Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, et al. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1996;47:569-593.
117. Ali A, Sivakami S, Raghuram N. Effect of nitrate, nitrite, ammonium, glutamate, glutamine and 2-oxoglutarate on the RNA levels and enzyme activities of nitrate reductase and nitrite reductase in rice. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 2007;13:1- 17.
118. Yanagisawa S. Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants. *Plant Science* 2014;229:167-171.
119. Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J-K. *Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance: Genetic engineering*; 2006.
120. Tuteja N. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Osmosensing and Osmosignaling* 2007;428:419-+.
121. Zhu JK. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 2002;53:247-273.
122. Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 2008;59:651-681.
123. Liu JP, Ishitani M, Halfter U, et al. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(7):3730-3734.
124. Hasegawa PM. Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environmental and Experimental Botany* 2013;92:19-31.
125. Soni P, Kumar G, Soda N, et al. Salt overly sensitive pathway members are influenced by diurnal rhythm in rice. *Plant signaling & behavior* 2013;8(Taylor & Francis):e24738.
126. Jiang C, Zheng Q, Liu Z, et al. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* Na⁺/H⁺ antiporter gene enhanced salt resistance in transgenic poplar (*Populus x euramericana* 'Neva'). *Trees-Structure and Function* 2012;26(3):685-694.
127. Ma D-M, Xu W-R, Li H-W, et al. Co-expression of the *Arabidopsis* SOS genes enhances salt tolerance in transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Protoplasma* 2014;251(1):219-231.

128. Simon E, Barcelo A, Arino J. Mutagenesis analysis of the yeast Nha1 Na⁺/H⁺ antiporter carboxy-terminal tail reveals residues required for function in cell cycle. *Febs Letters* 2003;545(2-3):239-245.
129. Chen Z, Wu Y, Di L, et al. The AtCCX1 transporter mediates salinity tolerance in both *Arabidopsis* and yeast (Retracted article. See vol. 110, pg. 317, 2012). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2012;109(1):91-99.
130. Manohar M, Shigaki T, Hirschi KD. Plant cation/H⁺ exchangers (CAXs): biological functions and genetic manipulations. *Plant Biology* 2011;13(4):561-569.
131. Silva P, Gerós H. Regulation by salt of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase activities and Na⁺/H⁺ exchange. *Plant signaling & behavior* 2009;4(Taylor & Francis):8.
132. Chen J-H, Jiang H-W, Hsieh E-J, et al. Drought and Salt Stress Tolerance of an *Arabidopsis* Glutathione S-Transferase U17 Knockout Mutant Are Attributed to the Combined Effect of Glutathione and Abscisic Acid. *Plant Physiology* 2012;158(1):340-351.
133. Song SY, Wang PH, Liu YX, et al. Effects of *Oenanthe javanica* on Nitrogen Removal in Free-Water Surface Constructed Wetlands under Low-Temperature Conditions. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2019;16(8).
134. Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, et al. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* 2004;55(407):2343-2351.
135. Houston K, Tucker MR, Chowdhury J, et al. The Plant Cell Wall: A Complex and Dynamic Structure As Revealed by the Responses of Genes under Stress Conditions. *Frontiers in Plant Science* 2016;7.
136. Hossain Z, Nouri MZ, Komatsu S. Plant Cell Organelle Proteomics in Response to Abiotic Stress. *Journal of Proteome Research* 2012;11(1):37-48.
137. Isayenkov S, Hilo A, Rizzo P, et al. Adaptation Strategies of Halophytic Barley *Hordeum marinum* ssp. *marinum* to High Salinity and Osmotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21(23).
138. Podgorska A, Burian M, Gieczewska K, et al. Altered Cell Wall Plasticity Can Restrict Plant Growth under Ammonium Nutrition. *Frontiers in Plant Science* 2017;8:19.
139. Walch-Liu P, Neumann G, Bangerth F, et al. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *Journal of Experimental Botany* 2000;51(343):227-237.
140. Li Q, Li BH, Kronzucker HJ, et al. Root growth inhibition by NH₄⁺ in *Arabidopsis* is mediated by the root tip and is linked to NH₄⁺ efflux and GMPase activity. *Plant Cell and Environment* 2010;33(9):1529-1542.
141. Abebe T, Melmaiee K, Berg V, et al. Drought response in the spikes of barley: gene expression in the lemma, palea, awn, and seed. *Functional & Integrative Genomics* 2010;10(2):191-205.
142. Soupene E, Ramirez RM, Kustu S. Evidence that fungal MEP proteins mediate diffusion of the uncharged species NH₃ across the cytoplasmic membrane. *Molecular and Cellular Biology* 2001;21(17):5733-5741.

143. Loque D, Yuan L, Kojima S, et al. Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *Plant Journal* 2006;48(4):522-534.
144. Roberts JKM, Pang MKI. Estimation of ammonium ion distribution between cytoplasm and vacuole using nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. *Plant Physiology* 1992;100(3):1571-1574.
145. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 2009;10(1):57-63.
146. Fang ZD, Martin J, Wang Z. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in RNA-Seq experiments. *Cell and Bioscience* 2012;2.
147. Diray-Arce J, Clement M, Gul B, et al. Transcriptome assembly, profiling and differential gene expression analysis of the halophyte *Suaeda fruticosa* provides insights into salt tolerance. *Bmc Genomics* 2015;16.
148. Skorupa M, Golebiewski M, Domagalski K, et al. Transcriptomic profiling of the salt stress response in excised leaves of the halophyte *Beta vulgaris* ssp *maritima*. *Plant Science* 2016;243:56-70.
149. Aliakbari M, Razi H, Alemzadeh A, et al. RNA-seq Transcriptome Profiling of the Halophyte *Salicornia persica* in Response to Salinity. *Journal of Plant Growth Regulation* 2021;40(2):707-721.
150. Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil. Circular California agricultural experiment station 1950;347.
151. Hunt R. *Plant growth analysis*. Vol 4. London: Institute of Terrestrial Ecology; 1978.
152. Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing. 2020.
153. Liang YX, Zhu H, Banuelos G, et al. Removal of nutrients in saline wastewater using constructed wetlands: Plant species, influent loads and salinity levels as influencing factors. *Chemosphere* 2017;187:52-61.
154. Healey FP. Slope of the monod equation as an indicator of advantage in nutrient competition. *Microbial Ecology* 1980;5(4):281-286.
155. Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant molecular biology reporter* 1993;11(2):113- 116.
156. Lal L, Sahoo R, Gupta R. RNA isolation from high phenolic tea leaves and buds. *Plant molecular biology report* 2001;19:181.
157. Meisel L, Fonseca B, Gonzalez S, et al. A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. *Biological Research* 2005;38(1):83-88.
158. Kal AJ, van Zonneveld AJ, Benes V, et al. Dynamics of gene expression revealed by comparison of serial analysis of gene expression transcript profiles from yeast grown on two different carbon sources. *Molecular Biology of the Cell* 1999;10(6):1859-1872.

159. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, et al. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 2003;19(2):185-193.
160. Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Research* 2007;35:D61-D65.
161. Conesa A, Götz S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International journal of plant genomics* 2008(Hindawi Publishing Corporation):1687-5370.
162. Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, et al. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research* 2005;33:W116-W120.
163. Diaz M, Javier A, Andrea O, et al. Efficiency of *Salicornia neei* to Treat Aquaculture Effluent from a Hypersaline and Artificial Wetland. *Agriculture* 2020:621
164. Kadlec RH, Reddy KR. Temperature effects in treatment wetlands. *Water Environment Research* 2001;73(5):543-557.
165. Tanner CC, Kadlec RH, Gibbs MM, et al. Nitrogen processing gradients in subsurface-flow treatment wetlands - influence of wastewater characteristics. *Ecological Engineering* 2002;18(4):499-520.
166. Akpor O, Adelani-Akande T, Aderiye B. The effect of temperature on nutrient removal from wastewater by selected fungal species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2013;2:328 - 340.
167. Song HL, Li XN, Lu XW, et al. Investigation of microcystin removal from eutrophic surface water by aquatic vegetable bed. *Ecological Engineering* 2009;35(11):1589-1598.
168. Lee CG, Fletcher TD, Sun GZ. Nitrogen removal in constructed wetland systems. *Engineering in Life Sciences* 2009;9(1):11-22.
169. Phipps RG, Crumpton WG. Factors affecting nitrogen loss in experimental wetlands with different hydrologic loads. *Ecological Engineering* 1994;3(4):399-408.
170. Seo DC, Hwang SH, Kim HJ, et al. Evaluation of 2-and 3-stage combinations of vertical and horizontal flow constructed wetlands for treating greenhouse wastewater. *Ecological Engineering* 2008;32(2):121-132.
171. Cooper P. Constructed wetlands and reed-beds: Mature technology for the treatment of wastewater from small populations. *Journal of the Chartered Institution of Water and Environmental Management* 2001;15(2):79-85.
172. Gao F, Yang ZH, Li C, et al. Saline domestic sewage treatment in constructed wetlands: study of plant selection and treatment characteristics. *Desalination and Water Treatment* 2015;53(3):593-602.
173. Wang ZC, Gao MC, She ZL, et al. Effects of salinity on performance, extracellular polymeric substances and microbial community of an aerobic granular sequencing batch reactor. *Separation and Purification Technology* 2015;144:223-231.
174. Lin T, Wen Y, Jiang LG, et al. Study of atrazine degradation in subsurface flow constructed

- wetland under different salinity. *Chemosphere* 2008;72(1):122-128.
175. Calheiros CSC, Quiterio PVB, Silva G, et al. Use of constructed wetland systems with Arundo and Sarcocornia for polishing high salinity tannery wastewater. *Journal of Environmental Management* 2012;95(1):66-71.
176. Freedman A, Gross A, Shelef O, et al. Salt uptake and evapotranspiration under arid conditions in horizontal subsurface flow constructed wetland planted with halophytes. *Ecological Engineering* 2014;70:282-286.
177. Ventura Y, Wuddineh WA, Myrzabayeva M, et al. Effect of seawater concentration on the productivity and nutritional value of annual Salicornia and perennial Sarcocornia halophytes as leafy vegetable crops. *Scientia Horticulturae* 2011;128(3):189-196.
178. Ventura Y, Sagi M. Halophyte crop cultivation: The case for Salicornia and Sarcocornia. *Environmental and Experimental Botany* 2013;92:144-153.
179. Raab T, Terry N. Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in Beta vulgaris L. *Plant Physiol* 1994;10:1159-1166.
180. Wang XY, Zhu H, Yan BX, et al. Bioaugmented constructed wetlands for denitrification of saline wastewater: A boost for both microorganisms and plants. *Environment International* 2020;138.
181. Kadlec RH, Wallace S. *Treatment wetlands* 2008.
182. Lin YF, Jing SR, Lee DY, et al. Nutrient removal from aquaculture wastewater using a constructed wetlands system. *Aquaculture* 2002;209(1-4):169-184.
183. Rathore AP, Chaudhary DR, Jha B. Biomass production, nutrient cycling, and carbon fixation by Salicornia brachiata Roxb.: A promising halophyte for coastal saline soil rehabilitation. *International Journal of Phytoremediation* 2016;18(8):801-811.
184. Hachiya T, Sakakibara H. Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. *Journal of Experimental Botany* 2017;68(10):2501-2512.
185. Hu JN, Liu JN, Fan JL, et al. Effect of salinity on the performance of constructed wetlands treating mariculture wastewater with different halophytes and its molecular biological mechanism. *Desalination and Water Treatment* 2017;99:255-265.
186. Hu Z, Lee JW, Chandran K, et al. Effect of plant species on nitrogen recovery in aquaponics. *Bioresource Technology* 2015;188:92-98.
187. Teixeira J, Fidalgo F. Salt stress affects glutamine synthetase activity and mRNA accumulation on potato plants in an organ-dependent manner. *Plant Physiology and Biochemistry* 2009;47(9):807-813.
188. Thursby GB, Harlin MM. Interaction of leaves and roots of ruppia-maritima in the uptake of phosphate, ammonia and nitrate. *Marine Biology* 1984;83(1):61-67.
189. Navin K, Shekhar M. Ameliorative Mechanisms of Polyamines Against Abiotic Stress in the Rice Plants. In: Hasanuzzaman M, Fujita M, Nahar K, et al., eds. *Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance*. United Kingdom: Woodhead Publishing; 2019:725-735.

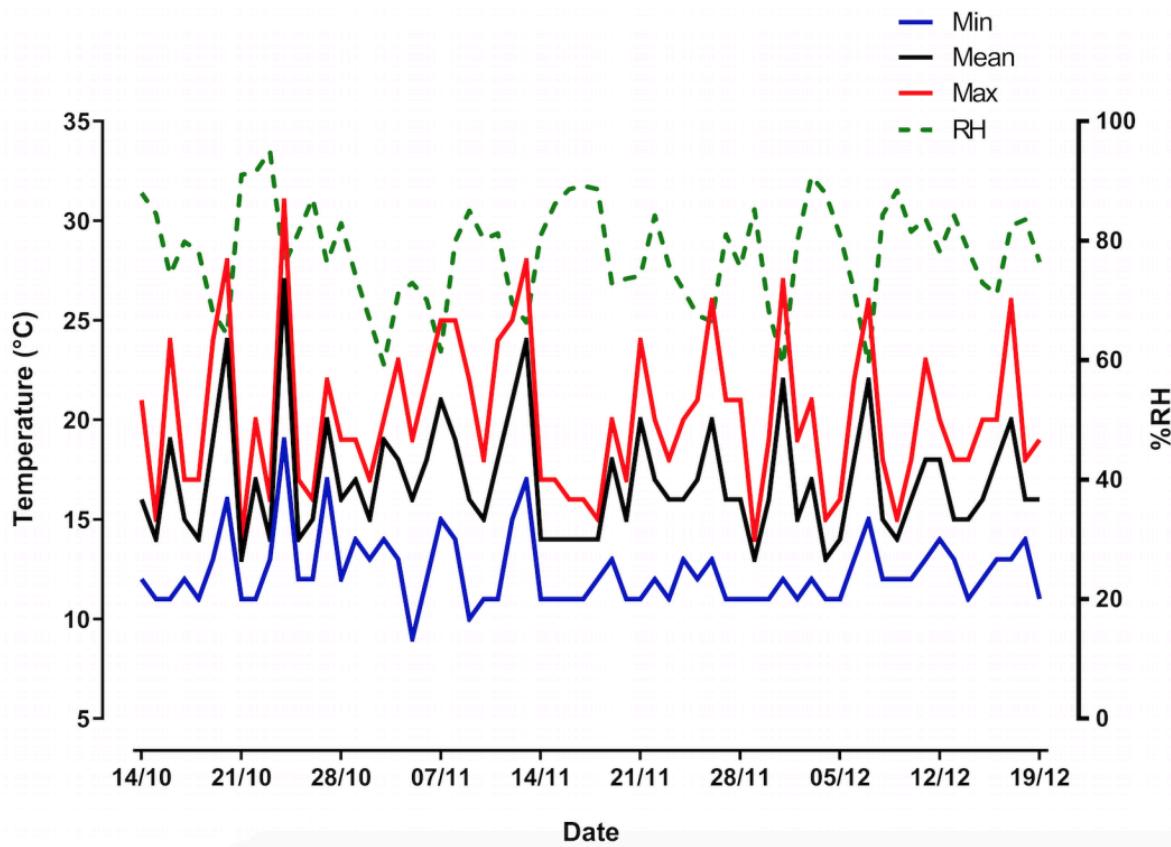
190. Bouchereau A, Aziz A, Larher F, et al. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* 1999;140(2):103-125.
191. Plant PJ, Manolson MF, Grinstein S, et al. Alternative mechanisms of vacuolar acidification in H⁺-ATPase-deficient yeast. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274(52):37270-37279.
192. Lee RB, Ratcliffe RG. Observations on the subcellular-distribution of the ammonium ion in maize root-tissue using *invivo* n-14-nuclear magnetic-resonance spectroscopy. *Planta* 1991;183(3):359-367.
193. Chen QW, Shinozaki D, Luo J, et al. Autophagy and Nutrients Management in Plants. *Cells* 2019;8(11).
194. Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus HE. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* 2007;58(1):83-102.
195. Zhou Y, Bai L, Song CP. Ammonium homeostasis and signaling in plant cells. *Science Bulletin* 2015;60(8):741-747.
196. Pamarthy S, Kulshrestha A, Katara GK, et al. The curious case of vacuolar ATPase: regulation of signaling pathways. *Molecular Cancer* 2018;17.
197. He CC, Klionsky DJ. Atg9 trafficking in autophagy-related pathways. *Autophagy* 2007;3(3):271-274.
198. Luo LM, Zhang PP, Zhu RH, et al. Autophagy Is Rapidly Induced by Salt Stress and Is Required for Salt Tolerance in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* 2017;8.
199. Fernandez-Crespo E, Camanes G, Garcia-Agustin P. Ammonium enhances resistance to salinity stress in citrus plants. *Journal of Plant Physiology* 2012;169(12):1183-1191.
200. An P, Li X, Zheng Y, et al. Effects of NaCl on Root Growth and Cell Wall Composition of Two Soya bean Cultivars with Contrasting Salt Tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science* 2014;200(3):212-218.
201. Leucci MR, Lenucci MS, Piro G, et al. Water stress and cell wall polysaccharides in the apical root zone of wheat cultivars varying in drought tolerance. *Journal of Plant Physiology* 2008;165(11):1168-1180.
202. Wang DL, Lu XK, Chen XG, et al. Temporal salt stress-induced transcriptome alterations and regulatory mechanisms revealed by PacBio long-reads RNA sequencing in *Gossypium hirsutum*. *Bmc Genomics* 2020;21(1).
203. Gall HL, Philippe F, Domon J-M, et al. Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants (Basel)* 2015;4(1):112-166.
204. Jiao PP, Wu ZH, Wang X, et al. Short-term transcriptomic responses of *Populus euphratica* roots and leaves to drought stress. *Journal of Forestry Research*.
205. Ahn I-P, Kim S, Lee Y-H. Vitamin B1 Functions as an Activator of Plant Disease Resistance. *Plant Physiology* 2005;138:1505-1515.
206. Roudier F, Schindelman G, DeSalle R, et al. The COBRA family of putative GPI-anchored proteins in Arabidopsis. A new fellowship in expansion. *Plant Physiology* 2002;130(2):538-548.

207. Tenhaken R. Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* 2015;5.
208. Lam HM, Chiu J, Hsieh MH, et al. Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* 1998;396(6707):125-126.
209. Ramos-Ruiz R, Poirot E, Flores-Mosquera M. GABA, a non-protein amino acid ubiquitous in food matrices. *Cogent Food & Agriculture* 2018;4(1).
210. Bai XT, Xu JM, Shao XM, et al. A Novel Gene Coding gamma-Aminobutyric Acid Transporter May Improve the Tolerance of *Populus euphratica* to Adverse Environments. *Frontiers in Plant Science* 2019;10.
211. Kinnersley AM, Lin F. Receptor modifiers indicate that 4-aminobutyric acid (GABA) is a potential modulator of ion transport in plants. *Plant Growth Regulation* 2000;32(1):65-76.
212. Verma V, Ravindran P, Kumar PP. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *Bmc Plant Biology* 2016;16.
213. Tiwari S, Lata C, Chauhan PS, et al. A Functional Genomic Perspective on Drought Signaling and its Crosstalk with Phytohormone-mediated Signalling Pathways in Plants. *Current Genomics* 2017;18(6):469-482.
214. Yao F, Sun J, Tang C, et al. Kinetics of Ammonium, Nitrate and Phosphate Uptake by Candidate Plants Used in Constructed Wetlands. *Procedia Environmental Sciences* 2011:1854-1861.

APÉNDICES

Apéndice 1

Temperatura ambiental ($^{\circ}$ C) y humedad relativa (% RH) durante la fecha de experimentación. El gráfico muestra los valores medios, máximos y mínimos de la temperatura ambiente, durante 74 días.



Apéndice 2

En el siguiente enlace encontrará los códigos de programación R para reproducir los análisis de datos agronómicos y los resultados de la anotación y análisis del Transcriptoma de *S. neei*:

<https://github.com/GenomicsLaboratory/PhD-Thesis-Monica-Diaz>

Códigos:

script_Michaelis-menten.R: Códigos R para determinación de ecuación y curva de Michaelis- Menten.

script_N_uptake.R: Códigos R para visualización de curvas de remoción de N

script_biomass_plant.R: Códigos R para cálculo de biomasa producido por el periodo de estudio *S.neei*.

script_nitrogen_remove.R: Códigos R para estimación de remoción de nitrógeno en los dos tratamientos.

Datos:

Data_CW.xlsx: Contiene los datos agrónomicos.

RNA-SEQ-Sneei.xlsx: Contiene el resultado del análisis de expresión global de genes.

Annotation_transcriptome_Sneei.xlsx: Contiene el resultado de la anotación de los conting de *S. neei*.

| Two-way ANOVA | Degree of freedom | Sum of Squares | Mean Squares | F Value | Probability |
|---------------------------|-------------------|----------------|--------------|---------|-------------|
| Treatment | 2 | 35.58 | 17.79 | 19.55 | 0.000168 |
| Days of culture | 1 | 131.13 | 131.13 | 144.14 | 4.81e-08 |
| Treatment:Days of culture | 2 | 40.86 | 20.43 | 22.46 | 8.78e-05 |
| Residuals | 12 | 10.92 | 0.91 | | |

Apéndice 3

ANOVA de dos factores para los datos cuantitativos del crecimiento de la biomasa, el efecto del tratamiento frente a los días de cultivo se analizó mediante una prueba ANOVA bidireccional.

Apéndice 4

Prueba de Tukey (HSD). Comparaciones múltiples de Tukey de medias del 95% del nivel de confianza familiar.

| | Mean | lower | uper | p adj |
|--------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| | differences | | | |
| Con:0-Amm + Nit:0 | 0.36722222 | -2.248671 | 2.983115 | 0.9963521 |
| Nit:0-Amm + Nit:0 | 0.43144444 | -2.184449 | 3.047338 | 0.9923336 |
| Amm + Nit:74-Amm + Nit:0 | 8.30844444 | 5.692551 | 10.924338 | 0.0000021 |
| Con:74-Amm + Nit:0 | 1.61411111 | -1.001782 | 4.230004 | 0.3608018 |
| Nit:74-Amm + Nit:0 | 7.07077778 | 4.454885 | 9.686671 | 0.0000117 |
| Nit:0-Con:0 | 0.06422222 | -2.551671 | 2.680115 | 0.9999993 |
| Amm + Nit:74-Con:0 | 7.94122222 | 5.325329 | 10.557115 | 0.0000034 |
| Con:74-Con:0 | 1.24688889 | -1.369004 | 3.862782 | 0.6128292 |
| Nit:74-Con:0 | 6.70355556 | 4.087662 | 9.319449 | 0.0000204 |
| Amm + Nit:74-Nit:0 | 7.87700000 | 5.261107 | 10.492893 | 0.0000037 |
| Con:74-Nit:0 | 1.18266667 | -1.433226 | 3.798560 | 0.6601556 |
| Nit:74-Nit:0 | 6.63933333 | 4.023440 | 9.255226 | 0.0000226 |
| Con:74-Amm + Nit:74 | -6.69433333 | -9.310226 | -4.078440 | 0.0000207 |
| Nit:74-Amm + Nit:74 | -1.23766667 | -3.853560 | 1.378226 | 0.6196403 |
| Nit:74-Con:74 | 5.45666667 | 2.840774 | 8.072560 | 0.0001604 |

Apéndice 5

Extracción de RNA a partir de tejido aéreo

1. Lisis de células.
 - Romper el tejido con nitrógeno líquido.
 - Colocar 1 mL de TRI REAGENT (Sigma T9424)
 - Centrifugar la solución homogenizada a 12 000 g por 10 minutos a 4°C para remover el material insoluble.
 - Transferir el sobrenadante a un tubo de centrífuga y dejar a temperatura ambiente por 5 minutos.
2. Fase de separación
 - Adicionar 0.2 mL de cloroformo y mediante un shaker homogenizar por 15 segundos.
 - Dejar la solución a temperatura ambiente por 10 minutos y centrifugar a 12 000 g por 15 minutos a 4°C.
 - Transferir la fase superior acuosa sin color (RNA) a un nuevo tubo eppendorf (la interfase concierne al DNA y la parte inferior a las proteínas).
3. Precipitación de RNA
 - Adicionar 500 µL de isopropanol, mezclar y dejar a temperatura ambiente por 10 minutos.
 - Centrifugar (12 000 g, 10 min, 4°C) y lavar el pellet de RNA adicionando 1 mL de Etanol al 75%. (Vortexear y centrifugar a 12 000, 5 min, 4°C)
 - Enseguida dejar secar el pellet de RNA por 10 minutos.
4. Solubilización de RNA
 - Adicionar 50 µL de agua libre de nuclease al pellet de RNA

Apéndice 6

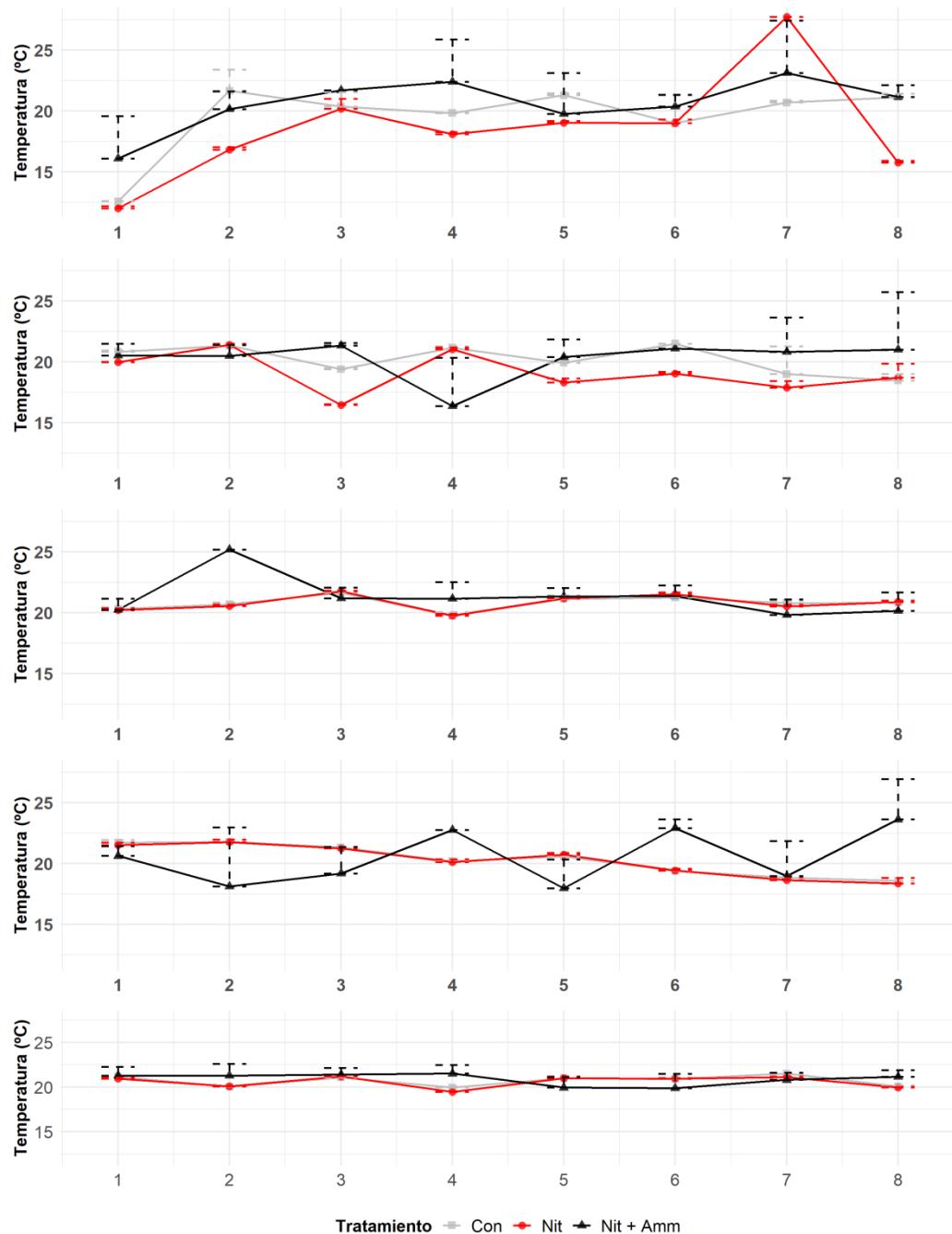
Reporte de calidad de las muestras a secuenciar, Librerías 0 y 3 mM.

| Muestra | Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | Volumen (μl) | Concentración (μg) | RIN | Razón rRNA |
|---------------------|--|------------------------------|------------------------------------|-----|------------|
| Librería 0mM | | | | | |
| NH ₄ Cl | 101.950 | 27 | 2.753 | 7.2 | 1.6 |
| Librería 3mM | | | | | |
| NH ₄ Cl | 115.314 | 24 | 2.768 | 7.2 | 1.6 |

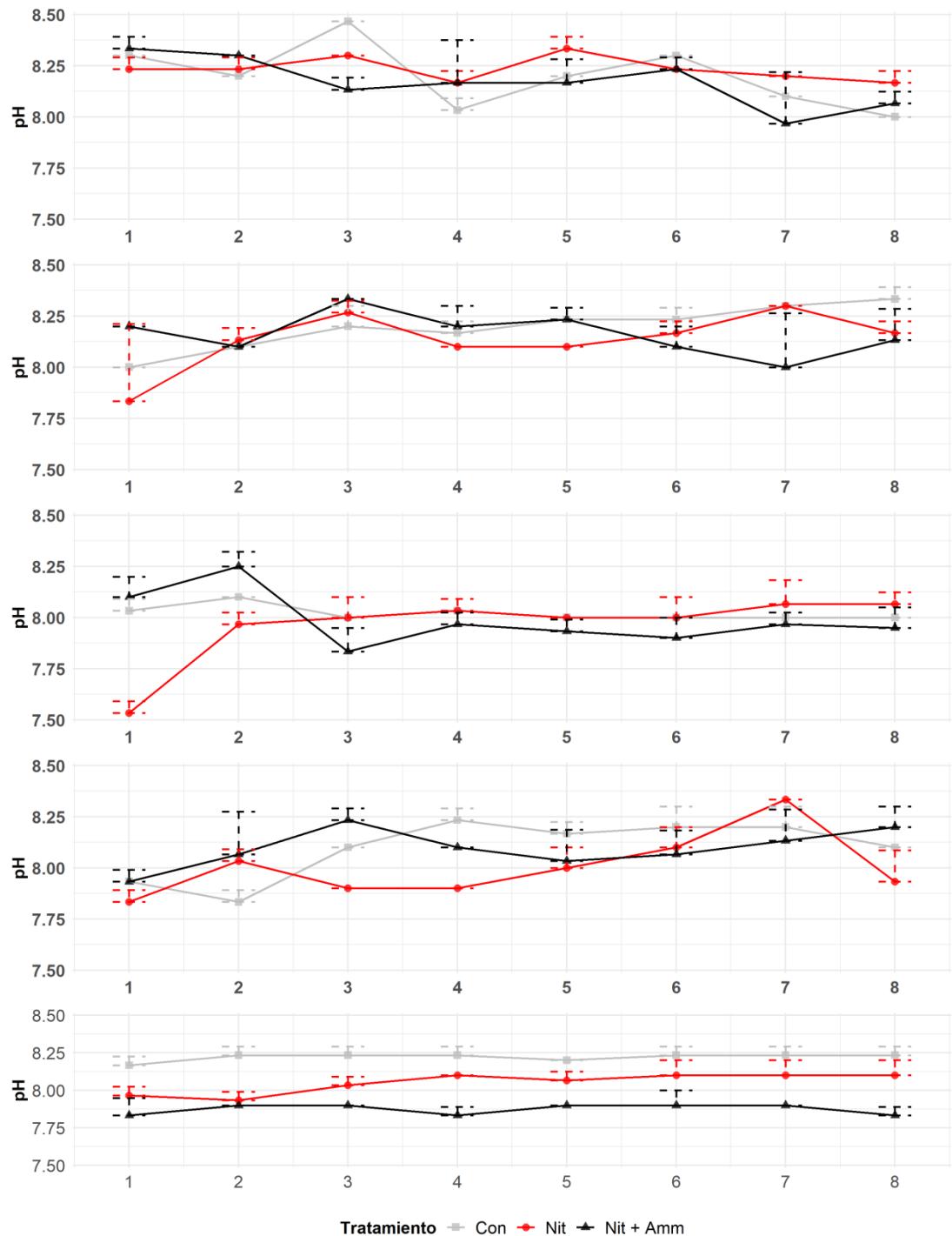
Apéndice 7

Parámetros Fisicoquímicos en efluente

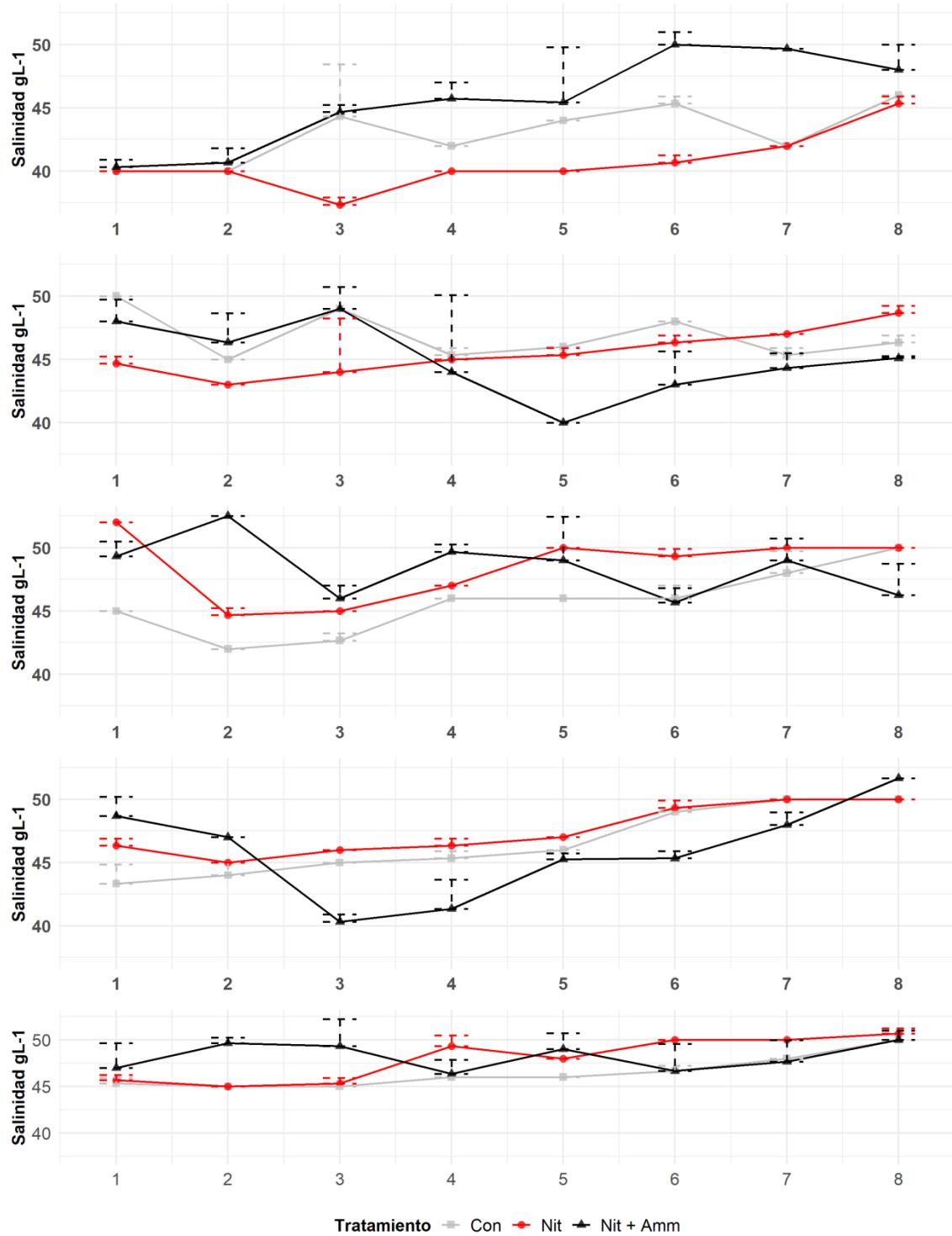
Temperatura



pH

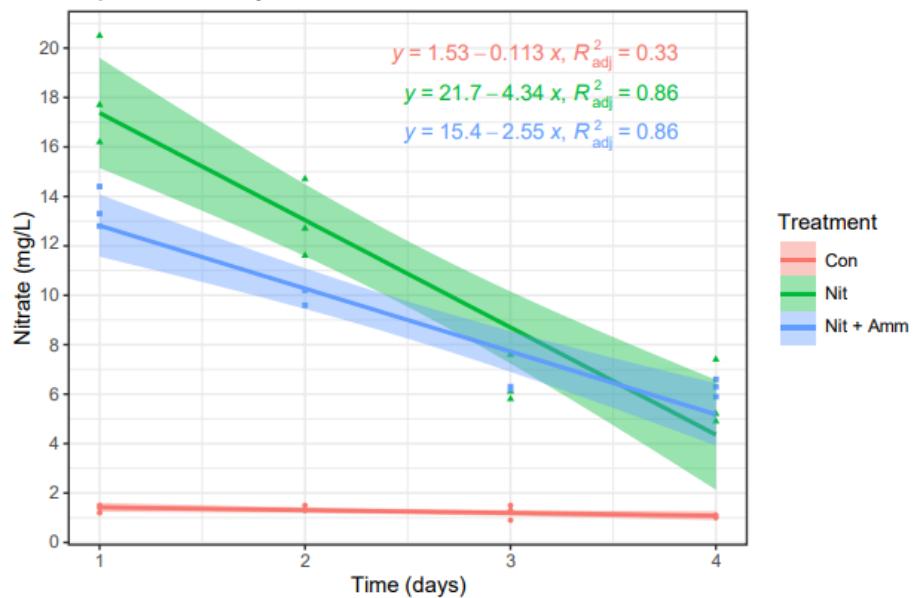


Salinidad

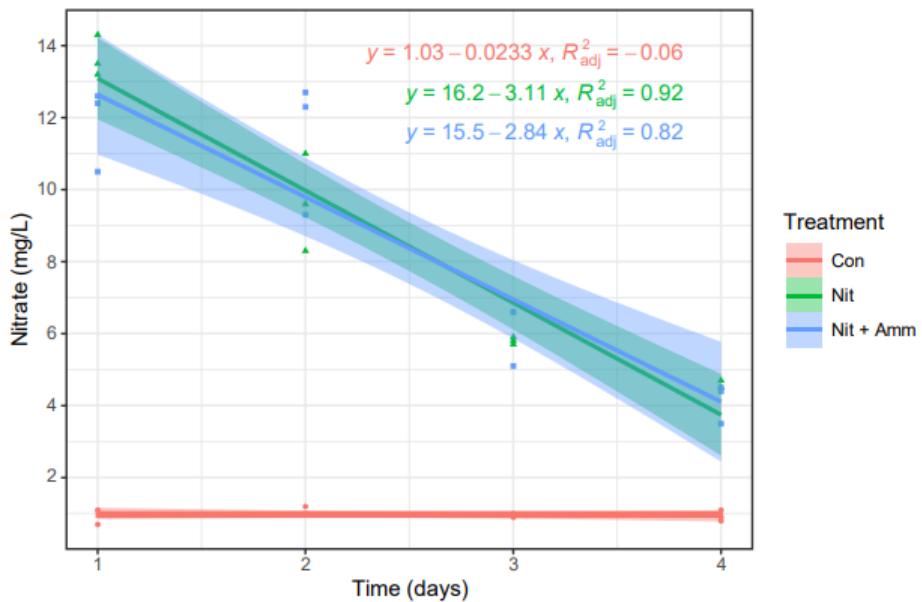


Apéndice 8

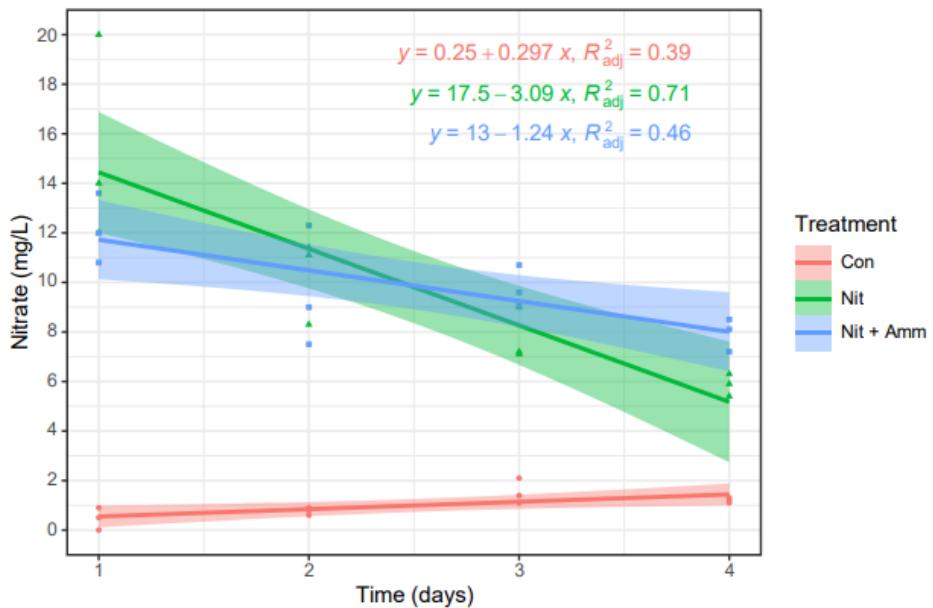
Input 1 / 1–4 days



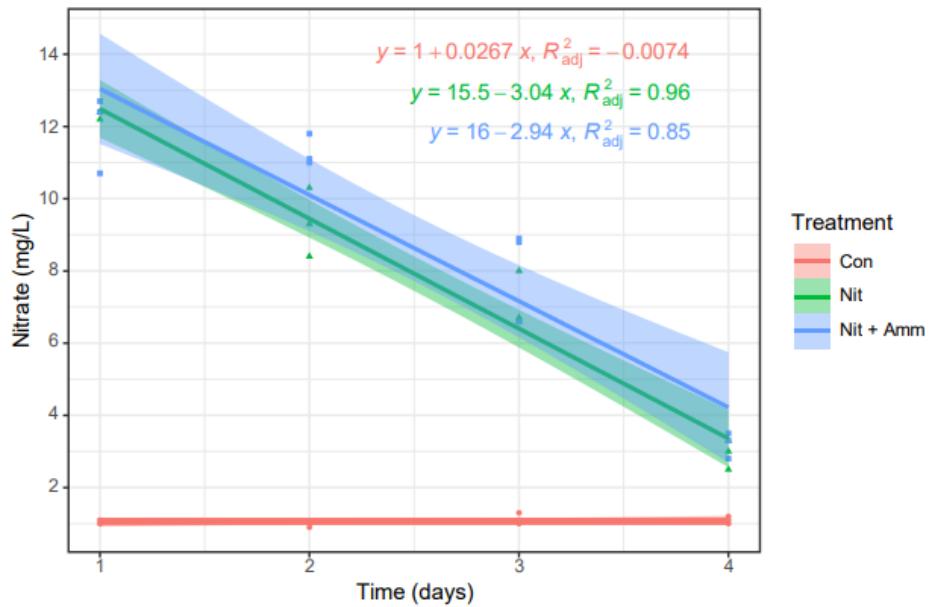
Input 2 / 1–4 days

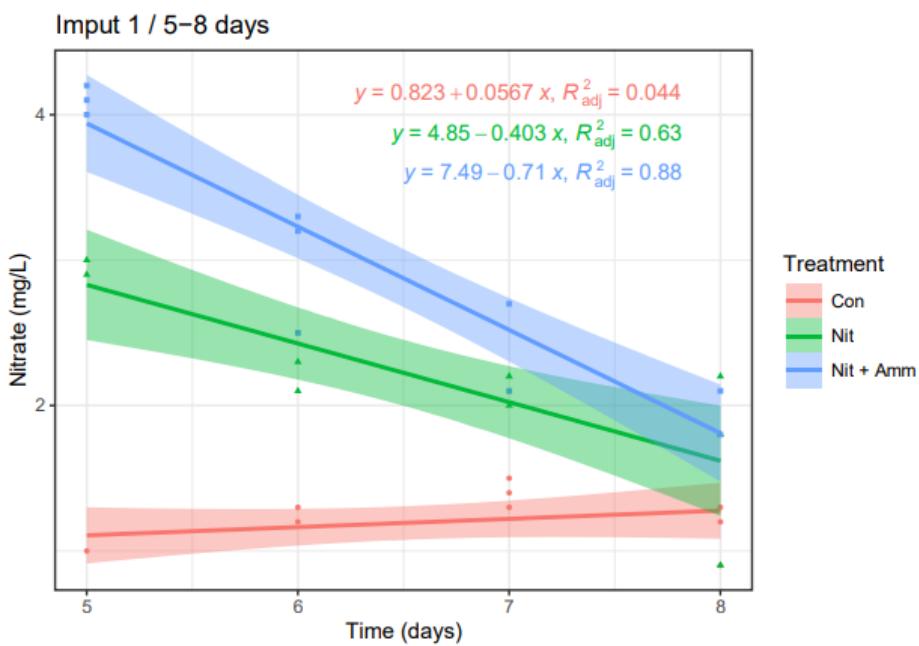
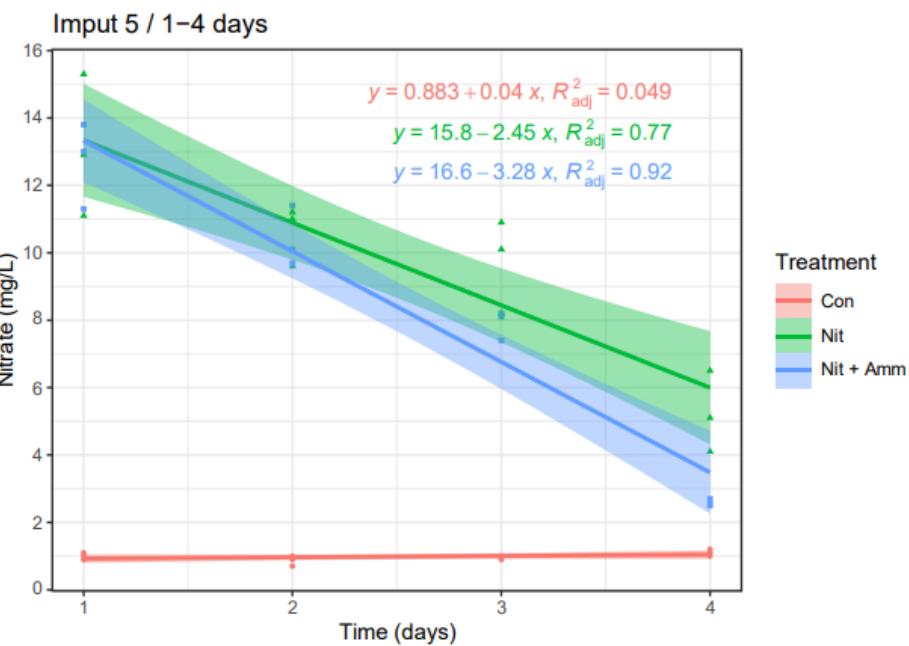


Input 3 / 1–4 days

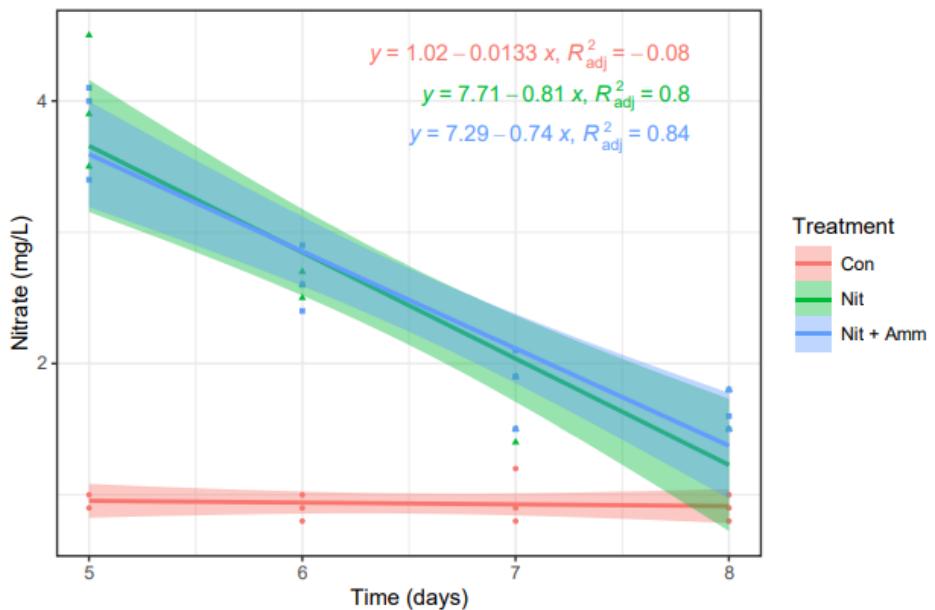


Input 4 / 1–4 days

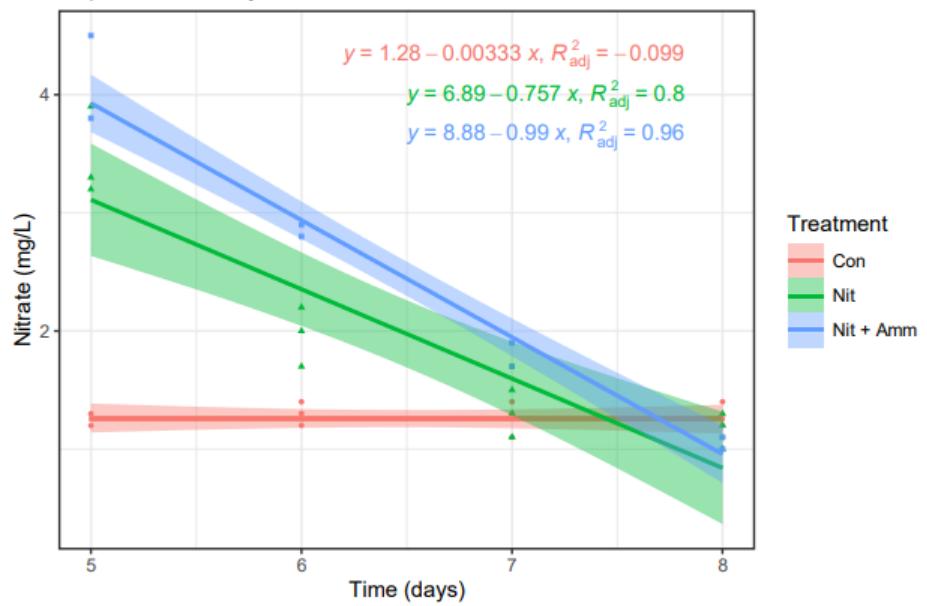




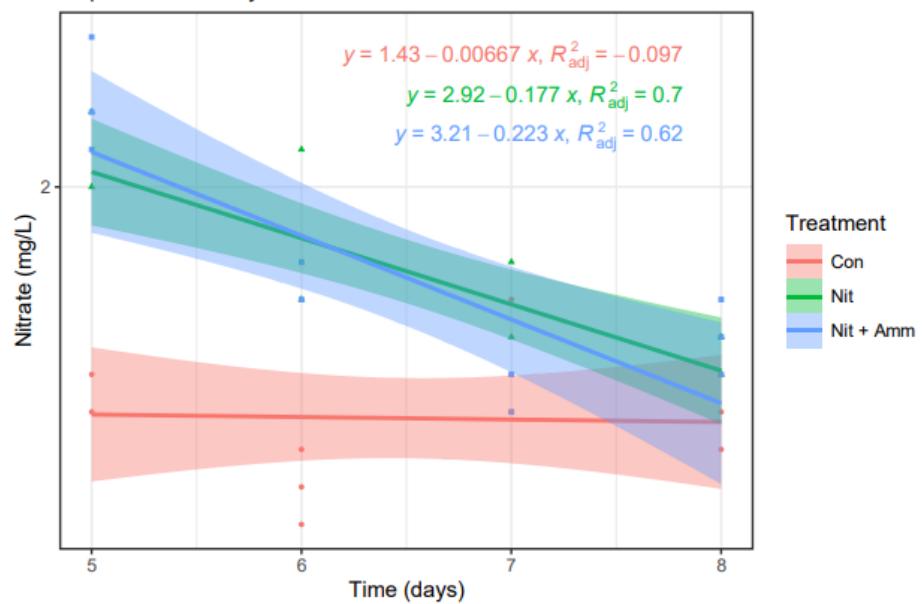
Input 2 / 5–8 days



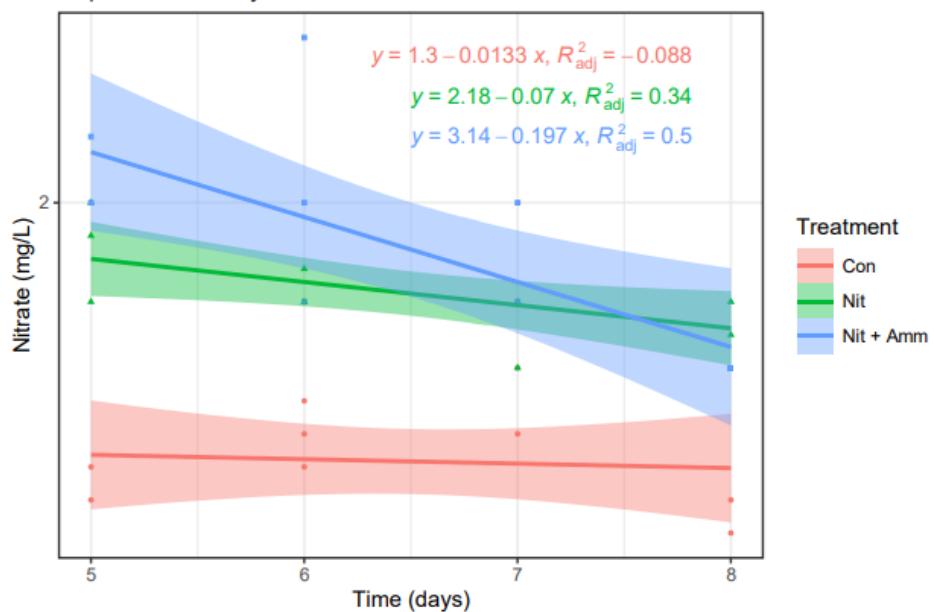
Input 3 / 5–8 days



Imput 4 / 5–8 days



Imput 5 / 5–8 days



Apéndice 9

Cálculo de remoción y diferencias significativas.

Datos crudos de remoción de amonio

| Concentración (mM) | Amonio (μM) |
|-----------------------|----------------|
| 0 | 0 |
| 0 | 14 |
| 0 | 14 |
| 1 | 875 |
| 1 | 917 |
| 1 | 875 |
| 2 | 1694 |
| 2 | 1722 |
| 2 | 1778 |
| 3 | 2639 |
| 3 | 2597 |
| 3 | 2653 |

ANOVA para amonio por concentración.

| ANOVA | Degree of freedom | Sum of Squares | Mean of Square | F-Ratio | Probability |
|----------------|-------------------|----------------|----------------|---------|-------------|
| Between groups | 3 | 1.13638E7 | 3.78792E6 | 4547.33 | 0.0000 |
| Within groups | 8 | 6664.0 | 833.0 | | |
| Total (Corr.) | 11 | 1.13704E7 | | | |

Prueba de Rangos múltiples para amonio por concentración.

* Denota diferencias estadísticamente significativas.

| Contrast | Sig. | Difference | +/- Limits |
|----------|------|------------|------------|
| 0 - 1 | * | -879,667 | 54,3423 |
| 0 - 2 | * | -1722,0 | 54,3423 |
| 0 - 3 | * | -2620,33 | 54,3423 |
| 1 - 2 | * | -842,333 | 54,3423 |
| 1 - 3 | * | -1740,67 | 54,3423 |
| 2 - 3 | * | -898,333 | 54,3423 |

Estimación de tasa de remoción

| Concentración $\text{NH}_4 \text{ mM}^{-1}$ | Tasa de remoción de amonio ($\mu\text{mol}/\text{min}$) | DS | t-value | p (> t) |
|--|---|---------|---------|----------|
| 0 | -0.01085 | 0.01253 | -0.866 | 0.407 |
| 1 | -0.36194 | 0.04676 | -7.741 | 1.57e-05 |
| 2 | -0.4757 | 0.1247 | -3.814 | 0.00341 |
| 3 | -0.5136 | 0.1332 | -3.856 | 0.00318 |
| 4 | -0.5602 | 0.1260 | -4.445 | 0.00124 |

DS: Desviación estandar, Valot t: t-statistic; p: probabilidad .

Apéndice 10

Genes expresados diferencialmente involucrados en el metabolismo del nitrógeno

| ID_NCBI | Description | Fold change | FDR -p value |
|----------------|--|-------------|--------------|
| GHTP01009702.1 | putative glutamine amidotransferase GAT1_2.1 | 2,47 | 6,33E-06 |
| | glutamate synthase 1 [NADH], chloroplastic isoform X1 | 2,14 | 1,46E-08 |
| GHTP01013407.1 | | 2,21 | 0,00E+00 |
| GHTP01021422.1 | dicarboxylate transporter 1, chloroplastic | 2,35 | 0,00E+00 |
| GHTP01021425.1 | dicarboxylate transporter 1, chloroplastic | 4,18 | 0,00E+00 |
| GHTP01000190.1 | high affinity nitrate transporter 2.5-like | 2,41 | 0,00E+00 |
| | delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase isoform X2 | -2,28 | 0,00E+00 |
| GHTP01012357.1 | 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial-like | 2,34 | 0,00E+00 |
| GHTP01008618.1 | | 3,12 | 0,00E+00 |
| GHTP01030179.1 | nitrate regulatory gene2 protein-like | 2,07 | 0,00E+00 |
| | high-affinity nitrate transporter-activating protein 2.1-like | -2,51 | 0,00E+00 |
| GHTP01030608.1 | | -2,03 | 1,67E-05 |
| GHTP01026298.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 6.4 | 2,36 | 0,00E+00 |
| GHTP01031518.1 | nitrate regulatory gene2 protein-like | 2,56 | 0,00E+00 |
| | bZIP domain class transcription factor (DUF630 and DUF632) | 2,22 | 0,00E+00 |
| GHTP01031519.1 | arginine decarboxylase | 4,28 | 1,69E-06 |
| GHTP01019462.1 | phenylalanine ammonia-lyase | -2,06 | 0,00E+00 |
| GHTP01010892.1 | phenylalanine ammonia-lyase | -2,29 | 0,00E+00 |
| GHTP01010894.1 | phenylalanine ammonia-lyase | -5,69 | 2,69E-09 |
| GHTP01013078.1 | chloride channel protein CLC-b | 3,08 | 0,00E+00 |
| GHTP01021416.1 | ammonium transporter 3 member 1-like | 5,68 | 0,00E+00 |
| | small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein | 3,63 | 2,91E-13 |
| GHTP01032288.1 | | 2,42 | 0,00E+00 |
| GHTP01033051.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 2.11-like | 2,7 | 0,00E+00 |
| GHTP01023397.1 | pyrroline-5-carboxylate synthetase | -2,85 | 0,00E+00 |
| GHTP01006207.1 | delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase | 5,8 | 0,00E+00 |
| | delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase isoform X1 | 2,96 | 7,28E-13 |
| GHTP01012348.1 | glutamate synthase 1 [NADH], chloroplastic isoform X1 | 3,52 | 0,00E+00 |
| GHTP01026846.1 | | -2,24 | 0,00E+00 |
| GHTP01010893.1 | phenylalanine ammonia-lyase | -2,93 | 0,00E+00 |
| | arginine/serine-rich coiled-coil protein 2 isoform X2 | 3,07 | 0,00E+00 |
| GHTP01034523.1 | ferredoxin--NADP reductase, leaf-type isozyme, chloroplastic | 2,77 | 2,71E-14 |
| GHTP01005883.1 | sulfite reductase 1 [ferredoxin], chloroplastic | 2,96 | 7,28E-13 |
| GHTP01007787.1 | sulfite reductase 1 [ferredoxin], chloroplastic | 3,52 | 0,00E+00 |
| GHTP01007786.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 1.1-like | 2,93 | 0,00E+00 |
| GHTP01024949.1 | nitrate regulatory gene2 protein | 3,07 | 0,00E+00 |
| GHTP01035440.1 | arginine/serine-rich coiled-coil protein 2 isoform X2 | 2,42 | 0,00E+00 |
| GHTP01035776.1 | ferredoxin-dependent glutamate synthase, chloroplastic | -2,24 | 0,00E+00 |
| GHTP01016476.1 | | -2,93 | 0,00E+00 |

| | | | |
|----------------|---|-------|----------|
| GHTP01012347.1 | delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase isoform X1 | 2,1 | 0,00E+00 |
| GHTP01029071.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 3.1 | 2,1 | 0,00E+00 |
| GHTP01024954.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 3.1 | 2,89 | 0,00E+00 |
| GHTP01021568.1 | E3 ubiquitin-protein ligase BAH1-like | 2,13 | 6,18E-13 |
| GHTP01026039.1 | probable histone-arginine methyltransferase 1.3 ferredoxin-dependent glutamate synthase, | 2,59 | 1,90E-10 |
| GHTP01037737.1 | chloroplastic arginine-serine-rich coiled-coil protein 2-like isoform X2 | 4,29 | 0,00E+00 |
| GHTP01002359.1 | threonine dehydratase biosynthetic, chloroplastic-like | -2,64 | 0,00E+00 |
| GHTP01027790.1 | ribosome biogenesis protein NSA2 homolog | 2,56 | 0,00E+00 |
| GHTP01002474.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 5.10-like ferredoxin-dependent glutamate synthase, | -2,66 | 1,91E-14 |
| GHTP01007773.1 | chloroplastic | 2,5 | 1,62E-13 |
| GHTP01027367.1 | asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] 2 E3 ubiquitin ligase PARAQUAT TOLERANCE 3-like isoform X1 | 2,14 | 0,00E+00 |
| GHTP01012190.1 | piriformospora indica-insensitive protein 2 | 2,39 | 3,50E-10 |
| GHTP01039235.1 | ammonium transporter 3 member 1-like probable 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase At5g05600 | -2 | 7,49E-08 |
| GHTP01008449.1 | ferredoxin--nitrite reductase, chloroplastic | -3,45 | 5,86E-11 |
| GHTP01002667.1 | arginine-serine-rich coiled-coil protein 2-like isoform X2 | 7,75 | 3,22E-04 |
| GHTP01002690.1 | probable histone-arginine methyltransferase 1.3 | 2,42 | 0,00E+00 |
| GHTP01002692.1 | dicarboxylate transporter 2.1, chloroplastic-like | 2,85 | 0,00E+00 |
| GHTP01005543.1 | dicarboxylate transporter 2.1, chloroplastic-like | -3,19 | 0,00E+00 |
| GHTP01008037.1 | hypothetical protein C5167_007012 | 2,81 | 0,00E+00 |
| GHTP01021423.1 | threonine dehydratase biosynthetic, chloroplastic-like | 2,87 | 0,00E+00 |
| GHTP01021421.1 | threonine dehydratase biosynthetic, chloroplastic-like | 2,24 | 0,00E+00 |
| GHTP01002922.1 | delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase isoform X2 | -2,67 | 3,11E-06 |
| GHTP01025534.1 | delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase isoform X2 | 4,17 | 0,00E+00 |
| GHTP01009152.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 6.1-like | 2,61 | 1,18E-06 |
| GHTP01023416.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 3.1-like | 3,3 | 0,00E+00 |
| GHTP01026297.1 | nitrate regulatory gene2 protein-like | 2,26 | 8,06E-05 |
| GHTP01024973.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 3.1-like | 2,45 | 3,81E-13 |
| GHTP01044624.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 3.1-like | -2,59 | 1,57E-05 |
| GHTP01007774.1 | ammonium transporter 1 member 1 | 2,16 | 0,00E+00 |
| GHTP01010915.1 | nitrate regulatory gene2 protein | 2,39 | 0,00E+00 |
| GHTP01045183.1 | high affinity nitrate transporter 2.5-like | -2,06 | 7,13E-04 |
| GHTP01006991.1 | acetylglutamate kinase, chloroplastic | 2,92 | 4,59E-08 |
| GHTP01023406.1 | nitrate regulatory gene2 protein-like | -4,67 | 1,96E-04 |
| GHTP01047139.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 6.3 | -2,12 | 9,01E-09 |
| GHTP01047685.1 | serine/arginine-rich SC35-like splicing factor | 2,04 | 7,74E-06 |
| | | 2,41 | 8,44E-12 |

| | | | | |
|----------------|--|--------|----------|--|
| | SCL33 | | | |
| GHTP01009884.1 | glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2 | 2,27 | 2,45E-04 | |
| GHTP01048472.1 | proline transporter 2-like isoform X2 | 2,35 | 3,70E-05 | |
| GHTP01020110.1 | glutamate synthase 1 [NADH], chloroplastic-like isoform X3 | 2,23 | 0,00E+00 | |
| GHTP01018073.1 | formamidase-like isoform X2 | 2,16 | 2,50E-07 | |
| GHTP01015954.1 | nitrate reductase | 2,01 | 3,90E-10 | |
| GHTP01003959.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 6.1-like threonine dehydratase biosynthetic, chloroplastic-like | 3,39 | 2,15E-06 | |
| GHTP01021384.1 | | 4,2 | 0,00E+00 | |
| GHTP01024969.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 1.2-like | 2,79 | 2,87E-15 | |
| GHTP01026302.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 1.1-like | 5,84 | 0,00E+00 | |
| GHTP01009131.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 6.4 | 4,23 | 1,15E-07 | |
| GHTP01017631.1 | probable 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase At5g05600 | 2,04 | 0,00E+00 | |
| GHTP01009881.1 | glutamate synthase 1 [NADH], chloroplastic isoform X1 | 5,19 | 0,00E+00 | |
| GHTP01004213.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 6.3 | 3,14 | 0,00E+00 | |
| GHTP01024978.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 1.1-like | 6,28 | 2,71E-12 | |
| GHTP01024977.1 | protein NRT1/ PTR FAMILY 1.1-like | 19,2 | 7,37E-08 | |
| GHTP01063025.1 | precursor of CEP14 | 6,46 | 0,00E+00 | |
| GHTP01026264.1 | high affinity nitrate transporter 2.5-like | 2,28 | 0,00E+00 | |
| GHTP01021097.1 | urease | 4,76 | 1,49E-04 | |
| GHTP01025626.1 | cytochrome P450 78A7-like | 4,85 | 2,87E-06 | |
| GHTP01004887.1 | glutamate synthase 1 [NADH], chloroplastic isoform X1 | 6,74 | 2,61E-06 | |
| GHTP01004888.1 | glutamate synthase 1 [NADH], chloroplastic isoform X1 | 3,68 | 1,87E-05 | |
| GHTP01016006.1 | glutamine synthetase | 100000 | 1,27E-05 | |
| GHTP01013071.1 | putative glutamine synthetase | 100000 | 9,11E-05 | |

Apéndice 11

Genes expresados diferencialmente involucrados en la biosíntesis de hormonas ABA y Etileno

| ID_NCBI | Description | Fold change | FDR -p value |
|----------------|---|-------------|--------------|
| GHTP01016249.1 | plastidial glycolate/glycerate translocator 1, chloroplastic | 4,01 | 0,00E+00 |
| GHTP01029578.1 | nodulin-related protein 1-like | 2,51 | 0,00E+00 |
| GHTP01022627.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF071 | 2,97 | 0,00E+00 |
| GHTP01022650.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF073-like bifunctional protein FOLD 4, chloroplastic-like isoform X2 | 3,96 | 0,00E+00 |
| GHTP01024045.1 | | 2,06 | 4,65E-09 |
| GHTP01022644.1 | ethylene-responsive transcription factor RAP2-4-like | 2,65 | 0,00E+00 |
| GHTP01022622.1 | ethylene-responsive transcription factor RAP2-4-like | 3,16 | 0,00E+00 |
| GHTP01030137.1 | protein FAF-like, chloroplastic | 2,2 | 5,62E-15 |
| GHTP01022640.1 | ethylene-responsive transcription factor 5 | 2,88 | 0,00E+00 |
| GHTP01027844.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF105-like RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase-like 1 | 3,66 | 0,00E+00 |
| GHTP01027510.1 | | 2,65 | 0,00E+00 |
| GHTP01012664.1 | protein TRANSPARENT TESTA GLABRA 1-like | 2,24 | 3,03E-09 |
| GHTP01026231.1 | EID1-like F-box protein 3 | 2,01 | 2,87E-15 |
| GHTP01023431.1 | ethylene-insensitive protein 2 | -2,05 | 0,00E+00 |
| GHTP01028224.1 | ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 5 | -2,02 | 0,00E+00 |
| GHTP01021801.1 | histidine kinase 2 | -2,09 | 6,38E-04 |
| GHTP01022617.1 | Ethylene-responsive transcription factor RAP2-10 aldehyde dehydrogenase family 3 member H1-like isoform X1 | 2,8 | 0,00E+00 |
| GHTP01012332.1 | | 2,98 | 0,00E+00 |
| GHTP01023041.1 | leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase BAM1 | -2,14 | 0,00E+00 |
| GHTP01023420.1 | ethylene-insensitive protein 2 isoform X1 | 2,39 | 0,00E+00 |
| GHTP01022626.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF113 | 2,09 | 0,00E+00 |
| GHTP01022624.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF113-like | 2,36 | 0,00E+00 |
| GHTP01026808.1 | ETHYLENE INSENSITIVE 3-like 1 protein | 2,21 | 0,00E+00 |
| GHTP01001331.1 | ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 2 | -2,01 | 9,13E-08 |
| GHTP01027484.1 | ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 2 | -2,1 | 2,22E-04 |
| GHTP01013581.1 | 24-methylenesterol C-methyltransferase 2 | 3,03 | 0,00E+00 |
| GHTP01025875.1 | mitogen-activated protein kinase kinase 3 | 2,01 | 0,00E+00 |
| GHTP01020930.1 | E3 ubiquitin-protein ligase XBAT32-like | 2,23 | 1,09E-04 |
| GHTP01019001.1 | abscisic stress ripening | 2,35 | 0,00E+00 |
| GHTP01018148.1 | heptahelical transmembrane protein 4-like isoform X1 | 2,05 | 0,00E+00 |

| | | | |
|----------------|---|-------|----------|
| GHTP01022648.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF114 | 3,97 | 0,00E+00 |
| GHTP01027496.1 | ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 5 | -3,44 | 0,00E+00 |
| GHTP01001870.1 | ethylene-responsive transcription factor 2-like | 2,06 | 0,00E+00 |
| GHTP01023877.1 | CBL-interacting protein kinase 2-like | 2,48 | 4,71E-10 |
| GHTP01001939.1 | annexin D2-like | -2,16 | 0,00E+00 |
| GHTP01026872.1 | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase | 5,4 | 0,00E+00 |
| GHTP01018144.1 | heptahelical transmembrane protein 2-like | -2,74 | 0,00E+00 |
| GHTP01027843.1 | ethylene-responsive transcription factor 1B-like | 4,77 | 0,00E+00 |
| GHTP01022652.1 | ethylene-responsive transcription factor 1B-like ethylene-responsive transcription factor RAP2-7-like isoform X4 | 4,31 | 0,00E+00 |
| GHTP01022611.1 | probable serine/threonine-protein kinase At4g35230 | 2,65 | 0,00E+00 |
| GHTP01006862.1 | ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 5 | -2,1 | 3,03E-06 |
| GHTP01022641.1 | ethylene-responsive transcription factor 4 | -3,48 | 0,00E+00 |
| GHTP01002427.1 | ethylene-responsive transcription factor 4 | 10,05 | 0,00E+00 |
| GHTP01022608.1 | probable protein phosphatase 2C 25 | 4,29 | 4,12E-06 |
| GHTP01022608.1 | AP2-like ethylene-responsive transcription factor ANT | -3,16 | 1,45E-15 |
| GHTP01039007.1 | AP2-like ethylene-responsive transcription factor ANT leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase BAM1 | -2,62 | 4,95E-08 |
| GHTP01023927.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF054-like plastidal glycolate/glycerate translocator 1, chloroplastic | -2,14 | 8,06E-07 |
| GHTP01027841.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF054-like plastidal glycolate/glycerate translocator 1, chloroplastic | 11,45 | 1,76E-06 |
| GHTP01002763.1 | serine/threonine-protein kinase TOR probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At2g33170 | 7,45 | 0,00E+00 |
| GHTP01014868.1 | systemin receptor SR160 | 2,73 | 1,36E-11 |
| GHTP01020513.1 | beta-amyrin synthase | 2,82 | 1,93E-10 |
| GHTP01008429.1 | 24-methylenesterol C-methyltransferase 2 | 4,09 | 0,00E+00 |
| GHTP01019273.1 | 24-methylenesterol C-methyltransferase 2 | 2,55 | 2,33E-06 |
| GHTP01023305.1 | abscisic acid 8'-hydroxylase 1-like | 3,79 | 0,00E+00 |
| GHTP01009640.1 | abscisic acid 8'-hydroxylase 1-like | 2,75 | 0,00E+00 |
| GHTP01023305.1 | probable ethylene response sensor 1 | 2,65 | 2,18E-14 |
| GHTP01005852.1 | probable ethylene response sensor 1 | -2,58 | 2,90E-06 |
| GHTP01008259.1 | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase | 13,96 | 0,00E+00 |
| GHTP01003383.1 | lipase-like PAD4 | 2,02 | 1,89E-09 |
| GHTP01023947.1 | protein kinase-like | 2,32 | 1,50E-06 |
| GHTP01046972.1 | pathogenesis-related protein STH-21-like | 2,69 | 0,00E+00 |
| GHTP01012984.1 | glycosyltransferase family 64 protein C4 leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase BAM1 | 2,27 | 0,00E+00 |
| GHTP01008433.1 | glycosyltransferase family 64 protein C4 leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase BAM1 | 3,15 | 6,47E-05 |
| GHTP01018149.1 | heptahelical transmembrane protein 1 | 2,92 | 2,85E-06 |

| | | | |
|----------------|---|--------|----------|
| GHTP01003587.1 | Ninja-family protein AFP3 | -2,03 | 6,84E-04 |
| GHTP01023878.1 | CBL-interacting protein kinase 2-like | 2,83 | 3,68E-10 |
| GHTP01048254.1 | fasciclin-like arabinogalactan protein 4 | 5,96 | 2,12E-08 |
| GHTP01048773.1 | protein EARLY FLOWERING 3 | 2,16 | 2,19E-09 |
| GHTP01003789.1 | pathogenesis-related protein STH-21-like | 2,47 | 1,63E-12 |
| GHTP01003798.1 | ethylene-overproduction protein 1 | 2,3 | 9,18E-07 |
| GHTP01050141.1 | ethylene-responsive transcription factor ABR1-like AP2-like ethylene-responsive transcription factor | 62,09 | 0,00E+00 |
| GHTP01022630.1 | At1g16060 | 2,12 | 2,18E-05 |
| GHTP01015115.1 | DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 38 | 2,02 | 9,04E-11 |
| GHTP01010361.1 | DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 38 | 2,63 | 0,00E+00 |
| GHTP01052236.1 | ethylene-responsive transcription factor CRF2-like | 100000 | 6,59E-07 |
| GHTP01020228.1 | abscisic acid 8'-hydroxylase 1-like | 3,03 | 5,07E-05 |
| GHTP01055544.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF073-like | 2,03 | 1,21E-06 |
| GHTP01022354.1 | receptor-like protein kinase HSL1 | 3,41 | 2,29E-05 |
| GHTP01055617.1 | ethylene-responsive transcription factor ABR1-like | 7,38 | 0,00E+00 |
| GHTP01026539.1 | dual specificity protein kinase YAK1 homolog | 2,52 | 4,04E-07 |
| GHTP01022604.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF003-like | 2,28 | 7,33E-06 |
| GHTP01055971.1 | ninja-family protein AFP2-like | -4,24 | 6,72E-04 |
| GHTP01022615.1 | ethylene-responsive transcription factor TINY-like | 6,4 | 0,00E+00 |
| GHTP01022637.1 | ethylene-responsive transcription factor TINY-like | 12,13 | 6,62E-05 |
| GHTP01056931.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF027-like | 124,44 | 0,00E+00 |
| GHTP01013791.1 | receptor-like protein kinase HSL1 | 4,04 | 9,90E-07 |
| GHTP01022606.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF054-like | 5,13 | 0,00E+00 |
| GHTP01059070.1 | ABA responsive element binding factor probable leucine-rich repeat receptor-like protein | 4,2 | 2,57E-06 |
| GHTP01022355.1 | kinase At5g63930 | 3,45 | 9,46E-06 |
| GHTP01062309.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF003-like | 7,07 | 8,07E-04 |
| GHTP01022649.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF114 | 3,93 | 1,11E-14 |
| GHTP01019434.1 | histone deacetylase 6 | 3,77 | 5,10E-06 |
| GHTP01064836.1 | protein EIN4 | 3,15 | 3,81E-09 |
| GHTP01022642.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF109-like | 100000 | 2,90E-06 |
| GHTP01022635.1 | AP2-like ethylene-responsive transcription factor AIL6 | 2,45 | 2,95E-04 |
| GHTP01004746.1 | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase | 100000 | 2,90E-06 |
| GHTP01008430.1 | systemin receptor SR160-like | 3,79 | 1,50E-10 |
| GHTP01022607.1 | ethylene-responsive transcription factor CRF2-like | 2,51 | 1,47E-06 |
| GHTP01074812.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF054-like | 20,88 | 1,98E-12 |

| | | | |
|----------------|---|--------|----------|
| GHTP01013796.1 | probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At5g63930 | 4,72 | 5,56E-04 |
| GHTP01022638.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF017 | 22,23 | 2,74E-13 |
| GHTP01084431.1 | ethylene-responsive transcription factor ERF027-like | 100000 | 4,75E-06 |

Apéndice 12

Procesos biológicos enriquecidos según el set de las 7.040 secuencias sobreexpresadas en tratamiento

| GO ID | GO Name | GO Category | FDR | P-Value | Nr Test | Nr Reference | Non Annot Test | Non Annot Reference |
|------------|--|-------------|----------|----------|---------|--------------|----------------|---------------------|
| GO:0044042 | glucan metabolic process | BP | 7.51E-08 | 1.48E-11 | 84 | 271 | 6956 | 56085 |
| GO:0006073 | cellular glucan metabolic process | BP | 1.30E-07 | 5.13E-11 | 80 | 259 | 6960 | 56097 |
| GO:0042546 | cell wall biogenesis | BP | 3.24E-07 | 1.92E-10 | 68 | 208 | 6972 | 56148 |
| GO:0055085 | transmembrane transport | BP | 9.49E-07 | 7.50E-10 | 313 | 1708 | 6727 | 54648 |
| GO:0051273 | beta-glucan metabolic process | BP | 5.72E-06 | 5.65E-09 | 51 | 146 | 6989 | 56210 |
| GO:0010411 | xyloglucan metabolic process | BP | 7.20E-06 | 8.54E-09 | 23 | 33 | 7017 | 56323 |
| GO:0044264 | cellular polysaccharide metabolic process | BP | 8.67E-06 | 1.20E-08 | 91 | 359 | 6949 | 55997 |
| GO:0051274 | beta-glucan biosynthetic process | BP | 1.93E-05 | 3.06E-08 | 45 | 127 | 6995 | 56229 |
| GO:0005976 | polysaccharide metabolic process | BP | 2.90E-05 | 5.15E-08 | 107 | 465 | 6933 | 55891 |
| GO:0034637 | cellular carbohydrate biosynthetic process | BP | 3.00E-05 | 5.93E-08 | 85 | 340 | 6955 | 56016 |
| GO:0009250 | glucan biosynthetic process | BP | 5.42E-05 | 1.18E-07 | 55 | 184 | 6985 | 56172 |
| GO:0044262 | cellular carbohydrate metabolic process | BP | 7.48E-05 | 1.77E-07 | 129 | 612 | 6911 | 55744 |
| GO:0000271 | polysaccharide biosynthetic process | BP | 9.30E-05 | 2.57E-07 | 76 | 303 | 6964 | 56053 |
| GO:0034220 | ion transmembrane transport | BP | 9.30E-05 | 2.47E-07 | 196 | 1043 | 6844 | 55313 |
| GO:0098660 | inorganic ion transmembrane transport | BP | 1.42E-04 | 4.21E-07 | 120 | 568 | 6920 | 55788 |
| GO:0016051 | carbohydrate biosynthetic process | BP | 1.72E-04 | 5.44E-07 | 99 | 444 | 6941 | 55912 |

| | | | | | | | | |
|------------|--|----|----------|----------|-----|-----|------|-------|
| GO:0033692 | cellular polysaccharide biosynthetic process | BP | 2.79E-04 | 9.38E-07 | 68 | 270 | 6972 | 56086 |
| GO:0071554 | cell wall organization or biogenesis | BP | 4.16E-04 | 1.48E-06 | 88 | 390 | 6952 | 55966 |
| GO:0016125 | sterol metabolic process | BP | 9.35E-04 | 3.51E-06 | 25 | 60 | 7015 | 56296 |
| GO:0098655 | cation transmembrane transport | BP | 9.51E-04 | 4.14E-06 | 118 | 587 | 6922 | 55769 |
| GO:0008202 | steroid metabolic process | BP | 9.51E-04 | 4.10E-06 | 30 | 83 | 7010 | 56273 |
| GO:0071555 | cell wall organization | BP | 9.51E-04 | 4.04E-06 | 64 | 261 | 6976 | 56095 |

Apéndice 13

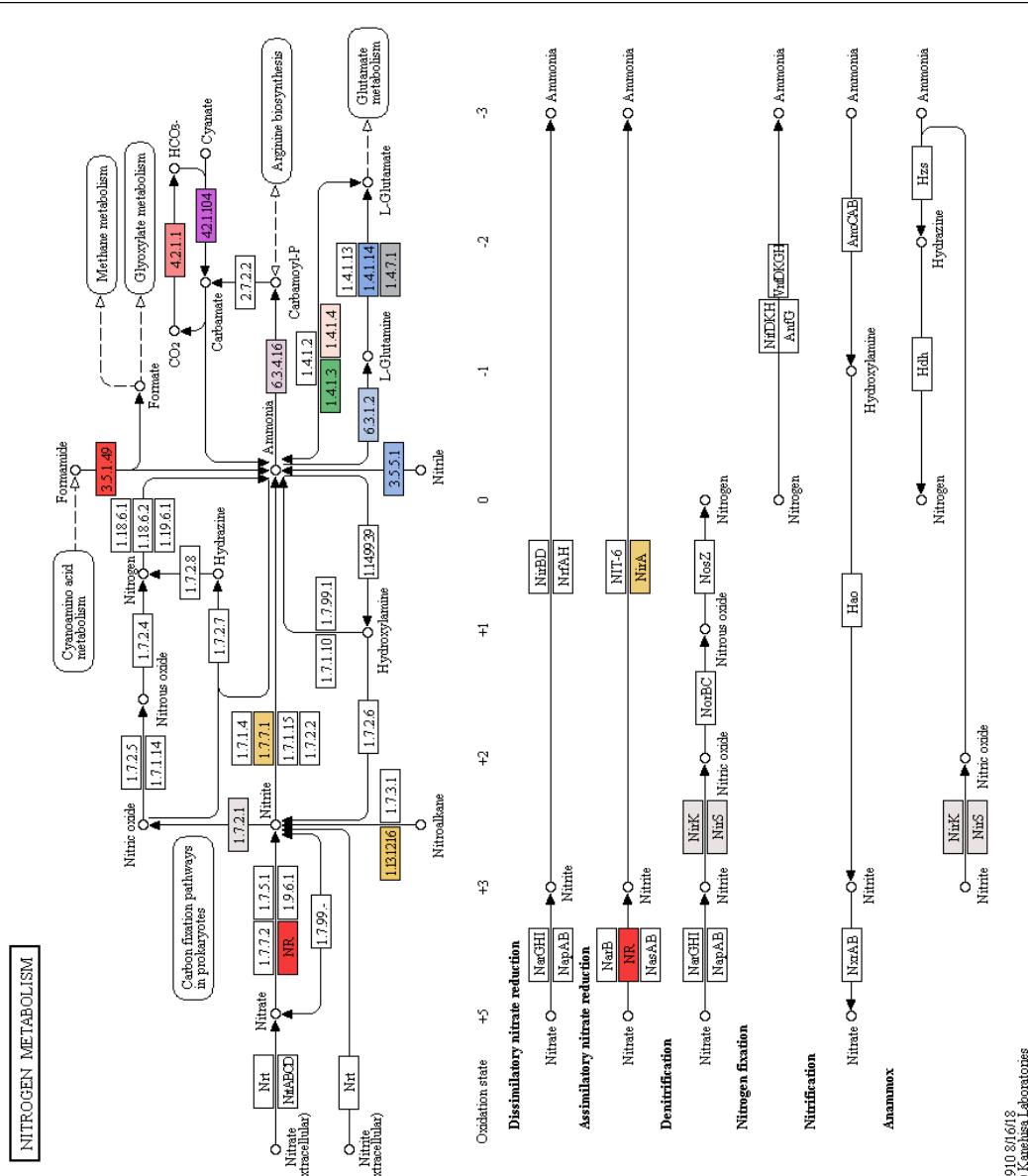
Funciones moleculares enriquecidas según el set de las 7.040 secuencias sobreexpresadas en tratamiento.

| GO ID | GO Name | GO Category | FDR | P-Value | Nr Test | Nr Reference | Non Annot Test | Non Annot Reference |
|------------|---|-------------|-----------|-----------|---------|--------------|----------------|---------------------|
| GO:0022857 | transmembrane transporter activity | MF | 1.68E -08 | 1.86E -11 | 306 | 1597 | 6734 | 54759 |
| GO:0005215 | transporter activity | MF | 1.68E -08 | 1.35E -11 | 321 | 1689 | 6719 | 54667 |
| GO:0046527 | glucosyltransferase activity | MF | 1.68E -08 | 8.10E -12 | 72 | 209 | 6968 | 56147 |
| GO:0015318 | inorganic molecular entity transmembrane transporter activity | MF | 2.05E -08 | 3.03E -11 | 181 | 820 | 6859 | 55536 |
| GO:0015075 | ion transmembrane transporter activity | MF | 1.33E -07 | 2.45E -10 | 215 | 1056 | 6825 | 55300 |
| GO:0020037 | heme binding | MF | 6.03E -07 | 1.34E -09 | 88 | 324 | 6952 | 56032 |
| GO:0022804 | active transmembrane transporter activity | MF | 1.39E -06 | 3.58E -09 | 131 | 577 | 6909 | 55779 |
| GO:0008194 | UDP-glycosyltransferase activity | MF | 4.51E -06 | 1.33E -08 | 96 | 388 | 6944 | 55968 |
| GO:0016758 | transferase activity, transferring hexosyl groups | MF | 7.28E -06 | 2.42E -08 | 113 | 492 | 6927 | 55864 |
| GO:0035251 | UDP-glucosyltransferase activity | MF | 8.03E -06 | 2.97E -08 | 58 | 190 | 6982 | 56166 |
| GO:0046906 | tetrapyrrole binding | MF | 8.15E -06 | 3.31E -08 | 92 | 374 | 6948 | 55982 |
| GO:0022836 | gated channel activity | MF | 1.10E -05 | 4.89E -08 | 47 | 139 | 6993 | 56217 |
| GO:0015291 | secondary active transmembrane transporter activity | MF | 1.62E -05 | 7.79E -08 | 73 | 276 | 6967 | 56080 |

| | | | | | | | | |
|------------|---|----|-----------|-----------|-----|------|------|-------|
| GO:0022890 | inorganic cation transmembrane transporter activity | MF | 4.46E -05 | 2.31E -07 | 116 | 536 | 6924 | 55820 |
| GO:0016757 | transferase activity, transferring glycosyl groups | MF | 6.27E -05 | 3.47E -07 | 172 | 893 | 6868 | 55463 |
| GO:0005216 | ion channel activity | MF | 1.81E -04 | 1.07E -06 | 55 | 200 | 6985 | 56156 |
| GO:0052691 | UDP-arabinopyranose mutase activity | MF | 2.39E -04 | 1.50E -06 | 7 | 1 | 7033 | 56355 |
| GO:0004497 | monooxygenase activity | MF | 2.81E -04 | 1.87E -06 | 54 | 199 | 6986 | 56157 |
| GO:0015297 | antiporter activity | MF | 4.37E -04 | 3.23E -06 | 53 | 198 | 6987 | 56158 |
| GO:0022853 | active ion transmembrane transporter activity | MF | 4.37E -04 | 3.16E -06 | 74 | 316 | 6966 | 56040 |
| GO:0016491 | oxidoreductase activity cation | MF | 5.37E -04 | 4.16E -06 | 328 | 2004 | 6712 | 54352 |
| GO:0008324 | transmembrane transporter activity | MF | 6.54E -04 | 5.31E -06 | 119 | 597 | 6921 | 55759 |
| GO:0015103 | inorganic anion transmembrane transporter activity | MF | 9.38E -04 | 7.97E -06 | 40 | 136 | 7000 | 56220 |

Apéndice 14

Metabolismo del Nitrógeno



Apéndice 15

Genes regulados positivamente relacionados con el mantenimiento, remodelación y biosíntesis de la pared celular.

| ID_NCBI | Description | Fold change | FDR -p value |
|----------------|---|-------------|--------------|
| GHTP01027148.1 | cellulose synthase A catalytic subunit 1 [UDP-forming] | 2,88 | 0,00E+00 |
| GHTP01021128.1 | peroxidase 57-like | 3,21 | 0,00E+00 |
| GHTP01030034.1 | probable beta-1,4-xylosyltransferase IRX10L | -2,61 | 0,00E+00 |
| GHTP01016517.1 | protein COBRA-like | 3,28 | 3,68E-09 |
| GHTP01030593.1 | polygalacturonase At1g48100-like | -2,37 | 6,29E-07 |
| GHTP01030665.1 | RHOMBOID-like protein 3 | 11,09 | 0,00E+00 |
| GHTP01000593.1 | pectinesterase-like | -2,64 | 0,00E+00 |
| GHTP01000612.1 | probable UDP-arabinopyranose mutase 2 | 5,33 | 0,00E+00 |
| GHTP01017730.1 | UDP-arabinopyranose mutase 1 | 6,59 | 0,00E+00 |
| GHTP01008237.1 | leucine-rich repeat extensin-like protein 4 | 3,84 | 0,00E+00 |
| GHTP01016894.1 | probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 51 | 2,52 | 4,40E-09 |
| GHTP01026780.1 | cellulose synthase-like protein D3 | 2,41 | 0,00E+00 |
| GHTP01015859.1 | xyloglucan 6-xylosyltransferase 2-like | 2,89 | 0,00E+00 |
| GHTP01031986.1 | peroxidase 27-like | 3,54 | 6,38E-10 |
| GHTP01017578.1 | cellulose synthase A catalytic subunit 1 [UDP-forming] | 3,62 | 0,00E+00 |
| GHTP01017126.1 | auxin-binding protein ABP19a-like | 2,31 | 0,00E+00 |
| GHTP01033018.1 | Rho GTPase-activating protein like | 2,17 | 1,02E-12 |
| GHTP01006810.1 | beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase 2-like | -2,4 | 4,50E-06 |
| GHTP01017555.1 | cellulose synthase-like protein E6 | 6,2 | 0,00E+00 |
| GHTP01027453.1 | cellulose synthase A catalytic subunit 1 [UDP-forming] | 2,79 | 0,00E+00 |
| GHTP01001240.1 | cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23 | -2,08 | 0,00E+00 |
| GHTP01028827.1 | | 2,91 | 7,73E-06 |
| GHTP01016893.1 | putative invertase inhibitor | -3,07 | 2,23E-05 |
| GHTP01018114.1 | xyloglucan galactosyltransferase MUR3 | 2,37 | 4,61E-09 |
| GHTP01006636.1 | rhamnogalacturonan I rhamnosyltransferase 1-like cellulose synthase A catalytic subunit 6 [UDP-forming]-like | 2,77 | 2,71E-14 |
| GHTP01017553.1 | | 2,28 | 0,00E+00 |
| GHTP01021126.1 | peroxidase 57-like | 2,3 | 0,00E+00 |
| GHTP01009985.1 | probable galacturonosyltransferase 14 isoform X2 | 3,53 | 0,00E+00 |
| GHTP01005421.1 | subtilisin-like protease SBT1.7 | 2,23 | 8,69E-04 |
| GHTP01017733.1 | probable UDP-arabinopyranose mutase 2 | 4,19 | 0,00E+00 |
| GHTP01017729.1 | alpha-1,4-glucan-protein synthase [udp-forming] 2 | 9,88 | 0,00E+00 |
| GHTP01017734.1 | alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming] 2 | 8,35 | 0,00E+00 |
| GHTP01017731.1 | probable UDP-arabinopyranose mutase 5 isoform X1 | 2,04 | 0,00E+00 |
| GHTP01021130.1 | peroxidase 3-like | 2,36 | 0,00E+00 |

| | | | |
|----------------|--|-------|----------|
| GHTP01001939.1 | annexin D2-like | -2,16 | 0,00E+00 |
| GHTP01001954.1 | UDP-arabinopyranose mutase 1 cellulose synthase A catalytic subunit 2 [UDP-forming]-like | 3,65 | 0,00E+00 |
| GHTP01010131.1 | | 2,34 | 0,00E+00 |
| GHTP01010621.1 | protein ALTERED XYLOGLUCAN 4-like putative UDP-glucuronate:xylan alpha-glucuronosyltransferase 3 | 2,24 | 1,36E-09 |
| GHTP01009488.1 | | -3,41 | 4,79E-09 |
| GHTP01021231.1 | beta-galactosidase 3-like | 2,1 | 4,12E-06 |
| GHTP01013166.1 | auxin-binding protein ABP19a-like | 2,63 | 0,00E+00 |
| GHTP01023436.1 | non-symbiotic hemoglobin 1 | 2,05 | 0,00E+00 |
| GHTP01017723.1 | galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase-like | 2,52 | 0,00E+00 |
| GHTP01002237.1 | cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 | -2,17 | 0,00E+00 |
| GHTP01038016.1 | protein trichome birefringence-like 14 | 6,18 | 0,00E+00 |
| GHTP01038017.1 | protein trichome birefringence-like 14 | 3,18 | 2,09E-07 |
| GHTP01011897.1 | rhamnogalacturonan I rhamnosyltransferase 1-like | 4,88 | 0,00E+00 |
| GHTP01023693.1 | peroxidase 64-like rhamnogalacturonan I rhamnosyltransferase 1 isoform X1 | -2,1 | 0,00E+00 |
| GHTP01006328.1 | | 3,54 | 0,00E+00 |
| GHTP01002380.1 | putative germin-like protein 2-1 | 3,73 | 0,00E+00 |
| GHTP01038564.1 | uncharacterized protein LOC110777824 xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 24-like | -2,5 | 1,43E-05 |
| GHTP01002422.1 | xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 24-like | 4,32 | 0,00E+00 |
| GHTP01005838.1 | | 4,23 | 0,00E+00 |
| GHTP01038909.1 | protein trichome birefringence-like 14 | 3,61 | 4,60E-09 |
| GHTP01023699.1 | peroxidase 42 | -2,1 | 2,02E-12 |
| GHTP01021136.1 | peroxidase 27-like | 2,46 | 0,00E+00 |
| GHTP01021127.1 | peroxidase 27-like | 5 | 0,00E+00 |
| GHTP01002534.1 | peroxidase 46-like | -4,35 | 1,33E-07 |
| GHTP01009416.1 | expansin-like A2 | 2,81 | 0,00E+00 |
| GHTP01008778.1 | probable xyloglucan glycosyltransferase 5 | 2,04 | 0,00E+00 |
| GHTP01008779.1 | probable xyloglucan glycosyltransferase 5 | 2,48 | 4,83E-07 |
| GHTP01028105.1 | polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase | 2,95 | 0,00E+00 |
| GHTP01009071.1 | cellulose synthase-like protein E6 | 2,22 | 0,00E+00 |
| GHTP01014590.1 | probable polygalacturonase | 2,23 | 4,25E-10 |
| GHTP01008887.1 | probable polygalacturonase | 2,64 | 0,00E+00 |
| GHTP01041207.1 | cellulose synthase A catalytic subunit 3 [UDP-forming] | 3,62 | 0,00E+00 |
| GHTP01010133.1 | cellulose synthase A catalytic subunit 3 [UDP-forming] | 3,18 | 0,00E+00 |
| GHTP01027883.1 | L-ascorbate oxidase homolog | 4,85 | 0,00E+00 |
| GHTP01009987.1 | probable galacturonosyltransferase-like 1 | 2,18 | 1,02E-09 |
| GHTP01006591.1 | probable xyloglucan glycosyltransferase 5 | 2,23 | 1,41E-06 |
| GHTP01006595.1 | probable xyloglucan glycosyltransferase 5 | 4,66 | 1,98E-07 |
| GHTP01023909.1 | leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PXC1 ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic | -2,31 | 3,41E-06 |
| GHTP01042166.1 | | -2,04 | 2,57E-07 |

| | | | |
|----------------|--|-------|----------|
| GHTP01003001.1 | galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase-like | 2,79 | 0,00E+00 |
| GHTP01011131.1 | omega-hydroxypalmitate O-feruloyl transferase-like | 2,89 | 0,00E+00 |
| GHTP01016519.1 | protein COBRA-like probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase | 2,63 | 0,00E+00 |
| GHTP01023802.1 | protein 23 probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase | 10,39 | 0,00E+00 |
| GHTP01013692.1 | protein 23 | 16,84 | 0,00E+00 |
| GHTP01006641.1 | protein COBRA-like | 2,26 | 0,00E+00 |
| GHTP01019467.1 | cell wall protein EXP3 precursor | -2,44 | 3,14E-04 |
| GHTP01021233.1 | beta-galactosidase 10 | 2,36 | 0,00E+00 |
| GHTP01027176.1 | protein REDUCED WALL ACETYLATION 3-like cellulose synthase A catalytic subunit 3 [UDP-forming]-like | 2,57 | 4,59E-07 |
| GHTP01007506.1 | | 2,38 | 0,00E+00 |
| GHTP01003284.1 | peroxidase 57-like | 4,53 | 0,00E+00 |
| GHTP01044660.1 | xyloglucan galactosyltransferase MUR3 cellulose synthase A catalytic subunit 6 [UDP-forming]-like | 4,16 | 0,00E+00 |
| GHTP01010132.1 | | 4,45 | 0,00E+00 |
| GHTP01009957.1 | probable xyloglucan glycosyltransferase 12 | 2,08 | 2,42E-12 |
| GHTP01012984.1 | glycosyltransferase family 64 protein C4 | 2,27 | 0,00E+00 |
| GHTP01026779.1 | cellulose synthase-like protein D3 | 5,13 | 0,00E+00 |
| GHTP01003589.1 | cellulose synthase | -2,39 | 8,53E-09 |
| GHTP01027212.1 | protein CELLULOSE SYNTHASE INTERACTIVE 1 | 3,03 | 5,16E-10 |
| GHTP01017579.1 | cellulose synthase-like protein E1 | 2,13 | 1,64E-12 |
| GHTP01048483.1 | peroxidase 3-like | 2,64 | 7,61E-09 |
| GHTP01048514.1 | rhamnogalacturonan I rhamnosyltransferase 1-like | 2,4 | 0,00E+00 |
| GHTP01023500.1 | myb-related protein Myb4-like | 5,12 | 0,00E+00 |
| GHTP01009983.1 | polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase | 2,69 | 2,56E-07 |
| GHTP01026347.1 | peroxidase 60-like | 3,46 | 0,00E+00 |
| GHTP01027310.1 | probable xyloglucan 6-xylosyltransferase 5 probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase | 3,29 | 0,00E+00 |
| GHTP01023811.1 | protein 33 | 3,19 | 1,65E-05 |
| GHTP01018187.1 | transmembrane 9 superfamily member 8 | 3,16 | 1,91E-14 |
| GHTP01050346.1 | protein CELLULOSE SYNTHASE INTERACTIVE 3 | 4,01 | 5,30E-14 |
| GHTP01050347.1 | protein CELLULOSE SYNTHASE INTERACTIVE 3 | 2,76 | 1,23E-06 |
| GHTP01013388.1 | alpha-galactosidase 3 | 2,4 | 5,41E-09 |
| GHTP01025288.1 | leucine-rich repeat extensin-like protein 4 probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase | 5,75 | 0,00E+00 |
| GHTP01023810.1 | protein 23 | 12,13 | 0,00E+00 |
| GHTP01027309.1 | probable xyloglucan 6-xylosyltransferase 5 | 3,36 | 6,39E-11 |
| GHTP01052309.1 | fasciclin-like arabinogalactan protein 13 | 3,08 | 7,81E-06 |
| GHTP01017503.1 | heparanase-like protein 3 | 10,11 | 1,19E-05 |
| GHTP01052507.1 | protein trichome birefringence-like 14 | 2,18 | 7,12E-04 |
| GHTP01052683.1 | fasciclin-like arabinogalactan protein 13 | 3,22 | 0,00E+00 |
| GHTP01009509.1 | probable galacturonosyltransferase 9 | 2,64 | 1,45E-08 |
| GHTP01006580.1 | probable galacturonosyltransferase 9 | 5,29 | 5,88E-09 |

| | | | |
|----------------|---|-------|----------|
| GHTP01014344.1 | protein REDUCED WALL ACETYLATION 3-like | 3,27 | 2,63E-07 |
| GHTP01014345.1 | protein REDUCED WALL ACETYLATION 3-like | 2,98 | 0,00E+00 |
| GHTP01053036.1 | expansin-like A1 | -2,1 | 1,88E-08 |
| GHTP01007505.1 | cellulose synthase-like protein D3 | 2,73 | 2,66E-04 |
| GHTP01055160.1 | COBRA-like protein 1 | 9,09 | 0,00E+00 |
| GHTP01055404.1 | putative germin-like protein 2-1 | 7,82 | 0,00E+00 |
| GHTP01056154.1 | probable xyloglucan glycosyltransferase 9 probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 32 | 2,86 | 2,47E-04 |
| GHTP01023806.1 | cellulose synthase-like protein D3 | 2,41 | 4,05E-04 |
| GHTP01017567.1 | probable methyltransferase PMT13 | 2,34 | 5,14E-12 |
| GHTP01006742.1 | xyloglucan 6-xylosyltransferase 2-like | 2,06 | 1,36E-06 |
| GHTP01058388.1 | uncharacterized protein At4g15970-like | 2,9 | 9,19E-07 |
| GHTP01059211.1 | putative Alpha-expansin 13 precursor probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23 | 2,11 | 1,32E-04 |
| GHTP01023809.1 | COBRA-like protein 1 | 2,81 | 8,36E-06 |
| GHTP01016515.1 | peroxidase 57-like | 11,59 | 0,00E+00 |
| GHTP01023708.1 | heparanase-like protein 1 | 3,18 | 1,27E-07 |
| GHTP01059847.1 | cellulose synthase-like protein D3 | 2,39 | 2,04E-13 |
| GHTP01017544.1 | protein CELLULOSE SYNTHASE INTERACTIVE 3 | 2,98 | 2,71E-05 |
| GHTP01024769.1 | protein CELLULOSE SYNTHASE INTERACTIVE 1-like | 5,84 | 5,30E-14 |
| GHTP01027971.1 | peroxidase 5-like | 6,54 | 0,00E+00 |
| GHTP01023719.1 | probable galacturonosyltransferase-like 9 | 4,97 | 0,00E+00 |
| GHTP01009951.1 | probable galacturonosyltransferase 12 | 2,28 | 8,59E-06 |
| GHTP01006578.1 | methionine aminopeptidase 1A | 2,2 | 1,25E-04 |
| GHTP01008638.1 | polygalacturonase-like | 5,25 | 5,62E-04 |
| GHTP01016749.1 | probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23 | 3,03 | 6,06E-04 |
| GHTP01015349.1 | methionine aminopeptidase 1A | 4,76 | 3,41E-08 |
| GHTP01004791.1 | expansin-A11-like | 7,73 | 0,00E+00 |
| GHTP01019465.1 | probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23 | 2,78 | 9,49E-04 |
| GHTP01013697.1 | cellulose synthase-like protein E1 | 2,08 | 6,39E-05 |
| GHTP01084988.1 | | 7,41 | 4,08E-07 |
| | | 16,17 | 9,34E-04 |