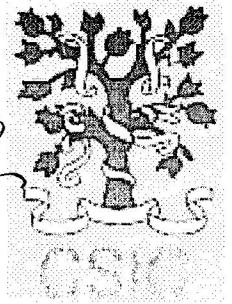




T 9/34

BS
L. R.



Universidad de Granada

Facultad de Ciencias

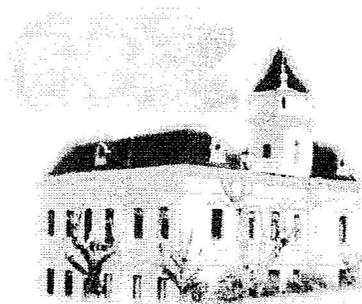
Tesis Doctoral

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 28/10/03
ENTRADA NUM. 3800

Estudios de los mecanismos de tolerancia al NaCl en cultivos celulares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Pera) que expresan Calcineurina de levadura

M^a Carmen Marín Manzano
2003

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 615033946
N.º Copia 216266407



UNIVERSIDAD DE GRANADA
18 OCT. 2003
COMISION DE DOCTORADO

Esta Memoria ha sido realizada durante los años 1998-2003 en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.).

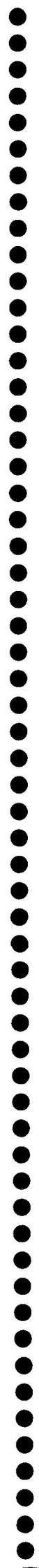
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
II. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS	3
A. EL PROBLEMA DE LA SALINIDAD EN PLANTAS	3
B. EFECTO NEGATIVO DE LA SALINIDAD	3
B.1. Susceptibilidad de las plantas a la salinidad	6
B. 2. Estrategias para la obtención de cultivos tolerantes Al NaCl	7
B.2.1. Importancia de la ingeniería genética	8
B.2.2. Importancia del cultivo <i>in vitro</i>	9
C. PRINCIPALES MECANISMOS DE TOLERANCIA AL NaCl	10
C.1. Mantenimiento del equilibrio osmótico	13
C.2. Mantenimiento de la homeostasis iónica: sistemas de transporte a través de las membranas celulares	16
C.2.1. H ⁺ -ATPasas, H ⁺ -PPasa y transportadores secundarios implicados en la homeostasis de Na ⁺ y Cl ⁻	17
C.2.1.1. Características bioquímicas, mecanismo de acción y papel fisiológico de la H ⁺ -ATPasa de plasmalema: efecto del estrés salino	19
C.2.1.2. Características bioquímicas, mecanismo de acción y papel fisiológico de la H ⁺ -ATPasa y H ⁺ -PPasa de tonoplasto: efecto del estrés salino	27
C.2.1.3. Transportadores secundarios implicados en el flujo de Na ⁺ y Cl ⁻	32
D. PAPEL DE LA CALCINEURINA EN LA SEÑALIZACIÓN DE LA HOMEOSTASIS IÓNICA	40
D.1. Subunidad catalítica de Calcineurina: Calcineurina A	42
D.2. Subunidad reguladora de Calcineurina: Calcineurina B	42
D.3. Papel fisiológico de la Calcineurina en levaduras, plantas y mamíferos: tolerancia a la salinidad	45
D.3.1. Calcineurina en levaduras	45
D.3.2. Calcineurina en plantas	48

D.3.3. Calcineurina en mamíferos	50
III. MATERIAL Y MÉTODOS	51
A. MATERIAL VEGETAL	51
A.1. Cultivo in vitro de plántulas	51
B. CEPA BACTERIANA Y VECTORES PLASMÍDICOS	51
B.1. Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	53
B.1.1. Introducción	53
B.1.2. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con el plásmido pBTCan	55
C. OBTENCIÓN DE CALLOS DE TOMATE TRANSFORMADOS	56
C.1. Obtención de cotiledones transformados	56
C.1.1. Crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56
C.1.2. Infección de los cotiledones	56
C.1.3. Inducción de la callogénesis y multiplicación de callos	57
C.2. Detección de CNAtr y CNB en los callos transformados	58
C.2.1 Extracción de ADN genómico	58
C.2.2. Amplificación por PCR	58
C.2.3. Extracción de ADN genómico e hibridación tipo Southern	59
C.3. Estudio de la expresión de Calcineurina en los callos transformados	60
C.3.1. Extracción de ARN total	60
C.3.2. Obtención de un fragmento de ADNc por RT- PCR	60
C.3.2.1. Transcripción inversa del ARN	60
C.3.2.2. Amplificación por PCR	61
D. ESTUDIOS FISIOLÓGICOS	61
D.1. Determinación del crecimiento	61
D.2. Determinación del contenido mineral: sodio, potasio, calcio y cloruro	61
D.3. Actividad extractora de protones	61
D.3.1. Fundamento del método y cuantificación de la medida	61

D.4. Test de viabilidad celular: reacción fluorocromática (FCR)	63
E. ESTUDIOS A NIVEL DE MEMBRANAS	64
E.1. Obtención de microsomas	64
E.2. Purificación de vesículas de plasmalema	64
E.3. Actividades enzimáticas asociadas a las membranas purificadas	65
E.3.1. Actividad ATPasa	65
E.3.2. Actividad UDPasa latente	67
E.3.3. Actividad NADH cit c reductasa insensible a antimicina A	67
E.4. Determinación del transporte de H ⁺ en vesículas de Membranas	68
E.5. Detección inmunológica de la H ⁺ -ATPasa de plasmalema	69
E.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	69
E.5.2. Electrotransferencia e inmunodetección de la H ⁺ -ATPasa de plasmalema	70
E.6. Estudio de la expresión de transportadores iónicos de Membranas	71
E.6.1. Hibridación por Northern	71
E.6.1.1. Sondas de ADNc utilizadas	71
E.6.1.2. Extracción de ARN total de los callos	72
E.6.1.3. Marcaje de las sondas de ADNc con ³² P-dCTP por cebamiento al azar	72
E.6.1.4. Separación del ARN en geles desnaturizantes de formaldehído	73
E.6.1.5. Transferencia del ARN a filtros de nylon	73
E.6.1.6. Condiciones de hibridación	73
E.6.1.7. Detección y cuantificación de los niveles de expresión génica	74

E.6.2. Estudios de expresión mediante PCR en tiempo real	75
E.6.2.1. Obtención de ADNc a partir de ARN total por RT- PCR: Transcripción inversa del ARN	75
E.6.2.2. PCR en tiempo real	75
IV. RESULTADOS	77
A. OBTENCIÓN DE CALLOS DE TOMATE TRANSGÉNICO	77
A.1. Regeneración de plántula a partir de cotiledones transformados con pBtCan	77
A.2. Obtención de callos a partir de tallos transformados	79
A.3. Análisis de la transformación	80
A.4. Morfología celular	83
B. ESTUDIOS FISIOLÓGICOS A NIVEL DE CALLOS	84
B.1. Crecimiento celular y análisis del contenido iónico	84
B.2. Extrusión de H ⁺ por las células de los callos disgregados	88
B.2.1. Determinación del Test de viabilidad celular durante el tiempo de medida de la actividad extrusora H ⁺	93
C. ESTUDIOS A NIVEL DE MEMBRANAS	97
C.1. Actividades H ⁺ - ATPasas asociadas a microsomas	97
C.2. Transporte de H ⁺ dependiente de ATP en vesículas de Microsomas	101
C.3. Purificación de plasmalema por partición de fases en dextrano polietilenglicol	104
C.3.1. Actividades enzimáticas asociadas al plasmalema	104
C.3.2. Transporte de H ⁺ dependiente de ATP a nivel de las vesículas de plasmalema	106
C.3.3. Detección inmunológica	108

C.4. Estudio de la expresión de bombas primarias y transportadores secundarios de iones ligados a membranas	111
C.4.1. Hibridación por Northern	111
C.4.2. PCR a tiempo real	114
V. DISCUSIÓN	117
VI. CONCLUSIONES	128
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129



**I. INTRODUCCIÓN Y
OBJETIVOS**

La salinidad de suelos y aguas de riego constituye uno de los principales factores que limita la productividad agraria. A causa de la salinización, grandes áreas geográficas no son aptas para la agricultura y, otras muchas, están en peligro de perderse debido a que la mayoría de las plantas cultivables son muy poco tolerantes a este factor ambiental.

Para disminuir el impacto de la salinidad en la agricultura, una estrategia que interesa a nuestro ámbito de actuación se basa en la selección de plantas tolerantes y productivas. Sin embargo, ni la utilización del potencial genético de las plantas ni la aportación de las técnicas de Biología Molecular han tenido éxito hasta el momento, debido a la complejidad de las características de resistencia, que ha resultado ser multigénica, y al desconocimiento de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos de tolerancia.

Para centrar este problema, es importante tener en cuenta que las plantas glicófitas basan su tolerancia a la salinidad en la exclusión de iones, en combinación con la síntesis de solutos orgánicos para su ajuste osmótico, y las halófitas en la alta velocidad de absorción, transporte y acumulación compartimentada de iones, para evitar la toxicidad y contribuir al ajuste osmótico, manteniéndose en ambos casos, una alta razón K^+/Na^+ en el citoplasma. A este respecto, la mayoría de las especies cultivadas de tomate, origen vegetal utilizado en este estudio, de una extraordinaria importancia agrícola en nuestro país y que se ve sometido a los continuos efectos de las altas concentraciones de NaCl en los suelos y aguas de riego, presenta, predominantemente, una estrategia glicófitica, mientras que las especies silvestres, mucho más tolerantes, presentan rasgos halófiticos. Por tanto, en especies de tomate tolerantes donde la capacidad para regular los flujos iónicos debe constituir un claro mecanismo de tolerancia, la identificación y caracterización bioquímica y génica de los componentes que controlan esta respuesta celular debe ser clave para los programas de mejora. Un enfoque adecuado de esta estrategia, requiere tener en cuenta que, en plantas expuestas a medios con alta concentración de NaCl, una necesidad primaria es excluir el Na^+ y el Cl^- del citoplasma por eflujo al apoplasto y/o a la vacuola. Este transporte es dirigido a través del plasmalema y tonoplasto por las bombas primarias (H^+ -ATPasas y H^+ -PPasa) y por los transportadores secundarios de iones (transportadores de K^+ y antiporte Na^+/H^+), habiendo sido demostrado que la salinidad inhibió, no afectó e incluso estimuló la actividad de estas proteínas, dependiendo de la especie, variedad y condiciones de cultivo. Así mismo, se ha podido comprobar que algunas de estas actividades enzimáticas pueden ser reguladas de forma rápida por mecanismos bioquímicos como fosforilación / desfosforilación y activación proteolítica, aunque, hasta el momento, sólo existen escasas evidencias de tales mecanismos de regulación en plantas. En su conjunto, todas estas evidencias se asocian al hecho constatado de que la capacidad de las plantas para tolerar

ambientes salinos viene determinada por procesos Biológicos que facilitan el mantenimiento de la homeostasis iónica, los cuales incluyen la síntesis y/o regulación postransduccional de proteínas que controlan el transporte iónico. De aquí, que un objetivo importante de este trabajo haya sido el estudio de la implicación de estas proteínas en los cambios que inicialmente siguen al estrés y en la activación transcripcional de los genes que las codifican.

Al hilo de lo anteriormente indicado en relación a los mecanismos de tolerancia al NaCl, diversos estudios han permitido determinar, utilizando plantas transgénicas, otros factores de tolerancia mediante la identificación de genes que codifican proteínas que interviene en la regulación de la expresión génica y transducción de señales implicadas en la respuesta al estrés, tanto a nivel celular como de planta entera. Este es el caso de la Calcineurina, una proteína fosfatasa de tipo 2B dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina que, en levadura, regula el sistema de exclusión de Na^+ (ENA1) y de K^+ (TRK1), incrementando la afinidad por K^+ en respuesta a la sal y, por ello, mejorando la discriminación entre K^+ y Na^+ a través de la regulación de estos iones. Además, aunque por el momento no se ha identificado un homólogo estructural de la subunidad catalítica de Calcineurina en el genoma de Arabidopsis, si se ha podido comprobar que el gen SOS3, implicado en la tolerancia a sal, codifica una proteína con cierta homología a la subunidad reguladora de Calcineurina de levadura, y que la expresión de Calcineurina en plantas transgénicas de tabaco confiere tolerancia al NaCl. Por ello, objetivo primario de esta investigación ha sido el estudio de la relevancia de la Calcineurina de levadura en la respuesta de células de tomate al NaCl, mediante la obtención de un cultivo celular de tomate transgénico en esta proteína, donde poder definir su participación en la regulación de las bombas primarias y/o transportadores secundarios de iones en este importante cultivo en función del estrés salino. Finalmente, para llevar a cabo los objetivos expuestos, ha sido fundamental la utilización de líneas de callos de tomate obtenidos a partir de explantos transformados y, posteriormente, subcultivados hasta definir un material homogéneo de trabajo.

**II. ANTECEDENTES
CIENTÍFICOS**

A. EL PROBLEMA DE LA SALINIDAD EN PLANTAS

La salinidad del suelo es uno de los factores ambientales que incide más negativamente en la productividad agrícola y limita el uso potencial de nuevas áreas de cultivo (Flowers y Yeo 1995). El 40 % de la superficie mundial corresponde a regiones áridas y semiáridas caracterizadas por suelos secos debido a la escasez de lluvias, temperaturas extremas y una alta velocidad de evaporación, donde la producción agrícola depende fuertemente de la irrigación y de un eficiente manejo de los recursos hídricos. En estas condiciones, el efecto acumulativo del uso continuado de aguas que contienen sales disueltas, unido a una gran velocidad de evaporación y baja capacidad de lixiviación de algunos suelos, así como el uso de elevadas cantidades de fertilizantes en ciertas áreas de cultivo y de la penetración del agua del mar en zonas costeras y marismas, ocasionan el fenómeno de salinización de los suelos (Downton 1984, Ashraf 1994, Serrano y Gaxiola 1994, Flowers y Yeo 1995).

Entre las áreas con elevados porcentajes de superficie agrícola afectadas por la salinidad se encuentran zonas más productivas, como California, el sur de Asia y gran parte del área mediterránea, como las marismas del Sur, Almería, Murcia, Alicante, Valle del Ebro (Ayers y col. 1960), y toda la franja atlántica de la costa marroquí (Choukrallah 1986). Todas estas razones justifican que la salinidad de suelos y aguas constituya una verdadera amenaza para la agricultura, puesto que la mayoría de las plantas cultivadas, entre ellas el tomate, se ven afectadas, en mayor o menor medida, por este factor ambiental.

B. EFECTO NEGATIVO DE LA SALINIDAD

El efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas se debe al estrés hídrico causado por el potencial hídrico más negativo del medio externo (hiperosmótico), a la toxicidad iónica específica asociada normalmente a la excesiva absorción de iones Na^+ y Cl^- y a la perturbación de la distribución de nutrientes causada por el exceso de Na^+ o Cl^- , que conduce a una menor absorción o a una alteración del contenido de iones esenciales como el K^+ , Ca^{2+} , nitrato o fosfato (Glenn y col., 1999; Hasegawa y col., 2000; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Zhu, 2001; Ward, 2003). En pelos radiculares de *Arabidopsis* el NaCl altera el Ca^{2+} citosólico y reduce el crecimiento, no afectándose el pH del citoplasma (Halperin y col., 2003)

Este efecto negativo de la salinidad da lugar, en plantas más o menos sensibles, a un rango de respuestas que, comúnmente, se inicia con una reducción del crecimiento. Pero los mecanismo subsecuentes a la inhibición del crecimiento van desde la reducción del turgor, inhibición de la división y

expansión celular, desorganización de las membranas, inhibición de determinadas actividades enzimáticas y producción de radicales libres, hasta la disminución de la fotosíntesis, inducción de deficiencias iónicas e interferencia del Cl^- y Na^+ con los sitios aniónicos y catiónicos implicados en el ligamiento de metabolitos claves para la planta (Hasegawa y col., 2000). La consecuencia general de todos estos efectos es la reducción del crecimiento, que en caso de extrema severidad del estrés, puede llevar a la muerte de la planta (Greenway y Munns, 1980; Shannon, 1984; Hasegawa y col., 1986; Cheeseman, 1988; Hurkman, 1992; Rengel, 1992; Munns, 1993; Shannon y col., 1994; Niu y col., 1995; Serrano y Gaxiola, 1994; Inzé y Van Montagu, 1995; Serrano, 1996; Yeo, 1998; Serrano y col., 1999; Hasegawa y col., 2000; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001).

A diferencia de las plantas halófitas, las glicófitas reducen rápidamente su crecimiento bajo condiciones salinas existiendo una gran controversia acerca de la causa primaria responsable de la disminución del crecimiento en este tipo de plantas, al resultar difícil discernir la importancia relativa de los efectos osmóticos, iónicos y desequilibrios nutricionales. Algunos autores han sugerido que este efecto rápido tiene lugar primariamente en la raíz, debido a un efecto osmótico más que iónico (Neumann y col. 1988, Munns 1993, Ortiz y col. 1994), a través de una reducción en el volumen celular (Iraki y col. 1989). La causa primaria de esta reducción del volumen celular es también controvertida, pudiendo provenir de una disminución del turgor causado por el déficit hídrico (Neumann y col. 1988), y/o de una extensibilidad reducida de la pared celular, a través de una alteración en el metabolismo de sus componentes polisacáridicos (Iraki y col. 1989, Cachorro y col. 1993, Zhong y Läuchli 1993).

A más largo plazo, el efecto negativo del estrés salino se debe a la acción tóxica de los iones Na^+ y Cl^- . En algunas plantas como *Citrus sinensis* (Bañuls y Primo-Millo, 1992) y soja (Abel, 1969), el NaCl y KCl son igualmente tóxicos, mientras que el NaNO_3 es menos tóxico lo que indica que el componente tóxico de las sales es fundamentalmente el Cl^- . Por el contrario, en tomate (Rush y Epstein, 1981) y trigo (Gorham y col., 1990) el NaCl es más tóxico que el KCl , indicando que, en este caso, el componente tóxico de la sal es el Na^+ . En suspensiones celulares de tabaco, concentraciones osmóticamente equivalentes de sorbitol, manitol, NaCl y KCl provocan una inhibición del crecimiento celular, siendo mucho más acentuado con el NaCl y KCl (LaRosa y col., 1985) lo que indica que, al menos en parte, los efectos negativos causados por estas sales son debidos al componente iónico.

Otro de los efectos primarios del estrés salino sobre el crecimiento se había atribuido a un daño en las membranas celulares ejercido por el componente iónico del estrés, como resultado de una alteración de la estructura y funcionalidad de las mismas, a través de cambios inducidos en sus componentes lipídicos y/o proteicos (Brown y Dupont 1989, Belver y Travis 1990, Hurkman 1992, Rodríguez Rosales y

col. 1999). Este daño en las membranas explicaría la alteración en procesos tales como fotosíntesis, respiración y absorción y transporte de nutrientes minerales (Läuchli y Epstein 1990, Hasegawa y col., 2000). En este sentido, se había postulado que la acción tóxica rápida del estrés salino sobre las membranas podría provenir del desplazamiento por el Na^+ de los iones Ca^{2+} asociados a la membrana plasmática y otros sistemas endomembranarios (Lynch y Läuchli 1988), cuya consecuencia sería una alteración de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular (Läuchli 1990, Rengel 1992). Resultados posteriores han indicado que el estrés salino es percibido por la planta a través de un aumento transitorio de la concentración de Ca^{2+} citosólico (Sanders y col., 1999; Knight, 2000), para facilitar su adaptación al estrés (Knight y Knight, 2001). En levadura, se ha comprobado que el estrés hiperosmótico, generado por sal o solutos osmóticos no iónicos, induce un incremento transitorio de la concentración de Ca^{2+} en el citosol en levadura, mediando la adaptación al estrés iónico. Cómo la mayoría de las sales son tóxicas a concentraciones que también producen estrés osmótico, en estas células la detección y la respuesta al estrés salino, probablemente, está mediada por un osmosensor y no por un sensor iónico. (Matsumoto y col., 2002). En plantas la modulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, probablemente tenga lugar a través de la generación de segundos mensajeros como inositol trifosfato, ABA y especies de oxígeno reactivas, que, a menudo inician una cascada de proteínas quinasas y fosfatasa dependiente de este ion (Pical y col. 1999; DeWald y col., 2001; White y Broadley, 2003), las cuales van a tener como dianas finales toda una batería de proteínas implicadas en la tolerancia a la sal (Bressan y col. 1998, Serrano y col. 1999; Xiong y col., 2002). Así, en cultivos celulares de *Arabidopsis* se observó un rápido incremento tanto de la fosfolipasa C, que hidroliza fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP_2), como de este fosfolípido (DeWald y col., 2001), y de los segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) y inositol trifosfato (IP_3), que activan a la proteína quinasa C, disparando la liberación de Ca^{2+} (Xiong y col., 2002).

En todo caso, cualquiera que sea la causa primaria relacionada con el estrés salino, la disminución del crecimiento en condiciones salinas parece tener connotaciones adaptativas, puesto que parte de la energía utilizada normalmente en el crecimiento y desarrollo, se desvía hacia procesos de mantenimiento de los mecanismos involucrados en la tolerancia al estrés, tales como la regulación de la concentración intracelular de iones, síntesis de solutos orgánicos compatibles y mantenimiento de la integridad de las membranas (Cheeseman 1988, Shannon y col. 1994; Hasegawa y col., 2000).

1. Susceptibilidad de las plantas a la salinidad

La salinidad de los suelos está mayoritariamente determinada por el NaCl y también, aunque en menor grado, por otras sales como Na₂SO₄, CaSO₄, MgCl₂ y Na₂CO₃ (Epstein y Rains 1987), variando la toxicidad de los iones en función de la planta. Así, el Cl⁻ es el componente tóxico en cítricos (Bañuls y Primo-Millo 1992) y soja (Abel 1969), mientras que el Na⁺ lo es para el tomate (Rush y Epstein 1981), trigo (Gorham y col. 1990) y Arabidopsis (Sheahan y col. 1993).

Tabla 1. Clasificación de las plantas según su capacidad de soportar altas concentraciones de NaCl sin daño aparente (Greenway y Munns 1980).

Grupo	Límite de supervivencia	Especie
Grupo I. Halófitas		
I _A . Crecimiento estimulado en presencia de 200-500 mM NaCl	700 mM NaCl	Suaeda maritima, Atriplex nummularia
I _B . Crecimiento inhibido en presencia de NaCl.	>200 mM NaCl	Atriplex hastata, Spartina townsendii
Grupo II. Halofitas y Glicófitas		
Tolerantes		
II _A . Halófitas monocotiledóneas	200 mM NaCl	Festuca rubra, Puccinella peisonis.
II _B . Glicófitas		Gossypium, Hordeum
Intermedias		
Sensibles		
	>100 mM NaCl	Lycopersicon
	<100 mM NaCl	Phaseolus, Glycine
Grupo III. Glicófitas		
Muy sensibles		
	<50 mM NaCl	Cítricos, Aguacates, Frutales de hueso

El crecimiento de las plantas se afecta negativamente cuando la concentración de sales alcanza un valor umbral, a partir de la cual dicho efecto puede variar dentro de un amplio rango, en función de la capacidad genética de las especies, estadio de desarrollo, interacciones ambientales y tipo de ion (Shannon 1984). En función de las concentraciones que son capaces de soportar sin sufrir daños aparentes, después de 1 a 6 meses de cultivo en condiciones salinas, las plantas se han clasificado en los diferentes grupos indicados en la Tabla 1.

En referencia concreta al tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), este cultivo ha adquirido gran importancia económica en todo el mundo, ocupando una superficie de casi tres millones de hectáreas con una media anual de producción superior a setenta millones de toneladas (F.A.O 1995). Se trata de una planta perenne que se desarrolla bien en un amplio rango de latitudes, tipos de suelos, temperatura y sistemas de cultivo, los cuales han experimentado cambios rápidos y notables durante las últimas cuatro décadas, estableciéndose hoy en día reglamentos específicos de cultivo y producción integrada bajo abrigo (Belda y Lastres 2000). La principal razón de estos cambios ha sido la experiencia de factores limitantes para la continuidad del cultivo intensivo en el suelo natural, entre ellos, la salinización, que provoca alteraciones generalizadas en el metabolismo de esta planta. Dichas alteraciones se reflejan en un sistema radical de menor desarrollo, hojas adultas abarquilladas, hojas jóvenes pequeñas, de color verde más intenso y enrolladas sobre si mismas, racimos con menor número de flores, frutos más pequeños y necrosis del sistema vascular (Cuartero y col. 1995).

El tomate cultivado pertenece al grupo de sensibilidad intermedia (Tabla 1), aunque puede haber una variación interespecífica e intraespecífica con la existencia de especies y de variedades cultivadas que presentan una tolerancia diferencial a la salinidad, abarcando un amplio rango de sensibilidad al estrés por este factor, y en las que la altura del tallo y el crecimiento de la hoja fueron los parámetros de crecimiento más afectados (Dehan y Tal 1978, Shannon 1984, Cuartero y col. 1992, Perez-Alfocea y col. 1993a, Cano y col. 1996, Santa-Cruz y col. 1999).

2. Estrategias para la obtención de cultivos tolerantes al NaCl

Para disminuir el impacto de la salinidad en la Agricultura, se ha venido desarrollando estrategias tanto de tipo tecnológico como biológico (Flowers y Yeo 1995). En la primera se incluyen unas buenas prácticas de irrigación y drenaje, como la optimización del riego para minimizar el uso de agua de media o baja calidad (con alto contenido de sales) y evitando la salinización secundaria, así como la regeneración del suelo mediante el lavado de las sales con agua de buena calidad (no siempre disponible). La segunda estrategia se basa en el aumento de la tolerancia de los cultivos mediante genética convencional o ingeniería genética.

Desde la perspectiva biológica, de especial importancia en Agricultura Sostenible, una primera aproximación a la solución de este problema ha venido de la mano de la mejora por genética clásica. Esta se ha basado, inicialmente, en criterios de selección agronómica, tales como rendimiento de la cosecha o supervivencia (Epstein y Rains 1987, Noble y Rogers 1992), y, más recientemente,

en el uso de criterios de selección basados en procesos fisiológicos concretos relacionados con la tolerancia, con objeto de identificar y seleccionar aquellos genotipos más tolerantes y su utilización como donadores de rasgos que confieren tolerancia (Noble y Rogers ,1992; Cuartero y col., 1992).

Si bien la aplicación de técnicas de mejora genética a la obtención de plantas tolerantes a la sal ofrece grandes posibilidades, también ha conllevado dificultades, debido a que la tolerancia a este factor está regulada por genes muy diversos y a que la respuesta al estrés tiene lugar tanto a nivel celular como a nivel de planta entera (Flowers y Yeo 1995, Bohnert y Jensen 1996, Hare y col., 1996, Hare y col., 1998, Yeo 1998). A todo lo anterior se une la dificultad para combinar, en el proceso de selección, dos rasgos multigénicos como son la tolerancia a la sal y la productividad agrícola (Flowers y Yeo 1995). De ahí que, a pesar del esfuerzo realizado y de las numerosas investigaciones llevadas a cabo para descifrar los mecanismos de tolerancia a la salinidad, los programas de mejora desarrollados hayan tenido un éxito limitado (Bohnert y Jensen, 1996, Yeo 1998).

2.1. Importancia de la ingeniería genética

La aplicación de la ingeniería genética en la obtención de organismos modificados genéticamente, puede constituir un método efectivo para la mejora de plantas de interés agronómico. En este sentido, se ha investigado el hecho de que la introducción de genes relevantes de halotolerancia que codifican a proteínas con funciones concretas puedan contribuir cualitativamente al incremento de un rasgo tan complejo como la tolerancia a la sal (Yeo 1998), habiéndose obtenido resultados positivos con la expresión de genes procedentes de organismos no vegetales (bacterias o levaduras) (Tarszczinsky y col. 1993, Pilon-Smits y col 1995, Saneoka y col. 1995, Bordás y col. 1997, Arrillaga y col. 1998), o con la sobreexpresión de genes que son componentes normales del mecanismo de adaptación de la planta o de especies relacionadas (Apse y col. 1999, Espinosa-Ruiz y col. 1999; Shi y col., 2002; Zhang y Blumwald, 2001; Zhang y col., 2001; Ohta y col., 2002; Rausell y col., 2003). Una estrategia prometedora parece ser la manipulación de genes implicados en las rutas de transducción de señales o en la activación transcripcional de múltiples genes (factores de transcripción, osmoprotectores), que al controlar diferentes características fisiológicas (p.e., la homeostasis iónica y osmótica) parece incrementar la tolerancia de forma cualitativa y cuantitativa (Pardo y col. 1998; Zhu, 2001; Shi y col., 2002; Nagaoka y Takano, 2003). Otra puede ser la expresión heteróloga de genes de plantas con posible implicación en la tolerancia al estrés salino en levadura, como es la expresión del N-terminal de los genes SLT1 de tabaco y Arabidopsis en el mutante de levadura deficiente en

Calcineurina B, que suprime el fenotipo de sensibilidad a la sal (Matsumoto y col., 2001). Así mismo, en virtud de la conexión existente entre varias rutas de defensa contra diferentes estreses (sal, frío, sequía), la manipulación de dichos genes podría ocasionar una protección cruzada frente a diferentes tipos de estrés (Serrano 1996, Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 1997, Serrano y col. 1999).

Todos estos resultados han hecho concebir esperanzas de que una mayor profundización en la investigación de las respuestas de las plantas a la salinidad y de sus mecanismos de tolerancia, que lleve a la identificación de marcadores bioquímicos y/o génicos, facilitaría la selección y/o la mejora de variedades más tolerantes. No cabe duda, que para llevar a cabo este desafío, se requiere el esfuerzo combinado de fisiólogos, bioquímicos, biotecnólogos y mejoradores, cuya cooperación abra las posibilidades de un aumento de la productividad (y calidad) en áreas de cultivo afectadas por este importante factor ambiental.

2.2. Importancia del cultivo *in vitro*

Los hechos expuestos han inducido a la necesidad de utilizar criterios fisiológicos para la selección de plantas tolerantes al NaCl (Cuartero y col., 1992), así como de técnicas de cultivo de tejidos y células. Las ventajas potenciales de las técnicas de cultivo *in vitro* para el estudio y la selección de líneas tolerantes al NaCl incluyen: la caracterización, a nivel celular, de marcadores fisiológicos asociados con la tolerancia a la sal; la reducción de interferencias en el proceso de selección debido a la ausencia de la variabilidad que suponen los tejidos diferenciados de las plantas; la posibilidad de obtener una gran variabilidad de genotipos que pueden ser evaluados y seleccionados en el laboratorio; la reducción en el tiempo entre generaciones y la capacidad de manipular, de manera precisa, las condiciones ambientales y del medio de cultivo (Epstein y Rains, 1987). Sin embargo, la aplicación del cultivo *in vitro* a la obtención de plantas tolerantes a la sal también encuentra dificultades, debidas, principalmente, a que el carácter seleccionado a nivel celular debe expresarse a nivel de planta entera, una vez se ha regenerado ésta, incorporando el carácter genético deseado y no así los caracteres adversos derivados del proceso de selección. Por todo ello, es necesario conocer las limitaciones del cultivo celular en la obtención de plantas tolerantes a la sal, a fin de aplicar esta técnica en las situaciones apropiadas (Meins, 1983).

Mediante la utilización de estas técnicas de cultivo de tejidos vegetales se han conseguido líneas celulares adaptadas a diferentes concentraciones salinas en especies como *Lycopersicon esculentum* Var. Saint Pierre (Boureaux-Chaillout y Guerrier, 1992), *Lycopersicon peruvianum* (Hassan y Wilkins, 1988),

Lycopersicon esculentum Var. Pera (Roriguez-Rosales y col., 1999; Kerkeb y col., 2001), *Beta vulgaris* (Blumwald y Poole, 1987; Ramagopal y Carr, 1991), *Citrus* sp. (Ben-Hayyim y col., 1989), *Nicotiana tabacum* (Murata y col., 1994), *Pisum Sativum* (Olmos y Hellín, 1996), *Poncirus trifoliata* (Bouharmont y Beloualy, 1992), *Oryza sativa* (Shirata y Takagishi, 1990), *Medicago sativa* (Winicov y col., 1990), *Medicago media* (Chaudhary y col., 1995), *Cymbopogon martinii* (Patnaik y Debata, 1997). La conversión de células sensibles en células adaptadas al NaCl es probablemente debido a una transformación epigenética, lo que implicaría que la información genética para el crecimiento en un ambiente salino está presente, aunque sin expresarse, en las células sensibles a la sal, hecho que no sorprende ya que en las células eucariotas sólo una pequeña fracción de la información genética se expresa de forma continuada (Lerner, 1985). En cualquier caso, las líneas celulares tolerantes al NaCl pueden ser de gran ayuda en la regeneración de plantas tolerantes a la sal.

Los mecanismos de tolerancia a la sal han sido estudiados en líneas celulares de numerosas especies tolerantes y sensibles al NaCl incluyendo alfalfa, tabaco, patata, tomate, *Vigna radiata*, *Cymbopogon*, cítricos y arroz (Ben-Hayyim y Kochba, 1983; Binzel y col., 1987; Shirata y Takagishi, 1990; Kumar y Sharma, 1989; Sabbah y Tal, 1990; Chaudhary y col., 1997; Hawkins y Lips, 1997; Patnaik y Debata, 1997). Estos estudios han evidenciado la importancia de los procesos de absorción y transporte iónico en la tolerancia, habiéndose constatado que las líneas celulares de Citrus tolerantes al NaCl sobreviven a elevados niveles de salinidad evitando parcialmente el NaCl (Ben-Hayyim y Kochba, 1983), mientras que líneas celulares de tabaco, patata y *Cymbopogon martinii* se adaptan al NaCl acumulando iones Na^+ y Cl^- (Binzel y col., 1987; Sabbah y Tal, 1990; Patnaik y Debata, 1997; Roriguez-Rosales y col., 1999; Kerkeb y col., 2001). En general, los estudios a nivel celular indican que uno de los factores mas importantes en la tolerancia es el equilibrio del contenido en Na^+ y K^+ (Zhong y Laüchli, 1994; Rubio y col., 1995; Shanon y Nobles, 1995; Datta y col., 1996; Roriguez-Rosales y col., 1999; Kerkeb y col., 2001).

C. PRINCIPALES MECANISMOS DE TOLERANCIA AL NaCl

El estrés salino afecta a diversos aspectos de la fisiología y metabolismo de las plantas, provocando muchos cambios que pueden ser, claramente, adaptativos y otros muchos que pueden ser, simplemente, consecuencias patológicas del daño provocado por el estrés, existiendo una señalización que activa la respuesta patológica (Hasegawa y col., 2000b; Zhu, 2001 y 2002). De forma natural, la planta sacrifica una parte de su estructura, lo que constituye una estrategia adaptativa para sobrevivir al episodio de estrés. Una respuesta adaptativa engloba tres aspectos bien diferenciados: a) homeostasis iónica y osmótica, b) control del daño

y reparación, c) control del crecimiento (Zhu, 2001). Como muestra la Figura 1 (Zhu, 2002), las causas del despliegue de la vía de señalización del estrés salino son cambios iónicos, como el exceso de Na^+ , y osmóticos, como pérdida de turgor en respuesta a la deshidratación, siendo su consecuencia directa el restablecimiento de la homeostasis iónica y osmótica. Por otro lado, la señal de detoxificación deriva directamente del daño provocado por el estrés, debido a la producción de especies activas de oxígeno y a la desnaturalización de proteínas, y su señal de salida es el control del daño y de la reparación. Las señales del estrés iónico y osmótico y de detoxificación, regulan la respuesta de inhibición del crecimiento (Xiong y Zhu, 2001), a través de la inhibición de la expansión y división celular, actuando sobre el ciclo de las ciclinas dependientes de kinasas (Zhu, 2001).

En función de los mecanismos desarrollados para mantener la turgencia celular y prevenir la toxicidad iónica en condiciones de salinidad, las plantas pueden adoptar dos tipos de respuestas adaptativas frente a la salinidad (Greenway y Munns, 1980; Jeschke, 1984; Cheeseman, 1988). Por un lado las plantas halófitas han desarrollado un mecanismo que se basa en la acumulación y/o extrusión de iones. Las especies halófitas generan turgencia celular incrementando las concentraciones intracelulares de Na^+ y Cl^- (Niu y col., 1995; Nelson y col., 1998; Hasegawa y col., 2000), y sintetizando solutos orgánicos neutros que son acumulados en el vacuola, a través de transportadores dependientes de energía, donde contribuyen al mantenimiento de la presión osmótica (Binzel y col., 1998; Glenn y col., 1999; Yeo, 1998; Apse y col., 1999; Hasegawa y col., 2000). Algunas especies halófitas han desarrollado modificaciones estructurales con valor adaptativo en condiciones de altas concentraciones iónicas, como son las glándulas o vesículas acumuladoras de sal en hojas y su consecuente aumento de volumen que posibilita la dilución de iones. Esta ventaja evolutiva, en la que este mecanismo bioquímico particular está preactivado, le confiere una capacidad de respuesta frente al estrés salino mucho más rápida y eficaz permitiéndole sobrevivir a un shock salino y recuperar fácilmente el estado metabólico normal de crecimiento en un ambiente salino (Casas, 1991; Niu y Hasegawa, 1993; Hassidim, 1997; Braun, 1997; Hasegawa y col., 2000).

Por otro lado, las plantas glicófitas han desarrollado una estrategia de defensa frente al estrés salino que se basa, fundamentalmente, en la potenciación de los mecanismos de exclusión de iones en combinación con la síntesis de compuestos orgánicos solubles, capaces de mantener las actividades bioquímicas de la célula y de contribuir al mantenimiento de la turgencia y el volumen celular. (Greenway y Munns, 1980; Bonhert y Sheveleva, 1998; Nelson y col., 1999). Algunas modificaciones estructurales como el incremento de la extensibilidad de la pared celular y de la permeabilidad de las raíces al agua o el espesamiento de las hojas pueden también contribuir a la tolerancia al NaCl en plantas (Greenway y Munns, 1980). La mayoría de las especies cultivadas adoptan una estrategia glicófitas frente al estrés salino, aunque existen especies glicofíticas tolerantes al

NaCl que presentan rasgos halófitos (Tal, 1984; Shannon, 1984). Estudios recientes afirman que la mayoría de las plantas halófitas y glicófitas toleran la salinidad por estrategias similares, usando procesos tácticos análogos. El citosol y las organelas de las células de plantas halófitas y glicófitas son igualmente sensibles al Na⁺ y al Cl⁻, así el ajuste osmótico es llevado a cabo en estos compartimentos por la acumulación de osmolitos y osmoprotectantes (Yokoi y col., 2002). Sin embargo, el Na⁺ y el Cl⁻ son eficientes osmolitos para el ajuste osmótico y son compartimentalizados en la vacuola para minimizar su citotoxicidad. (Blumwald y col., 2000; Hasegawa y col., 2000; Zhu, 2002).

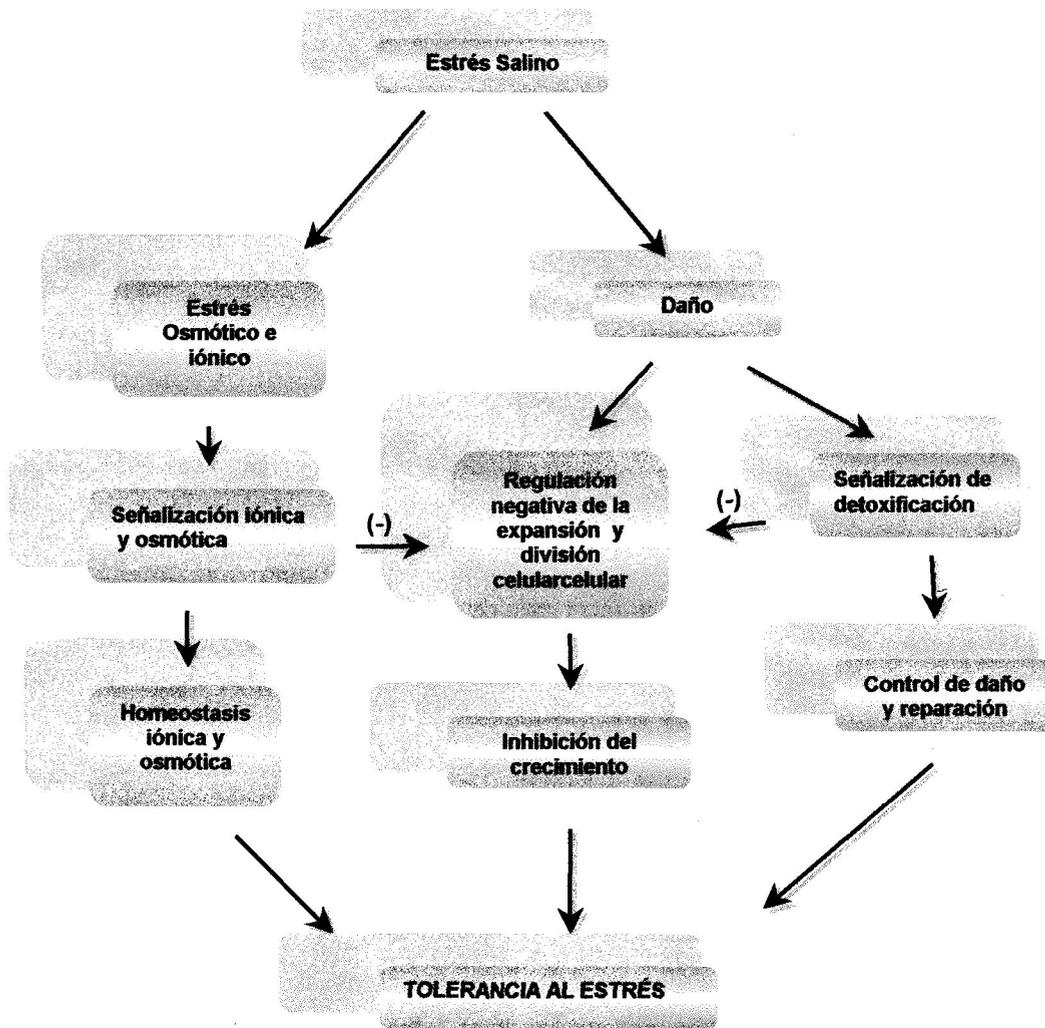


Figura 1. Diferenciación de las vías de señalización del estrés salino, (Zhu, 2002).

A nivel celular, los mecanismos de tolerancia a la salinidad descansan sobre tres aspectos interrelacionados, ya referidos, en alguna medida, anteriormente (Shannon y col. 1994, Serrano 1996; Hasegawa y col., 2000; Zhu, 2002). La Figura 2 incluye un esquema de estos aspectos, donde se puede apreciar que: a) el mantenimiento del equilibrio osmótico en relación con el tonoplasto y con el medio externo, requiere la síntesis en el citoplasma de solutos orgánicos compatibles (prolina, sacarosa, azúcares, etc.), y/o en conjunción con b) el mantenimiento de la homeostasis iónica, es decir, el control de la absorción de iones y su compartimentación intracelular (vacuolas), de manera que se mantengan las concentraciones de iones en el citoplasma dentro de un rango de 100 a 200 mM de K^+ , 1 a 30 mM Na^+ y Cl^- y 100 a 200 nM Ca^{2+} , requiriéndose una alta selectividad para el K^+ sobre el Na^+ , del Mg^{2+} sobre el Ca^{2+} , y del fosfato sobre el cloro o el nitrato, y c) un apropiado y coordinado sistema de transducción de la señal de estrés, en la que una serie de moléculas (segundos mensajeros) deben regular a proteínas implicadas en el transporte iónico y el mantenimiento del turgor o la expresión de los genes que las codifican (Xiong y col., 2002; Zhu, 2002).

Teniendo en cuenta que el estudio de los mecanismos de tolerancia de las plantas al estrés salino a nivel de tejidos, no ha constituido un objetivo de este trabajo de tesis doctoral, no se ha incluido en este apartado un análisis exhaustivo de antecedentes.

1. Mantenimiento del equilibrio osmótico

El estrés hídrico causado por el componente osmótico de la salinidad, y que es común a otros estreses como la sequía, conlleva a la pérdida del turgor necesario para la expansión celular y a procesos destructivos irreparables en las proteínas y membranas celulares (Serrano y Gaxiola 1994; Hasegawa y col., 2000). Las plantas glicófitas (y halófitas) típicamente responden a la pérdida del turgor restableciendo el equilibrio osmótico mediante la síntesis en el citosol y acumulación en la vacuola de osmolitos compatibles con la actividad de los enzimas e incrementando su estabilidad, del tipo de los polioles (glicerol, sorbitol, manitol, pinitol), azúcares no reductores (fructano, trehalosa y sacarosa), ácidos orgánicos (ácido málico), algunos aminoácidos y derivados (prolina y glicina-betaína) y compuestos sulfonados (sulfato de colina) (McCue y Hanson, 1990; Pilon-Smith y col., 1995; Bohnert y col., 1995; Bohnert y Jensen, 1996; Hare y col., 1998; Nuccio y col., 1999; Hasegawa y col., 2000; Xiong y Zhu, 2002).

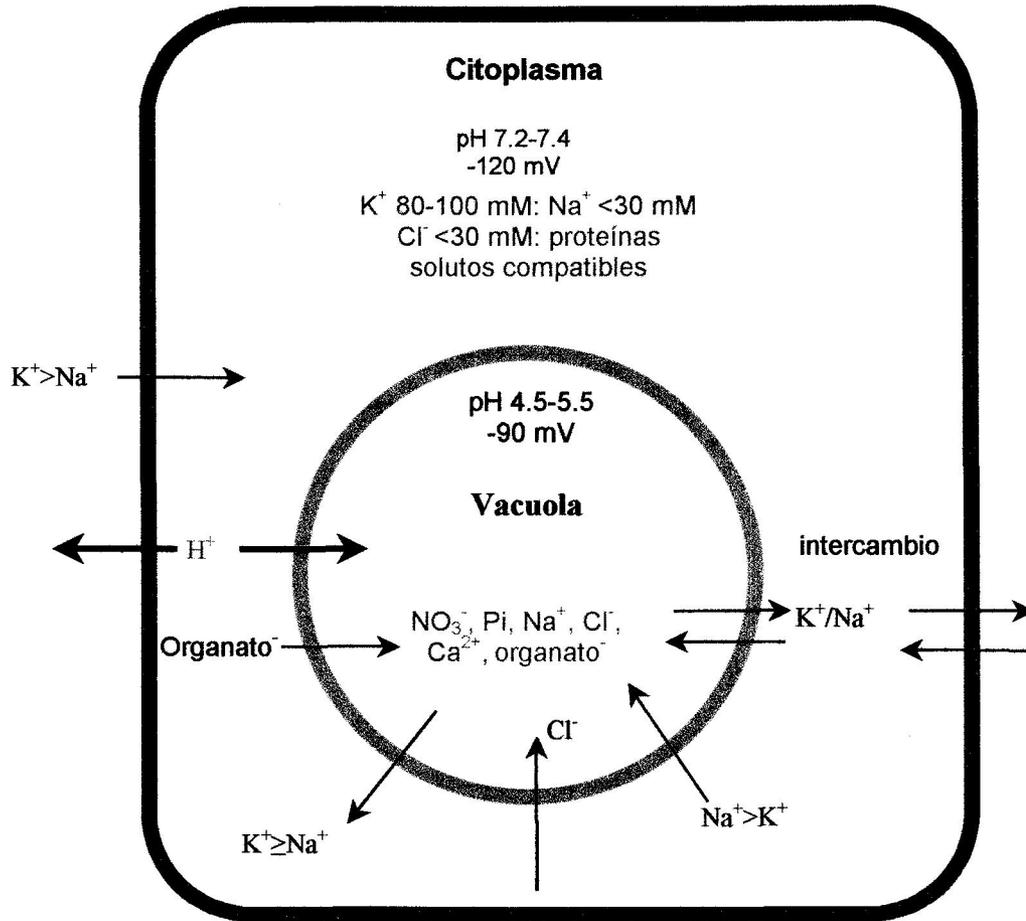


Figura 2. Esquema representativo de los mecanismos de tolerancia de las plantas a la salinidad a nivel celular, mostrando la compartimentalización intracelular de iones y solutos.

Entre los osmorreguladores la prolina es el que más frecuentemente se acumula en condiciones de estrés osmótico, principalmente sequía y salinidad. El papel de la prolina en la tolerancia al estrés osmótico se apoya en la mayor tolerancia al NaCl detectada en mutantes acumuladores de este aminoácido obtenidos por mutagénesis química, variación somaclonal o ingeniería genética (Mc Cue y Hanson, 1990; Delauney y Verma, 1993; Taylor, 1996; Petrusa y Winicov, 1997; Xin y Browse, 1998; Nanjo y col., 1999; Hong y col., 2000; Ronde, Soreeth y Cress, 2000). En algunos casos, el incremento de su acumulación o su síntesis, se inicia cuando el daño celular es evidente, o es demasiado bajo, como en plantas transgénicas, indicando que la síntesis de prolina no siempre constituye un marcador de tolerancia (Perez-Alfocea y col., 1994; Cano y col., 1996; Liu y Zhu, 1997; Zhu, 2001). Además de ser un soluto compatible, la prolina parece jugar un papel importante en la morfogénesis (Nanjo y col. 1999) y puede constituir una fuente nitrogenada o una reserva de ATP utilizable por las plantas durante la recuperación del estrés. Así, la oxidación de prolina a 1-pirrolina-5-carboxilato por el enzima prolina deshidrogenasa ubicada en la membrana inteARN de la mitocondria permite acoplar la degradación de prolina a la formación ATP (Elthon y Stewart 1981), estando el gen que la codifica reprimido por estrés hídrico e inducido tras la recuperación del estrés (Kiyosue y col. 1996).

La sacarosa y/o los azúcares reductores solubles son los principales solutos orgánicos involucrados en el ajuste osmótico en numerosas especies glicófitas sometidas a estrés osmótico o salino (Pilon-Smith y col. 1995, Ishitani y col. 1996, Gao y col. 1998; Hasegawa y col., 2000). Además de su papel como osmorregulador, los azúcares pueden jugar otras funciones en plantas estresadas. Así, la acumulación de azúcares solubles en respuesta a la sal permite paliar el estrés oxidativo causado por la salinidad, debido a la capacidad de algunos de estos solutos para neutralizar los radicales hidróxilo (Hare y col. 1998). Además, los azúcares no solamente son importantes para el crecimiento de la planta, sino que también afectan a los sistemas sensores que regulan la expresión de una variedad de genes involucrados en la fotosíntesis, respiración, síntesis y degradación de almidón y sacarosa y metabolismo nitrogenado (Koch 1996).

En respuesta a la hiperosmolaridad, en levadura se activa la vía MAPK HOG1, vía de proteínas kinasas dependiente de Ca^{2+} , lo que se traduce en el incremento de la producción de osmolitos necesarios, como se ha mencionado, para el ajuste osmótico. Es posible que en plantas exista una vía similar ya que, se han encontrado diversas proteínas kinasas en alfalfa, tabaco y Arabidopsis, activadas en respuesta al estrés osmótico (Kiegerl y col., 2000; Zhang y Klessig, 2001; Ichimura y col., 2000; Xiong y col., 2002).

2. Mantenimiento de la homeostasis iónica: sistemas de transporte a través de las membranas celulares

En condiciones de altas concentraciones salinas exteARNs, la concentración iónica citoplasmática de las células de plantas superiores se altera como resultado tanto de la absorción de Na^+ y Cl^- , como del incremento en la concentración iónica intracelular debido a la pérdida de agua. Concentraciones de NaCl superiores a 0.3-0.5 M inhiben la mayoría de los enzimas, ya que perturban el balance entre las fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas que mantienen la estructura de las proteínas solubles y de membranas (Serrano, 1996; Hasegawa y col., 2000; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Zhu, 2001). Alguno de estos enzimas pueden ser especialmente sensibles a concentraciones bajas de Na^+ y Cl^- , de forma que la regulación de su actividad en presencia de estos iones puede ser determinante de la sensibilidad al estrés salino. Por ello, los procesos de regulación de los flujos de estos iones y su concentración intracelular (homeostasis iónica) juegan un papel central en la tolerancia de las plantas a la salinidad (Zhu, 2003).

La distribución de estos iones a nivel intracelular y de tejido depende en último término de los sistemas de transporte ubicados en las membranas celulares, específicamente, la membrana plasmática y la membrana vacuolar (tonoplasto) (Figura 3). En general, las moléculas de agua, iones y solutos pasan a través de las membranas por dos tipos de mecanismos: a) difusión simple, en la que el agua, iones y solutos de pequeño tamaño atraviesan las membranas a favor de su gradiente de energía potencial, a una velocidad dependiente de su coeficiente de permeabilidad a la bicapa lipídica; b) transporte facilitado, por medio de sistemas de transporte específicos, identificados como proteínas de membranas, y a favor del gradiente de energía potencial (Bush 1993). El transporte facilitado, puede ser pasivo, cuando los solutos se mueven a través de transportadores (uniportadores) o canales a favor de su gradiente de energía potencial, o bien activo, cuando la translocación de los solutos a través de la membrana se lleva a cabo en contra de un gradiente de concentración o de potencial eléctrico, requiriendo aporte de energía exteARN suministrada por el metabolismo celular.

El transporte activo, a su vez, puede ser primario, cuando la translocación está ligada a una reacción química exergónica que suministra la energía necesaria para el proceso (hidrólisis de ATP, PPI). Dentro de esta categoría se encuentran las bombas iónicas (ATPasas de H^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , transportadores ABC). En el transporte activo secundario, la translocación de un soluto en contra de su gradiente electroquímico está acoplada al flujo de otro soluto que se mueve a favor de su gradiente de potencial electroquímico. A esta categoría pertenecen los sistemas simportes (flujo de ambos solutos en la misma dirección) y antiportes (en dirección opuesta).

Como se indica en la Figura 3, dentro de los procesos de transporte activo primario a través de las membranas celulares de plantas superiores se encuentran aquellos constituidos por transportadores electrogénicos de H^+ situados, principalmente, en el plasmalema y tonoplasto (Morsomme y Boutry, 2000; Drozdowicz y Rea, 2001; Maeshima, 2001). La actuación de estas bombas primarias de H^+ crea una diferencia de potencial eléctrico a través de estas membranas, así como una diferencia de pH, próximo a la neutralidad en el citoplasma, y ácido en la vacuola y en el exterior de la célula. El gradiente electroquímico generado por el bombeo de H^+ , constituye la energía o fuerza motriz para el transporte de diferentes solutos (cationes, aniones, azúcares y otras sustancias), mediante una batería de transportadores secundarios ubicados en estas estructuras (Sze y col. 1999; Morsomme y Boutry, 2000; Portillo, 2000; Palmgren, 2001), tal y como predice la teoría quimiosmótica de Mitchell (Mitchell 1976). Las bombas de H^+ energizan el plasmalema y el tonoplasto para transportar y compartimentalizar iones citotóxicos derivados del estrés salino, fuera del citoplasma y facilitar la función de estos iones como señales (Maeshima, 2000; Maeshima, 2001; Morsomme y Boutry, 2000; Ratajczak, 2000).

Entre las funciones atribuidas a la actuación de las bombas de H^+ , esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, destacan: el control del pH citoplasmático, la regulación de la turgencia y volumen celular, homeostasis de la composición iónica intracelular, apertura y cierre de los estomas, carga del floema y xilema, regulación de la elongación celular y de la síntesis de la pared celular, mantenimiento del potencial de membrana.

2.1. H^+ -ATPasas, H^+ -PPasa y transportadores secundarios implicados en la homeostasis de Na^+ y Cl^-

La membrana plasmática como primer punto de entrada de la célula debe ser altamente selectiva para el K^+ , bien por influjo selectivo de K^+ y/o extrusión activa de Na^+ , lo que otorga una relevancia especial a las bombas de H^+ en la tolerancia a la salinidad, como determinantes del control del transporte iónico. Este hecho surge del conocimiento del papel fisiológico que juegan estas proteínas en la célula vegetal, algunas de cuyas características bioquímicas y moleculares del mecanismo de acción se describen a continuación.

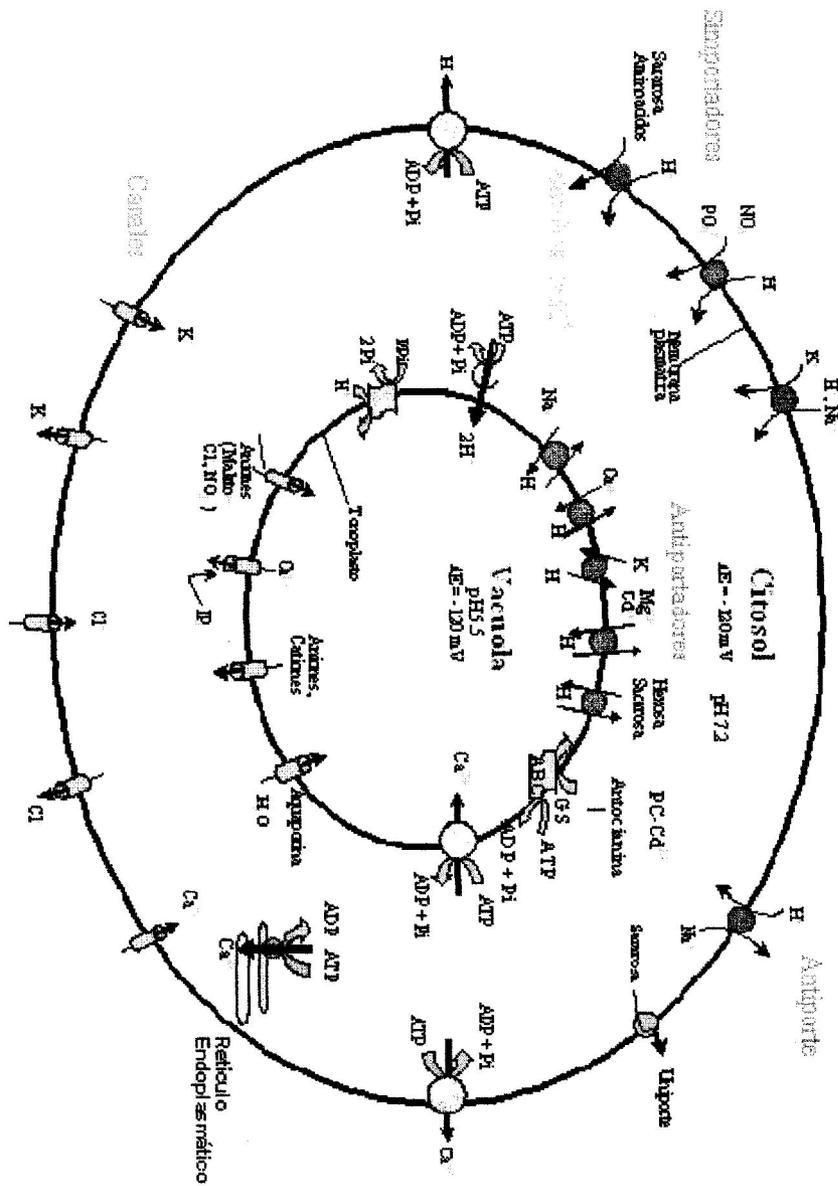


Figura 3. Esquema general de los distintos sistemas de transporte primario y secundario localizados en la membrana plasmática y tonoplasto de una célula vegetal simplificada. Tomado de Poole (1998).

2.1.1. Características bioquímicas, mecanismo de acción y papel fisiológico de la H⁺-ATPasa de plasmalema: efecto del estrés salino

El enzima H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de plantas (EC. 3.6.1.35) es un miembro de la familia de las P-ATPasas que presenta una única subunidad catalítica de aproximadamente 100 KD, activa tanto en forma monomérica como homodimérica, y que forma un intermediario fosforilado, mediante enlace aspartil-fosfato, durante su ciclo de reacción, inhibible por vanadato (Axelsen y Palmgren 1998, Sze y col. 1999; Palmgren, 2001). Tiene un pH óptimo de 6.5, una estequiometría variable de 0 a 1 H⁺ transportados por ATP hidrolizado y una cinética de saturación michaeliana frente al Mg-ATP, con valores de Km entre 0.3 y 1.4 mM. El enzima se estimula por cationes monovalentes sobre todo a pH ácido (K⁺ > Rb⁺ > NH₄⁺ > Cs⁺ > Na⁺, Li⁺) y por algunos aniones permeantes como Cl⁻, Br⁻ y NO₃⁻ que estimulan la formación del gradiente de pH, al disipar el gradiente eléctrico intravesicular. El Ca²⁺ no sustituye al Mg²⁺, e inhibe la actividad ATPásica a muy bajas concentraciones. Este tipo de ATPasa se caracteriza por ser altamente sensible a ortovanadato, si bien al ser éste un inhibidor general de enzimas que forman intermediario fosforilado, inhibe también a fosfatasas ácidas y otras ATPasas como las localizadas en el RE (Kawata y Yoshida 1988). De forma menos específica, el enzima se inhibe por eritrosina B, DCCD, DES y DIDS, siendo insensible a oligomicina, azida, NO₃⁻ y bafilomicina, los dos primeros compuestos, inhibidores específicos de F-ATPasas, y los últimos de las V-ATPasas.

El gen que codifica la H⁺-ATPasa de plasmalema fue inicialmente clonado y secuenciado en levadura (Serrano y col. 1986), y en *Arabidopsis thaliana* (Pardo y Serrano 1989, Harper y col. 1989), habiéndose obtenido posteriormente más de 20 secuencias completas de genes de H⁺-ATPasas de diferentes especies vegetales (Axelsen y Palmgren 1998; Palmgren, 2001). Asimismo, se ha comprobado que el enzima de plantas superiores puede estar codificado por varias isoformas génicas. Se han identificado hasta 12 genes en *Arabidopsis thaliana* (Vitart y col., 2001), 7 en tomate (Ewing y Bennett 1994), 4 en *Nicotiana plumbaginifolia* (Boutry y col. 1989), 2 en *Oryza sativa* (Ookura y col. 1994), y 2 en *Solanum tuberosum* (Harms y col. 1994).

La comparación de las secuencias de la proteína, compuesta por 920-950 aminoácidos (100 kD), en diversos orígenes vegetales, pone de manifiesto la existencia de 10 regiones hidrofóbicas compuestas por 17-24 residuos en configuración alfa-hélice, capaces de atravesar la bicapa lipídica, en la que el extremo amino y carboxilo terminal estarían orientados hacia el citoplasma. Asimismo, existen 8 regiones o motivos altamente conservados que se sitúan en las regiones hidrofílicas de la proteína, orientados hacia la cara citoplasmática de la membrana formando parte, probablemente, del centro activo. Esta región

contiene la mayoría de los determinantes antigénicos que, aunque no se conoce exactamente su función, parecen ser imprescindibles para su correcta ubicación en la membrana plasmática. Existen dos dominios o bucles citoplasmáticos que parecen contener los centros activos (Figura 4) (Serrano, 1989; Briskin, 1990; Serrano y Villalba, 1993; Axelsen y Palmgren, 1998; Palmgren y Harper, 1999; Scarborough, 2000; Palmgren, 2001). El mayor de ellos, con actividad kinasa y sitio de unión del ATP, cataliza la formación del intermediario fosforilado en el residuo aspartato de una secuencia altamente conservada, DKTGT, conteniendo probablemente cuatro de los motivos altamente conservados. El dominio de menor tamaño, con actividad fosfatasa, cataliza la hidrólisis del intermediario fosforilado y contiene los tres primeros lugares conservados del enzima. El extremo C-terminal, parece constituir un dominio autoinhibitorio del enzima que bloquea de forma regulable el centro activo (Palmgren, 2001). El canal de H^+ estaría formado por el grupo de 4 a 6 alfa-hélices transmembranario (Axelsen y Palmgren 1998; Palmgren, 2001).

En cuanto al mecanismo de acción del enzima, se ha propuesto un modelo de acoplamiento energético entre la hidrólisis de ATP y el transporte de H^+ para las P-ATPasas, basado en la existencia de dos conformaciones, E1 y E2 (Palmgren y Harper, 1999; Palmgren, 2001) (Figura 5). El ciclo catalítico comienza por la captación, desde el lado citoplasmático de la membrana, de un protón y ATP por la forma E1, por los que tiene una alta afinidad, dando lugar a la forma E2. Tras la hidrólisis del ATP, el enzima fosforilado E2 muestra una baja afinidad por ATP y por el H^+ . Teniendo en cuenta que los sitios de hidrólisis de ATP y de transporte de H^+ están separados en el espacio, la comunicación entre estos dos sitios debe implicar un importante cambio conformacional que lleva aparejado, primeramente, la oclusión del H^+ dentro de la bomba y, posteriormente, la liberación del mismo en la cara externa de la membrana plasmática. Una vez desfosforilado, el enzima recupera la conformación E1 de alta afinidad por el H^+ y ATP, desde el lado citoplasmático de la membrana, concluyendo el ciclo de reacción.

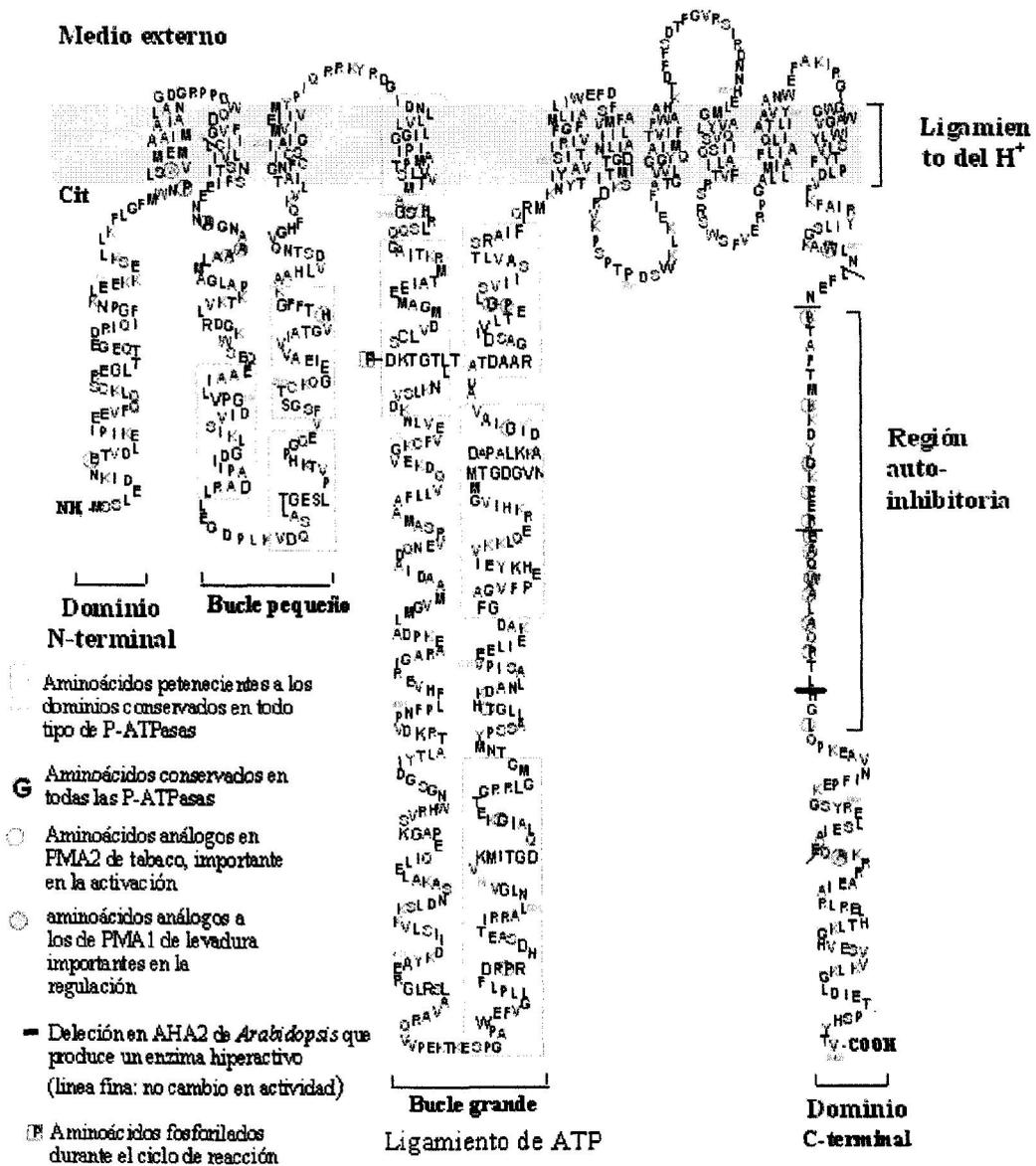


Figura 4. Representación de la estructura primaria y 3D de la H⁺-ATPasa de plasmalema (AHA2) de *Arabidopsis*. La cadena lineal, compuesta de 920-950 aminoácidos, se pliega en las membranas celulares y configura una estructura muy compleja. El modelo esbozado destaca los dominios funcionales (fosfatasa, quinasa e inhibidor). Tomado de Palmgren (1998).

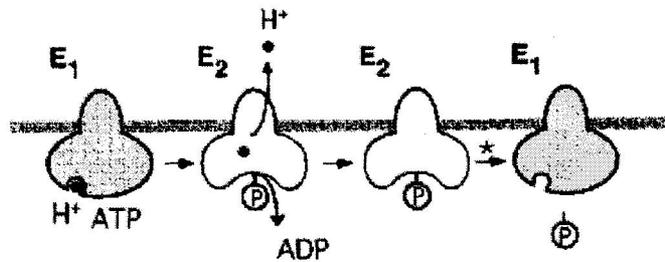


Figura 5. Modelo hipotético para el ciclo catalítico de las P-ATPasas. Tomado de Palmgren y Harper (1999).

La H⁺-ATPasa de plasmalema juega un papel central en la nutrición y crecimiento de las plantas (revisado por Serrano, 1985, 1988a, 1989, 1990, Serrano y Villalba, 1993; Palmgren 2001). La evidencia experimental de la participación del enzima en estos procesos, está basada en la extrapolación de los estudios bioquímicos llevados a cabo *in vitro*. Estudios con mutantes de levadura (Serrano, 1988a; Gaber, 1992) han demostrado que este enzima es esencial para el crecimiento celular (Serrano, 1989; Serrano y Villalba, 1993; Palmgren 1998) al servir como primera fuente de energía para el transporte secundario de nutrientes por medio de una batería de transportadores y canales específicos. (Sze y col., 1999; Palmgren y Harper 1999; Palmgren 2001). Así, la absorción de K⁺ depende directamente del gradiente electroquímico de protones generado por la H⁺-ATPasa (Serrano, 1989; Palmgren, 2001). Se ha implicado también a la H⁺-ATPasa de plasmalema en la elongación celular inducida por auxinas, de acuerdo con la teoría del crecimiento ácido (Rayle y Cleland 1992). Según esta teoría, la acidificación de la pared celular, causada por la acción de la H⁺-ATPasa, sería la responsable de la relajación de la misma, permitiendo así la elongación celular forzada por la presión de turgor.

Según Palmgren (1991) y Michelet y Boutry (1995) la regulación de la H⁺-ATPasa de plasmalema puede implicar al menos dos mecanismos distintos: a) regulación pretraduccional, como la inducción de la expresión génica del enzima; b) modificación postraduccional, sugerido como el mecanismo de acción más probable (Serrano 1989). En este sentido, existen evidencias de que diferentes isoformas de tomate (Ewing y col., 1990; Ewing y Bennett, 1994), *Arabidopsis thaliana* (Harper y col., 1990, 1994) y *Nicotiana plumbaginifolia* (Perez y col., 1992), se expresan diferencial y específicamente en función del tipo de tejido, células, estado de desarrollo y condiciones ambientales (DeWitt y col., 1991;

Uno de los mecanismos funcionales de regulación postraduccional de la H⁺-ATPasa es la modificación que afecta directamente a las moléculas del enzima preexistentes a través del dominio autoinhibitorio localizado en la región C-terminal del enzima. (Palmgren, 2001). Estudios en profundidad para clarificar esta regulación han demostrado que la interacción inhibidora entre el dominio inhibitorio y el sitio catalítico y/o el sitio de ligamiento a los protones puede controlarse por mecanismos tales como:

a) Desplazamiento del dominio inhibitorio por ligamiento de moléculas efectoras como lisofosfolípidos y fusicocina. La fusicocina, mediante unión a un complejo receptor de la membrana plasmática que incluye tanto el dominio autoinhibitorio C-terminal de la H⁺-ATPasa como la proteína 14-3-3 (Johansson y col., 1993; Jahn y col., 1997; De Boer, 1997; Baunsgaard y col., 1998; Sze y col., 1999; Oecking y Hagemann, 1999; Chung y col., 1999; Palmgren 2001) y los lisofosfolípidos activan la H⁺-ATPasa al provocar el desplazamiento del dominio autoinhibitorio o estimulando una proteína quinasa (Martiny-Baron y Scherer, 1989; Scherer y col., 1993).

b) Desplazamiento del dominio carboxilo terminal, reversiblemente, por mecanismos de fosforilación, mediante una proteína quinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina, o por desfosforilación, mediante una proteína fosfatasa. (Sussman, 1994; Xing y col., 1996; De Nisi y col., 1999; Olsson y col., 1999; Fuglsang y col., 1999; Svannelid y col., 1999; Palmgren, 2001). Según estos mecanismos, se ha propuesto un modelo de regulación postraduccional de la H⁺-ATPasa de plasmalema, a través del dominio C-terminal autoinhibitorio (Figura 6) (Sze y col., 1999; Palmgren, 2001). En dicho modelo, la fosforilación de residuos serina y treonina en la H⁺-ATPasa podría facilitar o inhibir el ligamento de la proteína 14-3-3 al dominio C-terminal de la H⁺-ATPasa, así como, la fusicocina induciría una fuerte interacción entre la proteína 14-3-3 y la enzima, modificación que, de alguna manera, estabilizaría el estado de alta actividad del enzima.

Teniendo en cuenta, los papeles fisiológicos claves atribuidos a la H⁺-ATPasa de plasmalema, no resulta extraño que la actividad de este enzima esté regulado por factores ambientales que controlan o alteran la fisiología de las plantas tales como la luz, turgor celular, todas las fitohormonas, fitotoxinas producidas por patógenos y diferentes estreses como daños mecánicos, déficit hídrico, temperatura y metales pesados (Serrano 1989 y 1990; Palta 1990; Meharg 1993; Michelet y Boutry 1995; Morsomme y Boutry, 2000; Palmgren 2001). En este sentido, mención especial merece el efecto de la salinidad sobre esta ATPasa.

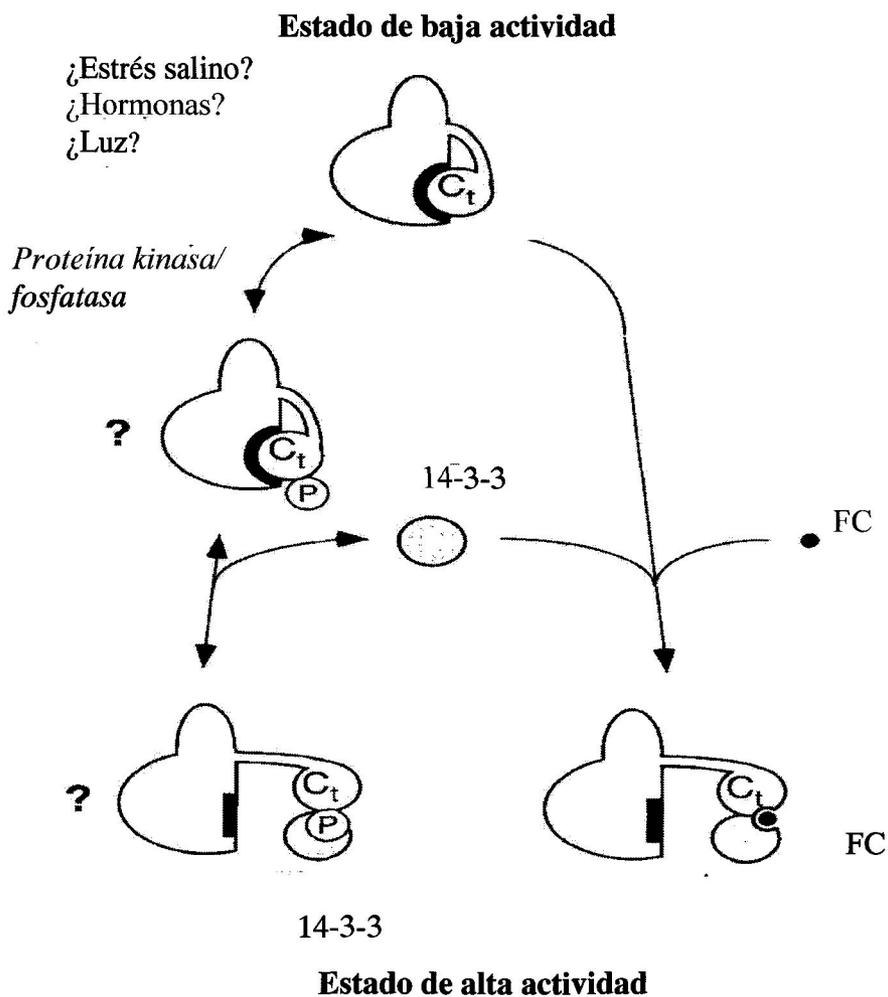


Figura 6. Modelo de regulación de la H⁺-ATPasa de plasmalema implicando al dominio C-terminal y su interacción con la proteína 14-3-3, y explicando la acción de la fusicocina y la regulación por fosforilación/desfosforilación. FC, fusicocina; Ct, dominio C-terminal; P, fosforilación. Tomado de Sze y col., (1999).

A pesar de los progresos en el análisis de una relación estructura-función del enzima, no se ha establecido aún una relación clara entre el estrés por NaCl y la expresión y/o regulación de esta bomba de H⁺ (Mansour y col., 2003). Así, se han obtenido resultados dispares dependientes del tejido, estadio vegetativo, intensidad y duración del tratamiento, métodos de obtención y determinación enzimática (Rausch y col. 1996). En glicófitas como el tomate, la actividad ATPasa de plasmalema, en respuesta al estrés salino, de raíces se inhibió parcialmente (Gronwald y col., 1990; Sanchez-Aguayo y col., 1991; Suhayda y col., 1990) y en hojas maduras pero no jóvenes de tomate y en raíces de girasol (Wilson y col., 1994; Ballesteros y col., 1998), o incluso se estimuló junto a la actividad transportadora de H⁺ (Wilson y Shannon 1995), mientras que en vesículas aisladas de raíces de girasol no se afectó (Roldan y col., 1991). En células de tabaco y en raíces de *Atriplex nummularia*, la actividad extractora de H⁺ *in vivo* asociada al enzima se vio incrementada tras el tratamiento con NaCl (Braun y col. 1986, Watad y col. 1991), respuesta que pudo ser mediada, al menos en parte, por una mayor expresión del gen que la codifica, de manera que el incremento del ARNm de H⁺-ATPasa sólo fue detectable durante el periodo de adaptación a sal (Niu y col., 1993b; Perez-Prat y col., 1994). Estos estudios previos eran inconsistentes con los resultados de Srivastava (1998), Yu y col., (1999) y García-Sánchez y col., (2000); que relacionaron una inhibición del crecimiento del cacahuete con un decrecimiento de la actividad ATPasa de plasmalema y un incremento de la concentración de Na⁺ y Cl⁻, y el incremento en la actividad ATPasa con un menor acumulo de Na⁺ en las hojas de cebada tolerante a sal, mientras que en cítricos incrementaban tanto la actividad ATPasa como la concentración de Na⁺.

Por otro lado, la tolerancia de callos de tomate al NaCl fue asociada con una mayor afinidad de la ATPasa por ATP y con un aumento de la actividad bombeada de H⁺, mientras que la actividad hidrolítica de ATP no se afectó (Rodríguez-Rosales y col., 1999; Kerkeb y col., 2001a; Kerkeb y col., 2001b). En general, el efecto de NaCl sobre la expresión del gen y la actividad H⁺-ATPasa se ha correlacionado positivamente con la tolerancia a este factor. Las plantas halófitas exhiben mayores niveles de transcripción y /o actividad H⁺-ATPasa que las glicófitas (Niu y col., 1995; Rausch y col., 1996), aunque también en tomate (*Lycopersicon esculentum*. Mill. cv. Large Cherry red) se ha descrito un aumento de ARNm de H⁺-ATPasa en raíces y hojas tras ser expuestas al NaCl (Binzel, 1995). En este sentido, un espaldarazo al importante papel que puede jugar la H⁺-ATPasa de plantas en la tolerancia a la sal ha venido de la producción de un mutante *knock-out* para la isoforma AHA4 de *Arabidopsis thaliana*, obtenido por inserción de ADN-T (Vitart y col., 2001). Dicho mutante, homocigótico para *aha4-1*, mostró un fenotipo altamente sensible al NaCl, acumulando sus hojas más cantidad de Na⁺ que de K⁺, lo que sugiere que AHA4 se requiere para la respuesta de las plantas al estrés salino, mediante del control del eflujo de Na⁺ a través de la endodermis (Palmgren y Harper 1999; Vitart y col., 2001).

Aunque no está del todo dilucidado, y menos aún en el caso de la salinidad, la modulación de la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema por toda esta gama de señales ambientales parece ser indirecta, implicando mecanismos de transducción de señales (Serrano 1989). En la célula vegetal, la hidrólisis mediada por receptores específicos de inositol-fosfatos y los cambios en la concentración del Ca^{2+} citosólico constituyen rutas de transducción de señales extracelulares a través de membrana plasmática (Poovaiah y Reddy, 1993; Drøbak, 1993; Axelsen y Palmgren, 1998). Así, el estrés salino parece ejercer cambios rápidos en el metabolismo de los fosfoinosítidos en *Dunaliella* (Einspahr y col., 1988) y en células de zanahoria (Cho y col., 1993), e incrementa el contenido del Ca^{2+} citosólico en protoplastos de raíz de maíz y en plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Lynch y col., 1989, Knight y col., 1997). Estos resultados han llevado a proponer que la respuesta primaria al estrés salino es la perturbación de la homeostasis del Ca^{2+} citosólico, el cual originaría todas las respuestas encontradas en las plantas bajo condiciones salinas y que afectaría la actividad de kinasas y fosfatasa dependiente de Ca^{2+} y Ca^{2+} -Calmodulina, implicadas en la activación-inactivación de numerosos sistemas enzimáticos, incluyendo la H^+ -ATPasa de plasmalema (Rengel, 1992; Shimazaki y col., 1992; Sussman, 1994; Lino y col., 1998; Palmgren, 1998; De Nisi y col., 1999). Teniendo en cuenta que diferentes mensajeros derivados del metabolismo de los fosfoinosítidos estimulan la actividad ATPasa de plasmalema de hipocotilos de girasol (Memon y col., 1989; Memon y Boss, 1990), podría pensarse en la eventualidad de una regulación de la ATPasa por estrés salino, a través de los mecanismos indicados.

Por otra parte, la hipótesis de un cambio conformacional del dominio C-terminal, podría explicar el incremento de la razón de acoplamiento de H^+ /ATP (forma activada) en plasmalema de raíz de girasol (Ballesteros y col., 1998) y la activación de la H^+ -ATPasa de plasmalema de *Spartina patens* (Wu y Seliskar, 1998), bajo condiciones salinas, hecho propiamente observado en levadura por efecto de la glucosa (Venema y Palmgren, 1995). En este sentido, callos de tomate estresados con 100 mM de NaCl, incrementó la extrusión y transporte in vitro de H^+ , pero no la hidrólisis de ATP, al tiempo que el Western-blot mostró mayor cantidad de proteína 14-3-3 pero no de H^+ -ATPasa, indicando todo esto que el estrés salino pudo activar el acoplamiento entre la hidrólisis de ATP y el transporte de H^+ in vitro a través de la formación de complejos 14-3-3/ H^+ -ATPasa en la membrana plasmática (Kerkeb y col., 2002).

2.1.2. Características bioquímicas, mecanismo de acción y papel fisiológico de la H⁺-ATPasa y H⁺-PPasa de tonoplasto: efecto del estrés salino

La H⁺-ATPasa de tonoplasto pertenece a la familia de las V-ATPasas, en la que se integran todas las bombas de protones de características bioquímicas y moleculares comunes, independientemente de la localización, y que se distribuyen ampliamente en orgánulos y sistemas endomembranarios de eucariotas, incluyendo vacuolas, lisosomas, endosomas, gránulos de cromafina, aparato de Golgi y vesículas revestidas de clatrina (Barkla y Pantoja, 1996; Sze y col., 1999). En plantas superiores, además de en vacuolas, el enzima está presente en Golgi, RE y vesículas revestidas de clatrina (Nelson, 1992).

A diferencia de las P-ATPasas, las V-ATPasas de tonoplasto son insensibles al vanadato y no forman intermediario fosforilado. El enzima se inhibe por nitrato y bafilomicina A₁ y es insensible a azida y oligomicina, estos últimos, inhibidores específicos de las F-ATPasas (Sze, 1985; Blumwald, 1987; Ward y Sze, 1992; White, 1994). Asimismo, este tipo de ATPasas es insensible a los cationes, y se estimulan por aniones en la secuencia Cl⁻, Br⁻ > I⁻ > HCO₃⁻ > SO₄²⁻, en base a su capacidad de disipar el potencial de membrana, vía canales de aniones (Sze, 1985). En el caso del Cl⁻, su estimulación como anión permeante se superpone a su acción directa sobre el enzima, la cual parece estar acoplado a una activación del bombeo de H⁺ (Ward y Sze, 1992). Puesto que la concentración de Cl⁻ citoplasmático en células vegetales es de 30-90 mM, la estimulación directa del Cl⁻ sobre la V-ATPasa puede ser importante en la regulación del gradiente de pH y potencial de membrana a través de la vacuola (Sze y col., 1992).

El enzima es también sensible a agentes bloqueantes de fosfohidrolasas que transportan H⁺ como DCCD, DIDS, eritrosina B y DES (Blumwald, 1987; Sze y col., 1992). El ATP es el sustrato preferido para las reacciones de hidrólisis y, en menor proporción, el GTP, CTP, UTP, ADP, GDP, AMP, GMP, CMP y p-NPP, en orden decreciente. El enzima requiere Mg²⁺ para su actividad, aunque puede ser reemplazado por el Mn²⁺, muestra un pH óptimo entre 7,0 y 8,5 y la afinidad (K_m) para el sustrato es menor que la de la ATPasa de plasmalema, teniendo un valor aproximado de 0.1-0.2 mM, con una estequiometría variable de 2 a 3 H⁺ transportados por cada ATP hidrolizado (Sze, 1985; Davies y col., 1994).

La V-ATPasa posee una típica estructura de cabeza y pedúnculo (Figura 7), (Getz y Klein, 1995), muy conservada en la mayoría de eucariotas conformando un complejo multimérico de proteínas compuesto de un sector integral (V_o), embebido en la membrana, de 250 a 300 kD, responsable de la translocación de H⁺, y un sector periférico (V₁), expuesto hacia la cara

citoplasmática, de 500-600 kD, responsable de la hidrólisis de ATP (Sze y col., 1992; Sze y col., 1999). La subunidad A es la subunidad catalítica, deducida por su sitio de unión a nucleótidos y por su secuencia de aminoácidos, y está estrechamente relacionada a otras proteínas que unen nucleótidos (Stevens y Forgac, 1997). La subunidad B tiene también un sitio de unión a nucleótidos, aunque no es catalítico y parece tener una función de regulación. Otras subunidades del complejo V_1 , que a menudo se describen como accesorias, son esenciales, y parecen jugar diferentes papeles, desde servir de puente entre los complejos V_1 - V_0 , la estabilización del subcomplejo V_1 , y probablemente, promover el acoplamiento de la hidrólisis de ATP al transporte de H^+ .

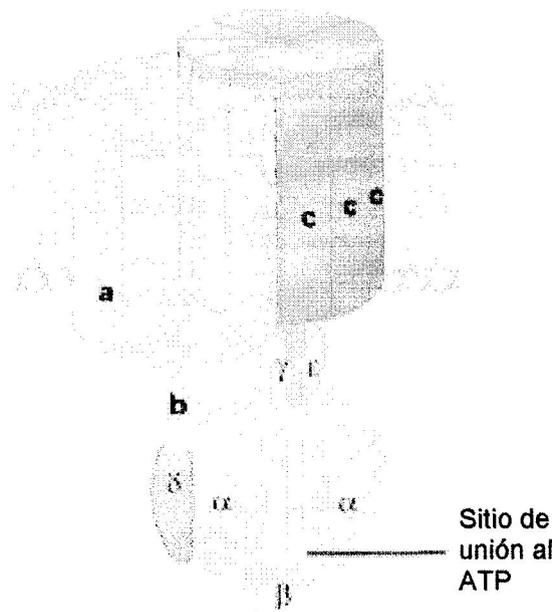


Figura 7. Estructura típica de una V-ATPasa (multímero de 650 kD) del sistema endomembrana de plantas. El complejo periférico, V_1 , incluye las subunidades catalíticas (70 kD) y reguladora (60 kD), y varias subunidades accesorias de funciones poco conocidas. El complejo integral embebido en la membrana, V_0 , lo forman 6 copias del proteolípido de 16 kD, capaces de unirse al DCCD, junto con otras subunidades integrales formando el canal para el transporte de H^+ .

El papel fisiológico de la H⁺-ATPasa de tonoplasto es conducir los iones y metabolitos al compartimento vacuolar, en virtud del gradiente electroquímico de H⁺ creado por el enzima (Binzel y Ratajczak, 2002). De hecho, los iones y metabolitos no son simplemente depositados en la vacuola, sino que están sometidos a un intercambio continuo con los componentes citoplasmáticos, lo que contribuye al mantenimiento del equilibrio citosólico. Esta función homeostática se pone de manifiesto en la regulación del pH citoplásmico, ajuste osmótico, acumulación y movilización de ácidos orgánicos y control de las concentraciones de iones inorgánicos, como el calcio y fosfato, en el citoplasma (Boller y Wiemken, 1986; Blumwald, 1987; Taiz, 1992; Barkla y Pantoja, 1996; Sze y col., 1999).

La idea de que el control de las concentraciones intracelulares de iones y su acumulación en vacuola es clave en la tolerancia a la salinidad, ha relacionado la actuación de este enzima con la tolerancia a este factor ambiental (Niu y col., 1995; Serrano, 1996; Mansour y col., 2003). Esta hipótesis fue contrastada en plantas de comportamiento halófito, que acumulan grandes cantidades de NaCl en las vacuolas, mediada por la actividad antiporte Na⁺/H⁺ y energizada por el funcionamiento de las dos bombas primarias de H⁺ del tonoplasto: la V-ATPasa y la V-PPasa (Rausch y col., 1996; Barkla y Pantoja, 1996; Binzel y Ratajczak, 2002). Debido a ello, se han llevado a cabo estudios detallados sobre la regulación de la expresión génica y de la actividad de la V-ATPasa, como un posible factor determinante de tolerancia. En *Messembryanthemum crystallinum*, *Beta vulgaris* y *Daucus carota*, los tratamientos salinos incrementaron los niveles de ARNm que codifican a las subunidades A y C (Rausch y col., 1996) y en algunos tejidos la subunidad E (Gollmack y Dietz, 2001).

En suspensiones celulares de mangrove se observó un rápido incremento en el volumen vacuolar bajo estrés salino, sin haber cambios en el volumen celular, acompañado de una activación de la V-ATPasa y fosfatasa ácida. Esto podría proteger al citoplasma, al inducirse una disminución del volumen citoplasmático en la fase inicial del estrés salino (Mimura y col., 2003).

Del mismo modo, parece ser un fenómeno general el incremento de la actividad y síntesis del enzima por los tratamientos salinos, habiéndose observado en células de tabaco adaptadas al NaCl, que la actividad transportadora de H⁺ y fosfohidrolítica incrementaba 3 y 4 veces, respectivamente, cuando dichas actividades se expresaban por unidad antigénica de subunidad A (Reuveni y col., 1990), y 2 veces en raíces de cebada (Matsumoto y Cheng, 1988). Así mismo, en la variedad sensible de trigo, el NaCl redujo la actividad V-ATPasa y cantidad de proteína (Wang y col., 2000), mientras que, la actividad transportadora de H⁺ se incrementó de 1 a 3 veces, sin cambio en la actividad ATPasa, en raíces de cebada (DuPont, 1992) y

suspensiones celulares de zanahoria (L6w y col., 1996), tratadas con 100 mM NaCl, así como en raíces de girasol tratadas con 75 y 150 mM NaCl. En este ultimo caso, también se produjo un incremento de la actividad antiportadora Na^+/H^+ de vacuola (Ballesteros y col., 1996, 1997) y no en la cantidad de enzima (Ballesteros y col., 1998). Para explicar estos hechos, DuPont (1992) y Ballesteros (1998) postularon que el estrés salino podía incrementar la razón de acoplamiento entre el transporte de H^+ y la hidrólisis de ATP, lo que implicaría la síntesis de isoformas de ATPasa específicas frente al estrés. Por otra parte, aunque el estrés salino no produjo cambios en la expresión de la V-ATPasa en plantas de hielo jóvenes, que son sensibles a la sal, si incrementó los niveles de transcrito en hojas de la planta madura (Golldack y Dietz, 2001). A este respecto, para Rausch y col., (1996) una regulación postranscripcional de la V-ATPasa por estrés salino sería de mayor relevancia que una regulación transcripcional, sobre todo, a la luz de los datos sobre la inactivación reversible por oxidación de la V-ATPasa (Stevens y Forgac, 1997; Müller y col. 1999) o la regulación vía fosforilación y/o lípidos específicos de membrana (Martiny-Baron y col., 1992; Yamanishi y Kasamo, 1994; Burgos y Donaire 1996).

Otra enzima íntimamente implicada en la regulación de la homeostasis iónica del citoplasma es la V- H^+ -PPasa, (E.C.3.6.1.1), de tonoplasto. Se trata de una segunda bomba de H^+ en el tonoplasto de células vegetales que utilizaba PPI como sustrato (Chanson y col., 1985; Rea y Poole, 1985), y que está también presente en algas, musgos y bacterias fotosintéticas (Maeshima y col., 1994).

Este enzima se halla abundantemente localizado en las membranas vacuolares de plantas (Vicente y Vale, 1991; Oberbeck y col., 1994), tiene un pH óptimo entre 7.0 y 8.5, insensible a vanadato, nitrato, y azida u oligomicina, e inhibible por fluoruro, así como por 1.1 difosfonato y sus análogos, como imidodifosfato, metilnodifosfonato y aminomelinodifosfonato (Wang y col., 1986; Chanson y Pilet, 1988; Pugliarello y col., 1991; Hoffma-Thoma y Willenbrick, 1993; Zhen y col., 1994; Zhen y col., 1997; Gordon-Weeks y col., 1999). La actividad enzimática depende estrictamente de cationes, principalmente K^+ , y en menor medida NH_4^+ , se inhibe por Na^+ y Li^+ , que probablemente compiten con el K^+ por el lugar de unión, no siendo afectada por los aniones (Pugliarello y col., 1991; Gordon-Weeks y col., 1997; Terrier y col., 1998). Presenta un requerimiento estricto de Mg^{2+} para su actividad mientras que concentraciones micromolares de Ca^{2+} inhiben al enzima (Maeshima, 1991; Suzuki y col., 1999). Tiene una estequiometría de un H^+ por PPI hidrolizado (Rea y Poole, 1993; Zhen y col., 1997).

La subunidad de unión al sustrato es un polipéptido de entre 64-81 kD, dependiente del origen vegetal (Rea y col., 1992a), no estando claro el tamaño de la unidad funcional (monómero, dímero o tetrámero). Tiene el centro catalítico orientado hacia el citosol, capaz de llevar a cabo ambas funciones catalíticas de hidrólisis de PPI y transporte de H^+ (Kim y col., 1994b; Perotti y col., 1994). En este sentido, es un hecho bien establecido que la H^+ -PPasa de tonoplasto funciona como una bomba electrogénica de H^+ , que transporta H^+ del citosol al lumen vacuolar, generando el gradiente electroquímico de H^+ necesario para el transporte acoplado de iones y solutos a través del tonoplasto, contribuyendo así al desarrollo y mantenimiento de la presión osmótica y presión de turgor, esenciales para la absorción de agua por las células y para el crecimiento celular, respectivamente (Rea y Sanders, 1987; Rea y Poole, 1993; Chanson, 1993; Barkla y Pantoja, 1996; Binzel y Ratajczak, 2002).

En cuanto a la relación de esta enzima con la respuesta al estrés salino, el mantenimiento del gradiente electroquímico de H^+ por la PPasa, podría ser clave para el transporte activo de Na^+ hacia el interior de la vacuola mediante el antiporte Na^+/H^+ , reduciendo así los niveles de Na^+ en el citoplasma celular (Blumwald y Poole, 1985; Binzel y Ratajczak, 2002; Manssur y col., 2003). En relación al efecto de la salinidad sobre el enzima se ha detectado una inhibición *in vivo* e *in vitro* de la actividad en raíces de *Vigna radiata* (Nakamura y col., 1992), *Mesembryanthemum crystallinum* (Bremberger y Lüttge, 1992), raíces de cebada (Matsumoto y Cheng, 1988) y en la variedad sensible de trigo (Wang y col., 2000), mientras que dicha actividad se incrementó en células de zanahoria (Colombo y Cerana, 1993) y raíces de girasol sin cambios en la cantidad de la V-PPasa (Ballesteros y col., 1996, 1997 y 1998), así como en células adaptadas al NaCl de *Acer pseudoplatanus* (Zingarelli y col., 1994). A nivel génico, el estrés salino parece incrementar la transcripción de la PPasa en protoplastos de tabaco, aunque este efecto se atribuyó a un mayor contenido vacuolar, más que a un efecto específico del NaCl (Hörtensteiner y col., 1994). No obstante, el hecho que la sobreexpresión de la H^+ -PPasa vacuolar (AVP1) de *Arabidopsis thaliana* confiera tolerancia a la salinidad a mutantes de levadura *ena1* (defectivos en el sistema de extrusión de Na^+) sensibles a la sal, siempre que expresen un canal funcional de Cl^- y antiporte Na^+/H^+ , parece indicar que esta bomba primaria (y la V-ATPasa) vacuolar actúa en concierto con dichos transportadores secundarios para secuestrar iones en este compartimento (Gaxiola y col., 1999).

2.1.3. Transportadores secundarios implicados en el flujo de Na⁺ y Cl⁻

La existencia de altas concentraciones de NaCl en el medio extracelular determina el establecimiento de un gradiente electroquímico de Na⁺ entre el interior y el exterior celular que conlleva la entrada de este catión en la célula vegetal y altera los procesos de absorción de otros iones como el K⁺ (Hasegawa y col., 2000; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Zhu, 2001; Ward, 2003), ion monovalente esencial en el crecimiento de las plantas (Maathuis y col., 1997). En la célula vegetal, las concentraciones citoplásmicas de K⁺ son relativamente altas mientras que las concentraciones de Na⁺ son relativamente bajas, lo que indica que existen mecanismos selectivos de absorción de K⁺ y de exclusión de Na⁺ del citoplasma. El hecho de encontrar diferencias en las concentraciones intracelulares de Na⁺ y K⁺ en variedades tolerantes y sensibles a la salinidad de una misma especie (Carden y col., 2003), no encontrarse canales selectivos de Na⁺ y la normal interacción entre el K⁺ y Na⁺, han llevado a la idea que el Na⁺ entra normalmente a través de los sistemas de transporte de K⁺. Básicamente, las plantas utilizan para la absorción de K⁺ sistemas de baja afinidad que funcionan como canales y sistemas de alta afinidad (Km de 10-30 μ M) que parecen funcionar como simportes K⁺-H⁺ (Schachtman y Schroeder, 1994; Chrispeels y col., 1999; Hasegawa y col., 2000). Se han identificado un gran número de canales de K⁺ en varios tipos de células vegetales (Schachtman y Liu, 1999; Amtmann y Sanders, 1999; Blumwald y col., 2000; Hasegawa y col., 2000b). Los canales iónicos se distinguen de los transportadores secundarios en que presentan cambios conformacionales entre estados abiertos o cerrados de las compuertas controladas por voltaje, unión a ligandos o modificación covalente (fosforilación).

Existen canales de K⁺ dependientes de voltaje, que transportan K⁺ hacia el interior (IRF, Inward Rectifying Channels) o hacia el exterior (ORC, Outward Rectifying Channels), o independientes de voltaje (VIC, Voltaje Independent Channels). Los canales de K⁺ en dirección hacia el interior (IRF: KAT1, AKT1, KST1) (Schachtman, 2000), identificados en *Arabidopsis* y *Solanum*, son responsables de la absorción de K⁺ a concentraciones extracelulares de K⁺ relativamente altas (baja afinidad), participando también en la absorción de K⁺ cuando la concentración extracelular es baja o cuando los transportadores de alta afinidad son bloqueados (Hirsch y col., 1998; Schachtman y Liu, 1999; Schachtman, 2000). Estos canales son altamente selectivos para el K⁺ pero parecen facilitar la entrada de Na⁺ al interior celular compitiendo con el K⁺ (Schachtman, 2000). Los canales de K⁺ en dirección hacia el exterior (ORF), menos específicos, podrían ser una posible vía de absorción de Na⁺ durante la despolarización inducida por NaCl (Murata y col., 1994; Schachtman, 2000). Una regulación efectiva de la apertura de estos canales permitiría controlar la entrada de Na⁺ y la pérdida de K⁺ (Amtmann y col., 1997) y podría constituir un mecanismo de adaptación a este tipo de estrés (Yeo y col., 1998). Trabajos llevados a cabo en células de tabaco parecen corroborar esta idea, ya que el

eflujo de K^+ fue menor en células adaptadas a NaCl que en la línea de células no adaptadas (Murata y col., 1994).

También se han descrito canales de cationes no selectivos (NSC) o VIC, muy permeables a un rango de cationes monovalentes, que podrían jugar un importante papel en la absorción de Na^+ (Amtmann y Sanders, 1999; Schachtman, 2000; Demidchik y col., 2002). Estos canales se inhiben por bajas concentraciones de Ca^{2+} externo (Laüchli y col., 1994; Davenport y Tester, 2000; Demidchik y col., 2002). Sería deseable que en condiciones salinas estos canales presentaran una actividad reducida, contribuyendo a un incremento de la tolerancia. Sin embargo, se desconoce su mecanismo de regulación y la identidad molecular de los mismos. Recientemente, se ha identificado un gen que codifica a un transportador de cationes de baja afinidad (LCT1), que complementa a un mutante de levadura incapaz de absorber K^+ , el cual es responsable de la absorción de Na^+ , Rb^+ a baja afinidad y que se bloquea por concentraciones milimolares de Ca^{2+} (Schachtman y col., 1997). Aunque se desconoce todavía su localización y si es un canal o un transportador, estos detalles son importantes para la determinación del papel fisiológico de estos nuevos transportadores en plantas (Amtmann y Sanders, 1999; Schachtman y Liu, 1999).

Uno de los sistemas de transporte de K^+ de alta afinidad mejor caracterizado es HKT1, originalmente identificado en trigo como un simporte K^+/H^+ y que parece catalizar tanto el simporte K^+-Na^+ , cuando el Na^+ esta a concentración μM , como el simporte Na^+-Na^+ , cuando el Na^+ esta a concentración mM (Schachtman y Schroeder, 1994; Rubio y col., 1995; Schachtman y Liu, 1999). Se encontraron homólogos de HKT1 en cebada (Wang y col., 1998), arroz (Golldak y col., 1997) y Arabidopsis (Schachtman y Schroeder 1994). HKT1 participa tanto en la absorción de K^+ a alta afinidad, como en la de Na^+ a baja afinidad cuando los sitios de K^+ están bloqueados (Gassmann y col., 1996). No obstante, el papel fisiológico de HKT1 en la tolerancia al NaCl no está claro. El hecho de que se exprese en las células corticales, y que el Na^+ no se requiera para el crecimiento, es indicativo de que este sistema no sea el mecanismo de absorción primario para el K^+ , ni por tanto, constituya una ruta de entrada mayoritaria de Na^+ en la célula. Sin embargo, cuando se expresa en oocitos de Xenopus, HKT1 participa en la absorción de Na^+ tanto a alta y como a baja afinidad (Rubio y col., 1995; Gassmann y col., 1996). Ello, y que diferentes mutaciones en el gen expresado en levadura incrementa la selectividad K^+/Na^+ y la tolerancia al NaCl sugiere su implicación en la homeostasia iónica de las células donde se expresan (Rubio y col., 1995; Rubio y col., 1999).

Recientemente, han sido caracterizadas las propiedades de las proteínas HKT de Arabidopsis (Uozumi y col., 2000; Kato y col., 2001; Mäser y col., 2002), arroz (Horie y col., 2001; Gollack y col., 2002) y eucalipto (Fairbairn y col., 2000; Liu y col., 2001). AtHKT1 es el único miembro de la familia de genes de Arabidopsis, mientras que en arroz existen, al menos, dos genes. La expresión de AtHKT1 incrementa la sensibilidad al NaCl en un mutante de levadura, con una delección en la Na⁺-ATPasa, ENA1, pero no suprime la deficiencia de mutantes *trk1* y *trk2* de levadura manteniendo atenuado el intercambio de K⁺ (Uozumi y col., 2000), siendo al contrario en el fenotipo mutante de *E. Coli*. La función como efector del influjo de Na⁺ de AtHKT1 en plantas ha sido confirmada por Rus y col., (2001). Inserciones de T-ADN y delecciones de AtHKT1 permitieron identificar aquellas que suprimían el fenotipo mutante *sos3-1* sensible al NaCl (Liu y Zhu, 1997; Rus y col., 2001). La supresión de este fenotipo mutante de arabidopsis sensible al NaCl se correlacionó con una reducida acumulación de Na⁺, una capacidad de mantener la concentración intracelular de K⁺ y una recuperación del crecimiento, inhibido por la deficiencia en K⁺. Todos estos resultados establecen que AtHKT1 es un determinante de la tolerancia a la sal, controlando el influjo de Na⁺ en plantas (Uozumi y col., 2000; Rus y col., 2001; Yokoi y col., 2002a). Por otro lado, el transporte de Na⁺, en raíces de cebada, arroz y trigo en condiciones de inanición de K⁺, exhibían una alta razón Na⁺/K⁺, baja Km y alta sensibilidad al K⁺. El Ba²⁺ inhibió el transporte de Na⁺ pero no de K⁺, lo que demuestra que el transporte de ambos iones está mediado por transportadores diferentes (García-Deblás y col., 2003). En el genoma de arroz se han identificado siete genes HKT, que pueden codificar para transportadores de Na⁺ (OsHKT1 y OsHKT2), los cuales fueron identificados basándose en la similitud de sus secuencias con las de trigo (Horie y col., 2001; Yokoi y col., 2002a). La expresión de OsHKT1 y OsHKT4 en levadura prueba que son transportadores de Na⁺ de alta y baja afinidad, respectivamente, siendo sensibles al Ba²⁺ y al K⁺. Esto mismo, también se llevó a cabo con TaHKT1 (trigo), demostrándose, en este caso, que era un cotransportador Na⁺/K⁺ (García-Deblás y col., 2003). En arroz, bajo condiciones de inanición de K⁺, todos los ARNm de los HKT se mantenían constantes e insensibles a cambios en las concentraciones de Na⁺ y K⁺ en tallo; sin embargo, en raíz, las expresiones, en general, eran mucho más bajas excepto la del OsHKT1 y OsHKT4. Todos estos resultados indican que los transportadores OsHKT están implicados en el movimiento del Na⁺ (García-Deblás y col., 2003).

Otros transportadores de alta afinidad que podrían jugar un papel importante en la adquisición de K⁺ y en la selectividad K⁺/Na⁺ es la familia KUP/HAK/KT, cuya afinidad, alta o baja, depende de la concentración de K⁺ en el medio (Rubio y col., 2000; Rigas y col., 2001). Se han caracterizado canales IRF en Arabidopsis, como AKT1 y KAT1, dos de nueve genes que se conocen, en patata, KST1, en maíz, ZMK1 y ZMK2, en trigo, TaAKT1, en tomate, LKT1, en plantas de hielo (*Mesembryanthemum crystallinum*) McHAK1-McHAK4 (Sentenac y col., 1992; Anderson y col., 1992; Müller-Röber y col., 1995;

Philippart y col., 1999; Bauer y col., 2000; Buschmann y col., 2000; Hartje y col., 2000; Su y col., 2002; Pilot y col., 2003) y recientemente OsAKT1 en arroz (Gollmack y col., 2003). Bajo condiciones de estrés por sal, los niveles de ARNm de OsAKT1 desaparecían, en variedades de arroz tolerantes a la sal (Pokkali y BK) y no se afectaban, en la variedad sensible a la sal (IR29), existiendo un incremento de 5 a 10 veces en la concentración de Na^+ intracelular en la variedad sensible con respecto a las tolerantes. Así mismo, en ambos casos se mantenían los niveles de K^+ , indicando que la regulación de este canal no afecta a la homeostasis de este catión bajo condiciones de estrés salino (Gollmack y col., 2003).

Respecto al mecanismo del eflujo de Na^+ a través del plasmalema de plantas superiores se han encontrado evidencias de la actividad de antiportadores Na^+/H^+ en plantas y algas (Blumwald y col., 2000). Shi y col., (2000) han identificado en *A. thaliana* el gen SOS1, que codifica un antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática. La expresión de SOS1 está regulada positivamente por estrés sódico y su mutación produce plantas extremadamente sensibles a NaCl. La actividad de SOS1 depende de los productos de SOS2 y SOS3, que codifican, respectivamente, una serina/treonina proteína quinasa y una proteína con dominios de unión a Ca^{2+} de tipo "EF-hand", todos identificados por Jian-Kang Zhu y sus colaboradores (Hasegawa y col., 2000a; Sanders, 2000; Zhu, 2000, 2001 y 2003; Liu y col., 2000; Shi y col., 2000, 2002b y 2003b). SOS3 pertenece a una familia de proteínas que unen Ca^{2+} y cuya secuencia de aminoácidos tiene gran similitud con la subunidad reguladora de Calcineurina (CNB) de levadura y sensores de Ca^{2+} neuronales (Liu y Zhu, 1998; Ishitani y col., 2000). Una mutación en Arabidopsis del gen SOS3 produce plantas hipersensibles al NaCl, fenotipo parcialmente recuperable incrementando la concentración de Ca^{2+} en el medio (Liu y Zhu, 1997a). Quizás SOS3 está implicado en los fenómenos que relacionan las altas concentraciones de ARNs de Ca^{2+} con el alivio de la toxicidad de la sal en plantas (Zhu, 2003). SOS3 posee tres dominios de unión a Ca^{2+} de tipo "EF-hand" con baja afinidad comparado con Calmodulina (Ishitani y col., 2000). Esto sugiere que la función de SOS3 en la tolerancia a la sal puede realizarse en localizaciones subcelulares específicas en las cuales el incremento transitorio de Ca^{2+} sea superior durante más tiempo. La proteína SOS3 está miristoilada in vivo, y es un requerimiento importante su función en relación con la tolerancia a la salinidad, ya que la mutación en este motivo miristoilado elimina la habilidad de SOS3 para complementar el fenotipo mutante carente de SOS3 (Ishitani y col., 2000). Se ha sugerido que la miristoilación de SOS3 puede regular las actividades de transportadores de iones unidos a la membrana.

En cuanto a SOS2, se trata de una serina/treonina proteína quinasa con un dominio catalítico N-terminal (similar a la quinasa SNF1 de levadura) y otro regulador (Liu y col., 2000; Zhu, 2000, Zhu, 2003). Ambos dominios interactúan causando autoinhibición, bloqueando el acceso del sustrato al sitio

catalítico (Guo y col., 2001). Parece ser que SOS3 interacciona con SOS2 a través de un motivo de 21 aminoácidos del dominio regulatorio (motivo FISL), pudiendo esto remediar la represión de la actividad kinasa, al dejar libre el dominio catalítico para la unión del sustrato (Halfter y col., 2000; Guo y col., 2001; Quintero y col., 2002; Gong y col., 2002). La sobreexpresión de una forma activada de SOS2, por delección del dominio autoinhibitorio conducido por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, puede complementar el fenotipo de hipersensibilidad al NaCl en plantas mutantes *sos2* y *sos3* (Guo y Zhu, resultados no publicados).

Análisis genéticos indican que SOS1, SOS2 y SOS3 funcionan en una vía común controlando la tolerancia a la salinidad (Zhu y col., 1998; Halfter y col., 2000) y estudios funcionales en levadura y plantas han mostrado que SOS1 es activado por el complejo SOS2-SOS3. Cuando SOS1 se expresa en mutantes de levadura carentes de Na⁺-ATPasas y transportadores Na⁺/H⁺ endógenos, solo incrementa ligeramente la tolerancia a la sal, pero cuando es coexpresado con SOS2 y SOS3 o con una forma activada de SOS2, las levaduras transgénicas mejoran drásticamente su tolerancia a la sal (Pardo y Zhu, datos no publicados). Así mismo, la sobreexpresión de SOS1 en Arabidopsis mejora la tolerancia a sal tanto en planta entera como en cultivos de callos (Shi y col., 2003a). La actividad antiportadora Na⁺/H⁺ en vesículas de membrana plasmática aisladas de mutantes *sos* era muy baja en comparación con los silvestres, habiéndose podido comprobar que al añadir una forma activada de SOS2 a éstas vesículas, la actividad antiportadora se recuperaba hasta casi los niveles normales en los mutantes *sos2* y *sos3* pero no en el mutante *sos1*. Estos resultados demuestran la activación por SOS3 y SOS2 del antiportador Na⁺/H⁺ SOS1 (Qiu y col., 2001). El antiportador SOS1 tiene una larga cola C-terminal que puede situarse en la cara citoplasmática de la membrana (Shi y col., 2000), proponiendo su función como sensor de Na⁺ intracelular. La formación de un lazo regulador le permite controlar la activación de SOS2 en plantas y, al mismo tiempo, estimular su capacidad de expulsar Na⁺ (Zhu, 2002; Zhu, 2003). En este sentido, además de la regulación de la actividad de SOS1, SOS2-SOS3 pueden regular a otros efectores de la tolerancia a sal (Gong y col., 2001), como al transportador de Na⁺ AtHKT1 de Arabidopsis (Uozumi y col., 2000). Así una mutación en este transportador suprime el fenotipo *sos3* de hipersensibilidad al NaCl (Rus y col., 2001), sugiriendo que SOS3 puede inhibir el influjo de Na⁺ por parte de AtHKT1. Por el momento, se sabe que en Arabidopsis existen ocho proteínas que unen Ca²⁺ como SOS3 y 22 proteínas kinasas como SOS2 (Guo y col., 2001).

Estudios recientes han revelado la existencia de un nuevo determinante de la tolerancia a la salinidad, SOS4, que codifica una piridoxal kinasa implicada en la formación de piridoxal-5-fosfato, una forma activada de la vitamina 6, y que parece ser ligando de SOS1, al haberse demostrado que SOS1 contiene una posible secuencia de unión a dicho ligando (Shi y col., 2002b; Shi y Zhu, datos no publicados). Así mismo, SOS5, una posible proteína de adhesión de la

superficie celular, anclada en la membrana plasmática, se requiere para una normal expansión celular bajo estrés salino (Shi y col., 2003b).

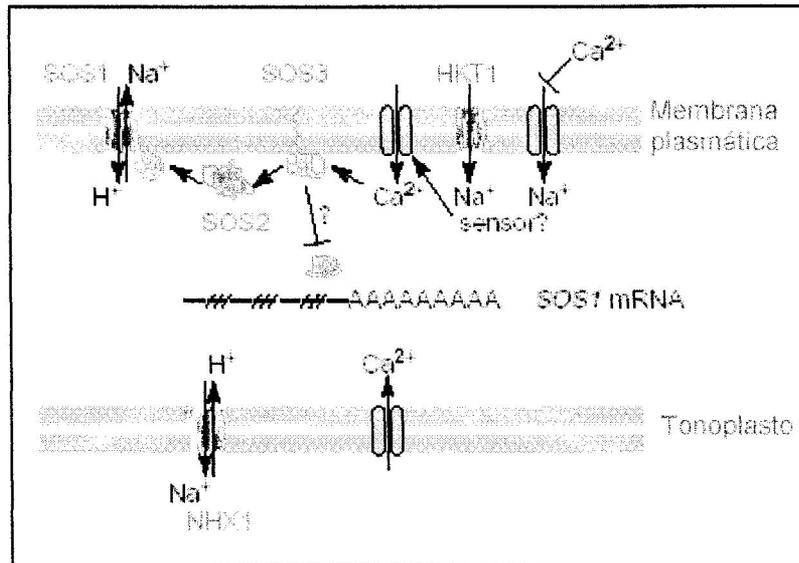


Figura 8. Esquema representativo de la vía de señalización de la ruta SOS frente al estrés salino en plantas de Arabidopsis. Tomado de Ward y col., (2003).

En la Figura 8 se muestra la ruta de señalización SOS en relación al estrés salino, en Arabidopsis. Dos son los componentes que inducen la expresión y la activación de SOS1 (Shi y col., 2002a; Qiu y col., 2002; Quintero y col., 2002). Por una parte, el estrés por Na⁺ induce elevadas concentraciones de Ca²⁺ citoplasmático, que puede constituir un componente de la señalización. El Na⁺ provoca toxicidad entrando por canales catiónicos no selectivos (Demidchik y col., 2002) y por AtHKT1 (Uozumi y col., 2000). Por otra parte, SOS3 interacciona y activa SOS2 (Quintero y col., 2002; Gong y col., 2002) que a su vez fosforila y activa SOS1 (Shi y col., 2002a; Quintero y col., 2002). Así mismo, bajo condiciones de estrés salino, SOS2 y SOS3 son también necesarios para la acumulación del ARNm (Shi y col., 2000) y de la proteína funcional de SOS1 (Shi y col., 2002a; Quintero y col., 2002), indicando que el complejo SOS2-SOS3 no solo participa en la fosforilación de SOS1, sino que también regula los niveles de transcrito y su estabilidad (Shi y col., 2003a).

Otra forma de mantener la concentración de Na^+ en el citoplasma a niveles no tóxicos es mediante su compartimentación en la vacuola, lo que además permite su uso como estabilizador osmótico. Mientras que las plantas sensibles a sal dependen principalmente de la exclusión de Na^+ a través de la membrana plasmática, las plantas tolerantes acumulan gran cantidad de Na^+ en la vacuola (Blumwald y col., 2000). El proyecto de secuenciación del genoma de *A. thaliana* ha permitido la identificación de genes que codifican proteínas de plantas con gran similitud a otras ya identificadas en levaduras. Es el caso del producto del gen AtNHX1, similar al antiportador Na^+/H^+ vacuolar en *S. cerevisiae* NHX1. Se ha demostrado que AtNHX1 disminuye la sensibilidad a NaCl e higromicina B del mutante de levadura nhx1 (Gaxiola y col., 1999), mediante un mecanismo que implica compartimentación de iones (Apse y col., 1999; Quintero y col., 2000).

La sobreexpresión de AtNHX1 aumentó la tolerancia a NaCl en *Arabidopsis* y tomate, existiendo una correlación entre tolerancia y niveles de transcrito, proteína y actividad Na^+/H^+ vacuolar (Apse y col., 1999; Quintero y col., 2000; Zhang y Blumwald, 2001). Estos resultados indican la importante función de la familia AtNHX en la compartimentación vacuolar del Na^+ . La expresión del gen AtNHX1 se induce por altos niveles de NaCl, KCl o por la adición de ABA, lo que sugiere una función de AtNHX1 en el ajuste osmótico celular y en la respuesta a la desecación (Gaxiola y col., 1999; Quintero y col., 2000; Shi y Zhu, 2002; Zhu, 2003). Estudios en plantas transgénicas de *Arabidopsis* con el promotor del gen AtNHX1 y el gen *gus* demostraron que este antiporte se expresa en todos los tejidos menos en los ápices de las raíces, siendo muy fuerte en células guarda. Esto sugiere el papel de AtNHX1 en la regulación del pH citoplasmático y de la homeostasis del K^+ (Shi y Zhu, 2002). La familia de los AtNHX se compone de 6 miembros AtNHX1-6. AtNHX1, 2 y 5 se expresan en tallo y raíces, y suprimen, con diferente eficacia, (AtNHX2 el más eficaz), el fenotipo sensible al Na^+/Li^+ de un mutante de levadura que carece del antiporte endosomal Na^+/H^+ ScNHX1, facilitando, entonces, la acumulación compartimentalizada de Na^+ y el mantenimiento del equilibrio osmótico del K^+ . AtNHX1 y 2 incrementan de forma similar con tratamiento salino o equiosmolaridad de ABA o sorbitol, pero AtNHX5 solo se incrementa en respuesta al NaCl. En este sentido, la expresión de AtNHX1 y 2 es regulada por una vía de señalización del estrés osmótico dependiente de ABA y la expresión de AtNHX5 se regula transcripcionalmente por sal y no a través de la vía SOS. (Yokoi y col., 2002b). Estudios recientes, ponen de manifiesto que AtNHX1 transporta K^+ con igual afinidad que para en Na^+ , y en menor medida Li^+ y Cs^+ . Estos estudios se llevaron a cabo purificando la proteína con colas de histidina y reconstituyéndola en liposomas, comprobándose que era activa en levadura y que respondía con la adición de Na^+ exógeno. Estos resultados muestran la implicación de esta proteína en el transporte de K^+ , en el control del pH y/o en la osmoregulación endosomal bajo condiciones de crecimiento fisiológicas y en la detoxificación de Na^+ bajo estrés salino (Venema y col., 2002).

Posteriormente, Venema y col., (2001, 2003) identificaron dos antiportadores Na^+/H^+ en tomate (*Lycopersicon esculentum*) LeNHX1 y 2, ambos implicados en la respuesta a la salinidad mediante la compartimentalización vacuolar del Na^+ . La isoforma LeNHX2 queda cerca de AtNHX5 y sin embargo, distante de AtNHX1. LeNHX2 complementa al fenotipo sensible a sal e higromicina del mutante de levadura carente de ScNHX1, afectándose fuertemente la concentración de K^+ vacuolar y de compartimentos intracelulares, mientras que en el citoplasma se mantenía similar, bajo concentraciones limitantes de K^+ . Por otro lado, no se han obtenido evidencias de la implicación de LeNHX2 en la acumulación activa de K^+ al interior de las vacuolas en ausencia de sal, llegando, entonces, a la conclusión de que LeNHX2 es un antiportador K^+/H^+ y no Na^+/H^+ . En plantas de tomate tratadas con 130 mM de NaCl observaron un rápido incremento de los niveles de este antiportor en hojas, aunque en tallos y raíces su expresión resultó ser constitutiva (Venema y col., 2003). Recientemente, el antiportador vacuolar Na^+/H^+ de una planta halófila, *Atriplex gmelini*, se ha expresado en arroz, *Oryza sativa*, consiguiendo un incremento de hasta 8 veces su actividad antiportadora con respecto al silvestre (Ohta y col., 2002).

En lo que respecta a la absorción de Cl^- , la diferencia de potencial que se establece a través de la membrana plasmática cuando se alcanza y mantiene la homeostasia iónica, constituye una barrera termodinámica para el influjo de este anión, incluso a concentraciones relativamente altas, si bien, una absorción activa puede ser mediada por un simportador Cl^-/H^+ (Niu y col. 1995). Por el contrario, la despolarización de la membrana derivada de la absorción de Na^+ detiene la absorción pasiva de Cl^- a través de los canales aniónicos (Skerret y Tyerman 1994). El Cl^- , una vez absorbido a través del plasmalema, sería transportado desde el citoplasma a la vacuola a través de canales selectivos de aniones (Plant y col. 1994) y de la ATPasa vacuolar (Wada y col 1992), siendo la compartimentación vacuolar de Cl^- una adaptación esencial en la tolerancia al NaCl (Niu y col. 1995).

D. PAPEL DE LA CALCINEURINA EN LA SEÑALIZACIÓN DE LA HOMEOSTASIS IÓNICA

Calcineurina es una proteína fosfatasa dependiente de Ca^{2+} y Calmodulina, requerida para la transducción de las señales de estrés dependientes de Ca^{2+} en muchos tipos de células. Es una proteína bastante conservada y ampliamente distribuida entre los eucariotas, aunque su existencia en vegetales no ha sido demostrada de manera concluyente. Se trata de una proteína heterodimérica que está constituida por una subunidad catalítica, Calcineurina A (CNA), que contiene un centro activo dinuclear metálico, y una subunidad reguladora, Calcineurina B (CNB) miristoilada y fuertemente asociada a la subunidad catalítica (Figura 9).

Se purificó por primera vez de tejido cerebral bovino y se describió como una proteína que une Calmodulina y cuatro átomos de Ca^{2+} con fuerte afinidad. La etimología de su nombre refleja la propiedad de unir átomos de Ca^{2+} y su abundancia en el tejido nervioso (Klee y col., 1979). Philip Cohen's en estudios posteriores e investigando la capacidad de desfosforilación de extractos celulares de músculo esquelético de conejo a subunidades α y β de kinasas, demostró que una de sus fracciones, identificada como una proteína fosfatasa de tipo 2B era idéntica que la Calcineurina identificada por Klee (Klee y Cohen, 1982; Cohen, 1983).

Genes que codifican para las subunidades A y B de Calcineurina se han identificado en levaduras, hongos, protozoos, insectos y mamíferos (Rusnak y Mertz, 2000). La secuencia primaria de ambas subunidades y la estructura cuaternaria heterodimérica están altamente conservadas desde levaduras a mamíferos (Sayito y col., 1991; Rusnak y Mertz, 2000).

Los miembros que pertenecen a la familia de las serina/treonina proteínas fosfatasas incluyen, además de Calcineurina, una proteína fosfatasa tipo 1 (PP1), una proteína fosfatasa tipo 2A (PP2A) y una proteína fosfatasa de tipo 2C (PP2C), todas ellas esenciales en diferentes vías de transducción de señales en células eucariotas (Ingebritsen y Cohen, 1983). Estas fosfatasas se distinguen entre sí por su sensibilidad a inhibidores, Calcineurina es específicamente inhibida por inmunosupresores como la ciclosporina A y FK506 en presencia de ciclofilinas y de la proteína de unión a FK506 (Liu y col, 1991; Schreiber y Crabtree, 1992), por el requerimiento de cationes divalentes para su actividad in vivo, y por el sustrato que desfosforilan. Así, mientras que las fosfatasas tipo 1 desfosforilan la subunidad β de las proteínas kinasas, las de tipo 2 desfosforilan la subunidad α (Cohen y col., 1989). Al tratarse de la única proteína fosfatasa conocida regulada específicamente por Ca^{2+} y Calmodulina, se sugiere que Calcineurina podría tener un papel importante en la mediación de los cambios en el estado de fosforilación de proteínas en respuesta a cambios en la concentración del Ca^{2+} intracelular.

CALCINEURINA fosfatasa de tipo 2B

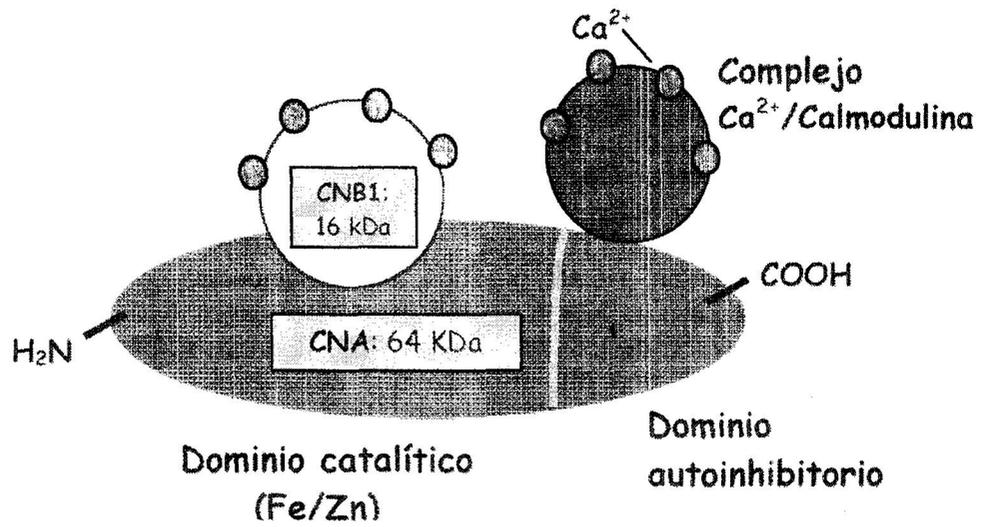


Figura 9. Representación del Complejo de Calcineurina. CNA, subunidad catalítica; CNB, subunidad reguladora; círculos rojos, átomos de Ca²⁺; H₂N y COOH, extremos amino y carboxiloterminales de la secuencia de aminoácidos.

1. Subunidad catalítica de Calcineurina: Calcineurina A

La actividad catalítica de Calcineurina reside en la subunidad CNA, que en mamíferos puede tener desde 57 a 59 kDa dependiendo de la isoforma. El tamaño de esta subunidad se incrementa hasta un 20% en especies eucariotas inferiores, como por ejemplo en *Saccharomyces cerevisiae* que tiene entre 63 y 69 kDa (Cyert, 1991; Liu y col., 1991; Ye y Bretscher, 1992) y 64 kDa en *Schizosaccharomyces pombe* (Yoshida y col., 1994; Plochocka y col., 1995). Sin embargo existe una estricta conservación en los genes de la subunidad catalítica de Calcineurina A en todos los organismos eucarióticos (Figura 10S). Mediante proteólisis limitada de la subunidad catalítica con clostripaina, una proteasa específica para arginina, Hubbard y col., (1989) identificaron cuatro dominios en la subunidad catalítica CNA de Calcineurina bovina: un dominio catalítico en la zona aminoterminal muy similar a proteína fosfatasa de tipo 2A, un dominio de unión a la subunidad reguladora CNB, un dominio de unión a Calmodulina y un dominio autoinhibidor en el extremo carboxilo (Figura 10D). Este último dominio funciona como un inhibidor competitivo que se une al sitio activo de la enzima. Aparentemente, la unión de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ a CNA induce un cambio conformacional, desplazando al dominio autoinhibidor, y dejando expuesto el centro activo de Calcineurina, que activa esta proteína. Así, la eliminación de los dominios de autoinhibición y de unión a CaM produce una Calcineurina constitutivamente activa, en ausencia de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. La estructura por rayos X de Calcineurina confirma la identificación de los residuos implicados en su regulación y que el dominio autoinhibitorio forma una α -hélice que se une al centro activo de la enzima (Figura 11). En este sentido, Perrino (1999) ha demostrado la existencia de elementos adicionales de inhibición situados entre el dominio de unión a CaM y el dominio de autoinhibición.

2. Subunidad reguladora de Calcineurina: Calcineurina B

La subunidad B de la Calcineurina (CNB) se ha conservado enormemente a lo largo de la evolución, mostrando la secuencia de aminoácidos en mamíferos un 80% de identidad con la de insectos y un 54% con la de *S. cerevisiae*.

El gen de CNB de mamíferos codifica una proteína de 170 aminoácidos con cuatro motivos "EF-hand" de unión a cuatro átomos de Ca^{2+} . La subunidad B permanece unida con alta afinidad a la subunidad A tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} con alta afinidad (Klee y col., 1988). El análisis de la secuencia primaria reveló un 35% de homología con Calmodulina, que también posee cuatro sitios de unión a Ca^{2+} . Estudios in vivo demostraron una escasa actividad fosfatasa en ausencia de Ca^{2+} , mientras que en presencia de Ca^{2+} estimuló ligeramente la actividad fosfatasa de CNB, y 600 veces por la adición de $\text{Ca}^{2+}/\text{Calmodulina}$ a las subunidades CNA y CNB reconstituidas (Perrino y col., 1995).

La pérdida de la metionina inicial y la unión de un grupo γ -amino de la glicina se une cíclicamente en posición 2 con el ácido mirístico (Aitken y col., 1983), constituye una modificación conservada desde levaduras hasta mamíferos, habiéndose demostrado que el papel biológico de la CNB miristoilada es incrementar la estabilidad de la proteína (Kennedy y col., 1996).

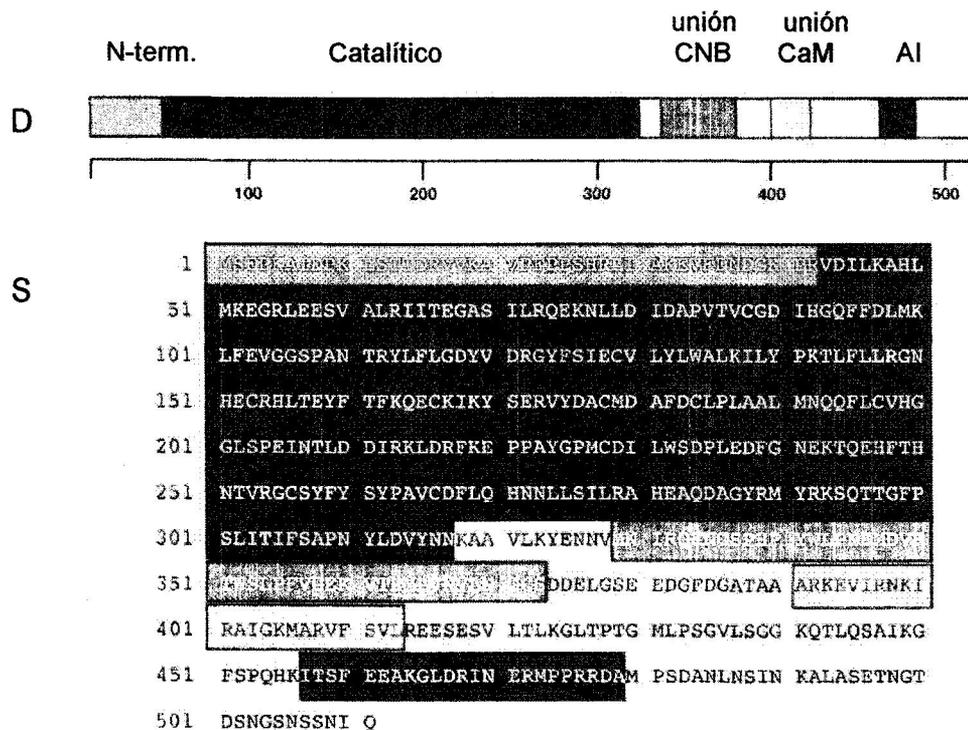


Figura 10. Estructura de los dominios (D) y secuencia primaria (S) de la Calcineurina A. La secuencia de aminoácidos representa la isoforma α de Calcineurina A de rata. CNB, Calcineurina B; CaM, Calmodulina; AI, dominio autoinhibitorio. Saitoh y col., 1991.

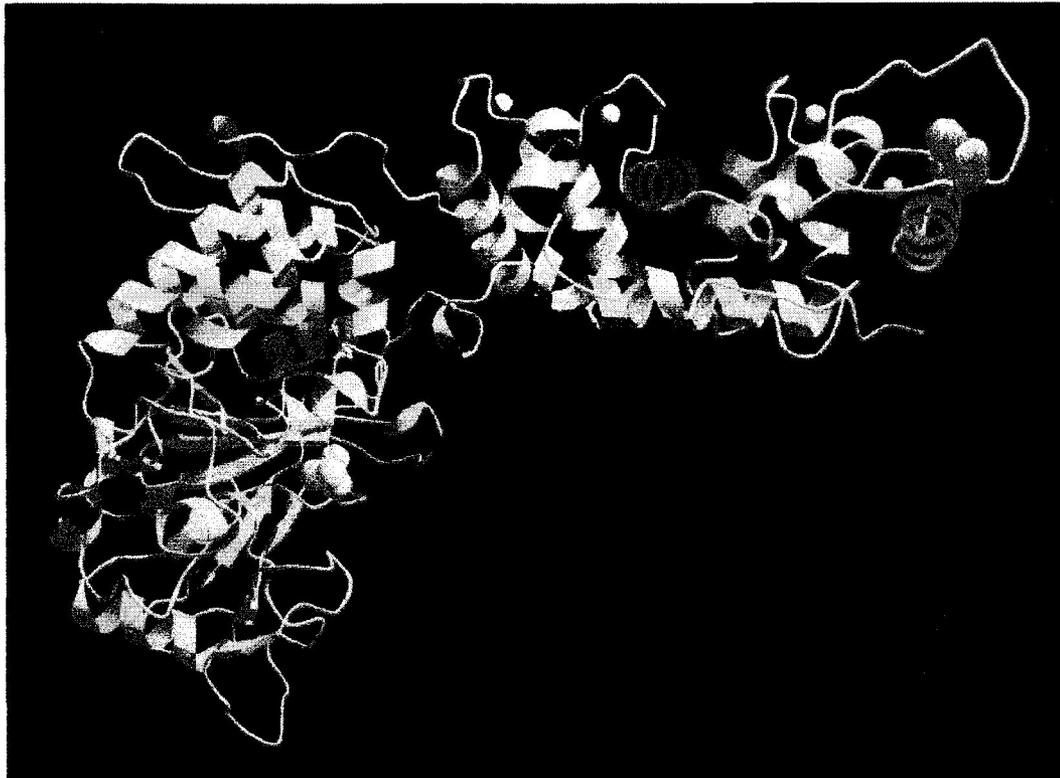


Figura 11. Diagrama Ribbon mostrando la estructura tridimensional de la Calcineurina, mediante la utilización de rayos-X (Griffith y col. 1995). Se muestra la estructura de CNA coloreada en gris, CNB en amarillo, los cuatro átomos de Ca^{2+} de la CNB en azul, el grupo miristoilado en rojo y las moléculas de fosfato unidas al centro activo de la CNA, representadas por las esferas naranjas.

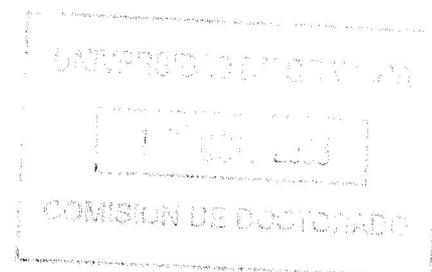
3. Papel fisiológico de la Calcineurina en levaduras, plantas y mamíferos: tolerancia a la salinidad

3.1. Calcineurina en levaduras

La utilización de fenotipos mutantes con deleciones selectivas e inmunosupresores específicos de Calcineurina han puesto de manifiesto las diferentes funciones fisiológicas de la Calcineurina en muchos organismos eucariotas. En general, los papeles fisiológicos de Calcineurina en levaduras están relacionados con la recuperación de la inhibición del crecimiento, inducida por el factor α de agregación, resistencia a cationes como Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , regulación de la homeostasis del Ca^{2+} , regulación en el inicio de la mitosis (Cyert y col., 1991; Ye y Bretscher, 1992; Cyert, 1993; Withee y col., 1997; Mizunuma y col., 1998). Por otro lado, en *Schizosaccharomyces pombe* la sobreexpresión de CaN causó cambios en la morfología celular aumentando su longitud, y aparición de núcleos con morfologías aberrantes y desplazados del centro celular. Así mismo, aparecieron alteraciones en la formación de los microtúbulos y de los cuerpos polares fusiformes y se observaron células septadas y ligeramente encorvadas (Yoshida y col., 1994;). La deficiencia en la iniciación de la septación fue suprimida por la sobreexpresión de Calcineurina en levaduras (Y, lu y col., 2002), lo que indica que CaN también se ha implicado en la citokinesis, en la agregación, en la posición de los cuerpos polares fusiformes, en la posición y morfología nuclear, en el crecimiento polarizado y septado, en la condensación de la cromatina, y en la regulación de la homeostasis del Cl^- (Plochocka-Zulinska y col., 1995; Sugiuray col., 1998; Sigiura y col., 2002; Cheng y col., 2002).

En otros organismos eucarióticos inferiores, como hongos, la Calcineurina está implicada en la tolerancia a compuestos antifúngicos, en la morfogénesis celular y en la virulencia (Sanglard y col., 2003; Bader y col., 2003).

Saccharomyces cerevisiae se ha utilizado como sistema modelo en la mayoría de los trabajos de investigación llevados a cabo en esta proteína. Este hecho se relaciona con la profundización en el estudio de de identificación de genes que determinan la tolerancia al estrés salino, al utilizarse para estos estudios sistemas modelos que permiten la definición genética de la respuesta a dicho estrés (Serrano y Gaxiola, 1994). A este respecto, es importante tener en cuenta que los mecanismos de percepción de la señal de estrés y la transducción en una respuesta fisiológica que ello conlleva, son procesos fisiológicos concentrados entre el sistema modelo (levadura o cultivo celular) y la planta entera. Se ha descrito que la expresión de una Calcineurina recombinante activada incrementa significativamente la resistencia a NaCl de células de levadura (Mendoza y col., 1996). En *S. cerevisiae* se han encontrado homólogos a la Calcineurina de mamíferos. Los genes CNA1 y CNA2 codifican para dos isoformas de la subunidad A (Liu y col., 1991), existiendo diferencias de expresión bajo un estrés osmótico (Del Aguila y col., 2003) y CNB1 dirige la



síntesis de la subunidad B (Kuno y col., 1991). El tamaño de la proteína Cna1 es de 60 kDa, Cna2 tiene 64 kDa y Cnb1 tan solo 16 kDa.

Existen claras evidencias de que la Calcineurina es esencial como proteína reguladora de la homeostasis de Na^+ y K^+ en *Saccharomyces cerevisiae*, ya que un mutante deficiente en esta proteína fosfatasa exhibía una menor tolerancia a cationes como Na^+ , y Li^+ y no al K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} (Nakamura y col., 1993; Mendoza y col., 1994). Se ha demostrado que Calcineurina regula la absorción de K^+ incrementando la afinidad por este catión en respuesta a un estrés salino (Mendoza y col., 1994,1996). Además, Calcineurina regula la expresión de ENA1, una Na^+ -ATPasa de plasmalema (Pmr2p) clave para la expulsión de Na^+ celular. Células deficientes en Calcineurina acumulan Na^+ y Li^+ al mismo tiempo que disminuye la expresión de ENA1 (Pmr2p) (Mendoza y col., 1994). Por otro lado, pudo demostrarse que la activación de Calcineurina por el Ca^{2+} , a través de Calmodulina, regula la adaptación al estrés salino al inducir la expresión de ENA1 (Danielsson y col., 1996; Hirata y col., 1995; Mendoza y col., 1996; Shi-Young Park y col., 2001) y que esta respuesta viene mediada por la actuación de los factores de transcripción Crz1/Tcn1p (Matheos y col., 1997; Stathopoulos y Cyert, 1997; Shi-Young Park y col., 2001) y por el, recientemente, descubierto, Prz1, un factor de transcripción "dedo de cinc" homólogo a Crz1/Tcn1 (Hirayama y col., 2003).

Por otro lado, células de levadura deficientes en CNB1 son incapaces de transformar el transportador de K^+ , Trk1p, en un transportador de alta afinidad para este catión, manteniendo la afinidad para el Na^+ y el Li^+ , lo que resulta en un incremento del influjo de Na^+ en estas células, sugiriéndose como mecanismo de regulación de esta respuesta una desfosforilación directa o indirecta de Trk1p por Calcineurina (Mendoza y col., 1994).

Otra proteína que, en levadura, interviene en la tolerancia al estrés salino es la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática, PMA1, esencial para el mantenimiento de pH citosólico y el potencial electroquímico de la membrana plasmática. Calcineurina parece regular negativamente a PMA1 in vivo, habiéndose demostrado una reducción tanto de la actividad como de la cantidad de Pma1p en fracciones de membrana en levadura que sobreexpresaron Calcineurina (Withee y col., 1998). Calcineurina también parece estar implicada en la regulación de las bombas y de los antiportadores de Ca^{2+} , así como de otros transportadores iónicos que indirectamente influyen la concentración de Ca^{2+} intracelular en levaduras. Así, Calcineurina induce la expresión de las Ca^{2+} -ATPasas tipo PMR1 y PMC1 de Golgi y vacuola, respectivamente, responsables de la reducción del Ca^{2+} citosólico (Cunningham y Fink, 1994 y 1996) e inhibe la actividad del antiportador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ vacuolar Vcx1 (Garrett-Engel y col., 1995; Hemenway y col., 1995; Tanida y col., 1995).

En la Figura 12 se muestra un modelo hipotético que incluye la percepción de señales, transducción y regulación de efectores que modulan la homeostasis iónica en levaduras, a través de la regulación de los factores de transcripción y de la regulación postranscripcional de transportadores iónicos dependientes de Calcineurina.

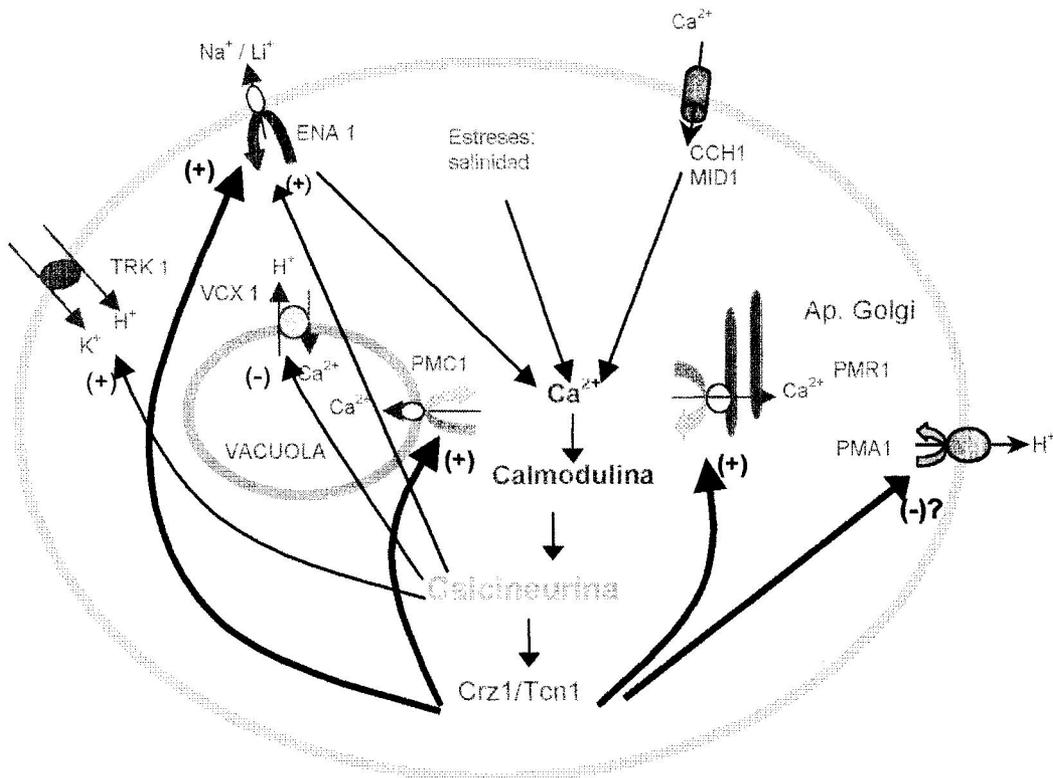


Figura 12. Modelo de percepción de señales, transducción y regulación de efectores que modulan la homeostasis de iónica en levaduras. El incremento de Ca^{2+} producido en respuesta a diferentes estreses, como el estrés salino, inducen la activación de Calcineurina. Las flechas gruesas indican la regulación de Calcineurina a través de los factores de transcripción, Crz1/Tcn1, induciendo los genes de ENA1, Na^+ -ATPasa de la membrana plasmática, PMC1 y PMR1, Ca^{2+} -ATPasas de la vacuola (alta afinidad) y del ap. De Golgi (bomba secretora de Ca^{2+}), respectivamente, y parece inhibir el gen PMA1, H^+ -ATPasa de la membrana plasmática. Las flechas estrechas indican regulación postranscripcional de la Calcineurina de forma positiva al transportador de K^+ de la membrana plasmática y ENA1, Na^+ -ATPasa de la membrana plasmática, y negativamente al antiportador vacuolar Ca^{2+}/H^+ de baja afinidad (Rusnak y Mertz, 2000).

3.2. Calcineurina en plantas

Existen evidencias bioquímicas y farmacológicas de la presencia de Calcineurina en plantas superiores y su participación en la regulación del transporte iónico que permite la apertura y cierre de los estomas. Las primeras evidencias bioquímicas de la existencia de Calcineurina en plantas fueron obtenidas por Luan y col. (1993) quienes demostraron, tras la utilización de inhibidores específicos, que una proteína fosfatasa con características bioquímicas similares a las de Calcineurina de levaduras media la señal de Ca^{2+} que regula la entrada de K^+ al citosol en *Vicia faba*. Posteriormente, Allen y Sanders, (1995), relacionaron esta proteína con la salida de Ca^{2+} vacuolar a través de canales iónicos en células guarda de *Vicia faba*. Los resultados obtenidos por estos autores demostraron que la Calcineurina vegetal también participa en la regulación del transporte iónico relacionado con el estrés salino.

Sin embargo, no se ha purificado aún Calcineurina de tejidos de plantas e incluso la secuenciación completa del genoma de *Arabidopsis thaliana* no ha permitido la identificación de un claro homólogo estructural de la subunidad catalítica de esta proteína. Si se han identificado diversas familias de sensores de Ca^{2+} , y quizás, la que más se conoce es Calmodulina (CaM) y proteínas relacionadas, las cuales constan de cuatro dominios "EF-hand" de unión a Ca^{2+} (Zielinski, 1998 y 2002; Snedden y Fromm, 2001; White y Broadley, 2003). CaM es una de las proteínas más conservadas en eucariotas, y el número y la organización de sus genes puede variar enormemente en diferentes organismos (Zielinski, 2002).

Una nueva familia de sensores de Ca^{2+} de *Arabidopsis* incluye proteínas similares a la subunidad reguladora de Calcineurina de levadura, AtCBLs (White y Broadley, 2003), que son codificadas por una familia multigénica de al menos 10 miembros, con dominios estructuralmente similares y con solo pequeñas variaciones en la longitud de la región codificante (Kudla y col., 1999; Kim y col., 2000; Albrecht y col., 2001; Guo y col., 2001). Se ha comprobado, que diversas AtCBLs han conservado el dominio miristoilado en su región N.terminal, sugiriendo que estas proteínas se localizan en las membranas celulares (Kim y col., 2000; Albrecht y col., 2001), como ocurre con SOS3, uno de los genes que se identificó de *Arabidopsis thaliana*, SOS3 o AtCBL4 (Liu y col., 1998) y que está implicado en la resistencia a estreses. La proteína codificada por el gen SOS3 tiene un 30 % de homología con CNB de varios orígenes, produciendo, su delección, mutantes de *Arabidopsis thaliana* sensibles al Na^+ (Liu y col., 1998). Así mismo, las proteínas AtCBLs, que muestran algo más de homología con CNB, son capaces de interactuar físicamente con la subunidad A de Calcineurina de rata, y no de levadura, complementando la proteína híbrida resultante un mutante de *S. cerevisiae* deficiente en Calcineurina (Kudla y col., 1999).

Una tercera familia de sensores de Ca^{2+} son proteínas kinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), las cuales contienen cuatro dominios de unión a Ca^{2+} como CaM o CBLs y el dominio kinasa (Harmon y col., 2000; White y Broadley, 2003). Las proteínas CDPKs son las únicas que pueden funcionar como sensores de Ca^{2+} y como efectoras de su actividad, en este caso como kinasa. El genoma de *Arabidopsis* codifica 34 posibles CDPKs (Harmon y col., 2001; Luan y col., 2002) cuyas expresiones, regulaciones y posibles funciones han sido estudiadas por Cheng y col., (2002) y algunas de ellas tienen un motivo miristoilado en el extremo amino terminal, sugiriendo su asociación a las membranas (Martin y Busconi, 2000; Kim y col., 2000; Albrecht y col., 2001; Xiong y col., 2002). Numerosos estudios han mostrado que las proteínas CDPKs se inducen o activan por estreses abióticos, sugiriendo su papel en la señalización (Hwang y col., 2000), habiéndose observado igual activación en respuesta a la infección por patógenos (Romeis y col., 2000; Xiong y col., 2002).

Las proteínas CaM y CBLs contienen múltiples dominios de unión a Ca^{2+} pero carecen de un dominio efector, como CDPKs. Para que estas proteínas puedan transmitir la señal de Ca^{2+} tiene que interactuar con otras proteínas diana y regular su actividad. Las proteínas diana de CaM han sido identificadas en plantas superiores y engloban a proteínas kinasa, enzimas metabólicas, proteínas asociadas al citoesqueleto (Snedden y Formm, 2001; Reddy y col., 2002; Zielinski, 2002), pero la diana más abundante es la Ca^{2+} -ATPasa de tipo IIB, localizada en las membranas celulares de plantas (Sze y col., 2000). La Ca^{2+} -ATPasa tiene un dominio autoinhibitorio que bloquea el centro activo en estado de reposo; cuando el complejo Ca^{2+} -CaM se une, desplaza al dominio autoinhibitorio dejando libre el centro activo de la enzima (Hook y jeans, 2001). En cuanto a las proteínas CBLs, se ha identificado una familia de proteínas kinasas como SNF1 (kinasa de levadura) como sus únicas dianas, CIPKs: proteínas kinasas que interactúan con las proteínas CBLs (Shi y col., 1999; Halfter y col., 2000; Luan y col., 2002). Interaccionan a través del dominio C-terminal, en una región de 24 aminoácidos denominado dominio NAF, requiriéndose, para ello, niveles micromolares de Ca^{2+} , y provocando la activación de la enzima por el desplazamiento del dominio autoinhibitorio, al igual que en el caso de la CaM (Albrecht y col., 2001; Guo y col., 2001b). En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado 25 proteínas CIPKs, entre las que encontramos a SOS2 o CIPK24, que interactúa con SOS3 o CBL4 activando y regulando la actividad kinasa (Halfter y col., 2000). La existencia de unas 10 proteínas CBLs y unas 25 proteínas CIPKs sugiere una interacción múltiple entre ambos tipos (Kim y col., 2000; Albrecht y col., 2001; Guo y col., 2001b). Estas interacciones dan lugar a complejos que están posiblemente implicados en la transducción de señales de diferentes estreses. Así, AtCIPK3 regula la vía de señalización del frío y del ABA y AtCBL1 regula de forma diferencial las respuestas al estrés salino, sequía, y frío en *Arabidopsis* (Kim y col., 2003; Cheong y col., 2003).

El hecho de que tanto AtCBL como SOS3 codifiquen proteínas que unen Ca^{2+} es muy sugerente, indicando que, en plantas, el estrés salino puede estar regulado por vías de transducción de señales dependientes de Ca^{2+} , posiblemente vía Calcineurina, al igual que ocurre en *S. cerevisiae*. Nuevas evidencias para esta hipótesis fueron obtenidas por Pardo y col., (1998), quienes demostraron que la coexpresión de las subunidades catalítica y reguladora de Calcineurina de levadura confería tolerancia a sal en plantas transgénicas de tabaco, lo que indicaba que en plantas, como en levaduras, una Calcineurina dependiente de Ca^{2+} y Calmodulina pueden regular los determinantes de tolerancia requeridos para la adaptación a dicho estrés.

3.3. Calcineurina en mamíferos

En lo que respecta a la actuación de Calcineurina en mamíferos, se la ha relacionado con numerosas funciones recogidas por Klee y col., (1998). Entre todas ella cabe destacar el papel esencial en la transducción de señales que induce la activación de los linfocitos T, siendo el blanco de agentes inmunosupresores como ciclosporina A y FK506 que se utilizan frente al rechazo de órganos trasplantados (Liu, 1993; Cardenas y Heitman, 1995; Rao y col., 1997) y en la respuesta a la morfogénesis cardíaca e inducción de la hipertrofia cardíaca (De La Pompa y col., 1998; Molkentin y col., 1998; Lim y Molkentin, 1999; Shimoyama y col., 1999; Sussman y col., 1998 y 1999; Lim y Molkentin, 2000; Tsao y col., 2000).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

A. MATERIAL VEGETAL

Para los diferentes estudios realizados se han utilizado callos obtenidos a partir de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum*. Mill, variedad Pera).

1. Cultivo in vitro de plántulas

El cultivo in vitro de las plántulas de tomate se realizó esencialmente según Rodríguez-Rosales y col (1999). Las semillas de tomate fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito sódico comercial diluida al 50 % durante 20 minutos y, posteriormente, lavadas sucesivamente durante 5, 10 y 15 minutos en agua destilada estéril. A continuación, las semillas se germinaron en un medio, previamente autoclavado a 120°C durante 20 minutos, compuesto por los macro y micronutrientes del medio Murashigue y Skoog, conteniendo 2% sacarosa y 0,7 % agar, manteniéndose durante 3 días en oscuridad a 27 °C hasta obtener una radícula de 1 cm, y hasta un total de 10 días con un fotoperiodo de 16 h y una intensidad de irradiación $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$

B. CEPA BACTERIANA Y VECTORES PLASMÍDICOS

La descripción de la construcción del plásmido se muestra en la Figura 1. El gen que codifica una forma truncada de CNA2 de levadura, conteniendo una delección en la treonina 459 (CNAtr; Mendoza et. al., 1996), fue clonado entre el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador de la octopina sintasa (Ocs) en el plásmido PBI121 derivado del pBTEX. A partir del gen CNB1 se genera cADN por RT-PCR, el cual fue insertado entre el promotor 35S de CaMV y el terminador de la octopina sintasa en el casete de expresión pTEX contenido en el plásmido pUC19. El casete entero fue clonado en Hind III en el plásmido pBTEX que ya contenía CNAtr. El gen marcador en este vector codifica para la enzima neomicin fosfotransferasa (NPT II) que confiere resistencia a kanamicina y estaba conducido por el promotor y terminador de la nopalina sintasa.

La transformación de los cotiledones de tomate se ha realizado con *Agrobacterium tumefaciens*, cepa LBA4404 (pAL4404). El plásmido utilizado en este estudio, pBTCaN, ha sido proporcionado por los Drs JM Pardo y T Ruiz (Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Sevilla).

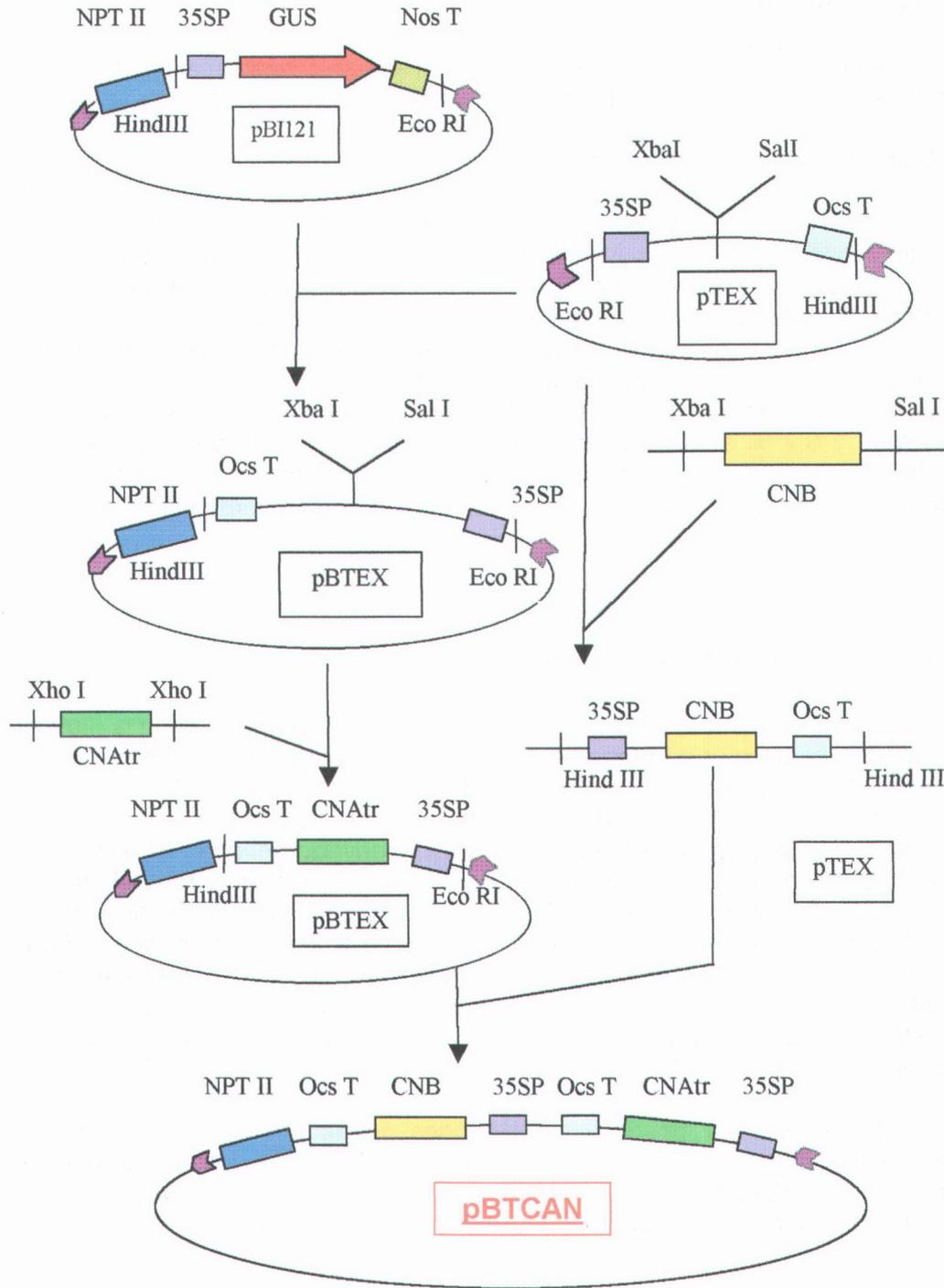


Figura 1. Construcción del plásmido pBTCAN (Pardo et. al. 1998).

1. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

1.1. Introducción

Las agrobacterias (grupo al cual pertenece *A. tumefaciens*) son microorganismos aeróbicos, gram negativos, típicos del suelo, que tienen forma de bacilo y no producen esporas (Schell, 1995a y 1995b; Miranda y Campos, 1998). El género *Agrobacterium* pertenece a la familia Rhizobiaceae. Debido a la capacidad y eficiencia de este género en infectar diversos organismos vegetales, surge la idea de utilizar *A. tumefaciens* como mediador para la introducción de genes de interés en plantas (Schell, 1995a y 1995b; Miranda y Campos, 1998). Se conocen más de 600 especies vegetales susceptibles a la infección por *A. tumefaciens*, en su mayoría aquellas pertenecientes a las Angiospermas dicotiledóneas. Esta agrobacteria induce en las plantas que infecta una enfermedad denominada "agalla de corona", un tumor que se desarrolla en la base del tallo de la planta infectada, el cual viene acompañado de una alta producción de opinas que son aprovechadas exclusivamente por la agrobacteria (Zupan y Zambryski, 1997). *A. tumefaciens* contiene un plásmido específico denominado "plásmido Ti" (Inductor de Tumores) el cual se encuentra en un pequeño porcentaje de las poblaciones naturales de esta agrobacteria en el suelo (Zupan y Zambryski, 1995). Este plásmido, de alrededor de 200kb (A. De La Riva y col., 1998), está dividido en varios segmentos o regiones. Uno de estos segmentos, denominado T-ADN (ADN Transferido o de Transferencia), se encuentra delimitado en sus extremos por dos regiones, conocidas como "extremidades derecha e izquierda", las cuales tienen un papel fundamental en la transferencia del T-ADN a la célula vegetal (Miranda y Campos, 1998; Schell, 1995a y 1995b). El T-ADN contiene los loci: oncogénicos (responsables de la formación del tumor) que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de auxinas y citoquininas, y no oncogénicos que codifican para la síntesis de opinas (A. De La Riva y col., 1998). Otra sección del plásmido Ti de gran importancia es la región conocida como "Vir" o "Región de Virulencia" de alrededor de 30 Kb (A. De La Riva y col., 1998); en esta región se encuentran varios genes denominados "genes vir" de cuya expresión depende la transferencia efectiva de la región T-ADN del plásmido Ti a la célula vegetal. Su nombre se debe a que esta es la región que entra al núcleo de la célula vegetal y se integra en su genoma (Figura 2).

Las cepas "desarmadas" son aquellas a las que se les ha quitado el T-ADN original por medio de un proceso de doble recombinación. Para esto se introduce en la cepa de *A. tumefaciens* un plásmido que contenga regiones de homología con el T-ADN (además de un gen marcador de selección). Gracias a estas regiones de homología el plásmido introducido se integra al plásmido Ti, logrando separar de este último la región del T-ADN que contiene los oncogenes.

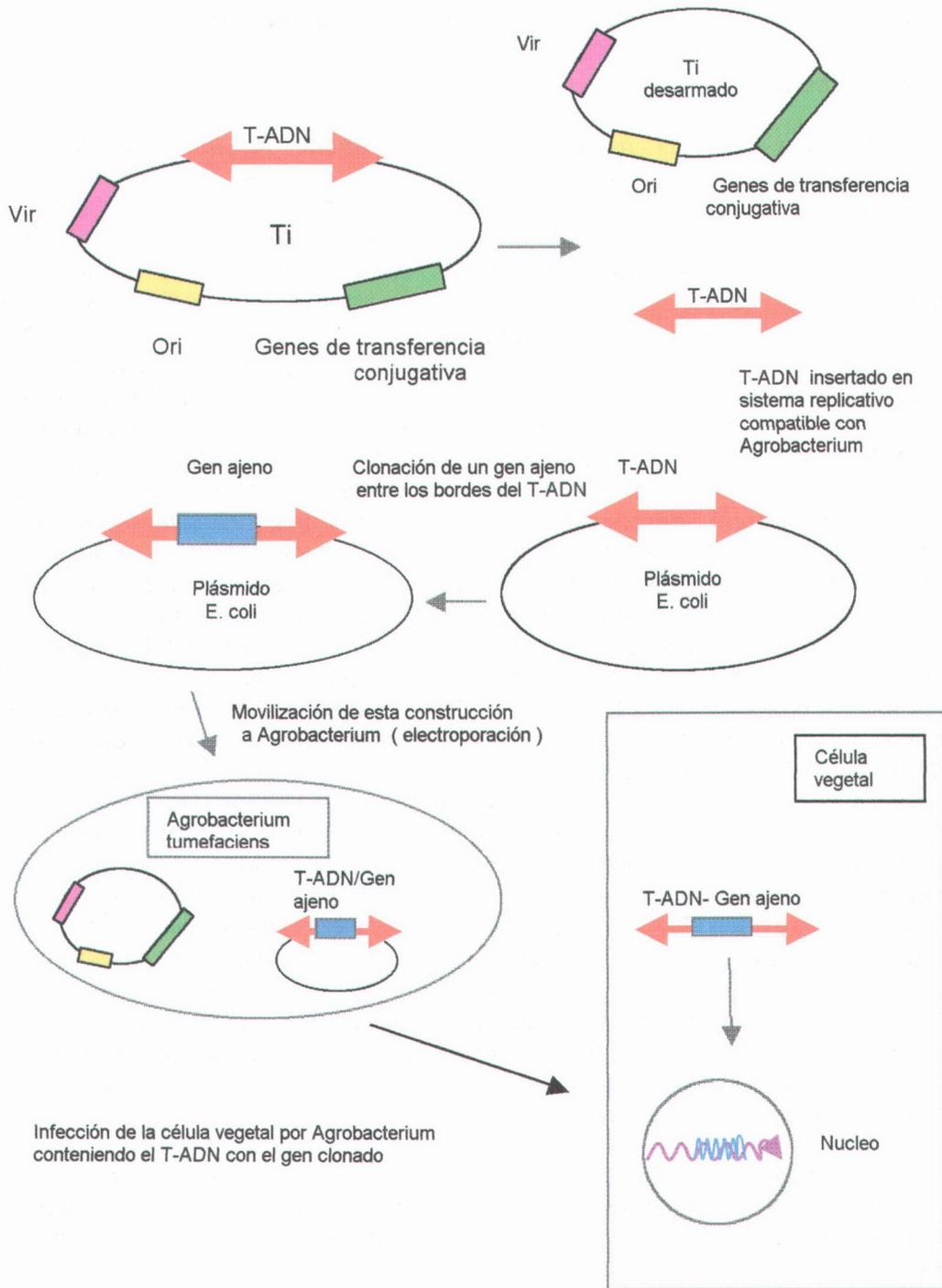


Figura 2. Infección de células vegetales por el sistema binario de *A. tumefaciens*.

Después de este proceso el panorama dentro de la célula bacteriana es el de un plásmido foráneo (el que se introdujo) conteniendo el T-ADN y por otra parte el plásmido Ti "desarmado" sin su región T-ADN y con el marcador de selección, que permitirá identificar la cepa desarmada. Una vez que se tiene la cepa desarmada, se necesita introducir en ésta los genes de interés, para lo cual se requiere de un vector que contenga dichos genes. Debido a su gran tamaño (200 Kb), el plásmido Ti no se puede manipular fácilmente (Miranda y Campos, 1998) para introducir estos genes de interés directamente en él. Por esta razón, se utilizan plásmidos más pequeños, que funcionan como vectores, los cuales poseen las extremidades del T-ADN, los genes a insertar, un origen de replicación y un gen para la posterior selección de la bacteria transformada. Es decir, que se construye un tipo de T-ADN, el cual en vez de oncogenes tiene los genes de interés. Estos vectores pueden ser binarios o cointegrados (Hoekema y col., 1983; Schell, 1995a y 1995b; Miranda y Campos, 1998), dependiendo de la manera en que se relacionan con el plásmido Ti. Así un vector co-integrado resulta de la "integración" del plásmido pequeño con el plásmido Ti, gracias a regiones de homología entre éstos. Los vectores de tipo binario (Figura 2), que es el que hemos utilizado nosotros, se derivan de plásmidos que son capaces de replicarse tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*, de tal manera que no necesitan integrarse al plásmido Ti para ser replicados y se mantienen dentro de la célula bacteriana como plásmidos independientes. Tras la obtención de la cepa transformada, se entra en la fase definitiva del proceso de transformación de la planta, el de la infección. Para este efecto, se co-cultivan la cepa de *Agrobacterium* con el vector conteniendo los genes de interés y un explanto vegetal, el cual es escogido en virtud de su capacidad de regeneración y facilidad de manipulación, pudiendo utilizarse discos foliares, raíces, tubérculos, cotiledones etc.

1.2. Transformación de *A. tumefaciens* con el plásmido pBTCan

El plásmido pBTCan fue introducido en *Agrobacterium* por electroporación. En este sistema, las células se someten a un pulso eléctrico de 1800 voltios para la apertura de poros temporales en la membrana bacteriana y permitir la entrada del ADN. Para ello, la cepa de *Agrobacterium* utilizada fue necesario hacerla electrocompetente. La bacteria se cultivó durante 3-5 h en medio YEB (1% de peptona, 1% de extracto de levadura y 0.5 % de NaCl) suplementado con kanamicina (50 µg/ml), gentamicina (25 µg/ml) y cloranfenicol (25 µg/ml) hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (DO de 0.3 a 660 nm). Se centrifugó y las células se resuspendieron en frío en 10 ml de HEPES 1mM, pH 7.0, repitiéndose la operación dos veces más. Finalmente, las células se resuspendieron en 200 ml de glicerol frío al 10%, congelándose en alícuotas de 40 µl a -20°C hasta su utilización. Se mezclaron alícuotas de *Agrobacterium* con

1-10 ng de plásmido en cubetas de electroporación de 0.1 cm, y se sometieron a un pulso eléctrico de 1.8kv, 50 μ F y 200 Ω . Tras la adición de 500 μ l de YEB e incubación durante 4 h a 28°C, se vertió el conjunto en placas selectivas, en presencia de 50 μ g/ml de kanamicina, y se seleccionan las colonias transformadas para su crecimiento en medio líquido YEB.

C. OBTENCIÓN DE CALLOS DE TOMATE TRANSFORMADOS

1. Obtención de cotiledones transformados

Se ha utilizado esencialmente el método descrito por El Mansouri y col. (1999).

1.1. Crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens LBA4404, transformado con el plásmido pBTCAN, se cultivó durante 24 h en 2 ml de medio YEB (1% peptona, 1% extracto de levadura y 0.5 % NaCl) suplementado con estreptomina y kanamicina (50 μ g/ml). Este precultivo se inoculó en 50 ml de medio YEB, manteniéndose durante 36 h hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (DO 1.0 a 660 nm), y posteriormente se diluyó con agua estéril hasta alcanzar una DO de 0.3 a 660 nm.

1.2. Infección de los cotiledones

Los cotiledones de las plántulas germinadas *in vitro* fueron separados del hipocotilo e incubados durante 24 h en medio de regeneración de tallos (MRT) compuesto por sales del medio MS, suplementadas por las vitaminas del medio B5 (1962), 3% de sacarosa, 0.7% de agar y 2 mg/l de benciladenina. Posteriormente, los cotiledones se cocultivaron en tubos estériles con 50 ml del cultivo diluido de *Agrobacterium* y agitación suave durante 20 minutos. Los cotiledones así infectados se secaron con papel de filtro estéril, se cultivaron en MRT durante 48 h, y se transfirieron a un medio de selección (MRT) suplementado con kanamicina y carbenicilina, ensayándose previamente diferentes concentraciones de kanamicina (50, 100, 200 y 400 μ g/ml) y una concentración única de carbenicilina (500 μ g/ml). El cultivo se mantuvo a una temperatura de 27°C, fotoperiodo de 16 h y unos 20 μ mol⁻².m⁻².seg⁻¹ de irradiación. La regeneración de los tallos tuvo lugar, aproximadamente, entre la cuarta y la sexta semana desde el inicio del cultivo en el medio de selección (Figura 3).

1.3. Inducción de la callogénesis y multiplicación de callos

Los tallos procedentes de los cotiledones transformados se cortaron transversalmente en fragmentos de 1 cm, se seccionaron longitudinalmente y se transfirieron a un medio de callogénesis (MS suplementado con 1 mg/l de ácido 2,4 diclorofenoxiacético, 100 $\mu\text{g/l}$ de kinetina, 3% de sacarosa y 1% de agar a pH 6.0), al que se adicionaron 25 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina para posibilitar el crecimiento selectivo de los callos transformados. Tras 24 días de cultivo en oscuridad a 27°C, los callos transformados se transfirieron a un medio de multiplicación con la misma composición del de callogénesis, excepto en la concentración de kinetina que fue de 10 $\mu\text{g/l}$, subcultivándose con una periodicidad de 3 semanas en oscuridad y a 27°C (Figura 3).

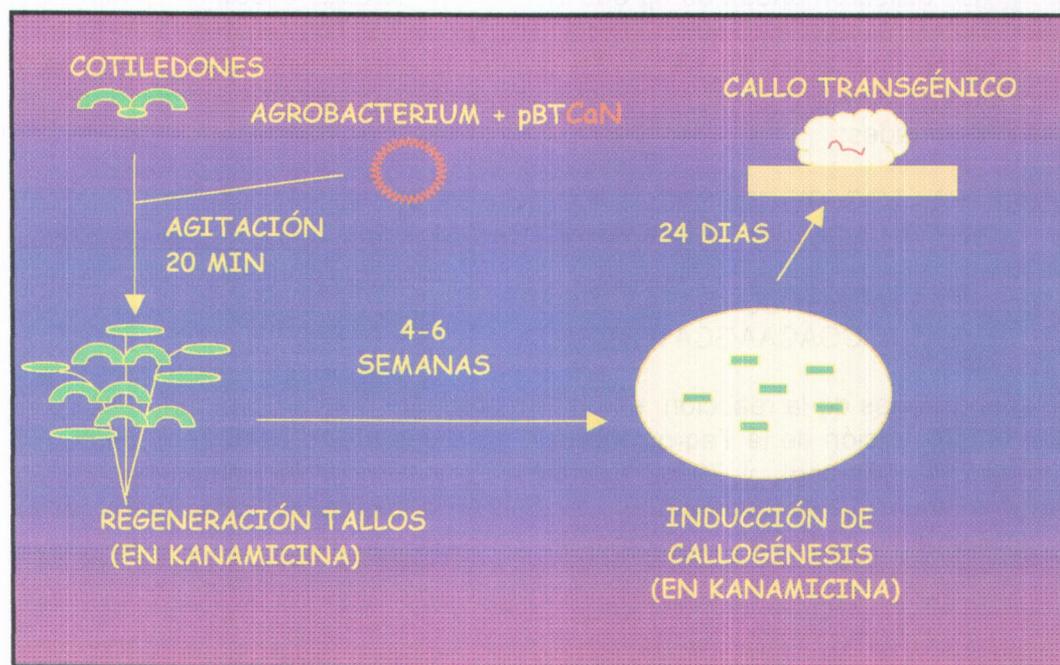


Figura 3. Etapas desde la Infección de los cotiledones de tomate con *A. tumefaciens* portando el plásmido pBTCAN, hasta la obtención de los callos transformados.

