

Universidad de Granada

Facultad de Ciencias

Tesis Doctoral

**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**

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

Memoria que presenta la licenciada en
Bioquímica M^a Carmen Marín Manzano
para optar al grado de Doctor

Fdo. M^a Carmen Marín Manzano

V^oB^o

Los Directores del trabajo

Fdo. Juan Pedro Donaire Navarro
Doctor en Farmacia
Profesor de Investigación del CSIC

Fdo. Cornelis Marinus Venema
Doctor en Ciencias Biológicas
Contratado programa Ramón y
Cajal (MICYT)

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.).

... a mis padres

... a mis herman@s

... a Manolo

Han sido tantas las personas tan importantes para mí a lo largo de este trabajo..., que, realmente, se me hace difícil seleccionar quienes y por qué han de estar presentes en estas letras.

No sería cortés dejar de mencionar en primer lugar a mis directores de tesis, Juan Pedro y Kees, quienes hicieron posible la realización de este extenso trabajo con su apoyo científico, moral y... económico, por supuesto. Claro que, y siguiendo con esta línea que he comenzado, no puedo olvidarme de personas tan importantes como ellos que forman parte de mi grupo, y que, como grupo que somos han contribuido a mi crecimiento científico y personal...Pilar, un reflejo de la lucha diaria y con la que he aprendido a sobrevivir en este mundillo; Conchi, la serenidad personificada, has sido un gran desahogo y aliento en mis momentos más duros sin olvidar, por supuesto, tu ayuda técnica con mis callos; Andrés,...umm de ti no sabría qué decir... ¡¡eres un pedazo de pan, muchas gracias!! Por supuesto a Anabel, siempre con tus ideas tan claras; y al nuevo becario, Fran, me apiado de ti...jeje, es broma, ¡ánimo colega!. También tengo un huequito para personas que han pasado por el labo y que ya no están; Loubna, Badea, Juani, Eva, Paula, Ernestina...así como, para la persona que diariamente viene a darnos los buenos días, alegrándonos la mañana... ¡¡que no me olvido de ti, Mariso!!.

Parte esencial en el periodo de rodaje de cualquier becari@ son sus compañer@s de reparto, que siguen, casi de la mano, tu mismo camino, compartiendo momentos de éxito, de fracaso, cafés, fiestas,...Carlota, Carlos, Laura, Ana Domínguez, Ana León, Rosa, Inma, Sergio, Dani, One, Jesús, Rebeca, Beatriz, Mónica, Marleni.... ¡¡ Como no !!, a mi incondicional trío...María, Quina y Patri.... amig@s que vienen de la carrera...Amada, Jose Angel, Marisa, Jose Carlos, Mª Carmen... ¡¡ siempre ahí, para todo el mundo, me habéis dado de pleno !!... y seguro que me dejo a gente pero a tod@s ell@s, ¡¡gracias!!.

Hay mucha gente muy especial fuera de este mundillo que me han aguantado, escuchado y apoyado durante estos largos años y que, en realidad, son parte de la tesis de mi vida....Moni, Yoli, M^a Angeles, Pablo, Rosi, Carlos...¡¡no esperaba menos chic@s!!.

Voy a terminar estas letras con la dedicación especial de esta tesis a mi padre, ¡¡si lo sabías, podías habérmelo dicho!!, a mi madre, de la que cada día aprendo más, ellos han formado parte de este proyecto de principio a fin, apoyándome en todo momento aún cuando las circunstancias apretaron. A Manolo, ¡¡te has tragado toda la bibliografía!!, no hay palabras que reflejen el agradecimiento a tus horas al ordenador y a tu paciencia. A mis herman@s Eva y Jose Miguel, y en especial a mi hermana Elena, que se inicia en el difícil pero fascinante camino de la tesis, ¡¡ adoro vuestro jaleo !!.

Me considero muy afortunada y rica al poder contar con el apoyo de tantas personas, por todo esto y mucho más, gracias a tod@s.

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
II. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS	3
A. EL PROBLEMA DE LA SALINIDAD EN PLANTAS	3
B. ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCIÓN DE CULTIVOS TOLERANTES AL NaCl	5
B.1. Importancia de la ingeniería genética	6
B. 2. Importancia del cultivo in vitro en el estudio de los mecanismos implicados en la tolerancia a la sal	7
C. EFECTOS NEGATIVOS DE LA SALINIDAD SOBRE EL CRECIMIENTO Y METABOLISMO DE LAS PLANTAS	8
D. PRINCIPALES MECANISMOS DE TOLERANCIA AL NaCl	10
D.1. Síntesis de solutos orgánicos compatibles	13
D.2. Mantenimiento de la homeostasis iónica: sistemas de transporte a través de las membranas celulares	14
D.2.1. Efecto del estrés salino sobre los transportadores primarios de H ⁺	16
D.2.2. Transportadores secundarios implicados en la entrada de Na ⁺ y Cl ⁻ en la célula	19
D.2.3. Transportadores de Na ⁺ . Exclusión y compartimentalización	22
E. PAPEL DE LA CALCINEURINA EN LA SEÑALIZACIÓN DE LA HOMEOSTASIS IÓNICA EN RESPUESTA AL ESTRÉS SALINO	24
E.1. Sistemas de transducción de señales implicados en la regulación de la homeostasis iónica y adaptación al estrés salino en plantas y levaduras	24
E.2. Estructura de la calcineurina	27
E.2.1. Subunidad catalítica de calcineurina. Calcineurina A	30
E.2.2. Subunidad reguladora de calcineurina. Calcineurina B	33
E.3. Papel fisiológico de la Calcineurina en levaduras	33
E.4. Proteínas con homología a calcineurina en plantas	37
E.5. La vía SOS en plantas	39
III. PLAN DE TRABAJO	43
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	45
A. MATERIAL VEGETAL	45
A.1. Cultivo in vitro de plántulas	45
B. CEPA BACTERIANA Y VECTORES PLASMÍDICOS	45

B.1. Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	47
B.1.1. Introducción	47
B.1.2. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con el plásmido pBTCan	50
C. OBTENCIÓN DE CALLOS DE TOMATE TRANSFORMADOS	50
C.1. Obtención de cotiledones transformados	50
C.1.1. Crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
C.1.2. Infección de los cotiledones	51
C.1.3. Inducción de la callogénesis y multiplicación de callos	51
C.2. Detección de CNAtr y CNB en los callos transformados	53
C.2.1 Extracción de ADN genómico	53
C.2.2. Amplificación por PCR	53
C.3. Estudio de la expresión de Calcineurina en los callos transformados	54
C.3.1. Extracción de ARN total	54
C.3.2. Obtención de un fragmento de ADNc por RT- PCR	54
C.3.2.1. Transcripción inversa del ARN	54
C.3.2.2. Amplificación por PCR	55
D. ESTUDIOS FISIOLÓGICOS	55
D.1. Determinación del crecimiento	55
D.2. Determinación del contenido mineral: sodio, potasio, calcio y cloruro	56
D.3. Actividad extractora de protones	57
D.3.1. Fundamento del método y cuantificación de la medida	57
D.4. Test de viabilidad celular: reacción fluorocromática (FCR)	58
E. ESTUDIOS A NIVEL DE MEMBRANAS	58
E.1. Obtención de microsomas	58
E.2. Purificación de vesículas de plasmalema	59
E.3. Actividades enzimáticas asociadas a las membranas purificadas	60
E.3.1. Actividad ATPasa	60
E.3.2. Actividad UDPasa latente	62
E.3.3. Actividad NADH cit c reductasa insensible a antimicina A	63

E.4. Determinación del transporte de H ⁺ en vesículas de membranas	63
E.5. Detección inmunológica de la H ⁺ -ATPasa de plasmalema	65
E.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	65
E.5.2. Electrotransferencia e inmunodetección de la H ⁺ -ATPasa de plasmalema	66
E.6. Estudio de la expresión de transportadores iónicos de membranas	67
E.6.1. Hibridación por Northern	67
E.6.1.1. Sondas de ADNc utilizadas	67
E.6.1.2. Extracción de ARN total de los callos	68
E.6.1.3. Marcaje de las sondas de ADNc con ³² P-dCTP por cebamiento al azar	69
E.6.1.4. Separación del ARN en geles desnaturalizantes de formaldehído	69
E.6.1.5. Transferencia del ARN a filtros de nylon	70
E.6.1.6. Condiciones de hibridación	70
E.6.1.7. Detección y cuantificación de los niveles de expresión génica	71
E.6.2. Estudios de expresión mediante RT-PCR en tiempo real	72
E.6.2.1. Obtención de ADNc a partir de ARN total por RT-PCR. Transcripción inversa del ARN	72
E.6.2.2. PCR en tiempo real	73
V. RESULTADOS	75
A. OBTENCIÓN DE CALLOS DE TOMATE TRANSGÉNICO	75
A.1. Regeneración de plántula a partir de cotiledones transformados con pBtCan	76
A.2. Obtención de callos a partir de tallos transformados	78
A.3. Análisis de la transformación	79
A.4. Morfología celular	81
B. ESTUDIOS FISIOLÓGICOS A NIVEL DE CALLOS	83
B.1. Crecimiento celular y análisis del contenido iónico	83
B.2. Extrusión de H ⁺ por las células de los callos disgregados	88

B.2.1. Determinación de la viabilidad celular durante el tiempo de medida de la actividad extractora H ⁺	92
C. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	96
C.1. Actividades de la H ⁺ -ATPasas a nivel de microsomas	96
C.1.1. Cantidad de proteína microsomal	97
C.1.2. Actividad fosfohidrolítica y transporte de H ⁺ dependiente de ATP	97
C.2. Actividades de la H ⁺ -ATPasas a nivel de plasmalema purificado	100
C.2.1. Purificación de la membrana plasmática	100
C.2.2. Actividad fosfohidrolítica y transporte de H ⁺ dependiente de ATP	104
C.3. Estudio de la expresión de bombas primarias y transportadores Secundarios	108
C.3.1. Hibridación Northern	108
C.3.2. PCR a tiempo real	110
VI. DISCUSIÓN	117
A. Obtención de un cultivo celular transgénico	118
B. Efecto de la sobreexpresión de calcineurina sobre la morfología y crecimiento de los callos	119
C. Efecto de calcineurina de levadura sobre la regulación de la homeostasis iónica en callos de tomate	120
D. Efecto de la expresión heteróloga de calcineurina sobre la tolerancia a sal	124
E. Posibles mecanismos de acción de la calcineurina de levadura en callos de tomate	129
VII. CONCLUSIONES	133
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
IX. ABREVIATURAS	165

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, la utilización del potencial genético de las plantas y la aportación de las técnicas de biología molecular han tenido un éxito limitado hasta el momento, debido, por una parte, a la complejidad de las características de resistencia, que ha resultado ser multigénica, y, por otra parte, al desconocimiento de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de tolerancia.

En relación a los mecanismos de tolerancia al NaCl, 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 glicofítica, mientras que las especies silvestres, mucho más tolerantes, presentan rasgos halofíticos. 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. Se ha demostrado que este transporte es dirigido por las bombas primarias (H^+ -ATPasas y H^+ -PPasa) y por los transportadores secundarios de iones (transportadores de K^+ y antiporte Na^+/H^+) a través del plasmalema y tonoplasto y que la salinidad inhibía, no afectaba e incluso estimulaba 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 este sentido, diversos estudios, a nivel celular y de planta entera, han permitido determinar factores de tolerancia al estrés salino, mediante la identificación de genes que codifican proteínas que intervienen en la regulación de la expresión génica y en la transducción de señales implicadas en la respuesta al estrés. 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 la homeostasis 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, sí 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.

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. Por ello, se ha investigado 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 función del estrés salino. Así mismo, indicar que para llevar a cabo estos objetivos 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 las 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). Todo esto justifica 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.

La salinidad de los suelos está mayoritariamente determinada por el NaCl y también, aunque en menor grado, por otras sales como Na_2SO_4 , CaSO_4 , MgCl_2 y Na_2CO_3 (Epstein y Rains 1987). El crecimiento de las plantas se afecta negativamente cuando la concentración de sales alcanza un valor umbral, a partir del 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.

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

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. 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 día reglamentos específicos de cultivo y producción integrada bajo abrigo (Belda y Lastres 2000). La principal razón de estos cambios en las condiciones de cultivo ha sido la existencia 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 sí 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 las distintas especies y variedades de tomate presentan una tolerancia diferencial a la salinidad, abarcando un amplio rango de sensibilidad al estrés por este factor. Los parámetros de crecimiento más afectados por el estrés salino son la altura del tallo y el crecimiento de la hoja (Dehan y Tal, 1978; Shannon, 1984; Cuartero y col., 1992; Perez-Alfocea y col., 1993; Cano y col., 1996; Santa-Cruz y col., 1999).

B. ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCIÓN DE CULTIVOS TOLERANTES AL NaCl

Para disminuir el impacto de la salinidad en la agricultura se han 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 la 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, como la adaptación a diferentes concentraciones de NaCl, 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).

B.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 proteínas con funciones concretas pueda contribuir cualitativamente al incremento de un rasgo tan complejo como la tolerancia a la sal (Yeo, 1998). Así, se han obtenido resultados positivos con la expresión de genes procedentes de organismos no vegetales (bacterias o levaduras) (Tarszcinsky 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., 2002b; 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), que pueden incrementar la tolerancia controlando diferentes características fisiológicas como por ejemplo la homeostasis iónica y osmótica (Pardo y col., 1998; Zhu, 2001; Shi y col., 2002b; Nagaoka y Takano, 2003). En este sentido, se ha demostrado que la expresión en levadura de genes de plantas con posible implicación en la tolerancia al estrés salino,

como la expresión del extremo N-terminal de los genes SLT1 de tabaco y *Arabidopsis* en el mutante de levadura deficiente en calcineurina B, suprime el fenotipo de sensibilidad a la sal (Matsumoto y col., 2001). Asimismo, 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, mejora y producción de plantas más tolerantes. No cabe duda de 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.

B.2. Importancia del cultivo *in vitro* en el estudio de los mecanismos implicados en la tolerancia a la sal.

Los hechos expuestos han inducido a la necesidad de utilizar, tanto aproximaciones fisiológicas como biotecnológicas para la selección de plantas tolerantes al NaCl, así como de técnicas de cultivo de tejidos y células. Las ventajas potenciales de las técnicas de cultivo *in vitro* para el estudio de la tolerancia a la salinidad, incluyen: la caracterización, a nivel celular, de marcadores fisiológicos asociados con la tolerancia a la sal; la capacidad de manipular, de manera precisa, las condiciones ambientales y del medio de cultivo (Epstein y Rains, 1987), así como la facilidad de manipulación genética y caracterización del transgen introducido en el cultivo (Marín-Manzano y col., 2001).

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, tomate y *Cymbopogon martinii* se adaptan al NaCl acumulando iones Na^+ y Cl^- (Binzel y col., 1987; Sabbah y Tal, 1990; Patnaik y Debata, 1997; Rodríguez-Rosales y col., 1999; Kerkeb y col., 2001a). En general, los estudios a nivel celular indican que uno de los factores más importantes en la tolerancia es el equilibrio del contenido en Na^+ y K^+ (Zhong y Laüchli, 1994; Rubio y col., 1995; Shannon y Nobles, 1995; Datta y col., 1996; Rodríguez-Rosales y col., 1999; Kerkeb y col., 2001a y b).

C. EFECTOS NEGATIVOS DE LA SALINIDAD SOBRE EL CRECIMIENTO Y METABOLISMO DE LAS PLANTAS

El efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas se debe a la combinación de tres factores (Greenway y Munns, 1980, Shannon y col., 1994): a) el estrés osmótico causado por el potencial hídrico más negativo del medio externo (hiperosmótico), b) la toxicidad iónica específica asociada normalmente a la excesiva absorción de iones Na^+ y Cl^- , c) 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 y col., 2003; Halperin y col., 2003).

Este efecto negativo de la salinidad da lugar, en plantas más o menos sensibles, a un rango de respuestas como la reducción del turgor, inhibición de la división y expansión celular, desorganización de las membranas, inhibición de determinadas actividades enzimáticas, interferencia del Cl^- con los sitios aniónicos implicados en el ligamiento de ARN y de metabolitos aniónicos como bicarbonatos, carboxilatos y azúcares fosfatos, interferencia del Na^+ con los sitios catiónicos implicados en el ligamiento de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} y otros metabolitos claves para la planta, producción de

radicales libres, disminución de la fotosíntesis e inducción de deficiencias iónicas (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). Por otra parte, 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).

En condiciones de altas concentraciones salinas externas, 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). Algunos de estos enzimas pueden ser especialmente sensibles a concentraciones bajas de Na^+ y Cl^- , de forma que la inhibición de su actividad puede ser determinante de la sensibilidad al estrés salino. 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). Por otra parte, se ha postulado que la rápida acción tóxica del estrés salino sobre las membranas podría provenir del desplazamiento por el Na^+ de los iones Ca^{2+} asociados a la membrana plasmática y 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). También 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+} a través del influjo de Ca^{2+} desde el exterior, mediando la adaptación al estrés iónico e induciendo la vía de transducción de señales mediada por calcineurina (Matsumoto y col., 2002). (Ver apartado E).

D. PRINCIPALES MECANISMOS DE TOLERANCIA AL NaCl

El estrés salino afecta a diversos aspectos de la fisiología y metabolismo de las plantas, provocando 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 dicha respuesta (Hasegawa y col., 2000; Zhu, 2001 y 2002). Una respuesta adaptativa engloba tres aspectos bien diferenciados: a) reajuste de la 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 las vías de señalización inducidas por el estrés salino son cambios iónicos, como el exceso de Na^+ , y osmóticos, como pérdida de turgor en respuesta a la deshidratación. Por otro lado, las señales de detoxificación derivan directamente del daño provocado por el estrés, debido a

la producción de especies activas de oxígeno y a la desnaturalización de proteínas. Las señales provocadas por el estrés iónico y osmótico y la detoxificación, podrían regular directamente el crecimiento (Xiong y Zhu, 2001), a través de la inhibición de la expansión y división celular, actuando sobre ciclinas dependientes de kinasas y otros componentes del ciclo celular u hormonas que regulan el crecimiento (Zhu, 2001).

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):

1) El mantenimiento del equilibrio osmótico en relación con el medio externo mediante la síntesis de solutos orgánicos compatibles (prolina, sacarosa, azúcares, etc.) y la acumulación de iones en la vacuola.

2) El control de la absorción de iones y su compartimentación intracelular para mantener la homeostasis iónica, de manera que las concentraciones de iones en el citoplasma se mantengan 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.

3) 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 Zhu, 2002; Zhu, 2002).

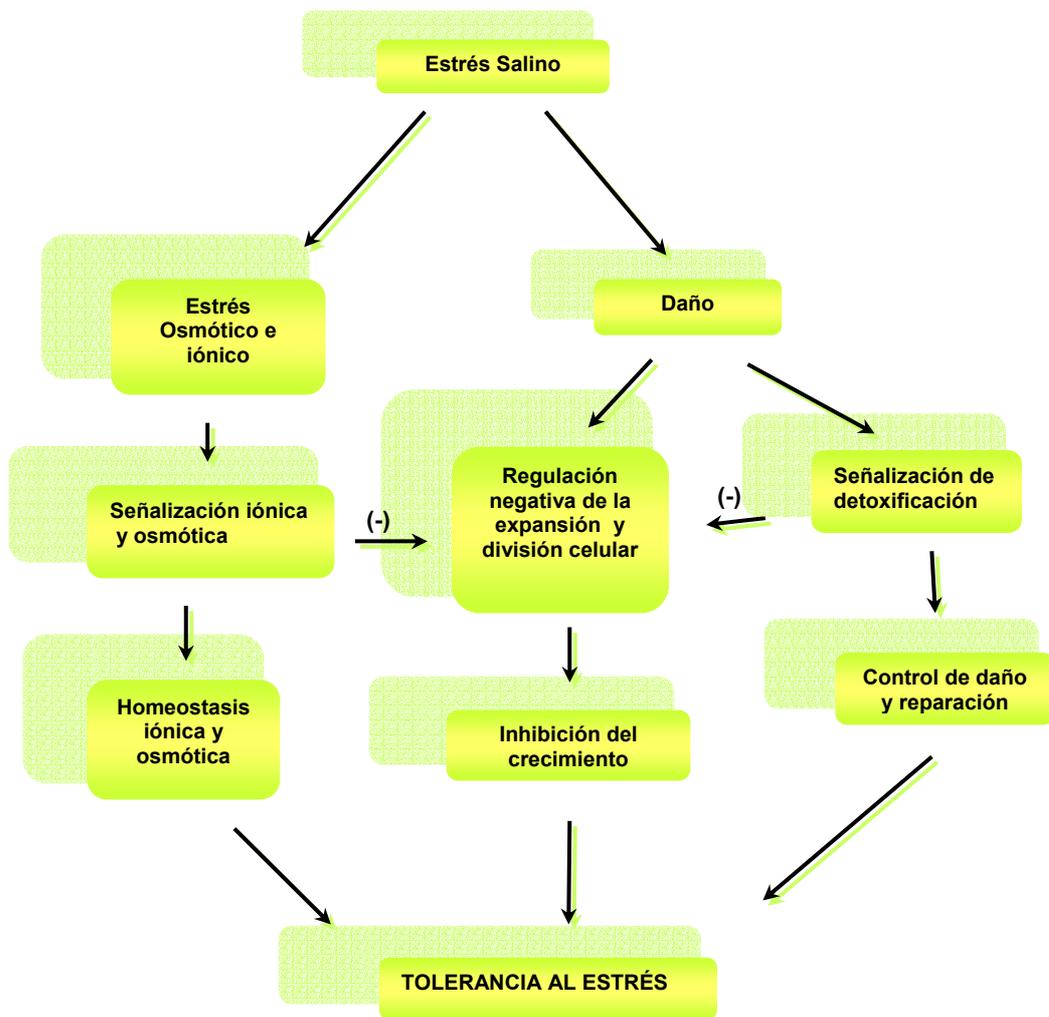


Figura 1. Diferenciación de las vías de señalización del estrés salino (Zhu, 2002).

Para mantener la turgencia celular y prevenir la toxicidad iónica en condiciones de salinidad, las plantas pueden adoptar dos tipos de respuestas adaptativas (Greenway y Munns, 1980; Jeschke, 1984; Cheeseman, 1988). Por un lado, las especies halófitas generan turgencia celular incrementando las concentraciones internas de Na^+ y Cl^- (Niu y col., 1995; Nelson y col., 1998; Hasegawa y col., 2000), mientras que 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. Sin embargo, estudios recientes demuestran que muchas plantas halófitas y glicófitas toleran la salinidad por estrategias similares. Puesto que el citosol y la mayoría de los orgánulos de las células de plantas halófitas y glicófitas son igualmente sensibles al Na^+ y al Cl^- , el ajuste osmótico es llevado a cabo en estos compartimentos por la acumulación de osmolitos y osmoprotectores (Yokoi y col., 2002). Al mismo tiempo, Na^+ y el Cl^- son eficientes osmolitos para el ajuste osmótico y son compartimentados en la vacuola para minimizar su citotoxicidad. (Blumwald y col., 2000; Hasegawa y col., 2000; Zhu, 2002).

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

D.1. Síntesis de solutos orgánicos compatibles

El estrés hídrico causado por el componente osmótico de la salinidad, y que es común a otros estreses como la sequía, conlleva 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 generalmente responden a la pérdida del turgor restableciendo el equilibrio osmótico mediante la síntesis de osmolitos compatibles con la actividad de los enzimas e incrementando su estabilidad. Entre ellos encontramos 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).

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

La homeostasis iónica a nivel intracelular depende en último término de los sistemas de transporte ubicados en las membranas celulares, específicamente, la membrana plasmática y la membrana vacuolar (Figura 2). 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 membrana (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 externa 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 antiportadores (en dirección opuesta).

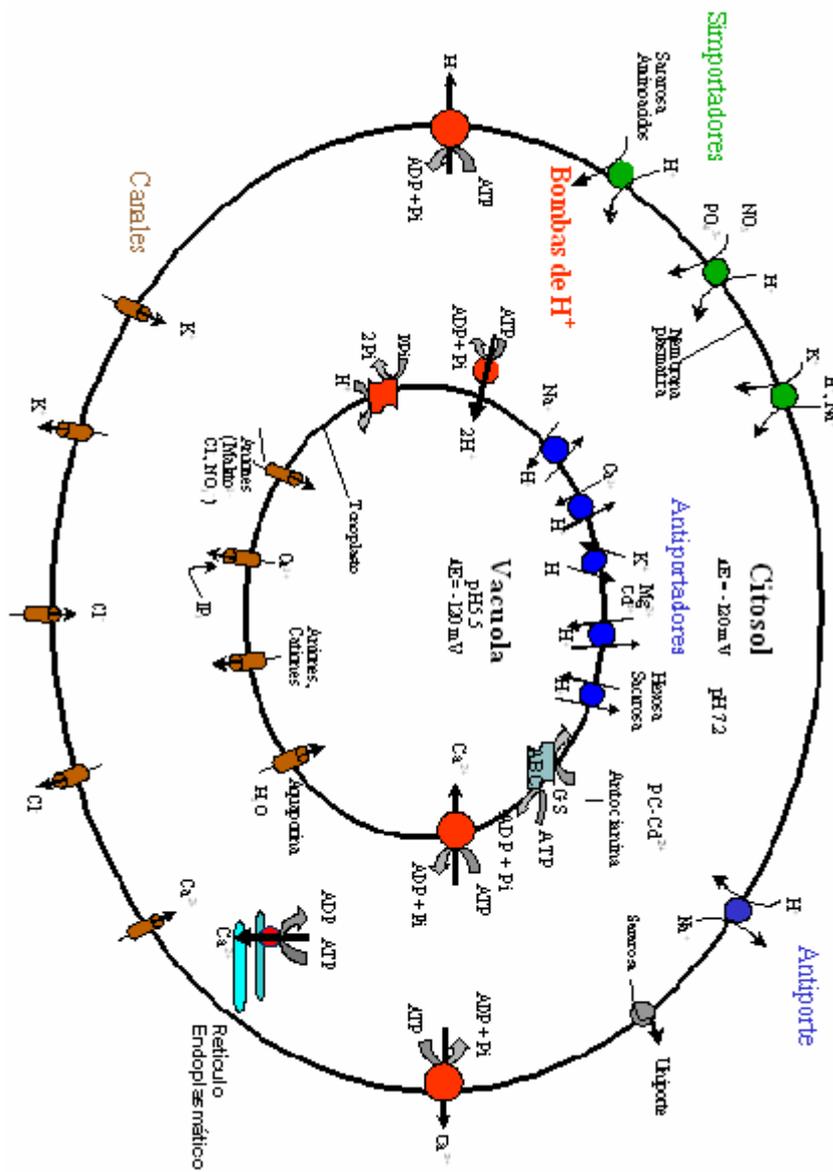


Figura 2. Esquema general de los distintos sistemas de transporte primario y secundario localizados en la membrana plasmática y tonoplasto de una célula vegetal simplificada. Tomado de Poole (1998).

Como se indica en la Figura 2, 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 fuerza motriz para el transporte de diferentes solutos (cationes, aniones, azúcares y otras sustancias), mediante 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).

D.2.1. Efecto del estrés salino sobre los transportadores primarios de H^+

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 la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática en la tolerancia a la salinidad, como fuente de energía para este transporte iónico.

A pesar de los progresos en el análisis de los mecanismos de activación de esta enzima a nivel molecular, 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 general, las plantas halófitas exhiben mayores niveles de transcrito y/o actividad H^+ -ATPasa que las glicófitas (Niu y col., 1995; Rausch y col., 1996), y 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, la confirmación del importante papel que puede jugar esta H^+ -ATPasa de plantas en la tolerancia a la sal ha venido del estudio 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 en 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 el control del eflujo de Na⁺ a través de las membranas (Palmgren y Harper, 1999; Vitart y col., 2001).

Por otra parte, un cambio conformacional que implique fosforilación y unión de proteínas 14-3-3, induciendo un estado activado con una mayor razón de acoplamiento H⁺ transportado/ATP hidrolizado (Baunsgaard y col. 1996, Morsomme y col. 1996, Palmgren 2001), podría explicar el incremento de la razón de acoplamiento de H⁺/ATP en plasmalema de raíz de girasol (Ballesteros y col., 1998), la activación de la H⁺-ATPasa de plasmalema de *Spartina patens* (Wu y Seliskar, 1998) y de células de tabaco (Reuveni y col., 1993), bajo condiciones salinas. En este sentido, en callos de tomate estresados con 100 mM de NaCl, se incrementó la extrusión y transporte *in vitro* de H⁺, pero no la hidrólisis de ATP, al tiempo que se encontró mayor cantidad de proteína 14-3-3 pero no de H⁺-ATPasa, lo que indicaba que el estrés salino podía activar el acoplamiento entre la hidrólisis de ATP y el transporte de H⁺ *in vitro* a través de la fosforilación de la ATPasa, resultando en la formación de complejos 14-3-3/H⁺-ATPasa en la membrana plasmática (Kerkeb y col., 2002).

En cuanto al tonoplasto, esta membrana contiene dos bombas electrogénicas de H⁺, la H⁺-ATPasa (V-ATPasa) y la pirofosfatasa (H⁺-PPasa) vacuolar, siendo la V-ATPasa, tanto en actividad como en cantidad, la bomba mayoritaria (Dietz y col., 2001). El hecho de que el control de las concentraciones intracelulares de iones y su acumulación en vacuola para el ajuste osmótico sea clave en la tolerancia a la salinidad, sugiere un importante papel para estas enzimas en la tolerancia a este factor ambiental (Niu y col., 1995; Serrano, 1996; Mansour y col., 2003). Así, se ha demostrado que plantas de comportamiento halófito 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).

Parece ser un fenómeno general el incremento de la actividad de la V-ATPasa por los tratamientos salinos. Así, se ha observado que en células de tabaco adaptadas al NaCl, tanto la actividad transportadora de H⁺ como la actividad 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 Chung, 1988). También en *Mesembryanthemum 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 (Golldack y Dietz, 2001). Por otra parte, aunque el estrés salino no produjo cambios en la expresión de la V-ATPasa en hojas de plantas jóvenes de *Mesembryanthemum crystallinum*, que son sensibles a la sal, sí incrementó los niveles de transcrito en hojas de la planta madura (Golldack y Dietz, 2001). En cambio, en la variedad sensible de trigo, el NaCl redujo la actividad V-ATPasa y la cantidad de proteína (Wang y col., 2000).

Existen varios indicios de un incremento de la razón H⁺ extruídos/ATP hidrolizado por la V-ATPasa de tonoplasto en respuesta al estrés salino. En raíces de cebada (Dupont, 1992), en suspensiones celulares de zanahoria tratadas con 100 mM NaCl (Löw y col., 1996), y en raíces de girasol tratadas con 75 y 150 mM NaCl (Ballesteros y col., 1996, 1997), la actividad transportadora de H⁺ incrementó de 1 a 3 veces, sin cambio en la actividad fosfohidrolítica. Para explicar estos hechos, Dupont (1992) y Ballesteros y col. (1996) postularon que el estrés salino podía incrementar la razón de acoplamiento entre el transporte de H⁺ y la hidrólisis de ATP, que implicaría la síntesis de isoformas de ATPasa específicas frente al estrés. Este mecanismo ha sido descrito en levadura, donde la razón entre el transporte de H⁺ y la hidrólisis de ATP de la V-ATPasa depende de la presencia de las isoformas de la subunidad A, VPH1 o STV1 en el complejo de la V-ATPasa (Kawasaki-Nishi y col. 2001).

Vista la presencia de otra bomba de H⁺ mayoritaria en el tonoplasto, la función de la H⁺-PPasa se entiende como una alternativa a la energización de esta membrana en caso de ser insuficiente la acidificación por la V-ATPasa, una situación que podría tener especial relevancia en condiciones de estrés (Sze y col., 1999). Así, en respuesta al estrés salino se ha detectado una inhibición *in vivo* e *in vitro* de la actividad de esta enzima en raíces de

Vigna radiata (Nakamura y col., 1992), *Messembryanthemum crystallinum* (Bremberger y Lüttge, 1992), raíces de cebada (Matsumoto y Chung, 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), 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). El hecho de que la sobreexpresión de la H⁺-PPasa vacuolar (AVP1) de *Arabidopsis thaliana* confiera tolerancia a la salinidad a mutantes de levadura *ena1* (con supresión 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, junto con la V-ATPasa vacuolar, actúan en concierto con dichos transportadores secundarios para secuestrar iones en este compartimento (Gaxiola y col., 1999). En este sentido, el mantenimiento del gradiente electroquímico de H⁺ por la PPasa y V-ATPasa, 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; Ballesteros y col., 1996 y 1997; Binzel y Ratajczak, 2002; Mansour y col., 2003).

D.2.2. Transportadores secundarios implicados en la entrada de Na⁺ y Cl⁻ en la célula

La existencia de altas concentraciones de NaCl en el medio extracelular en combinación con el potencial de membrana positivo exterior, determina el establecimiento de un fuerte gradiente electroquímico de Na⁺ entre el interior y el exterior celular que conlleva la entrada de este catión en la célula vegetal, alterando los procesos de absorción de otros iones como el K⁺ (Hasegawa y col., 2000; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Zhu, 2001; Ward y col., 2003). En la célula vegetal, las concentraciones citoplasmáticas 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. La inexistencia de canales selectivos de Na⁺, la constatación de una

interacción entre la absorción de K^+ y Na^+ y la existencia de similitudes fisicoquímicas entre Na^+ y K^+ , han sugerido que el Na^+ puede entrar en la célula vegetal 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 (K_m de 10-30 μM) 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., 2000).

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, *Voltage Independent Channels*). Los canales de K^+ en dirección hacia el interior son altamente selectivos para el K^+ , pero algunos 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, 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). Sin embargo, se desconoce su mecanismo de regulación y la identidad molecular de los mismos. Recientemente, se ha identificado en trigo un gen que codifica un transportador de cationes de baja afinidad (LCT1), cuya expresión en un mutante de levadura deficiente en antiportadores de Na^+ , produce un fenotipo de hipersensibilidad al NaCl

resconstituyéndose el crecimiento con la adición de altas concentraciones de K^+ y Ca^{2+} al medio salino (Schachtman y Liu, 1999; Amtmann y col., 2001).

Los transportadores de alta afinidad juegan un papel clave en la adquisición de K^+ y en la selectividad K^+/Na^+ . Entre ellos encontramos la familia KUP/HAK, cuya afinidad depende de la concentración de K^+ en el medio (Rubio y col., 2000; Rigas y col., 2001). Uno de los sistemas con mayor relevancia para la entrada de Na^+ en la célula es HKT1, originalmente identificado en trigo como un simporte K^+/H^+ y que parece catalizar tanto el simporte K^+-Na^+ , cuando el Na^+ está a concentración μM , como el simporte Na^+-Na^+ , cuando el Na^+ está a concentración mM (Schachtman y Schroeder, 1994; Rubio y col., 1995; Schachtman y Liu, 1999).

Se han encontrado homólogos de HKT1 en cebada (Wang y col., 1998), arroz (Gollak y col., 1997) y *Arabidopsis* (Schachtman y Schroeder 1994). Mientras AtHKT1 es único en *Arabidopsis*, en arroz existen entre siete y nueve genes. En contraste con HKT1 de trigo, AtHKT1 funciona como sistema de absorción de Na^+ específico o de K^+ de baja afinidad no acoplado al transporte Na^+ (Uozumi y col. 2000). La función de AtHKT1 en *Arabidopsis* como efector del influjo de Na^+ ha sido confirmada por Rus y col., (2001a), que han aislado mutantes con inserciones de T-ADN en AtHKT1 que suprimían el fenotipo mutante sos3-1 de hipersensibilidad al NaCl (Liu y Zhu, 1997; Rus y col., 2001a). 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^+ . Posteriormente se demostró que mutaciones en AtHKT1 que parcialmente inactivan la enzima, provocan sensibilidad a estrés salino por una reducida recirculación de Na^+ por el floema que ocasiona acumulación de este ión en la parte aérea (Berthomieu y col., 2003). También las isoformas OsHKT1 y OsHKT4 representan transportadores de Na^+ de alta y baja afinidad, respectivamente, sensibles al Ba^{2+} y K^+ (Garcia-deblás y col., 2003).

D.2.3. Transportadores de Na⁺: exclusión y compartimentación

Evidencias bioquímicas han llevado a postular la existencia de sistemas antiporte Na⁺/H⁺ en tonoplasto y plasmalema de diferentes especies, los cuales dependen, de forma coordinada y asociada, del establecimiento de un gradiente electroquímico de H⁺ generado por las bombas primarias de H⁺ (Blumwald y col. 2000). Recientemente se han identificado los primeros genes de antiportadores Na⁺/H⁺ de plantas (Gaxiola y col. 1998, Shi y col. 2000). Respecto al mecanismo del eflujo de Na⁺ a través del plasmalema, 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. Además, la sobreexpresión de este gen en *Arabidopsis* produce plantas con mayor grado de tolerancia a la sal (Shi y col., 2003a). 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 Ca²⁺ de tipo “EF-hand” (Hasegawa y col., 2000; Sanders, 2000; Zhu, 2000, 2001 y 2003; Liu y col., 2000; Shi y col., 2000, 2002b y 2003b). Se ha sugerido que la vía de traducción de señales mediado por SOS2 y SOS3 constituye el homólogo funcional de la vía de calcineurina en levadura (Ver apartado E.5).

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. El proyecto de secuenciación del genoma de *A. thaliana* ha permitido la identificación 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 (Apse y col., 1999; Zhang y Blumwald, 2001). 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). Estudios recientes, ponen de manifiesto que AtNHX1 transporta K^+ con igual afinidad que Na^+ , y en menor medida Li^+ (Zhang y Blumwald 2001, Venema y col. 2002). Estos resultados sugieren la implicación de esta proteína 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). La familia de los AtNHX se compone de 6 miembros AtNHX1-6 (Yokoi y col 2002b) Los niveles de transcrito de AtNHX1 y 2 incrementan de forma similar con estrés salino y osmótico o ABA, pero AtNHX5 solo se incrementa en respuesta al NaCl.

En tomate (*Lycopersicon esculentum*) se han identificado las isoformas LeNHX1 y LeNHX2 (Venema y col., 2003). La isoforma LeNHX2 queda próxima a AtNHX5 y complementa al fenotipo sensible a sal e higromicina del mutante de levadura carente de ScNHX1, afectándose fuertemente la concentración de K^+ en compartimentos intracelulares en condiciones de estrés salino. Estudios de la actividad de LeNHX2 *in vitro* han revelado que se trata de un antiportador K^+/H^+ y no Na^+/H^+ . Estos datos ponen de manifiesto la importancia de una adecuada regulación de la homeostasis de K^+ y/o H^+ a través de este tipo de antiportadores en compartimentos intracelulares en condiciones de estrés salino. En plantas de tomate tratadas con 130 mM de NaCl se observó un rápido incremento de los niveles de este antiportador en hojas, aunque en tallos y raíces su expresión resultó ser constitutiva, (Venema y col., 2003). La localización de AtNHX1 y de AtNHX2 en el tonoplasto ha sido demostrada por Yokoi y col. (2002), mientras que AtNHX5 y LeNHX2 parecen localizarse en la membrana del Aparato de Golgi (Venema y col. 2003, Cubero B, comunicación personal).

Las proteínas NHE, los homólogos estructurales en animales de las proteínas NHX de plantas, están sujetas a una estricta regulación por factores fisiológicos y hormonales a través de la interacción del extremo c-terminal citosólico con proteínas reguladoras (Orlowski y Grinstein, 1997; Counillon y Pouysségur, 2000). A este respecto, se ha observado que la proteína kinasa SOS2, intermediario en la vía de traducción SOS, también activa a la proteína AtNHX1 (Qiu y col., 2003). Sin embargo, se ha

sugerido que el extremo c-terminal de la proteína AtNHX1 está localizado en el lumen de la vacuola, indicando que, en plantas, la regulación por SOS2 es a través de otros dominios. El extremo c-terminal estaría implicado en la determinación de la especificidad Na^+/K^+ del antiportador (Yamaguchi y col., 2003)

En lo que respecta a la absorción de Cl^- , la diferencia de potencial que se establece a través de la membrana plasmática 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). 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) o transportadores (Rea y Sanders, 1987) ubicados en el tonoplasto, siendo la compartimentación vacuolar de Cl^- una adaptación esencial en la tolerancia al NaCl (Niu y col., 1995).

E. PAPEL DE LA CALCINEURINA EN LA SEÑALIZACIÓN DE LA HOMEOSTASIS IÓNICA EN RESPUESTA A ESTRÉS SALINO

Como ya se ha indicado, el principal objetivo de esta tesis ha sido el estudio del efecto de la sobreexpresión de calcineurina de levadura sobre la homeostasis iónica en callos de tomate. Aunque en levadura la calcineurina es un intermediario central en la vía de transducción de la señal de estrés salino al regular la homeostasis de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y H^+ , no se ha identificado en plantas un homólogo estructural de esta proteína. Sin embargo, existen muchas similitudes en la respuesta al estrés salino entre levadura y plantas superiores, que apoyan la existencia de vías de transducción de la señal de estrés salino funcionalmente homólogas entre ambos organismos.

E.1. Sistemas de transducción de señales implicados en la regulación de la homeostasis iónica y adaptación al estrés salino en plantas y levaduras

La adaptación al estrés salino implica la modificación de las actividades del conjunto de transportadores anteriormente descrito, capaz de ajustar la homeostasis iónica a las nuevas condiciones. La señalización de la respuesta al estrés salino en plantas incluye una serie de vías dependientes e independientes del ácido abscísico,

varios factores de transcripción (tipo MyC, bZIP y AP2, MyB, HD-Zip) y elementos de promotores como ABRE (*Abscisic Acid Responsive Element*), y DRE, (*Drought Responsive element*) (Serrano y Rodríguez-Navarro 2001; Xiong y Zhu 2001). Aunque han sido identificados, a nivel molecular, un gran número de transportadores del eflujo o influjo de iones, se desconocen muchas de las vías de traducción de señal implicadas en la regulación de sus actividades que determinan la homeostasis iónica (Serrano y Rodríguez Navarro 2001; Xiong y Zhu 2001). En células eucariotas, las señales que inician la respuesta adaptativa al estrés incluyen cambios de turgor, detectados por proteínas de membrana, y cambios en la concentración intracelular de cationes, como K^+ , Na^+ o Ca^{2+} , o pH, detectado por proteínas del citosol (Serrano y col., 1996). Los componentes implicados en la traducción de las señales de estrés incluyen, en primer lugar, los receptores de la señal, como canales activados por estrés mecánico, sistemas de traducción de señal de dos componentes sensor-respuesta, como las Histidina-kinasas, sensibles al estrés osmótico, o kinasas con similitud a receptores (*Receptor-Like kinases*, RLK's) y receptores asociadas a proteínas G (GPCR) (Haro y col. 1993; Wurgler–Murphy y Saito, 1997; Márquez y Serrano 1996; Xiong y Zhu 2001). En plantas, han sido identificadas y parcialmente caracterizadas proteínas con homología a este tipo de receptores de bacterias, hongos y animales, aunque su papel en la percepción del estrés ambiental, aplicando estudios genéticos, no ha sido establecido con exactitud (Serrano y Rodríguez-Navarro 2001, Xiong y Zhu 2001). En segundo lugar, la transmisión de la señal implica cascadas de MAP kinasas activadas por estrés osmótico, kinasas generales como la proteína quinasa A o kinasas activadas por Ca^{2+} o calmodulina y la proteína fosfatasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina, calcineurina (Márquez y Serrano 1996; Mendoza y col. 1994; Nakamura y col 1993; Hasegawa y col 2000). Estas kinasas y fosfatasas afectan, a su vez, al estado de fosforilación de factores de transcripción que regulan la cantidad de los transportadores iónicos implicados en la homeostasis iónica y osmótica (Kwon y Handler, 1995; Proft y Serrano, 1999; Matheos y col, 1997; Mendizábal y col., 1998). Por otro lado, como se ha descrito anteriormente, la actividad de los transportadores iónicos puede estar regulada directamente por mecanismos de fosforilación y desfosforilación, mientras que otros mecanismos de modificación postraduccionales como glicosilación, miristoilación, lipidación o metilación también pueden afectar a la traducción de la señal o a la actividad de los transportadores (Xiong y Zhu 2001). Además, existen mecanismos de regulación que implican proteínas

adaptadoras (scaffolds), iniciando la formación de complejos entre los componentes de vías de traducción de señal, regulando, de esta forma, la especificidad de las respuestas (Xiong y Zhu 2001).

En levadura, al menos dos vías de traducción de señal están implicadas en la adaptación al estrés iónico y osmótico. La vía HOG (*High Osmolarity Glycerol*) es el principal responsable de la adaptación osmótica. Esta vía HOG, con el intermediario central Hog1p, una MAP Kinasa (*Mitogen Activated Protein Kinase*), se inicia por la percepción de un estrés osmótico por las proteínas Sln1p o Sho1p, y tiene como resultado la activación de la transcripción de *GDP1*, implicado en la síntesis de glicerol (Wurgler–Murphy y Saito, 1997) y de otras proteínas como la bomba de Na^+ , ENA1 (Márquez y Serrano, 1996.). Por otra parte, la vía de Calcineurina, activada al menos en algunos casos por un aumento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático a través del influjo desde el exterior por un canal inducible por estrés osmótico Cch1p-Mid1p (Matsumoto y col. 2002), es el principal regulador de la homeostasis iónica (Serrano y col. 1999).

En plantas, existen evidencias de la existencia de una vía de transducción de señales regulada por histidina kinasas y MAP kinasas con similitud a la vía HOG de levadura. La histidina kinasa AtHK1 de *Arabidopsis* complementa funcionalmente a Sln1p de levadura (Urao y col., 1999), y una MAP Kinasas de guisante, PsMAPK, que complementa parcialmente a Hog1p. Además, las MAP Kinasas de alfalfa (SIMK), (Munnik y col., 1999), tabaco (SIPK), (Mikolajczyk y col., 2000) y *Arabidopsis* (AtMPK4 y ATMPK6) (Ichimura y col. 2000) se activan por estrés salino.

Por otra parte, se ha demostrado en plantas que, al igual que en levadura, el estrés salino induce 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). La modulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, probablemente esté mediado por la generación de segundos mensajeros como inositol trifosfato, ABA y especies de oxígeno reactivas (Pical y col., 1999; DeWald y col., 2001). Un mecanismo de liberación de Ca^{2+} de la vacuola parece ser mediada por la producción del segundo mensajero inositol trifosfato (Knight y col 1997; Drobak y col., 2000). En cultivos celulares

de *Arabidopsis* se observó un rápido incremento de la fosfolipasa C, enzima que hidroliza fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) (DeWald y col., 2001), y a partir de este fosfolípido se incrementan los segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) y inositol trifosfato (IP₃), que activan a proteína kinasa C, disparando la liberación de Ca²⁺ (Xiong y col., 2002). Otros mecanismos que favorecen la liberación de Ca²⁺ consisten en la activación de canales de Ca²⁺ de la membrana plasmática (Blatt, 2000), mientras que las ATPasas de Ca²⁺ y los antiportadores Ca²⁺/H⁺, CAX, garantizan la restauración de la homeostasis de este catión (Hirschi, 1999). En plantas, la señal de Ca²⁺ es percibida por CDPKs, proteínas kinasas dependientes de Ca²⁺, con dominios de unión a Ca²⁺ y dominio kinasa, única en plantas (Harmon y col., 2001; Luan y col., 2002; White y Broadley, 2003), o por subunidades sensoras de Ca²⁺, como calmodulina o las proteínas CBL, proteínas con cierta homología a la calcineurina B (*calcineurin B-like*). Estas proteínas CBL parecen interactuar con proteína kinasas (CIPK) y no con una fosfatasa homóloga de calcineurina (Liu y col 2000, Halfter y col 2000, Kudla y col 1999, Shi y col 1999). Sin embargo, se ha demostrado que la expresión de calcineurina de levadura en plantas mejora la resistencia a sal (Pardo y col 1998), lo que indica que la regulación por fosfatasas en plantas también es funcional (ver apartado E4).

E.2. Estructura de la calcineurina

Calcineurina es una proteína fosfatasa dependiente de Ca²⁺ y calmodulina, requerida para la transducción de las señales de estrés dependientes de Ca²⁺ 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. Se trata de una proteína heterodimérica 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 5).

CALCINEURINA: fosfatasa de tipo 2B

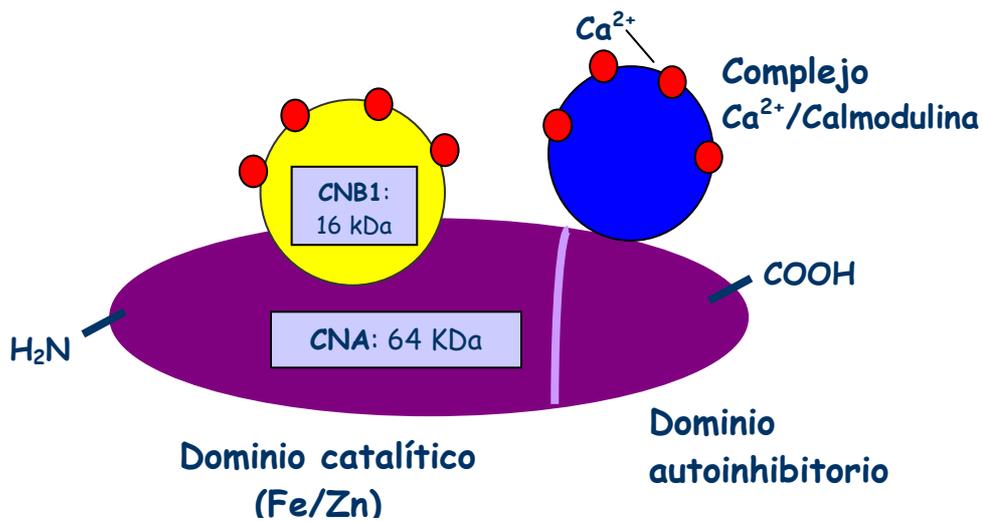


Figura 5. Representación del complejo de calcineurina. CNA, subunidad catalítica; CNB, subunidad reguladora; círculos rojos, átomos de Ca²⁺, H₂N y COOH, extremos amino y carboxiloterminales de la secuencia de aminoácidos.

Calcineurina 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 en estudios posteriores, 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 (Stewart y col., 1982 y 1983).

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 ellas 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; Cárdenas y Heitman, 1995; Rao y col., 1997), en la respuesta a la morfogénesis cardíaca y en la 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).

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 (Saitoh 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 de tipo 1 (PP1), una proteína fosfatasa de 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), distinguiéndose 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). Asimismo estas fosfatasas se distinguen por el

requerimiento de cationes divalentes para su actividad *in vivo*, y por el sustrato que desfosforilan. Mientras que las fosfatasa tipo 1 desfosforilan la subunidad β de las proteínas kinasas, las de tipo 2 desfosforilan la subunidad α (Cohen, 1989). Se sugiere que calcineurina, al tratarse de la única proteína fosfatasa conocida regulada específicamente por Ca^{2+} y calmodulina, 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.

E.2.1. 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 en *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene entre 63 y 69 kDa (Cyert y col., 1991; Liu y col., 1991; Ye y Bretscher, 1992) y 64 kDa en *Schizosaccharomyces pombe* (Yoshida y col., 1994; Plochocka-Zulinska 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 6S).

Mediante proteólisis limitada de la subunidad catalítica con clostripaína, una proteasa específica para arginina, Hubbard y Klee, (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 6D). 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, induciendo la activación de calcineurina. 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 7). 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.

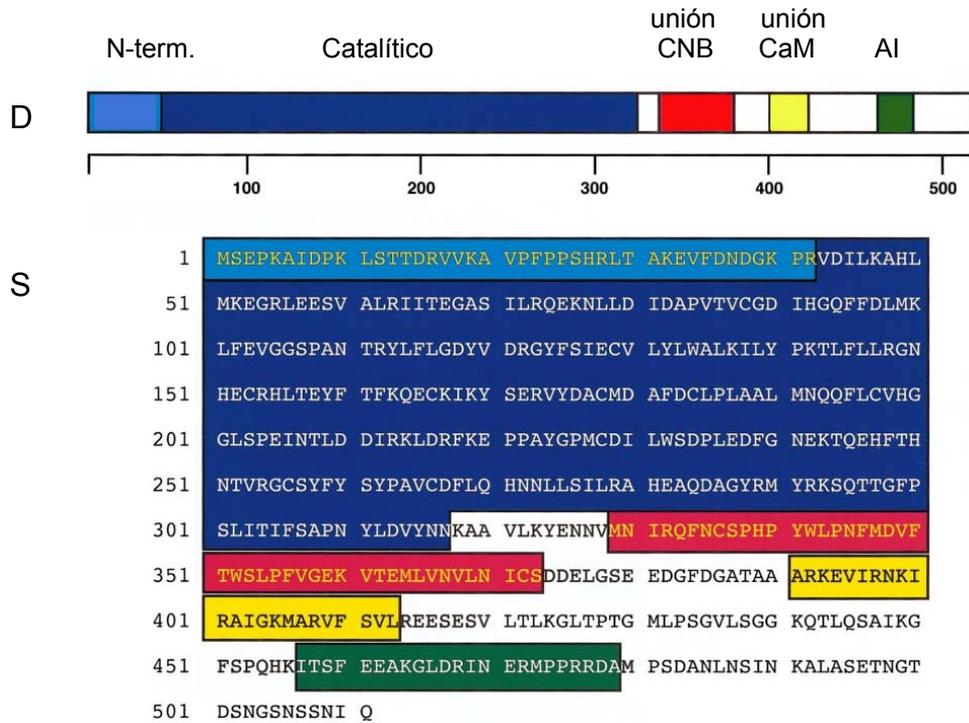


Figura 6. Estructura de los dominios (D) y secuencia primaria (S) de la calcineurina A. La secuencia de aminoácidos representa la isoforma α de calcineurina A de rata. CNB, calcineurina B; CaM, calmodulina; AI, dominio autoinhibitorio. Saitoh y col., (1991).

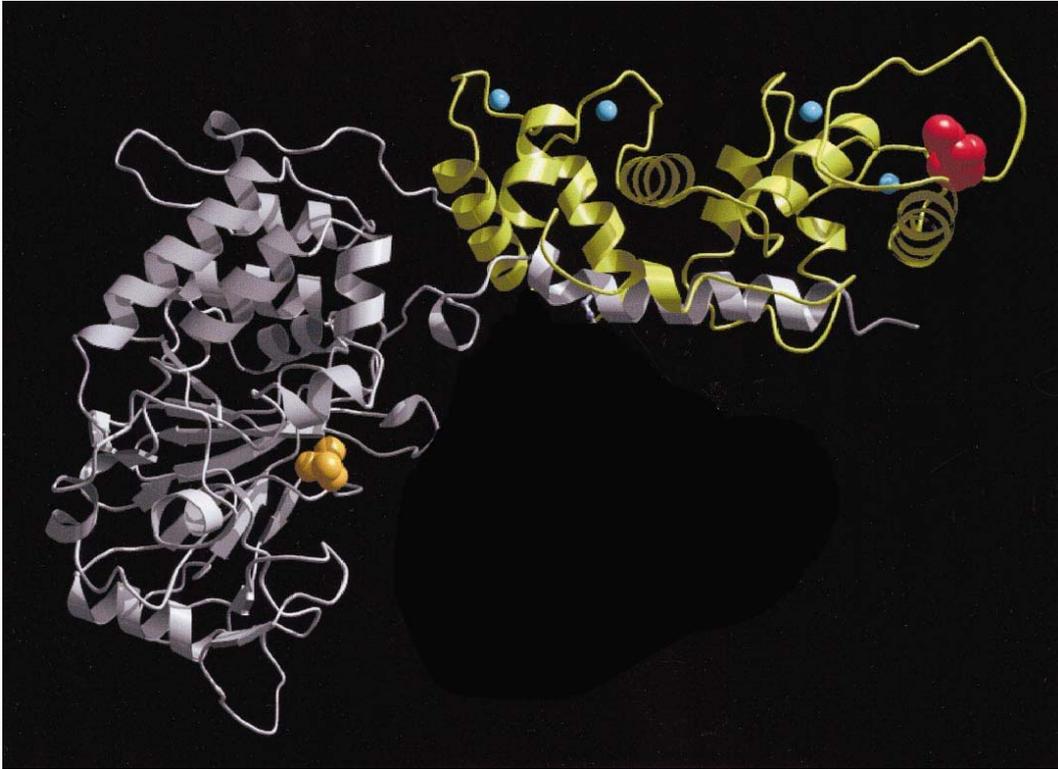


Figura 7. Diagrama Ribbon mostrando la estructura tridimensional de la calcineurina, mediante la utilización de rayos-X (Griffith y col., 1995). Se muestra la estructura de CNA coloreada en gris, CNB en amarillo, los cuatro átomos de Ca^{2+} de la CNB en azul, el grupo miristoilado en rojo y las moléculas de fosfato unidas al centro activo de la CNA, representadas por las esferas naranjas.

E.2.2. 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, y hasta 600 veces la actividad fosfatasa por la adición de Ca^{2+} /calmodulina a las subunidades CNA y CNB reconstituidas (Perrino y col., 1995).

La pérdida de la metionina inicial en la secuencia de aminoácidos de CNB y la unión cíclica del grupo α -amino de la glicina en posición 2 con el ácido mirístico (Aitken y col., 1982), 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).

E.3. Papel fisiológico de la 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 conjugación, resistencia a cationes como Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , regulación de la homeostasis del Ca^{2+} , y regulación del 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, desplazados del centro celular. Asimismo, 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 (Lu y col., 2002), lo que indica que CaN también está implicada en la citokinesis y en el crecimiento polarizado y septado. Además, se le ha asociado con funciones relacionadas con la agregación celular, la posición de los cuerpos polares fusiformes, la posición y morfología nuclear, la condensación de la cromatina, y con la regulación de la homeostasis del Cl⁻ (Plochocka-Zulinska y col., 1995; Sugiura y col., 1998; Sugiura y col., 2002; Cheng y col., 2002). En otro tipo de 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).

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 Águila y col., 2003) mientras que CNB1 dirige la síntesis de la subunidad B (Kuno y col., 1991). El tamaño de la proteína Cna1 es de 60 kDa, Cna2 de 64 kDa y Cnb1 tan solo de 16 kDa.

Existen claras evidencias de que calcineurina es esencial como proteína fosfatasa 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⁺ pero no al K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺, y la expresión de una calcineurina recombinante activada incrementaba significativamente la resistencia a NaCl (Nakamura y col., 1993; Mendoza y col. 1994, y 1996). Se ha demostrado que calcineurina regula la absorción de K⁺ incrementando la afinidad de trk1 por este catión, en respuesta a un estrés salino (Mendoza y col., 1994,1996). 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).

Por otro lado, células deficientes en calcineurina acumulan Na^+ y Li^+ al mismo tiempo que disminuye la expresión de ENA1 (Pmr2p), una Na^+ -ATPasa de la membrana plasmática, clave para la expulsión de Na^+ (Mendoza y col., 1994). En este sentido, 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 factor de transcripción, recientemente descubierto, Prz1, un factor en “dedo de cinc” homólogo a Crz1/Tcn1 (Hirayama y col., 2003). La calcineurina cataliza la desfosforilación de estos factores de transcripción, lo que facilita su importación al núcleo, donde se pueden unir a los CDRE's (*Calcineurin-Dependent Response Elements*) en los promotores de, por ejemplo, ENA1, PMC1 y PMR1 (Matheos y col. 1997, Mendizábal y col. 1998, Stathopoulos y Cyert, 1997).

Como es sabido, en levadura, la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática, PMA1, interviene en la tolerancia al estrés salino siendo una proteína esencial para el mantenimiento de pH citosólico y el potencial electroquímico de la membrana plasmática. A este respecto, calcineurina parece regular negativamente a PMA1, habiéndose demostrado una reducción tanto de la actividad como de la cantidad de Pma1p en fracciones de membrana de levadura que sobreexpresan calcineurina (Withee y col., 1998). Además, 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 8 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.

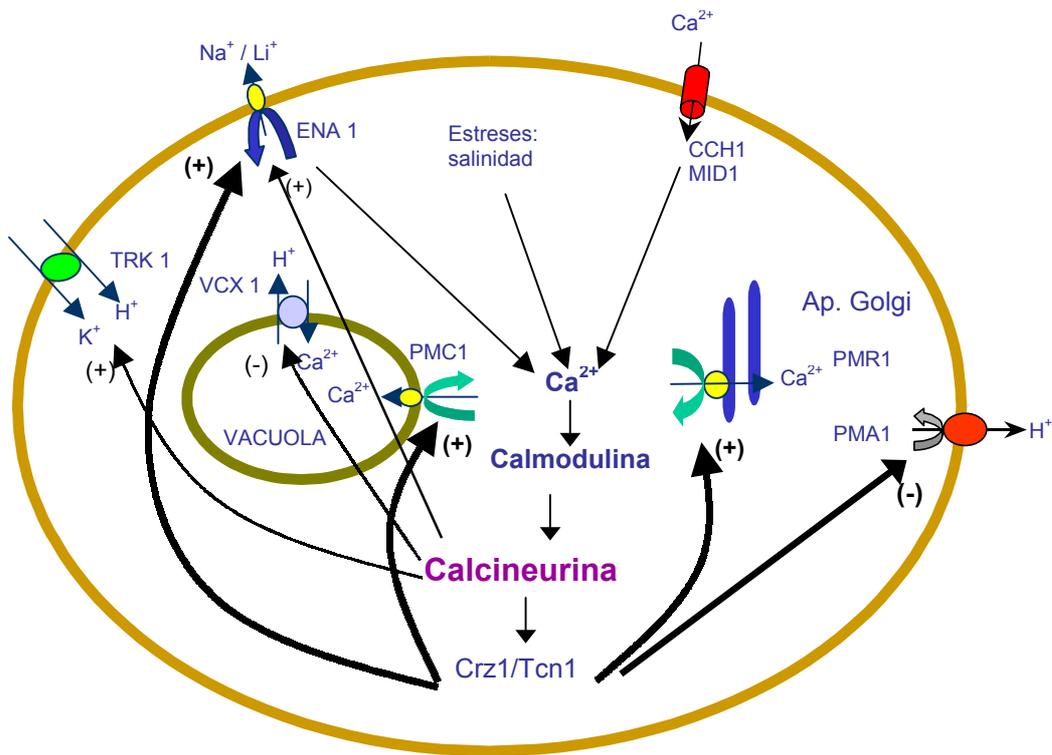


Figura 8. Modelo de percepción de señales, transducción y regulación de efectores que modulan la homeostasis iónica en levaduras. El incremento de Ca^{2+} producido a través de canales de Ca^{2+} , como Cch1p (Paidhungat y Garrett, 1997), en respuesta a diferentes estreses, como el estrés salino, inducen 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 (Mendoza y col., 1996; Park y col., 2001), PMC1 y PMR1, Ca^{2+} -ATPasas de la vacuola (alta afinidad) y del ap. de Golgi (bomba secretora de Ca^{2+}), respectivamente, (Cunningham y Fink, 1994 y 1996) y parece inhibir el gen PMA1, H^+ -ATPasa de la membrana plasmática (Withee y col., 1998). Las flechas estrechas indican regulación positiva postranscripcional de la calcineurina al transportador de K^+ de la membrana plasmática (trk1) (Mendoza y col., 1994) y ENA1, y a la Na^+ -ATPasa de la membrana plasmática, y negativa, al antiportador vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ de baja afinidad (Garrett-Engel y col., 1995; Hemenway y col., 1995; Tanida y col., 1995). Tomado de Rusnak y Mertz (2000).

E.4. Proteínas con homología a Calcineurina en plantas

Existen evidencias bioquímicas y farmacológicas de la presencia de calcineurina en plantas superiores y de su participación en la regulación del transporte iónico relacionado con la apertura y cierre de los estomas. Las primeras indicaciones bioquímicas de la existencia de calcineurina en plantas fueron obtenidas por Luan y col. (1993), quienes demostraron en *Vicia faba*, tras la utilización de inhibidores específicos, que una proteína fosfatasa con características bioquímicas similares a las de calcineurina de levaduras inhibe canales de K^+ regulando su entrada al citosol. Además, en el citosol de células vegetales se han identificado ciclofilinas que interactúan *in vivo* con calcineurina (Luan y col. 1994, Lippuner y col. 1994). Por otra parte, Allen y Sanders, (1995) demostraron en experimentos de *patch-clamp* que calcineurina tiene la capacidad de regular canales de Ca^{2+} vacuolares en células guarda de *Vicia faba* y relacionaron esta proteína con la salida de Ca^{2+} vacuolar a través de canales iónicos en estas células. Los resultados obtenidos por estos autores permiten hipotetizar que la calcineurina vegetal podría participar en la regulación del transporte iónico relacionado con el estrés salino. Evidencias que apoyan esta hipótesis fueron obtenidas por Pardo y col., (1998), quienes demostraron que la coexpresión de las subunidades catalítica y reguladora de calcineurina de levadura confiere 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 puede regular los determinantes de tolerancia requeridos para la adaptación a dicho estrés.

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. Sin embargo, sí se ha identificado una familia de sensores de Ca^{2+} en *Arabidopsis*, AtCBLs, que incluye proteínas con cierta homología a la subunidad reguladora de calcineurina de levadura (White y Broadley, 2003). Estas proteínas son codificadas por una familia multigénica de, al menos, 10 miembros, con dominios estructuralmente similares y con sólo pequeñas variaciones en la longitud de la región codificante (Kudla y col., 1999; Kim y col., 2000; Albrecht y col., 2001; Guo y col., 2001b). Se ha comprobado que diversas AtCBLs han conservado el dominio miristoilado en su

región N-terminal, al igual que la subunidad reguladora de calcineurina, CNB, sugiriendo que estas proteínas se localizan en las membranas celulares (Kim y col., 2000; Albrecht y col., 2001), como ocurre con SOS3 o AtCBL4, uno de los genes que se identificó en *Arabidopsis thaliana* (Liu y Zhu, 1998, Quintero y col., 2002), 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 Zhu, 1998). Asimismo, las proteínas AtCBLs, que muestran algo más de homología con CNB, son capaces de interactuar físicamente con la subunidad A de calcineurina de rata, pero no de levadura, complementando, la proteína híbrida resultante, un mutante de *S. cerevisiae* deficiente en calcineurina (Kudla y col., 1999).

Las proteínas CNB y CBLs contienen múltiples dominios de unión a Ca²⁺, pero carecen de un dominio efector, como CDPKs, proteínas kinasas dependientes de Ca²⁺ con dominios de unión a Ca²⁺ y dominio kinasa (Harmon y col., 2001; Luan y col., 2002; White y Broadley, 2003). Para que estas proteínas puedan transmitir la señal mediada por Ca²⁺ tienen que interactuar con otras proteínas diana y regular su actividad. La subunidad reguladora de calcineurina, CNB, interactúa con la subunidad catalítica, CNA, para inducir la actividad fosfatasa. En plantas se ha identificado la familia de proteínas kinasas CIPKs, análogas a SNF1 (kinasa de levadura) que interactúa con las proteínas CBLs (Shi y col., 1999; Halfter y col., 2000; Luan y col., 2002) a través del dominio autoinhibitorio C-terminal, en una región de 24 aminoácidos denominado dominio NAF, requiriéndose, para ello, niveles micromolares de Ca²⁺. Cuando el complejo Ca²⁺-CBL se une, desplaza al dominio autoinhibitorio dejando libre el centro activo de la enzima provocando su activación (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). Las proteínas CIPK y CBL también han sido denominados PKS (Proteína Kinasa S) y SCaBP (*Specific Calcium Binding Protein*) por el grupo de JK Zhu. La existencia de unas 10 proteínas CBLs y unas 25 proteínas CIPKs sugiere una interacción múltiple entre ambos tipos de proteínas (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 o PKS3 y ScaBP5 intervienen en la vía de señalización

del ABA (Kim y col., 2003, Guo y col., 2002), AtCBL1 regula de forma diferencial, las respuestas al estrés salino, sequía y frío en *Arabidopsis* (Cheong y col., 2003) y CBL4 (SOS3) y CIPK24 (SOS2) intervienen en la respuesta al estrés salino (Zhu y col., 1998; Liu y col. 2000; Shi y col. 2000; Halfter y col., 2000). Recientemente se ha demostrado la existencia de una interacción entre la kinasa SOS2 u otras kinasas CIPK y la fosfatasa 2C ABI2 implicada en la vía de señalización a través del ABA (Ohta y col., 2003).

E.5. La vía SOS en plantas

Se ha sugerido que, en plantas, la vía de traducción de señales dependiente de Ca^{2+} en respuesta a estrés salino que implica a las proteínas SOS3, SOS2 y SOS1, es homóloga funcional de la vía calcineurina en levadura. A diferencia de lo que ocurre en levadura, la vía SOS incluye una proteína kinasa SOS2, en lugar de una fosfatasa, y la diana final sería el antiportador Na^+/H^+ , SOS1, y no una bomba de Na^+ , tipo ENA1. En *Arabidopsis*, mutaciones en los genes SOS3, SOS2 y SOS1 producen plantas hipersensibles al NaCl (Liu y Zhu, 1997), fenotipo parcialmente recuperable, en el caso del mutante SOS3, incrementando la concentración de Ca^{2+} en el medio (Liu y Zhu, 1998). Análisis genéticos indican que SOS1, SOS2 y SOS3 funcionan en una vía común que controla la tolerancia a la salinidad (Zhu y col., 1998; Liu y col. 2000, Shi y col. 2000, Halfter y col., 2000).

SOS3 posee tres dominios de unión a Ca^{2+} de tipo “*EF-hand*” con baja afinidad comparado con Calmodulina (Ishitani y col., 2000), lo que sugiere que la función de SOS3 en la tolerancia a la sal podría llevarse a cabo en localizaciones subcelulares específicas favoreciendo que el incremento transitorio de Ca^{2+} se mantenga durante más tiempo. La proteína SOS3 está miristoilada *in vivo*, un requerimiento importante de su función en relación con la tolerancia a la salinidad, puesto que la mutación en este motivo miristoilado elimina la capacidad 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 los transportadores de iones ligados a membranas (Quintero y col., 2002).

En cuanto a SOS2, se trata de una serina/treonina proteína kinasa con un dominio catalítico N-terminal, similar a la kinasa SNF1 de levadura y otro dominio regulador (Liu y col., 2000; Zhu, 2000, Zhu, 2003). Ambos dominios interactúan causando autoinhibición, al bloquear el acceso del sustrato al dominio catalítico (Guo y col., 2001a). Parece ser que SOS3 interactúa con SOS2 a través de un motivo de 21 aminoácidos del dominio regulador (motivo FISL), evitando la represión de la actividad kinasa por parte del dominio autoinhibitorio, al dejar libre el dominio catalítico para la unión del sustrato (Halfter y col., 2000; Guo y col., 2001a; 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* (Qiu y col., 2002). En vesículas de membrana plasmática aisladas de mutantes *sos* la actividad antiportadora Na^+/H^+ era muy baja en comparación con los silvestres, habiéndose podido comprobar, en los mutantes *sos2* y *sos3* pero no en el mutante *sos1*, que al añadir una forma activada de SOS2 a éstas vesículas, la actividad antiportadora se recuperaba hasta casi los niveles normales, resultados que demuestran la activación por SOS3 y SOS2 del antiportador Na^+/H^+ SOS1 (Qiu y col., 2002). Asimismo, pudo concluirse que SOS3 y SOS2 parecen inducir la expresión de la SOS1 (Shi y col., 2000), y que 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 vía SOS, integrada por SOS1, SOS2 y SOS3, ha sido reconstituida en levadura (Quintero y col. 2002; Figura 9). Cuando SOS1 se expresa en mutantes de levadura carentes de Na^+ -ATPasas y transportadores Na^+/H^+ endógenos, sólo se 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 (Quintero y col., 2002). Además, este estudio ha demostrado que SOS3 es necesario para la movilización de SOS2 a la membrana plasmática, donde puede fosforilar a SOS1. El antiportador SOS1 tiene una larga cola C-terminal que puede situarse en la cara citoplasmática de la membrana (Shi y col., 2000), habiéndose propuesto que actúa como sensor de Na^+ intracelular, mediante la formación de un lazo regulador que le permite controlar la activación de SOS2 y, al mismo tiempo, estimular su capacidad de expulsar Na^+ (Zhu, 2002; Zhu, 2003).

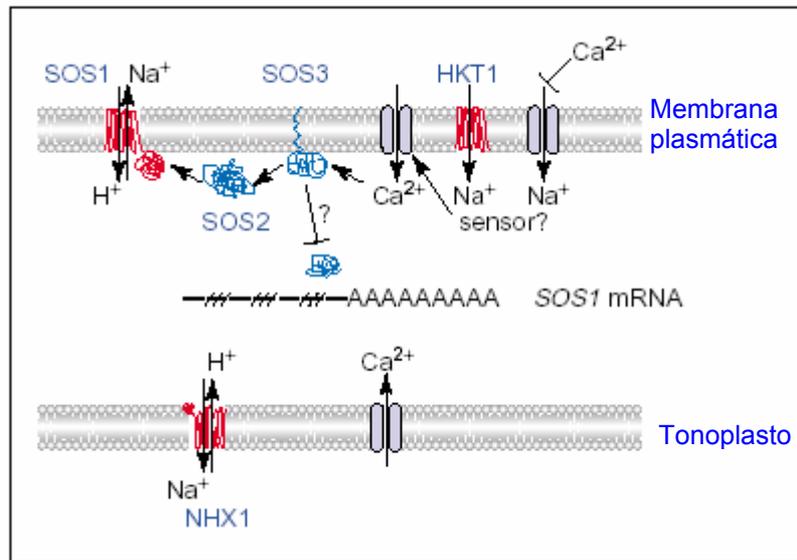


Figura 9. Esquema representativo de la vía de señalización de la ruta SOS frente al estrés salino en plantas de *Arabidopsis*. Dos son los componentes que inducen la expresión y la activación de SOS1 (Shi y col., 2002a; Qiu y col., 2002; Quintero y col., 2002). Por una parte, el estrés por Na⁺ induce 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 sólo participa en la fosforilación de SOS1, sino que también regula los niveles de transcrito y su estabilidad (Shi y col., 2003a). Tomado de Ward y col., (2003).

Además de la regulación de la actividad de SOS1, SOS2-SOS3 pueden regular a otros efectores de tolerancia a sal (Gong y col., 2001). Así, se ha demostrado que SOS2 puede activar al antiportador $\text{Na}^+, \text{K}^+/\text{H}^+$, AtNHX1 (Qiu y col., 2003), y al antiportador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, CAX1 (Cheng y col 2003), lo que indica que la vía SOS constituye una ruta de transducción de señales central en el mantenimiento de la homeostasis iónica bajo condiciones de estrés salino. Así mismo, la vía SOS podría regular negativamente a HKT1, limitando el influjo de Na^+ y estimulando, posiblemente a través de cambios del potencial de membrana, sistemas de absorción selectivos de K^+ (Rus y col 2001a). A este respecto se ha demostrado que la vía SOS esta implicada en la adquisición de K^+ a bajas concentraciones externas de este ión, aunque por el momento no se han identificado los sistemas de transporte de alta afinidad que estarían implicados (Zhu y col. 1998).

III. PLAN DE TRABAJO

La introducción, los objetivos y los antecedentes científicos expuestos nos han llevado a establecer el siguiente plan de trabajo:

1. Establecimiento de un cultivo celular de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Pera) transgénico con calcineurina de levadura.
2. Análisis de la transformación. Estudio de la inserción y de los niveles de expresión de las subunidades de calcineurina.
3. Estudio de la morfología celular, crecimiento celular y contenido iónico.
4. Determinación de la extrusión de H^+ y viabilidad celular. Medida de la actividad y expresión de la H^+ -ATPasa de plasmalema y tonoplasto.
5. Estudios de expresión de transportadores primarios y secundarios implicados en la homeostasis iónica.

IV. 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, Cv. 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 $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$

B. CEPA BACTERIANA Y VECTORES PLASMÍDICOS

La descripción de la construcción del plásmido se muestra en la Figura 1 (Pardo y col., 1998). El gen que codifica una forma truncada de CNA2 de levadura, conteniendo una delección a partir de la treonina 459 (CNAtr; Mendoza y col., 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 pBTEX derivado del PBI121. A partir del gen CNB1 se genera ADNc 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.

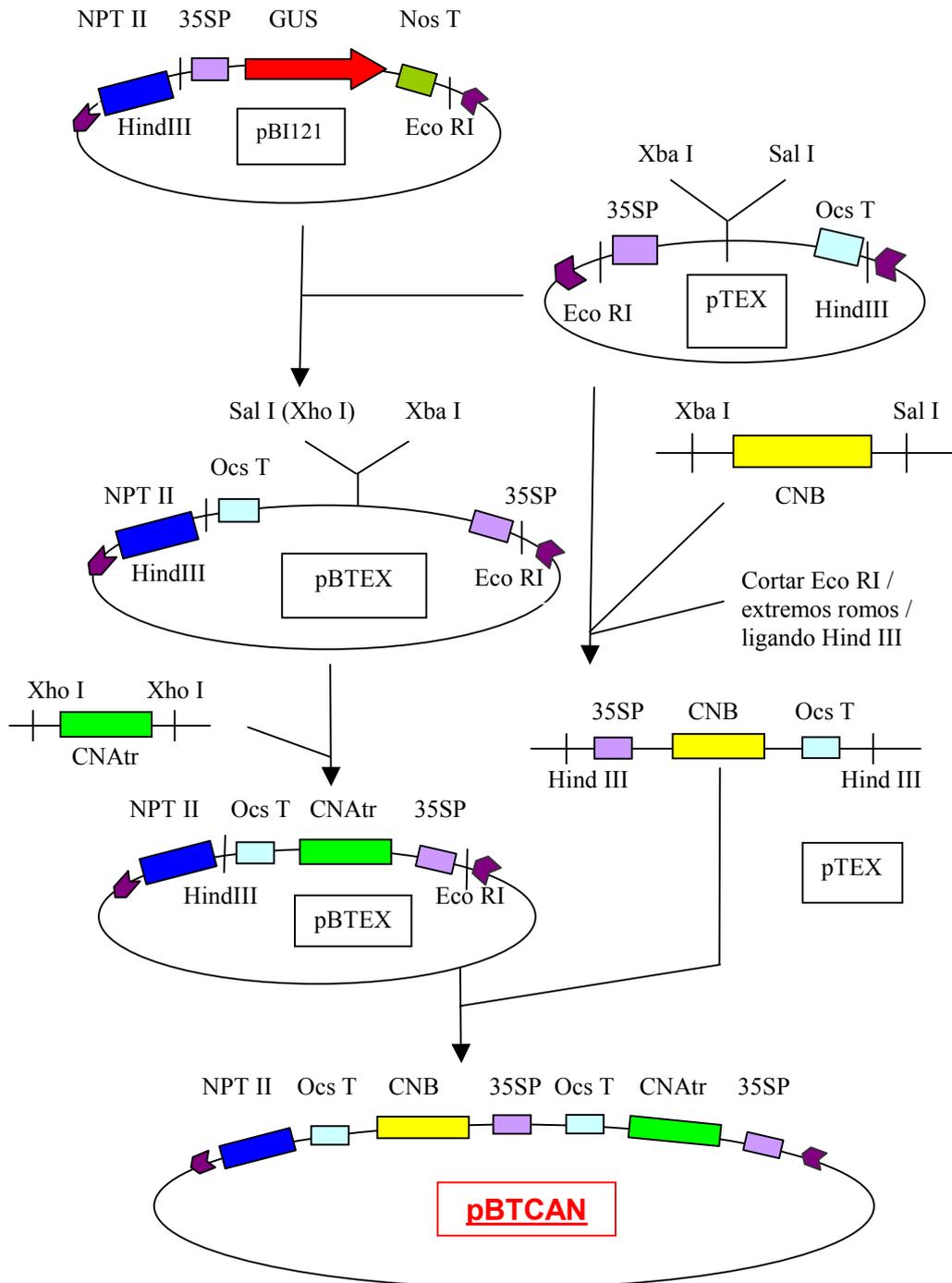


Figura 1. Construcción del plásmido pBTCAN (Pardo y col., 1998).

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).

B.1. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

B.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. El nombre de T-ADN se debe a que ésta es la región que entra al núcleo de la célula vegetal y se integra en su genoma (Figura 2).

Con el objetivo de utilizar este sistema en la transformación de plantas, se han construido vectores desarmados, en los que los oncogenes del T-ADN han sido eliminados para evitar la formación de la enfermedad tumoral. Estos vectores permiten insertar los genes que nos interesan entre los bordes de T-DNA para ser introducidas en el genoma de la planta. Debido a su gran tamaño (200 Kb), el plásmido Ti desarmado no se puede manipular fácilmente (Miranda y Campos, 1998) para introducir los genes de interés directamente en él. Por esta razón, se utilizan plásmidos más pequeños 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. Estos vectores pueden ser binarios o cointegrativos (Hoekema y col., 1983; Schell, 1995a y 1995b; Miranda y Campos, 1998). El vector cointegrativo se integra al vector Ti desarmado, gracias a regiones de homología entre éstos. Los vectores de tipo binario (Figura 2), 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 pasa a la fase 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.

Las células vegetales transformadas con T-ADN desarmado se comportan del mismo modo que las células vegetales no transformadas de la misma especie en cultivo de tejidos (Hooykaas, 1989).

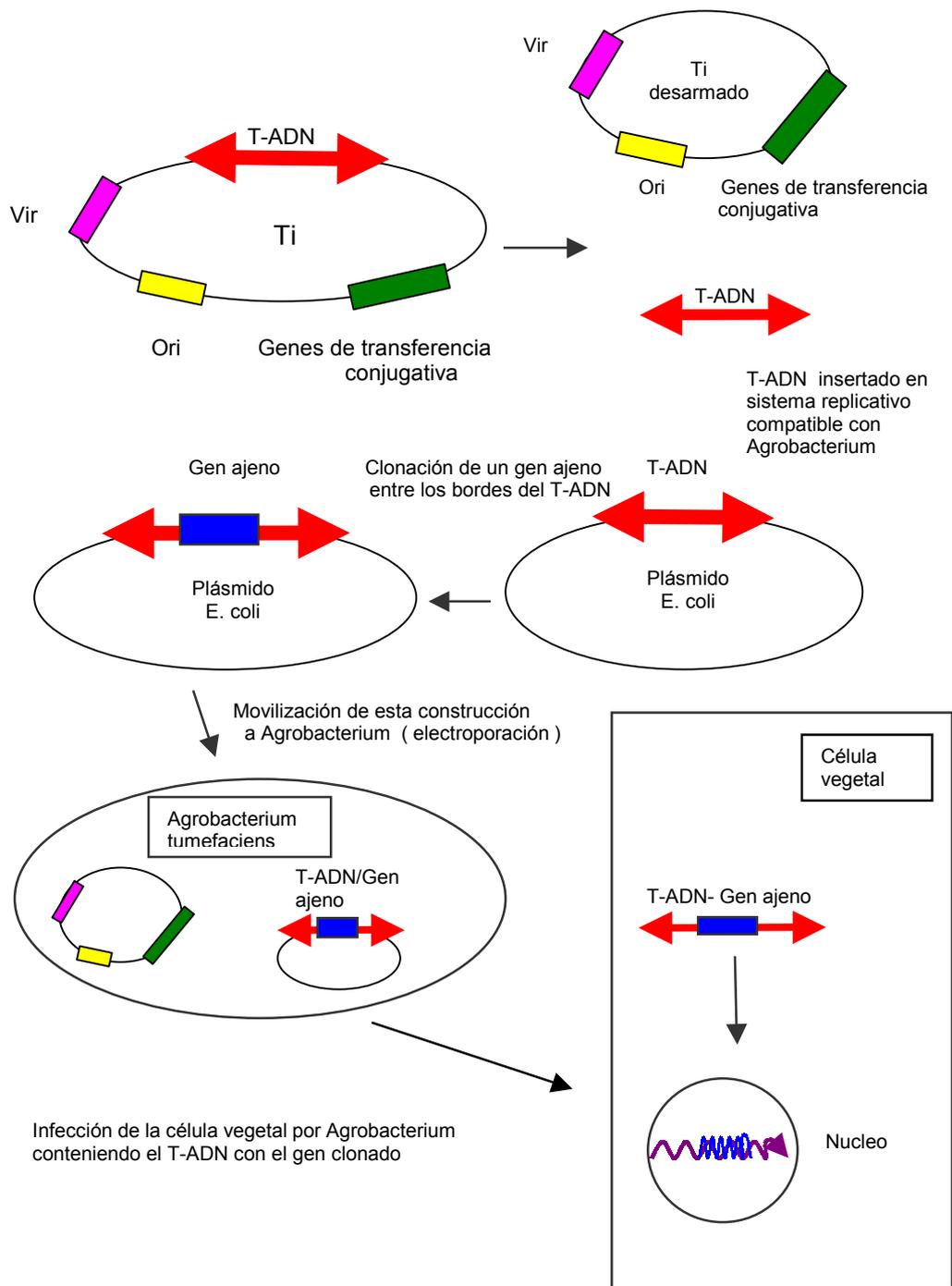


Figura 2. Infección de células vegetales por el sistema binario de *A. tumefaciens*.

B.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 se hizo 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) y gentamicina (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 -80 °C hasta su utilización. Se mezclaron alícuotas de *Agrobacterium* con 1-10 ng de plásmido en cubetas de electroporación de 0.2 cm, y se sometieron a un pulso eléctrico de 1.8kv, 50 µF y 200 Ω. Tras la adición de 500 µl de YEB e incubación durante 4 h a 28 °C, se vertió el conjunto en placas selectivas, en presencia de 50 µg/ml de kanamicina, y se seleccionan las colonias transformadas para su crecimiento en medio líquido YEB.

C. OBTENCIÓN DE CALLOS DE TOMATE TRANSFORMADOS

C.1. Obtención de cotiledones transformados

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

C.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 estreptomycin y kanamicina (50 µg/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.

C.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 µg/ml) y una concentración única de carbenicilina (500 µg/ml). El cultivo se mantuvo a una temperatura de 27°C, fotoperiodo de 16 h y unos 20 µmol².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).

C.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 µg/l de kinetina, 3% de sacarosa y 1% de agar a pH 6.0), al que se adicionaron 25 µg/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 µg/l, subcultivándose con una periodicidad de 3 semanas en oscuridad y a 27 °C (Figura 3).

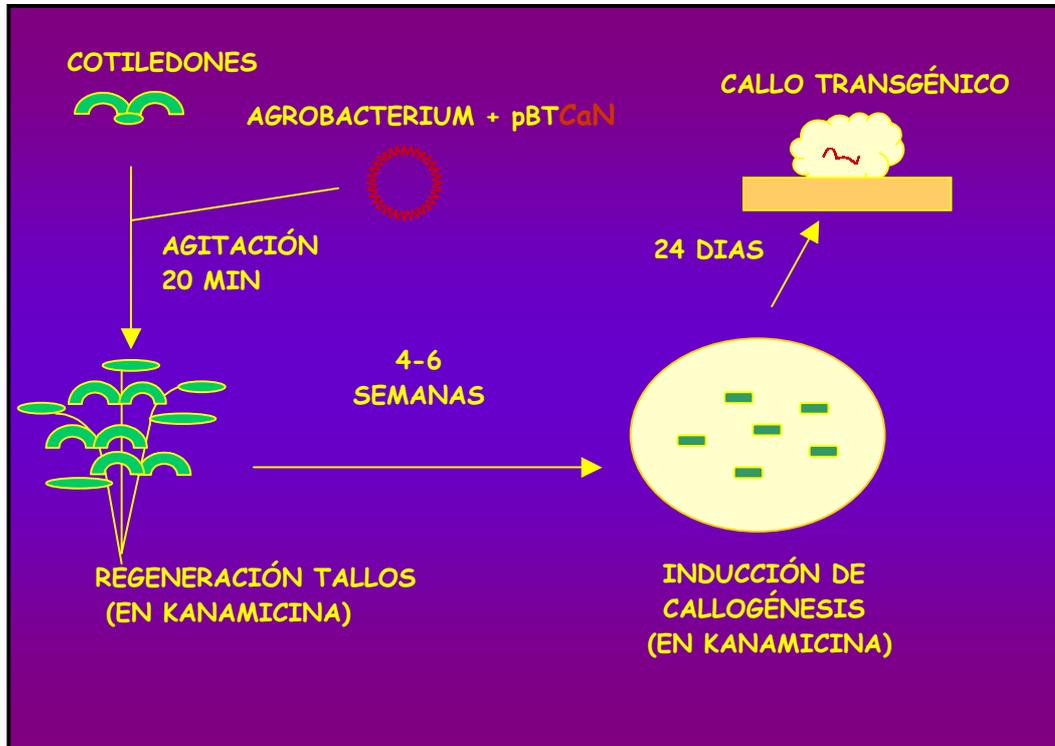


Figura 3. Etapas desde la Infección de los cotiledones de tomate con *A. tumefaciens* portando el plásmido pBTCAN, hasta la obtención de los callos transformados.

C.2. Detección de las subunidades de calcineurina CNATr y CNB en los callos transformados

C.2.1 Extracción de ADN genómico para análisis por PCR

Se siguió el protocolo de Dellaporta y col. (1983). A 50 mg de peso fresco de callos triturados en nitrógeno líquido, se añadieron 3 ml de tampón de extracción conteniendo 7 M urea, 0.3 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA y 1 % sarcosyl agitándose a 37 °C durante 5-10 min. Tras centrifugar a 8.000 xg durante 1 min, se añadieron al sobrenadante 3 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1), se mezclaron por inversión y se centrifugaron a 8.000 x g durante 6 min. Se adicionó un volumen de isopropanol al sobrenadante, se mezcló y se dejó en hielo durante 20 min y se centrifugó a 8.000 g el conjunto durante 15 min lavándose el precipitado con etanol al 70%. Finalmente, el ADN se resuspendió en TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA).

C.2.2. Amplificación por PCR

Se utilizaron unos 200 ng de ADN, 0.7 µM de cada cebador, 0.25 mM de dNTPs (dATP+dGTP+dCTP+dTTP), y 0.5-1 U Taq I ADN polimerasa, en un volumen final entre 25-100 µl. La presencia de las dos subunidades de la calcineurina, CNATr y CNB, se analizó utilizando cebadores específicos de las dos subunidades:

CNATr: 5'AATGGGTGCTGCTCCTTCCAAAAT3' y
5'TTACACATCGTATTGCAATGTCAG3'
CNB: 5'AATACTGAGCAGATAAACGC3' y
5'ATTGCGACAAGCATCTCTGT3'.

Las condiciones de la reacción, en un termociclador marca Eppendorff, fueron: 94 °C (5 min), adición de la Taq-polimerasa, 30 ciclos a 94 °C (45 seg), 54 °C (45 seg), 72 °C (45 seg), y 72 °C (5 min). La ausencia de contaminación por *Agrobacterium* se comprobó mediante amplificación del gen Vir-D, exclusivamente bacteriano, utilizándose como cebadores:

5'ATGTCGCAAGGCAGTAAGCCCA3' y
5'GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA3'

y como condiciones de PCR, 94 °C (3 min), adición de la Taq-polimerasa, 30 ciclos de 94 °C (30 seg), 60 °C (45 seg), 72 °C (45 seg) y 72 °C (5 min) (Lipp-Joao y Brown, 1993). Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa entre el 0,7 y el 1% de agarosa, preparados en tampón TBE 0,5x (45mM Tris/borato, 1mM EDTA, pH 8.0), conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio.

C.3. Estudio de la expresión de calcineurina en los callos transformados

C.3.1. Extracción de ARN total

La extracción de ARN total de los callos de tomate, previamente congelados en N₂ líquido y almacenado a -70 °C, se llevó a cabo mediante extracción por columnas de "Qiagen" *Rneasy Plant Mini Kit*. Mediante esta técnica se obtenía un ARN puro, libre de ADN.

C.3.2. Obtención de un fragmento de ADNc por RT- PCR

C.3.2.1. Transcripción inversa del ARN

La primera hebra de ADNc se sintetizó a partir del ARN total extraído de callos de tomate, utilizando como cebador el propio cebador reverso específico de las dos subunidades de Calcineurina (apartado B.2.2.) y el enzima transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis de ave (AMV-RT) (Sigma). Previo a la reacción de RT, 1 µg de ARN total, se incubó durante 10 min a 77.5 °C, en presencia de 0.5 mM de cada uno de los dNTPs y 3.5 µM del cebador específico reverso. Tras un breve enfriamiento en hielo, se añadió tampón 1 x de AMV-RT (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 40 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 1 mM DTT), 0.25 U.µl⁻¹ de inhibidor de ARNsas y 0.5 U.µl⁻¹ de AMV-RT, en un volumen total de 20 µl. La reacción se llevó a cabo a 42 °C durante 50 min.

C.3.2.2. Amplificación por PCR

La población de primeras hebras de ADNc, obtenida por transcripción inversa, se utilizó como molde para amplificar por PCR las subunidades de calcineurina, utilizando los cebadores específicos descritos en el apartado B.2.2.

El medio de reacción de PCR (50 μ l) incluía: 5 μ l de la reacción de transcripción inversa, tampón de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.05 % - p/v- gelatina), 200 μ M de cada uno de los dNTPs, 1 μ M de los cebadores específicos, y 2.5 U de Taq ADN polimerasa. El protocolo de amplificación consistió en 3 min a 94 °C, 1 min a 94 °C, 1 min a 54 °C, 1 min a 72 °C (35 ciclos), y 5 min 72 °C. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorff.

Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa al 1 % con TBE 0.5 x (45 mM Tris, pH 7.6, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA), conteniendo 0.5 μ g.ml⁻¹ de bromuro de etidio, determinado los contenidos relativos de ADNc por densitometría mediante el programa Quantity One de Bio-Rad.

D. ESTUDIOS FISIOLÓGICOS

D.1. Determinación del crecimiento

El crecimiento de los callos, a lo largo de 5 semanas, fue analizado en función de los cambios de peso fresco. Partiendo de 3 g de tejido se determinó el peso fresco de los callos controles y transgénicos cultivados en ausencia y presencia de 100 mM NaCl, así como el porcentaje de inhibición del peso de los callos en respuesta a un estrés de 100 mM NaCl durante una generación. Para ello se calculó el índice de crecimiento relativo (ICR);

ICR = (peso final-peso inicial)/peso inicial

D.2. Determinación del contenido mineral: sodio, potasio, calcio y cloruro

La determinación del contenido de los iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} se ha realizado a partir del mineralizado obtenido de la eliminación del material orgánico de los callos con SO_4H_2 y H_2O_2 (Wolf 1982). A 250 mg de peso seco de callo se añadieron 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y se calentó la mezcla durante 4 min en microondas a presión atmosférica (Maxidigest MX 4350, prolabo, potencia máxima de 800 W) al 50% de potencia. Tras enfriar, se adicionaron cuidadosamente 3 ml de H_2O_2 , se incubó durante 2 min, y se volvió a calentar al 80% y al 90% de potencia, llevándose el extracto a un volumen de 50 ml con agua desmineralizada (Novozamsky y col., 1999).

El contenido de Na^+ y K^+ se determinó por espectrofotometría de llama (aire-propano), frente a una curva patrón obtenida a partir de soluciones concentradas de molaridad conocida de NaCl y KCl que contenían H_2SO_4 en cantidades equivalentes al mineralizado. El contenido de Ca^{2+} se determinó por espectrofotometría de absorción atómica con atomización de llama (aire-acetileno). Los valores de Ca^{2+} se obtuvieron por extrapolación frente a una curva patrón obtenida a partir de una solución madre de CaCO_3 . Los valores de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} se expresaron en porcentaje de g de ión. g^{-1} peso seco de callos.

El contenido en cloro se determinó mediante valoración potenciométrica de una suspensión de la muestra utilizando una solución valorada de nitrato de plata (AFNOR 85619, 1985). Para ello 150 mg de peso seco de callos se homogeneizaron con una mezcla de 10 ml de H_2O y posteriormente, 5 ml de NO_3H y 40 ml de H_2O , y al homogeneizado resultante se añadieron, gradualmente, volúmenes conocidos de una solución de NO_3Ag 0.1N, determinándose las diferencias de potencial provocadas por la precipitación del AgCl en un potenciómetro con electrodos de plata-cloruro de plata y de referencia. El punto de inflexión de la curva de valoración, que marcó el punto de equivalencia de la valoración, permitió identificar el volumen de NO_3Ag necesario para precipitar todo el cloruro de la muestra, expresado en porcentaje de g de ión. g^{-1} peso seco de callos.

D.3. Actividad extractora de protones

D.3.1. Fundamento del método y cuantificación de la medida

El método se basa en un sistema de medida continua y automática de pH, que permite determinar la capacidad de extrusión de H^+ de los tejidos, principalmente raíces, y de células en suspensión. Se ha utilizado un sistema marca Metrohm, compuesto por pH-metro, multidosimat e impulsomat (Rodríguez Rosales y col., 1989), incluyendo además un embudo Buchner con una placa porosa de vidrio fritado por la que se hace pasar una corriente continua de aire descarbonatado. La descarbonatación se consigue haciendo pasar una corriente de aire por una columna de vidrio rellena de gel de sílice para eliminar la humedad, y por tres columnas de cal sodada, con indicador de saturación, para eliminar el CO_2 . La termostatación del sistema se logra por paso de agua a temperatura controlada a través de la doble pared del embudo Buchner donde se incuban las células.

Para el funcionamiento del sistema, el impulsomat transmite un impulso eléctrico, en función de la disminución del pH del medio de incubación de las células con respecto a un pH prefijado, el cual se transmite al multidosimat para que éste libere al medio volúmenes fijos de una solución de KOH de concentración conocida. El registro gráfico correspondiente al volumen de KOH sucesivamente adicionado, es proporcional a la cantidad de H^+ extruídos por las células al medio de incubación.

En el caso concreto de la cuantificación de la actividad de extrusión de H^+ en los callos de tomate, estos son disgregados en medio líquido de igual composición al medio de multiplicación pero sin agar, suplementado con 20 mM de MES, pH 6.0, donde se mantienen en agitación durante 16 horas a 27 °C y en oscuridad. Se filtra la suspensión celular resultante a través de papel Whatman nº 1, se lavan 2 ó 3 veces con una solución isoosmótica de sorbitol y se incuban 12 gramos de células en el embudo Buchner en 40 ml de medio de reacción compuesto por 1,6 % sorbitol, 2 mM K_2SO_4 y 0.1 mM $CaSO_4$. La actividad extractora de H^+ de las células se determina durante 8 h, a pH prefijado de 7.3, 27 °C y en oscuridad.

A partir de los registros de acidificación se calculan valores de extrusión entre la 1ª y la 8ª h, a partir de los cuales se determina el valor medio de la velocidad de flujo de H^+ en $\mu\text{eq } H^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{ peso fresco } h^{-1}$.

D.4. Test de viabilidad celular: reacción fluorocromática (FCR)

Este método se basa en la conversión del diacetato de fluoresceína (FDA), reactivo apolar, no fluorescente y permeable, por medio de las esterasas citoplásmicas que lo hidrolizan liberando la fluoresceína (polar, fluorescente e impermeable). La fluoresceína se acumula en el citoplasma de aquellas células cuyo sistema de membranas se mantiene intacto. Por tanto, las células que muestran fluorescencia amarillo-verdosa pueden considerarse viables, al poseer un sistema de membranas intacto y esterasas activas. Por el contrario, las células inviables no mostrarán fluorescencia debido a la ausencia de esterasas, o a la difusión de la fluoresceína fuera del citoplasma a través de las membranas dañadas.

Para realizar el test se toma una alícuota de la suspensión celular de callos de tomate en un eppendorff, se adiciona 1 μl de FDA (5mg/ml en acetona), se agita suavemente y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente, tomándose una gota para ser observada al microscopio de fluorescencia.

E. ESTUDIOS A NIVEL DE MEMBRANAS

E.1. Obtención de microsomas

Entre 10-20 g de peso fresco de callos se homogeneizaron a 4 °C en mortero con tampón de extracción (1:2, peso fresco/volumen de medio) conteniendo: 25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.2 % (p/v) BSA, 250 mM sacarosa, 2 mM MgSO_4 , 5 mM EGTA-Tris, pH 7.6, 10 % (v/v) glicerol, 10 % (p/v) PVPP, 2 mM DTT, 1 mM PMSF y 2,5 mM metabisulfito sódico. El homogenizado obtenido se pasó dos veces por la prensa de French a una presión de 1000 PSIG y el extracto resultante fue centrifugado a 13.000 g

durante 10 min (Sorvall, rotor SS34). El sobrenadante se centrifugó durante 35 min a 100.000 g (Beckman, rotor 60Ti) obteniéndose un sedimento correspondiente a la fracción microsomal. Para el aislamiento de las vesículas de plasmalema por partición de fases, la mayor parte del sedimento anterior se resuspendió en 2 ml de tampón de partición que contenía 330 mM sacarosa, 5 mM fosfato potásico, pH 7.8, y 0.1 mM PMSF y el resto se resuspendió en tampón de conservación 2 mM BTP-Mes pH 7.0, conteniendo 250 mM sacarosa, 0.2 % (p/v) BSA, 10 % (v/v) glicerol, 2 mM DTT y 1 mM PMSF, congelándose las suspensiones en nitrógeno líquido y almacenándose a - 80 °C.

E.2. Purificación de vesículas de plasmalema

La purificación de las vesículas de plasmalema se llevó a cabo por el método de partición de fases en sistemas de dos polímeros acuosos de PEG y dextrano (Larson y col., 1987), el cual permite la separación de los componentes de una mezcla por distribución entre estos dos líquidos no miscibles. El fundamento de esta técnica es la generación de una diferencia de potencial electrostático muy baja, la cual depende del tipo y concentración de la sal utilizada (LiCl, NaCl, KCl) (Albertsson, 1971 a y b). La composición de las fases determina que la separación (partición) de los componentes de una mezcla pueda depender del peso molecular de la carga neta, de la hidrofobicidad y de la existencia de sitios específicos de unión. El sistema de partición de fases permite la purificación de la membrana plasmática utilizando concentraciones variables de polímero (5,5-6,5 % de PEG y dextrano), de sales (KCl, NaCl) y de osmoreguladores (sacarosa, sorbitol), todo disuelto en tampón, normalmente fosfato potásico, pH 7.5-8.0. Las vesículas de plasmalema se separan en la fase superior de polietilenglicol mientras que las membranas intracelulares se separan en la interfase y fase inferior de dextrano.

Para la purificación de plasmalema de callos de tomate, el sistema de partición de fases estuvo compuesto por 6 % (p/p) de Dextrano T500, 6 % (p/p) de PEG 3350, 2 mM KCl, 330 mM sacarosa, en tampón fosfato potásico 5 mM, pH 7.8, utilizando tubos de vidrio corex de 15 ml a los que se adicionaron 12 g de fases y entre 5-10 mg de proteína microsomal en 2 ml de tampón de partición. Tras la adición, las fases se mezclaron vigorosamente por inversión y se separaron por centrifugación a 3.000 xg durante 5 min

a 4 °C (Martin Christ). La fase superior de PEG resultante, recogida con pipeta Pasteur, se añadió a una nueva fase inferior de dextrano del segundo tubo de partición, procediéndose de la misma manera a mezclar y centrifugar. La nueva fase superior obtenida, conteniendo las vesículas enriquecidas en plasmalema, se diluyó con tampón de lavado que contenía 250 mM sacarosa, 2 mM BTP-MES pH 7.5, 2 mM DTT y 0.1 mM PMSF, se centrifugó a 150.000 g durante 45 min, a 4 °C (Beckman, rotor 60Ti), recogiendo el sedimento enriquecido en plasmalema en tampón de conservación (0.2 %, p/v, BSA), congelándose en N₂ líquido y almacenándose en alícuotas a -80 °C.

Las proteínas de membranas se cuantificaron por el método de Bradford (1976), empleándose el reactivo de color de Bio-Rad, diluido 5 veces, y BSA como patrón.

E.3. Actividades enzimáticas asociadas a las membranas purificadas

E.3.1. Actividad ATPasa

La determinación de las actividades fosfohidrolíticas asociadas a las ATPasas de las vesículas aisladas se basó en la medida de Pi liberado en la hidrólisis del sustrato (ATP, PPi, UDP, etc.) (Ames 1966). La reacción se inició con la adición de una alícuota de la suspensión de membranas (8 µg de proteínas microsomales ó 4 µg de las fracciones enriquecidas en plasmalema) a 500 µl de medio de reacción. Tras 30 min de incubación a 27 °C, la reacción se paralizó con la adición del reactivo de Ames (10 % ácido ascórbico-0.42 % (NH₄)Mo₇O₂₄ en 1 N H₂SO₄, 1/5, v/v), suplementado con 0.75% (p/v) SDS, tras otros 30 min a temperatura ambiente, las correspondientes actividades enzimáticas se determinaron espectrofotométricamente a 820 nm (Espectrofotómetro Shimadzu, mod.160) frente a una curva patrón de KH₂PO₄, expresándose la actividad específica en µmol Pi. mg⁻¹ proteína. h⁻¹. En la Tabla 1 se muestran los medios de reacción diferenciales utilizados para la determinación de las actividades ATPásicas asociadas a plasmalema, tonoplasto o mitocondria.

La orientación de las vesículas, natural o invertida, derivada del proceso de extracción, se calculó mediante el análisis de la latencia de las actividades ATPásicas, utilizando como agente permeabilizante de las vesículas el detergente Brij 58. La actividad latente se define como la diferencia entre las actividades medidas en presencia y ausencia de detergente, y la latencia de las vesículas como la actividad latente expresada en porcentaje de actividad ATPasa en presencia de detergente:

% Latencia =

$$\frac{(\text{Actividad presencia detergente} - \text{Actividad ausencia detergente}) \times 100}{\text{Actividad presencia detergente}}$$

Tabla 1. Medios de reacción utilizados para la determinación de las actividades de las ATPasas de plasmalema, tonoplasto y mitocondria.

	Plasmalema	Tonoplasto	Mitocondria
pH	6.5	8.0	8.0
BTP-MES (mM)	25	25	25
Na ₂ MoO ₄ (μM)	100	100	100
ATP-BTP (mM)	3	3	3
MgSO ₄ (mM)	3	3	3
Brij 58 (μg ml ⁻¹)	100	100	100
NaN ₃ (mM)	2	2	-
KNO ₃ (mM)	50	-	50
KCl (mM)	-	50	-
Ortovanadato (μM)	-	250	250

Actividad ATPasa de plasmalema. Definida como la actividad sensible a vanadato e insensible a nitrato, azida y molibdato (Serrano, 1990), se determinó como la diferencia de actividad en presencia y ausencia de 250 μM Na_3VO_4 en el medio específico de reacción:

$$\Delta \text{Va-ATPasa} = \text{Actividad (total)} - \text{Actividad (+Va)}$$

Actividad ATPasa de tonoplasto. Definida como la actividad sensible a nitrato e insensible a azida, vanadato y molibdato (O'Neill y col., 1983; White, 1994), se determinó como la diferencia de actividad en presencia y ausencia de 100 mM KNO_3 en el medio específico de reacción:

$$\Delta \text{NO}_3^- \text{-ATPasa} = \text{Actividad (+KCl)} - \text{Actividad (+KNO}_3\text{)}$$

Actividad ATPasa mitocondrial. Definida como la actividad sensible a azida (Galtier y col., 1988), se determinó como la diferencia de actividad en presencia y ausencia de 2 mM NaN_3 en el medio específico de reacción:

$$\Delta \text{N}_3 \text{-ATPasa} = \text{Actividad (-N}_3\text{)} - \text{Actividad (+N}_3\text{)}$$

E.3.2. Actividad UDPasa latente

La actividad fosfohidrolítica UDPasa latente, utilizada como marcador del aparato de Golgi (Green, 1983), se realizó en un medio de reacción con 30 mM BTP-MES, pH 6.5, 3 mM MnCl_2 , 3 mM UDP, y esta definido como la diferencia de actividad en presencia y ausencia de 0.1 % de Triton X-100.

E.3.3. Actividad NADH cit c reductasa insensible a antimicina A

La actividad NADH citocromo C reductasa se ha utilizado como marcador del Retículo Endoplasmático (Hodges y Leonard, 1974). Se adicionaron 30 μg de proteínas de membrana a un medio de reacción compuesto por 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.5, 1.66 mM KCN, 30 μM citocromo c oxidasa y 1 μM antimicina A. La reacción se inició con la adición al medio de 100 μM NADH, midiéndose el incremento de absorbancia a 550 nm, debido a la reducción del citocromo c. La actividad enzimática fue expresada en μmoles de citocromo c reducido. mg^{-1} proteína. h^{-1} (coeficiente de extinción molar de 18.5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

E.4. Determinación del transporte de H^+ en vesículas de membranas

La determinación del transporte de H^+ se basa en la medida de la velocidad inicial de extinción de fluorescencia de una sonda de pH, al acumularse en el interior de las vesículas en presencia de un gradiente de pH, ácido en el interior (Bennett y Spanswick, 1983). En este trabajo se ha utilizado el ACMA, por la sensibilidad de esta sonda a pequeños cambios intravesiculares de pH (Rottenberg y Moreno-Sánchez, 1993; Burgos y Donaire, 1996). Para medir la extinción de la emisión de fluorescencia del cromóforo ACMA se utilizó un espectrofluorímetro marca Shimadzu, modelo RF 540, provisto de sistema de agitación magnética y termostatación, en el que se fijaron las siguientes condiciones para el ACMA: λ_{exc} 415 nm, λ_{em} 485 nm, como longitudes de onda a las cuales se obtuvieron las fluorescencias máximas de emisión y excitación, con la sonda disuelta en etanol.

La actividad transportadora de H^+ asociada a la H^+ -ATPasa de plasmalema se definió como la fracción del transporte de H^+ inhibible por 600 μM vanadato. Las vesículas de membranas (100 μg de proteínas microsomales ó 15-50 μg de proteínas de plasmalema) se preincubaron durante 10 min a 27 °C en 1 ml de medio de reacción conteniendo 50 mM BTP-MES, pH 6.5, 100 mM KNO_3 , 1 μM ACMA, 5 mM ATP-BTP, 250 mM sacarosa y 1 μM valinomicina, iniciándose la reacción por adición de 5 mM MgSO_4 y determinándose el transporte de H^+ asociado a la ATPasa de plasmalema

como la diferencia de extinción de la fluorescencia del ACMA, a pH 6.5, en ausencia y presencia de 600 μM de vanadato.

En función del registro gráfico obtenido, se calcularon los siguientes parámetros que definieron la actividad bombeadora de H^+ en las vesículas de membrana (Bennett y Spanswick, 1983):

- Velocidad inicial de extinción (VQi): definida por la pendiente inicial de la curva de extinción de fluorescencia. La velocidad se calcula como el cociente entre la emisión inicial F_0 (100 %, en unidades arbitrarias) y el tiempo (t_i) necesario para que dicha emisión se extinga por completo a la velocidad inicial que marca dicha pendiente ($VQ_i = F_0/t_i$). VQi es expresado como % Q min^{-1} .
- Velocidad específica de extinción de fluorescencia (VQs): corresponde a la velocidad inicial expresada por mg de proteína ($VQ_s = VQ_i \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$) y se expresa como % Q $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$.
- Extinción máxima de fluorescencia (Q_{max}): representa la proporción de emisión extinguida (F) respecto a la emisión inicial (F_0) y se expresa en porcentaje ($Q_{\text{max}} = F/F_0 \times 100$).
- Razón H^+ extruídos / ATP hidrolizado: representa un índice estequiométrico de la reacción enzimática catalizada por la H^+ -ATPasa y fue calculado como el cociente entre la velocidad específica de extinción de fluorescencia ($\Delta V_a - VQ_s$) y la actividad fosfohidrolítica de la enzima sensible a vanadato ($\Delta V_a - \text{ATPasa}$).

E.5. Detección inmunológica de la H⁺-ATPasa de plasmalema

E.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Se incubaron 25 µg de proteínas microsomales o 12.5 µg de proteínas de vesículas de plasmalema a 30 °C durante 30 min en 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% SDS, 2% glicerol, 10 mM DTT, 0.00125 % azul de bromofenol, 4 mM PMSF y 100 µg.ml⁻¹ de quimostatina. La separación de las proteínas solubilizadas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida utilizando un equipo Mini-ProteanTM de Bio-Rad para geles de 8 x 7 cm y 1 mm de espesor (5 cm de gel de resolución y 2 cm de empaquetamiento) (Laemmli, 1970). El gel de resolución se preparó utilizando 10 % (p/v) de la mezcla acrilamida/bisacrilamida (30:0.8, p/p), 375 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.1 % (p/v) SDS, 0.05 % (p/v) persulfato amónico y 0.05 % (v/v) TEMED, y como gel de empaquetamiento una solución al 4 % (p/v) acrilamida/bis, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 % (p/v) SDS, 0.05 % (p/v) persulfato amónico y 0.1 % (v/v) TEMED.

En cada pocillo se cargaron 25 µg de proteínas solubilizadas en tampón de Laemmli de cada una de las muestras y de los patrones de peso molecular conocido. La electroforesis se llevó a cabo en tampón constituido por 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1 % SDS a temperatura ambiente, y a voltaje constante de 100 V, detuviéndose una vez que el frente de azul de bromofenol llegó a 0.5 cm del borde inferior del gel. Para el análisis del perfil protéico, uno de los geles se tiñó con Coomassie, y otro se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa para proceder al inmunoensayo con anticuerpos específicos.

Para el revelado de las diferentes bandas de proteínas, los geles se fijaron y tiñeron directamente con 0.25 % (p/v) Coomassie Brilliant Blue R en metanol:ácido acético:agua (40:10:50, v/v/v), durante 1-2 h en agitación, y se destiñeron durante 3-5 h con metanol:ácido acético:agua (40:10:50, v/v/v).

E.5.2. Electrotransferencia e inmunodetección de la H⁺-ATPasa de plasmalema

Finalizado el desarrollo electroforético, las proteínas se electrotransfirieron de los geles a membranas de nitrocelulosa (0.45 µm de tamaño de poro, Bio-Rad), siguiendo esencialmente el método de Towbin y col., (1979). Los geles a transferir, membranas de nitrocelulosa, papeles de filtro, y demás componentes del sandwich de transferencia, se incubaron en tampón de transferencia constituido por 0.01 M CAPS, pH 11.0 y 10 % (v/v) metanol.

La electrotransferencia se llevó a cabo en el sistema Mini Trans-Blot™ de Bio-Rad a voltaje constante de 100 V durante 1 h a 4°C. Posteriormente, tras un breve lavado con agua destilada, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron reversiblemente con Ponçeau S (0.1 % (p/v) en 1 % (v/v) ácido acético), para visualizar y señalar los patrones de peso molecular, y las membranas, lavadas con agua destilada para eliminar el colorante, se procesaron inmediatamente para el inmunoensayo. Para evaluar la eficacia de la transferencia, el gel electrotransferido se tiñó con Coomassie.

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se incubaron durante 90 min a temperatura ambiente con medio TBSL compuesto por 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl y 0.2 % (p/v) de leche en polvo desnatada, para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana de nitrocelulosa.

La detección de la proteína antigénica correspondiente a la ATPasa de la membrana plasmática se llevó a cabo incubando a 4 °C durante 12-15 h en agitación con anticuerpos policlonales de conejo frente al extremo carboxilo terminal (aminoácidos 851-949) de la ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis thaliana*, a una dilución de 1:700 en TBSL. Los anticuerpos, obtenidos según describen Parets-Soler y col., (1990) fueron amablemente cedidos por Dr. Ramón Serrano, Universidad Politécnica de Valencia.

Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 min con TBSL, para eliminar tanto el exceso de anticuerpo no fijado como el fijado de forma inespecífica. Posteriormente, para revelar las bandas correspondientes al anticuerpo primario fijado a la proteína, las membranas se incubaron

3 h con anticuerpo secundario (anti IgG de conejo, Promega) ligado a la fosfatasa alcalina, diluida 1:5000 en TBSL. Tras un doble lavado con TBSL, para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, y un lavado rápido con el tampón de la fosfatasa alcalina, tampón Tris-HCl 100 mM pH 9.0, 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂, el revelado de la reacción de la fosfatasa alcalina se llevó a cabo utilizando los sustratos cromogénicos BCIP (33 µg ml⁻¹) y NBT (16.5 µg ml⁻¹) en el tampón correspondiente, desarrollándose el color a la oscuridad y a temperatura ambiente.

La reacción se detuvo por lavados con agua destilada, y se procedió al secado de la membrana y su registro con la ayuda de un analizador de imagen *Gel Doc System, Bio-Rad*. Finalmente, los contenidos relativos de proteína antigénica en las membranas de nitrocelulosa se determinaron por densitometría mediante el programa *Quantity One de Bio-Rad*.

E.6. Estudio de la expresión de transportadores iónicos de membranas

E.6.1. Hibridación por Northern

Los niveles de expresión de los genes que codifican para las proteínas transportadoras de iones que se indican a continuación, se determinaron a partir del ARN total de los callos controles y transgénicos, mantenidos en presencia o ausencia de NaCl, por hibridación en *Northern-blot*.

E.6.1.1. Sondas de ADNc utilizadas

Se han utilizado las siguientes sondas homólogas de ADNc:

- ✓ Fragmento de ADNc de 0.55 kb, correspondiente a la pirofosfatasa vacuolar de tomate, obtenido por RT-PCR y clonado por extremos cohesivos en el plásmido pGEM-T (Kerkeb, 2000) (cedido por el Dr. A. Belver, Estación Experimental del Zaidín-CSIC, Granada).

- ✓ Fragmento de ADNc de 0.77 kb, correspondiente a la subunidad A (70 kD) de la V-H⁺-ATPasa vacuolar de tomate, obtenido por PCR a partir de una genoteca de pelos radiculares de tomate, construida en el vector fagémido λZAP II (Stratagene) (Bucher y col. 1997) y, posteriormente, clonado en el sitio EcoRV del plásmido pSTBlue-1 (Kerkeb, 2000) (cedido por el Dr. A. Belver, Estación Experimental del Zaidín-CSIC, Granada).
- ✓ Fragmento de ADNc de 0,72 Kb, correspondiente a la subunidad C de la V-H⁺-ATPasa vacuolar de tomate (cedido por el Dr. K. Bradford U.C. Davis, California).
- ✓ Fragmento de ADNc de 0,237 Kb, correspondiente a la isoforma LHA4 de la H⁺ ATPasa de plasmalema (cedido por la Dra. N. Ferrol Estación Experimental de Zaidín-CSIC, Granada).

E.6.1.2. Extracción de ARN total de los callos

La extracción de ARN total de los callos de tomate, previamente congelados en N₂ líquido y almacenado a -70 °C, se llevó a cabo por el método de Logemann y col., (1987). El tejido se homogeneizó en mortero de porcelana con N₂ líquido hasta la obtención de polvo fino, se pasó el material a un tubo de centrifuga de 13 ml, se añadió tampón de extracción (0.5 ml. g⁻¹ peso fresco) conteniendo 8 M hidrocloreuro de guanidina, 20 mM MES, pH 7.0, 20 mM EDTA, 50 mM β-mercaptoetanol y mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (0.5 ml.g⁻¹ peso fresco), agitándose vigorosamente durante 15 min. El homogeneizado resultante se centrifugó a 15.000 g durante 15 min (Sorvall, rotor SS-34), se transfirió la fase superior acuosa a un nuevo tubo, se le adicionaron 700 µl de etanol y 200 µl de ácido acético 1M, ambos por ml de fase acuosa, para la precipitación selectiva de ARN total, incubándose el conjunto toda la noche a -20 °C. La mezcla se centrifugó durante 15 min a 15.000 g y el sedimento obtenido se lavó 2 veces con 1 ml de acetato potásico 3M, pH 5.2, para disolver los polisacáridos contaminantes, centrifugándose una vez más durante 10 min a 15.000 g. Se adicionó al sedimento 1 ml de etanol al 70 % en agua-DEPC, se agitó durante 5 min y se centrifugó a 15.000 g. El sedimento obtenido, conteniendo el ARN total, se centrifugo a vacío en *speed vacuum*, para eliminar trazas de etanol, y se disolvió en un volumen

reducido de agua-DEPC por calentamiento a 56 °C, almacenándose a -70 °C hasta su utilización posterior.

La cuantificación y determinación del grado de pureza del ARN obtenido se realizó mediante el registro del espectro de absorbancia entre 230 y 320 nm (Shimadzu, mod. UV 160) en una alícuota de la preparación de ARN total diluida 100 veces, teniendo en cuenta que la $A_{260}=1$ corresponde a una concentración de 40 µg ARN total por ml. Todas las preparaciones de ARN tuvieron una razón A_{260}/A_{280} superior a 1.8 y A_{260}/A_{230} superior a 2.0, indicando mínima contaminación por proteínas y polisacáridos, respectivamente.

E.6.1.3. Marcaje de las sondas de ADNc con ^{32}P -dCTP por cebamiento al azar

Tras desnaturalización por calentamiento a 100 °C durante 5 min, las sondas de ADNc se marcaron con 5 µl de α - ^{32}P dCTP (3000 Ci mmol⁻¹) durante 10 min a 37 °C utilizando el método de cebamiento al azar (*random priming*) (Sambrook y col. 1989), y el *kit rediprimeTM II* (Amersham Pharmacia Biotech), siguiendo las instrucciones del fabricante, es decir 25 ng de sonda en 45 µl de TE.

Los fragmentos marcados con ^{32}P se purificaron por centrifugación en *Mini Quick SpinTM columns* (Boehringer) que contenía Sephadex G-50 en tampón 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl (STE).

E.6.1.4. Separación del ARN en geles desnaturalizantes de formaldehído

Se ha seguido el protocolo descrito por Sambrook y col., (1989) con algunas modificaciones. Para ello 10 µg de ARN total se disolvieron en 35 µl de tampón de muestra conteniendo 6.0 % (v/v) de formaldehído, 1 x tampón MAE (20 mM MOPS, pH 7.0, 8 mM acetato sódico, 1 mM EDTA), 5.0 % (v/v) glicerol, 5.0 % (v/v) formamida desionizada, 0.04 % azul de bromofenol y 0.5 % µg ml⁻¹ bromuro de etidio, incubándose 10 min a 65 °C. Tras enfriar las muestras en hielo, se cargaron en un gel de agarosa al 1.25 % (p/v) en 1 x MAE, conteniendo formaldehído al 1 %, y se desarrolló a 7.5 V cm⁻¹,

durante 2 h, en tampón 1 x MAE. Tras el desarrollo electroforético, el gel se lavó con agua-DEPC, y posteriormente, 2 x 20 min en 2 x SSC (0.3 M NaCl, 30 mM citrato sódico, pH 7.0) para eliminar el formaldehído, tras lo cual el ARN se visualizó en el gel por iluminación UV, (fotografiándose en un analizador de imagen *Gel Doc System, Bio-Rad*), para comprobar que se cargaron en el gel cantidades idénticas de ARN y no existía degradación.

E.6.1.5. Transferencia del ARN a filtros de nylon

Para la hibridación *Northern* (Sambrook y col. 1989), el ARN se transfirió por capilaridad a membranas de nylon (Hybond™ N⁺, 0.2 μm de poro, Amersham, Life Science), en 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M citrato sódico, pH 7.0), durante 12-16 h. El sistema de transferencia se formó de abajo a arriba, sobre un soporte de cristal, con los siguientes componentes: papel Wathman 3 MM humedecido en el líquido de transferencia, el gel, la membrana de nylon, papel Wathman 3 MM (todos ellos cortados al mismo tamaño que el gel y previamente mojados en 2 x SSC), y una pila de unos 5-7 cm de servilletas de papel, también cortadas al mismo tamaño del gel. Sobre el conjunto se colocó una placa de vidrio con un peso de 500-800 g. Finalizada la transferencia, la membrana se lavó con 2 x SSC, y el ARN se fijó covalentemente a la membrana en horno de vacío a 120 °C durante 30 min entre piezas de papel Wathman 3 MM.

E.6.1.6. Condiciones de hibridación

Para todas las sondas, la hibridación se llevó a cabo por el método del PSE (Church y Gilbert, 1984). Inicialmente, las membranas se prehibridaron, durante al menos 30 min a las temperaturas indicadas en la Tabla 2, con 0.3 ml cm⁻² con medio PSE que contenía 7 % SDS, 0.3 M fosfato sódico, pH 7.2, y 1 mM EDTA. Posteriormente, las membranas se hibridaron durante 10-16 h con 30 μl cm⁻² de medio PSE con sonda marcada. Tanto las temperaturas como los lavados (0.5 ml. cm⁻²) se especifican en la Tabla 2 para cada sonda utilizada.

Tabla 2. Condiciones de hibridación y lavados de cada una de las sondas utilizadas en el Northern-blot.

	Tamaño (pb)	Prehibridación 30 min (°C)	Hibridación (°C)	1 ^{er} lavado 15 min (°C)	2 ^o lavado 15 min (°C)	3 ^{er} lavado 15 min (°C)
LHA4	237	60	60	55 4x SSC 0,1% SDS	55 4x SSC 0,1% SDS	55 1x SSC 0,1% SDS
Pirofosfa-tasa	500	65	65	65 4x SSC 0,1% SDS	65 4x SSC 0,1% SDS	65 0,4x SSC 0,1% SDS
Sub C V-ATPasa	723	65	65	65 4x SSC 0,1% SDS	65 4x SSC 0,1% SDS	65 0,4x SSC 0,1% SDS
Sub A V-ATPasa	777	65	65	65 4x SSC 0,1% SDS	65 4x SSC 0,1% SDS	65 0,4x SSC 0,1% SDS
LeNHX 2	500	60	60	55 4x SSC 0,1% SDS	55 4x SSC 0,1% SDS	55 0,4x SSC 0,1% SDS

E.6.1.7. Detección y cuantificación de los niveles de expresión génica

Cada membrana se envolvió en papel de plástico transparente y se introdujo en un casete de Autoradiografía, conteniendo una película Hyperfilm™ y pantalla intensificadora (Dupont), exponiéndose 1-5 días a -70 °C. Para el revelado de la película se procedió:

- ✓ Al revelado durante 0-1 min a 25 °C con revelador y regenerador G150 (AGFA).
- ✓ A la fijación durante 10 min con fijador radiográfico G350 (AGFA).
- ✓ Al lavado final durante unos min con agua del grifo.
- ✓ Al secado de la película al aire.

Finalmente la película fue digitalizada en un analizador de imagen (*Gel Doc System, Bio.Rad*) y alternativamente, los filtros se expusieron en pantallas de Phosphorimager (Bio-Rad Molecular Imagen System) y las señales de hibridación se registraron en un Analizador de Phosphorimager (Bio-Rad Molecular Imagen System). Los niveles de expresión génica para cada muestra, se cuantificaron midiendo la intensidad de la banda en relación a la intensidad de hibridación del gen constitutivo 18S ribosomal de tomate, mediante el programa Quantity One de Bio-Rad.

E.6.2. Estudios de expresión mediante RT-PCR en tiempo real

Esta técnica se utilizó para determinar la expresión diferencial de algunos transportadores de membrana, tanto en callos de tomate controles y transgénico mantenidos en ausencia y presencia de 100 mM de NaCl. La extracción de ARN total se llevó a cabo mediante extracción por columnas de “*Qiagen*” RNeasy Plant Mini Kit, obteniéndose un ARN puro, libre de ADN.

E.6.2.1. Obtención de ADNc a partir de ARN total por RT-PCR. Transcripción inversa del ARN

La primera hebra de ADNc se sintetizó a partir del ARN total extraído de los callos de tomate, utilizando como cebador el propio cebador reverso específico del gen a cuantificar y el enzima transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis de ave (AMV-RT) (Sigma).

Previo a la reacción de RT, se incubó durante 10 min a 77.5 °C, 1 µg de ARN total en presencia de 0.5 mM de cada uno de los dNTPs y 3.5 µM del cebador random nonamers. Tras breve enfriamiento en hielo, se añadió tampón 1 x de AMV-RT (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 40 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 1 mM DTT), 0.25 U µl⁻¹ inhibidor de ARNasas y 0.5 U µl⁻¹ AMV-RT, en un volumen total de 20 µl. La reacción se llevó a cabo a 25 °C durante 15 min y, posteriormente, a 48 °C durante 50 min.

E.6.2.2. PCR en tiempo real

El método se basa en la detección de fluorescencia, proporcional a la cantidad de producto de PCR formado. El proceso de monitorización se llevó a cabo mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida por SYBR Green (Molecular Probes), un fluoróforo con capacidad para unirse a ADN de doble cadena, lo que permitió determinar la cantidad de la secuencia "blanco" amplificada durante la PCR.

La población de primeras hebras de ADNc, obtenida por transcripción inversa, se utilizó como molde para amplificar por PCR los genes de interés. El medio de reacción de PCR (25 μ l) incluía: 1 μ l de la reacción de transcripción inversa, tampón de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 0.05 % -p/v- gelatina), 200 μ M de cada uno de los dNTPs, 0.3 μ M de los cebadores específicos, 3 mM de MgCl₂, una dilución 1/5000 de SYBR Green y 2.5 U de Taq ADN polimerasa platinum (Invitrogen). Cada muestra se analizaba en tres diluciones diferentes con tres replicas de cada una, mas tres blancos de muestra. El protocolo de amplificación consistió en 3 min a 94 °C, 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C (x45 ciclos), añadiendo al final una curva de melting para conocer la posible formación de dímeros de cebadores. Esta curva se obtuvo midiendo la fluorescencia durante el incremento de temperatura, 1 grado por minuto entre 0 y 100 °C. Como la temperatura a la que la doble cadena de ADN se separa en cadenas simples depende de su tamaño, se observa una disminución de la fluorescencia al subir la temperatura que se corresponde con la separación de cadenas dobles de ADN de fragmentos cada vez más grandes. Finalmente se analiza el logaritmo de la pérdida de fluorescencia frente a los grados de temperatura, obteniendo picos en aquellas temperaturas donde se hayan separado cadenas de ADN. Los dímeros de cebadores se caracterizan por la formación de un pico a baja temperatura debido a su pequeño tamaño.

Posteriormente, para la cuantificación de los genes estudiados, se determinaron los ciclos a los que amplifica cada muestra denominados c_t (threshold cycle: ciclo umbral). El c_t se corresponde con el punto de corte de cada curva con la línea umbral, la cual se establece en un rango de fluorescencia por encima del fondo y la fase estacionaria de amplificación en la zona más paralela de las curvas. Finalmente cada gen se relativizó con el ribosómico 18S de cada muestra (Bustin, 2002):

$$c_t \text{ muestra} - c_t \text{ ribosómico 18S} = \Delta c_t \text{ muestra}$$
$$\Delta c_t \text{ muestra} - \Delta c_t \text{ muestra control} = N; \quad 2^N = X$$

El valor X corresponde a la razón cantidad de ADN muestra / ADN control.

V. RESULTADOS

A. OBTENCIÓN DE CALLOS DE TOMATE TRANSGÉNICO

Como se indicó en el apartado de material y métodos (C.1) la obtención de callos de tomate transgénicos en calcineurina de levadura se realizó en varias etapas, las cuales incluyen desde la transformación de los cotiledones hasta la aparición de los callos.

La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utilizó como herramienta genética para transformar las células de tomate con los genes de la calcineurina de levadura, mediante el sistema vector binario para la coexpresión de una subunidad truncada y constitutivamente activada de la subunidad catalítica y la subunidad reguladora de dicha proteína. Una vez introducido el plásmido en *E. coli* para su multiplicación y para la producción de un stock bacteriano, se aisló el plásmido de *E. coli* y se transformó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404, mediante la técnica de electroporación descrita en material y métodos (apartado B.1.2.), obteniéndose el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*, posteriormente utilizado para la infección, del que se generó un stock.

En un primer intento se utilizaron suspensiones celulares de tomate, comprobándose que la proliferación de *Agrobacterium tumefaciens* en el medio de cultivo de estas suspensiones celulares era incontrolable, incluso en presencia de antibióticos del tipo de la carbenicilina o cefotaxima, a los que esta bacteria es sensible. Tras muchos intentos, se obtuvieron células de tomate transformadas infectando los cotiledones, a partir de los cuales se regeneraron plántulas transformadas en medio de regeneración de tallo y, finalmente, se obtuvieron callos transformados de los explantos de los tallos transformados.

A.1. Regeneración de plántula a partir de cotiledones transformados con pBtCan

A partir de los cotiledones transformados se obtuvieron tallos después de 4 a 6 semanas en medio de selección suplementado con kanamicina (Figura 1, T). Aunque también se regeneraron pequeños tallos a partir de cotiledones no transformados, éstos eran incapaces de seguir creciendo en el medio de selección con kanamicina (Figura 1, NT).

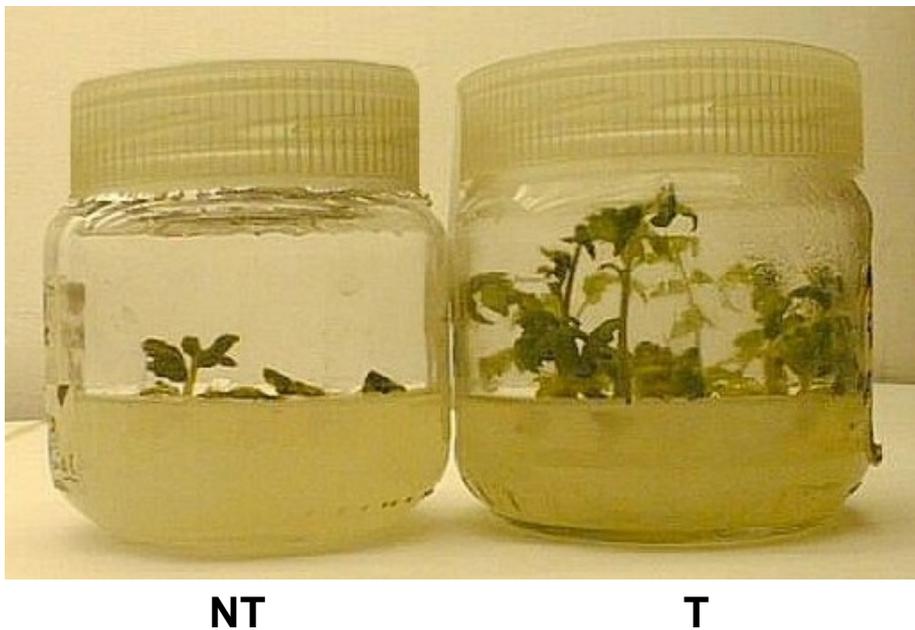


Figura 1. Regeneración de plántulas a partir de cotiledones de tomate transformados con pBTCaN. Los tallos se regeneraron mediante cultivo de cotiledones no transformados (NT) y transformados (T) en MRT suplementado con 50 µg/ml de kanamicina.

En la Figura 2 se muestra el resultado del análisis mediante PCR de la presencia de las subunidades CNAtr y CNB de la calcineurina de levadura en el ADN genómico de hojas jóvenes de las plántulas de tomate transformadas. Se detectó la presencia de estas subunidades en 8 de las 10 plántulas estudiadas. Asimismo, quedó confirmada la ausencia de contaminación bacteriana en las plántulas transformadas tras comprobar por PCR la ausencia del gen Vir-D.

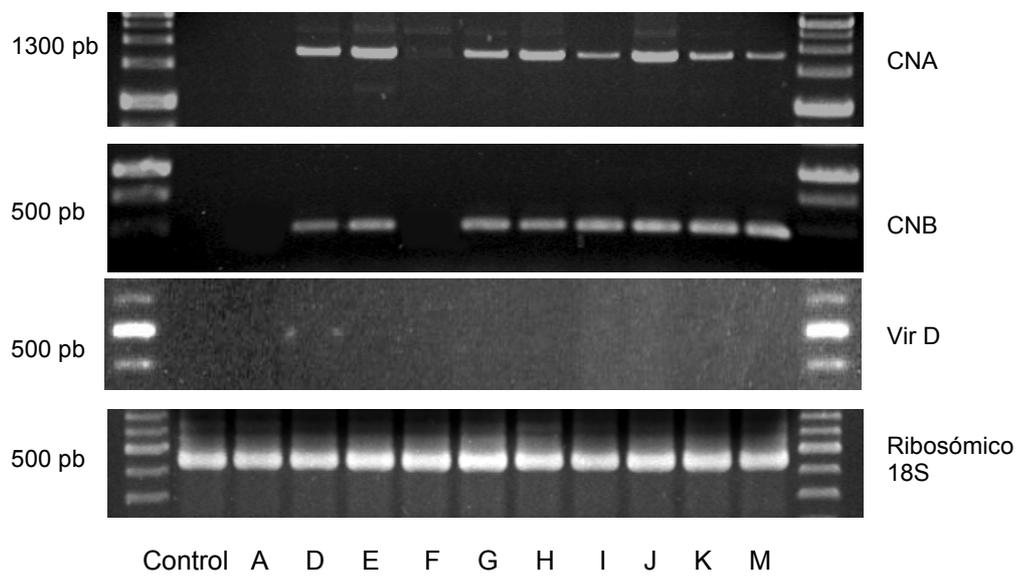


Figura 2. Análisis por PCR del ADN genómico de plántulas de tomate transformadas con pBTCaN. Detección de los genes CNAtr, CNB, VirD y de la subunidad 18 S ribosómica de tomate, en las plántulas transformadas (A-M) y en las plántulas controles, no transformadas.

A.2. Obtención de callos a partir de tallos transformados

La callogénesis se indujo a partir de explantos de tallos, en presencia de kanamicina. Únicamente formaron callos los explantos procedentes de los callos transformados y no de los controles (Figura 3).

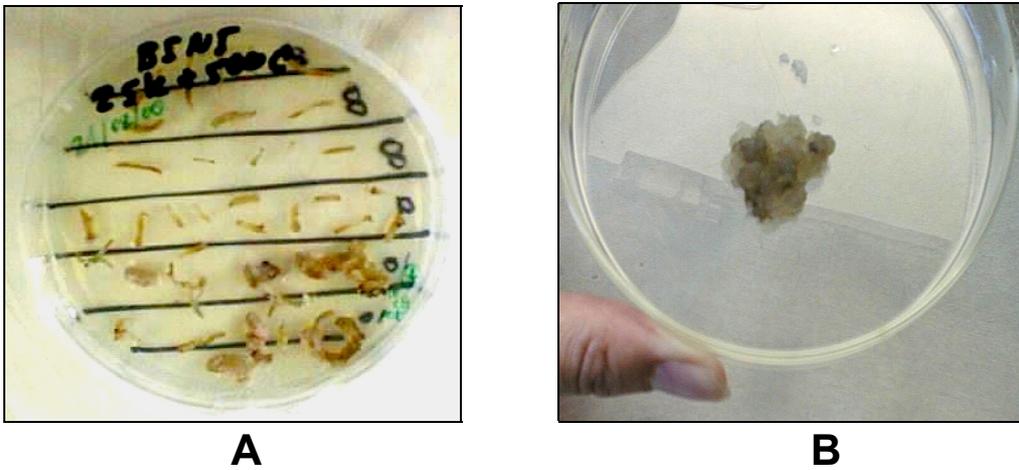


Figura 3. Obtención de callos por incubación de explantos de tallos de plántulas no transformadas y transformadas en medio de calogénesis suplementado con 25 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina **(A)**. Callo obtenido tras sucesivos cultivos en medio de multiplicación suplementado con 25 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina **(B)**.

Aunque algunos de los explantos transformados no formaron callo, siendo considerados falsos positivos, sí lo hicieron todos los explantos procedentes de tallos de las plantas regeneradas E, H y J. Así, de las tres plantas diferenciadas se obtuvieron un total de doce líneas de callos, E: L1, H: L2, L3, L4, L5, L6 y J: L7, L8, L9, L10, L11 y L12 algunas de las cuales no sobrevivieron más allá del segundo o tercer subcultivo, manteniéndose tras varias generaciones, tan sólo ocho líneas transformadas, E: L1, H: L2, L5 y L6 y J: L7, L8, L9 y L12. De forma habitual, los callos transformados se aislaron y se subcultivaron en medio fresco con una periodicidad de tres semanas, hasta generar masa suficiente para poder llevar a cabo estudios posteriores de caracterización.

A.3. Análisis de la transformación

Como primer paso, en los callos transformados se confirmó la presencia de CNAtr y CNB, así como la ausencia del gen Vir-D en su ADN genómico, para descartar contaminación bacteriana. El análisis por PCR demostró la integración de la calcineurina de levadura en el genoma del tomate (Figura 4).

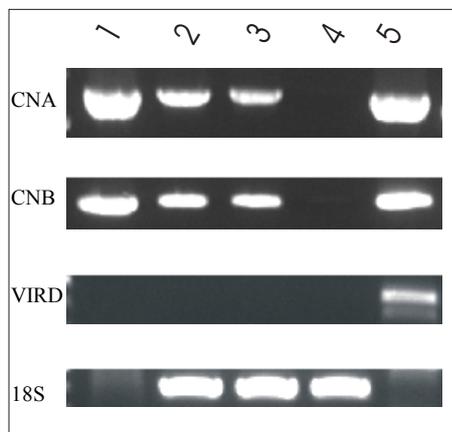


Figura 4. Análisis por PCR del ADN genómico de callos de tomate transformados con pBTCaN. Detección de los genes CNAtr (A), CNB (B), VirD (C) y de la subunidad 18 S ribosómica de tomate (D), en el Vector pBTCaN (1), en los callos transformados (2 y 3), en los callos controles no transformados (4), y en el ADN de *A. tumefaciens* LBA4404 transformado con pBTCaN (5).

Para su funcionalidad, el cultivo transgénico debe incorporar a su genoma el transgen y posteriormente expresarlo. Para verificar estos requerimientos, tras comprobar la presencia de las dos subunidades de CaN en el ADN genómico de los callos transformados (Figura 4), se estudiaron, por RT-PCR a partir del ARN total, los niveles de expresión de ambas subunidades, CNAtr y CNB, en diferentes líneas de callos transgénicos, refiriendo la cuantificación al ribosómico 18S (Figura 5 y 6). Como puede observarse, los niveles de expresión son similares entre las distintas líneas de callos siendo más abundante la subunidad reguladora CNB en todos los casos.

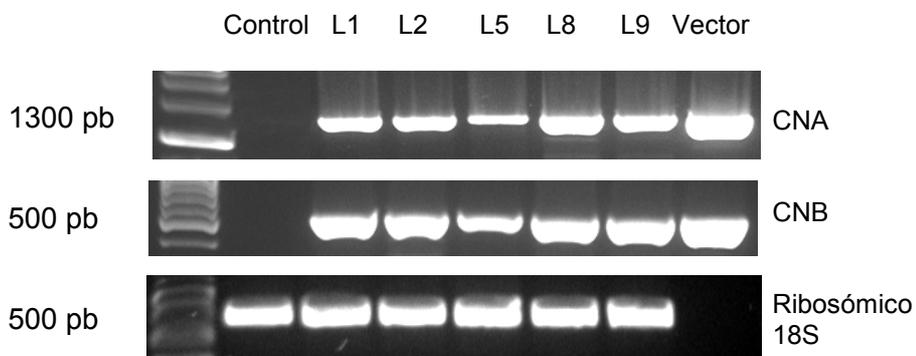


Figura 5. Visualización, en geles de agarosa, de la expresión de los ARNm correspondientes a las subunidades CNA y CNB de calcineurina.

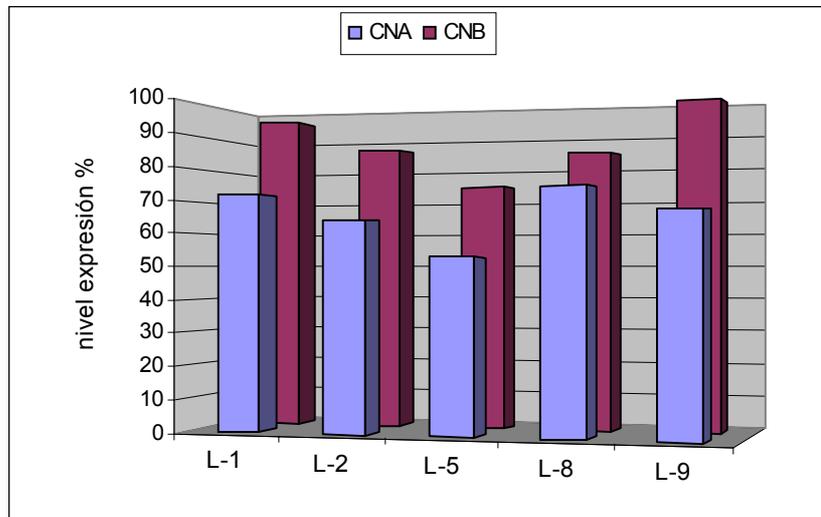


Figura 6. Niveles de expresión de las subunidades CNA y CNB en diferentes líneas de callos transgénicos; cuantificación referida al ribosómico 18S.

A.4. Morfología celular

La observación de las células de tomate controles y transformadas con calcineurina, ha mostrado que la transformación conlleva una disminución del tamaño celular, un mayor grado de elongación y la aparición de septos que dividen la célula en múltiples compartimentos (Figura 7).



Figura 7. Observación al microscopio óptico de células de tomate controles (C) y transgénicas (T).

B. ESTUDIOS FISIOLÓGICOS A NIVEL DE CALLOS

B.1. Crecimiento celular y análisis del contenido iónico

Teniendo en cuenta que la inhibición del crecimiento es uno de los primeros efectos que se manifiestan en plantas ante un estrés salino o hídrico (Serrano, 1996), en cuatro de las líneas celulares transgénicas obtenidas se realizaron estudios de crecimiento, como parámetro indicativo de tolerancia a la sal. El análisis del peso fresco y del índice de crecimiento relativo durante 5 semanas, demostró una ligera inhibición del crecimiento en los callos transgénicos frente a los controles en ausencia de NaCl (Figura 8). El tratamiento con 100 mM de NaCl inhibió el crecimiento de ambos tipos de callos, siendo más drástica, esta inhibición, en el caso de los callos controles (Figura 9).

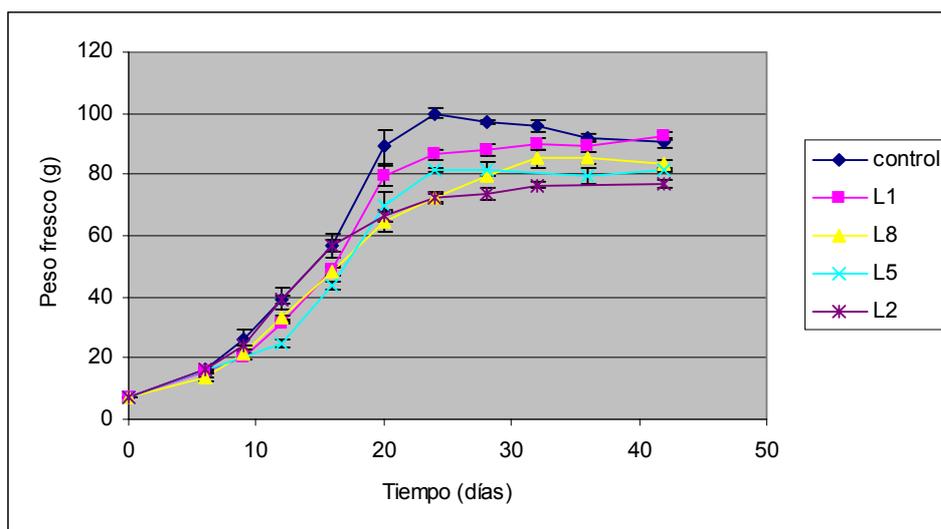


Figura 8. Crecimiento, expresado como gramos de peso fresco, de callos de tomate. Los resultados son la media \pm DE de 4 repeticiones independientes con los parámetros determinados por duplicado.

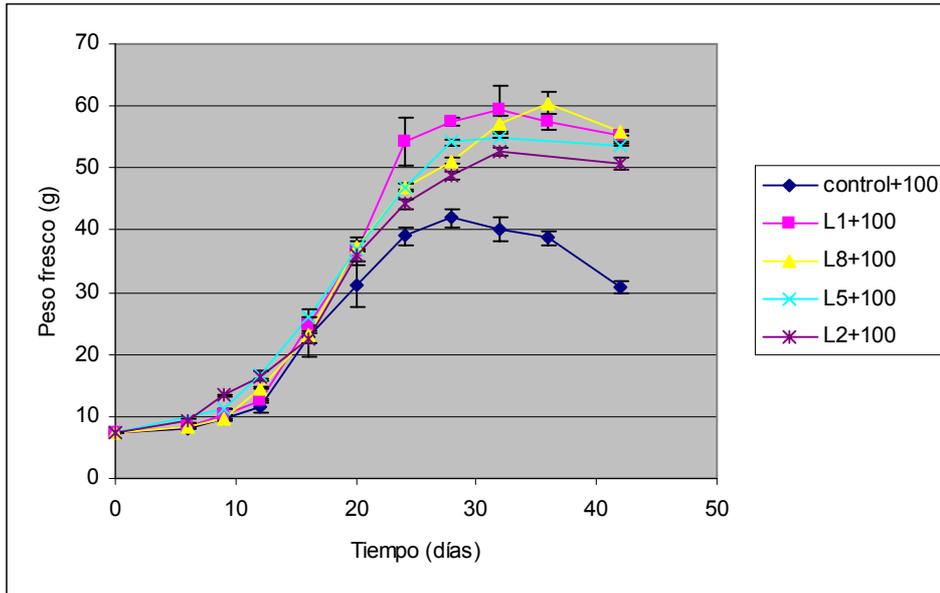


Figura 9. Crecimiento de los callos de tomate, expresado como gramos de peso fresco, mantenidos durante 5 semanas en presencia de 100 mM de NaCl. Los resultados son la media \pm DE de 4 experimentos independientes con los parámetros determinados por duplicado.

Tabla 1. Índice de Crecimiento Relativo (ICR) de los callos controles y transgénicos, desarrollados en ausencia y presencia de 100 mM de NaCl.

NaCl mM	ICR				
	C	L1	L2	L5	L8
0	12,6	11,59	9,46	10,6	10,12
100	4,71	7,05	6,17	7,22	6,47

El ICR mostró una inhibición en los callos transgénicos (35%) y, sobre todo, en los callos controles (62%), sometidos a un estrés por 100 mM NaCl (Tabla 1).

El hecho conocido de que, en las células vegetales, el mantenimiento de la homeostasia iónica se ve afectado por el estrés salino (Niu y col.; 1995, Datta y col.; 1996), unido a la constatación de que la calcineurina es un regulador de la homeostasis iónica en levaduras (Mendoza y col., 1994), llevó a realizar un análisis del contenido intracelular de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- en los callos de tomate controles y transgénicos en dicha proteína fosfatasa.

Los resultados obtenidos muestran que los contenidos de Na^+ y Cl^- en los callos controles y transgénicos son similares (Figura 10), mientras que en el caso del Ca^{2+} y el K^+ , los callos transgénicos acumulan más cantidad de estos iones. Tras un estrés por 100 mM NaCl es observable un fuerte incremento de Na^+ y de Cl^- en ambos tipos de callos, aunque en el caso del Cl^- el incremento es inferior en los callos transgénicos. Del mismo modo, también en presencia de 100 mM de NaCl los callos transgénicos acumulan más cantidad de Ca^{2+} y K^+ que los controles. De ello se deriva una razón K^+/Na^+ significativamente mayor en los callos transgénicos que en los controles (Tabla 2). Por otra parte, la sobreexpresión de calcineurina de levadura no alteró el contenido hídrico de los callos de tomate, mientras que este parámetro se vio significativamente reducido tanto en callos controles como transgénicos desarrollados durante 5 semanas con 100 mM NaCl (Tabla 3).

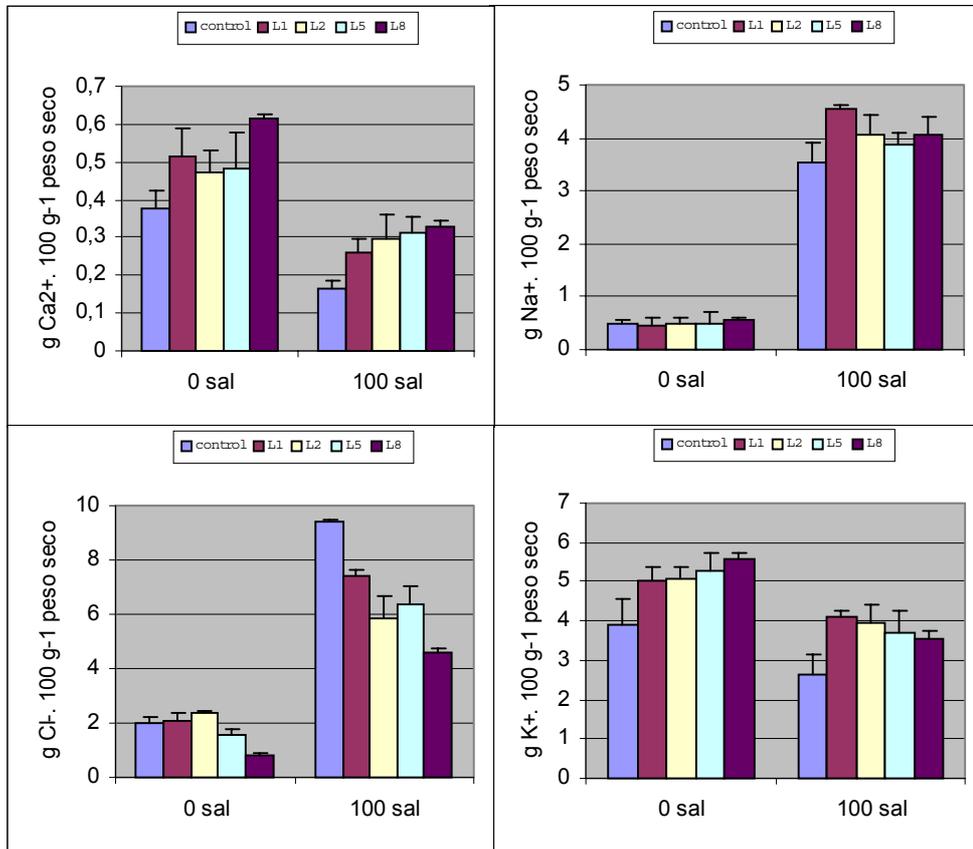


Figura 10. Contenido iónico, expresado en g.100 g⁻¹ peso seco, de callos de tomate controles y transgénicos en calcineurina de levadura cultivados durante 5 semanas en presencia y ausencia de 100 mM de NaCl. Los resultados son la media ± D.E de 6 experimentos independientes.

Tabla 2. Razón K^+/Na^+ en callos de tomate controles y transgénicos en calcineurina de levadura mantenidos durante 5 semanas en presencia y ausencia de 100 mM NaCl. Los resultados son la media \pm DE de 6 experimentos independientes.

Tratamiento	K^+ / Na^+
Control	8.30
Control + 100 mM NaCl	0.75
Transgénico L1	10.92
L1 + 100 mM NaCl	0.90
Transgénico L2	10.66
L2 + 100 mM NaCl	0.98
Transgénico L5	10.44
L8 + 100 mM NaCl	0.96
Transgénico L8	10.2
L9 + 100 mM NaCl	0.88

Tabla 3. Peso fresco, peso seco y porcentaje de peso seco frente a peso fresco de callos de tomate controles y transgénicos mantenidos durante 5 semanas en presencia y ausencia de 100 mM NaCl. Los resultados son la media \pm DE de 6 experimentos independientes.

Tratamiento	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	% PS/PF
Control	36.17 \pm 6.85	0.94 \pm 0.24	2.59
Control + 100 mM NaCl	13.26 \pm 1.62	0.58 \pm 0.05	4.40
Transgénico L1	30.15 \pm 4.78	0.77 \pm 0.12	2.55
L1 + 100 mM NaCl	19.93 \pm 4.86	0.87 \pm 0.09	4.37
Transgénico L2	27.79 \pm 2.50	0.76 \pm 0.12	2.72
L2 + 100 mM NaCl	17.00 \pm 3.15	0.79 \pm 0.10	4.65
Transgénico L8	25.19 \pm 3.37	0.73 \pm 0.07	2.88
L8 + 100 mM NaCl	17.65 \pm 1.74	0.80 \pm 0.22	4.51

B.2. Extrusión de H^+ por las células de los callos disgregados

Previo a los estudios llevados a cabo para determinar la actividad extractora de H^+ , se observó que las células disgregadas de callos transgénicos acidificaban menos el medio de reacción que las controles (Figura 11). Es decir, las células transgénicas funcionaban a un pH más alcalino, tres décimas, aproximadamente, por encima de los controles.

El transporte activo de iones y solutos a través de las membranas celulares de plantas superiores está dirigido por sistemas de transporte electrogénico de H^+ ubicados, principalmente, en el plasmalema y en el tonoplasto (Serrano, 1985; Zhen y col., 1997; Palmgren, 1998; Sze y col., 1999). De la actuación de estos sistemas se deriva la creación de una diferencia de potencial eléctrico a través de estas membranas y una diferencia de pH, de forma que el gradiente electroquímico generado por el bombeo de H^+ , constituye la fuerza motriz para el transporte de los diferentes iones y solutos, mediante una serie de transportadores secundarios ubicados en estas estructuras (Sáez col., 1999), tal y como predice la teoría quimiosmótica de Mitchel (Mitchel, 1976).

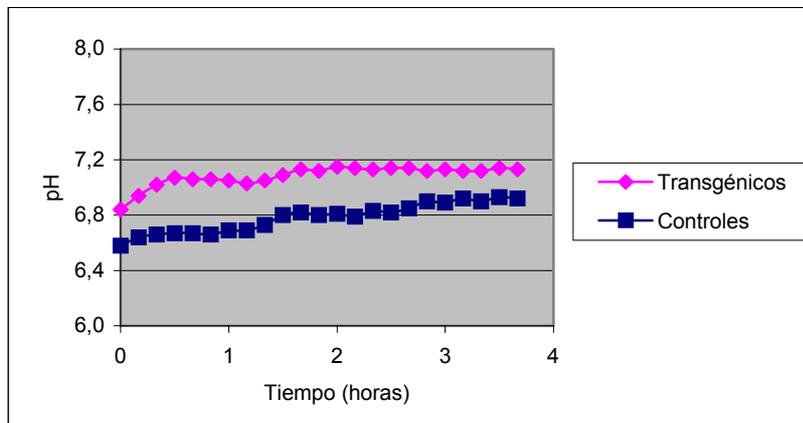


Figura 11. Cambios en los valores de pH a lo largo del tiempo, inducidos por células de tomate controles y transgénicas en calcineurina de levadura. Los resultados son la media \pm DE de 4 experimentos independientes.

Teniendo en cuenta que calcineurina regula la homeostasis iónica en levaduras al actuar sobre sistemas que transportan iones, (Na^+ , H^+ y Ca^+), en este trabajo hemos investigado la actividad extractora de H^+ por células de callos de tomate controles y transgénicos en calcineurina de levadura, mantenidas en ausencia y presencia de 100 mM NaCl en el medio de reacción. Debido a la diferencia de comportamiento entre los callos controles y transgénicos con respecto al pH del medio utilizamos un pH de 7.3 para la determinación de la capacidad de extrusión de H^+ . En estas condiciones se observó una significativa menor extrusión en las células de callos transgénicos con respecto a los controles (Figura 12).

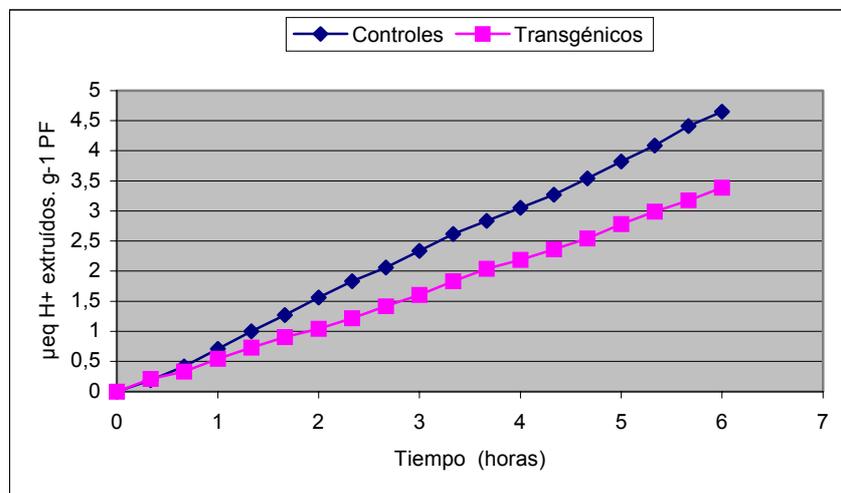


Figura 12. Extrusión de H^+ por células de callos de tomate disgregados controles y transgénicos. Los resultados, expresados como flujo acumulativo de $\mu\text{eq H}^+$. g⁻¹ de peso fresco, son media de 4 experimentos independientes que no difieren en más de un 10% del valor medio (pH de medida 7.3).

Tras una hora de incubación de las células en el medio de reacción, la adición de 100 mM de NaCl provocó un incremento significativo de la actividad extractora de H^+ en ambos tipos de células, aunque la activación fue inferior en las células procedentes de callos transgénicos (Figura 13). Así mismo, mientras que en las células de callos control, la activación por 100 mM NaCl fue inmediata, en las transgénicas el incremento fue más ralentizado.

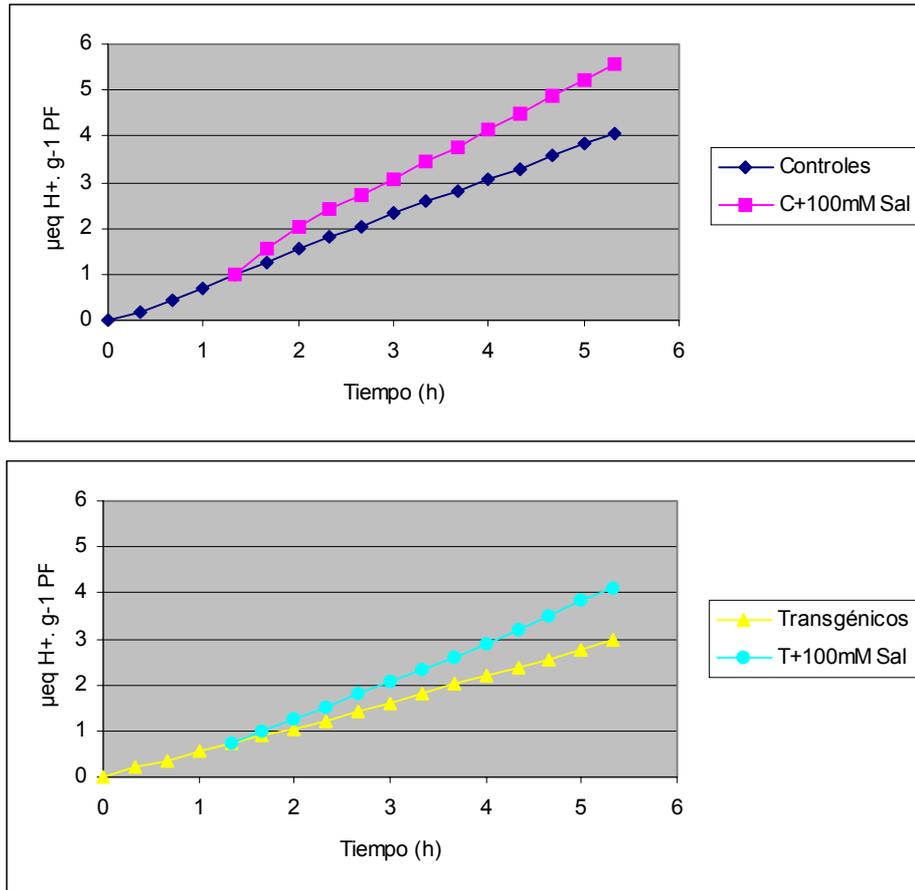


Figura 13. Capacidad de extrusión de H^+ por células de tomate procedentes de callos controles y transgénicos mantenidos durante la primera h en el medio estándar de reacción, al que se añadió, posteriormente, 100 mM NaCl. Los resultados, expresados como flujo acumulativo de $H^+ \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco, son media de 4 experimentos independientes que no difieren en más de un 10% del valor medio.

La adición al medio de reacción de $0,5 \mu\text{M}$ fusicocina, una toxina fúngica que activa específicamente el enzima H^+ -ATPasa de la membrana plasmática, incrementó significativamente la extrusión de H^+ por las células disgregadas de callos transgénicos y, sobre todo, controles (Figura 14).

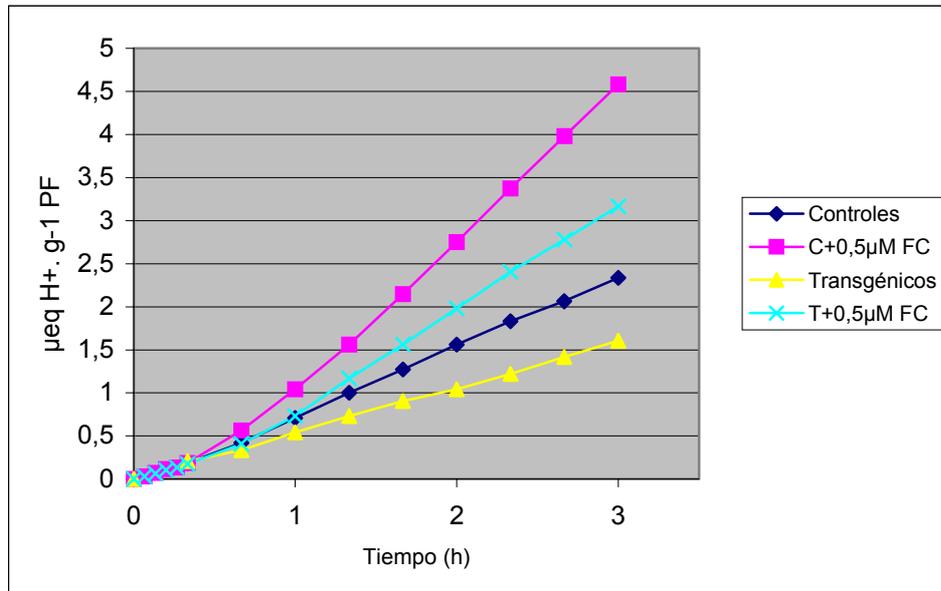


Figura 14. Efecto de la adición de $0,5 \mu\text{M}$ de fusicocina al medio de reacción sobre la capacidad de extrusión de H^+ por células de callos de tomate controles y transgénicos. Los resultados, expresados como flujo acumulado de H^+ · g^{-1} de peso fresco, son media de 4 experimentos independientes y de varias líneas transgénicas, que no difieren en más de un 10% del valor medio.

La Tabla 4 muestra un resumen de los valores numéricos correspondientes a la actividad extractora de H^+ de células de tomate disgregadas de callos controles y transgénicos en calcineurina de levadura, en función del pH del medio de reacción, del estrés por 100 mM de NaCl y de la adición de fusicocina.

Tabla 4. Valores de velocidad media de extrusión de H^+ por células disgregadas de callos controles y transgénicos en función del pH, de un estrés de 100 mM de NaCl y 0,5 μ M fusicocina. Los resultados, expresado en $\mu eqH^+ \cdot g^{-1} PF \cdot h^{-1}$, son la media \pm DE de 4 experimentos independientes.

Tratamiento en el medio de reacción	$\mu eqH^+ \cdot g^{-1} PF \cdot h^{-1}$	
	Callos controles	Callos transgénicos
pH 7.0	0.47 \pm 0.01	0
pH 7.3	0.76 \pm 0.01	0.54 \pm 0.02
pH 7.3 + 100 NaCl	1.02 \pm 0.03	0.73 \pm 0.03
pH 7.3 + 0,5 μ M FC	1.42 \pm 0.11	1.01 \pm 0.05

B.2.1. Determinación de la viabilidad celular durante el tiempo de medida de la actividad extractora H^+

Para controlar la integridad de las células y tener seguridad de que la acidificación del medio de reacción era debido a la actividad extractora de H^+ y no provocada por una posible rotura celular tras varias horas sometidas a un estrés de 100 mM de NaCl, se tomaron muestras de células para la realización del test de reacción fluorocromática (FCR). Los resultados demuestran que tanto las células controles como transgénicas sometidas a 1 y 4 h de estrés salino mantenían una perfecta integridad de sus membranas (Figuras 15 y 16). Solo a partir de la sexta hora de estrés sobre todo las células controles iniciaban un claro deterioro al observarse la pérdida de fluorescencia (Figura 17). En función de estos resultados, los experimentos de estrés salino en el medio de medida de la actividad extrusora de H^+ se llevaron a cabo en un tiempo máximo de entre 4 y 5 h.

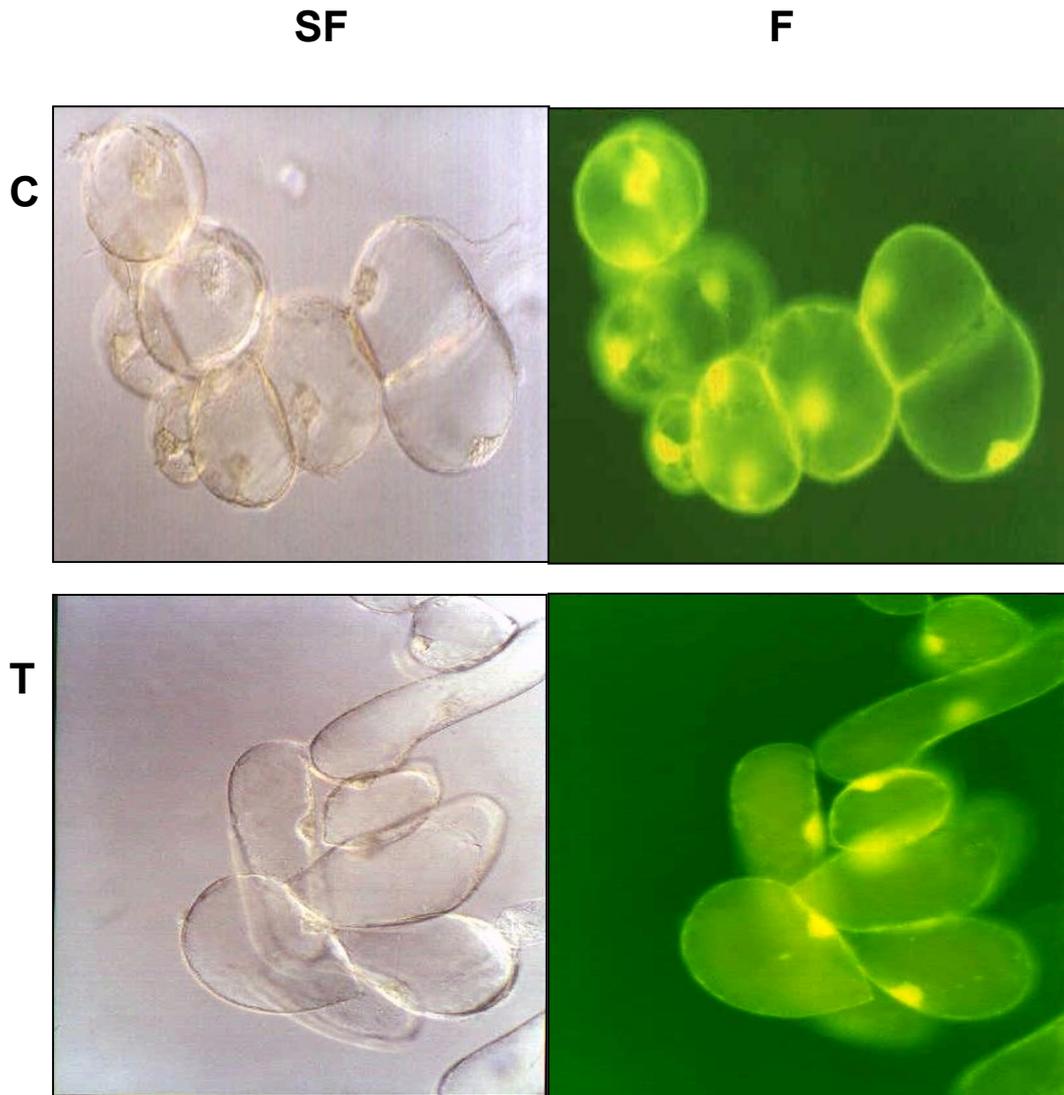


Figura 15. Test de viabilidad después de 1 h en el medio de reacción de la actividad extractora de H^+ de células disgregadas de callos controles (**C**) y callos transgénicos (**T**) sometidas a un estrés de 100 mM de NaCl. (**F**, células sometidas al test de viabilidad; **SF**, células no sometidas al test de viabilidad).

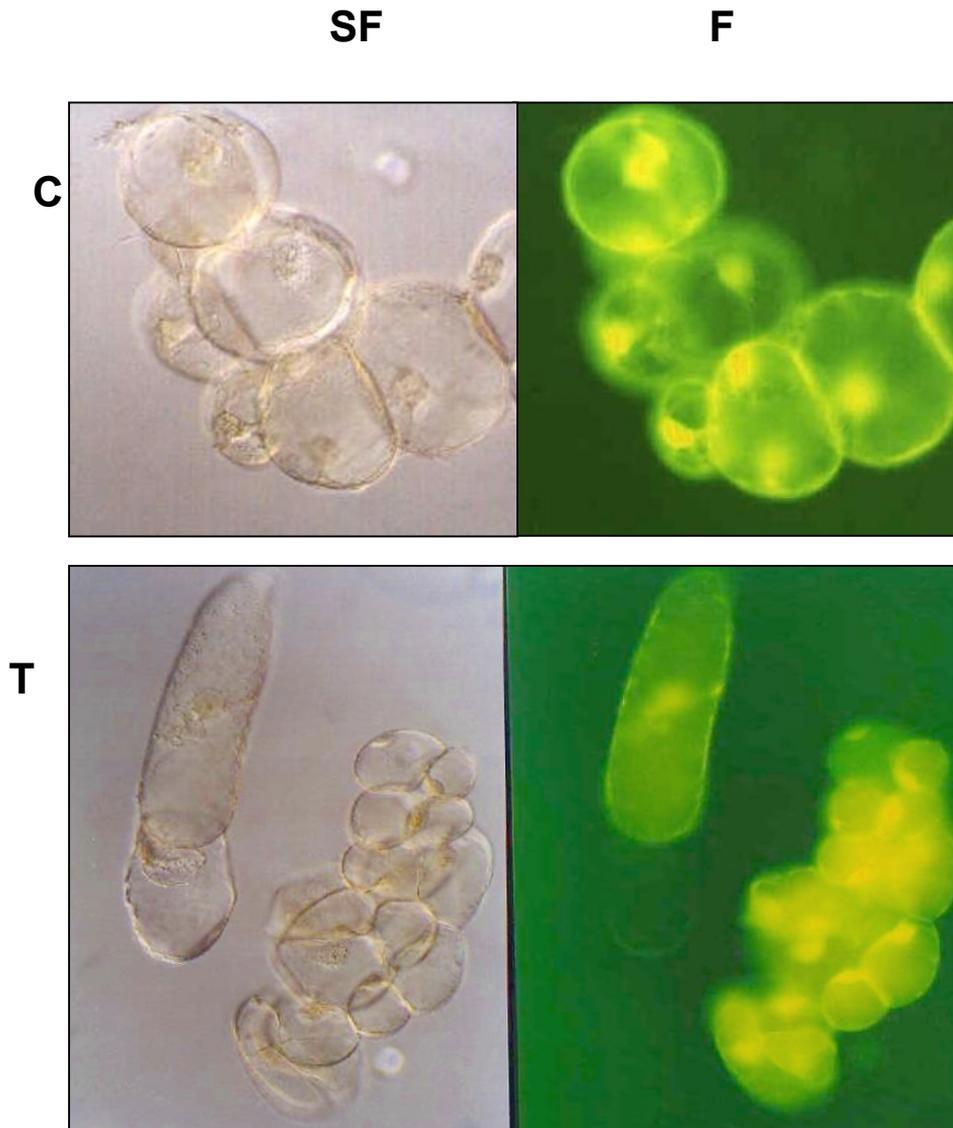


Figura 16. Test de viabilidad después de 4 h en el medio de reacción de la actividad extractora de H^+ de células disgregadas de callos controles (**C**) y callos transgénicos (**T**) sometidas a un estrés de 100 mM de NaCl. (**F**, células sometidas al test de viabilidad; **SF**, células no sometidas al test de viabilidad).

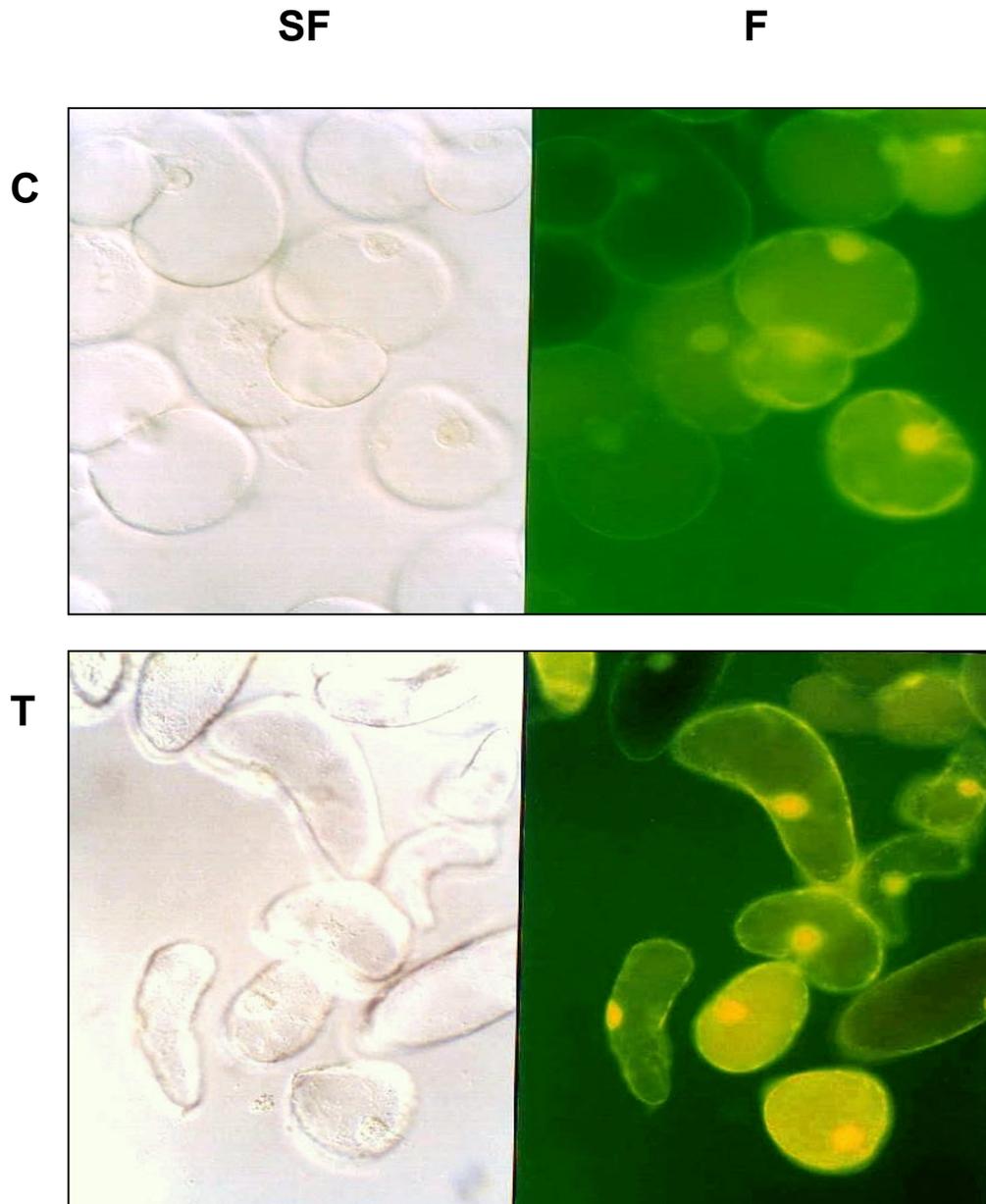


Figura 17. Test de viabilidad después de 6 h en el medio de reacción de la actividad extractora de H^+ de células disgregadas de callos controles (**C**) y callos transgénicos (**T**) sometidas a un estrés de 100 mM de NaCl. (**F**, células sometidas al test de viabilidad; **SF**, células no sometidas al test de viabilidad).

C. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

En levaduras la calcineurina afecta a la homeostasis iónica mediante la regulación transcripcional y postranscripcional de transportadores iónicos de Na^+ , K^+ , H^+ y Ca^{2+} , entre otras ATPasas de tipo P. En plantas, la H^+ -ATPasa de tipo P de la membrana plasmática es la principal responsable de la acidificación del medio exterior, un factor que se ve afectado en los callos transgénicos en calcineurina de levadura (ver apartado anterior). Por esta razón hemos estudiado tanto la actividad como la cantidad de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática en los callos controles y transgénicos con mas detalle. Así mismo, hemos estudiado los niveles de expresión de otros transportadores implicados en la homeostasis de Na^+ , K^+ , H^+ y Ca^{2+} .

C.1. Actividades de la H^+ -ATPasas a nivel de microsomas

El estudio de este objetivo, supuso inicialmente el aislamiento de la fracción microsomal de las células de callos de tomate controles y transgénicos en calcineurina de levadura. Durante el aislamiento, las diferentes membranas celulares que componen la fracción de microsomas (plasmalema, tonoplasto, golgi y retículo endoplasmático) pueden orientarse de forma natural o invertida. La utilización de detergentes (Brij-58) durante la medida de la actividad, favorece la orientación mayoritaria en su forma invertida, lo que permite determinar las actividades H-ATPasas total y latente (ver capítulo de Material y Métodos E.3.1), claramente diferenciadas de la actividad basal definida como la actividad enzimática en ausencia de detergente.

Para estudiar el efecto del estrés salino sobre las actividades H^+ -ATPasa a nivel de microsomas de callos controles y transgénicos en calcineurina de levadura, las células disgregadas de los callos fueron incubadas durante 3 h en medio de composición idéntica al de multiplicación, sin agar, conteniendo 100 mM NaCl.

C.1.1. Cantidad de proteína microsomal

Los resultados mostrados en la Tabla 5, indican que el contenido en proteína en las vesículas microsomales obtenidas a partir de las células disgregadas no presenta diferencias significativas entre los callos controles y transgénicos, ni en ningunas de estas líneas de callos incubadas durante 3 horas con 100 mM de NaCl.

Tabla 5. Contenido en proteínas de la fracción de microsomas aisladas de células disgregadas de callos de tomate controles y transgénicos en calcineurina de levadura incubadas durante 3 h en ausencia y presencia de 100 mM de NaCl. Los resultados, expresados en mg de proteína. g⁻¹ PF, son media ± DE de 6 experimentos independientes.

Tratamiento	Proteínas (mg proteína. g ⁻¹ PF)
Control	0.21 ± 0.03
Control + 100 mM NaCl	0.23 ± 0.04
L1	0.26 ± 0.05
L1 + 100 mM NaCl	0.28 ± 0.07
L8	0.26 ± 0.04
L8 + 100 mM NaCl	0.28 ± 0.05

C.1.2. Actividad fosfohidrolítica y transporte de H⁺ dependiente de ATP en microsomas

La actividad H⁺-ATPasa asociada a plasmalema en las vesículas microsomales de los callos transgénicos muestra una importante inhibición con respecto a los callos controles. Por otra parte, se observa un ligero incremento en presencia de un estrés de 100 mM de sal durante 3 horas con respecto a la ausencia del estrés tanto en los callos controles como en los transgénicos. Así mismo, los callos transgénicos muestran más

actividad de la H⁺-ATPasa asociada al tonoplasto tanto en ausencia como en presencia de un estrés de 100 mM de sal (Tabla 6).

Tabla 6. Actividades H⁺-ATPasas de vesículas microsomales aisladas de callos de tomate controles y transgénicos en calcineurina de levadura incubados durante 3 h en ausencia y presencia de 100 mM de NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{moles de Pi} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína $\cdot \text{h}^{-1}$, son media \pm DE de, al menos, 4 experimentos independientes.

Tratamiento	H ⁺ -ATPasa de plasmalema ΔVa total	H ⁺ -ATPasa de tonoplasto ΔNO_3^- total
Control	4.50 \pm 0.71	1.23 \pm 0.16
Control + 100 mM NaCl	5.82 \pm 0.86	2.55 \pm 0.08
L1	3.32 \pm 0.65	1.82 \pm 0.34
L1 + 100 mM NaCl	3.47 \pm 1.41	2.82 \pm 0.11
L2	2.76 \pm 0.70	1.96 \pm 0.34
L2 + 100 mM NaCl	3.14 \pm 0.79	2.79 \pm 0.47
L8	2.94 \pm 1.23	1.79 \pm 0.42
L8 + 100 mM NaCl	3.35 \pm 1.20	2.81 \pm 0.23

El estudio del transporte de H⁺ dependiente de ATP mediado por la H⁺-ATPasa de plasmalema a nivel de vesículas de microsomas se basó en la medida espectrofluorométrica de extinción de fluorescencia de la sonda ACMA. Los resultados demuestran una significativa inhibición de la extinción máxima de fluorescencia (Qmax) y de la velocidad específica de extinción de fluorescencia (VQs) en las vesículas aisladas de los callos transgénicos con respecto a los callos controles (Tabla 7). El desarrollo en presencia de 100 mM de NaCl indujo un incremento de ambos parámetros en los callos transgénicos y en los controles.

Tabla 7. Transporte de H⁺ dependiente de ATP en vesículas microsomales aisladas de callos controles y transgénicos en calcineurina de levadura mantenidos durante 3 h en ausencia y presencia de 100 mM NaCl. Los resultados, expresados como extinción máxima de fluorescencia (Q_{max}) y como velocidad específica de extinción de fluorescencia (VQs), son media ± DE de, al menos, 4 experimentos independientes.

Transporte de H ⁺ dependiente de ATP		
Tratamiento	Q _{max} % Q. mg ⁻¹ proteína	VQs % Q. min ⁻¹ . mg ⁻¹ proteína
Control	111.53 ± 9.49	76.98 ± 4.33
Control + 100 mM NaCl	183.98 ± 7.20	107.59 ± 3.80
L1	60.27 ± 7.64	45.74 ± 2.56
L1 + 100 mM NaCl	79.81 ± 6.14	56.23 ± 3.72
L2	76.32 ± 8.32	48.2 ± 4.80
L2 + 100 mM NaCl	93.62 ± 8.10	58.08 ± 2.43
L5	60.65 ± 9.48	46.37 ± 1.63
L5 + 100 mM NaCl	84.20 ± 8.36	73.40 ± 8.06
L8	67.15 ± 0.26	58.20 ± 4.38
L8 + 100 mM NaCl	105.78 ± 4.42	69.96 ± 4.92

En cuanto a la razón H⁺ extruídos/ATP hidrolizado, por la H⁺-ATPasa de plasmalema, no cambió significativamente ni en función del tipo de callo de partida ni por el estrés por NaCl (Tabla 8).

Tabla 8. Actividad ΔV_a -H⁺-ATPasa, transporte de H⁺ dependiente de ATP y razón H⁺ extruídos/ATP hidrolizado en microsomas de callos controles y transgénicos en ausencia y presencia de 100 mM NaCl. Los resultados son media \pm DE de, al menos, 4 experimentos independientes.

Tratamiento	Actividad fosfohidrolítica $\mu\text{moles.mg}^{-1} \text{prot.h}^{-1}$	Transporte de H ⁺ (VQs) $\%Q \text{ .min.mg}^{-1} \text{proteína}$	H ⁺ / ATP
Control	4.50 \pm 0.71	76.98 \pm 4.33	17.17 \pm 2.63
Control +100 mM NaCl	5.82 \pm 0.86	107.59 \pm 3.80	18.49 \pm 2.83
L1	3.32 \pm 0.65	45.74 \pm 2.56	13.77 \pm 2.39
L1 +100 mM NaCl	3.47 \pm 1.41	56.23 \pm 3.72	16.24 \pm 3.65
L2	2.76 \pm 0.70	48.2 \pm 4.80	17.46 \pm 3.88
L2 +100 mM NaCl	3.14 \pm 0.79	58.08 \pm 2.43	18.49 \pm 3.98
L8	2.94 \pm 1.23	58.20 \pm 4.38	19.79 \pm 2.00
L8 +100 mM NaCl	3.35 \pm 1.20	69.96 \pm 4.92	20.88 \pm 3.67

C.2. Actividades de la H⁺-ATPasas a nivel de plasmalema purificado

C.2.1. Purificación de la membrana plasmática

La purificación de plasmalema a partir de la fracción microsomal obtenida de los diferentes tipos de callos se ha realizado mediante la técnica de partición de fases en doble polímero acuoso. El sistema de partición estuvo compuesto por dextrano-polietilenglicol en los porcentajes indicados en el capítulo de Material y Métodos (E.2).

Para comprobar el grado de purificación de la fracción de plasmalema, se determinaron marcadores enzimáticos ligadas a las distintas membranas celulares: H⁺-ATPasa sensible a vanadato, marcador de plasmalema; H⁺-ATPasa sensible a nitrato, marcador del tonoplasto; H⁺-ATPasa sensible a azida, marcador mitocondrial; UDPasa latente, marcador del aparato de Golgi y NADH citocromo c reductasa insensible a antimicina A, marcador del retículo endoplasmático.

El contenido en proteína de las vesículas enriquecidas de plasmalema obtenidas no presenta diferencias significativas entre los callos controles y transgénicos, así como tras mantener éstos en ausencia y en presencia de 100 mM NaCl (Tabla 9).

Tabla 9. Contenido en proteínas de la fracción enriquecida de plasmalema purificado a partir de microsomas obtenidos de callos control y transgénicos mantenidos durante 3 h en presencia y ausencia de 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{g. mg}^{-1}$ proteína microsomal, son media \pm DE de 6 experimentos independientes.

Tratamiento	Proteína de plasmalema ($\mu\text{g. mg}^{-1}$ proteína microsomal)
Control	20.03 \pm 4.24
Control + 100 mM NaCl	26.50 \pm 2.89
L1	16.53 \pm 4.23
L1 + 100 mM NaCl	19.24 \pm 3.82
L8	20.84 \pm 3.80
L8 + 100 mM NaCl	23.22 \pm 4.56

Para las diferentes muestras analizadas, en función del tipo de callo y del tratamiento salino, los resultados presentados en la Tabla 10 muestran la práctica inexistencia de actividades enzimáticas marcadores de las membranas de tonoplasto y mitocondria, así como la escasa actividad de aquellas otras actividades ligadas al aparato de Golgi y al Retículo Endoplasmático. El hecho más importante a resaltar es la mayor actividad H^+ -ATPasa de plasmalema purificado de callos controles en relación a los callos transgénicos (Tabla 10).

Tabla 10. Actividad de enzimas marcadores en la fracción enriquecida de plasmalema tras la partición en dextrano/PEG de las vesículas microsomales procedentes de callos controles y transgénicos. Los resultados, expresados en $\mu\text{moles de Pi. mg}^{-1} \text{ proteína. h}^{-1}$ y $\mu\text{moles de citocromo c. mg}^{-1} \text{ proteína. h}^{-1}$, son media \pm DE de, al menos, 4 experimentos independientes. ND: no detectado.

Tratamientos						
Actividad enzimática	Microsomos			Plasmalema		
	Control	L1	L8	Control	L1	L8
H⁺-ATPasa ΔVa-total	4.50\pm0.71	3.32 \pm 0.65	2.94 \pm 1.23	18.16\pm2.80	13.83 \pm 2.40	10.17 \pm 4.91
H⁺-ATPasa ΔNO_3^--total	1.23 \pm 0.16	1.82 \pm 0.34	1.79 \pm 0.42	ND	ND	ND
H⁺-ATPasa ΔN_3^--total	1.62 \pm 0.16	2.10 \pm 0.20	1.91 \pm 0.20	ND	ND	ND
UDPasa latente	4.51 \pm 0.84	4.28 \pm 0.81	4.13 \pm 0.86	1.93 \pm 0.07	1.47 \pm 0.17	1.84 \pm 0.24
NADH cit. C reductasa insensible antimicina A	1.69 \pm 0.16	1.84 \pm 0.39	2.11 \pm 0.14	0.64 \pm 0.02	0.57 \pm 0.16	0.65 \pm 0.05

Los resultados anteriormente indicados demuestran que la fracción purificada por partición de fases en dextrano-polietilenglicol a partir de las vesículas microsomales está enriquecida en un 80 % por plasmalema (actividad H⁺-ATPasa). Este hecho también fue comprobado mediante la inmunodetección del enzima H⁺-ATPasa de la membrana plasmática en las fracciones microsomales y de plasmalema purificado, llevada a cabo mediante técnicas de inmunodetección utilizando un anticuerpo policlonal de conejo frente al extremo carboxilo terminal del enzima de plasmalema de *Arabidopsis thaliana* (Figura 20).

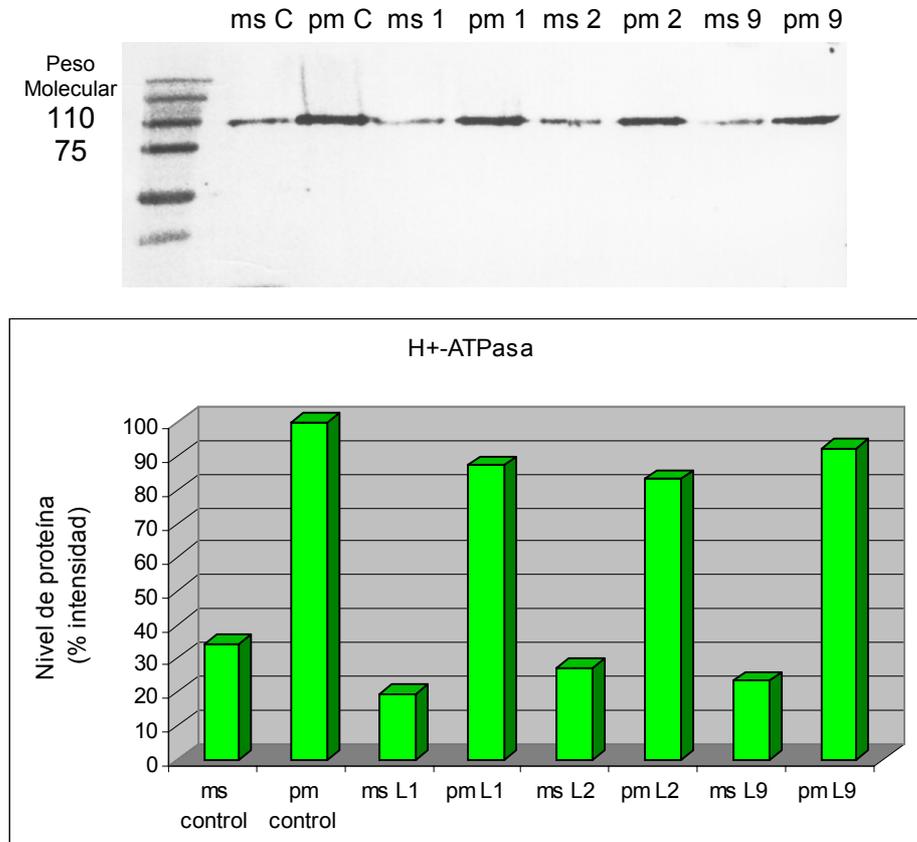


Figura 18. Análisis densitométrico e inmunodetección de la H⁺-ATPasa de plasmalema de las fracciones microsomales (ms) y de plasmalema (pm) de callos de tomate controles y transgénicos en calcineurina de levadura. Los resultados son media ± DE de 3 experimentos independientes. El valor 100 % corresponde a la intensidad máxima obtenida en el inmunoblot.

C.2.2. Actividad fosfolitolítica y transporte de H⁺ dependiente de ATP en plasmalema

Los resultados muestran una mayor actividad H⁺-ATPasa de plasmalema purificado de callos controles en relación a los callos transgénicos, hecho detectable tanto en ausencia como en presencia de 100 mM de NaCl (Tabla 11).

Tabla 11. Actividad de la H⁺-ATPasa en la fracción enriquecida de plasmalema de callos controles y transgénicos en ausencia y presencia de 100 mM de sal. Los resultados, expresados en $\mu\text{moles de Pi. mg}^{-1} \text{ proteína. h}^{-1}$, son media \pm DE de, al menos, 4 experimentos independientes.

Tratamiento	H ⁺ -ATPasa ΔVa - total
Control	18.16 \pm 2.80
Control +100 mM NaCl	23.29 \pm 3.46
L1	13.83 \pm 2.40
L1 +100 mM NaCl	13.88 \pm 5.64
L2	11.05 \pm 2.80
L2 +100 mM NaCl	12.56 \pm 3.19
L8	10.17 \pm 4.91
L8 +100 mM NaCl	13.43 \pm 4.80

La determinación de la medida fluorimétrica del transporte de H⁺ asociado al enzima H⁺-ATPasa sólo es posible llevarla a cabo en vesículas con orientación “*inside-out*”, ya que el centro activo accesible al sustrato se muestra en la cara citoplasmática de la membrana, y por tanto debe estar orientada hacia el exterior. Teniendo en cuenta que durante el proceso de purificación por partición de fases en dextrano/PEG las vesículas suelen adoptar la orientación natural (la cara externa de la membrana hacia el exterior), fue necesario adicionar el detergente Brij 58 al medio de aislamiento que, a determinadas concentraciones, induce la inversión de las vesículas sin afectar a la permeabilidad de la membranas (Johansson y col., 1995).

Tabla 12. Transporte de H⁺ dependiente de ATP en vesículas de plasmalema de callos de tomate controles y transgénicos en calcineurina de levadura mantenidos durante 3 h en ausencia y presencia de 100 mM NaCl. Los resultados, expresados como extinción máxima de fluorescencia (Q_{max}) y como velocidad específica de extinción de fluorescencia (VQs), son media ± DE de, al menos, 4 experimentos independientes.

Transporte de H ⁺ dependiente de ATP		
Tratamiento	Q _{max} %Q. mg ⁻¹ proteína	VQs %Q. min. mg ⁻¹ proteína
Control	856.68 ± 51.59	614.62 ± 75.59
Control + 100 mM NaCl	965.47 ± 89.73	738.01 ± 70.85
L1	304.55 ± 90.92	217.32 ± 86.90
L1 + 100 mM NaCl	590.06 ± 141.07	539.52 ± 18.13
L2	220.50 ± 62.18	157.68 ± 39.10
L2 + 100 mM NaCl	412.25 ± 0.02	373.47 ± 12.19
L5	153.84 ± 36.26	118.65 ± 29.80
L5 + 100 mM NaCl	244.60 ± 14.84	293.05 ± 2.55
L8	364.82 ± 0.02	184.95 ± 18.96
L8 + 100 mM NaCl	431.16 ± 64.0	358.10 ± 50.42

Como en el caso de las vesículas de microsomas, a nivel de plasmalema es observable una menor actividad transportadora de H⁺ en las membranas purificadas de los callos transgénicos, mientras que, contrariamente a lo detectado en microsomas, la activación de dicho transporte en función del estrés salino es superior en las vesículas de plasmalema purificadas de callos transgénicos (Tabla 12).

En los callos controles el estrés salino no afecta a la razón H⁺ extruídos/ATP hidrolizado. En el caso de los callos transgénicos el valor de la razón H⁺ extruídos/ATP hidrolizado es aproximadamente el 50% del valor obtenido en los callos controles en ausencia de estrés salino. Sin embargo, en presencia de NaCl, esta razón aumenta en los callos transgénicos hasta el valor obtenido en los callos controles (Tabla 13).

Tabla 13. Actividad ΔV_a -H⁺-ATPasa basal, transporte de H⁺ dependiente de ATP y razón H⁺ extruídos / ATP hidrolizado en la fracción enriquecida de plasmalema de callos controles y transgénicos en ausencia y presencia de 100 mM NaCl. Los resultados son media \pm DE de, al menos, 4 experimentos independientes.

Tratamiento	ΔV_a $\mu\text{moles. mg}^{-1} \text{ prot. h}^{-1}$	VQs $\%Q. \text{ min. mg}^{-1} \text{ proteína}$	H ⁺ / ATP
Control	18.16 \pm 2.80	614.62 \pm 75.59	33.84 \pm 4.58
Control + Sal	23.29 \pm 3.46	738.01 \pm 70.85	31.67 \pm 4.85
L1	13.83 \pm 2.40	217.32 \pm 86.90	15.71 \pm 2.87
L1 + Sal	13.88 \pm 5.64	539.52 \pm 18.13	38.87 \pm 7.80
L2	11.05 \pm 2.80	157.68 \pm 39.10	14.27 \pm 3.17
L2 + Sal	12.56 \pm 3.19	373.47 \pm 12.19	29.74 \pm 7.65
L8	10.17 \pm 4.91	184.95 \pm 18.96	18.19 \pm 5.54
L8 + Sal	13.43 \pm 4.80	358.10 \pm 50.42	26.66 \pm 6.88

La detección inmunológica de la H⁺-ATPasa de los callos controles y transgénicos en ausencia y presencia de 100 mM de NaCl demostró la existencia de una menor cantidad del enzima en las membranas de callos transformados respecto de los controles, así como un ligero incremento del contenido de esta proteína enzimática en las membranas de ambos tipos de callos sometidos a un estrés de 3 horas con 100 mM NaCl (Figura 19).

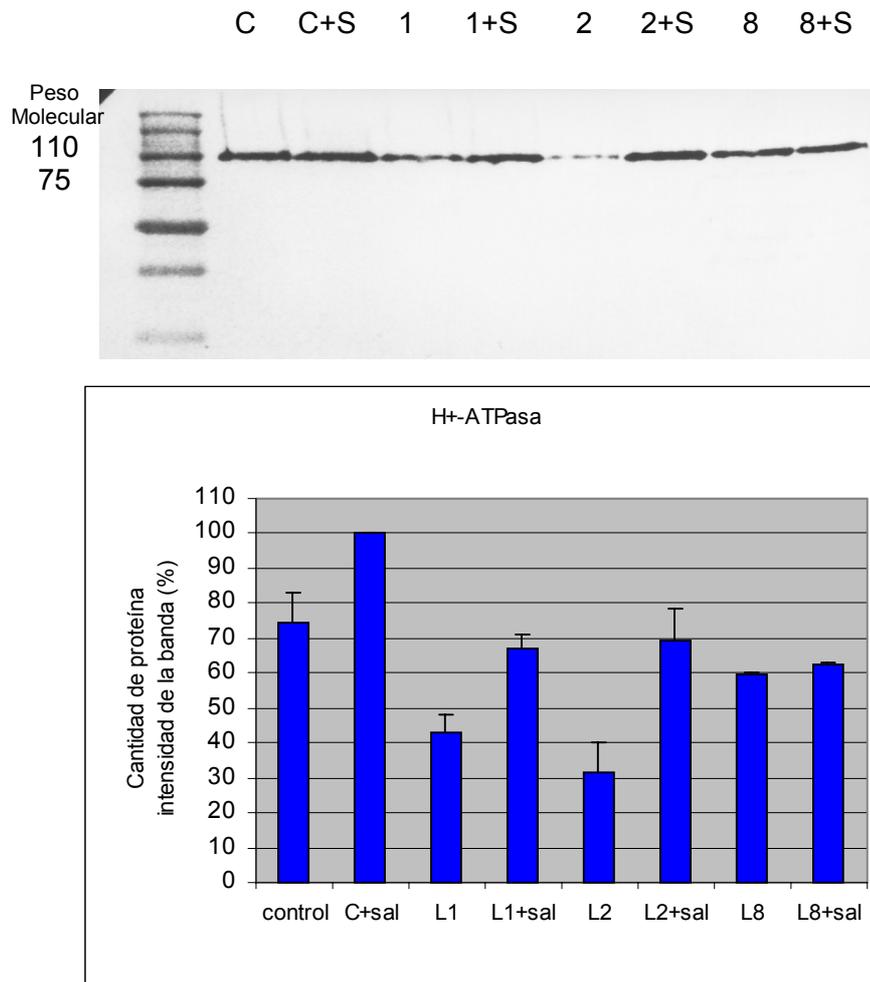


Figura 19. Análisis densitométrico e inmunodetección de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática en la fracción de plasmalema purificada de callos de tomate controles y transgénicos en calcineurina de levadura mantenidos en ausencia y presencia de 100 mM de NaCl durante 3 h. Los resultados son media \pm DE de 3 experimentos independientes. El valor 100 % corresponde a la intensidad máxima obtenida en el inmunoblot.

C.3. Estudio de la expresión de bombas primarias y transportadores secundarios

C.3.1. Hibridación Northern

La determinación de los niveles de expresión de los genes que codifican diversas bombas primarias y transportadores secundarios de iones en suspensiones celulares obtenidas por disgregación de callos controles y transgénicos, que habían sido sometidas a distintos tiempos de estrés con 100 mM de NaCl, se llevó a cabo por hibridación con las respectivas sondas de ADNc marcadas con ^{32}P (*Northern-blot*) (Figura 20). El nivel de expresión para el gen de la isoforma LHA4 de la H^+ -ATPasa de plasmalema fue menor en los callos transgénicos con respecto a los controles. El estrés salino indujo un incremento de la expresión de esta proteína en ambos tipos de callos, aunque manteniendo las mismas diferencias de expresión que las detectadas entre controles y transgénicos en ausencia de sal.

Por otra parte, ni entre callos controles y transgénicos, ni entre estas líneas sometidas a estrés salino, las subunidades A y c de la V-H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa mostraron cambios significativos en los niveles de transcrito. Estos resultados se ratificaron por la cuantificación de las intensidades de las distintas bandas, relativizadas con la carga del ribosómico 18S de callos de tomate (Figura 21).

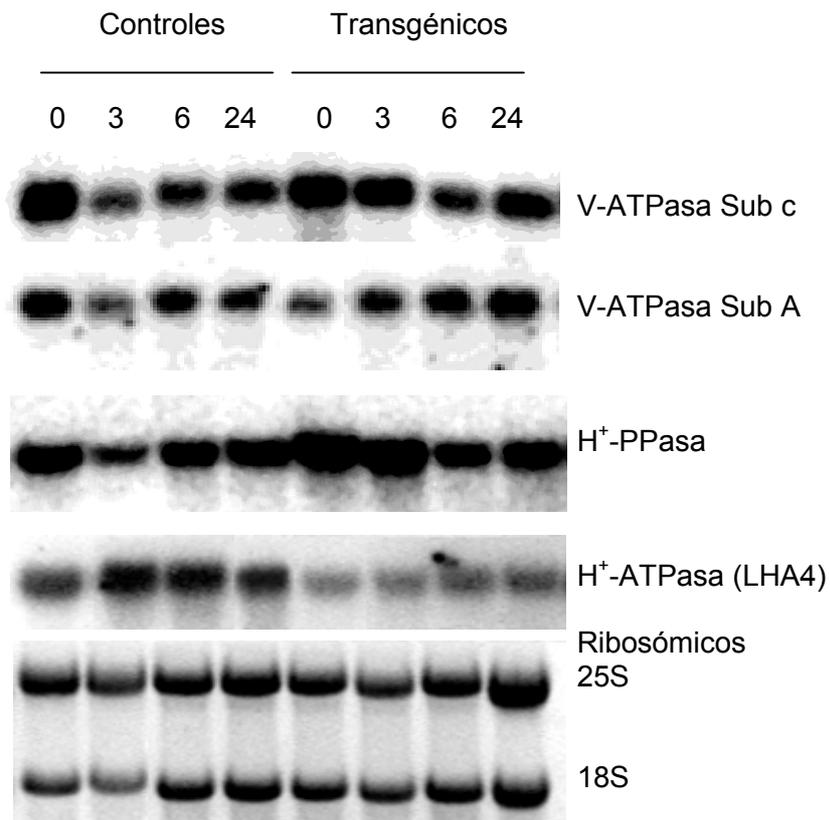


Figura 20. Hibridación por Northern-blot de los niveles de transcrito para varios transportadores de membrana de los callos controles y transgénicos mantenidos en ausencia y presencia de 100 mM NaCl durante 0, 3, 6 y 24 h. Subunidades A y c de H⁺-ATPasa vacuolar, H⁺-PPasa, isoforma LHA4 de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática y la carga de ARN ribosómicos 25S y 18S.

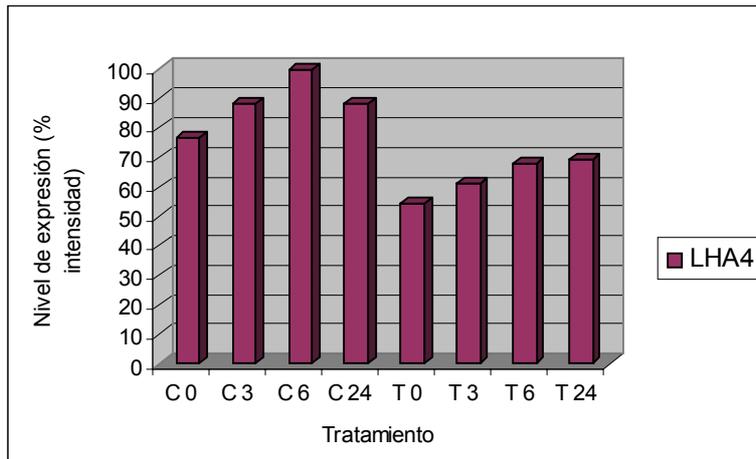


Figura 21. Cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a la isoforma LHA4 de la H^+ -ATPasa de plasmalema mediante Northern-blot, en callos control y transgénicos mantenidos en ausencia y presencia de 100 mM NaCl durante 3, 6 y 24 h (C 0, C 3, C6 y C 24, T 0, T 3, T 6 y T 24). El valor 100 % corresponde a la intensidad máxima obtenida en el Northern-blot.

C.3.2. RT-PCR a tiempo real

Debido a que algunos de los transcritos de los genes que codificaban para transportadores de membranas que pretendíamos estudiar estaban por debajo del límite de detección para la técnica del *Northern-blot*, decidimos utilizar la técnica de PCR a tiempo real. Este método se basa en la detección de fluorescencia, proporcional a la cantidad de producto de PCR formado, que permite detectar diferencias mínimas en los niveles de expresión. Cada gen analizado requiere de una puesta a punto independiente, para poder determinar cual es la cantidad de ADN inicial y la temperatura de amplificación adecuada para maximizar la eficiencia de la PCR y garantizar la correcta cuantificación de dicho gen. Para ello se preparan un mínimo de 3 diluciones distintas del producto de retrotranscripción: 1, 1/10 y 1/100 para poder calcular y optimizar la eficiencia de la PCR, lo que permite comparar la expresión de distintos genes, incluido el que usemos de referencia, en este caso el ribosómico 18S (Figura 22).

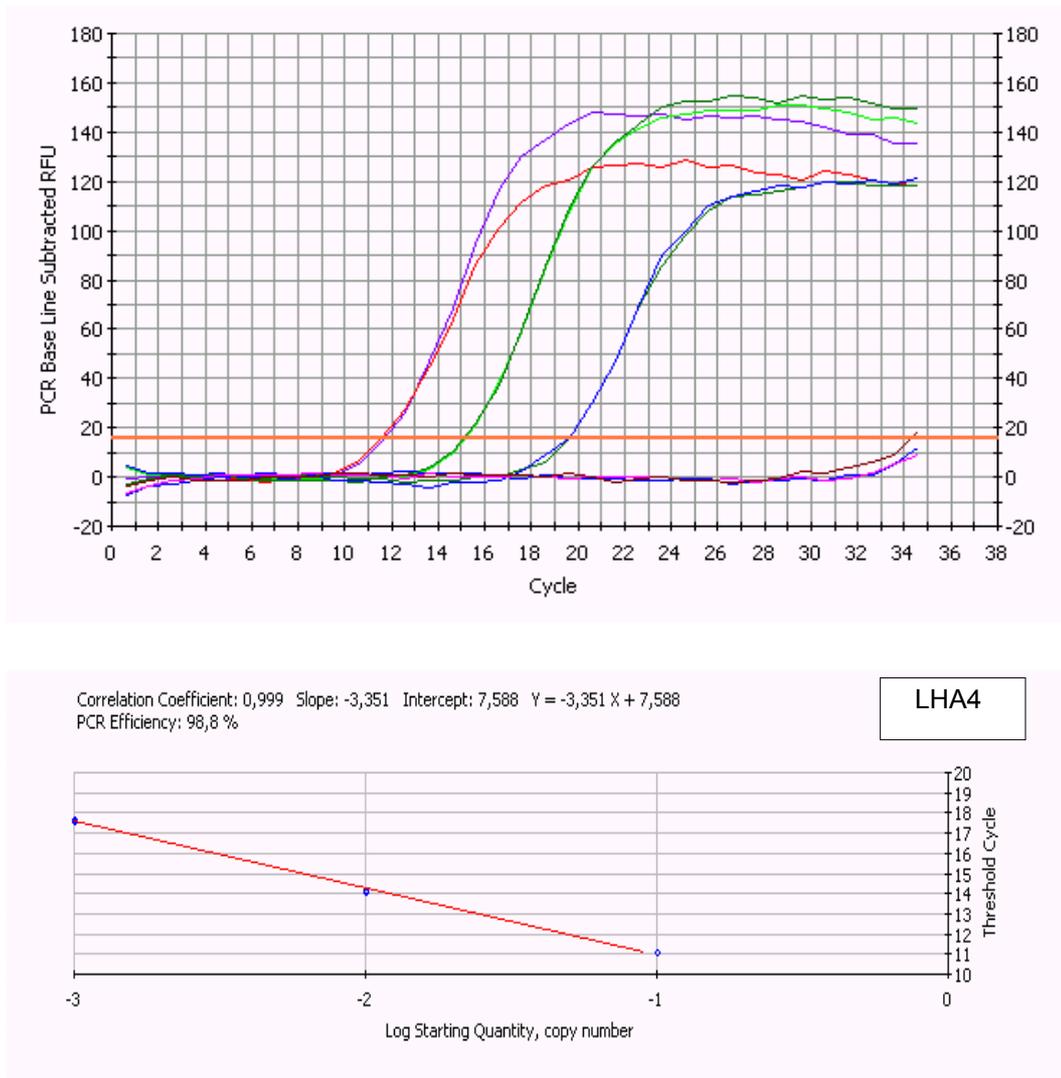


Figura 22. Curvas de amplificación y de eficiencia de la PCR de la isoforma LHA4 de tres diluciones distintas: 1, 1/10, y 1/100 y un control negativo.

Esta puesta a punto se realizó también con los genes LeNHX2, LeCAX y el ribosómico 18S, obteniendo curvas de eficiencia de la PCR similares a la de la isoforma LHA4 de la H⁺-ATPasa de plasmalema.

Una vez analizadas las curvas de eficiencia se incluyó en la misma PCR el gen a cuantificar y el ribosómico 18S obtenido de callos controles y transgénicos tanto en ausencia como en presencia de un estrés de 100 mM de NaCl (Figura 23).

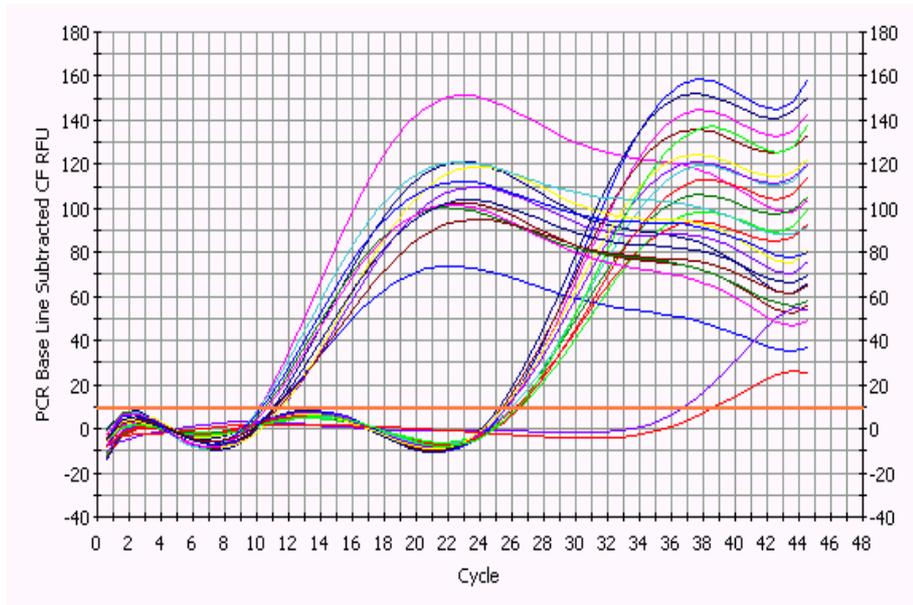


Figura 23. Curvas de amplificación de ADN mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida por el SYBR Green unido al ADN. En ordenada, se representa la intensidad de fluorescencia (restado el ruido de fondo) y en abscisa, el número de ciclos de amplificación. La línea naranja proporciona el punto de corte de cada curva para la cuantificación, c_t o ciclo umbral, y debe corresponder a la zona más paralela de las curvas. Cada color es una muestra diferente. El primer bloque de curvas corresponde a la amplificación del gen constitutivo, ribosómico 18S, el segundo bloque de curvas corresponde a la amplificación del gen problema, en este caso LeNHX2, y las últimas curvas son blancos donde no hay amplificación.

Finalmente pasamos a la cuantificación de los genes en cada muestra tal y como se describe en el apartado E.6.2.2 del material y métodos.

En la figura 24 se corroboran los resultados obtenidos tanto en el northern-blot como en la inmunodetección en cuanto al menor contenido en la isoforma LHA4 de la H^+ -ATPasa de plasmalema. En el caso del antiportador K^+/H^+ vacuolar LeNHX2 observamos mayor cantidad de transcrito en los callos transgénicos con respecto a los controles y una ligera inducción por un estrés de 100 mM de NaCl (Figura 25).

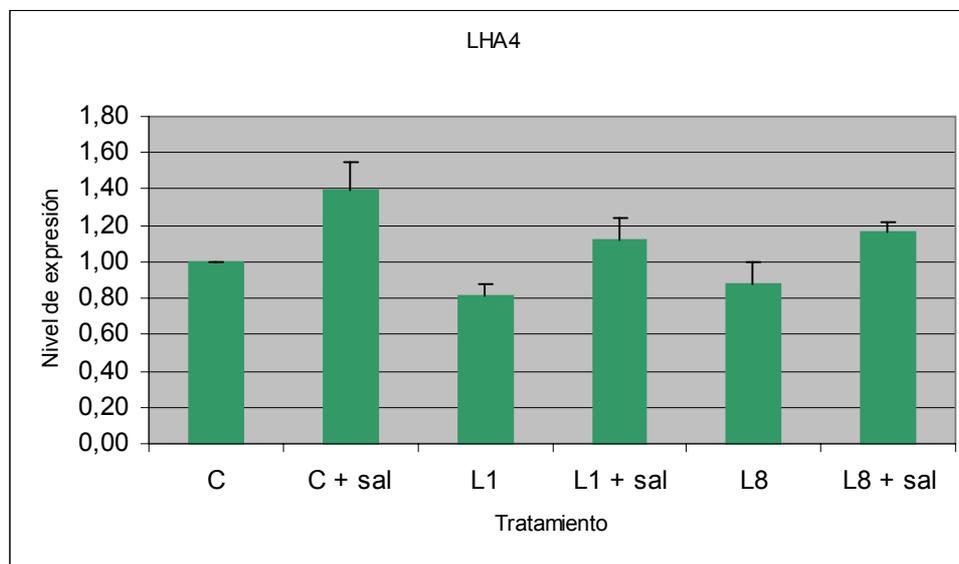


Figura 24. Cuantificación mediante PCR a tiempo real de la expresión de la isoforma LHA4 de la H^+ -ATPasa de plasmalema en callos controles (C) y transgénicos en calcineurina de levadura (L1 y L8) mantenidos durante 3 h en ausencia y presencia de 100 mM NaCl.

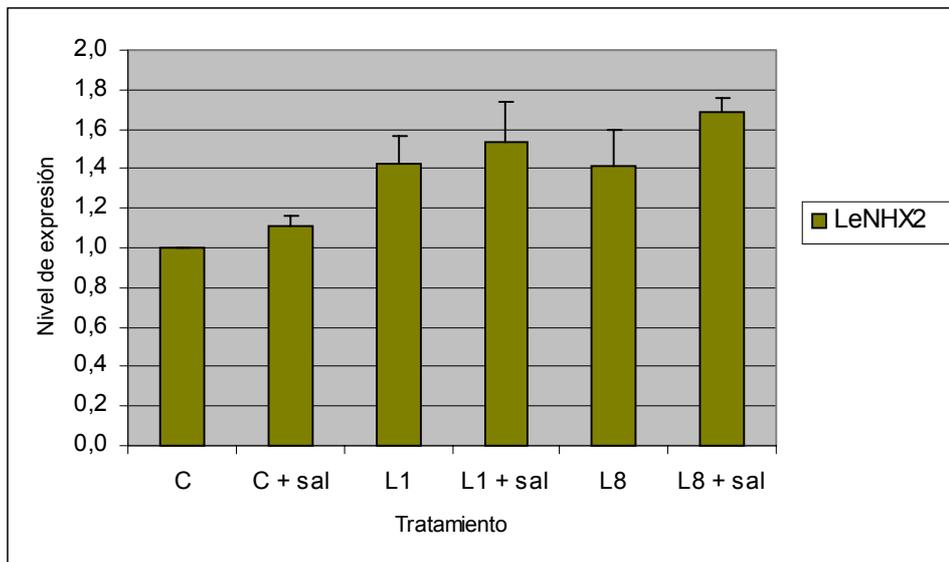


Figura 25. Cuantificación mediante PCR a tiempo real de la expresión del antiportador K^+/H^+ vacuolar LeNHX2 en callos controles (C) y transgénicos en calcineurina de levadura (L1 y L8) mantenidos durante 3 h en ausencia y presencia de 100 mM NaCl.

Dada la relevancia del Ca^{2+} en nuestro trabajo hemos estudiado la expresión de un posible antiportador Ca^{2+}/H^+ de tomate. Utilizando secuencias de CAX1 y CAX2 de *Arabidopsis* hemos identificado en la base de datos de EST de tomate, (www.tigr.org) dos secuencias con homología a estas enzimas (TC100667 y TC105183), aunque solamente hemos detectado el transcrito correspondiente a TC105183 en los ARN obtenidos de los callos de tomate. Este fragmento se alineó con todos los CAX que se han descrito en *Arabidopsis* observando la cercanía con AtCAX2 y AtCAX5 en el dendrograma (figura 26), y obteniendo un 78,85 % de homología con AtCAX2 (Figura 27)

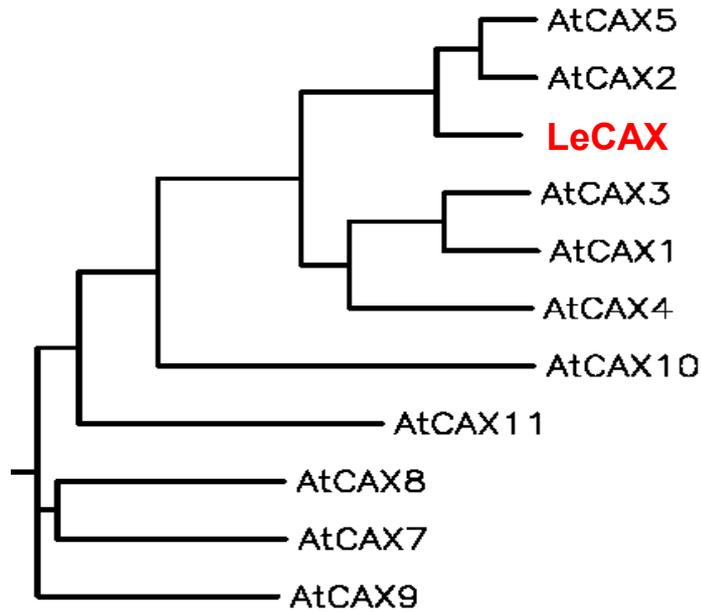


Figura 26. Dendrograma del LeCAX con la familia de los CAX de Arabidopsis.

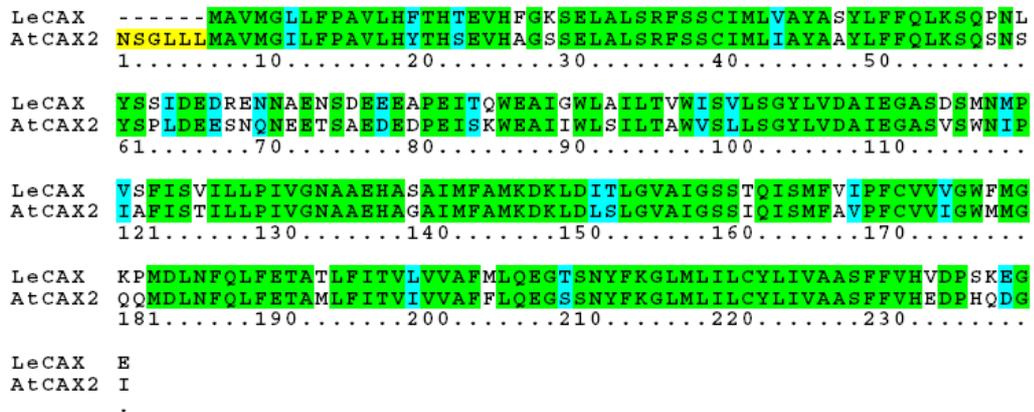


Figura 27. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de LeCAX con AtCAX2.

Para el análisis por PCR a tiempo real hemos utilizado los cebadores: 5' CATCAGCAGAAAGTCCAGG 3' y 5' CTGTGTGGGTGAAATGAAG 3', amplificando un fragmento de 160 pb, denominado LeCAX en las figuras, cuya identidad ha sido comprobada por secuenciación. Los resultados mostraron una pequeña inhibición en la expresión de este LeCAX en los callos transgénicos con respecto a los callos controles tanto en ausencia como en presencia de un estrés de 100 mM de NaCl, y una inducción por estrés salino tanto en callos controles como en los transgénicos (Figura 28).

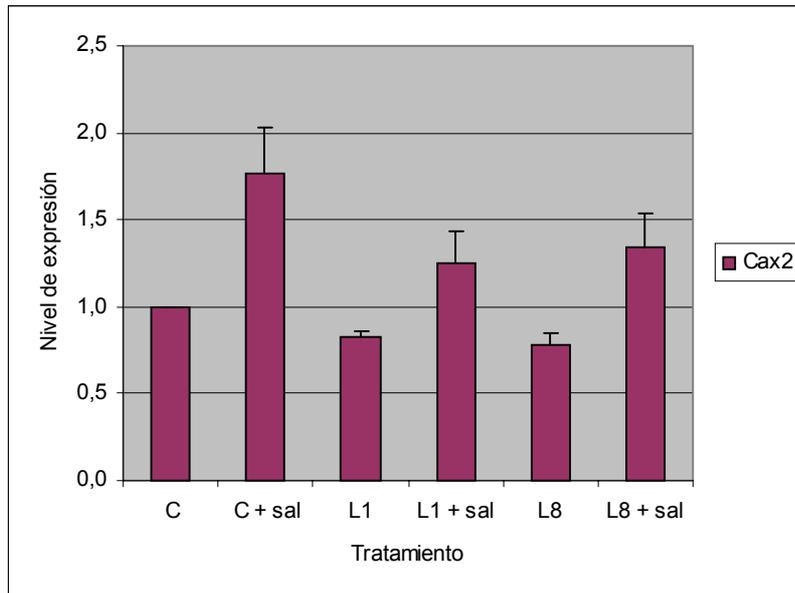


Figura 28. Cuantificación mediante PCR a tiempo real de la expresión de una isoforma LeCAX en callos controles (C) y transgénicos en calcineurina de levadura (L1 y L8) mantenidos durante 3 h en ausencia o presencia de 100 mM NaCl.

VI. DISCUSIÓN

La mayoría de las plantas responden al estrés salino con una inhibición del crecimiento y un reajuste de la homeostasis iónica (Zhu, 2003). Mientras que plantas sensibles a la salinidad tienen una capacidad limitada para ajustar la homeostasis iónica, en especies tolerantes la capacidad para controlar los flujos iónicos constituye uno de los mecanismos fundamentales implicados en la tolerancia (Greenway y Munns, 1980; Bonhert y Sheveleva, 1998; Nelson y col., 1999). Puesto que la mayoría de las especies cultivadas desarrollan frente al estrés salino una estrategia glicófitas, el estudio de la regulación del transporte iónico es clave en los programas de mejora vegetal (Niu y col., 1995; Gil-Mascarell y col., 1999).

Desde esta perspectiva, una aproximación prometedora para mejorar la resistencia a la sal en glicófitas se basa en la introducción de genes que codifican para reguladores de la homeostasis iónica (Bordás y col., 1997; Pardo y col., 1998; Kasuga y col., 1999; Saijo y col., 2000; Rus y col., 2001b). Por otra parte, el estudio del efecto de estos genes sobre la bioquímica y fisiología de la planta puede ayudar a descubrir, con más precisión, los determinantes implicados en la homeostasis iónica en respuesta a estrés salino. Por esta razón este trabajo se ha centrado en el estudio del efecto de la sobreexpresión de calcineurina de levadura en tomate, como una proteína que en levaduras regula la homeostasis del Na^+ y K^+ a través del control de las bombas primarias y transportadores secundarios de iones. La idea de utilizar calcineurina de levadura como determinante de halotolerancia en células de callos de tomate, ha surgido de la funcionalidad demostrada en plantas por este factor. Así, plantas transgénicas de tabaco que expresan calcineurina presentan un incremento muy notable en su supervivencia frente a un estrés salino, habiéndose comprobado que su efecto principal tiene lugar a nivel de la captación de iones (Pardo y col., 1998).

A. Obtención de un cultivo celular transgénico

Para la obtención de cultivos celulares de tomate modificados genéticamente, ha sido fundamental la aplicación de las técnicas de ingeniería genética. El primer paso a seguir en este trabajo ha sido la obtención de líneas de callos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Var. Pera) a partir de explantos transformados con calcineurina de levadura, que posteriormente, fueron subcultivados hasta definir un material homogéneo. Se ha utilizado el tomate por la importancia económica de este cultivo, por constituir un material clásico para programas de investigación y mejora y por ser un modelo para el estudio de las respuestas al estrés salino (Santa Cruz y col., 1999; Bolarín y col., 1995).

La utilización inicial de suspensiones celulares de tomate, demostró que la proliferación de *Agrobacterium tumefaciens* en el medio de cultivo de estas suspensiones no permitía el crecimiento celular, incluso en presencia de antibióticos del tipo de la carbenicilina o cefotaxima a los que esta bacteria es sensible. Tras muchos intentos, se obtuvieron células transformadas infectando los cotiledones, a partir de los cuales se regeneraron plántulas transformadas en medio de regeneración de tallo y, finalmente, se consiguieron callos transformados de los explantos de tallos (Figuras 1 y 3). El gran aumento en la eficiencia de la transformación, alcanzado cuando se partió de cotiledones unidos por el meristemo apical, puede resultar equívoco. En este sentido, el resultado positivo obtenido en nueve de las once plántulas de tomate, tras detectar la presencia de las subunidades CNATr y CNB de calcineurina en hojas jóvenes de las plántulas transformadas (Figura 2), contrasta con la baja eficiencia de transformación previamente obtenida por El Mansouri y col., (1999) en esta variedad de tomate. Asimismo, aunque las plantas generadas a partir de este tipo de explantos pueden ser quiméricas, incapaces de producir semillas transgénicas, esto no ha supuesto un obstáculo para la obtención de un cultivo celular transgénico a partir de tallos obtenidos de estos cotiledones transformados, al haberse realizado el proceso bajo la presión selectiva por kanamicina.

La callogénesis se indujo a partir de explantos obtenidos de los tallos, comprobándose a lo largo de los subcultivos la presencia de las dos subunidades de calcineurina en los callos transgénicos (Figura 4). Sin embargo, varias de las líneas originalmente seleccionadas, o bien eran incapaz de formar callos en medio selectivo, indicando que eran falsos positivos, o se perdieron por infecciones con hongos o bacterias durante el tiempo de iniciación de los callos. Finalmente, se han podido establecer ocho líneas de callos a partir de tres plantas distintas. Como es sabido, para ser funcional, el cultivo transgénico debe incorporar a su genoma el transgen y, posteriormente, expresarlo. Por esta razón, se hizo un estudio de expresión, por RT-PCR, de las dos subunidades de calcineurina, CNA y CNB, en los distintos callos transgénicos (Figura 6) comprobándose que los niveles de expresión eran similares entre las distintas líneas de callos siendo algo mas abundante la subunidad reguladora CNB (Figura 7). El hecho de poseer un exceso de la subunidad reguladora en las células tiene importantes consecuencias para la acción de la proteína heterodímera en el cultivo (ver apartado E).

B. Efecto de la sobreexpresión de calcineurina sobre la morfología y crecimiento de los callos

Una de las primeras consecuencias observadas de la expresión de calcineurina de levadura en las células de tomate fue un cambio en la morfología celular. Un porcentaje muy elevado de las células de los callos transgénicos exhiben un menor tamaño y un mayor grado de elongación, resultando células fusiformes con formaciones en cadeneta donde las células aparecen septadas en múltiples compartimentos (Figura 7). Este mismo efecto fue detectado en *Schizosaccharomyces pombe* por Yoshida y col., (1994), donde la CaN aumentó la longitud de las células, indujo la formación de núcleos con morfologías aberrantes y desplazados del centro de las células, así como alteraciones en la formación de los microtúbulos y de los cuerpos polares fusiformes y la aparición de células septadas y ligeramente encorvadas. Del mismo modo, en *S. cerevisiae* la sobreactivación de calcineurina indujo la transformación de células redondeadas a células alargadas y cambios en el patrón de gemación (Mendoza y col., 1996). En esta misma línea, la supresión de la deficiencia en la iniciación de la septación en levaduras

por sobreexpresión de calcineurina (Lu y col., 2002), sugirió la implicación de CaN en la citocinesis, en la posición de los cuerpos polares fusiformes, en la posición y morfología nuclear, y en el crecimiento polarizado y septado (Plochocka-Zulinska y col., 1995; Sigiura y col., 2002; Cheng y col., 2002).

La ligera inhibición del crecimiento de los callos transgénicos, expresado como peso fresco e índice de crecimiento relativo, en relación a los controles (Figura 8) constituye un hecho que también ha sido observado en levadura tras la sobreexpresión de calcineurina (Withee y col., 1998).

C. Efecto de calcineurina de levadura sobre la regulación de la homeostasis iónica en callos de tomate

Los resultados referidos al análisis del contenido iónico muestran que el acúmulo de Na^+ y Cl^- es similar en los callos controles y transgénicos, mientras que los callos transgénicos acumulan más cantidad de Ca^{2+} y de K^+ que los controles (Figura 10). En levadura, la calcineurina afecta directamente a los flujos de K^+ y Ca^{2+} , a través de la modulación de los transportadores de K^+ , Trk1 y 2, y de los transportadores de Ca^{2+} , Vcx1, Pmc1 y Pmr1 (Mendoza y col 1996, Cunningham y Fink 1996). Nuestros datos indican que también en plantas, la calcineurina de levadura puede regular los transportadores K^+ y Ca^{2+} de la membrana

En el tomate transgénico la calcineurina sobreactivada de levadura podría activar sistemas de absorción de K^+ de la membrana plasmática con homología a los transportadores Trk, como por ejemplo los transportadores de tipo Kup o HAK o HKT. En este trabajo hemos observado que la sobreexpresión de calcineurina incrementa los niveles de expresión de uno de los sistemas de transporte de K^+ , el antiportador K^+/H^+ LeNHX2 de membranas intracelulares (Figura 25), que parece estar implicado en la regulación de la homeostasis de K^+ en el citoplasma y en compartimentos intracelulares (Venema y col. 2003). El aumento de los niveles de transcrito de LeNHX2 en callos transgénicos podría estar inducido directamente por la calcineurina, o indirectamente por un incremento en los niveles de K^+ citoplasmáticos, ya que ha sido observado que la

expresión de una proteína de la misma familia, AtNHX1 se induce en Arabidopsis por altos niveles de K^+ (Gaxiola y col. 1999). Respecto a la regulación de la absorción de K^+ en plantas por homólogos de calcineurina, se ha observado en células guarda de Vicia faba una inhibición de los canales IRF de K^+ por una actividad calcineurina (Luan y col., 1993).

En levadura, la calcineurina mantiene la homeostasis del Ca^{2+} regulando positivamente los transportadores primarios Pmc1 y Pmr1 (Cunningham y col., 1994) y negativamente el antiportador Ca^{2+}/H^+ , Vcx1 (Cunningham y Fink, 1996; Tanida y col., 1995; Garret-Engle y col., 1995). El efecto sobre Pmc1 y Pmr1 es sobre todo transcripcional, mientras que calcineurina afecta sólo ligeramente el nivel de expresión de Vcx1 (Cunningham y Fink, 1996). En plantas, la actividad de la proteína AtCAX2 que codifica un antiportador Ca^{2+}/H^+ con homología a Vcx1 (Hirschi y col., 1996), es modulable por calcineurina cuando se expresa en células de *S. cerevisiae* (Mendoza, 2001). Utilizando secuencias EST de tomate, se ha estudiado el nivel de expresión de un posible antiportador CAX en este cultivo, mediante PCR a tiempo real, habiéndose encontrado en los callos transgénicos una pequeña inhibición en la expresión de un CAX con homología a AtCAX2 (Figuras 26, 27 y 28). No hemos podido cuantificar los niveles de otra isoforma con más homología a CAX1 o a la Ca^{2+} -ATPasa LCA1 (datos no mostrados). Los datos obtenidos indican, una vez más, que la calcineurina de levadura expresada en plantas tiene efectos similares a los que tiene en levadura. A este respecto, nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión de calcineurina de levadura mejora la absorción del K^+ y del Ca^{2+} , lo que podría explicarse como un efecto de calcineurina directamente sobre el nivel de expresión de los antiportadores o indirectamente a través de los cambios en la homeostasis iónica.

Por otra parte, en levadura, calcineurina afecta la expresión de varias P-ATPasas (Mendoza y col., 1996, Cunningham y Fink, 1996; Whittee y col., 1998), siendo un hecho conocido en plantas, que la absorción de iones por los transportadores secundarios depende de la fuerza motriz generada por la bomba de H^+ de la membrana plasmática, lo que confiere especial importancia a este enzima en la regulación de la homeostasis iónica. Por esta razón hemos investigado la actividad extractora de H^+ por células de callos controles y transgénicos en calcineurina de levadura, comprobándose que las células disgregadas de callos transgénicos resuspendidos en un medio líquido sin

tamponar se equilibraban a un pH más alcalino que las controles (Figura 11). Resultados similares fueron obtenidos Whithee y col., (1998) tras expresar una forma constitutivamente activada de calcineurina en levadura, comprobando que estas células presentaban una mayor sensibilidad a pH bajos que la estirpe silvestre.

Los resultados anteriormente indicados nos llevaron a fijar el pH a 7,3 para las determinaciones de la capacidad de extrusión de H^+ en ambos tipos de callos. Los estudios de actividad bombeadora de H^+ demostraron una menor actividad en los callos transgénicos que en los controles (Figuras 12). La estimulación por fusicocina de la extrusión de protones indicó que el principal responsable de la acidificación era la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática (Figura 14, Tabla 4). En vista de los resultados obtenidos y de las evidencias existentes en la bibliografía que relacionan a la calcineurina con la H^+ -ATPasa de plasmalema (Whithee y col., 1998), llevamos a cabo un estudio más exhaustivo de la actividad y expresión del enzima H^+ -ATPasa asociada a la membrana plasmática.

La menor actividad H^+ -ATPasa de plasmalema, en vesículas microsomales y en vesículas enriquecidas en plasmalema, de los callos transgénicos con respecto a los controles (Tablas 6 y 11) así como la significativa inhibición del transporte de H^+ dependiente de ATP en membranas microsomales y en plasmalema de los callos transgénicos con respecto a los callos controles (Tablas 7 y 12), se corresponde, asimismo, con una menor cantidad de enzima (Figura 18) y con una menor expresión de LHA4, una isoforma mayoritaria de la H^+ -ATPasa en las membranas de callos transformados respecto de los controles (Mito y col., 1996). Las actividades H^+ -ATPasa de plasmalema y transporte de H^+ dependiente de ATP, determinadas a nivel micorsomal, son superiores en los callos controles que en los transgénicos, no observándose variaciones significativas en la razón H^+ extruídos/ATP hidrolizado (Tabla 8). Por el contrario, en determinaciones a nivel de vesículas de plasmalema, los callos controles muestran un mayor incremento de H^+ extruídos en relación a la actividad de hidrólisis de ATP y, por tanto una mayor razón H^+ /ATP, que los callos transgénicos (Tabla 13). Cambios en la razón H^+ extruídos vs ATP hidrolizado han sido observados en estudios previos llevados a cabo por Venema y Palmgren, (1995); Baunsgaard y col., (1996); Morsomme y col., (1996); Ballesteros y col., (1998) y por Kerkeb y col., (2001a, b), en los

que se ha descrito que los cambios en la estequiometría del enzima H^+ -ATPasa podrían explicarse en base a un mecanismo que implica la fosforilación de este enzima. La calcineurina podría intervenir en la regulación de la H^+ -ATPasa promoviendo la defosforilación del enzima y, en consecuencia, su desactivación. Por otra parte, es probable que la razón H^+/ATP en los callos transgénicos disminuya como consecuencia de la menor cantidad de enzima. En este sentido, el cambio de pH y otras señales derivadas de dicho cambio podrían modificar el estado de activación de la H^+ -ATPasa. A este respecto, nuestros resultados concuerdan con los de Whitee y col., (1998), quienes demuestran que la sobreexpresión de una forma constitutivamente activada de calcineurina en levadura reduce la actividad y la expresión de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática, lo que conduce a un crecimiento ralentizado y a una mayor sensibilidad a pH ácidos en las células transgénicas que en las controles.

Por otra parte, hemos observado una mayor actividad H^+ -ATPasa de tonoplasto en los microsomas obtenidos de callos transgénicos que en los de callos controles (Tabla 6). Esta diferencia en actividad no se corresponde con cambios en el nivel de expresión de la subunidad c y A de la V-ATPasa o la PPasa, según se deduce de los estudios de *Northern blot*. (Figura 20). Aunque no se han descrito en la literatura efectos de calcineurina sobre la V-ATPasa, es posible que la actividad de esta enzima incremente en callos de tomate para compensar la alcalinización del citoplasma que podría resultar de la menor expresión de la H^+ -ATPasa de plasmalema. Además, el incremento en la actividad V-ATPasa como consecuencia de la sobreexpresión de calcineurina podría estar implicada en la mayor acumulación de K^+ , Ca^{2+} y Na^+ en callos transgénicos respecto de los controles, al proporcionar esta enzima la fuerza H^+ motriz necesaria para el funcionamiento de los transportadores iónicos secundarios de la vacuola.

Los resultados expuestos demuestran que la expresión de una forma constitutivamente activada de calcineurina en callos de tomate da lugar a un gran número de cambios relacionados con la homeostasis iónica, al implicar procesos fundamentales para el buen funcionamiento de las células. Es conocido que la actividad del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema es controlada a muchos niveles. En plantas ha sido muy difícil manipular la cantidad de H^+ -ATPasa, y solamente en algunos casos se ha conseguido demostrar directamente el efecto de la reducción de la cantidad de

determinadas isoformas del enzima por inserciones de T-ADN (Krysan y col., 1996) o cosupresión (Zhao y col. 2000), que han resultado en fenotipos de reducción del crecimiento, disminución de la carga de floema, cierre de los estomas o esterilidad.

Nuestros resultados indican la existencia de una relación entre estos fenotipos y la sobreexpresión de calcineurina, aportando evidencias de la importancia de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática para el crecimiento y la morfología de las células de tomate. Así, la reducción de la actividad H⁺-ATPasa de plasmalema podría inducir cambios en el turgor celular provocando células más alargadas, tal como hemos observado en este trabajo. El papel de la H⁺-ATPasa en la morfología celular ya ha sido sugerido por Yoshida y col., (1994) y Mendoza y col., (1996), mientras que su implicación en la osmoregulación a nivel de los estomas ha sido demostrada (Zhao y col., 2000, Kinoshita y Shimazaki, 1999). Además, existen numerosas evidencias que relacionan la actividad H⁺-ATPasa con la elongación celular en respuesta a auxinas (Hager, 2003, Rober-Kleber y col., 2003)

D. Efecto de la expresión heteróloga de calcineurina sobre la tolerancia a sal

Altos niveles de Na⁺ extracelulares inducen un incremento transitorio de la concentración de Ca²⁺ libre en el citoplasma tanto en levadura (Mendoza y col., 1996) como en plantas (Lynch y col., 1989; Torrecilla y col., 2001; Knight, 2000), iniciando de este modo la vía de señalización del estrés salino (Knight y Knight, 2001; Matsumoto y col., 2002). Por otra parte, es conocido que el equilibrio celular del contenido en Na⁺ y K⁺ es un factor importante en la tolerancia a la sal (Greenway y Muns, 1980), habiéndose indicado que, en condiciones de estrés salino, las plantas tolerantes poseían una mayor razón K⁺/Na⁺ que las sensibles (Heimler y col., 1995; Datta y col., 1996; Ayala y col., 1997). Esto implica que el aumento de las concentraciones de K⁺ y Ca²⁺ en las células que expresan calcineurina podría tener efectos beneficiosos cuando estos callos se someten a un estrés salino. En relación a lo anterior, las determinaciones de peso fresco e índice de crecimiento relativo mostraron que los callos controles cultivados en presencia de 100 mM de NaCl reducen en un 60 % su crecimiento, mientras que los callos transgénicos

cultivados en medios con 100 mM NaCl reducen su crecimiento tan sólo en un 35 % (Tabla 1, Figura 9).

Por otra parte, el aumento en el contenido de Na⁺ y de Cl⁻ observable en ambos tipos de callos, sobre todo de Na⁺ en los callos transgénicos, tras un estrés por 100 mM de NaCl, también fue observado en células de tabaco (Binzel y col., 1987) y de patata (Sabbah y Tal, 1990) una vez adaptadas al NaCl, y en las líneas de callos de *Cymbopogon martinii* tolerantes al NaCl respecto a las sensibles (Patnaik y Debata, 1997). El hecho de que los callos de tomate transgénicos en calcineurina de levadura sometidos a un estrés de 100 mM de NaCl muestren un mayor crecimiento y una mayor acumulación de Na⁺, podría explicarse en base a la utilización de este catión para compensar la pérdida de K⁺. Es conocido que el Na⁺ puede sustituir al K⁺ en diferentes funciones celulares (Kumar y Sharma, 1989), incluyendo la osmoregulación (Patnaik y Debata, 1997; Blumwald y col., 2000; Hasegawa y col., 2000; Zhu, 2002). La diferencia en la acumulación de Ca²⁺ entre los callos controles y transgénicos es, sobre todo, manifiesta en presencia de estrés salino. En este trabajo no hemos visto diferencias entre callos controles y transgénicos crecidos en condiciones de estrés salino respecto a la inducción o inhibición de la expresión de los transportadores estudiados, probablemente debido a que hemos utilizado una forma constitutivamente activada de Calcineurina. Por el contrario, sí hemos observado un efecto del estrés salino sobre el nivel de expresión de algunos de los transportadores estudiados. Así, tanto en callos controles como transgénicos observamos que el estrés salino induce la expresión del antiportador con homología a CAX2, del antiportador K⁺/H⁺ LeNHX2 y del gen LHA4 y no afecta la expresión de las bombas de H⁺ del tonoplasto (Figura 20, 21, 24, 25 y 28)

Asimismo, el hecho de que la sobreexpresión de calcineurina de levadura no altere el contenido hídrico de los callos de tomate, mientras que este parámetro se ve significativamente reducido, tanto en los callos controles como en los transgénicos desarrollados durante 5 semanas con 100 mM NaCl (Tabla 3), es indicativo de que el cambio en el contenido iónico no está provocado por una dilución y/o concentración de estos iones.

Como se indicó en el capítulo de Antecedentes Científicos, la inhibición del crecimiento es una de las primeras respuestas de defensa que desarrollan las plantas frente al estrés salino, de forma que una menor división y elongación celular pueda facilitar la utilización de la energía para la acumulación de solutos orgánicos y para la compartimentalización iónica (Tal y col., 1984; Cheesman, 1988, Hasegawa y col., 2000; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Zhu, 2002). En este sentido es conocido que la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema representa un factor esencial para el crecimiento celular, habiéndose observado una inhibición de dicha actividad en respuesta al estrés salino. Así, en trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto que callos de tomate adaptados a 100 mM de NaCl mostraban una menor actividad H^+ -ATPasa de plasmalema y una razón K^+/Na^+ intracelular más elevada que los callos controles (Kerkeb y col. 2001b), lo que sugería que una posible respuesta de tolerancia al NaCl podría estar relacionada con una reducida actividad de las bombas de H^+ , de lo que se deriva una disminución del potencial de membrana y de la absorción de Na^+ (Nass y col., 1997; Serrano y col., 1999; Mansour y col., 2003). Este hecho ha sido, asimismo, observado en raíces de tomate (Suhayda y col., 1990), en hojas maduras pero no jóvenes de tomate (Wilson y col., 1994) y en raíces de girasol (Ballesteros y col., 1998). De este modo, la menor cantidad y actividad de la H^+ -ATPasa y el reducido crecimiento de los callos transgénicos podrían estar relacionados directamente con la mayor tolerancia a la salinidad de estos callos.

Para comprobar esta hipótesis, hemos intentado medir la extrusión de protones en callos controles y transgénicos tras cultivarlos durante una generación en un medio con 100 mM de NaCl. Los callos controles no mostraban una extrusión de protones en estas condiciones, probablemente por el mal estado de sus células. En este sentido, es observable que el peso fresco de los callos controles disminuye a lo largo de las tres semanas de cultivo (Figura 9). Asimismo, el ensayo de viabilidad de las células mostró que la fluorescencia de las células controles era mucho menor que la de las células transgénicas tras seis horas de estrés salino (Figura 17). Por esta razón los ensayos para determinar el efecto del estrés salino sobre la actividad extractora de H^+ in vivo se llevaron a cabo a tiempos comprendidos entre 1 y 4 horas.

.

En el intervalo de tiempo anteriormente indicado, el estrés salino incrementa la extrusión de H^+ en células disgregadas de callos transgénicos y sobre todo, de callos controles (Figura 13). Por otra parte, el Test de reacción fluorocromática (FCR), demostró que la mayor acidificación de las células controles no era provocada por una mayor rotura celular tras varias horas de sometimiento a un estrés de 100 mM de NaCl, puesto que tanto las células controles como transgénicas sometidas a 1 y 4 horas de estrés salino mantenían una perfecta integridad de sus membranas (Figuras 15 y 16) y solo a partir de la sexta hora de estrés las membranas iniciaban un claro deterioro al observarse la pérdida de fluorescencia (Figura 17). Este aumento del bombeo de protones por un estrés salino de corta duración (Figura 13) ya había sido observado en trabajos anteriores (Kerkeb y col 2001a). Nuestros resultados también han demostrado, a nivel de membranas microsomales de callos controles y transgénicos, un ligero incremento de la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema por el estrés salino (Tabla 6), detectándose una menor actividad enzimática en las membranas de los callos transgénicos. Puesto que el análisis de la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema a nivel de microsomas no es muy fiable, a pesar del uso de inhibidores, al estar dicha actividad enmascarada por la actividad de otras ATPasas (Larsson y col., 1987), se procedió a la purificación del plasmalema, al objeto de confirmar los datos obtenidos en microsomas (tabla 10). El incremento de la actividad fosfohidrolítica de la ATPasa de plasmalema tras someter los callos a un estrés salino (Tabla 11), podría estar provocado por un aumento de la cantidad de enzima, posibilidad ratificada tanto por la detección inmunológica, utilizando un anticuerpo policlonal, como por la detección del transcrito de LHA4, por northern blot y PCR a tiempo real, que reflejaron un ligero incremento del contenido de esta ATPasa en las vesículas de plasmalema de los callos controles y transgénicos sometidos a un estrés de 100 mM NaCl durante 3 horas (Figura 18, 19, 21 y 24). En estas condiciones de estrés se ha observado, asimismo, un incremento de la razón H^+ extruidos/ATP hidrolizado en plasmalema de callos transgénicos (Tabla 13), resultados coincidentes con los previamente obtenidos en callos de tomate por Kerkeb y col., (2001a y b, 2002). Según estos autores el incremento de la razón H^+ /ATP se acompañaba de una mayor cantidad de la proteína 14-3-3 en la membrana plasmática, lo que indicaba que este incremento se debía a una fosforilación y activación de la enzima (Kerkeb y col., 2002). El hecho de que en los callos controles dicha razón no cambie por el estrés salino podría estar relacionado con la severidad y duración del

estrés, mientras que en caso de los callos transgénicos el incremento de la razón podría indicar que la señalización inducida en respuesta al estrés salino compensa la perturbación del mecanismo de activación aparentemente causado por la sobreexpresión de calcineurina. Asimismo, el aumento de la actividad ATPasa de plasmalema tras un estrés salino de corta duración contrasta con la observación de que los callos transgénicos, a pesar de tener menor actividad ATPasa, crecen mejor en condiciones de estrés salino. Mecanismos implicados en la tolerancia a un estrés de corta duración podrían estar relacionados con la inducción del eflujo de Na^+ por el antiportador Na^+/H^+ de plasmalema, mientras que, a más largo plazo, la acumulación de Na^+ en las vacuolas y el reajuste del crecimiento y la homeostasis iónica son procesos más importantes (Rodríguez-Rosales y col., 1999; Kerkeb y col., 2002; Zhu, 2001, 2002).

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 la V-ATPasas 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; Ballesteros y col., 1996; Binzel y Ratajczak, 2002). En nuestro trabajo, la actividad H^+ -ATPasa asociada al tonoplasto, determinada en la fracción microsomal, mostró un aumento significativo con el estrés salino, aunque los niveles de enzima en los callos transgénicos y controles eran similares (Tabla 6). Sin embargo, no se detectaron diferencias a nivel de los transcritos de las subunidades A y c de la V-ATPasa, así como de la V-PPasa, ni en función de la transgenicidad ni del estrés salino, lo que sugiere una regulación postraducional de la V-ATPasa de tomate tanto por calcineurina como por el estrés salino (Figura 20).

E. Posibles mecanismos de acción de la calcineurina de levadura en callos de tomate

En levadura, el papel fundamental de calcineurina en la resistencia a sal implica la activación de una bomba de sodio, ENA1 (Mendoza y col. 1996), de lo que resulta una extrusión de Na^+ muy eficiente. En plantas no se han encontrado, hasta ahora, homólogos de esta bomba, estando el mecanismo del eflujo de Na^+ mediado por la combinación de una fuerza protón motriz creada por la H^+ -ATPasa y por el antiportador Na^+/H^+ SOS1 (Quintero y col., 2002). En comparación con plantas, en levadura la acumulación de Na^+ en la vacuola para el ajuste osmótico tiene menos importancia (Quintero y col., 2000), lo que indica que existen diferencias fundamentales en los mecanismos de adaptación al estrés salino entre plantas y hongos. En cualquier caso, también existen muchas similitudes en la percepción y transducción de la señal en respuesta a estrés salino entre ambos organismos. Así, en plantas, la vía SOS parece jugar un papel central en la adaptación al estrés salino, modulando la homeostasis de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} a través de transportadores de estos iones tanto en plasmalema como en vacuola (Shi y col., 2000; Rus y col., 2001a ; Qiu y col., 2002; Quintero y col., 2002; Qiu y col., 2003; Cheng y col., 2003), lo que demuestra que en plantas la homeostasis de Ca^{2+} también juega un papel esencial en la adaptación a estrés salino.

El efecto de la expresión de calcineurina de levadura sobre la expresión de los transportadores y cambios en la homeostasis iónica en tomate se podría explicar a través de la interferencia de calcineurina con otros sistemas dependientes de Ca^{2+} , como la vía SOS. En este sentido, se ha demostrado que ciertas proteínas sensoras de Ca^{2+} de la familia a la que pertenece SOS3 (las proteínas CBL, Calcineurin B-like) complementan la disrupción de CNB en levadura y tienen capacidad para interactuar con CNA de calcineurina de rata (Kudla y col., 1999). También podría ocurrir el fenómeno inverso, es decir que CNB interactuara con proteínas kinasas de la familia a la que pertenece SOS2 (CIPK). Estas interacciones podrían ser funcionales, y dar lugar a la activación de la kinasa, o no-funcionales, inhibiendo la respuesta normal de la planta. Aunque se supone que en levadura la acción de calcineurina es a través del heterodímero CNA-CNB, en plantas de tomate sobreexpresando calcineurina hemos observado un exceso de la subunidad CNB. Por otra parte, la subunidad CNA podría

interaccionar con algunos CBLs de plantas, compitiendo, de esta forma, con las kinasas CIPK por sus efectores. De ello se derivaría una modificación de las vías de regulación que implican CBLs y CIPKs, lo que podría dar lugar, por ejemplo, a una sobreactivación de la proteína kinasa SOS2, implicada directamente en la regulación de la actividad y del nivel de expresión de varios transportadores claves en la respuesta a estrés salino, como es el caso de los antiportadores SOS1 o NHX1 (Shi y col., 2000; Qiu y col., 2002; Quintero y col., 2002; Qiu y col., 2003), de los sistemas de absorción de K^+ como HKT1 (Rus y col., 2001a) y de los transportadores de Ca^{2+} , como CAX1 o CAX2 (Cheng y col., 2003). La inducción de LeNHX2, la inhibición de un CAX de tomate, y el aumento de los niveles de Ca^{2+} y K^+ en callos de tomate transgénicos en calcineurina de levadura se podrían explicar por un mecanismo como el indicado.

Por otra parte, aunque no se hayan identificado homólogos estructurales de calcineurina en plantas, cabe también pensar en un efecto específico de esta fosfatasa en estos organismos. A este respecto, la interacción entre CBLs y CNA, funcional en levadura, representa un mecanismo de regulación probablemente inexistente en plantas, lo que podría indicar que, en plantas, está conservado un mecanismo de regulación no funcional. Esto sugiere que, proteínas evolutivamente relacionadas han adquirido dianas distintas, no pudiendo descartarse que la homología entre las proteínas CNB y CBL esté relacionada por la similitud en su función, unir Ca^{2+} , y no por razones evolutivas. Teniendo en cuenta que en levadura, el efecto de calcineurina sobre el nivel de transcritos de diversos transportadores tiene lugar de forma específica a través de la desfosforilación de factores de transcripción que se unen a elementos reguladores en los promotores (Matheos y col., 1997; Stathopoulos y Cyert, 1997; Shi-Young Park y col., 2001; Hirayama y col., 2003), cabe la posibilidad de que en plantas algunos factores de transcripción homólogos hayan conservado dominios implicados en la desfosforilación por calcineurina. Esto podría explicar el efecto de esta fosfatasa sobre la expresión del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema en los callos de tomate y en levadura (Whithee y col., 1998). Sin embargo, no han sido identificados los elementos reguladores a nivel de promotores implicados en la represión de la expresión génica por calcineurina o los factores de transcripción implicados, elementos clave para poder comprobar esta hipótesis.

Cabría también la posibilidad de que en los callos de tomate, la calcineurina de levadura ejerciera su actividad fosfatasa de la misma forma que en levadura. A este respecto, existen evidencias experimentales de la presencia de una fosfatasa con propiedades funcionales similares a calcineurina, deducidas del efecto de sustratos o inhibidores específicos de fosfatasas tipo 2B, cuyo mecanismo de acción se establece a nivel del control de la homeostasis de K^+ (Luan y col., 1993; Allen y Sanders, 1995; Pardo y col., 1998). Aunque con poca homología estructural, la calcineurina de levadura podría tener la misma especificidad para sus sustratos que esta fosfatasa endógena. Otra posibilidad es que calcineurina de levadura catalizara en plantas una defosforilación no específica de proteínas inducida por la fuerte sobreexpresión de esta fosfatasa.

En conclusión, cualquiera que sea el mecanismo de acción de calcineurina de levadura en plantas, los resultados aquí presentados han demostrado que en los callos de tomate transgénicos la expresión de esta proteína tiene múltiples efectos sobre la homeostasis iónica, los cuales podrían ser el resultado de una regulación directa por esta fosfatasa, o lo que es más probable, que calcineurina afecte a un número limitado de efectores que a su vez sean los que induzcan los cambios observados. Así, el efecto primario de calcineurina podría estar relacionado con la homeostasis de Ca^{2+} , al afectar a algún transportador de este catión. Posteriormente, el cambio en los niveles de Ca^{2+} podría inducir otros cambios observados en los demás sistemas de transporte por otras vías dependientes de Ca^{2+} . Por otra parte, también cabe la posibilidad de que calcineurina pueda controlar la homeostasis iónica a través de la inhibición de la expresión de la H^+ -ATPasa de plasmalema. En este sentido, aparte de la implicación directa en la absorción o exclusión de Na^+ , los cambios en el pH citoplasmático y en el potencial de membrana representan importantes señales implicadas en la regulación de la homeostasis iónica (Yenush y col., 2002). Asimismo, variaciones en el nivel de K^+ en las células de callos transgénicos podrían dar lugar a una multitud de respuestas, entre ellas, la inducción del antiportador LeNHX2 (Figura 25).

VII. CONCLUSIONES

1. El análisis de la expresión de las subunidades catalítica y reguladora de Calcineurina de levadura en los callos de tomate indica la estabilidad con la que el transgen se ha integrado en el genoma de la planta, y la eficiencia en la obtención de un cultivo celular transformado con dicha proteína.
2. La menor actividad y expresión del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema y la menor capacidad para acidificar el medio de cultivo de los callos transgénicos con respecto a los controles, junto con el mayor contenido de iones K^+ y Ca^{2+} , la mayor expresión del antiportador vacuolar K^+/H^+ , LeNHX2, y menor expresión de un antiportador vacuolar Ca^{2+}/H^+ demuestra que la expresión de calcineurina tiene efectos fundamentales sobre la homeostasis iónica en plantas.
3. La respuesta más eficaz de los callos transgénicos frente a un estrés salino es probablemente consecuencia de las alteraciones en la actividad y expresión de varios transportadores secundarios y primarios inducidas por la expresión de calcineurina.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. de la Riva G., González-Cabrera J., Vázquez-Padrón R. y Ayra-Pardo C. (1998).** *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Plant Biotech.* 1:3.
- Abel G.H. (1969).** Inheritance of the capacity for chloride exclusion by soybean. *Crop Sci* 9: 697-699.
- Aitken A., Cohen P, Santikarn S., Williams D.H., Calder A.G. Smith A. y Klee C.B. (1982).** Identification of the NH₂-terminal blocking group of calcineurin B as myristic acid. *FEBS lett* 150: 314-318.
- Albertsson P.A. (1971a).** Partition of cell particles and macromolecules. 2nd ed. Almqvist & Wiksell, Srockholm; Wiley (Intersciencie), New York.
- Albertsson P.A. (1971b).** Partition of cell particles and macromolecules. 2nd ed. Japanese transl. Charles E, Tuttle Co., Tokyo.
- Albretcht V., Ritz O., Linder S., Harter K y Kudla J. (2001).** The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca²⁺-regulated kinase. *EMBO J.* 20: 1051-1063.
- Allen G. J. y Sanders D. (1995).** Calcineurin, a time 2B protein phosphatase, modulates the Ca²⁺ permeable slow vacuolar ion channel of stomatal guard cells. *The Plant Cell* 7, 1473-1483.
- Ames N.B. (1966).** Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol* 8: 115-119.
- Amtmann A. y Sanders D. (1999).** Mechanisms of uptake Na⁺ by plant cells. *Adv Bot Res* 29: 75-12.
- Amtmann A., Fischer M., Marsh E.L., Stevanovic A., Sanders D. y Schachtman D.P. (2001).** The wheat CDNA LCT1 generates hipersensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. *plant physiol.* 126: 1061-1071.
- Amtmann A., Laurie S., Leigh R. A y Sanders D. (1997).** Multiple inward channels provide flexibility in Na⁺/K⁺ discrimination at the plama membrane of barley suspension culture cells. *Journal of Experimental Botany.* 48: 481-497.
- Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A. y Blumwald E. (1999).** Salt tolerance conferred by overexpression of vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.
- Arrillaga I., Gil-Mascarell, Gisbert C., Sales E., Montesinos C., Serrano R. y Moreno V. (1998).** Expression of the yeast *HAL2* gene in tomato increases the in vitro salt tolerance of transgenic progenie. *Plant Sci* 136: 219-226.

- Ashraf M. (1994).** Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 13: 121-138.
- Ayala F., Ashraf M. Y O'Leary J.W. (1997).** Plasma membrane H⁺ATPase activity in salt-tolerant and salt-sensitive lines of spring wheat (*Triticum Aestivum L.*). *acta Bot. Neerl.* 46(3): 315-324.
- Ayers A.O., Vazquez N., De la Rubia A., Blaso E., Samplon S. (1960).** Saline and sodic soils of Spain. *Soil Science* 90: 133-138.
- Babakov A.V., Chelysheva V.V., Klychnikov O.I., Zorinyanz S.E., Trofimova M.S. y De Boer A.H. (2000).** Involvement of 14-3-3 proteins in the osmotic regulation of H⁺-ATPase in plant plasma membranes. *Planta.* 211(3):446-8.
- Bader T., Bodendorfer B., Schroppe K. y Morschhauser J. (2003).** Calcineurin is essential for virulence in *Candida albicans*. *Infect immun.* 71(9): 5344-54.
- Ballesteros E., Blumwald E., Donaire J.P., Belver A. (1997).** Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. *Physiol Plant* 99: 328-334.
- Ballesteros E., Donaire J.P. y Belver A. (1996).** Effects of salt stress on H⁺-ATPase and H⁺-PPase activities of tonoplast-enriched vesicles isolated from sunflower roots. *Physiol Plant* 97: 259-268.
- Ballesteros E., Kerkeb B., Donaire J.P., Belver A. (1998).** Effects of salt stress on H⁺-ATPase activity of plasma membrane-enriched vesicles isolated from sunflower roots. *Plant Sci.* 134: 181-190.
- Bañuls J. y Primo-Millo E. (1992).** Effect of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of *Citrus* plants. *Physiol Plant* 86: 115-123.
- Barkla B.J. y Pantoja O. (1996).** Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 159-184.
- Baunsgaard L., Venema K., Axelsen K.B., Villalba J.M., Welling A., Wolenweber B. y Palmgren M.G. (1996).** Modified plant plasma membrane H⁺-ATPase with improved transport coupling efficiency identified by mutant selection in yeast. *Plant J* 10: 451-458.
- Belda JE. y Lastres J. (2000).** Reglamento de producción integrada de tomate bajo abrigo: Resumen de aspectos importantes, pp 1-7.
- Belver A. y Travis R.L. (1990).** Effect of NaCl and mannitol on plasma membrane proteins in corn roots. *Protoplasma* 155: 76-84.

- Ben-Hayyim G. y Kochba J. (1983).** Aspects of salt tolerance in a NaCl selected stable cell line of *Citrus sinensis*. *Plant Physiol.* 72:687-690.
- Bennett A.B. y Spanswick R.M. (1983).** Optical measurements of ΔpH and $\Delta\Psi$ in corn root membrane vesicle. Kinetic analysis of Cl^- effects on a proton-translocating ATPase. *J Membr Biol* 71: 95-107.
- Berthomieu P., Conejero G., Nublat A., Brackenbury W.J., Lambert C., Savio C., Uozumi N., Oiki S., Yamada K., Cellier F., Gosti F., Simonneau T., Essah P.A., Tester M., Very A.A., Sentenac H., Casse F. (2003).** Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na^+ recirculation by the phloem is crucial for Salt tolerance. *EMBO J* 22, 2004-2014.
- Binzel M. L., Hasegawa P. M., Rhodes D., Handa A. K. y Bressan R.A. (1987).** Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiol.* 84:1408-1415.
- Binzel M. y Ratajczak R. (2002).** Function of membrane transport systems under salinity: tonoplast, in: A. Lauchli, U. Luttge (Eds.), *Salinity: Environment-Plant-Molecules*, Kluwer Academic Publishers 423-449.
- Binzel M.L. (1995).** NaCl-induced accumulation of tonoplast and plasma membrane H^+ -ATPase message in tomato. *Plant Physiol* 94: 722-728.
- Blatt M.R. (2000).** Ca^{2+} signalling and control of guard-cell volume in stomatal movements. *Curr Opin Plant Biol.* Jun;3(3):196-204.
- Blumwald E. (1987).** Tonoplast vesicles as a tool in the study of ion transport at the plant vacuole. *Physiol Plant* 69: 731-734.
- Blumwald E. y Poole R.J. (1985).** Na^+/H^+ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 78: 163-167.
- Blumwald E., Aharon G. S. y Apse M. P. (2000).** Sodium transport in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1; 1465, 140-151.
- Bohnert H.J. y Jensen R.G. (1996).** Metabolic engineering of increased salt tolerance-The next step. *Aust J Plant Physiol* 23: 661-667.
- Bohnert H.J. y Scheveleva E. (1998).** Plant stress adaptation-making metabolism move. *Current opinion in Plant Biology.* 1: 267-274.
- Bohnert H.J., Jensen R.G., Nelson D.E. (1995).** Adaptation to environmental stresses. *Plant Cell* 7: 1099-1111.

- Bolarín M.C., Santa-Cruz A., Cayuela E. y Perez-Alfocea F. (1995).** Short-term solute changes in leaves and roots of cultivated and wild tomato seedlings under salinity. *J. Plant Physiol.* 147, 463-468.
- Bordás M., Montesinos C., Dabanza M., Salvador A., Roig L.A., Serrano R. y Moreno V. (1997).** Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to *Cucumis melo* L. cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance. *Transgenic Res.* 6: 41-50.
- Bowers K., Levi B.P., Patel F.I. y Stevens T.H. (2000).** The Sodium/Proton Exchanger Nhx1p Is Required for Endosomal Protein Trafficking in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Moll. Biol. Cell* Vol. 11, Issue 12, 4277-4294.
- Bradford M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bremberger C. y Lüttge U. (1992).** Dynamics of tonoplast proton pumps and other tonoplast proteins of *Mesembryanthemum crystallinum* L. during the induction of crassulacean acid metabolism. *Planta* 188: 575-580.
- Brown D.J. y Dupont F.M.C. (1989).** Lipid composition of plasma membranes and endomembranes prepared from root of barley (*Hordeum vulgare* L.). Effect of salt. *Plant Physiol* 90: 955-961.
- Bucher M., Schroeder B., Willmitzer C. y Reiesmeier J.W. (1997).** Two genes encoding extensin-like proteins are predominantly expressed in tomato root hair cells. *Plant Mol Biol* 35: 497-508.
- Burgos P.A. y Donaire J.P. (1996).** H⁺-ATPase activities of tonoplast-enriched vesicles from non-treated and NaCl-treated jojoba roots. *Plant Sci* 118: 167-175.
- Bush D.R. (1993).** Proton-coupled sugar and aminoacid transporters in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44:513-542.
- Bustin S.A. (2002).** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* vol.29, 23-39.
- Camoni L., Iori V., Marra M. y Aducci P. (2000).** Phosphorylation-dependent interaction between plant plasma membrane H(+)-ATPase and 14-3-3 proteins. *J Biol Chem.*275(14):9919-9923.
- Cano E.A., Perez-Alfocea F., Moreno V. y Bolarin M.C. (1996).** Responses to NaCl stress of cultivated and wild tomato species and their hybrids in callus cultures. *Plant Cell Reports* 15: 791-794.

- Cárdenas M. E. y Heitman J. (1995).** Role of calcium in T-lymphocyte activation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 30: 281-298.
- Cheeseman J.M. (1988).** Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol* 87: 547-550.
- Chelysheva V.V., Smolenskaya I.N., Trofimova M.C., Babakov A.V. y Muromtsev G.S. (1999).** Role of the 14-3-3 proteins in the regulation of H⁺-ATPase activity in the plasma membrane of suspension-cultured sugar beet cells under cold stress. *FEBS Lett.* 30;456(1):22-26.
- Cheng N-H., Pittman J.K., Zhu J-K. y Hirschi K.D. (2003).** The protein kinase SOS2 activates the Arabidopsis H⁺/Ca²⁺ antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance. *J Biol Chem*, en prensa).
- Cheng S-H., Wilmann M.R., Chen H.C. y Sheen J. (2002).** Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant physiol.* 129: 469-485.
- Cheong Y.H., Kim K-N., Pandey G.K, Gupta R., Grant J.J. y Luan S. (2003).** CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. (2003) *Plant Cell.* 15:1833-1845.
- Choukallah R. (1986).** The effect of calcium on *Lycopersicon esculentum* sensitivity to sodium chloride. Doctoral Thesis 131 pp University of Minnesota.
- Chrispeels M.J., Crawford N.M. y Schroeder J.I. (1999).** Proteins for transport of water and mineral nutrient across the membranes of plant cells. *Plant Cell* 11: 661-675.
- Church G.M. y Gilbert W. (1984).** Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-1995.
- co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* Rif^r::pGSFR1161 in the presence of acetosyringone. *Plant Cell Reports* 12, 422-425.
- Cohen P. (1989).** The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev. biochem.* 58: 452-508.
- Colombo R. y Cerana R. (1993).** Enhanced activity of tonoplast pyrophosphatase in NaCl-grown cells of *Daucus carota*. *J Plant Physiol* 142: 226-229.
- Counillon L. y Pouysségur J. (2000).** The expanding family of eucaryotic Na⁺/H⁺ exchangers. *J Biol Chem* 275: 1-4
- Cuartero J., Fernandez-Muñoz R. y González-Fernando J.J. (1995).** Estreses abióticos. *En: El cultivo de tomate.* Nuez F (ed), pp.351-383. Mundi-Prensa.

- Cuartero J., Yeo A.R. y Flowers T.J. (1992).** Selection of donors for salt-tolerance in tomato using physiological traits. *New Phytol* 121: 63-69.
- Cunningham K.W. y Fink G.F. (1996).** Calcineurin inhibits VCX1-dependent H^+/Ca^{2+} exchange and induces Ca^{2+} ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 16: 2226-2237.
- Cunningham K.W. y Fink G.R. (1994a).** Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca^{2+} ATPases. *J. Cell Biol.* 124:351-363.
- Cunningham K.W. y Fink G.R. (1994b).** Ca^{2+} transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Exp. Biol.* 196: 157-166.
- Cyert M. S. (1993).** The function of Ca^{2+} /calmodulin regulated phosphatase in yeast. *Adv Protein Phosphatases* 7: 429-443.
- Cyert M.S., Kunisawa R., Kaim D. y Thorner J. (1991).** Yeast has homologs (CNA1 and CA2 gene products) of mammalian calcineurin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7376-7380.
- Danielsson A., Larsson C., Larsson K., Gustafsson L. y Alder L. (1996).** A genetic analysis of the role of calcineurin and calmodulin in Ca^{2+} dependent improvement of NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 30, 476-484.
- Datta K., Kumar A., Varma S.K. y Angrish R. (1996).** Effects of salinity on water relations and ion uptake in three tropical forage crops. *Indisn K. plant Physiol.* 2: 102-108.
- Davenport R.J. y Tester M. (2000).** A weakly voltage-dependent, nonselective cation channels mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiol.* 122: 823-834.
- De La Pompa J. L., Timmerman L. A., Takimoto H., Yoshida H., Elia A. J., Samper E., Potter J., Wakeham A., Marengere L., Langille B. L., Crabtree G. R. Y Mak T. W. (1998).** Role of the NF-AYc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 392: 182-186.
- Dehan K y Tal K (1978).** Salt tolerance in the wild relatives of cultivated tomato: Responses of *Solanum pennellii* to high salinity. *Irrig Sci* 1: 71-76.
- Del Águila E.M., Silva J.T. y Paschoalin V.M. (2003).** Expresión of the yeast calcineurin subunits CNA1 and CNA2 during growth and hyper-osmotic stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 221(2): 197-202.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. (1983).** A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.

- Demidchik V., Davenport R.J. y Tester M. (2002).** Nonselective cation channels in plants. *Annu Rev Plant Biol.*;53:67-107.
- DeWald D.B., Torabinejad J., Jones C.A., Shope J.C., Cangelosi A.R., Thompson J.E., Prestwich G.D. y Hama H. (2001).** Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126(2):759-769.
- Dietz K.J., Tavakoli N., Kluge C., Mimura T., Sharma S.S., Harris G.C., Chardonnens A.N., Y Golldack D. (2001).** Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and bio-chemical level. *J. Exp. Bot.* 52, 1969–1980.
- Downton W.J.S. (1984).** Salt tolerance of food crops: perspectives for improvement. *CRC Crit Rev Plant Sci* 1: 183-201.
- Drozdowicz Y.M. y Rea P.A. (2001).** Vacuolar H⁺ pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream. *Trends Plant Sci.* 6: 206-211.
- Dupont F.M. (1992).** Salt-induced changes in ion transport: regulation of primary pumps and secondary transporters. In *Transport and Receptor Proteins of Plant Membranes*. Cooke DT, Clarkson DT, pp. 91-100. Plenum Press, New York.
- El Mansouri I, Mercado JA, Santiago-Doménech N, Pliego-Alfaro F, Valpuesta V, Quesada MA. (1999).** Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiol. Plant.* 106: 355-362.
- Epstein E. y Rains D.W. (1987).** Advances in salt tolerance. *Plant Soil* 99: 17-29.
- Espinosa-Ruiz A., Bellés J.M., Serrano R. y Culiañez-Macia F.A. (1999).** *Arabidopsis thaliana* AtHAL3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. *Plant J* 20: 529-539.
- Ewing N.N. y Bennett A.B. (1994).** Assessment of the number and expression of P-type H⁺-ATPase genes in tomato. *Plant Physiol* 106: 457-557.
- Flowers T.J. y Yeo A.R. (1995).** Breeding for salinity resistance in crop plants- where next?. *Aust J Plant Physiol* 23: 661-667.
- Fuglsang A.T., Visconti S., Drumm K., Jahn T., Stensballe A., Mattei B., Jensen O.N., Aducci P. y Palmgren M.G. (1999).** Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H⁺-ATPase AHA2 involves the tree C-terminal residues Tyr(946)-thr-Val and requires phosphorylation of Thr (947). *J Biol Chem* 274: 36774-36780.

- Galtier N, Belver A, Gibrat R, Grouzis JP, Rigaud J, Grignon C (1988).** Preparation of corn root plasmalemma with low Mg-ATPase latency and high electrogenic H⁺ pumping. *Plant Physiol* 87: 491-497.
- Garcíadeblás B., Senn M.E., Bañuelos M.A. y Rodríguez- Navarro A. (2003).** Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *The Plant Journal* 34: 788-801.
- Garret-Engel P., Moilanen B. y Cyerts M. S. (1995).** Calcineurin, the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H⁺-ATPase. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4103-4114.
- Gassmann W., Rubio F. y Schroeder J.I. (1996).** Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *Plant J* 10: 869-882.
- Gaxiola R.A., Rao R., Sherman A., Grifasi P., Alpie S.L. y Fink G.R. (1999).** The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNHX1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1480-1485
- Gaxiola R.A., Yaun D.S., Klausner R.D. y Fink G.R. (1998).** The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4046-4050.
- Gil-Mascarell R., Lopez-Coronado J.M., Bellés J.M., Serrano R. y Rodriguez P.L. (1999).** The *Arabidopsis* HAL2-line gene family includes a novel sodium-sensitive phosphatase. *Plant J* 17: 373-383.
- Glenn E. P., Brown J. J. y Blumwald E. (1999).** Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:227-55.
- Gollack D. y Dietz K.J. (2001).** Salt-Inducer Expression of the Vacuolar H⁺-ATPase in the Common Ice Plant Is Developmentally Controlled and Tissue Specific. *Plant Physiology* 125:1643-1654.
- Gong D, Guo Y, Jagendorf AT, and Zhu JK. (2002).** Biochemical Characterization of the *Arabidopsis* Protein Kinase SOS2 That Functions in Salt Tolerance. *Plant Physiology* 130: 256-264.
- Gong Z., Koiwa H., Cushman M.A., Ray A., Bufford D., Kore-eda S., Matsumoto T.K, Zhu J., Cushman J.C., Bressan R.A. y Hasrgawa P.M. (2001).** Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. *Plant physiol.* 126: 363-375.
- Gorham J. , Wyn Jones R.G., Bristol A. (1990).** Partial characterization of the traits for enhanced K⁺-Na⁺ discrimination the D genome of wheat. *Planta* 180: 590-597.
- Green J.R. (1983).** The Golgi apparatus. *In* Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells. Hall JL, Moore AC (eds), pp. 55-81. Academic Press, London.

- Greenway H. y Munns R. (1980).** Mechanisms of salt-tolerance in non-halophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 31: 149-190.
- Griffith J.P., Kim J.L., Kim E.E., Sintchak M.D., Thomson J.A., Fitzgibbon M.J., Fleming M.A., Caron P.R., Hsiao K. y Navia M.A. (1995).** X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* 82 : 507-522.
- Guo Y., Xiong L., Song C.P., Gong D., Halfter U. y Zhu J.K. (2002).** A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 2002 2, 233-244.
- Guo, H., Mockler T., Duong H. y Lin C. (2001a).** SUB1, an *Arabidopsis* Ca²⁺ binding protein involved in cytochrome and phytochrome coaction. *Science* 291: 487-490.
- Guo, Y., Halfter U., Ishitani M. y Zhu J. K. (2001b).** Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* 13, 1383-1400.
- Hager A. (2003).** Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J Plant Res* 20 (en prensa)
- Halfter U., Ishitani M. y Zhu J-K. (2000).** The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3735-3740.
- Halperin S.J., Gilroy S. y Lynch J.P. (2003).** Sodium Chloride reduces growth and cytosolic calcium, but does not affect cytosolic pH, in root hairs of *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 54, No. 385, pp1269-1280.
- Hare P.D., Cress W.A. y Van Staden J. (1998).** Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environm.* 21: 535-553.
- Hare P.D., Du Plessis S., Cress W.A. y Van Staden J. (1996).** Stress induced changes in plant gene expression : prospect for enhancing agricultural productivity in South Africa. *South African Journal of Science* 92: 431-439.
- Harmon A.C., Gribskov M., Gubrium E. y Harper J.F. (2001).** The CDPK superfamily of protein kinase. *New Phytol.* 151: 175-183.
- Haro R., Bañuelos M.A., Quintero F.J., Rubio F., Rodríguez-Navarro A. (1993).** Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiol Plant* 89: 868-874.

- Harper J.F., Surowy T.K. y Sussman M.R. (1989).** Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) of *Arabidopsis thaliana*. Proc Nat Acad Sci USA 86: 1324-1238.
- Hasegawa P.M., Bressan P.A., Zhu J.K. y Bohnert H.J. (2000).** Plant cellular and molecular responses to high salinity, Annu.Rev. Plant Physiol.Plant Mol. Biol. 51: 463-499.
- Hasegawa P.M., Bressan R.A. y Handa A.L. (1986).** Cellular mechanisms of salinity tolerance. Hort Science 21: 1317-1324.
- Hawkins H. J. y Lips S. H. (1997).** Cell suspensión cultures of *Solanum tuberosum* L. as a model system for N and salinity response effect of salinity on NO₃⁻ uptake and PM-ATPase activity. J. plant Physiol. 150: 103-109.
- Heimler D., Tattini M., Ticci S., Coradeshi M.A. y Traversi M.L. (1995).** Growth, ion accumulation and lipid composition of two olive genotypes under salinity. Journal of plant Nutrition. 18(8): 1723-1734.
- Hemenway C. S., Dolinsky K., Cárdenas M. E., Hiller M. A., Jones E. W. y Heitman J. (1995).** vph6 mutants of *Sacharomyces cervisiae* require calcineurin for growth and are defective in vacuolar H⁺-ATPase assembly. Genetics 141: 833-844.
- Hirata D., Harada S., Namba H. y Miyakawa T. (1995).** Adaptation to high-salt stress in *Saccharomyces cervisiae* is regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase (calcineurin) and cAMP-dependent protein kinasa. Mol. Gen. Genet. 249, 257-264.
- Hirayama S., Sugiura R., Lu Y., Maeda T., Kawagishi K., Yokoyama M., Tohda H., Giga-Hama Y., Shuntoh H y Kuno T. (2003).** Zinc finger protein Prx1 regulates Ca²⁺ but not Cl⁻ homeostasis in fission yeast. J. Biol. Chem. 278: 18078-18084.
- Hirschi K.D. (1999).** Expression of *Arabidopsis* CAX1 in tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. Plant Cell. Nov;11(11):2113-2122.
- Hirschi K.D., Zhen R.G., Cunningham K.W., Rea P.A. Y Fink G.R. (1996).** CAX1, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 8782-8786.
- Hodges T.K. y Leonard R.T. (1974).** Purification of plasma membrane adenosine phosphatase from plant roots. Methods Enzymol 32: 392-406.
- Hoekema A., Hirshch P.R., Hooykaas P.J.J. y Schilperoort R.A. (1983).** A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. NATURE. 303:179-180.

- Hooykaas P.J.J. y Shilperoort R.A. (1992).** *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* 19: 15-38.
- Hooykaas, P.J.J. (1989).** Transformation of plant cells via *Agrobacterium*. *Plant Mol Biol.* 13(3):327-336. Review.
- Hörtensteiner S., Martinoia E. y Amshein N. (1994).** Factors affecting the reformation of vacuoles in evacuated protoplasts and the expression of the two vacuolar proton pumps. *Planta* 192: 395-403.
- Hubbard M. J. y Klee C. B. (1989).** Functional domain structure of calcineurin A: mapping by limited proteolysis. *Biochemistry* 28, 1868-1874.
- Hurkman W.J. (1992).** Effect of salt stress on plant gene expression: a review. *Plant Soil* 146: 145-151.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T. Y Shinozaki K. (2000).** Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* 24: 655-665.
- Ingebritsen T.S. y Cohen P. (1983).** Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221: 331-338.
- Inzé D. y Van Montagu M. (1995).** Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotech* 6: 153-158.
- Ishitani M., Liu J., Halfter U., Kim C.S., Wei M., y Zhu J.K. (2000).** SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* 12, 1667-1678.
- Jeschke W.D. (1984).** K^+ - Na^+ exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance. In *Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement*. Staples RC, Toenniessen GH (ed), pp. 37-66. Wiley-Interscience. New York.
- Johansson F, Olbe M, Sommarin M, Larsson C (1995).** Brij 58, a polyoxyethylene acyl ether, creates membranes vesicles of uniform sidedness. A new tool to obtain inside-out (cytoplasmic side-out) plasma membrane vesicles *Plant J* 7: 165-173.
- Johansson F., Sommarin M. y Larsson C (1993).** Fusaric acid activates the plasma membrane H^+ -ATPase by mechanism involving the C-terminal inhibitory domain. *Plant Cell* 5: 312-327.

- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K. (1999).** Improving drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* 17, 287-291.
- Kawasaki-Nishi S., Nishi T. y Forgac M. (2001).** Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100-kDa a-subunit differ in coupling efficiency and in vivo dissociation. *J. Biol Chem.* 25;276(21):17941-17948.
- Kennedy M. T., Brockman H. y Rusnak F. (1996).** Contributions of myristoylation to calcineurin structure/function. *J Biol. Chem.* 271: 26517-26521.
- Kerbeb L., Venema K., Donaire J.P. y Rodríguez-Rosales M.P. (2002).** Enhanced H⁺/ATP coupling ratio of H⁺/ATPase and increased 14-3-3- protein content in plasma membrane of tomato cells upon osmotic shock. *Physiol- plant.* 116:37-41.
- Kerkeb B. (2000).** Mecanismos bioquímicos y moleculares de tolerancia a la salinidad en especies cultivada y silvestre de tomate: papel de los enzimas translocadores de iones de plasmalema y tonoplasto. Tesis Doctoral.
- Kerkeb L., Donaire J.P., Rodríguez-Rosales M.P. (2001b).** Plasma membrane H⁺ - ATPase activity is involved in adaptation of tomato to NaCl, *Physiol. Plant.* 111: 483-490.
- Kerkeb L., Donaire J.P., Venema K., Rodríguez-Rosales M.P. (2001a).** Tolerance to NaCl induces changes in plasma membrane lipid composition, fluidity and H⁺-ATPase activity of tomato calli. *Physiol Plant* 113, 217-224.
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan C., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklof S., Till S., Bogre L., Hirt H. y Meskiene I. (2000).** SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant Cell.* 12(11):2247-2258.
- Kim K.N., Cheong Y.H., Grant J.J., Pandey G.K y Luan S. (2003).** CIPK3, a calcium sensor associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 15: 411-423.
- Kim K.N., Cheong Y.H., Gupta R. y Luan S. (2000).** Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant PhyPhysiol.* 124: 1844-1853.
- Kinoshita T. y Shimazaki K. (1999).** Blue light activates the plasma membrane H(+)-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J.* 15;18(20):5548-5558.

- Klee C. B., Cruch T. H. y Krinks M. H. (1979).** Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 6270-6273.
- Klee C. B., Ren H. y Wang X. (1998).** Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase calcineurin. *J. biol. Chem.* 273: 13367-13370.
- Klee C.B., Draetta G.F. y Hubbard M.J. (1988).** Calcineurin. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 61: 149-200.
- Knight H., Trewavas A.J. y Knight M.R. (1997).** Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* 12: 1067-1078.
- Knight, H. (2000).** Calcium signalling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cytol.* 195: 269-324.
- Knight, H. y Knight, M.R. (2001).** Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 6: 262-267.
- Kudla J., Xu Q., Harter K., Gruissem W. y Luan S. (1999).** Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 4718-4723.
- Kumar V. y Sharma D. R. (1989).** Isolation and characterization of sodium chloride-resistant callus culture of *Vigna radiata* (L.) Wilczek var. *radiata*. *J. Exp. Bot.* 210:143-147.
- Kuno T., Tanaka H., Mukai H., Chang C., Hiraga K., Miyakawa T. y Tanaka C. (1991).** cDNA cloning of a calcineurin B homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 180, 1159-1163.
- Kwon H.M. y Handler J.S. (1995).** Cell volume regulated transporters of compatible osmolytes. *Curr Opin Cell Biol.* 7(4):465-471.
- Laemmli U.K. (1970).** Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 222: 680-685.
- LaRosa P. C., Handa A. K., Hasewaga P. M., Bressan R. A. (1985).** Abscisic acid accelerates adaptation of cultured tobacco cells to SALT. *Plant Physiol.* 79: 138-142.
- Larsson C., Widell S. y Kjellbom O. (1987).** Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods Enzymol.* 148: 558-568.
- Läuchli A. (1990).** Calcium, salinity and the plasma membrane. *In* Calcium in Plant Growth. Leonard RT, Hepler PK (eds). pp 26-35. The American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD.

- Läuchli A. y Epstein E. (1990).** Plant responses to saline and sodic conditions. In Agricultural Salinity Assessment and Management. Tanji KK (ed), pp. 113-137. American Society of Civil Engineers, New York.
- Läuchli A., Colmer T.D., Fan T.W.M. y Higashi R.M. (1994).** Solute regulation by calcium in salt-stressed plants. In Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants. Cherry JH (ed), pp. 443-461. Springer-Verlag, Berlin.
- Lim H. W. y Molkentin J. D. (1999).** Calcineurin and human heart failure. *Nature Med.* 5: 246-247.
- Lim H. W. y Molkentin J. D. (2000).** Reply to revisiting calcineurin in human heart failure. *Nature Med.* 6: 3,2000.
- Lipp-Joao K.H. y Brown T.A. (1993).** Enhanced transformation of tomato
- Liu J y Zhu JK. (1998).** A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280: 1943-1945.
- Liu J. (1993).** FK506 and ciclosporin: molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 182-188.
- Liu J. y Zhu J.K. (1997).** An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23; 94(26): 14960-4.
- Liu J., Farmer J. D., Lane W. S., Friedman J., Weissman I. y Schreiber S. L. (1991).** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815.
- Liu J., Ishitani M., Halfter U., Kim C. S. y Zhu J. K. (2000).** The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl Acad. Sci.* 97, 3730-3734.
- Logemann J., Shell J. y Willmitzer L. (1987).** Improved method of isolation of RNA from plant tissue. *Anal Biochem* 163: 16-20.
- Löw R., Rockel B., Kirsch M., Ratajczak R., Hortensteiner S., Martinoia E., Lüttge U. y Rausch T. (1996).** Early salt stress effects on the differential expression of vacuolar H⁺-ATPase genes in roots and leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol* 110: 259-263.
- Lu Y, Sugiura R., Yada T., Cheng H., Sio S.O., Shuntoh H y Kuno T. (2002).** Calcineurin is implicated in the regulation of the septation initiation network in fission yeast. *Genes Cells.* 10: 1009-1019.

- Luan S., Kudla J., Rodríguez-Concepción M., Yalovsky S. y Grissem W. (2002).** Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell. Sup.* 2002: S389-S400.
- Luan S., Li W., Rusnak F., Assman S. M. y Schreiber S. L. (1993).** Immunosuppressants implicate protein phosphatase regulation of K⁺ channels in guard cells. *Proc. Natl Acad. Sci.* 90, 2202-2206.
- Lynch J, Polito VS, Läuchli A (1989).** Salinity stress increases cytoplasmic Ca²⁺ activity in maize root protoplasts. *Plant Physiol* 90: 1271-1274.
- Lynch J, y Läuchli A, (1988).** Salinity affects intracellular Ca²⁺ in corn root protoplasts. *Plant Physiol* 87: 351-356.
- Maeshima M. (2001).** Tonoplast transporters: organization and function. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 469-497.
- Manssour M.M.F., Salama K.H.A. y Al-Mutawa M.M. (2003).** Transpot proteins and salt tolerance in plants. *Plant Science* 164: 891-900.
- Marín-Manzano MC, Bueno P, Rodríguez-Rosales MP, Donaire JP Venema K (2001).** Transformación de cotiledones de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) con calcineurina de levadura. Obtención de un cultivo celular transgénico. En: *Nutrición Mineral en una Agricultura Sostenible*, vol I, pp 67-73.
- Marquez J.A. y Serrano R. (1996).** Multiple transduction pathways regulate the sodium extrusion gene PMR2 ENA1 during salt stress in yeast. *FEBS Letters* 382: 89-92.
- Matheos D. P., Kingsbury T. J., Ahsan U. S. y Cunningham K. W. (1997).** Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11, 3445-3458.
- Matsumoto M. y Chung G. C. (1988).** Increase in proton-transport activity of tonoplast vesicles as an adaptative response of barley roots to NaCl stress. *Plant Cell Physiol.* 29: 1133-1140.
- Matsumoto T.K., Ellsmore A.J., Cessna S.G., Low P.S., Pardo J.M., Bressan R.A. y Hasegawa P.M. (2002).** An Osmotically Induced Cytosolic Ca⁺ Transient Activates Calcineurin Signaling to Mediate Ion Homeostasis and Salt Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.227, No 36, Issue of September 6, pp 33075.

- Matsumoto T.K., Pardo J.M., Takeda S., Versan R.A. y Hasegawa P.M. (2001).** Tobacco and *Arabidopsis* SLT1 mediate SALT tolerance of yeast. *Plant Molecular Biology* 45: 489-500.
- McCue K.F. y Hanson (1990).** Drought and salt tolerance: towards understanding application. *Trends Biotech* 8: 358-362.
- Meharg S. (1993).** The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiol Plant* 88: 191-198.
- Mendizabal I., Rios G., Mulet J.M., Serrano R. y De Larrinoa I.F. (1998).** Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett.* Mar 27;425(2):323-328.
- Mendoza I. (2001).** Regulación de la homeostasis de sodio y potasio por la proteína fosfatasa calcineurina. Tesis Doctoral.
- Mendoza I., Quintero F.J., Bressan R.A., Hasegawa P.M. y Pardo J.M. (1996).** Activated calcineurin confers high tolerance to ion stress and alters the budding pattern and cell morphology of yeast cells. *J Biol Chem* 271: 23061-23067.
- Mendoza I., Rubio F., Rodríguez-Navarro A. y Pardo J.M. (1994).** The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269: 8972-8996.
- Michelet B. y Boutry M. (1995).** The plasma membrane H⁺-ATPase. A highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol* 108: 1-6.
- Mikolajczyk M., Awotunde O.S., Muszynska G., Klessig D.F., Dobrowolska G. (2000).** Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell.* 12(1):165-178..
- Miranda A.C. y Campos V.T. (1998).** Manual de transformacao genética de plantas. Embrapa servicio de producao de informacao, SPI, Brasilia, Brasil, chapter 8, p. 127-141.
- Mitchell P. (1976).** Vectorial chemistry and the molecular mechanism of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity. *Biochem Soc Trans* 4: 399-430.
- Mito N., Wimmers L.E. y Bennett A.B. (1996).** Sugar regulates mRNA abundance of H⁺-ATPase gene family members in tomato. *Plant Physiol.* 112(3): 1229-36.
- Mizunuma M., Hirata D., Miyahara K., Tsuchiya E. y Miyakawa T. (1998).** Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature* 392: 303-306.

- Molkentin J.D., Lu J. R., Antos C. L., Markham B., Richardson J., Robbins J., Grant S. R. y Olson E. N. (1998).** A calcineurin dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93: 215-228.
- Morsome P. y Boutry M. (2000).** The plant plasma membrane H⁺ ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:1-16.
- Morsomme P., De Kerchove d'Exaerde A., De Meester S., Thines D., Goffeau A. y Boutry M. (1996).** Single point mutations in various domains of a plant plasma membrane H(+)-ATPase expressed in *Saccharomyces cerevisiae* increase H(+)-pumping and permit yeast growth at low pH. *EMBO J.* 15;15(20):5513-5526.
- Munnik T., Ligterink W., Meskiene I. I., Calderini O., Beyerly J., Musgrave A. y Hirt H. (1999).** Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J.* 20(4):381-388.
- Munns R. (1993).** Physiological processes limiting plants growth in saline soils-some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environm* 16: 15-24.
- Murata T., Obi I., Yoshihashi M., Noguchi M. y Kukutani T. (1994).** Reduced permeability to K⁺ and Na⁺ ions of K⁺ channels in the plasma membrane tobacco cells suspension after adaptation to 50 mM NaCl. *Plant Cell Physiol* 35: 87-92.
- Nagaoka S y Takano T. (2003).** Salt tolerance-related protein STO binds to a Myb transcription factory homologue and confers salt tolerance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 54 (391): 2231-7.
- Nakamura T., Liu Y., Hirata D., Namba H., Harada S., Hirokawa T. y Miyakawa T. (1993).** Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated FK 506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J* 12: 4063-4071
- Nakamura Y., Kasamo K., Shimosato N., Sakata M. y Ohta E. (1992).** Stimulation of the extrusion of protons and H⁺-ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact mung bean roots under high-NaCl stress and its relation to external levels of Ca²⁺ ions. *Plant Cell Physiol* 33: 139-149.
- Nass R.y Rao R. (1999).** The yeast endosomal Na⁺/H⁺ exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiology.* 145 (Pt 11):3221-3228.
- Nelson D. E., Koukoumanos M. y Bohnert H. J. (1999).** Myo-inositol dependent sodium uptake in ice plant. *Plant Physiol.* 119: 165-172.

- Nelson D.E., Shen B. y Bohnert H.J. (1998).** Salinity tolerance--mechanisms, models and the metabolic engineering of complex traits. *Genet Eng (N Y)*.;20:153-176.
- Nelson N. (1992).** Structural conservation and functional diversity of V-ATPases. *J Bioenerg Biomembr* 24: 407-414.
- Niu X., Bressau R.A., Hasegawa P.M. y Pardo J.M. (1995).** Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol* 109: 735-742.
- Noble C.L. y Rogers M.E. (1992).** Arguments for the use of physiological criteria for improvement the salt tolerance in crops. *Plant Soil* 146: 99-107.
- Novozamsky I., Houba V.J.G., Van Der Lee J.J., Can Eck R. y Mingorance M.D. (1999).** A convenient wet digestion procedure for multielement análisis of plant materials. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 24: 2595-2605.
- Nuccio M.L., Rhodes D., McNeil S.D. y Hanson A.D. (1999).** Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 128-134.
- Ohta M., Guo Y., Halfter U. y Zhu J.K. (2003).** A Novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase ABI2. *PNAS* 100, 11771-11776.
- Ohta M., Hayashi Y., Nakashima A., Hamada A., Tanka A., Nakamura T. y Hayakawa T. (2002).** Introduction of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Atriplex gnelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS letters* 532: 279- 282.
- Olsson A., Svennelid F., Ek B., Sommarin M., Larsson C. (1999).** A phosphothreonine residue at the C-terminal end of the plasma membrane H⁺-ATPase is protected by fusicoccin-induced 14-3-3 binding. *Plant Physiol* 118: 551-555.
- O'Neill SO, Bennett AB, Spanswick RM (1983).** Characterization of a NO₃⁻ sensitive H⁺-ATPase from corn roots. *Plant Physiol* 72: 837-846.
- Orlowski J. y Grinstein S. (1997).** Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *J Biol Chem* 272: 22373-22376.
- Paidhungat M. y Garret S. (1997).** A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca²⁺ uptake and exacerbates the cdc1(Ts) growth defect. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6339-6347.
- Palmgren M.G. (1998).** Proton gradients and plant P-type ATPases. *J Exp Bot* 50: 883-893.
- Palmgren M.G. (2001).** Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouse for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 817-845.

- Palmgren M.G. y Harper J.F. (1999).** Structure of plasma membrane H⁺-ATPase gene from *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 164: 8557-8562.
- Palta J.P. (1990).** Stress interactions at the cellular and membrane levels. Hort Science 25:1377-1381.
- Pardo J.M. y Serrano R. (1989).** Structure of a plasma membrane H⁺-ATPase gene from *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 164: 8557-8562.
- Pardo J.M., Reddy M.P., Yang S., Maggio A., Huh G.H., Matsumoto T., Coca M.A., Paino-D'Urzo M., Koiwa H., Yun D-J., Watad A.A., Bressan R.A., Hasegawa P.M. (1998).** Stress signaling through Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. Proc Natl Acad Sci USA 95: 9681-9686.
- Parets-Soler A., Pardo J.M. y Serrano R. (1990).** Immunocytolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase. Plant Physiol 93: 1654-1658.
- Park S-Y., Seo S.B., Lee S-J, Na J-G. y Kim Y-J. (2001).** Mutation in PMR1, a Ca²⁺-ATPase in Golgi, confers salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by inducing expression of PMR2, an Na⁺-ATPase in plasma membrane. J. Biol. Chem. 276: 28694-28699.
- Patnaik J. y Debata B. K. (1997).** In vitro selection of NaCl tolerant callus lines of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. Plants Science. 124:203-210.
- Pérez-Alfocea F., Estain M.T., Cano M. y Bolarin M.C. (1993).** Reponse of tomato cultures to salinity. Plant Soil 250: 203-211.
- Perrino B.A. (1999).** Regulation of calcineurin phosphatasa activity by its autoinhibitory domain. Arch. Biochem. Biophys. 372: 159-165.
- Perrino B.A., Ng L.Y. y Soderling T.R. (1995).** Calcium regulation of calcineurin phosphatase activity by its B subunit and calmodulin. J. Biol. Chem. 270: 340-346.
- Pical C., Westergren T., Dove S.K., Larsson C. y Sommarin M. (1999).** Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacyl glycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* cells. J Biol Chem 174: 38232-38240.
- Pilon-Smith E.A.H., Ebskamp M.J.M., Paul M.L., Jeuken M.J.W., Weisbeek P.J. y Smeeckens S.C.M. (1995).** Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. Plant Physiol. 107: 125-130.
- Plant P.J., Gelli A. y Blumwald E. (1994).** Vacuolar chloride regulation of anion-selective tonoplast channel. J Membr Biol 140: 1-12.

- Plochocka-Zulinska D., Rasmussen G. y Rasmussen C. (1995).** Regulation of calcineurin gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. J. Biol. Chem. 270: 24794-24799.
- Poole R.J. (1998).** Solute transport *In* Plant Physiology 2nd edition, Taiz L, Zeiger E (eds), 791 pp. Sinauer Associates, Inc, Publishers. Sunderland, MA.
- Portillo F. (2000).** Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. Biochim. Biophys. Acta 1469:31-42.
- Proft M. y Serrano R. (1999).** Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. Mol Cell Biol. 19(1):537-546.
- Qiu Q.S., Guo Y., Quintero F.J., Pardo J.M., Schumaker K.S. y Zhu J.K. (2003).** Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the SOS pathway. J Biol Chem. En prensa.
- Qiu, Q.S., Guo Y., Dietrich M.A., Schumakere K.S. y Zhu J.K. (2002).** Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 8436-8441.
- Quintero F.J., Blatt M.R. y Pardo J.M. (2000).** Functional concentration between yeast and plant endosomal Na⁺/H⁺ antiporters. FEBS Lett 471: 224-228.
- Quintero FJ, Ohta M, Shi H, Zhu JK, and Pardo JM. (2002).** Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathqay for Na⁺ homeostasis. PNAS 99, No. 13: 9061-9066.
- Rao A., Luo C. y Hogan P. G. (1997).** Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. Annu. Rev. Immunol.15, 707-747.
- Rausch T., Kirsch M., Löw R., Lehr A., Viereck R. y Zhigang A. (1996).** Salt stress responses of higher plants: the role of proton pumps and Na⁺/H⁺ antiporters. J Plant Physiol 148: 425-433.
- Rausell A., Kanhonou R., Yenush L., Serrano R. y Ros R. (2003).** The Translation initiation factor eIF1A is an important determinant in the tolerance to NaCl stress in yeast and plants. The Plant Journal 34: 257-267.
- Rea P.A. y Sanders D. (1987).** Tonoplast energization: two H⁺ pumps, one membrane. Physiol Plant 71: 131-141.
- Rengel Z. (1992).** The role of calcium in salt-toxicity. Plant Cell Environm 15: 625-632.

- Reuveni M., Bennett A.B., Bressan R.A. y Hasegawa P.M. (1990).** Enhanced H⁺ transport capacity and ATP hydrolysis activity of the tonoplast H⁺-ATPase after NaCl adaptation. *Plant Physiol* 94: 524-530.
- Reuveni M., Versan R.A. y Hasegawa P.M. (1993).** Modification of proton transport kinetics of the plasma membrana H⁺-ATPase after adaptation of tobacco cells to NaCl. *J. Plant Physiol* 142, 312-318
- Rigas S., Debrosses G., Haralampidis K., Vicente-Agullo F., Feldman K., Grabov A., Dolan L. y Hatzopoulos P. (2001).** Trh1 encodes a potassium transporter required for a tip growth in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell*. 13: 139-151.
- Rober-Kleber N., Albrechtova J.T., Fleig S., Huck N., Michalke W., Wagner E., Speth V., Neuhaus G. y Fischer-Iglesia C. (2003).** Plasma membrane H⁺-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development. *Plant Physiol* 2003, 131, 1302-12.
- Rodríguez-Rosales M.P., Roldán M., Belver A. Y Donaire J.P. (1989).** Correlation between in vitro germination capacity and proton extrusion in olive pollen. *Plant Physiol. Biochem.* 27 (5): 723 –728.
- Rodríguez-Rosales P.M., Kerkeb L., Bueno P. y Donaire J.P. (1999).** Changes induced by NaCl in lipid content and composition, lipoxygenase, plasma membrane H⁺-ATPase and antioxidant enzyme activities of tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill) Calli. *Plant Sci* 143: 143-150.
- Rottenberg H. y Moreno-Sanchez R. (1993).** The proton pumping activity of the H⁺-ATPase: an improved fluorescence assay. *Biochem Biophys Acta* 1183: 161-170.
- Rubio F., Gassmann W. y Schroeder J.I. (1995).** Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* 270: 1660-1663.
- Rubio F., Santa-María G.E., y Rodríguez-Navarro A. (2000).** Cloning of *Arabidopsis* and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiol. Plant.* 109: 34-43.
- Rus A. M., Estañ M. T., Gispert C., García-Sogo B., Serrano R., Caro M., Moreno V. y Bolarín M. C. (2001b).** Expressing the yeast HAL1 gene in tomato increases fruit yield and enhances K⁺/Na⁺ selectivity under salt stress. *Plant Cell Environ.* 24, 875-880.

- Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A., Reddy M, Lee B-H, Matsomoto T.K, Koiwa H., Zhu J-K., Bressan R.A. y Hasegawa P.M. (2001a).** AtHKT1 is a salt tolerance determinat that controls Na⁺ entry plant roots. PNAS 98: 14150-14155.
- Rush D.W. y Epstein E. (1981).** Comparative studies on the sodium, potassium and chloride relations of a wild halophytic and domestic salt sensitive tomate species. Plant Physiol 68: 1308-1313.
- Rusnak F. y Mertz P. (2000).** Calcineurin: form and function. Phys. Rev. 8, 1483-1521.
- Sabbah S. y Tal M. (1990).** Development of callus and suspensión cultures potato resistant to NaCl and manitol and their responses to stress. Plant Cell Tissue Organ Cult. 21: 119-128.
- Saijo Y., Hata S., Kyojuka J., Shimamoto K. y Izui K. (2000).** Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and SALT/drought tolerante on rice plants. Plant J. 23, 319-327.
- Saitoh Y., Maeda S., Fukunaga K., Yasugawa S., Sakamoto Y., Uyemira K., Shimada K., Ushio Y y Miyamoto E. (1991).** Nucleotide sequence of a rat calcineurin AcDNA lacking a specific 30-base pair region. Biomed. Res. 12:215-218.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989).** Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanders D. (2000).** Plant biology: the salt tale of *Arabidopsis*. Curr. Boil. 10: 486-488.
- Sanders D., Brownlee C. y Harper J.F. (1999).** Communicating with calcium. Plant Cell. 11: 691-706.
- Saneoka H., Nagaseka C., Hahn D.T., Yang W.J., Premachanda G.S., Joly R.J. y Rhodes D. (1995).** Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and containing maize lines. Plant Physiol 107: 631-638.
- Sanglard D., Ischer F., Marchetti O., Entenza J. y Bille J. (2003).** Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance cell morphogenesis and virulence. Mol. Microbial. 48 (4): 959-976.
- Santa-Cruz A., Acosta M., Rus A. y Bolarin M.C. (1999).** Short-term salt tolerance mechanism in differentially salt tolerant species. Plant Physiol Biochem 37: 65-71.
- Schachtman D.P. (2000).** Molecular inside into the structure and function of plant K⁺ transport mechanisms. Biochimica et Biophysica Acta. 1465: 127-139.
- Schachtman D.P. y Liu W. (1999).** Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. Trends Plant Sci 7: 218-287.

- Schachtman D.P. y Schroeder J.I. (1994).** Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* 370: 655-658.
- Schell J. (1995a).** Progress in plant science is our best hope to achieve an economically rewarding, sustainable and environmentally stable agriculture. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 1: 10-12.
- Schell J. (1995b).** Crop Biotechnology- a necessity for an environmentally friendly and sustainable agriculture. *Proceedings Part 1. Ninth Forum for Applied Biotechnology University of Gent*. 60: 1513-1514.
- Schreiber S.L. y Crabtree G.R. (1992).** The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Inmunol. Today*. 13: 136-142.
- Serrano R. (1985).** *Plasma Membrane ATPase of Plants and Fungi*. 174 pp. CRC Press. Boca Raton.
- Serrano R. (1989).** Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 61-94.
- Serrano R. (1990).** Plasma membrane ATPase. *In the Plant Plasma Membrane*. Larsson C, Møller IM (eds), pp. 127-153. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Serrano R. (1996).** Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol.*;165:1-52.
- Serrano R. (1996).** Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol* 165: 1-52.
- Serrano R. y Gaxiola R. (1994).** Microbial models and salt-stress tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 13: 121-138.
- Serrano R. y Rodriguez-Navarro A. (2001).** Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 399-404.
- Serrano R. y Villalba J.M. (1993).** Bomba de protones de la membrana vegetal. *Investigacion y Ciencia (Enero)*, pp. 62-63.
- Serrano R., Kielland-Brandt M.C. y Fink G.R. (1986).** Yeast plasma membrane ATPase is essential of growth and has homology with (Na⁺+K⁺), -K⁺-and Ca²⁺-ATPase. *Nature* 319: 689-693.
- Serrano R., Mulet J.M., Rios G., Marquez J.A., De Larrinoa I.F., Leube M.P., Mendizabal I., Pascual-Ahuir A., Proft M., Ros R. y Montesinos C. (1999).** A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J Exp Bot* 50: 1023-1036.

- Shannon M. C. y Nobles C. L. (1995).** Variation in salt tolerance and ion accumulation among subterranean clover cultivars. *Crop sci.* 35: 798-804.
- Shannon M.C. (1984).** Breeding selection and the genetics of salt tolerance. *In* Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement. Staples RC, Toenniensen GH, (eds), pp. 301-321. Wiley- Interscience, New York.
- Shannon M.C., Grieve C.M. y François L.E. (1994).** Whole-plant response to salinity. *In* Plant Environment Interactions. Wilkinson RF (ed), pp 199-244. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Shi H, Kim YS, Guo Y, Stevenson B, and Zhu JK. (2003b).** The Arabidopsis SOS5 Locus Encodes a Putative Cell Surface Adhesion and Is Required for Normal Cell Expansion. *The Plant Cell* 15:19-32.
- Shi H, Lee B, Wu SJ and Zhu JK. (2003a).** Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporte gene improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *Nay. Biotechnol.* 21, 81-85.
- Shi H. y Zhu J.K. (2002).** Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic. *Plant Molecular Biology* 50: 534-550.
- Shi H., Ishitani M., Kim C. y Zhu J.K. (2000).** The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6896-6901.
- Shi H., Quintero F.J., Pardo J.M. y Zhu J.K. (2002a).** The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* 14, 465-477.
- Shi H., Xiong L., Stevenson B., Lu T., y Zhu J.K. (2002b).** The Arabidopsis *salt overly sensitive 4* Mutants Uncover a Critical Role for Vitamin B6 in Plant Salt tolerance. *The Plant Cell* 14: 575-588.
- Shi J., Kim K.N., Ritz O., Albretch V., Gupta R., Harter K, Luan S. y Kudla J. (1999).** Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *Plant cell* 11: 2393-2405.
- Shimoyama M., Hayashi D., Takimoto E., Zou Y., Oka T., Uozumi H., Kudoh S., Shibasaki F., Yazaki Y., Nagai R. y Komuro I. (1999).** Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation* 100: 2449-2454.
- Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (1997).** Gene expression and signal transduction in water-stress reponse. *Plant Physiol* 115: 327-334.

- Shirata K. y Takagishi H. (1990).** Salt-induced accumulation of 26 and 27 kD proteins in cultured cells of rice plant. *Soil Sci. Plant. Nutr.* 36:153-157.
- Stathopoulos A. M. y Cyert M. S. (1997).** Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Gen Dev.* 11, 3432-3444.
- Stewart A.A., Ingebritsen T.S. y Cohen P. (1983).** The protein phosphatase involved in cellular regulation. 5. Purification and properties of a Ca^{2+} /calmodulin dependent protein phosphatase (2B) from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. biochem.* 132: 289-295.
- Stewart A.A., Ingebritsen T.S., Manalan A., Klee C.B. y Cohen P. (1982).** Discovery of Ca^{2+} -and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP₅₀). *FEBS Lett* 137: 80-84.
- Sugiura R., Sio S.O., Shuntoh H. y Kuno T. (2002).** Calcineurin phosphatase in signal transduction: lessons from fission yeast. *Genes Cells.* 7: 619-627.
- Sugiura R., Toda T., Shuntoh H., Yanagida M. y Kuno T. (1998).** Pmp1⁺, a supressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *EMBO J* 17: 140-148.
- Suhayda C.G., Gianini J.L., Briskin D.P. y Shannon M.C. (1990).** Electrostatic changes in *Lycopersicon esculentum* root plasma membrane resulting from salt-stress. *Plant Physiol* 93: 471-478.
- Sussman M. A., Lim H. W., Gude N., Taigen T., Olson E N., Robbins J., Colbert M. C., Gualberto A., Wieczorek D. F. y Molkentin J. D. (1998).** Prevention of cardiac hipertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science* 281: 1690-1693.
- Sussman S. A., Welch S., Gude N., Khoury P. R., Daniels S. R., Kirkpatrick D., Walsh R. A., Price R. L., Lim H. W. y Molkentin J. D. (1999).** Pathogenesis of dilated cardiomyopathy: molecular, structural and population analysis in tropomodulin-overexpressing transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 155: 2101-2113.
- Suzuki Y., Kanayama Y., Shiratake K. y Yamaki S. (1999).** Vacuolar H^{+} -pyrophosphatase purified from pear fruit. *Phytochemistry* 50: 535-539.
- Svennelid F., Olsson A., Piotrowski M., Rosenquist M., Ottman C., Larsson C., Oecking C. y Sommarin M. (1999).** Phosphorylation of Thr-948 at the C-terminus of the plasma membrane H^{+} -ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell* 11: 2379-2392.

- Sze H., Li X, y Palmgren M.G. (1999).** Energization of plant cell membranes by H⁺ pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11: 677-689.
- Tal M (1984).** Physiological genetics of salt resistance in higher plants: studies on the level of the whole plant and isolated organs, tissues and cells. In *Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement*. Staples RC, Toenniessen GH (eds), pp. 301-321. Wiley-Interscience, New York.
- Tanida I., Hasegawa A., Iida H., Ohya I. y Anraku Y. (1995).** Cooperation of calcineurin and vacuolar H⁺-ATPase in intracellular Ca²⁺ homeostasis in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 270, 10113-11119.
- Tarczynsky M.C., Jensen R.G. y Bohner H.J. (1993).** Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259: 508-510.
- Terrier N., Deguilloux C., Sauvage F.X., Martinoia E. y Romieu C. (1998).** Proton pumps and anion transport in *Vitis vinifera*: The inorganic pyrophosphatase plays a predominant role in the energization of the tonoplast. *Plant Physiol Biochem* 36: 367-377.
- Torrecilla I., Leganes F., Bonilla I. y Fernández-piñas F. (2001).** Calcium transients in response to salinity and osmotic stress in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena sp.* PCC7120, expressing cytosolic apoaequorin. *Plant Cell Environ.* 24: 641-648.
- Towbin H., Staehelin T. y Gordon J.C. (1979).** Electrophoretic transfers of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Tsao L., Neville C., Muraro A., McCullach K. J. A. y Rosenthal N. (2000).** Revisiting calcineurin and human heart failure. *Nature Med.* 6: 2-3.
- Uozumi N., Kim E.J., Rubio F., Yamaguchi T., Muto S., Tsuboi A., Bakker E.P., Nakamura T. y Schoereder J.I. (2000).** The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* 122: 1249-1259.
- Urao T., Yakubov B., Satoh R., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M., Hirayama T. y Shinozaki K. (1999).** A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell.* 11(9):1743-1754.
- Venema K. y Palmgren M.C. (1995).** Metabolic modulation of transport coupling ratio in yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 270: 19659-19667.
- Venema K., Belver A. y Donaire J.P. (2001).** Cloning and characterization of two sodium/hydrogen antiporters from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) In: Juan March

workshop on Molecular basis of ionic homeostasis and salt tolerance in plants. Octubre 22-24, 2001, Madrid.

Venema K., Belver A., Marín-Manzano M. C., Rodríguez-Rosales M. P. y Donaire J. P. (2003). A novel intracellular K^+/H^+ antiporter related to Na^+/H^+ antiporters is important for K^+ ion homeostasis in plants. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278, 25: 22453-22459.

Venema K., Quintero F.J., Pardo J.M., y Donaire J.P. (2002). The Arabidopsis Na^+/H^+ Exchanger AtNHX1 Catalyzes Low Affinity Na^+ and H^+ Transport and Reconstituted Liposomes. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277, No 4, 25: 2413-2418.

Vitart V., Baxter I., Doerner P. y Harper J. F. (2001). Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H^+ ATPase in the root endodermis. *Plant J.* 27, 191-201.

Wang B.S., Ratajczak R. y Zhang J.H. (2000). Activity, amount, and subunit composition of vacuolar-type H^+ -ATPase and H^+ -PPase in wheat roots under severe NaCl stress, *J. Plant Physiol.* 157:109-166.

Wang T.B., Gassmann W., Rubio F., Schroeder J.I. y Glass A.D.M. (1998). Rapid up-regulation of HKT1, a high affinity potassium transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium. *Plant Physiol* 118: 651-659.

Ward J.M., Hirschi K.D. y Sze H. (2003). Plant pass the salt. *Trends in Plant Science* vol. 8, No. 5: 200-201.

White P.J. y Broadley M.R. (2003). Calcium in plants. *Ann Bot (Lond)*. 92(4):487-511.

Wilson C., Clark R.A. y Shearer G.C. (1994). Effect of salinity on the plasma membrane ATPase from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves. *Plant Sci* 103: 1-9.

Withee J. L., Mulholland J., Jeng R. y Cyert M. S. (1997). An essential role of the yeast pheromone-induced Ca^{2+} signal is to activate calcineurin. *Mol. Biol. Cell* 8: 263-277.

Withee J. L., Sen R. y Cyert M. S. (1998). Ion tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* Lacking the Ca^{2+} /CaM-dependent phosphatase (calcineurin) is improved by mutations in URE2 or PMA1. *Genetics* 149, 865-878.

Wolf B (1982). A comparative system of leaf analysis and its use for diagnostic of crop nutrient status. *Commun. Soil Sci Plant Anal* 13: 1035-1059.

Wu J. y Seliskar D.M.C. (1998). Salinity adaptation of plasma membrane H^+ -ATPase in the salt march plant *Spartina patens*: ATP hydrolysis and enzyme kinetics. *J Exp Bot* 49: 1005-1013.

- Wurgler-Murphy S.M. y Saito H. (1997).** Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem Sci.* 22(5):172-176.
- Wurtele M., Jelich-Ottmann C., Wittinghofer A. y Oecking C. (2003).** Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex. *EMBO J.* 3;22(5):987-994.
- Xiong L. y Zhu J.K. (2001).** Abiotic stress signal transduction in plant: molecular and genetic perspective. *Physiol. Plant* 112: 152-66.
- Xiong I. y Zhu JK. (2002).** Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 131-139.
- Xiong L., Schumaker K.S. y Zhu J.K. (2002).** Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *The Plant Cell*, S165-S183.
- Yamaguchi T., Apse M.P., Shi H. y Blumwald E. (2003).** Topological analysis of a plant vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(21):12510-12515.
- Ye R.R. y Bretscher A. (1992).** Identification and molecular characterization of the calmodulin-binding subunit gene (CMP1) of protein phosphatase 2B from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 204: 713-723.
- Yenush L., Mulet J.M., Ariño J. y Serrano R. (2002).** The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J* 21, 920-929.
- Yeo A. (1998).** Molecular biology of salt in the content of whole-plant physiology. *J Exp Bot* 49: 915-929.
- Yokoi S., Quintero F.J., Cubero B., Ruiz M.T., Versan R.A., Hasegawa P.M. y Pardo J.M. (2002).** Differential expresión and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporter in the salt stress response. *The Plant Journal* 30(5), 529-539.
- Yoshida T., Toda T. y Yanagida M. (1994).** A calcineurin-like gene *ppb1*⁺ in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *J. Cell Sci.* 107, 1725-1735.
- Young J.C., DeWitt N.D. y Sussman M.R. (1998).** A transgene encoding a plasma membrane H⁺-ATPase that confers acid resistance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Genetics* 149, 501-507
- Zhang H-X. y Blumwald E. (2001).** Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol* 19: 765-768

- Zhang H-X., Hodson J.N., Williams J.P., Blumwald E. (2001).** Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12832-12836
- Zhao R., Dielen V., Kinet J-M. y Boutry M. (2000).** Cosuppression of a plasma membrane H⁺-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth and male fertility. *Plant Cell* 12, 535-546.
- Zhen R.G., Kim E. y Rea P.A. (1997).** The molecular and biochemical basis of pyrophosphate-energized ion translocation at the vacuolar membrane. *Adv Bot Res* 27: 297-337.
- Zhong H. y Läuchli A. (1993).** Changes of cell wall composition and polymer size in primary roots of cotton seedlings under high salinity. *J. Exp Bot* 44: 773-778.
- Zhu J.K. (2000).** Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 124: 941-48.
- Zhu J.K. (2001).** Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6, 66-71.
- Zhu J.K. (2002).** Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 247-73.
- Zhu J.K. (2003).** Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opi. Plant Biol.* 5: 441-445.
- Zhu J.K., Liu J. y Xiong L. (1998).** Genetic análisis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role to potassium nutrition. *Plant Cell.* 10: 1181-1191.
- Zingarelli L., Anzani P. y Lado P.C. (1994).** Enhanced K⁺-stimulated pyrophosphatase activity in NaCl-adapted cells of *Acer pseudoplatanus*. *Physiol Plant* 91: 510-516.
- Zupan J, Zambryski P. (1997).** The *Agrobacterium* DNA transfer complex. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16, 279–295.
- Zupan J.R. y Zambryski P. (1995).** Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* 107: 1041-1047.

IX. ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscisico
ABRE	Abscisic Acid Responsive Element
ACMA	9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina
ADNc	ADN complementario
ADN-T	ADN transferido
ATPasa	Adenosintrifosfata
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
Brij58	Polioxietilencetil eter
BSA	Albúmina bovina
BTP	1,3-bis(tri(hidroximetil-metilamino)propanol)
CaM	Calmodulina
CaMV	Caulimovirus
CaN	Calcineurina
CAPS	Ácido 3-(ciclohexilanoamino)-1-propanosulfónico
CBL	Calcineurin B-like
CDPKs	Proteínas kinasas dependientes de Ca ²⁺
CDREs	Calcineurin-Dependent response elements
CIPKs	Proteínas kinasas que interaccionan con las proteínas CBLs
CNA	Subunidad catalítica de calcineurina
CNAtr	Forma truncada de la subunidad catalítica de calcineurina
CNB	Subunidad reguladora de calcineurina
DE	Desviación estándar
DEPC	Diethylpirocarbonato
DO	Densidad optica
DRE	Drought Responsive element
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenediaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicoltetracético
FDA	Diacetato de fluoresceína
Hepes	Ácido hidroxietilpiperazina etanosulfónico
HOG	High Osmolarity Glycerol
IRF	Inward Rectifying Channels
MES	Ácido 2,N-morfolino-etanol-sulfónico
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MRT	Medio de regeneración de tallos
NAD	Nicotinamin adenin dinucleótido
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NPT II	Neomicin fosfotransferasa
ORC	Outward Rectifying Channels
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Ácido fenilmetilmetanosulfónico
PPasa	Pirofosfatasa
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RT-PCR	Retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecilsulfatosódico
SOS	Salt overly sensitive
SSC	Cloruro sódico/citrato sódico
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N', N'-tetrametiletildiamida
Tris	Trishidroximetil-aminometano

UDP	Uridin 5' difosfato
UDPasa	Uridin 5' difosfatasa
VIC	Voltaje Independent Channels

