

t 4/45

Universidad de Granada
Facultad de Ciencias

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 22/6/99
ENTRADA NUM. 2095

Tesis Doctoral



**Estudio de los Mecanismos de Tolerancia al NaCl
en Cultivos Celulares de Tomate (*Lycopersicon
esculentum* Mill.)**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Documento 613370151
Copia 15477381

Loubna Kerkeb
1999

La presente Memoria ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología celular y Molecular de Plantas de la Estación experimental del C.S.I.C. con la ayuda de una beca de la Agencia española de Cooperación Internacional y del Ministerio de Enseñanza Superior. Marruecos.

Me gustaría expresar en estas líneas mi agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido a la realización de este trabajo.

Esta gratitud va dirigida en primer lugar a los directores de esta Tesis Doctoral, Dra. María Pilar Rodríguez Rosales Y Dr. Juan Pedro Donaire Navarro, no sólo por sus valiosas enseñanzas y el amplio significado de la investigación que en mi han confiado, sino también por su ayuda y dedicación al trabajo, y por su gran categoría humana. Todo ello ha hecho posible la realización de esta Memoria, al tiempo que ha constituido una acertada guía de mi labor.

Debo agradecer, igualmente, al Dr. C. López-Encinas (Estación Experimental La Mayora, CSIC, Málaga) su inestimable ayuda en la puesta a punto de los cultivos *in vitro* de tomate, al Dr. Cuartero (Estación Experimental La Mayora, CSIC, Málaga) el suministro de las semillas utilizadas en este trabajo, al Dr. Ramon Serrano (Universidad Politécnica de Valencia) el suministro del anticuerpo antiH⁺-ATPasa de plasmalema, y los Doctores Manuel Lachica y María Dolores Minorance su inestimable ayuda en la determinación de los componentes inorgánicos de los callos de tomate.

Asimismo, quiero expresar mi infinita gratitud a mis padres, Khadija Benjelloun y Ahmed Kerkeb, por su gran apoyo, amor y estímulo moral.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, Marina Romano, Pablo Bueno, Badea Kerkeb, Andrés Belver, Kees Venema, Marie Carmen Marin, Anabel Molina, Oleg Kripsky su gran apoyo y muestras de compañerismo.

Mi reconocimiento a Dña. Concepción Santiago por su gran ayuda como compañera y por su excelente asistencia técnica en los cultivos *in vitro* de tomate.

Por último, deseo expresar un especial agradecimiento a todas las personas que, con su ayuda, hicieron posible superar con éxito los momentos más difíciles, especialmente, a Najib Maslouh, Imane Kerkeb, Larbi Kerkeb, Abdelillah Kerkeb, Mouad Kerkeb, Lamiae Azbaid, Karim Benabdellah, Jaber Rahoutei, Mustafa Naimi, Saloua Alkezteti, César Azorín, Ikram Blilou, Eduardo López-Huertas, Estefanía Distefano, Khadija Fehdi, Hikmat Rachid, Mounia Jaatar y todos mis compañeros de la Estación Experimental del Zaidín.

A todos ellos mi mas sincero agradecimiento.

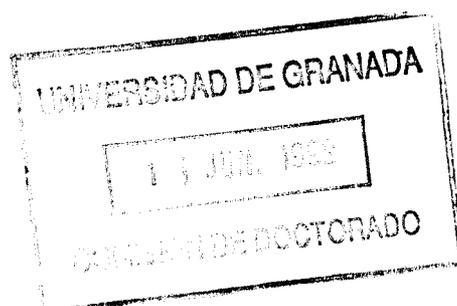
A mis Padres
A Najib

Indice

I.	INTRODUCCION Y OBJETIVOS	11
II.	REVISION BIBLIOGRAFICA	14
	A. Aproximaciones al estudio de la problemática de la salinidad en el cultivo del tomate	15
	B. Selección de cultivos tolerantes a la salinidad	16
	C. Mecanismo de tolerancia a la salinidad	18
	C.1. Estrategia halófito	19
	C.2. Estrategia glicófito	20
	D. Clasificación de las plantas en función de su tolerancia a la salinidad	20
	E. Componente osmótico del estrés salino	21
	F. Regulación de los flujos iónicos a través de las membranas celulares	27
	G. Transporte activo primario	28
	G.1. H ⁺ -ATPasa de plasmalema	30
	G.1.1. Primeros estudios	30
	G.1.2. Estructura, funcionamiento y propiedades cinéticas	30
	G.1.3. Funciones fisiológicas del enzima H ⁺ -ATPasa de plasmalema en plantas	35
	G.1.4. Regulación del enzima H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática	36
	G.1.5. Efecto de la salinidad sobre el enzima H ⁺ -ATPasa de plasmalema	40
	G.2. H ⁺ -ATPasa de tonoplasto	41
	G.3. H ⁺ -Pirofosfatasa de tonoplasto	43
	H. Procesos de transporte secundarios	45
	I. Regulación del pH citoplasmático	47
	J. Composición lipídica y propiedades de las membranas celulares	51
	J.1. Fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática	54

	Indice
III. PLAN DE TRABAJO	57
IV. MATERIAL Y METODOS	59
A. Material Vegetal	60
A.1. Germinación de las semillas	60
A.2. Inducción de la callogénesis y multiplicación de los callos	60
A.3. Adaptación de los callos al NaCl, estabilidad del carácter de tolerancia a la sal y condiciones de estrés por NaCl.	62
A.4. Determinación del índice de crecimiento relativo y cuantificación del diámetro celular	62
B. Estudio a nivel del callo	63
B.1. Respiración celular	63
B.2. Análisis de solutos intracelulares	63
B.2.1. Determinación de sodio, potasio, calcio y cloruro	63
B.2.2. Contenido en malato	64
B.2.3. Contenido en azúcares solubles	65
B.3. Composición y Contenido lipídico	65
B.3.1. Extracción de lípidos totales	65
B.3.2. Análisis de los ácidos grasos de lípidos totales	66
B.3.3. Separación de diferentes fosfolípidos	67
B.3.4. Análisis de ácidos grasos de fosfolípidos	67
B.3.5. Cuantificación del contenido de fosfolípidos	68
B.3.6. Composición y contenido de esteroides libres	68
B.4. Composición y contenido en aminoácidos libres	68
B.5. Contenido en proteínas totales	70
B.6. Determinación de la extrusión de H ⁺	70
B.6.1. Fundamento del método de medida	70
B.6.2. Medida de la extrusión de H ⁺ y evaluación del registro	71
B.6.3. Efecto de un estrés de corta duración sobre la capacidad extractora de H ⁺	72

B.7. Actividades fosfoenolpiruvato carboxilasa y enzima málico implicadas en la regulación del pH citoplasmático.	72
C. Estudio a nivel de membranas	73
C.1. Obtención de membranas microsomales	73
C.2. Purificación de membrana plasmática a partir de microsomas	73
C.3. Actividades enzimáticas asociadas a las membranas celulares	77
C.3.1. Actividad H ⁺ -ATPasa	77
C.3.2. Actividad pirofosfatasa	78
C.3.3. Actividad UDPasa latente	78
C.3.4. Actividad NADH citocromo c reductasa insensible a antimicina A	79
C.3.5. Transporte de H ⁺ dependiente de ATP	79
C.3.5.1. Estimación de la permeabilidad pasiva a los H ⁺ de las membranas	80
C.4. Detección inmunológica de la H ⁺ -ATPasa de plasmalema	82
C.4.1. Solubilización de las proteínas	82
C.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	83
C.4.3. Tinción con Coomassie	83
C.4.4. Electrotransferencia	84
C.4.5. Inmunodetección de la H ⁺ -ATPasa de plasmalema	84
C.5. Análisis de los lípidos de la membrana plasmática	85
C.5.1. Extracción de lípidos totales	85
C.5.2. Separación de diferentes fosfolípidos	85
C.5.3. Análisis de ácidos grasos de fosfolípidos	86
C.5.4. Análisis de esteroides libres	86
C.6. Determinación del grado de fluidez de la membrana plasmática	86
V. RESULTADOS	88
A. Efecto del NaCl sobre el crecimiento de los callos, contenido en iones minerales y solutos orgánicos	89
A.1. Crecimiento de los callos	89
A.2. Diámetro celular	96
A.3. Actividad respiratoria	96



	Indice
A.4. Composición y contenido en iones inorgánicos	97
A.5 Componentes orgánicos solubles	101
A.6. Contenido en proteína a nivel de callo y microsomas	107
A.7. Cambios en la composición y contenido en lípidos	108
B. Actividad extractora de H ⁺ por las células de callos desarrollados en medios diferenciales de NaCl	114
B.1. Producción y consumo intracelular de H ⁺ dependiente de reacciones de carboxilación y decarboxilación	121
C. Estudio a nivel de membranas	123
C.1. Actividades H ⁺ -ATPasa y H ⁺ -PPasa asociadas a la fracción microsomal	123
C.2. Transporte de H ⁺ dependiente de ATP en vesículas microsomales	128
C.3. Detección inmunológica de la H ⁺ -ATPasa de plasmalema	132
C.4. Purificación del plasmalema: partición de fases	133
C.4.1. Actividad H ⁺ -ATPasa	136
C.4.2. Transporte de H ⁺ dependiente de ATP	139
C.4.3. Transporte pasivo de protones	142
C.4.4. Componentes lipídicos de plasmalema	143
C.4.5. Cambios en las propiedades de fluidez de la membrana plasmática	146
VI. DISCUSSION	148
VII. CONCLUSIONES	170
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	173
IX. ABREVIATURAS	200

*I. Introducción y
Objetivos*

Introducción y Objetivos

La salinidad constituye uno de los factores ambientales que más negativamente incide en la producción agrícola, limitando el uso potencial de nuevas áreas de cultivo en extensas zonas del mundo. La obtención de plantas tolerantes a la sal representa una posible solución a la problemática de la salinidad. En este sentido, el estudio de las respuestas fisiológicas, bioquímicas y genéticas de las plantas frente al estrés salino, constituye un gran objetivo de la agrobiología que permitiría identificar y seleccionar genotipos de variedades cultivadas tolerantes a altas concentraciones de NaCl.

La mayoría de las especies cultivadas han desarrollado frente al estrés salino una estrategia glucófito, que consiste en la exclusión de iones tóxicos en combinación con la síntesis de solutos orgánicos solubles y osmóticamente activos. Así, la capacidad de ajuste osmótico y el control de los flujos iónicos a través de las membranas plasmática y vacuolar constituyen los mecanismos fundamentales de tolerancia, por lo que la caracterización e identificación bioquímica de los procesos que regulan estas respuestas celulares pueden ser claves para el establecimiento de los programas de mejora vegetal.

La compartimentación celular de iones y solutos depende de la actividad de bombas electrogénicas que regulan el pH intracelular y el transporte activo y facilitado de nutrientes a través de la membrana plasmática y tonoplasto. Además, la membrana plasmática constituye la primera línea de entrada y de defensa de las células contra el estrés salino. Por ello, los cambios en los componentes lipídicos y en las propiedades de la membrana plasmática son claves para el mantenimiento tanto de la homeostasia celular como de la actividad de los enzimas integradas en el plasmalema.

Desde esta perspectiva, el eje de esta investigación se ha centrado en el estudio del efecto del NaCl sobre: la composición intracelular en solutos orgánicos e inorgánicos, la extrusión *in vivo* de H^+ , la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema, los componentes lipídicos del plasmalema y las propiedades de fluidez de esta membrana.

La utilización de cultivos celulares ofrece grandes ventajas a la hora de estudiar los mecanismos de tolerancia al NaCl ya que permite realizar un estudio comparativo de líneas celulares sensibles y adaptadas al NaCl. Por esta razón, la investigación de los objetivos indicados se llevó a cabo en callos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) adaptados y no adaptados a

Introducción y Objetivos

diferentes concentraciones de NaCl lo que permitía diferenciar las respuestas resultantes del estrés, de aquellas otras que podrían tener un valor adaptativo. En este sentido, el estudio los mecanismos de adaptación al estrés salino en callos de tomate adaptados al NaCl y crecidos en presencia de diferentes concentraciones de esta sal, puede coadyuvar a descifrar los mecanismos de tolerancia a este factor y a identificar los marcadores biológicos de tolerancia.

*II. Revisión
Bibliográfica*

A. Aproximaciones al estudio de la problemática de la salinidad en el cultivo del tomate

La salinidad es uno de los factores ambientales que más limita la productividad agrícola, afectando a más del 40% de las áreas de riego y, especialmente, a las regiones más deprimidas y a las más productivas del mundo, como son el área mediterránea, California y el sur de Asia. La problemática de la salinidad proviene fundamentalmente de los efectos acumulativos del uso continuado de aguas que contienen sales disueltas, de la gran velocidad de evaporación y baja capacidad de lixiviación de sales de algunos suelos (Downton, 1984; Wyn Jones y Gorham, 1986; Flowers y Yeo, 1988), del uso de elevadas cantidades de fertilizantes en ciertas áreas de cultivo y de la penetración del agua del mar en zonas costeras y marismas. Además, la gran demanda de agua de alta calidad, debida tanto al incremento de la población humana como al desarrollo industrial, conlleva el uso, cada vez más frecuente, de aguas de baja calidad en la agricultura, lo que agrava el problema de la salinidad tanto desde el punto de vista ecológico como económico. Por todas estas razones, la salinidad de los suelos y las aguas constituye una verdadera amenaza para la agricultura, puesto que la mayoría de las plantas cultivadas, entre ellas el tomate, se afectan en mayor o menor medida por la salinidad. En los suelos pueden acumularse diversos tipos de sales, como cloruros, sulfatos, carbonatos y bicarbonatos de Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} , entre ellas, el NaCl es la de mayor impacto sobre el crecimiento y producción de las plantas cultivadas.

El cultivo de tomate ha adquirido gran importancia económica en todo el mundo, ocupando una superficie de casi 3 millones de hectáreas con una media anual de producción superior a setenta millones de toneladas. El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una planta perenne que se desarrolla bien en un amplio rango de latitudes, tipos de suelos, temperatura y sistemas de cultivo. Las técnicas de cultivo de esta planta han experimentado cambios rápidos y notables durante las últimas cuatro décadas. La principal razón de estos cambios ha sido la existencia de factores limitantes para la continuidad del cultivo intensivo en el suelo natural, entre ellos, la salinización del suelo que provoca alteraciones generalizadas del 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. Debido al enorme coste económico que supone la resolución de la problemática de la salinidad en el cultivo de tomate desde un punto de vista tecnológico, se hace necesario la investigación de los mecanismos biológicos que conduzcan a la obtención de variedades cultivadas más tolerantes a la sal. Sin embargo, la dificultad para identificar caracteres relacionados con la tolerancia a salinidad que sean fácilmente medibles y que muestren escasa influencia por otros factores ambientales continua siendo uno de los principales impedimentos para obtener estas

variedades de tomate tolerantes a la salinidad (Cuartero-Zueco y col, 1995).

B. Selección de cultivos tolerantes a la salinidad

Desde hace unas décadas se sabe que la variación genética intra e inter específica puede ser utilizada para desarrollar cultivos tolerantes a la sal (Epstein y Rains, 1987). En este sentido, una de las posibles estrategias a seguir en la obtención de cultivos tolerantes a la salinidad consistiría en introducir en las especies sensibles genes de resistencia al NaCl (genes de halotolerancia) mediante métodos clásicos de cruzamiento (Wyn Jones y Gorham, 1986; Epstein, y col., 1980; Tal, 1985; Epstein y Rains, 1987). Así, plantas cultivadas sensibles a la sal podrían ser cruzadas con variedades silvestres tolerantes aunque, posteriormente, se requirieran numerosos retrocruzamientos para obtener conjuntamente las características agronómicas de la especie cultivada y los genes de halotolerancia de la silvestre. Sin embargo, esta estrategia no es generalmente aplicable debido a la propia complejidad de las características a seleccionar y a que no siempre existe en la naturaleza un genotipo silvestre tolerante capaz de fertilizar al genotipo cultivado sensible.

Por ello, se ha hecho necesario el uso de criterios fisiológicos para la selección de plantas tolerantes al NaCl (Cuartero y col., 1992). Las técnicas de cultivo de tejidos y células ofrecen un gran número de ventajas no encontradas en los procesos de selección convencional habitualmente utilizados para incrementar la tolerancia de las plantas a ambientes salinos. Las ventajas potenciales de las técnicas de cultivo *in vitro* para el estudio y la selección de líneas tolerantes al NaCl incluyen: (a) la caracterización, a nivel celular de marcadores fisiológicos asociados con la tolerancia a la sal, (b) la reducción de interferencias en el proceso debido a la ausencia de la variabilidad que suponen los tejidos diferenciados de las plantas, (c) la posibilidad de obtener una gran variabilidad de genotipos que pueden ser evaluados y seleccionados en el laboratorio, (d) la reducción en el tiempo entre generaciones, (e) la capacidad de manipular, de manera precisa, las condiciones ambientales y del medio de cultivo (Epstein y Rains, 1987). Sin embargo, también existen dificultades para aplicar los procedimientos del cultivo celular a la obtención de plantas tolerantes a la sal, principalmente, debidas a que el carácter seleccionado a nivel celular tiene que expresarse a nivel de planta entera, una vez se ha regenerado ésta. A pesar de que numerosas especies vegetales presentan alta capacidad de regeneración, no todas pueden ser regeneradas. A ello, hay que añadir el efecto negativo de la duración del cultivo celular sobre la capacidad de regeneración de plantas puesto que cuanto más tiempo se mantienen las células en cultivo más difícil es regenerar plantas a partir de ellas (Stavarek y col., 1980). Por otra parte, las plantas regeneradas deben incorporar el carácter genético deseado sin incorporar caracteres adversos que podrían derivar del proceso de selección. Por todo ello, es

necesario conocer las limitaciones de la técnica de cultivo celular en la obtención de plantas tolerantes a la sal y aplicarla en las situaciones apropiadas (Meins, 1983).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han sido utilizadas con gran éxito en la obtención de líneas celulares adaptadas al NaCl a partir de cultivos celulares. Así, se ha conseguido líneas celulares adaptadas a diferentes concentraciones salinas en especies como *Lycopersicon esculentum* Var. Saint Pierre (Bourgeois-Chaillou y Guerrier, 1992) *Lycopersicon peruvianum* (Hassan y Wilkins, 1988), *Beta vulgaris* (Le Dily y col., 1990; Blumwald y Poole, 1987), *Citrus* sp. (Ben-Hayyim y col., 1989), *Nicotiana tabacum* (Ericson y Alfinito, 1984; Murata y col., 1994), *Pisum sativum* (Olmos y Hellin, 1996), *Poncirus trifoliata* (Bouharmont y Beloualy, 1992), *Oryza sativa* (Kavi Kishor, 1988; Shirata y Takagishi, 1990), *Beta vulgaris* (Ramagopal y Carr, 1991), *Medicago sativa* (Winicov y col., 1990) y *Cymbopogon martinii* (Patnaik y Debata, 1997).

La conversión de células sensibles en células adaptadas al NaCl es probablemente debida a una transformación epigenética puesto que es un proceso de una duración no explicable como resultado de una mutación. Esto implica que la información genética para el crecimiento en un ambiente salino está presente aunque no se expresa en las células sensibles a la sal, lo cual no es sorprendente puesto que en las células eucariotas solo una pequeña fracción de la información genética se expresa de forma continuada (Lerner, 1985). Estas líneas celulares tolerantes al NaCl pueden ser de gran ayuda en el conocimiento de los mecanismos fisiológicos implicados en la tolerancia a la sal en plantas superiores, y en la regeneración en algunos casos de plantas tolerantes a la sal. A partir de cultivos celulares, se han obtenido plantas tolerantes a la salinidad de las siguientes especies: *Nicotiana sylvestris*, *N. tabacum*, *Capsicum annum*, *Saccharum officinarum*, *Medicago sativum*, *Oryza sativa*, *Coffea arabica*, *Datura inoxia*, *Citrus sinensis*, *C. aurantium*, *Crepis capillaris*, *Hordeum vulgare*, *Lycopersicon esculentum*, *Colocasia esculenta*, *Medicago media* y *Cymbopogon martinii* (Rains y col., 1980; Watad y col., 1983; Papadopoulos y Rendig, 1983; Ram y Nabors, 1986; Stavarek y Rains, 1984; Chaudhary y col., 1995; Patnaik y Debata, 1997).

Los mecanismos de tolerancia a la sal han sido estudiados en líneas celulares de numerosos especies incluyendo alfalfa, tabaco, patata, tomate, *Vigna radiata*, *Cymbopogon*, cítricos y arroz (Shah, 1990; Chaudhary y col., 1997; Binzel y col., 1987; Sabbah y Tal, 1990; Ben-Hayyim y Kochba, 1983; Kumar y Sharma, 1989; Patnaik y Debata, 1997; Kishor, 1988; Shah y col., 1990). En líneas celulares de estas especies tolerantes y sensibles al NaCl se ha evidenciado la importancia de los procesos de absorción de iones. Así, líneas celulares de *Citrus* tolerantes al NaCl sobreviven a elevados niveles de salinidad evitando parcialmente el NaCl (Ben-Hayyim y Kochba, 1983). Pandey y Ganapathy (1984) y Paek y col., (1982) relacionaron la sensibilidad al NaCl de los callos de *Cicer arietinum* y *Brassica campestris* con el exceso de Na⁺ y Cl⁻. No obstante, Binzel y col., (1987), Sabbah y Tal (1990) y Patnaik y Debata (1997) indicaron que las células de tabaco, patata y *Cymbopogon*

martinii adaptadas al NaCl acumulan mas Na^+ y Cl^- que las células no adaptadas. En resumen, los estudios a nivel de cultivos celulares con diferente grado de tolerancia a la sal indican que uno de los factores mas importante en la tolerancia a la sal es el equilibrio celular del contenido en Na^+ y K^+ (Watad y col., 1983; Croughan y col., 1979; Ben-Hayyim y col., 1985; Rubio y col., 1995; Datta y col., 1996; Shanon y Nobles, 1995).

La aplicación de las técnicas de biología molecular en la obtención de plantas tolerantes al estrés salino ofrece grandes posibilidades, pero también conlleva dificultades, ya que la tolerancia a la salinidad en plantas está regulada por numerosos procesos en los que intervienen genes muy diversos. Además, la respuesta al estrés tiene lugar tanto a nivel celular como a nivel de organismo implicando, por lo tanto, numerosos y diversos procesos genéticos (Epstein y Rains, 1987; Flowers y Yeo, 1995; Hare y col., 1996; Hare y col., 1998).

A pesar de la amplia información disponibles, tras numerosas investigaciones de potenciales marcadores biológicos de tolerancia a la salinidad, los programas de mejora desarrollados hasta hoy han tenido un éxito limitado debido, por una parte, a la propia complejidad de las respuestas de tolerancia al NaCl, controladas por una familia de múltiples genes y, por otra, al escaso conocimiento de los mecanismos biológicos responsables de la sensibilidad y tolerancia de las plantas a la salinidad. Por todo ello, el éxito en la incorporación de rasgos genéticos que confieran a las plantas tolerancia a la salinidad mediante cruzamientos convencionales o, más recientemente, mediante técnicas de ingeniería genética, requiere un mejor conocimiento de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares implicados en la tolerancia al estrés salino. En este sentido, el estudio de la respuesta de las plantas en condiciones de estrés y adaptación al NaCl permitirá conocer las vías metabólicas implicadas en la tolerancia a la salinidad y los límites de su funcionamiento, herramientas imprescindibles a la hora de seleccionar plantas tolerantes al NaCl (Hurkman, 1992; Bonhert y Jensen, 1996; Yeo, 1998)

C. Mecanismos de tolerancia a la salinidad

En plantas, el efecto negativo de la salinidad se atribuye a tres componentes: el déficit hídrico provocado por la disminución del potencial hídrico del medio externo, la toxicidad iónica provocada por el exceso en la absorción de iones Na^+ y/o Cl^- y, finalmente, los desequilibrios nutricionales causados por la interferencia del NaCl con la absorción y transporte de nutrientes minerales. Para superar estos efectos negativos, las plantas han desarrollado, tanto a nivel de organismo como a nivel celular, diversas estrategias de adaptación al NaCl. Estas estrategias consisten en el desarrollo de los mecanismos de ajuste osmótico y en la regulación efectiva de los sistemas de transporte iónico

(Bartels y Nelson, 1994; Murghia y col., 1995; Serrano, 1996; Bonhert y Jensen, 1996; Bonhert y Shen, 1998).

En plantas superiores, la contribución respectiva de los componentes osmótico e iónico del estrés salino sobre el desarrollo y crecimiento celular no está muy clara. En general, el estrés salino provoca un déficit hídrico inmediato frente al cual la planta responde con un ajuste osmótico. A más largo plazo, el efecto negativo del estrés salino se debe a la acción tóxica de los iones Na^+ y Cl^- .

En algunas plantas, como *Citrus sinensis* (Bañuls y Primo-Millo, 1992) y soja (Abel, 1969), el NaCl y KCl son igualmente tóxicos mientras que el NaNO_3 es menos tóxico que los cloruros de Na o K , lo que indica que el componente tóxico de la sal es fundamentalmente el Cl^- . Por lo contrario, en tomate (Rush y Epstein, 1981a) y trigo (Gorham y col, 1990) el NaCl es más tóxico que el KCl , indicando que, en este caso, que el componente tóxico de la sal es el sodio. En suspensiones celulares de tabaco, la adición de concentraciones osmóticamente equivalentes de sorbitol y manitol, NaCl o KCl provoca en todos los casos una inhibición del crecimiento celular. No obstante, el efecto inhibitorio provocado por el cloruro de Na o K es superior al ejercido por sorbitol o manitol (LaRosa y col, 1985). Además, en las suspensiones celulares de tabaco, el grado de toxicidad del KCl es superior al del NaCl , lo cual podría deberse a una mayor capacidad de absorción del Cl^- cuando se encuentra como sal potásica que cuando se encuentra como sal sódica (Rush y Epstein, 1981a).

Además de los efectos osmóticos e iónicos, el estrés salino puede inducir desequilibrios nutricionales, entre ellos, deficiencias en la absorción de K^+ y Ca^{2+} (Laüchli y col, 1994). Por otra parte, la concentración de nutrientes en los medios salinos condiciona el efecto tóxico del NaCl . En este sentido, es bien conocido que el Ca^{2+} reduce la absorción de Na^+ y Cl^- (Bañuls y Primo-Millo, 1992) y restaura los niveles intracelulares de K^+ , lo cual es probablemente consecuencia de interacciones complejas entre estos cationes y sus sistemas de transporte (Epstein, 1998; Liu y Zhu, 1998).

C.1. Estrategia halofita.

El mecanismo de tolerancia a la sal de las plantas halofitas se basa en la acumulación, dilución y/o extrusión de iones. Así, las especies halofitas generan turgencia celular incrementando las concentraciones internas de Na^+ y Cl^- y sintetizando solutos orgánicos neutros que son acumulados en el citoplasma donde contribuyen al mantenimiento de la presión osmótica. Además, algunas especies halofitas han desarrollado modificaciones estructurales con valor adaptativo que contribuyen a superar las altas concentraciones de iones como son las glándulas o vesículas acumuladoras de sal en hojas y el aumento del volumen de la hoja asociado a la succulencia que posibilita la dilución de iones

(Greenway y Munns, 1980).

C.2. Estrategia glicófita

La estrategia glicófita se basa fundamentalmente en mecanismos de exclusión de iones en combinación con síntesis de compuestos orgánicos solubles capaces de mantener las actividades bioquímicas de la célula y de contribuir al mantenimiento de la turgencia y el volumen celular. Algunas modificaciones estructurales como el incremento en la extensibilidad de la pared celular y de la permeabilidad de las raíces al agua o el espesamiento de las hojas pueden también contribuir en la tolerancia al NaCl de las plantas glicófitas (Greenway y Munns, 1980). La mayoría de las especies cultivadas suelen adoptar una estrategia glicófita, aunque existen especies cultivadas tolerantes al NaCl que presentan rasgos halofíticos (Tal, 1984)

D. Clasificación de las plantas en función de su tolerancia a la salinidad

Las plantas se pueden diferenciar según su grado de supervivencia en medios salinos. Jennings (1976) ha establecido una clasificación ecológica de las plantas en la que define el límite de tolerancia al estrés salino en base a la inhibición del crecimiento de la planta tras un periodo de 1 a 6 meses (Tabla 1.). De acuerdo con ello, las halofitas se definen como plantas capaces de crecer en presencia de hasta 500 mM NaCl (grupo I) mientras que las glicófitas se definen como plantas que no crecen en suelos con alto contenido en NaCl (grupo III). Entre estos dos extremos existe una gran variedad de plantas con diferentes niveles de tolerancia al estrés salino y que definen un grupo intermedio en esta clasificación (grupo II).

Tabla 1. Clasificación de las plantas en base a su grado de supervivencia en presencia de NaCl (Jennings, 1976).

Grupos	Limite de supervivencia	Ejemplos
Grupo I. Halofitas		
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> , <i>Beta vulgaris</i>
Grupo II. Halofitas y Glicófitas		
<i>Tolerantes</i>	200 mM NaCl	
II _A . Halofitas monocotiledoneas		<i>Festuca rubra</i> , <i>Puccinellia peisonis</i> .
II _B . Glicófitas		<i>Gossypium</i> , <i>Hordeum</i> .
<i>Intermedias</i>	>100 mM NaCl	<i>Lycopersicon</i> .
<i>Sensibles</i>	< 100 mM NaCl	<i>Phaseolus</i> , <i>Glycine</i> .
Grupo III. Glicófitas		
<i>Muy sensibles</i>	< 50 mM NaCl	<i>Citrus sp.</i> , Aguacates.

E. Componente osmótico del estrés salino

El componente osmótico del estrés salino no es específico de éste sino que también aparece con el estrés por sequía, ya que resulta de la deshidratación y pérdida de turgencia celular inducida por los solutos externos. La turgencia es un factor esencial en el crecimiento celular y su pérdida conlleva procesos destructivos irreparables en las proteínas y membranas celulares (Crowe, 1988). El mantenimiento de la turgencia en las células vegetales expuestas a la sal se realiza mediante mecanismos de síntesis y acumulación de osmolitos compatibles con la actividad de los enzimas intracelulares (Brown, 1990). Estos osmoreguladores son esencialmente polioles (glicerol, sorbitol, manitol, pinitol), azúcares no reductores (fructano, trehalosa y sacarosa) y algunos aminoácidos y derivados (prolina y betaina que también pueden actuar como osmoprotectores exógenos) (McCue y Hanson, 1990; Bonhert y Jensen, 1996a, 1996b; Pilon-Smith y col., 1995; Serrano, 1996; Bonhert y Shen, 1998; Hare y col., 1998; Bouchereau y col., 1999).

La acción del NaCl sobre la acumulación de solutos osmóticamente activos y no tóxicos se acompaña de un incremento del influjo o una reducción del eflujo de agua que permite la recuperación del turgor necesario para la expansión celular. Además, la acumulación de altas concentraciones de

solutos orgánicos en el citoplasma celular contribuye al balance osmótico entre citoplasma y vacuola, donde se produce una elevada acumulación de iones. Aunque los osmoreguladores orgánicos pueden estar presentes tanto en el citoplasma como en vacuola, las concentraciones citoplasmáticas de los mismos son bastante más elevadas que las vacuolares. Puesto que en la vacuola los iones inorgánicos también contribuyen al ajuste osmótico (Mc Cue y Hanson, 1990).

Entre los diferentes osmoreguladores indicados, la prolina, es el más frecuentemente acumulado en condiciones de estrés osmótico, principalmente sequía y salinidad (Mc Cue y Hanson, 1990; Delauney y Verma, 1993; Taylor, 1996; Petrusa y Winicov, 1997; Patnaik y Debata, 1997). El papel de la prolina en la mejora de la tolerancia al estrés osmótico, se apoya en la existencia de mutantes acumuladores de prolina obtenidos por mutagenesis química, variación somaclonal o ingeniería genética, en los que se observa una mayor tolerancia al estrés salino. Aunque la capacidad de sobrevivir a un déficit hídrico o estrés salino se ha correlacionado con el incremento de los niveles celulares de prolina, en algunos casos la acumulación o la síntesis de este osmoregulador se inicia cuando el daño celular es evidente, lo que indica que la síntesis de prolina no siempre constituye un marcador de tolerancia (Perez-Alfocea, 1994b; Cano y col., 1996; Liu y Zhu, 1997; Root y Shaw, 1998). Así, no está claro que las especies tolerantes a la salinidad acumulen más prolina que las sensibles. Por ejemplo, en condiciones de estrés por 200 mM NaCl, la especie de tomate tolerante a la sal, *Lycopersicon peruvianum*, acumula en sus hojas la mitad de prolina pero el doble de iones cloro que la especie sensible, *Lycopersicon esculentum* (Tal y col., 1979) y el mutante *sos1* de *Arabidopsis thaliana*, deficiente en transportador de K⁺, y por tanto sensible al NaCl acumula más prolina que el genotipo silvestre en condiciones de estrés salino (Liu y Zhu, 1997).

En plantas, el control de la síntesis de prolina es bastante complejo puesto que existen dos vías biosintéticas que pueden ser reguladas a nivel de las actividades enzimáticas o la expresión de los genes implicados en las mismas. La biosíntesis de prolina se lleva a cabo en el citoplasma celular a partir de ornitina o a partir de glutamato vía pirrolina-5-carboxilato (Fig 1). Sin embargo, únicamente la vía pirrolina-5-carboxilato se activa en condiciones de estrés por salinidad y deficiencia en nitrógeno (Delauney y Verma, 1993). Las dos primeras etapas de la vía pirrolina-5-carboxilato están catalizadas en plantas, animales y bacterias por una enzima bifuncional con actividades glutamato 5-quinasa y glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa. Este enzima bifuncional se denomina 1-pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS) y su expresión en plantas está inducida por el estrés salino y osmótico (Hu y col., 1992; Yoshida y col., 1995; Zhang y col., 1995; Liu y Zhy, 1997). Recientemente, Kavi-Kishor y col. (1995) han indicado que la sobreexpresión de P5CS en plantas de tabaco transgénicas conlleva un incremento en la concentración de prolina que determinan una mayor productividad de estas plantas en condiciones de déficit hídrico.

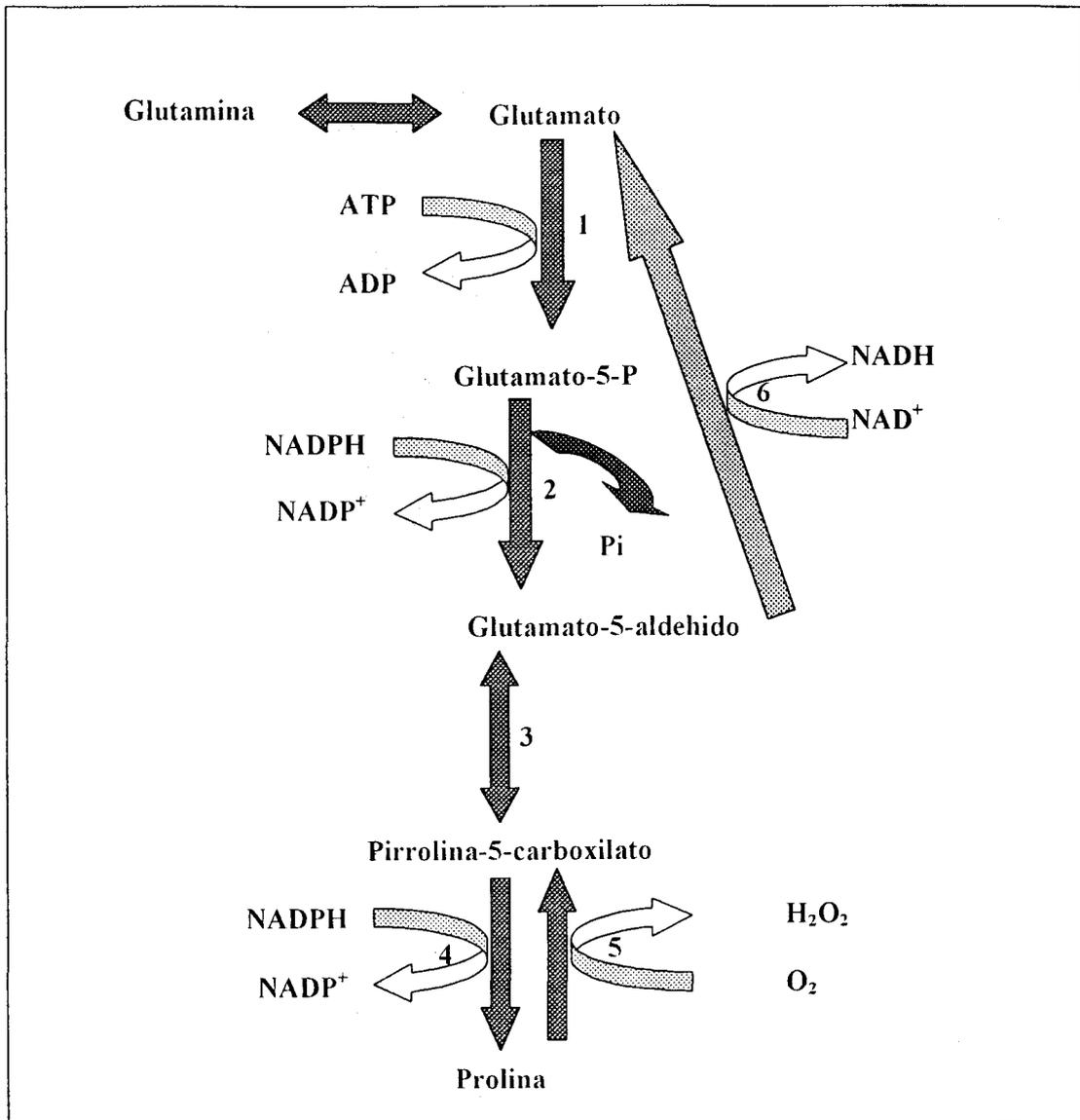


Figura 1: Ciclo metabólico de la prolina en la vía pirrolina-5-carboxilato. Las etapas son las siguientes: 1, glutamato 5-Kinasa (EC 2.7.2.11); 2, glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.41); 3, formación de un ciclo espontáneo; 4, 1-pirrolina-5-carboxilato reductasa (EC 1.5.1.2); 5, prolina oxidasa (probablemente EC 1.5.99.8); 6, 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (EC 1.5.1.12). (tomada de Serrano, 1996)

No obstante, los mecanismos a través de los cuales elevadas concentraciones citoplasmáticas de prolina influyen en las relaciones hídricas de la planta no son todavía evidentes (Blum y col., 1996). Delauney y Verma, (1993) sugieren que la acumulación de la prolina en condiciones de estrés puede ser debida a una regulación del enzima glutamato 5-Kinase en los tejidos estresados. Aunque la 1-pirrolina-5-carboxilato reductasa es también inducible por el estrés osmótico (Williamson y Slocum, 1992), altos niveles de expresión de este enzima no incrementan significativamente la concentración de prolina en plantas transgénicas, indicando ello que la reducción de la pirrolina-5-carboxilato no es el paso limitante en la producción de la prolina (Szoke y col., 1992).

La adición al medio de reacción de 10 mM prolina provoca la inhibición *in vitro* del enzima P5CS sin embargo en hojas de plantas sometidas a estrés hídrico se han detectado concentraciones superiores a 150 mM (Delauney y Verma, 1993). Recientemente, se ha demostrado un incremento en la concentración de prolina en el floema de alfalfa en condiciones de estrés hídrico (Girousse y col., 1996) sugiriendo ello un incremento del transporte de prolina a diferentes tejidos de la planta en condiciones de estrés. Del mismo modo, en *Arabidopsis*, se ha identificado siete genes de permeasas de aminoácidos (Frommer y col., 1993; Kwart y col., 1993; Fischer y col., 1995; Rentsch y col., 1996; Taylor, 1996) capaces de transportar prolina aunque ninguno de ellos parece codificar para un transportador específico. En condiciones de estrés hídrico, se incrementa en plantas de *Arabidopsis* la expresión del gen *ProT2* que codifica un transportador de prolina siendo la inducción de *ProT2* por estrés hídrico posterior a la del gen P5CS, lo que implica que la biosíntesis de prolina y su transporte están regulados de manera coordinada durante el déficit hídrico.

Puesto que la acumulación de prolina es común a varias situaciones de estrés (salinidad, estrés hídrico, bajas temperaturas, deficiencia mineral, acidez de suelo...etc.) debe existir alguna señal común que dispare el mecanismo de su biosíntesis bajo diferentes condiciones de estrés. En este sentido, Goring (1981) ha indicado que la disminución del pH citoplasmático puede ser la señal que induzca la síntesis de este osmoregulador.

En plantas, la prolina además de un soluto compatible puede constituir una fuente nitrógenada o una reserva de ATP utilizable durante la recuperación del estrés. En este sentido, la oxidación de la prolina al 1-pirrolina-5-carboxilato por el enzima prolina deshidrogenasa ubicada en la membrana interna de la mitocondria, permite el acoplamiento entre la degradación de prolina y la formación de ATP (Elthon y Stewart, 1981). Esta vía de degradación de prolina en mitocondria puede ser reprimida por las mismas condiciones que inducen su biosíntesis en el citoplasma, ya que se ha observado, por una parte, que la actividad prolina deshidrogenasa está disminuida en mitocondrias aisladas de plantas sometidas a déficit hídrico (Rayapati y Stewart, 1991) y, por otra, que la expresión del gen *ERD5* que codifica para prolina deshidrogenasa se induce después de rehidratar las plantas sometidas a estrés hídrico.

La betaina constituye otro de los osmoreguladores orgánicos que también se acumulan en algunas plantas en condiciones de estrés osmótico (Hares y Cress 1997). Su biosíntesis se realiza en el estroma cloroplastídico a partir de colina e involucra dos etapas enzimáticas catalizadas por colina monooxigenasa y betaina-aldehído deshidrogenasa (Mc Cue y Hanson, 1990), esta última inducible por estrés osmótico (Weretilnyk y Hanson, 1990).

La glicina betaina es otro osmoregulador que confiere tolerancia a la salinidad (Grumet y Hanson, 1986; Rhodes y col., 1989; Mc Cue y Hanson, 1990). A este respecto, se ha evidenciado que líneas isogénicas de cebada o maíz que difieren en su capacidad acumuladora de glicina-betaina, presentan distintas capacidades de ajuste osmótico en condiciones de salinidad (Weretilnyk y Hanson, 1989; Arakawa y col., 1990; Hasegawa y col., 1993).

La sacarosa y/o los azúcares reductores son los principales solutos orgánicos involucrados en el ajuste osmótico en numerosas especies glicófitas sometidas a estrés salino o osmótico (Hare y col., 1998; Gao y col., 1998; Drenan y col., 1993; Keller y Ludlow, 1993; Pilon-Smith y col., 1995; Ishitani y col., 1996; Olmos y Hellin, 1996; Garcia y col., 1997; Karakas y col., 1997; Pelleschi y col., 1997; Iyer y Caplan, 1998). A parte del papel en el ajuste osmótico, la acumulación de azúcares solubles en respuesta a la sal puede resultar en una disminución del estrés oxidativo causado por la salinidad puesto que algunos de estos solutos pueden neutralizar los radicales hidróxilo (Hare y col., 1998).

Además de la acumulación de compuestos específicos, el estrés hídrico o salino se acompañan de modificaciones en el reparto del fotosintato (Geigenberger y col, 1997; Drennan y col, 1993; Keller y Ludlow, 1993; Iyer y Caplan, 1998; Gao y col., 1998) que pueden contribuir al mantenimiento del turgor celular (Pilon-Smith y col., 1995). Concretamente, el almidón plastidial representa una reserva de azúcares que puede ser rápidamente convertido a sacarosa en condiciones de estrés (Quick y col., 1992; Zrenner y Stitt, 1991; Geigenberger y col., 1997). Por otra parte, el estrés osmótico o salino favorecen la síntesis de sacarosa a través de una activación de sacarosa fosfato sintasa (SPS; EC 2.3.1.14.), enzima que cataliza la formación de sacarosa-6-P a partir de UDP-glucosa y fructosa-6-P, mediante una fosforilación reversible del enzima (Toroser y Huber, 1997). La acumulación de sacarosa en respuesta al estrés salino puede también ser atribuida a una disminución de la degradación de este disacárido resultante de una menor actividad invertasa ácida (EC 3.2.1.26.). Se ha descrito una correlación positiva entre la acumulación de sacarosa en hojas de plantas sometidas a estrés salino, el incremento de la actividad SPS y la disminución de la actividad invertasa ácida (Gao y Lips; 1998; Huber y Huber, 1992; Hammond y col., 1994; Huber, 1989; Geigenberger y col., 1997) lo cual limitaría el uso de la sacarosa como reserva energética, pudiendo ello limitar el crecimiento celular.

Además de su posible papel osmoregulador los azúcares pueden jugar otras funciones

reguladoras en plantas estresadas (Hare y col., 1998). Así, los azúcares pueden sintetizarse en condiciones de estrés en respuesta al incremento en la demanda de carbohidratos fácilmente metabolizables capaces de mantener el estado energético de la planta estresada (Bianchi y col., 1991).

El contenido en azúcares es un parámetro indicativo del balance entre el carbono asimilado y el utilizado en la formación de esqueletos carbonados y representa una señal crítica para los ajustes de este balance frente a alteraciones por factores ambientales o programas de desarrollo endógenos. Los azúcares no solamente sostienen el crecimiento de la planta sino también afectan los sistemas sensores que regulan la expresión de una variedad de genes involucrados en la fotosíntesis, respiración, síntesis y degradación de almidón y sacarosa y metabolismo nitrogenado (Koch, 1996). A pesar de que la acumulación de azúcares (Ingram y Bartels, 1996) y los cambios en la distribución de carbohidratos han sido considerados desde hace mucho tiempo importantes determinantes de la tolerancia al estrés osmótico, la implicación de estas moléculas en los procesos de señalización del estrés aún no está bien establecida. Existen evidencias que implican la fosforilación de hexosas por hexoquinasa más que los niveles de hexosa fosfato en sí como el más importante mediador sensor de azúcares (Koch, 1996; Jang y col., 1997; Smeekens y Rock, 1997). Durante el estrés, la reacción irreversible de la hexoquinasa puede ser un importante indicador de si los hexosas son consumidos vía respiración o acumulados posiblemente para fines osmóticos. Plantas superiores contienen un espectro de actividades hexoquinasas con diferentes especificidades para los sustratos glucosa, fructosa y manosa. Dichos enzimas también difieren en la localización subcelular y en la regulación de su expresión por el desarrollo o tejidos (Kruger, 1997). El papel fisiológico preciso de los miembros de las familias de los genes de la hexoquinasa no son todavía conocidos.

Los fructanos son moléculas de polifruktosa producidos por numerosas plantas y bacterias como forma de reserva de carbohidratos (Nelson y Smith, 1986; Hendry, 1987, 1993). En plantas, la síntesis de fructano a partir de sacarosa involucra al menos dos enzimas. La primera cataliza la producción del trisacárido Glc-Fru-Fru, que puede ser extendido con residuos de fructosa en una reacción dependiente de una o más enzimas (Pollock y Cairns, 1991). En plantas, los fructanos están constituidos por 10 a 200 unidades de fructosa dependiendo de la especie y las condiciones ambientales (Pontis y del Campillo, 1985). Los fructanos son compuestos solubles lo que se acumulan en vacuola en cantidades que pueden llegar a ser mucho más elevadas que la del almidón plastídico (Brocklebank y Hendry, 1989). Por ello, estos polímeros pueden jugar un papel importante en el ajuste osmótico en condiciones de estrés (Bielecki, 1993; Hendry, 1993). La introducción en tabaco de un gen bacteriano que codifica para fructosiltransferasa, enzima responsable de la síntesis de fructano a partir de sacarosa, incrementa el contenido en azúcares, el crecimiento de las plantas y el rendimiento en peso fresco y seco tras un estrés por PEG (Pilon-smith y col., 1995). En estas plantas, tras el fraccionamiento de cada molécula de sacarosa, la molécula de fructosa resultante contribuye a la

polimerización de fructano catalizada por fructosiltransferasa, mientras que la de glucosa es disponible para la respiración.

La acumulación de polioles, de cadena simple como manitol y sorbitol (Bielecki, 1982) y de polioles cíclicos como mio-inositol y sus derivados metilados (Loewus y Dickinson, 1982; Smart y Flores, 1997; Sheveleva y col., 1997), está también correlacionada con la tolerancia a la salinidad y la sequía en numerosas especies, en las que se ha observado que el estrés salino produce un incremento en la concentración de estos compuestos (Everard y col., 1994; Bonhert y Jensen, 1996; Bonhert y Shen, 1998).

F. Regulación de los flujos iónicos a través las membranas celulares

En plantas, la composición iónica intracelular se caracteriza por la existencia de altas concentraciones de K^+ y Mg^{2+} y bajas concentraciones de Na^+ , Cl^- , H^+ y Ca^{2+} . El medio externo, por el contrario, puede presentar altas concentraciones de Na^+ , Cl^- , H^+ , Ca^{2+} y bajas concentraciones de K^+ y Mg^{2+} (Serrano y Villalba, 1993). Puesto que los altos niveles apoplásticos de iones Na^+ y Cl^- generados por el estrés salino alteran el equilibrio iónico, es vital para la planta restablecer la homeostasia iónica que permite el desarrollo de las funciones celulares mediante un control del flujo iónico neto a través de las membranas celulares (Niu y col., 1995).

En condiciones fisiológicas, las concentraciones citoplasmáticas son de 100 a 200 mM de K^+ , 1 a 10 mM de Na^+ y Cl^- y 0.1 a 0.2 mM de Ca^{2+} (Niu y col., 1995). Los sistemas enzimáticos de las células eucariotas son funcionales en un rango de concentraciones iónicas bastante restringido: de 0.1 a 0.2 M de K^+ e inferiores a 50 mM de Na^+ y Cl^- . La toxicidad iónica provocada por el estrés salino resulta tanto de la asimilación de Na^+ y Cl^- como del incremento en la concentración iónica intracelular que resulta de 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 tanto solubles como de membrana (Wyn Jones y Pollard, 1983). Además algunos sistemas enzimáticos pueden ser especialmente sensibles a concentraciones relativamente bajas de Na^+ o Cl^- de forma que la regulación de su actividad en presencia de estos iones puede ser determinante de la sensibilidad al estrés salino. En este sentido, los procesos de transporte a nivel del plasmalema y tonoplasto son de crucial importancia en la tolerancia a la salinidad

El agua, iones y solutos de pequeño tamaño atraviesan las membranas celulares a favor de gradiente por procesos de difusión, a una velocidad dependiente de su coeficiente de permeabilidad en la bicapa lipídica. Puesto que los iones y solutos de mayor tamaño no atraviesan fácilmente la bicapa

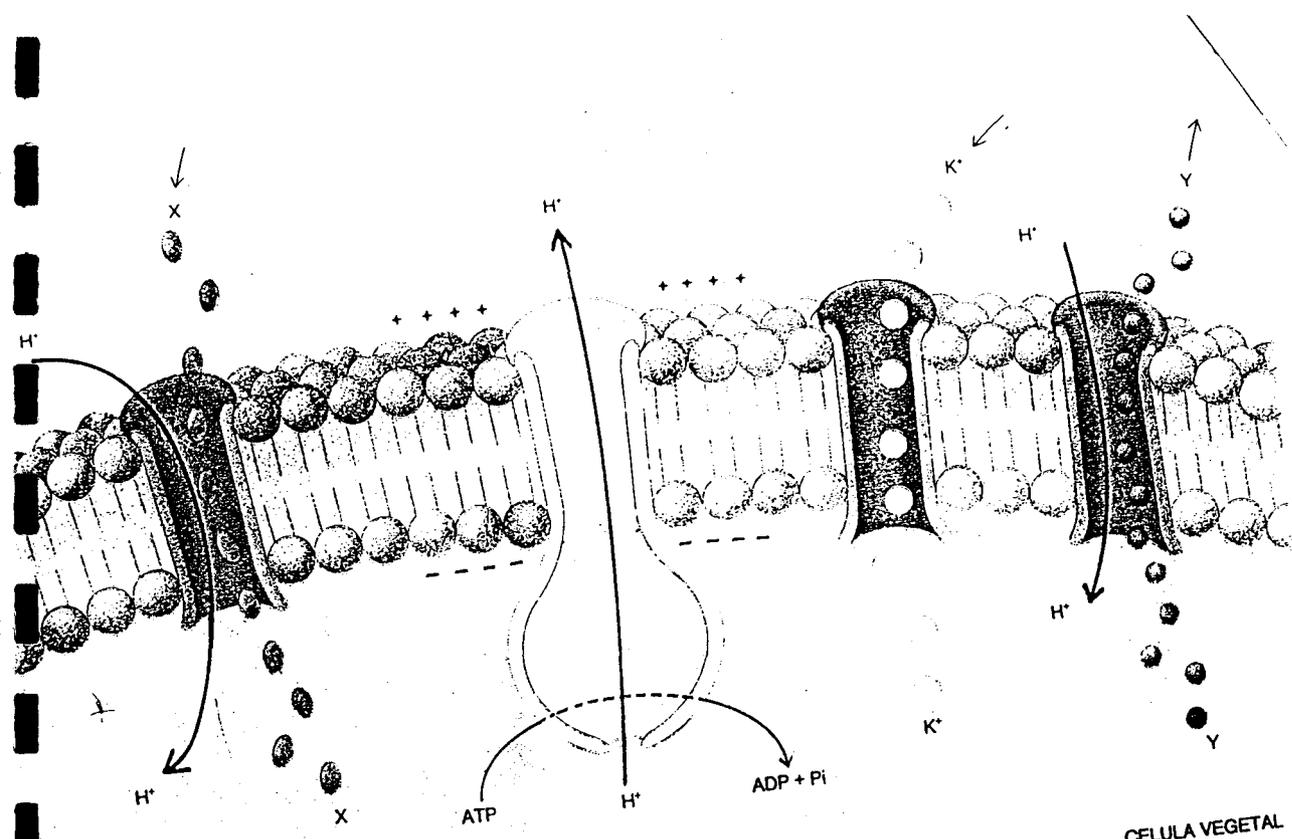
lipídica. el flujo de los mismos a través de la membrana plasmática y tonoplasto se produce a través de sistemas de transporte.

Los sistemas de transporte que permiten el flujo de iones se clasifican en bombas, transportadores y canales (Sussman y Harper, 1989). El transporte facilitado de iones y solutos a través de las membranas celulares puede ser un proceso pasivo a favor de gradiente mediado por canales (uniportadores) o bien un proceso activo en contra de gradiente de concentración o potencial eléctrico dependiente del aporte de energía metabólica. Las bombas (H^+ -ATPasa, H^+ -PPasa, UDPasa...etc) utilizan directamente la energía metabólica (ATP, PPI, UDP...etc) para el transporte vectorial de un ion, mientras que los transportadores acoplan el transporte de un soluto en contra de su gradiente electroquímico al flujo de otro soluto a favor de su gradiente electroquímico en el mismo sentido (simporte) o en sentido contrario (antiporte) (Niu y col., 1995; Rausch y col., 1996)

En plantas, el transporte activo de la mayoría de los iones a través las membranas celulares es acoplado al gradiente electroquímico ($\Delta\mu_H^+$) generado por el gradiente de pH (ΔpH) y el potencial de membrana ($\Delta\psi$). La fuerza motriz, que resulta de la conversión de la energía química ($\Delta\mu_H^+$) en diferencia de potencial eléctrico (mV), es $\Delta p = \Delta\mu_H^+/F = \Delta\psi - 59 \Delta pH$ (a 25 °C), donde F es la constante de Faraday (Sze, 1985). Así, el flujo de iones mediado por transportadores esta acoplado a un descenso del flujo de H^+ (Niu y col., 1995).

G. Transporte activo primario

De acuerdo con la teoría de Mitchell (1961), en plantas superiores, el transporte activo primario se lleva a cabo fundamentalmente mediante la actuación de H^+ -ATPasas y/o H^+ -PPasas, las cuales acoplan la energía libre de la hidrólisis de ATP y/o PPI, respectivamente, al transporte electrogénico de H^+ desde el citoplasma hacia el exterior celular, a través del plasmalema, o hacia la vacuola, a través del tonoplasto, creando una diferencia de potencial eléctrico entre el citoplasma y el medio externo (-120 mV) y entre la vacuola y el medio externo (-90 mV) y una diferencia de pH entre el citoplasma (pH próximo a la neutralidad) y la vacuola (pH ácido). Dichos transportadores primarios o bombas contribuyen a la formación del gradiente electroquímico transmembranario y a la regulación del pH citoplasmático necesario para impulsar numerosos procesos de transporte de iones como Na^+ y Cl^- y de solutos no iónicos como aminoácidos y azúcares.



X = AZUCARES, AMINOACIDOS, PURINAS, ETC.
 Y = CALCIO, SUCCINATO, LACTATO, ETC.

G.1. H⁺-ATPasa de plasmalema

G.1.1. Primeros estudios.

La existencia de una ATPasa bombeadora de protones en la membrana plasmática de las células vegetales se puso en manifiesto en los años setenta, mediante experimentos electrofisiológicos realizados en diversos laboratorios. Destacan los trabajos de Marré (1979) que demostró que la adición de fusicocina, un terpenoide producido por el hongo patógeno *Fusicoccus amygdalus*, a secciones de órganos vegetales provocaba simultáneamente la acidificación del medio externo y la hiperpolarización de las células. Sus resultados sugirieron que la fitotoxina activaba una bomba electrogénica que expulsaba protones hacia el medio extracelular y cuyo funcionamiento dependía del metabolismo energético, lo que hacía pensar que se trataba probablemente de una ATPasa. Sin embargo, en tejidos intactos no se pudo demostrar de forma concluyente que la bomba de protones fuese una ATPasa, puesto que no se podía excluir la implicación de otros sistemas de expulsión de protones, por ejemplo, enzimas de oxidación-reducción asociadas a la membrana plasmática. Fue la purificación y reconstitución en liposomas del enzima ATPasa de la membrana plasmática de hongos y plantas lo que permitió su caracterización enzimológica y demostró que dicha enzima opera en tubo de ensayo como una potente bomba electrogénica de protones (Serrano y Villalba, 1993).

G.1.2. Estructura, funcionamiento y propiedades cinéticas

El origen de las H⁺-ATPasas de plasmalema de plantas podría encontrarse en una bomba de H⁺ presente en células primitivas, en las que la existencia de un enzima capaz de expulsar protones al exterior supondría una ventaja evolutiva, ya que contrarrestaría la disminución del pH intracelular resultante de los ácidos generados en el metabolismo anaerobio (Serrano y Villalba, 1993).

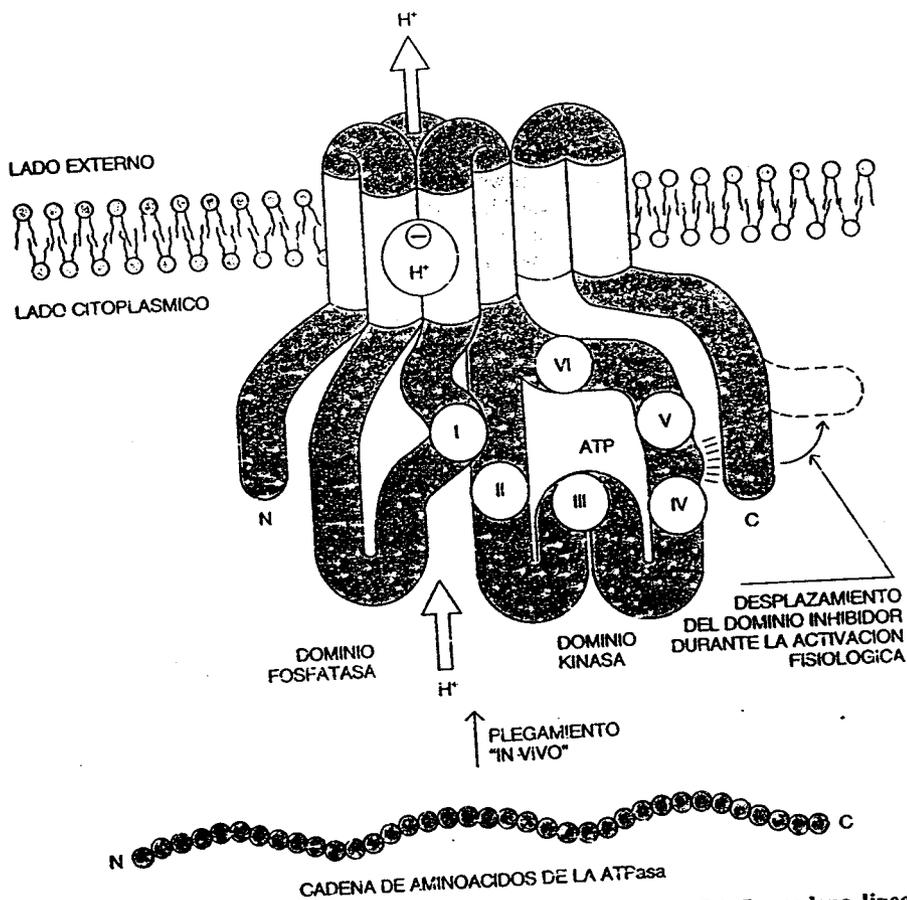
La H⁺-ATPasa de la membrana plasmática (EC.3.6.1.35) pertenece a la familia de las (E-P)-ATPasas que poseen una única subunidad catalítica, forman un intermediario fosforilado (E-P, con enlace aspartilfosfato) y son sensibles a vanadato (Serrano, 1988, 1989, 1990; Serrano y Villalba, 1993; Moller y col., 1996).

La proteína H⁺-ATPasa aislada y purificada de preparaciones de plasmalema de diversos orígenes vegetales, se presenta como un dímero de tamaño molecular entorno a 200 KDa (Briskin y col., 1985) en que cada monómero de 100 KDa representaría la unidad mínima que acopla la hidrólisis de ATP al transporte de H⁺ (Briskin, 1990; Rauch y col., 1996).

El gen que codifica para la H^+ -ATPasa de plasmalema fue inicialmente secuenciado en levadura por Serrano y col., (1986) y en *Arabidopsis thaliana* por Pardo y Serrano (1989). En trabajos posteriores se han secuenciado genes de este enzima en diferentes orígenes vegetales (Ewing y Bennet, 1994; Palmgren y Axelsen, 1998). Así, en plantas, el enzima H^+ -ATPasa de plasmalema está codificada por una familia multigénica de aproximadamente 10 genes (Harper y col., 1990, 1994; Pérez y col., 1992; Ewing y Bennet, 1994). Sin embargo, todos los genes que codifican para la H^+ -ATPasa, identificados a nivel de cDNA en las diferentes especies, pueden ser clasificados en 2 subfamilias según la identidad de sus secuencias. La diversidad entre las dos subfamilias que representan los genes mas altamente expresados parece reflejar la evolución de las especies comunes de monocotiledoneas y dicotiledoneas (Moriau y col., 1993)

La información disponible sobre la estructura de la proteína H^+ -ATPasa se basa, por una parte, en la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos de los genes correspondientes y, por otra, en la localización, dentro de la secuencia de aminoácidos, de regiones hidrofóbicas transmembranarias con configuración *alfa*-hélice (Boutry y col., 1989; Harper y col., 1989, 1990; Pardo y Serrano, 1989a y b; Ewings y col., 1990; Serrano y Villalba, 1993). Serrano (1989) y Briskins (1990) han propuesto la existencia de un total de 6 regiones (I-VI, figura 2.) altamente conservadas en el peptido de 100 KDa. El dominio N-terminal es un bucle de *alfa*-hélices variable en longitud y secuencia orientado hacia el citoplasma celular y sin actividad catalítica, aunque de gran importancia en relación a los cambios conformacionales implicados en el funcionamiento del enzima. El dominio C-terminal, también orientado hacia el citoplasma celular, y variable en longitud secuencia, está implicado en la regulación de la actividad catalítica del enzima (Susman y Harper, 1989; Palmgren y col., 1991). Los dos dominios citoplasmáticos centrales contienen los sitios activos del enzima: el mayor de ellos, con actividad quínasa, contiene el sitio de unión de ATP (regiones III, IV, V, VI) y sintetiza el intermediario fosforilado aspartil fosfato (región II) y el menor (región I), con actividad fosfatasa, está implicado en la hidrólisis del intermediario fosforilado y en los cambios conformacionales necesarios para dicha hidrólisis. Finalmente, el enzima presenta un canal para H^+ que atraviesa la membrana y que puede estar formado por cuatro o seis *alfa*-hélices (Serrano y Villalba, 1993).

El acoplamiento energético entre la hidrólisis de ATP y el transporte de iones se apoya en la diversidad de conformaciones que ofrece la H^+ -ATPasa: enzima defosforilada-deprotonada (E), defosforilada-protonada (H^+ .E), fosforilada protonada (H^+ .E-P) y fosforilada deprotonada (E-P) (Figura 3.). La enzima defosforilada une protones con gran afinidad en el lado citoplasmático de la membrana, mientras que la enzima fosforilada los une con baja afinidad en el lado externo, siendo a la vez la forma que libera los protones.



6. MODELO ESTRUCTURAL DE LA ATPasa DE PROTONES. La cadena lineal compuesta por 920-950 aminoácidos (*esquema inferior*) se pliega en las membranas celulares y configura una estructura muy compleja. El modelo arriba esbozado destaca los dominios funcionales (fosfatasa, kinasa, inhibidor y transmembrana) y los motivos de aminoácidos esenciales (I a VI) que han persistido a lo largo de la evolución, identificados por Francisco Portillo y Ramón Sefrano, uno de los autores. El dominio inhibidor es el extremo carboxílico, que bloquea de forma regulable el centro activo. Se supone que el dominio kinasa cataliza la formación del intermediario fosforilado; al dominio fosfatasa le corresponde catalizar la hidrólisis de dicho intermediario. Se trata, sin embargo, de atribuciones de funciones más o menos hipotéticas, porque los cambios conformacionales del ciclo catalítico complican el análisis de las mutaciones.

Cuando el ATP fosforila el enzima, se induce el bombeo de protones que se toman ávidamente de la cara citoplasmática de la membrana y se liberan en la cara externa de la misma. La hidrólisis de ATP necesita del transporte de protones, porque las dos etapas del ciclo catalítico, fosforilación e hidrólisis, son catalizadas exclusivamente por el enzima protonada y deprotonada, respectivamente (Figura 3.). Así, la conformación (E) no es capaz de interaccionar con ATP a menos que tome un protón del lado citoplasmático y adquiera la conformación ($H^+ \cdot E$). Esta conformación tiene actividad quinásica, es decir, transfiere el grupo fosfato desde la molécula de ATP a un residuo de aspartato del propio enzima. Una vez fosforilado el enzima por ATP, la conformación ($H^+ \cdot E-P$) requiere la liberación de H^+ al medio externo para poder concluir su ciclo (Serrano y Villalba, 1993).

La actividad de hidrólisis de ATP es dependiente de Mg, lo que indica que el verdadero sustrato del enzima no es el ATP sino el complejo Mg-ATP, presentando asimismo una fuerte especificidad por el ATP como compuesto fosforilado. El enzima aislado y purificado muestra una cinética simple de tipo Michaelis-Menten respecto al Mg-ATP (Briskin, 1990) con una K_m para este sustrato que oscila entre 0.2 y 1.4 mM, siendo la estequiometría de la reacción de 1 H^+ transportado por ATP hidrolizado. El pH óptimo para la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema está alrededor de 6.6, aunque in vivo el intervalo de pH al que el enzima tiene una actividad óptima puede ser mucho más amplio (Sze, 1985).

La H^+ -ATPasa de plasmalema se estimula fuertemente por cationes según la siguiente secuencia $K^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+$ (Sze, 1985) y, aunque su actividad no se ve alterada por aniones, los aniones permeantes Cl^- , Br^- y NO_3^- estimulan la formación del gradiente de pH (Vara y Serrano, 1982), probablemente por su capacidad para disipar el gradiente eléctrico. La estimulación por K^+ de la actividad H^+ -ATPasa, y el acoplamiento de esta actividad enzimática al transporte de K^+ a través del plasmalema (Briskin, 1990), podría explicarse en base a una activación directa del transporte de K^+ por la H^+ -ATPasa, o a un efecto del catión sobre el funcionamiento del enzima (Grouzis y col., 1990).

Inicialmente se propuso que la H^+ -ATPasa podría funcionar como una H^+/K^+ -ATPasa (Sze, 1983) de forma similar a la Na^+/K^+ -ATPasa de las células animales (Briskin, 1990). En este sentido, Thibaut y col. (1986) y Bienfait y Lüttge (1988) han demostrado en raíces que la acidificación del medio por la actividad H^+ -ATPasa depende del intercambio H^+/K^+ , el cual ha sido también puesto de manifiesto por Braun y col. (1986) y Hassidim y col. (1990) en vesículas de membrana plasmática de *Atriplex*. Sin embargo, en estudios posteriores se ha observado que la extrusión de H^+ al medio externo puede realizarse en ausencia de K^+ indicando que la H^+ -ATPasa de plasmalema transporta únicamente H^+ y que el transporte de K^+ es catalizado por un sistema diferente impulsado por el potencial de membrana generado por la extrusión de H^+ (Shasan y Schroeder, 1992).

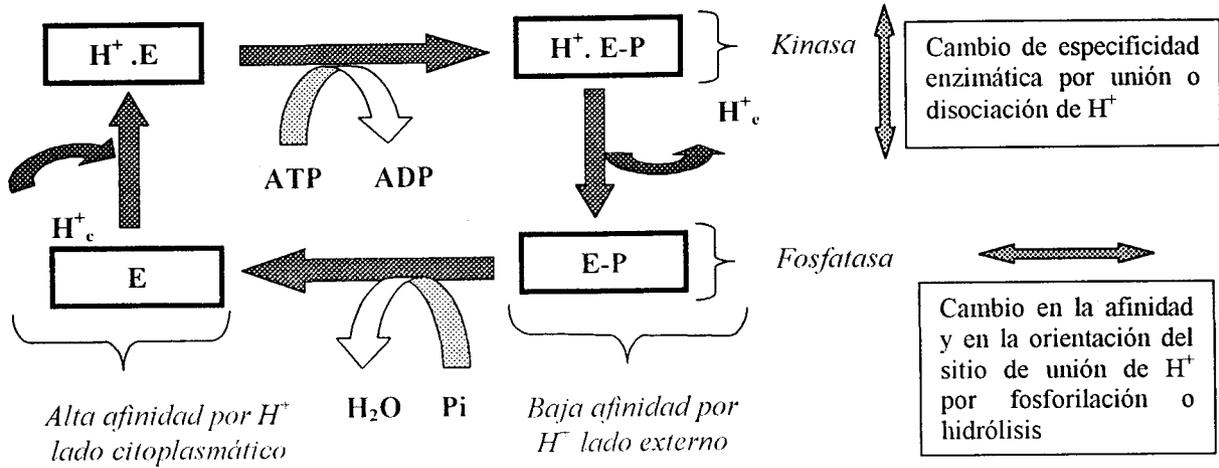


Figura.4. Mecanismo de acoplamiento energético entre la hidrólisis de ATP y el transporte de protones. Este mecanismo consiste en un ciclo de reacción con cuatro compuestos intermediarios claves con diferentes propiedades catalíticas y de transporte de H^+ (Serrano y Villalba, 1993).

Por otra parte, la estimulación por K^+ de la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema podría deberse a un efecto de este catión sobre la velocidad de transición entre las distintas conformaciones del enzima, incrementando la actividad H^+ -ATPasa sin implicar un transporte acoplado y simultáneo de K^+ (Briskin, 1990). Otra posibilidad sería que el transporte de K^+ provocara la disipación del potencial de membrana creado por la extrusión activa de H^+ , lo que estimularía el bombeo de H^+ y la hidrólisis de ATP. Así, Vara y Serrano (1982) demuestran que la adición conjunta de K^+ y valinomicina, ionóforo específico de este catión, estimula la velocidad de bombeo de H^+ e incrementa el gradiente de pH. Finalmente, el K^+ podría también estimular la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema por disminución de la repulsión electrostática entre el complejo Mg-ATP y las cargas negativas de la superficie de la membrana (Gibrat y col., 1990; Grouzis y col., 1990), por inactivación de enzimas quinasas que podrían actuar sobre la H^+ -ATPasa (Scalla y col., 1983; Schaller y Sussman, 1988), o bien mediante modificación de las interacciones lípido-proteínas (Palmgren y col., 1988, 1990; Cooke y col., 1994).

La H^+ -ATPasa de plasmalema es sensible a ciertos inhibidores, entre ellos, vanadato (Bowman y Slayman, 1979; Gallagher y Leonard, 1982; Lew y Spanswick, 1984), DCCD (Randall y Sze, 1986; Solioz, 1984), DES (Balke y Hodges, 1977; Rasi-Caldogno y col., 1985; Vara y Serrano, 1982), eritrosina B (Cocucci, 1986), sales de Cu^{2+} y mercuriales (Kartz y Sussman, 1987) pero insensible a anión nitrato, bafilomicina y DIDS, inhibidores de la H^+ -ATPasa vacuolar, a azida y oligomicina, potentes inhibidores de la ATP sintasa mitocondrial (Balke y Hodges, 1977, De Michelis y col., 1984). La inhibición por DCCD y DES se establece a nivel de los canales o lugares de paso de H^+ , mientras que la inhibición por vanadato se establece a nivel de la formación del intermediario fosforilado que puede anclarse al enzima en los sitios de unión de ATP (Briskin, 1990; Gallagher y Leonard, 1982).

G.1.3. Funciones fisiológicas del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema en plantas

Las evidencias experimentales a cerca de las funciones fisiológicas del enzima H^+ -ATPasa de membrana plasmática en plantas se basan en los estudios de la actividad bombeadora de H^+ *in vivo* así como en la extrapolación de los estudios bioquímicos llevados a cabo *in vitro* (Serrano, 1989). La importancia de la H^+ -ATPasa de plasmalema en todas estas funciones sólo podrá dilucidarse cuando se disponga de un importante número de mutantes de la proteína H^+ -ATPasa vegetal capaces de expresarse en un sistema adecuado. En este contexto, Villalba y col. (1992) han conseguido expresar la H^+ -ATPasa de *Arabidopsis thaliana* en levadura, permitiendo así la identificación de residuos aminoácidos de interés funcional mediante mutagénesis dirigida.

Así, se ha indicado la participación del enzima H^+ -ATPasa en diversas funciones esenciales de

las plantas, como crecimiento celular, carga y descarga de sacarosa en los vasos del floema, transporte de malato en plantas CAM, desencadenamiento de la germinación de esporas de hongos y semillas de plantas, crecimiento polar de células y órganos, movimientos de los estomas, acumulación de moléculas orgánicas por parte del embrión, secreción de proteínas, procesos mitóticos, gravitropismo, respuestas mediadas por la luz y mantenimiento del potencial de membrana (Sussman, 1994; Michelet y Boutry, 1995; Palmgren, 1998).

La H^+ -ATPasa de la membrana plasmática es también responsable de la acidificación de la interfase suelo/raíz (rizosfera) que conlleva la movilización de nutrientes minerales en las proximidades de las raíces, altera la capacidad tampón del suelo y modifica la actividad de algunos microorganismos del suelo (Lin, 1984; Römheld y col., 1984; Serrano 1989; Spanswick 1981; Sze 1985). De aquí que el enzima H^+ -ATPasa de membrana plasmática juegue un papel importante en el transporte secundario de iones y metabolitos y en la regulación del pH intracelular (Raven y Smith, 1979; Gout y col., 1992).

Otras funciones fisiológicas propuestas para este enzima se han basado en la investigación de los efectos provocados por reguladores del crecimiento como auxinas sobre la capacidad extractora de H^+ por diferentes tejidos vegetales. La teoría del crecimiento ácido propuesta por Hager (1971) en base a la correlación entre la elongación celular y la extrusión de protones tras la activación por auxina del enzima H^+ -ATPasa de la membrana plasmática. Los protones bombeados por este enzima actuarían sobre la pared de polisacáridos que confina a las células permitiendo así la elongación celular. La activación de la H^+ -ATPasa suministraría además la energía para el transporte activo de potasio y azúcares necesario para el crecimiento (Serrano 1993).

G.1.4. Regulación del enzima de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática

En plantas, la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema parece estar regulada por una gran variedad de factores como luz, turgor celular, hormonas, fitotoxinas y agentes bióticos y abióticos, lo cual es probablemente consecuencia de los numerosos papeles de este enzima en la fisiología de la planta. La regulación del enzima H^+ -ATPasa en diferentes tejidos celulares sometidos a una gran variedad de condiciones ambientales es explicable si se tiene en cuenta que este enzima está codificado por una familia de genes, concretamente, mas de 7 genes en tomate (Ewing y Bennett, 1994) y 10 en *Arabidopsis thaliana* (Harper y col., 1994) y que, además, las isoformas del enzima difieren en sus propiedades cinéticas.

La regulación transcripcional de los genes que codifican para H^+ -ATPasa responde a la distribución específica de este enzima en los tejidos. La mayoría de los genes que codifican para H^+ -

ATPasa se expresan, aunque a niveles diferentes, en casi la totalidad de los órganos de las plantas (Haper y col., 1990; Pérez y col., 1992; Moriau y col., 1993; Ewing y Bennett, 1994) con excepción de los genes *AHA9* (Houlne y Boutry, 1994) y *AHA10* (Harper y col., 1994) de *A. thaliana*, que se expresan exclusivamente en anteras y semillas en germinación, respectivamente. Además, la proteína H^+ -ATPasa no está uniformemente distribuida a lo largo de la planta, de forma que su acumulación en algunas células de la planta puede ofrecer información sobre la especialización de estas células en ciertas funciones fisiológicas específicas. En raíces, se ha demostrado mediante técnicas inmunocitoquímicas que la H^+ -ATPasa es abundante en la cofia y la epidermis (incluyendo los pelos radicales) y que está presente en todos los tipos celulares de la estela, especialmente en las células acompañantes del floema (Parets-Soler y col., 1990; Samuels y col., 1992; Stenz y col., 1993).

Estudios de expresión de los genes *AHA1* y *pmal* corroboran la presencia del enzima H^+ -ATPasa en tejidos de floema y epidermis de la raíz, respectivamente, (Dewitt y col., 1991; Michelet y col., 1994). Los resultados descritos tanto por los estudios inmunológicos como por los estudios de expresión, confirman la función fisiológica de la H^+ -ATPasa presente en el epidermis de la raíz en la absorción de nutrientes minerales y de la existente en las células de floema en el transporte y la carga y/o descarga de solutos. Además, la expresión de la H^+ -ATPasa en la cofia de la raíz correlaciona el flujo de H^+ y la hiperpolarización producida durante las respuestas gravitrópicas. En tallo y hojas, experimentos de inmunodetección muestran que la H^+ -ATPasa está presente a altos niveles en estomas y células de floema (Parets-Soler y col., 1990; Villalba y col., 1991), especialmente en células de transferencia (Bouche-Pillon y col., 1994). Los estudios de expresión de los genes de H^+ -ATPasa, *AHA3* y *pmal* confirman y extienden estos resultados mostrando que *AHA3* se expresa en tejidos de floema (Dewitt y col., 1991) y que *pmal* se expresa en los estomas (Michelet y col., 1994).

En los órganos de reproducción, la H^+ -ATPasa ha sido detectada inmunológicamente en las células de los meristemos florales, anteras, parenquima sepal y mesocarpo del ovario (Parets-Soler y col., 1993). Además de expresarse en los tejidos de floema, *AHA3* se expresa en polen y en semillas en germinación (Dewitt y col., 1991) mientras que *pmal* se expresa en tapetum, grano de polen, y tubo polínico, estilo y semillas en desarrollo (Michelet y col., 1994) y *AHA9* se expresa mayoritariamente en los tejidos del tegumento que rodean al embrión (Harper y col., 1994). Todos estos tejidos están implicados en procesos de absorción y secreción de diferentes sustancias, para lo que se requiere una elevada actividad H^+ -ATPasa.

La expresión de los genes que codifican para H^+ -ATPasa está sometida a una continua regulación durante el desarrollo la planta. *AHA3* se expresa únicamente en tejidos de floema pero solo en el estado completamente diferenciado de la planta (Dewitt y col., 1991), mientras que *pmal* también se expresa en el floema pero únicamente en el fruto. Además, las condiciones ambientales

también son determinantes en la expresión de estos genes. Por ejemplo, en condiciones fisiológicas, la expresión del gen *pmal* en los estomas no es siempre detectable en plantas desarrolladas en suelo sin embargo incrementa fuertemente cuando las plántulas se hacen crecer en cultivos hidropónicos o cuando las hojas de plantas crecidas en suelo se sumergen durante algunas horas en solución nutritiva o en agua (Michelet y col., 1994).

Algunos genes que codifican para H^+ -ATPasa pueden regularse por factores ambientales y de desarrollo lo que implica que la expresión de estos genes está sujeta a la puesta en marcha de mecanismos de transducción de señales (Serrano, 1989). Por ejemplo, la salinidad parece inducir cambios rápidos en el metabolismo de los fosfoinosítidos en *Dunaliella* (Einspahr y col., 1988; Einspahr y Thompson, 1990) y en células de zanahoria (Cho y col., 1993) e incrementa la actividad del Ca^{2+} citosólico en protoplastos de raíz de maíz (Lynch y col., 1989). Todo ello sugiere que el NaCl puede afectar la homeostasis del Ca^{2+} citosólico provocando la inducción de las respuestas posteriores de la planta a la salinidad (Rengel 1992; Liu y Zhy, 1997).

La regulación de la H^+ -ATPasa por señales ambientales puede ser transcripcional (inducción de la expresión génica) o bien postraduccional (cambios en la actividad del enzima) (Palmgren, 1991). No obstante, la rapidez de la respuesta enzimática frente a estos estreses sugiere que la regulación es principalmente postraduccional (Serrano, 1989). Sin embargo, la existencia de una familia multigénica, sugiere que las diferentes isoformas pueden expresarse de manera diferencial en determinadas condiciones ambientales (Sussman, 1994; Luo y col., 1999).

También la regulación postranscripcional parece afectar a la expresión de algunos isoenzimas H^+ -ATPasa. En realidad, numerosos genes de H^+ -ATPasa producen RNA mensajero bastante poco frecuentes (Pérez y col., 1992). En el caso de *pmal* de *N. Plumbaginifolia*, se ha demostrado que estas bajas tasas de transcripción influyen en la traducción (Michelet y col., 1994), lo que podría resultar en una rápida modulación de la síntesis de la H^+ -ATPasa por ejemplo en respuesta a señales ambientales.

En relación a la regulación postraduccional se sabe que una de las señales que mas influye la actividad H^+ -ATPasa es la auxina, hormona que incrementa el flujo de membranas desde el retículo endoplasmático a la membrana plasmática, probablemente a través de una aceleración de los procesos de exocitosis. Este efecto de la auxina sobre la actividad H^+ -ATPasa podría explicarse en base a la presencia del enzima en vesículas secretoras y/o una limitación del transporte del enzima al plasmalema por la velocidad de formación de las vesículas. Además de sus efectos en la cantidad de H^+ -ATPasa, la auxina puede también afectar la actividad H^+ -ATPasa. En efecto, la auxina incrementa la diferencia del potencial transmembranario (Barbier-Brygoo y col., 1989) y la actividad bombeadora de protones in vitro en vesículas microsomaes (Santoni y col., 1993).

Finalmente, la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema de plantas puede regularse postraduccionalmente por una modificación del enzima. Se sabe que la H^+ -ATPasa de plantas al igual que la de *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa* presenta una región autoinhibitoria C-terminal (Palmgren y col., 1991). La eliminación de los 12 últimos aminoácidos del extremo C-terminal de la H^+ -ATPasa de plasmalema de *S. cerevisiae*, resulta en un incremento de la V_{max} del enzima y en una tendencia a la neutralidad de los valores de pH óptimo del enzima. Resultados similares se han observado en plantas cuando el extremo carboxilo de la H^+ -ATPasa de plasmalema fue tratado con proteasas como tripsina o quimotripsina (Palmgren y col., 1991) o cuando se eliminaron los últimos 51 aminoácidos del extremo C-terminal (Regenberg y col., 1995). En el enzima de *S. cerevisiae*, la región C-terminal también interviene en la regulación del crecimiento por glucosa provocando un incremento considerable en la actividad del enzima H^+ -ATPasa, posiblemente como resultado de una ruptura de interacciones entre diferentes dominios del enzima tras la fosforilación de uno o, posiblemente, dos residuos de la región C-terminal (Eraso y Portillo, 1994). Esta modulación por defosforilación es posible debido a la existencia de una proteína quínasa dependiente de calmodulina y asociada a la membrana capaz de fosforilar las H^+ -ATPasas de plasmalema de levaduras y plantas (Shimazaki y col., 1992; Sussman, 1994; Lino y col., 1998).

La estimulación de la extrusión H^+ in vivo por fusicocina (Johansson y col., 1993) puede deberse a una acción de esta fitotoxina estabilizando la asociación entre el dominio C-terminal de la H^+ -ATPasa y las proteínas 14-3-3 (Jahn y col., 1997; Oecking y col., 1997) que en células eucariotas actúan como receptores de la fusicocina (Aitken, 1996). Así, parece ser que la fusicocina se une a un sitio creado por un complejo entre el dominio C-terminal de la H^+ -ATPasa de plasmalema y la proteína 14-3-3 lo que da lugar a una activación del enzima (Baunsgaard y col., 1998). Puesto que las proteínas 14-3-3 normalmente se unen únicamente a una secuencia de motivos que incluyen la serina fosforilada (Muslim y col., 1996; Yaffe y col., 1997) es posible que la acción de la fusicocina imita el efecto de la proteína quínasa que media la fosforilación de un residuo serina en el dominio C-terminal del enzima H^+ -ATPasa de plantas (Palmgren y Axelsen, 1998)

La composición de la membrana en fosfolípidos y esteroides así como las propiedades de fluidez que confieren dichos lípidos a esta estructura pueden influenciar la actividad de proteínas de membrana entre ellas la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema (Cooke y Burden, 1990; Palmgren, 1991; Cooke y col., 1994). Es conocido que un entorno fosfolipídico específico es requerido para una actividad ATPasa óptima. Los fosfolípidos ácidos activan las H^+ -ATPasas de membrana plasmática en plantas superiores (Memon y col., 1989) y hongos (Scarborough, 1977). Entre estos fosfolípidos, los poliinositidos representan los únicos fosfolípidos ácidos que pueden metabolizarse de manera rápida y reversible en la membrana plasmática (Memon y col., 1989). Ello, unido a los cambios rápidos que provocan auxina (Ettliger y Lehle, 1988) luz (Memon y Boss, 1990) o NaCl (Shinozaki y

Imaguchi-Shinozaki, 1996; Smolenska-Sym y Kacperska, 1996) en el metabolismo del sfatidilinositol de plasmalema, sugiere que la vía de traducción de señales mediada por sfatidilinositol está implicada en la regulación de la H^+ -ATPasa.

Los lisofosfolípidos, detergentes naturales producidos por la acción de la fosfolipasa A_2 sobre los fosfolípidos, constituyen otros fosfolípidos capaces de activar el enzima H^+ -ATPasa de la membrana plasmática (Palmgren y col., 1988; Palmgren y Sommarin, 1989; Pedchenko y col., 1990). De hecho, el enzima fosfolipasa que genera lisofosfatidilcolina a partir de la fosfatidilcolina ha sido encontrada en membrana plasmática (Palmgren y col., 1988), donde parece regularse por auxina (Scherer y André, 1989). El efecto estimulador de los lisofosfolípidos no es sólo debido a las propiedades de estas moléculas como detergente, puesto que (a) los lisofosfolípidos estimulan la velocidad de hidrólisis de ATP por H^+ -ATPasa en poblaciones de vesículas de membrana plasmática inside-out, es decir, sin sitios de unión de ATP latentes (Palmgren y col., 1990b), y (b) a concentraciones micromolares, los lisofosfolípidos estimulan el bombeo de protones en vesículas de membrana plasmática de raíces de avena sin afectar la permeabilidad pasiva de la membrana a los H^+ (Palmgren y Sommarin, 1989). El efecto de los lisofosfolípidos sobre la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática puede ser también directo. A este respecto, la unión de lisofosfolípidos al enzima H^+ -ATPasa podría causar un cambio conformacional que conllevaría el desplazamiento del dominio autoinhibitorio. Alternativamente, el efecto estimulador de los lisofosfolípidos sobre la actividad H^+ -ATPasa podría ser mediado por una proteína quinasa estimulable por lisofosfolípidos (Oishi y col., 1988; Martiny-Baron y Scherer, 1989). Sin embargo, puesto que los lisofosfolípidos son detergentes (Sawyer y Andersen, 1990), se debe tener en cuenta que el efecto anteriormente descrito puede deberse a que estas moléculas faciliten una mayor accesibilidad de la proteína quinasa a los sitios de fosforilación latentes.

La composición en esteroides del plasmalema de plantas influye en la actividad H^+ -ATPasa en esta membrana (Cooke y col., 1993, 1994) aunque debido a la complejidad del metabolismo de estas moléculas, la regulación por esteroides de la actividad de la H^+ -ATPasa de plasmalema probablemente no es parte de la respuesta rápida de regulación de este enzima (Hartmann y Benveniste, 1987).

G.1.5. Efecto de la salinidad sobre el enzima H^+ -ATPasa de plasmalema

A pesar de los progresos recientes en el análisis de la relación estructura-función del enzima H^+ -ATPasa de membrana plasmática, no se han establecido todavía los mecanismos mediante los cuales el NaCl puede afectar a la expresión y a la regulación de esta bomba primaria de protones (Rausch y col., 1996).

Los estudios llevados a cabo en este sentido muestran una gran controversia. Así, el estrés salino no afecta la actividad, el contenido o la expresión del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema en raíces de girasol (Roldán y col., 1991) ni la actividad y contenido del enzima en células de *Pisum sativum* (Olmos y Hellin, 1997), mientras que inhibe la H^+ -ATPasa en raíces de tomate y girasol (Gronwald y col., 1990; Ballesteros y col., 1998) e incrementa la actividad H^+ -ATPasa de la membrana plasmática en halofitas como *Atriplex nummularia* (Braun y col., 1986) y *Salicornia bigelovii* Torr. (Ayala y col., 1996).

La actividad extractora de H^+ asociada al enzima H^+ -ATPasa de la membrana plasmática incrementa en respuesta al tratamiento por NaCl en células de tabaco y raíces de *A. nummularia* (Braun y col., 1986; Watad y col., 1991). Esta regulación puede ser mediada, al menos en parte, por una mayor expresión del gen (Niu y col., 1993a, 1993b; Perez-Prat y col., 1994), tal como indica el incremento en los niveles de mRNA de H^+ -ATPasa de plasmalema de células de tabaco y *Atriplex nummularia* tratadas con NaCl (Niu y col., 1993a). La acumulación de mRNA de H^+ -ATPasa sólo ocurre durante la adaptación al NaCl de forma que una vez que se alcanza la adaptación se detectan niveles de mRNA similares en las células crecidas en ausencia de sal y en las adaptadas a la sal (Niu y col., 1993b; Perez-Prat y col., 1994). El efecto del NaCl incrementando la expresión del gen y la actividad H^+ -ATPasa de membrana plasmática se han correlacionado positivamente con la tolerancia a la sal. En este sentido, las plantas halofitas exhiben mayores niveles de transcripción y/o actividad H^+ -ATPasa que las plantas no-tolerantes (Braun y col., 1986; Niu y col., 1993a, 1993b, Perez-Prat y col., 1994) y existen plantas glicófitas como tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill. cv. Large Cherry red.) en que la exposición al NaCl induce una acumulación de mRNA de H^+ -ATPasa en raíces y hojas en respuesta al NaCl (Binzel, 1995).

Desafortunadamente, los estudios de extrusión de protones *in vivo* en paralelo con determinaciones de la hidrólisis de ATP *in vitro* en el mismo sistema experimental son relativamente escasos. En relación con esto, la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema, ensayada *in vivo* como eflujo de protones, parece incrementar durante la adaptación osmótica de cultivos celulares de zanahoria (Reuveni y col., 1987) y tabaco (Watad y col., 1986).

G.2. H^+ -ATPasa de tonoplasto

La H^+ -ATPasa de tonoplasto pertenece la familia de V-ATPasas que reagrupa gran parte de las ATPasas de membranas de orgánulos de células eucariotas incluyendo lisosomas, endosomas y Aparato de Golgi (Nelson, 1992). La V-ATPasa posee una estructura de cabeza y pedúnculo (Getz y Klein, 1995). Las diferentes subunidades del enzima se organizan en un complejo integral embebido

en la membrana y que forma el canal de H^+ (Vo), y un complejo periférico (V1) (Gogarten y Taiz, 1992). El Complejo Vo está compuesto por 4 subunidades: una de ellas es un proteolípido de 16 KDa y las otras tres son subunidades de 32, 13 y 12 KDa. El complejo V1 está compuesto por 6 subunidades de 70, 60, 44, 42, 36 y 29 KDa. La composición en subunidades difiere según la especie vegetal (Sze y col., 1992; Lüttge y col., 1995). Mediante técnicas de filtración en gel se ha determinado que el tamaño funcional de la H^+ -ATPasa de tonoplasto se encuentra entre 200-600 KDa, por lo que una o más de las subunidades mencionadas deben encontrarse en más de una copia en cada molécula funcional (Randall y Sze, 1986; Rea y Sanders, 1987). El polipeptido de 70 KDa es el centro catalítico del enzima (Bowman y col., 1986; Randall y Sze, 1986; Narasimhan y col., 1991; Low y col., 1994), mientras que el de 60 KDa presenta una doble función catalítica y reguladora (Manolson y col., 1985; Low y col., 1994). La subunidad de 16 KDa está incluida en la bicapa lipídica caracterizándose por su alta hidrofobicidad que permite constituir el canal de transporte de H^+ (Low y col., 1994). En contraposición con ello, las subunidades de 70 y de 60 KDa están situadas en la periferia de la membrana, pudiendo ser separadas de la misma mediante agentes caotrópicos (Rea y Sanders, 1987).

Se ha propuesto que el funcionamiento de la H^+ -ATPasa vacuolar implica una organización en dos dominios funcionales (Tu y col., 1990; Tu y col., 1987). El centro catalítico (dominio I) intervendría en la hidrólisis de Mg-ATP y transmitiría la energía liberada en esa hidrólisis al centro transportador de H^+ (dominio II), lo que implicaría cambios conformacionales inducidos en el dominio II que harían posible el transporte vectorial de H^+ en el tonoplasto.

La insensibilidad al vanadato (Sze, 1985) demuestra que este tipo de ATPasa, a diferencia de la ATPasa de plasmalema, no forma un intermediario fosforilado durante la catálisis. Por otra parte, azida y oligomicina, inhibidores de las F-ATPasas (presentes en la membrana de eubacterias y en la membrana interna de mitocondrias y cloroplastos), no tienen ningún efecto sobre este enzima.

El NO_3^- y DIDS son inhibidores relativamente específicos de este tipo de H^+ -ATPasa: el NO_3^- actúa como inhibidor tanto de la formación del gradiente de pH como la actividad hidrolítica de la H^+ -ATPasa (Sze 1985); mientras que el DIDS actúa mediante interacciones con los lugares específicos de unión para el anión (Churchill y Sze, 1984; Wang y Sze, 1985; Brauer y col., 1997). La H^+ -ATPasa de tonoplasto también es inhibida por DCCD, potente inhibidor de todos los tipos de H^+ -ATPasas a nivel de sus respectivos canales de H^+ , por lo que en este caso se presume su unión al polipeptido de 16 KDa (Randall y Sze, 1986; Wang y Sze, 1985). Finalmente, El inhibidor más específico de la H^+ -ATPasa vacuolar conocido hasta hoy es la Bafilomicina, un antibiótico que inhibe la ATPasa de tonoplasto en un rango nanomolar (Bowman y col., 1988)

La H⁺-ATPasa vacuolar es insensible a los cationes y sensible a los aniones, que la estimulan según la secuencia siguiente: Cl⁻, Br⁻ < I⁻ < HCO₃⁻ < SO₄²⁻ (Sze, 1985). El Cl⁻ es el anión más efectivo en la estimulación de la ATPasa debido a que, al ser un anión permeante, disipa el potencial de membrana y estimula la formación del gradiente de pH.

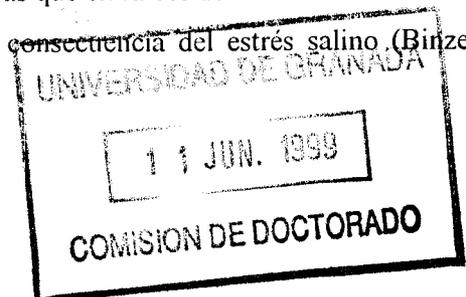
La H⁺-ATPasa de tonoplasto presenta una K_m para el ATP entre 0.1 y 0.2 mM (Churchill y Sze, 1983; O'Neil y col., 1983), muestra una estequiometría de 2 H⁺ transportados por ATP hidrolizado y un pH óptimo comprendido entre 7.5 y 8.5.

El papel fisiológico de la H⁺-ATPasa de tonoplasto es, fundamentalmente, la acumulación de iones y metabolitos en el compartimento vacuolar, proceso que se lleva a cabo aprovechando el gradiente de H⁺ creado por la actuación de este enzima. De hecho, los iones y metabolitos no son simplemente depositados en la vacuola, sino que más bien están sometidos a un intercambio continuo con los componentes citoplasmáticos. Esta función homeostática se pone de manifiesto en la regulación del pH citoplasmático, ajuste osmótico, acumulación y movilización de ácidos orgánicos y control de las concentraciones de iones Ca²⁺ y PO₄³⁻ en el citoplasma (Boller y Wiemken, 1986).

El efecto de la salinidad sobre el enzima H⁺-ATPasa de tonoplasto ha sido estudiado en numerosas plantas. La actividad de este enzima se incrementa en *Mesembryanthemum crystallinum* expuesto al NaCl (Bremberger y Lüttge, 1992; Ratajczak y col., 1994) y raíces de Cebada (Matsumoto y Chung, 1988), tomate (Sanche-aguayo y col., 1991) y *Vigna radiata* (Nakamura y col., 1992), así como en células de tabaco adaptadas al NaCl (Reuveni y col., 1990) mientras que la actividad H⁺-ATPasa de tonoplasto de células de zanahoria no se afecta por la sal (Colombo y Cerana, 1993). En algunos casos, el cultivo de las plantas en presencia de NaCl incrementa el transporte de H⁺ dependiente de ATP a nivel de tonoplasto sin embargo estos incrementos no se acompañan de cambios en la actividad fosfohidrolítica del enzima H⁺-ATPasa de tonoplasto (Dupont, 1992; Ballesteros y col., 1996). El NaCl incrementa los niveles de mRNA de la subunidad catalítica 70 KDa de la H⁺-ATPasa de tonoplasto en células de tabaco (Narasimhan, 1991) y en hojas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill. cv. Large Cherry red.) (Binzel, 1995) mientras que en raíces de tomate los niveles de mRNA de la subunidad de 70 KDa no se modifican como consecuencia del estrés salino (Binzel, 1995).

G.3. H⁺-Pirofosfatasa de tonoplasto

La H⁺-PPasa es capaz de utilizar la energía producida por la hidrólisis de PPI para el transporte



electrogénico de H^+ hacia el interior vacuolar (Rea y Poole, 1993). Las primeras evidencias de esta actividad enzimática datan de 1975, cuando Karlsson (1975) detectó una actividad PPasa estimulable por K^+ en membranas microsomales de raíces y cotiledones de remolacha azucarera. Posteriormente, Walker y Leigh (Walker y Leigh, 1981a, b) y Wagner y Mulready (1983), demostraron la asociación de esta PPasa con el tonoplasto en raíces de remolacha y pétalos de tulipán, respectivamente. Numerosos trabajos posteriores determinaron que las características de este enzima eran completamente distintas a las de la H^+ -ATPasa, sobre todo en cuanto a la respuesta a efectores e inhibidores.

El enzima H^+ -PPasa ha sido identificado en diferentes tejidos vegetales, en los que se localiza, además de en vacuola, en diversos sistemas endomembranarios como retículo endoplasmático y Aparato de Golgi (Chanson y Pilet, 1988; Vicente y Vale, 1991; Oberbeck y col., 1994). En todos los casos el enzima está constituido por un solo tipo de polipéptido de aproximadamente 80 KDa (Chanson y Pilet, 1989; Rea y col., 1992). La existencia de 2 isoformas de H^+ -PPasa en *Beta vulgaris* (Kim y col., 1994b) sugiere la posibilidad de que el enzima esté codificado por una familia multigénica si bien en *Arabidopsis thaliana* (Sarafian y col., 1992) y cebada (Tanaka y col., 1993) existen evidencias de un único gen que codifica para este enzima.

La estimulación de la H^+ -PPasa por K^+ (Karlsson, 1975; Wagner y Mulready 1983; Walker y Leigh, 1981) puede deberse a que la unión del catión al enzima cause un cambio conformacional en la forma inactiva dando lugar a la forma activa (Wang y col., 1986). Davies y col., (1992) y Leigh y col., (1994) sugieren que la H^+ -PPasa podría catalizar el K^+/H^+ cotransporte hacia la vacuola. La actividad H^+ -PPasa es también dependiente de Mg^{2+} que ha sido propuesto como un activador del enzima (Johannes y Felle, 1989; Marquardt y Lüttge, 1987; Walker y Leigh, 1981; Wang y col., 1986), no sustituible por otro catión divalente (Chanson y Pilet, 1988). Además del K^+ y Mg^{2+} , el enzima es estimulado por otros cationes (Marquardt y Lüttge, 1987; Rea y Pool, 1985; Walker y Leigh, 1981; Wang y col., 1986) e inhibida por Na^+ y Li^+ , que probablemente compiten con K^+ por el lugar de activación. Por otra parte, los aniones tienen poco efecto en esta actividad enzimática (Johannes y Felle, 1990; Wang y col., 1986).

La actividad H^+ -PPasa presenta una cinética típicamente hiperbólica respecto a la concentración de PPi con una K_m aparente para el PPi de 5-30 μM con una estequiometría de 2 H^+ transportados por PPi hidrolizado (Chanson y Pilet, 1988; Johannes y Felle, 1990; Marquardt y Lüttge, 1987; Pope y Leigh, 1987; Rea y Poole, 1985; Wang y col., 1986; White y col., 1990).

El pH óptimo de funcionamiento de este enzima en membranas microsomales de raíces de maíz (Chanson y Pilet, 1988) es de 7.0 a 8.0, si bien en *Kalanchoe* el pH óptimo oscila entre 8.0 y 9.0 (Marquardt y Lüttge, 1987), y en ápices de guisante se sitúa aproximadamente en 6.5 (Macri y Vianelo, 1987)

En cuanto al efecto de los inhibidores (Chanson y Pilat, 1988) vanadato, oligomicina y molibdato no inducen cambios en la actividad PPasa mientras que DIDS y DCCD inhiben en mayor o menor medida, en dependencia del tejido. Así, en células de *Nitella* y vesículas de tonoplasto de raíces de avena, la H⁺-PPasa presenta baja sensibilidad al DCCD mientras que en vesículas de tonoplasto procedentes de raíces de maíz y coleoptilos de maíz y guisante existe mayor sensibilidad del enzima a este inhibidor. Además fluoruro e imidodifosfato son potentes inhibidores de la H⁺-PPasa (Wang y col., 1986; Chanson y Pilat, 1988; Pugliarello y col., 1991; Hoffma-Thoma y Willenbrick, 1993; Zhen y col., 1994).

El enzima H⁺-PPasa es más activa, o más abundante, en el ápice de la raíz que en el resto de los tejidos radiculares (Chanson y Pilet, 1987), sugiriendo esto un posible papel de este enzima en la regulación de los procesos de crecimiento de la planta (Palmgren y Sommarin, 1989; Pilet, 1982). Según White y col. (1990), aunque este enzima puede actuar conjuntamente con la H⁺-ATPasa de tonoplasto, la actividad H⁺-PPasa sería implicada en mantener la fuerza protón-motriz a través del tonoplasto cuando la actividad H⁺-ATPasa en esta membrana este disminuida por la baja disponibilidad de ATP.

En cuanto al efecto de la sal sobre el enzima pirofosfatasa de tonoplasto, el NaCl induce un incremento de la actividad H⁺-PPasa en vesículas de tonoplasto de raíces de girasol (Ballesteros y col., 1996) y en microsomas de células de *Acer pseudoplatanus* y de *Daucus carota* adaptadas al NaCl (Zingarelli y col., 1994; Colombo y Cercana, 1993), mientras que provoca una inhibición de esta actividad en vesículas de tonoplasto de raíces de *Vigna radiata* (Nakamura y col., 1992).

H. Procesos de transporte secundarios

La existencia de altas concentraciones de NaCl en el medio que rodea la célula vegetal, determina el establecimiento de un gradiente electroquímico de Na⁺ entre el interior y exterior celular que conlleva la entrada de este catión en la célula vegetal. Pero además, la existencia de Na⁺ en el medio externo interfiere con los procesos de absorción de K⁺ (Niu y col., 1995). En plantas, las raíces utilizan dos sistemas para la absorción de K⁺: uno de alta afinidad con K_m para el K⁺ de 10-30 μM, que permite la asimilación de K⁺ a bajas concentraciones del catión y no se inhibe por Na⁺ (Rains y Epstein, 1967), y otro de baja afinidad implicado en la absorción del catión a altas concentraciones externas (rango mM) (Smart y col., 1996). El sistema de alta afinidad es un transportador activo, posiblemente un simporte K⁺/H⁺ (Schachtman y Schroeder, 1994) que se induce por bajas concentraciones de K⁺ y se inhibe por elevadas concentraciones de este catión (Fernando y col, 1992), mientras que el sistema de baja afinidad es un canal de K⁺ (Maathuis y Sanders, 1993).

La entrada de sodio a la planta se produce probablemente a través del sistema de asimilación de K^+ de baja afinidad (Rains y Epstein, 1967). Sin embargo, canales de K^+ clonados, probablemente de baja afinidad al K^+ , son muy selectivos frente al Na^+ (Schachtman y Schroeder, 1994). Así, es posible que existen otros canales de K^+ que son menos selectivos entre el K^+ y Na^+ . Recientemente, Rubio y col., (1995) y Ding y Zhu (1997) indicaron que el transportador de K^+ de alta afinidad contribuye probablemente en la entrada de Na^+ al interior celular y que funciona como un simporte K^+-Na^+ . Schachtman y col (1991) han sugerido que la asimilación de Na^+ puede producirse a través de canales de cationes. En este sentido, la exposición a altas concentraciones externas de NaCl incrementa la probabilidad de apertura de canales de cationes en raíces de trigo y células de tabaco, permitiendo así el influjo de Na^+ (Gassmann y Shroeder, 1994; Tyerman y col., 1997). La regulación de cualquier proceso que reduzca la probabilidad de apertura de dichos canales de cationes afectaría tanto a la entrada de sodio como a la pérdida de K^+ hacia el exterior celular, lo que posiblemente representaría un mecanismo de adaptación al estrés por NaCl (Amtmann y col., 1997; Robert y Tester, 1997; Davenport y col., 1997).

Los flujos de Na^+ a través de las membranas celulares, se producen no solo a través de los sistemas de absorción de K^+ , sino que además existen sistemas para el transporte activo de Na^+ a través las membranas plasmática y vacuolar, los cuales son esenciales en la regulación de la absorción y la compartimentación vacuolar de Na^+ . Estudios fisiológicos y bioquímicos avalan la existencia en el plasmalema y el tonoplasto de sistemas de antiporte Na^+/H^+ inducibles por NaCl (Dupont, 1992, Kiegle y Bisson, 1996; Rauch y col., 1996; Ballesteros y col., 1997). La inducción de la actividad antiporte Na^+/H^+ en membrana plasmática ocurre en plantas halofitas en respuesta al incremento en la concentración de NaCl en el medio externo (Katz y col, 1992; Hassidim y col, 1990) aunque existen evidencias de existencia de un actividad antiporte Na^+/H^+ en membrana plasmática en raíces de tomate (Wilson y Shanon, 1995) y trigo (Allen y col., 1995), mientras que en plantas glicófitas es el antiporte Na^+/H^+ de tonoplasto el que se induce por NaCl (Dupont, 1992; Ballesteros y col., 1997; Rauch y col., 1996), permitiendo con ello la regulación de los niveles citosólicos de Na^+ y el ajuste osmótico requerido para el mantenimiento de la turgencia celular.

El conocimiento de los procesos de absorción y compartimentación intracelular de Cl^- es relativamente escaso (Binzel y col, 1988). La diferencia de potencial que se establece a través de la membrana plasmática cuando se alcanza y mantiene la homeostasia iónica constituye una barrera termodinámica para el influjo de Cl^- , incluso a concentraciones externas relativamente altas. Cuando la entrada de Na^+ depolariza el potencial de membrana, el Cl^- puede ser asimilado pasivamente a través de un canal anionico (Skerrett y Tyerman, 1994). Seguidamente, los movimientos de Cl^- desde el citoplasma hacia la vacuola se llevarían a cabo a través de canales (Plant y col, 1994) o de un antiporte $H^+/anión$ (Rea y Sanders, 1987) que transportarían activamente el Cl^- a través del tonoplasto.

El papel del Ca^{2+} en la protección frente al estrés por NaCl es muy complejo y todavía no está muy bien definido aunque la homeostasia del Ca^{2+} es clave en la adaptación a la salinidad. De forma general, el aporte externo de Ca^{2+} disminuye los efectos negativos del NaCl y preserva la selectividad K^+/Na^+ (Zhong y Läuchli, 1994), favoreciendo el transporte de K^+ (Läuchli, 1990) y reduciendo el influjo de Na^+ a través del sistema de absorción de K^+ de baja afinidad (Schroeder y col, 1994). Además de paliar los efectos negativos de la salinidad, el calcio interviene en los procesos de transducción de señales (Bush, 1995), entre ellas, la señal de estrés salino (Lynch y col, 1989). En este sentido se ha comprobado que los niveles citosólicos de Ca^{2+} , habitualmente en el rango μM , pueden experimentar pequeños incrementos en condiciones de estrés. Los incrementos inducidos por el estrés en los niveles de Ca^{2+} citoplasmático deben ser transitorios, ya que el restablecimiento de la homeostasia del Ca^{2+} citosólico es un requisito para la adaptación de la célula al estrés. Estas variaciones en la concentración de Ca^{2+} citosólico libre, afectan la actividad de proteínas dependientes de Ca^{2+} y Ca^{2+} -calmodulina, entre ellas, quinasas implicadas en la activación-inactivación de numerosos sistemas enzimáticos. En relación con ello, en mutantes de *Arabidopsis* se ha demostrado que el producto del gen *SOS3* es crucial en la vía mediante la cual el calcio ejerce su papel protector durante el estrés salino (Liu y Zhu, 1997). El análisis de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen *SOS3* muestra una gran analogía entre el producto de este gen y las proteínas que unen calcio, concretamente, calcineurina de levadura y proteínas sensoras de Ca^{2+} en neuronas que actuarían estimulando fosfatasas o inhibiendo quinasas.

El incremento del contenido en Ca^{2+} citoplasmático puede ocurrir mediante un influjo desde el apoplasto, a través de canales (Cosgrove y Hedrich, 1991) o bien mediante eflujo desde el tonoplasto y otros orgánulos a través de canales regulados por inositol (1,4,5)-trifosfato (Alexander y col, 1990) en respuesta a la activación de proteínas G. Otros enzimas de transporte que regulan la concentración de Ca^{2+} citoplasmático son la Ca^{2+} -ATPasa en la membrana plasmática y endomembranas (Bush, 1995; Ferrol y Bennet, 1996) y el antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ de tonoplasto (Bush, 1995).

I. Regulación del pH citoplasmático.

El pH regula la actividad de enzimas claves en los procesos metabólicos celulares. En plantas, el pH citoplasmático se mantiene alrededor de 7.5, el vacuolar en torno a 5.0 y el cloroplastidico alcanza valores próximos a 4.0 en los tilacoides y cercanos a 8.0 en el estroma (Raven, 1985; Kurkdjian y Guern, 1989).

Las plantas se enfrentan a perturbaciones del pH citoplasmático asociadas al metabolismo, al transporte de solutos, y a la respuesta a diversos factores ambientales (anaerobiosis, transiciones luz-

oscuridad, temperatura y pH externo). En cuanto al efecto del estrés salino sobre el pH citoplasmático, en suspensiones celulares de variedades silvestres y tolerantes al NaCl del género *Citrus*, se ha observado que el estrés salino no afecta al pH del citoplasma celular (Ben Hayyim y Navon, 1985), mientras que en células de *Dunaliella* la salinidad provoca una alcalinización del citoplasma (Kuchitsu y col., 1989) y en células de *Nitellopsis obtusa* provoca una acidificación del mismo (Katsuhara y col., 1989, 1997). A pesar de que el pH citoplasmático puede afectarse por múltiples factores éste se mantiene próximo a la neutralidad y sólo presenta pequeñas variaciones en circunstancias fisiológicas especiales. En la regulación del pH citoplasmático intervienen las enzimas del sistema pH-Stat bioquímico y los mecanismos de regulación del flujo de H^+ a través de las membranas celulares (enzimas H^+ -ATPasa, H^+ -PPasa y sistemas que transportan H^+ con otros iones y solutos) (Kurkdjian y Guern, 1989; Romani y col., 1998; Sakano y col., 1992, 1998).

Papel de la H^+ -ATPasa de plasmalema. La ATPasa bombeadora de H^+ localizada en el plasmalema de las células vegetales juega un papel importante en la regulación del pH citoplasmático ya que representa el sistema más eficiente en el bombeo de protones hacia el medio exterior (Marré y Ballarin-Denti, 1985; Serrano, 1984; Sze, 1984; Beffagna y Romani, 1991; 1994). La H^+ -ATPasa presenta un pH óptimo de 6.6 bastante menor que el pH fisiológico del citoplasma celular, generalmente, alrededor de 7.2-7.5. Así, cuando los protones empiezan a acumularse en el citoplasma, la actividad del enzima H^+ -ATPasa incrementa, resultando en la expulsión del exceso de protones de la célula. En efecto, la hiperpolarización del plasmalema inducida por una carga ácida en el citoplasma estimula la acción del enzima H^+ -ATPasa (Bates y Goldsmith, 1983; Bertl y Felle, 1985; Frachisse y col., 1988; Marré y col., 1983); mientras que la depolarización provocada por una alcalinización del citoplasma inhibe el enzima H^+ -ATPasa (Felle y Bertl, 1986; Kobayashi y col., 1982). Así, este enzima además de contribuir a la regulación del pH citoplasmático es también un sensor de la concentración de protones en el citoplasma.

El hecho de que cambios en el valor de pH citoplasmático regulen la respuesta a numerosos factores externos confiere al enzima H^+ -ATPasa de plasmalema un importante papel en los procesos de transducción de señales ya que, como se ha indicado, este enzima constituye el principal mecanismo de extrusión de H^+ por parte de la célula vegetal (Blatt y Armstrong, 1993; Kurkdjian y Guern, 1989).

Producción y consumo de ácidos orgánicos. El sistema "pH stat bioquímico", es un mecanismo de control de pH citoplasmático a través de la producción y consumo de ácidos orgánicos (Smith y Raven, 1979; Davis, 1986). Numerosas evidencias experimentales apoyan la importancia del balance entre producción y consumo de malato en la regulación del pH citoplasmático en plantas (Edwards y

col., 1998; Robert y col., 1992).

Cuando las células vegetales se someten a tratamientos que alcalinizan el citoplasma se estimula la síntesis de malato de forma que se incrementa su contenido en las células (Hiatt, 1967; Marré, 1979; Beffagna y Romani, 1994). Sin embargo, la relación que puede existir *in vivo* entre estimulación de la síntesis de malato y alcalinización intracelular no está cuantitativamente caracterizada. Por el contrario, se dispone de algunas informaciones sobre la relación entre la acidificación del citosol y la síntesis de malato. Así, cuando el citoplasma de las células de *Acer pseudoplatanus* se acidifica, la incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ en malato disminuye considerablemente mientras que su consumo incrementa permitiendo así la neutralización de más del 55 % de los H^+ totales generados lo que conlleva a la recuperación parcial de la caída inicial del pH citoplasmático (Mathieu y col., 1986). De Boer (1997) ha indicado que la acidificación del citoplasma observada tras la adición de fusicocina al medio de incubación de células de *Lycopersicon peruvianum* es probablemente debida a la estimulación de la síntesis de malato.

En plantas superiores, la absorción de cationes inorgánicos puede exceder la absorción de aniones siendo este exceso de cationes equilibrado mediante síntesis de ácidos orgánicos en el citoplasma (Ulrich, 1941). El malato representa el ácido orgánico mayoritariamente producido por la célula cuando ésta absorbe un exceso de cationes (Osmond, 1976). En este sentido, la salinidad induce la acumulación de malato en numerosas especies vegetales especialmente en las plantas capaces de cambiar su estatus metabólico pasando del metabolismo C_3 al CAM cuando crecen en medios salinos (Whittington y Smith, 1992; Brulfert y col., 1986; Mathieu y col., 1986).

La producción de malato a partir de azúcares neutros libera 2 H^+ por molécula de malato (Whittington y Smith, 1992) y su biosíntesis en el citoplasma celular involucra la acción del enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa y malato deshidrogenasa (Lüttge, 1993) (Figura 4.). Este enzima está presente en bacterias, algas y plantas superiores y juega un papel fundamental en la fotosíntesis, en el reciclaje de los metabolitos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en la regeneración de NADPH y en la captación del CO_2 procedente de la respiración (Andreo y col., 1987; Cushman y col., 1989; Jiao y Chollet, 1991).

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31), enzima citosólica que cataliza la β -carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato a oxaloacetato en presencia de HCO_3^- y Mg^{2+} , se activa fuertemente *in vitro* a valores de pH situados en el rango 6.8-8.0 lo que indica que además de un papel fundamental en la fijación del CO_2 atmosférico, esta enzima puede contribuir a la regulación del pH citoplasmático (Kurkdjian y Guern, 1989; Leegood y Osmond, 1990; Lepiniec y col., 1994; Outlaw, 1990; Chollet, 1996). Sin embargo, se desconoce en que medida la actividad PEPC es sensible a pequeños cambios de pH y cuál es su eficiencia contrarrestando las alcalinizaciones citosólicas.

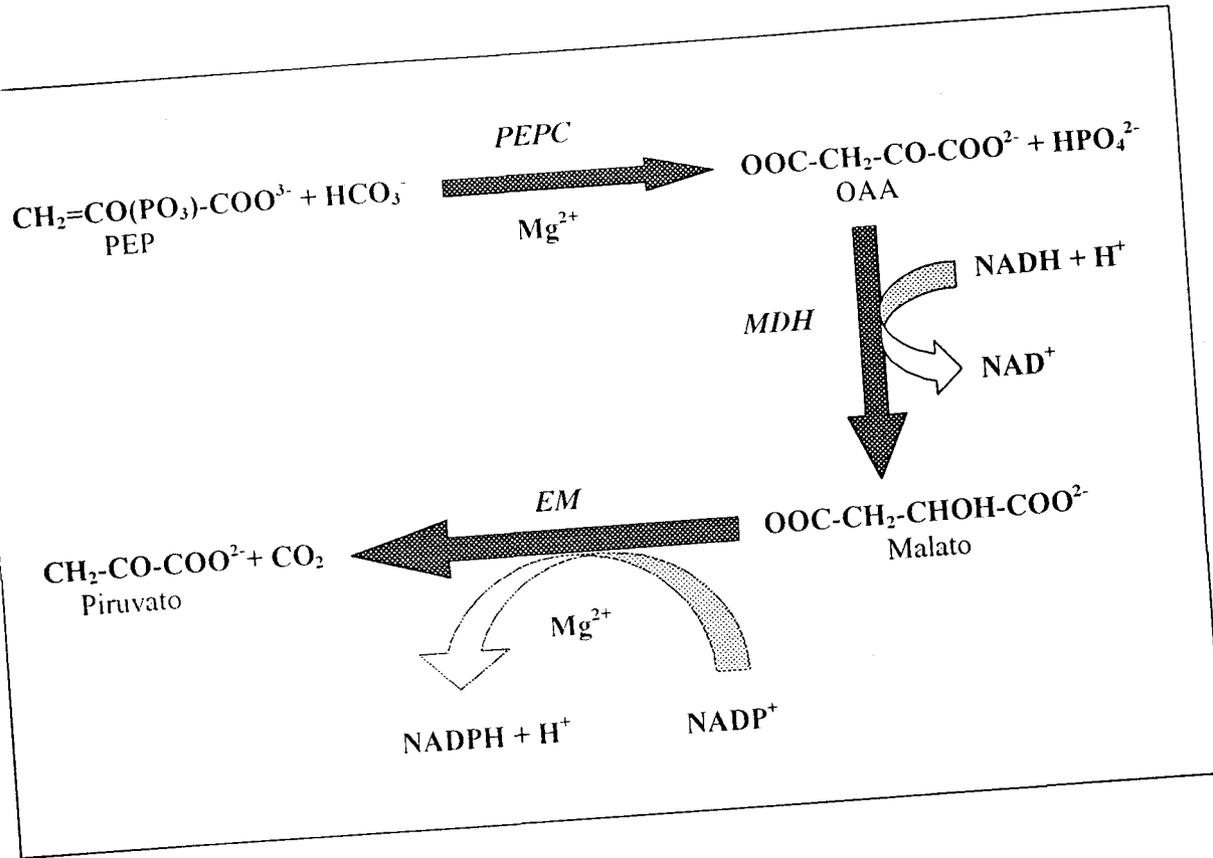


Figura 5. Reacciones de síntesis y consumo de malato catalizadas en el citoplasma por los enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH) y NADP enzima málico (EM). PEP, Fosfoenolpiruvato. OAA, Oxalacetato.

El consumo de malato en el citoplasma celular implica al NADP enzima málico (NADP Oxalacetato-decarboxilasa, EC 1.1.1.40). Este enzima es una malato deshidrogenasa citoplasmática que además decarboxila el ácido málico, dando lugar a la formación de piruvato, CO₂ y NADPH. La reacción requiere un catión divalente (Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺), estando su rango de pH óptimo entre 8.0 y 8.4 (Ochoa, 1955). La actividad del NADP-enzima málico juega importante papel en el metabolismo de plantas CAM y C₄, ya que permite la formación de una reserva de esqueletos carbonados que pueden ser utilizados en la producción de energía en condiciones de estrés, reduciendo así la dependencia de la glicolisis para la producción de energía. En las plantas CAM, el enzima málico posibilita la existencia de un mecanismo de defensa frente a estreses ambientales y así permite la adaptación a dichos estreses. In vitro, la actividad del enzima málico se afecta fuertemente por el pH, incrementando cuando el pH del medio de reacción se sitúa entre 7.6 y 6.5 (Davies y Patil, 1974; Wedding y Black, 1983). También en vivo, el enzima málico es muy sensible a pequeños cambios de pH de forma que valores de pH citoplasmáticos superiores a 7.0 disminuyen claramente la actividad de este enzima (Willeford y Wedding, 1987; Robert y col., 1992; Edwards y col., 1998).

El efecto de la salinidad sobre los enzimas PEPC y NADP-enzima málico se ha estudiado principalmente en las plantas CAM (Cushman, 1990; Thomas y col., 1992; Lüttge, 1993; Yen y col., 1997). En estas plantas se ha observado que el NaCl induce la activación transcripcional de *ppc1*, miembro de la familia de genes de PEPC específico del CAM, lo que conlleva un incremento del mRNA y actividad del enzima PEPC (Cushman y Bonhert., 1996; Thomas y col., 1992; Li y Chollet, 1994). Además en especies de *Chusca*, la inducción del metabolismo CAM parece estar directamente asociada al incremento en la actividad y/o cantidad del enzima PEPC en respuesta a la sequía (Borland y col., 1998) y en *Mesembryanthemum crystallinum* L., la inducción del metabolismo CAM como respuesta adaptativa a altas concentraciones de NaCl, va acompañada de un incremento de las actividades PEPC y NADP-enzima málico (Holtum y Winter, 1982). La activación de dichos enzimas se observa también en respuesta al estrés salino en tallos de dos genotipos de *Pennisetum* (*P. Typhoides* cv. Droô Zarzis y *P. Mollissimum*) tolerantes al NaCl (Bouraima y col., 1987).

J. Composición lipídica y propiedades de las membranas celulares

Las membranas celulares son estructuras lipoprotéicas en las cuales las moléculas lipídicas representan del 20 a 80 % de la masa de la membrana, en la que forman una bicapa que constituye una barrera semipermeable. En el modelo de membrana en *Mosaico fluido* propuesto por Singer y Nicolson (1972), se maximizan las interacciones entre los diferentes componentes de la membrana, lográndose estados de baja energía libre y consiguiéndose, de esta forma, un equilibrio dinámico

favorecedor de los movimientos de moléculas en el plano de la bicapa. Este modelo no sólo continúa siendo válido hoy en día, sino que la estructura en mosaico fluido de la membrana es la que mejor describe la funcionalidad de los sistemas implicados en la transducción energética y de señales en las células. Así mismo, la bicapa lipídica representa una matriz fluida y una barrera impermeable a los iones que muestra grandes diferencias en el contenido y calidad de sus componentes (variación de la cabeza polar, carga, longitud e insaturación de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, abundancia de esteroides), lo que justifica funciones específicas para cada tipo de membrana.

En plantas, las moléculas fosfolipídicas son los constituyentes lipídicos mayoritarios de las membranas celulares, predominando entre ellas la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. El ácido fosfatídico constituye el precursor de todos los fosfolípidos que integran las membranas, aunque diferentes trabajos sugieren que este fosfolípido podría ser un constituyente natural de las membranas celulares (Mansour, 1994). Los fosfolípidos juegan múltiples papeles en los procesos celulares. Su función primaria es definir la permeabilidad de las membranas celulares y formar la matriz que envuelve las proteínas membranaarias implicadas en importantes funciones celulares como transducción de energía, transducción de señales, transporte de solutos, replicación del DNA...etc. Los fosfolípidos no juegan un papel directo en estos procesos pero es un participante activo que influye en las propiedades de las proteínas asociadas a la membrana (Kasamo y Yamanishi, 1991; Merillon, 1993) y sirven como precursores de importantes componentes celulares (Dowhan, 1997).

En cuanto a los esteroides, el sitosterol, estigmasterol y campesterol constituyen los esteroides más abundantes en plantas, mientras que el colesterol es un componente minoritario (Hartmann y Benveniste, 1987). Los esteroides tienen una función estructural en las membranas celulares de las plantas, análoga a la que ejerce el colesterol en las membranas de las células animales. Los esteroides pueden encontrarse libres o esterificados estando la mayoría de los esteroides libres localizados en la membrana plasmática (Dyas y Goad, 1993).

En plantas, a pesar de la protección que representa la pared celular, las células están expuestas a las fluctuaciones del medio externo (iones, pH, hormonas, luz, temperatura, patógenos etc.). Particularmente, en el caso del estrés salino, el NaCl desorganiza la membrana plasmática y altera su permeabilidad, lo que conlleva una pérdida de iones (Leopold y Wiling, 1984), alteración de la selectividad Na^+/K^+ (Cramer y col., 1987a), inhibición del transporte de fosfatos y nitratos (Maas y col., 1979; Klobus y col., 1988; Aslam y col., 1984) y depolarización de la membrana (Katsuhara y Tuzawa, 1987). Todo ello puede llevar a (a) interacciones electrostáticas en la superficie de la membrana, que afectan a las propiedades básicas como la diferencia de potencial y la permeabilidad

iónica (Chow y Barber, 1980; Thibaud y col., 1984), (b) un desplazamiento por Na^+ del Ca^{2+} unido a las membranas (Cramer y col., 1985), lo que puede inducir cambios conformacionales de los fosfolípidos de la bicapa que repercuten en la funcionalidad de esta estructura (Gregory y Ginsberg, 1984; Sakmann, 1986; Tilcock y col., 1988), y que afectan a la actividad de enzimas de membrana (Marmé, 1982; Chapman, 1984; Blowers y col., 1987), (c) una alteración en la estructura de las proteínas y lípidos (Criddle y col., 1989) que determinaría cambios en la relación proteínas/lípidos de membrana (Poljakoff-mayber, 1972.), en el patrón protéico (Hurman y Tanaka, 1987; Belver y Travis, 1990) y en la composición lipídica de las membranas (Kuiper, 1985).

Así, ante condiciones ambientales adversas y, sobre todo, cuando estas persisten, ha de lograrse que las repercusiones en el sistema celular sean mínimas, siendo en la membrana plasmática donde recaen los mecanismos de defensa contra estos agentes. Para ello, además de la inducción de enzimas de membrana que permitan la defensa frente al estrés, la membrana plasmática debe ser capaz de adoptar estrategias particulares consistentes en cambios en los componentes lipídicos, en el grado de fluidez o en las propiedades eléctricas de superficie, que permitan la respuesta celular adecuada frente a los estímulos externos (Blum y Ebercon, 1981; Wolf y Steponkus, 1981; Chapman y col., 1983; Vigh y col., 1986; Navarri-izzo y col., 1988; Leshem, 1990; Duxbury y col., 1991; Mazlack 1989; Thompson y col., 1989; Elenkov y col., 1996). El hecho de que las membranas biológicas sean selectivamente permeables a metabolitos polares se explica en base a la existencia de sistemas de transporte formados por estructuras protéicas presentes en la bicapa lipídica. No obstante, los lípidos también juegan un papel importante en los procesos de transporte de iones y solutos que se establecen a nivel de las membranas, ya que la composición lipídica de las mismas determina sus propiedades de permeabilidad y afecta a la actividad de las enzimas que se localizan en dicha estructura. Diferentes trabajos indican que cambios en los fosfolípidos y esteroides libres de la membrana plasmática pueden contribuir a la tolerancia a la salinidad (Kuiper 1968, 1984b; Douglas 1985; Mansour y col., 1994; Wu y col., 1998). Así, mientras en algunas especies vegetales el estrés salino incrementa el contenido en fosfolípidos (Ben Rais y col., 1993; Erdei y col., 1980; Stuver y col., 1981; Chetal y col., 1980); en otras la salinidad genera un aumento del contenido en esteroides y un incremento de la razón esteroides/fosfolípidos a nivel del plasmalema (Blits y Gallagher, 1990; Peeler y col., 1989). En Contraposición con ello, se ha descrito que altas concentraciones salinas también pueden inducir una disminución del contenido lipídico total (Al-Hasan y col., 1987; Stefanov y col., 1994).

Por otra parte, se ha descrito que situaciones de estrés salino provocan una disminución de la poliinsaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas y, en consecuencia, una disminución de la permeabilidad de membrana que impediría la entrada masiva de iones Na^+ (Mansour y col., 1994; Peeler y col., 1989).

J.1. Fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática

El grado de fluidez de la membrana está relacionado con el orden estructural de la misma, es decir, con su grado de empaquetamiento molecular. La fluidez de la membrana depende de la naturaleza de la cabeza polar de los fosfolípidos, de la longitud e insaturación de los ácidos grasos de los mismos, del contenido y calidad en esteroides y de la razón molecular esteroides/fosfolípidos. Puesto que la bicapa lipídica está constituida por dominios heterogéneos de diferente composición, la fluidez depende igualmente de las proteínas intrínsecas de la membrana, de su carga y de la proporción lípido/proteína. No obstante, las medidas de fluidez aportan solo un valor medio y no representan el grado de fluidez de dominios lipídicos particulares (Van Blitterswijk y col., 1981).

La bicapa lipídica presenta, en ausencia de estrés, un estado líquido cristalino, que puede transformarse en estado gel rígido bajo condiciones de deshidratación generadas por un estrés osmótico (Crowe y col., 1992).

La estabilidad de las biomembranas también depende del balance entre los lípidos formadores de bicapa (fosfatidilcolina) y los que no forman bicapa (fosfatidiletanolamina) (Quinn, 1983; Cullis y De Kruijff 1979; Gagné y col., 1985). Además, un alto contenido en colina en las cabezas polares de los fosfolípidos tiende a aumentar la fluidez de la membrana mientras que un alto contenido en etanolamina determina membranas más rígidas (Zull y Hopfinger 1969; Singer, 1981). Así, una reducción de la razón FC/FE puede suponer un enriquecimiento en dominios no formadores de bicapa, y por lo tanto conducir a una membrana más rígida (Quinn, 1984).

La longitud de la cadena y el grado de saturación de los ácidos grasos son dos parámetros determinantes de las propiedades físicas de los lípidos de membrana. En este sentido, el estrés salino provoca un incremento en la proporción de ácidos grasos saturados en los fosfolípidos de membrana plasmática de raíces de trigo (Harwood 1984; Mansour y col., 1994) y de *Spartina patens* (Wu y col., 1998), así como en suspensiones celulares de *Dunaliella salina* (Peeler y col., 1989). Estos cambios en la composición en ácidos grasos de fosfolípidos pueden inducir la formación de una fase gel en la membrana plasmática (Senaratna y col., 1984), causando una bicapa lipídica menos fluida y una membrana menos permeable al NaCl (Kuiper, 1984b).

Los esteroides libres son también efectivos en la regulación de la estabilidad y permeabilidad a los iones de las membranas. Aunque el contenido en esteroides en la membrana plasmática de raíces de cebada y de diferentes genotipos de *Citrus* no cambia significativamente en respuesta al estrés salino (Brown y Dupont, 1989; Walker y Douglas, 1984), numerosas investigaciones indican la existencia de una correlación positiva entre la tolerancia a la sal y el contenido de esteroides libres (Mansour y col.,

1994), y el aumento de la razón esteroides libres/fosfolípidos (Kuiper, 1985; Douglas y Sykes, 1985; Blits y Gallagher, 1990). Además, el nivel de esteroides libres es mayor en los cultivos resistentes a la sal que en los cultivos sensibles (Kuiper, 1968; 1984a, Douglas 1985).

Las proteínas son igualmente un componente fundamental de la membrana puesto que definen una propiedad esencial de las mismas como es la asimetría estructural y funcional. En este sentido, las proteínas integrales o periféricas, al ofrecer una orientación fija, determinan la asimetría de la membrana y condicionan la existencia de funciones distintas en sus superficies interna y externa. Del amplio abanico de funciones de las proteínas de membrana destaca su implicación en los procesos de permeabilidad selectiva a iones o moléculas específicas que se transportan a través de bombas, transportadores ó canales. Además, la respuesta de la célula vegetal a señales externas también depende de proteínas receptoras que perciban las señales a nivel de la membrana y la transmitan al interior celular (Sussman, 1994; De Boer, 1997). Del mismo modo, las proteínas ejercen efectos sobre los lípidos de las membranas, que modulan a su vez a las proteínas, bien a nivel de su conformación o a nivel de su actividad (Sjostrand y Kreman, 1979; Hoffman y col., 1980; Serrano y col., 1988; Coccuci y Marre, 1984; Cooke y Burden, 1990). La salinidad podría afectar la actividad catalítica de las enzimas como consecuencia de una alteración de los componentes de la membrana (lípidos, esteroides y proteínas) (Criddle y col., 1989; Kuiper, 1985; Douglas y Sykes, 1985).

Numerosos trabajos indican que los lípidos de membrana intervienen en los procesos de transducción frente a estímulos externos, incluyendo reguladores del crecimiento y factores ambientales como luz, temperatura o salinidad. Así, los lípidos de membrana son precursores de moléculas importantes en los procesos de transducción como son fosfoinosítidos y ácido jasmónico.

La hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato mediante la acción del enzima fosfolipasa C (PLC) genera dos segundos mensajeros, 1,2-diacilglicerol y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). El primero activa la proteína quinasa C lo que indica su implicación en la fosforilación de proteínas reguladoras y el segundo interviene en la regulación de la concentración intracelular del ion calcio, que juega un papel clave en el acoplamiento estímulo-respuesta. El calcio es liberado al citoplasma cuando el inositol trifosfato se une a su receptor (Drayer y Haastert, 1994) y a su vez inicia una cadena de respuestas celulares (balance iónico, expresión génica, metabolismo de carbohidratos, mitosis, secreción) (Cosgrove y Hedrich, 1991; Ward y Schroeder, 1994; Neuhaus y col., 1993; Bowler y col., 1994; Zorec y Tester., 1992; Bush, 1995). La vía de los fosfoinosítidos juega un papel muy importante en la respuesta de las células vegetales a estímulos físicos y químicos como la luz, estrés hídrico, choques osmóticos, elicitores fúngicos, auxinas, citoquininas y poliaminas (Drobak, 1992, Drory y col., 1992)

En las células vegetales, el Ca^{2+} y IP_3 son los posibles mensajeros secundarios en la respuesta

al estrés hídrico (Coté, 1995), habiéndose cambios en los niveles de los lípidos precursores de IP3 y en la actividad de los enzimas implicados en el metabolismo de inositol fosfolípidos tras un estrés hiperosmótico (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Además, se ha observado una inducción de los genes que codifican para la PLC en situaciones de estrés por sequía, salino y bajas temperaturas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Smolenska-Sym y Kacperska, 1996)

Los ácidos jasmónico y metil jasmónico previenen la senescencia, actúan como reguladores del crecimiento y regulan la expresión génica. La acumulación del ácido jasmónico y metil jasmonato en plantas puede inducirse por heridas y elicitors. En plantas, el nivel del ácido jasmónico varía en función de los tejidos, tipo de células, estadio de desarrollo y en respuesta a estímulos ambientales. Además, los niveles en ácido jasmónico pueden elevarse de forma rápida y transitoria en función de diferentes factores externos, como perturbaciones mecánicas (Czapski y Saniewski, 1992; Weiler y col., 1993) déficit hídrico (Creelman y Mullet, 1995, 1997).

La biosíntesis de ácido jasmónico se realiza a partir del ácido linolénico que, por la acción del enzima lipoxigenasa (linoleato:oxígeno oxireductasa, EC 1.13.11.12), es convertido en ácido 13-hidroperoxilínolénico, sobre el que actúan los enzimas aleno oxido sintasa y aleno oxido ciclasa resultando ello en la formación de ácido 12-oxo-fitodienoico. Tras una reacción de reducción y de tres beta oxidación se forma el ácido jasmónico a partir del cual se puede formar ácido metil jasmónico y numerosos conjugados que pueden tener actividad biológica (Hamberg y Gardner, 1992).

En plantas, las membranas son una fuente rica de ácido linolénico esterificado en glicolípidos y fosfolípidos, por lo cual los incrementos del ácido jasmónico pueden resultar de la activación de fosfolipasas que liberan el ácido linolénico esterificado en los fosfolípidos y glicolípidos de las membranas celulares (Farmer y Ryan, 1992; Conconi y col., 1996), permitiendo así la actuación del enzima lipoxigenasa sobre el ácido graso liberado.

Las lipoxigenasas de plantas son enzimas extremadamente activas que catalizan la degradación de los ácidos grasos con estructura *cis, cis*, 1,4-pentadien. La función bioquímica de los hidroperóxidos producidos todavía no está clara, aunque es posible que en membranas, los hidroperóxidos producidos por acción del enzima LOX modifican la fluidez y permeabilidad de la membrana provocando disfunciones en la bicapa lipídica (Vick, 1993; Siedow, 1991).

*III. Plan de
Trabajo*

Plan de Trabajo

En función de los objetivos marcados en la introducción, de los antecedentes bibliográficos expuestos y la experiencia de nuestro grupo al respecto, se ha planteado el siguiente plan de trabajo, encaminado a descifrar algunos mecanismos de tolerancia al NaCl a nivel celular.

1. La selección de líneas celulares de callos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sensibles y adaptadas a diferentes concentraciones de NaCl.
2. Caracterización de dichos callos mediante un estudio del efecto del NaCl sobre, la composición celular en solutos orgánicos y inorgánicos.
3. Estudio, a nivel de las líneas celulares seleccionadas, del efecto del NaCl sobre la capacidad de extrusión de H^+ por células así como sobre la actividad de las bombas primarias de las membranas plasmática y vacuolar (H^+ -ATPasas y H^+ -PPasa), enzimas claves en la regulación de los flujos iónicos a través las membranas celulares.
4. Determinación de los cambios inducidos por la adaptación al NaCl en las características cinéticas del enzima H^+ -ATPasa y del transporte de H^+ dependiente de ATP en plasmalema.
5. Estudio del efecto de la adaptación al NaCl sobre la composición lipídica y las propiedades de fluidez de la membrana plasmática.

*IV. Material y
Métodos*

A. Material Vegetal

Los diferentes estudios llevados a cabo en esta Memoria se han realizado en callos derivados de hipocotilo de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum*. Mill, variedad Pera).

A.1. Germinación de las semillas

Las semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*. Mill, variedad Pera), desinfectadas superficialmente con solución de lejía comercial al 50 % durante 20 minutos y lavadas tres veces con agua destilada estéril durante 5, 10 y 15 minutos, fueron sembradas en tubos de ensayo de 25x150 mm conteniendo 25 ml de medio de germinación (Tabla 1), previamente autoclavado a 120 °C durante 20 minutos, compuesto por las sales del medio de Murashigue y Skoog (1962), a las que se adicionó 20 g/l sacarosa y 7 g/l agar, ajustándose el pH a 5.5 con KOH. Tras mantener los cultivos a 27 °C y en oscuridad durante 5 días, hasta formación de una radícula de 0.5 a 1.0 cm de longitud, estos fueron iluminados (350 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$, fotoperiodo de 16 horas) durante 7-9 días hasta la obtención de las plántulas utilizadas para la inducción de la callogénesis.

A.2. Inducción de la callogénesis y multiplicación de los callos

Los hipocotilos de las plántulas cultivadas in vitro fueron aislados y cortados asépticamente en explantos de aproximadamente 1 cm de longitud y sometidos, posteriormente, a una sección longitudinal. Los explantos fueron transferidos asépticamente a frascos de cultivo conteniendo 50 ml de medio de iniciación de la callogénesis, compuesto por los macro y microelementos del medio Murashigue y Skoog (1962), las vitaminas B₅ (Gamborg y col, 1986), así como glicina, azúcares, antioxidantes, y hormonas a la concentración indicada en la Tabla 1 ajustándose el pH a 6.0 con KOH. Tras 6 semanas de crecimiento de los explantos en este medio, los callos formados fueron transferidos, en condiciones de esterilidad, a frascos de cultivo conteniendo 50 ml de medio de multiplicación de igual composición a la del medio de iniciación, excepto en la concentración de quinina. Tanto la formación como la multiplicación de los callos se llevaron a cabo en oscuridad y a 27 °C. Al final de la fase exponencial de crecimiento los callos eran transferidos a medios nuevos de multiplicación.

Tabla 1: Medios de cultivo utilizados para la germinación de las semillas y para inducción de la callogénesis.

	Medio de Germinación <i>mg.l⁻¹</i>	Medio de iniciación <i>mg.l⁻¹</i>
Componentes inorgánicos		
Macronutrientes		
NH ₄ NO ₃	1650	1650
KNO ₃	1900	1900
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440	440
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170
Micronutrientes		
KI	0.830	0.830
H ₃ BO ₃	6.200	6.200
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	22.300	22.300
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	8.600	8.600
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0.250	0.250
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0.025	0.025
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27.80	27.80
Na ₂ . EDTA. 2 H ₂ O	37.30	37.30
Componentes orgánicos		
Vitaminas B₅		
Acido nicotínico	-	1
Piridoxina	-	1
Tiamina	-	10
Aminoácidos		
Glicina	-	2
Antioxidantes		
Acido ascórbico	-	500
Polivinil-pirrolidona	-	500
Azucres		
Myo-inositol	-	100
Sacarosa	20.000	30.000
Hormonas		
2,4-Diclorophenoxyacetico	-	1.0
Quinetina	-	0.1
Agar	7.000	10.000
pH	5.5	6.0

A.3. Adaptación de los callos al NaCl, estabilidad de la tolerancia a la sal y condiciones de estrés por NaCl.

A partir de los callos controles se obtuvieron líneas tolerantes al NaCl mediante sucesivos subcultivos en medios de multiplicación conteniendo 25, 50 ó 100 mM NaCl, utilizándose para ello callos en los últimos estadios de la fase exponencial de crecimiento lo que se corresponde a 5 semanas de cultivo de los callos en los medios correspondientes. Se consideró que las líneas tolerantes quedaban establecidas cuando los callos alcanzaron un crecimiento estable en los medios suplementados con sal, lo que se conseguía tras 5 subcultivos en dichos medios.

Para estudiar la estabilidad de la tolerancia al NaCl en ausencia de la presión de selección impuesta por la sal, los callos adaptados a 50 mM NaCl fueron desarrollados en medios de multiplicación desprovistos de NaCl durante 6 subcultivos y, posteriormente, fueron transferidos a medios de cultivo conteniendo 50 mM NaCl durante un subcultivo.

Además, se obtuvieron callos estresados con diferentes concentraciones salinas, para lo cual los callos control y adaptados a 50 mM NaCl fueron incubados durante un subcultivo (20 días aproximadamente) en medios de multiplicación suplementados con 25, 50 ó 100 mM NaCl.

A.4. Determinación del índice de crecimiento relativo y cuantificación del diámetro celular

El crecimiento de los callos de tomate fue analizado en función de los cambios de peso fresco y peso seco a lo largo de 7 semanas. Se partió de 0.6 g tejido y se determinó el peso fresco de los callos cultivados en ausencia o en presencia de NaCl a intervalos de una semana durante 7 semanas consecutivas. Igualmente, se determinó el peso seco tras incubar el material vegetal en una estufa a 72°C durante 48 horas. El crecimiento se expresó como índice de crecimiento relativo (ICR), definido como $(P_f - P_i) / P_i$, donde P_f corresponde al peso final y P_i al peso inicial.

Para la medida del diámetro celular se utilizó un microscopio Leyca conectado a un ordenador provisto del programa QWIN. Estas determinaciones se realizaron en las células

resultantes de la disgregación de los callos durante 12 horas a una razón de 1/10 (p/v) en medio líquido conteniendo la misma concentración de NaCl que su medio sólido de crecimiento.

B. Estudios a nivel del callo

B.1. Respiración celular

Callos controles y adaptados a 50 mM NaCl fueron transferidos a tubos de vidrio conteniendo medio de multiplicación suplementado con 0 y 50 ó con 50 y 100 mM NaCl, respectivamente. Tras una incubación de 48 horas, los tubos fueron sellados y la respiración fue determinada midiendo el CO₂ presente en muestras de 50 µl liberado a intervalos de 30 minutos durante las dos primeras horas. La determinación del CO₂ se llevó a cabo por cromatografía de gases (cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 5730 A) a 40 °C, utilizando una columna Poropak Q de 2 m equipada con un tubo catalizador de níquel capaz de convertir el CO₂ en metano.

B.2. Análisis de solutos intracelulares

B.2.1. Determinación de sodio, potasio, calcio y cloruro

La determinación del contenido en Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ se ha realizado a partir del mineralizado, obtenido por eliminación del material orgánico con SO₄H₂ y H₂O₂. Sobre 0.25 g de peso seco de callos se añaden 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y se calienta la mezcla en microondas a presión atmosférica (Maxidigest MX 4350, Prolabo, potencia máxima de 800 W) al 50 % de potencia durante 4 minutos. Tras enfriar, se adicionan cuidadosamente 3 ml de H₂O₂ y se incuba la mezcla durante dos minutos antes de calentar durante 5 minutos al 80 % de potencia y posteriormente al 90 % de potencia. Tras enfriar de nuevo, se lleva el extracto a un volumen de 50 ml con agua demineralizada (Mingorance y col., 1999).

El contenido en Na⁺ y K⁺ se determinó por fotometría de llama de air-propano (fotómetro Jenway Ltd. Mod. PFP7) y el contenido en calcio por espectrometría de absorción atómica con atomización de llama aire-acetileno (espectrómetro Perkin-Elmer 1100B) en el homogenado obtenido según las condiciones estándar descritas en los manuales del espectrómetro y el fotómetro.

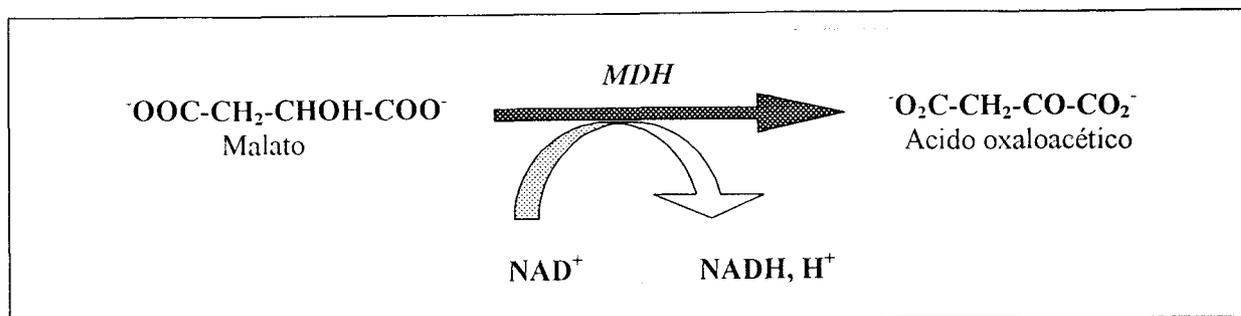
El contenido en cloruro se llevó a cabo por valoración potenciométrica de una suspensión de la muestra de callos, utilizando una solución de nitrato de plata. (Afnor, 1985). Se partió de 0.15 g de peso seco de callos sobre el que se añadieron 10 ml de H₂O y, posteriormente, 5 ml de NO₃H y otros 40 ml de H₂O. Al homogenado resultante se añadieron, gradualmente, volúmenes conocidos de una solución de NO₃Ag 0.1 N. Las diferencias de potencial provocadas por la precipitación de cloruro de plata se detectaron en un potenciómetro (electrodos de plata-cloruro de plata y de referencia). El punto de inflexión de la curva de valoración marcó el punto de equivalencia de la valoración, permitiendo identificar el volumen de NO₃Ag necesario para precipitar todo el cloruro de la muestra. El contenido en cloruro de los callos fue expresado como mmoles. g⁻¹ peso seco de callos.

B.2.2. Contenido en malato

El análisis del contenido intracelular en malato se realizó siguiendo el método propuesto por Hohorst (1965). Para ello, 4 g de peso fresco de callos se homogenizaron en mortero con nitrógeno líquido incubándose, posteriormente, en solución de ácido perclórico al 6 %, proporción 1:4 (p/v). La suspensión resultante fue homogenizada en potter-Elvehjem y centrifugada a 3000 g durante 10 minutos ajustándose el pH del sobrenadante obtenido a 3.5 con NaHCO₃ 2,5 M. Tras eliminar por filtración el perclorato sódico precipitado, el extracto se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

El contenido en malato de los extractos fue determinado espectrofotométricamente a 340 nm, en función del incremento en absorbancia debido a la reducción del NAD⁺ exógeno acoplada a la actividad malato deshidrogenasa (Figura 1). El medio de reacción estuvo constituido por 0.36 M hidrazina-0.9 M glicina, pH 9.5, 2.5 mM NAD⁺ y 50 µl del extracto en un volumen total de 1 ml. La reacción se inició por adición de 10 µg de NAD malato deshidrogenasa y el contenido en malato se expresó en mmoles. g⁻¹ de peso fresco, utilizando un coeficiente de extinción molar de 6.22 mM⁻¹. cm⁻¹.

Figura 1. Reacción catalizada por el enzima malato deshidrogenasa.



B.2.3. Contenido en azúcares solubles

La extracción de azúcares solubles totales de los callos se llevó a cabo según el método de Weinberg y col (1981) basado en la incubación del material vegetal en una solución de tolueno a baja concentración que permite la liberación de componentes citoplasmáticos al medio externo. Se incubó 1 g de peso fresco de callos en 25 ml de solución acuosa de tolueno al 0.5 % durante 3 horas, a 25 °C, y en constante agitación. El extracto obtenido fue filtrado a vacío a través de papel Whatman N°1 y el material no extraído fue incubado otras dos veces en tolueno durante 3 y 24 horas, respectivamente. Se unieron los extractos y el residuo seco, obtenido por evaporación en Rotavapor a 40 °C, se llevó a un volumen conocido de agua destilada, manteniéndose a -20 °C hasta su análisis.

La cuantificación del contenido en azúcares solubles totales del extracto se realizó según Fales (1951). Se añadió 1 ml del extracto de tolueno adecuadamente diluido a 5 ml de una solución de 2 g antrona por litro de la mezcla ácido sulfúrico:agua (5:1, v/v). Las dos fases formadas se mezclaron por inversión, incubándose a 100°C durante 10 min y determinándose el contenido de azúcares espectrofotométricamente a 620 nm frente a una curva patrón de glucosa de concentraciones comprendidas entre 0 y 320 $\mu\text{g. ml}^{-1}$. Los resultados fueron expresados en mg de azúcares por gramo de peso fresco.

B.3. Composición y contenido lipídico

B.3.1. Extracción de lípidos totales

La extracción de los lípidos totales de los callos de tomate se ha realizado según el método de Norberg y Liljenberg (1991). De acuerdo con ello, 2 g de callos homogenizados en mortero con nitrógeno líquido fueron transferidos a tubos de vidrio con tapón a rosca e incubados durante 4 minutos en 10 ml de isopropanol hirviente. El conjunto se homogenizó en Sorvall Omnimixer durante un minuto a velocidad máxima, resultando un extracto al que se adicionaron por dos veces 3.5 ml de mezcla cloroformo:isopropanol (1:1, v/v), y posteriormente, 4 ml de cloroformo, siguiendo a cada adición una nueva homogenización en las condiciones anteriores. El extracto obtenido fue filtrado a vacío a través de papel Whatman N°1 y concentrado a sequedad en Rotavapor a 30 °C. El residuo resultante fue extraído con 6 ml de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v/v) y 1 ml de NaCl al 1 % centrifugándose el extracto a 3000 g durante 5 minutos y recogiendo la fase inferior clorofórmica que contenía los lípidos totales y la fase superior metanólico-acuosa que contenía los componentes celulares solubles en agua. La fase clorofórmica se concentró en speed vacuum a 30 °C, disolviéndose el residuo lipídico en un volumen conocido de mezcla benceno:etanol (4:1, v/v) que se conservó a -80 °C, en atmósfera de nitrógeno, hasta su posterior utilización.

B.3.2. Análisis de ácidos grasos de lípidos totales

La determinación de los ácidos grasos de lípidos totales se realizó según la técnica de Metcalfe y col. (1966), modificada por Lechevalier (1966). Se tomó una alícuota de la solución de lípidos totales, la cual, previa evaporación en corriente de nitrógeno, fue saponificada en tubos pirex con tapón a rosca con 3 ml de una solución al 2 % de NaOH en metanol, durante 30 minutos, a 80 °C. Posteriormente, se adicionaron 3 ml de una solución al 14 % de trifluoruro de boro en metanol, manteniéndose de nuevo los tubos 30 minutos a 80 °C. Enfriados los tubos, se extrajeron los ésteres metílicos de los ácidos grasos con 5 ml de pentano, cuantificándose los ácidos grasos previa adición a la fase pentánica de un volumen conocido de una solución metanólica del éster metílico del ácido heptadecanoico (utilizado como patrón interno, al estar ausente en las muestras problema). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron separados, identificados y determinados por cromatografía en fase gaseosa utilizando una columna de 30 m semicapilar de vidrio (Supelco SP-2330) y a una temperatura constante de 175 °C. La Cuantificación se realizó por comparación del área de cada uno de los picos correspondientes a los ácidos problemas, con la proporcionada por el

éster metílico del ácido heptadecanoico.

B.3.3. Separación de diferentes fosfolípidos

A partir del extracto de lípidos totales se separaron los fosfolípidos de las diferentes categorías lipídicas por cromatografía en capa fina. Una vez activada la placa de gel de sílice (silicagel G, Merk, 0.5 mm de espesor), durante 60 minutos a 100 °C, fue depositada una alicuota del extracto de lípidos totales, en el origen de la placa bajo una corriente de nitrógeno. La separación se inició con un primer desarrollo, hasta unos 15 cm, con una mezcla hexano: éter etílico: ácido fórmico (80:20:1, v:v:v), que hizo correr los lípidos neutros con el frente de la fase móvil. Se secó la placa, se eliminó el disolvente bajo corriente de nitrógeno y se expuso el borde de la placa, en donde se había aplicado patrón de diacilglicerol, a la acción de los vapores de yodo. Localizada y marcada la banda de diacilglicerol, se procedió a un segundo desarrollo en mezcla de cloroformo: metanol: H₂O (65:25:4, v:v:v), que permitió el desplazamiento de los diferentes lípidos polares a lo largo de la placa de forma indirectamente proporcional a su polaridad. Cuando el disolvente alcanzó la altura del patrón de diacilglicerol, se detuvo este segundo desarrollo y se secó la placa bajo corriente de aire.

La visualización de cada una de las bandas que aparecieron en la placa se realizó mediante revelado breve exposición a vapores de yodo, los cuales se fijan de forma reversible en las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, llevándose a cabo la identificación de cada uno de los fosfolípidos problema mediante el desarrollo cromatográfico frente a patrones.

B.3.4. Análisis de ácidos grasos de fosfolípidos

Para determinar la composición y contenido de ácidos grasos de las distintas categorías fosfolipídicas, previamente separadas por cromatografía en capa fina, se rasparon con espátula las bandas correspondientes a cada uno de los fosfolípidos y se llevaron a tubos de vidrio calidad pirex con tapón de rosca. Los ácidos grasos fueron metilados mediante adición de 2.5 ml de una solución al 14 % de trifluoruro de boro en metanol, calentándose a 85 °C durante 30 minutos. Tras enfriar los tubos, se adicionaron 5 ml de pentano y 1 ml de H₂O y la mezcla se centrifugó a 3.000xg durante 5 minutos. Tras separar las fases acuosa y pentánica, los ésters metílicos de los ácidos grasos

contenidos en la fase pentánica fueron identificados por cromatografía en fase gaseosa, utilizando como patrón interno el éster metílico del ácido heptadecanoico, según la metodología descrita en el apartado B.3.2.

B.3.5. Cuantificación del contenido de fosfolípidos

La dosificación de los fosfolípidos purificados por cromatografía en capa fina se ha realizado a partir del contenido en ácidos grasos de cada una de dichas moléculas. Para ello, se ha estimado que los ácidos grasos representan el 70 % de la masa de los fosfolípidos. Alternativamente, la dosificación se realizó determinando el contenido en fósforo en el extracto de los lípidos totales.

B.3.6. Composición y contenido de esteroides libres

Para determinar la composición y contenido de esteroides libres a nivel de los lípidos totales, un volumen conocido de dicho extracto lipídico fue evaporado a sequedad y, posteriormente, silado a 60 °C durante una hora con 0.1 ml de una mezcla BSTFA:dimetilformamida (1:5 v/v). Los derivados silados de los esteroides se determinaron por cromatografía gaseosa (cromatógrafo Hewlett-Packard, mod. 5730A) a temperatura constante de 275 °C, utilizándose una columna de vidrio de 2 m rellena con fase estacionaria OV-17 sobre Chromosorb-W-AW-DMCS, 100-200 mesh. La identificación de las distintas moléculas de esteroides se realizó por comparación con patrones externos de una mezcla de esteroides vegetales silada y analizada por cromatografía de gases en las mismas condiciones que el problema. La cuantificación de los esteroides problema se realizó por comparación de las áreas correspondientes con la de un patrón de colestano adicionando como patrón interno a las muestras problemas.

B.4. Composición y contenido en aminoácidos libres

Se partió de la fase superior metánolico-acuosa resultante de la extracción de lípidos totales descrita en el apartado B.3.1., la cual contiene los componentes celulares solubles. Dicha fase fue

filtrada a través de una membrana de 0.45 μm de tamaño de poro (HATF MF- Millipore) tomándose 200 μl del filtrado que fueron llevados a sequedad en speed vacuum, a 30 °C. Al residuo seco se adicionó 25 μl de una solución compuesta por 400 mM acetato sódico en una mezcla TEA:metanol: H₂O (1:2:2, v/v/v). Tras agitación, el disolvente se evaporó nuevamente a sequedad y el residuo resultante se incubó en 25 μl de una solución compuesta por metanol:H₂O:TEA:PITC (7:1:1:1, v/v/v/v) durante 10 minutos, a temperatura ambiente y con agitación en vortex cada 3 minutos. La muestra se llevó de nuevo a sequedad en speed vacuum, a 30 °C y se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

La determinación de la composición y contenido en aminoácidos libres de los callos se llevó a cabo por HPLC frente a un patrón externo constituido por una mezcla de 19 aminoácidos (Sigma Chemical Co.) a una concentración final de 100 μM en 0.1 M HCl. Para la calibración del sistema, se utilizaron 120 μl de la mezcla de patrones procesada simultáneamente con los extractos y en la que la concentración final de cada aminoácido en la mezcla de patrones fue de 60 μM (O6). Tanto las muestras problema como la mezcla de patrones de aminoácidos fueron disueltas en 200 μl de una solución de fosfato sódico monohidrogeno al 7.1 % (p/v) ajustada a pH 7.4 con ácido fosfórico al 10 % y acetonitrilo al 0.5 %. Para la separación y cuantificación de los aminoácidos por HPLC (Varian, modelo) se utilizó una columna LiChroCART de 250 x 46 mm (Merck), con fase liChrospher, RP-18 de 5 μm , mantenida a temperatura de 40 °C. Como fase móvil se utilizó un eluyente compuesto por 140 mM acetato sódico trihidratado, 0.54 mM EDTA en solución acuosa de TEA al 0.05 % y acetonitrilo al 0.6 %, ajustado a pH 6.3 (eluyente A), y un segundo eluyente compuesto por 0.54 mM EDTA en acetonitrilo al 60 % (eluyente B). El programa de elución consistió en un gradiente de los dos eluyentes a un flujo medio de 1 ml. min⁻¹. (Tabla 2). La detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 254 nm. Las concentraciones de cada uno de los aminoácidos presentes en la mezcla patrón así como sus tiempos de retención permitieron, por comparación, la identificación y la cuantificación del contenido en aminoácidos de los extractos, expresándose los resultados como mmoles de aminoácido por gramo de peso seco.

Tabla 2: Gradiente de elución y condiciones de flujo utilizadas para el análisis por HPLC de aminoácidos libres de callos de tomate.

Tiempo de desarrollo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)	Flujo (ml. min ⁻¹)
0.00	100	0	1.0
1.00	100	0	1.0
21.00	54	46	1.0
21.50	0	100	1.0
22.00	0	100	1.5
30.50	0	100	1.5
31.00	100	0	1.5
39.00	100	0	1.5
40.00	100	0	1.0

B.5. Contenido en proteínas totales

Para la extracción de las proteínas totales, 2 g de callos fueron homogenizados en mortero con nitrógeno líquido. Al material resultante se adicionó tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7.6 conteniendo 250 mM sacarosa, 5 mM EGTA-Tris, pH 7.6, 25 mM metabisulfito sódico, 2 mM DTT, 1 mM PMSF y 0.2 % PVPP realizándose una nueva homogenización en Potter-Eveljhem. En el extracto obtenido se determinó el contenido en proteínas según el método de Bradford (1979), modificado por Gogstad y Krutnes (1982) utilizando una curva patrón de BSA.

B.6. Determinación de la extrusión de H⁺

B.6.1. Fundamento del método de medida

La capacidad extractora de H⁺ por las células de callos de tomate se ha determinado utilizando un sistema de regulación continua y automática de pH, marca Metrohm, constituido por pH-metro (mod. E 632), multidosimat (mod. 655) e impulsomat (mod. 614) (Rodríguez Rosales y col., 1989), así como por un embudo Buchner provisto de una placa porosa de vidrio filtrado en el

que se mantienen las células en suspensión haciendo pasar a través la placa una corriente continua de aire decarbonatado. La decarbonatación del aire se consiguió por paso a través de una columna de vidrio rellena de gel de sílice que elimina la humedad y tres columnas rellenas de cal sodada, con indicador de saturación, que eliminan el CO_2 . El sistema consta también de un baño termostatzado que permite mantener constante la temperatura del medio de incubación mediante la circulación de agua a través de la doble pared del embudo Buchner en el que eran incubadas las células. El funcionamiento de este dispositivo se basa en la generación de un impulso eléctrico derivado de la disminución de pH del medio de incubación de las células, respecto al prefijado en el impulsomat, el cual se transmite al multidosimat haciendo que este libere al medio de incubación de las células volúmenes fijos de una solución neutralizadora de KOH de concentración conocida, de forma proporcional a la frecuencia de los impulsos recibidos. El volumen de solución adicionado, indicado por el multidosimat y reflejado en un registrador, es proporcional a la cantidad de H^+ extruidos por las células al medio de incubación (Davidian, 1984).

B.6.2. Medida de la extrusión de H^+ y evaluación del registro

Callos de tomate desarrollados a diferentes concentraciones de NaCl durante uno o varios subcultivos fueron disgregados en medio de composición idéntica al medio de multiplicación pero desprovisto de agar y suplementado con Mes 20 mM, pH 6.0. Tras 12 horas de incubación a 27 °C y en oscuridad, la suspensión celular resultante se filtró a través de papel Whatman N° 1, y las células se lavaron varias veces con una solución isoosmótica de sorbitol. A continuación, 6 g de células se incubaron en 20 ml de un medio de reacción conteniendo 1.6 % sorbitol, 2 mM K_2SO_4 y 0.1 mM CaSO_4 determinándose la capacidad extractora de H^+ de las células en función de la acidificación del medio de reacción durante un periodo de 6 horas, pH prefijado a 6.8, a 27 °C y en oscuridad.

A partir del registro de acidificación en función del tiempo de medida obtenido se obtuvo la primera derivada a intervalos de tiempo constantes de 15 minutos en el intervalo de 2-6 horas, lo que permitió determinar un valor medio de velocidad de flujo de H^+ en $\mu\text{eq H}^+ \cdot \text{g}^{-1}$ peso fresco de células. hora⁻¹.

Al objeto de poder correlacionar la extrusión de H^+ a nivel de células con la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema, se utilizaron activadores e inhibidores específicos del enzima. Como activador se utilizó fusicoccina a una concentración de 2 μM y, como inhibidor, DCCD a una concentración de

150 μ M.

B.6.3.. Efecto de un estrés de corta duración sobre la capacidad extractora de H^+

Para estudiar el efecto de un estrés de corta duración con diferentes sales (NaCl, KCl o Na_2SO_4) o sorbitol sobre la capacidad extractora de los callos control y adaptados a 50 y 100 mM NaCl, las células obtenidas a partir de la disgregación de dichos callos según las condiciones descritas en el apartado G.2. fueron filtradas y, posteriormente, incubadas en 20 ml de un medio compuesto por 1.6 % sorbitol, 2 mM K_2SO_4 y 0.1 mM $CaSO_4$. Después de 3 horas, se adicionaron 100 mM NaCl o KCl, 50 mM Na_2SO_4 o 3.4 % de sorbitol al medio de incubación, determinándose los cambios en la extrusión de protones en función de la acidificación del medio de reacción, tal como se describe el apartado G.2.

B.7. Actividades fosfoenolpiruvato carboxilasa y enzima málico implicadas en la regulación del pH citoplasmático

Para la determinación de las actividades fosfoenolpiruvato carboxilasa y el enzima málico, 5 g de callos se homogenizaron a 4 °C en mortero y, posteriormente, mediante dos pases sucesivos en prensa de French a una presión de 1000 PSIG, utilizando 15 ml de medio compuesto por 100 mM HEPES-NaOH, pH 7.0, PVP-40 al 0.5 % (p/v), 5 mM $MgCl_2$ y 2 mM PMSF. El homogenado fue centrifugado a 10.000xg (Sorvall RC-5C, rotor SS-34), a 4 °C, durante 10 minutos, almacenándose el sobrenadante resultante a -20 °C hasta su utilización posterior.

La determinación de las actividades enzimáticas se realizó según la metodología de Holtum (1992) basada en el seguimiento del cambio de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación de NADH (fosfoenolpiruvato carboxilasa) ó a la reducción del $NADP^+$ (enzima málico). En el caso del enzima PEPcarboxilasa se adicionaron 30 μ g de proteína del extracto a 1 ml de medio de reacción compuesto por 50 mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM $NaHCO_3$, 3 UI NAD-malato deshidrogenasa y 0.12 mM NADH, iniciándose la reacción a 25 °C por adición de 2 mM fosfoenolpiruvato. La actividad del enzima málico se llevó a cabo en las mismas condiciones, incubando 20 μ g de proteína del extracto en medio de reacción compuesto por 50 mM HEPES-NaOH, pH 6.5, suplementado con 0.25 mM $NADP^+$ y 6 mM $MgCl_2$, iniciándose la reacción por adición de 6 mM malato. Las actividades enzimáticas se expresaron en nmoles de NADH

(fosfoenolpiruvato carboxilasa) o NADP⁺ (enzima málico) formados por mg proteína total y por hora, utilizando un coeficiente de extinción de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

C. Estudio a nivel de membranas

C.1. Obtención de membranas microsomales

Básicamente, se utilizaron 10 g de callos que fueron homogenizados en mortero con 30 ml de 25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 250 mM sacarosa, 5 mM EGTA-Tris, pH 7.6, 2.5 mM metabisulfito sódico, 2 mM MgSO₄, 2 mM ATP, 10 % (v/v) glicerol, 0.2 % (p/v) BSA, 2 mM DTT; 1 mM PMSF y 1 g PVPP. El homogenado obtenido se pasó dos veces por la prensa de French a una presión de 1000 PSIG y el extracto resultante fué centrifugado a 13.000xg, durante 10 minutos. El sobrenadante se centrifugó a 100.000xg, durante 35 minutos (Ultracentrifuga Beckman, modelo rotor 60-Ti), obteniéndose un sedimento correspondiente a la fracción microsomal (Figura 2) que fue resuspendido en tampón de conservación compuesto por 2 mM BTP-Mes, pH7.0, 250 mM sacarosa, 10 % glicerol, 0.2 % BSA, 2 mM DTT y 1 mM PMSF, congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C. Cuando las membranas microsomales fueron utilizadas para la purificación de plasmalema, los microsomas se resuspendieron en tampón de partición compuesto por 0.5 M sacarosa, 5mM KH₂PO₄, pH 7.8 y 1 mM PMSF. Todo el proceso de aislamiento de membranas microsomales se llevó a cabo a 4°C.

C.2. Purificación de membrana plasmática a partir de microsomas

La purificación del plasmalema se llevo a cabo por el método de Larsson y col (1987) consistente en un sistema de partición de doble fase acuosa. Dicho sistema permite la separación de los componentes de una mezcla por distribución entre dos líquidos no-miscibles, generalmente polimeros solubles en agua y diferentes estructuralmente, siendo los más usuales el polietilen glicol y el dextrano. El sistema de partición incluye sales y otros solutos que determinan su capacidad tamponante y tonicidad.

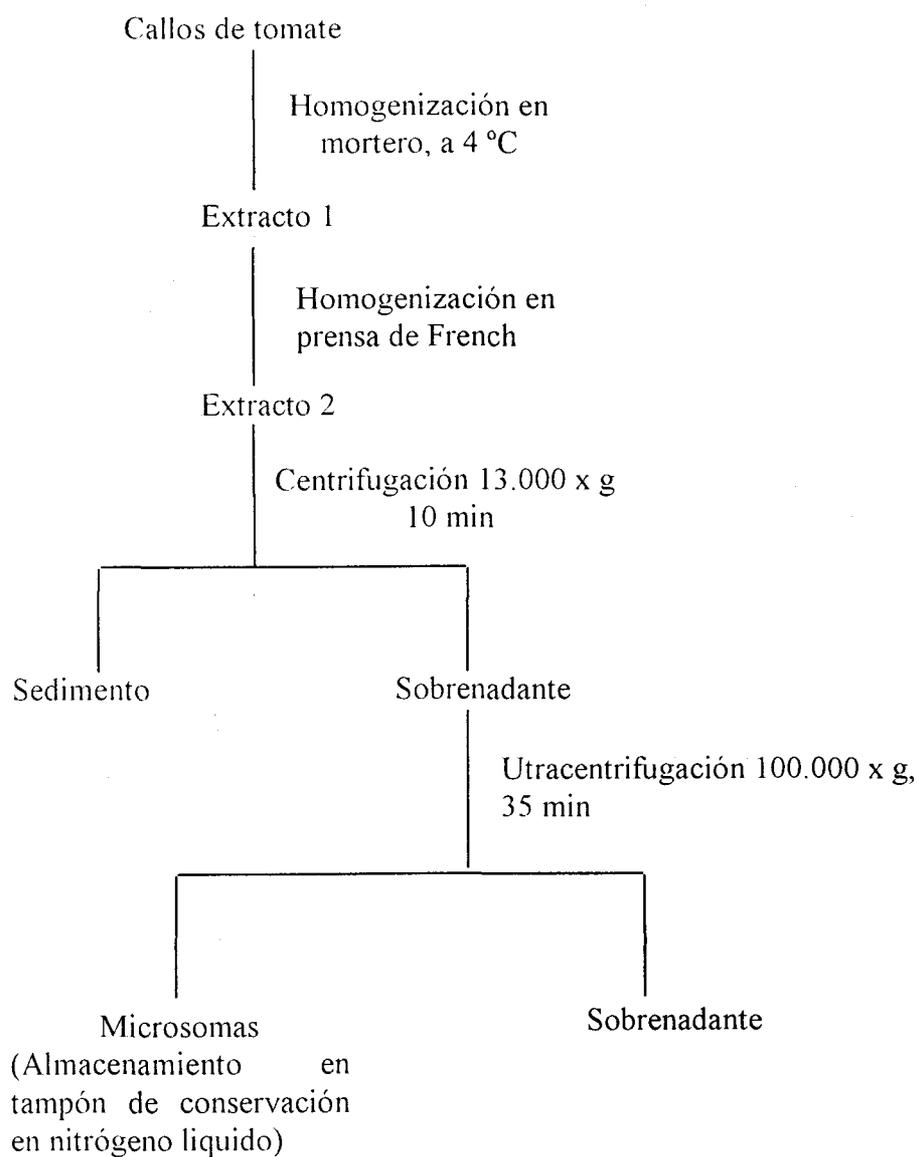


Figura 2. Obtención de membranas microsomales de callos de tomate.

Material y Métodos

Dependiendo del tipo y concentración de sal (LiCl, KCl, NaCl) se crea una diferencia de potencial electrostático muy baja (Albertsson, 1971a y b) aunque con gran influencia sobre el rendimiento de la separación. La composición del sistema de fases determina que la partición de las macromoléculas puede hacerse dependiente del peso molecular, de la carga neta, de la configuración molecular, de la hidrofobicidad y de la presencia de lugares específicos de unión. Además, el comportamiento de cualquier material en un sistema de partición de fases está determinado por las propiedades físicas dependientes de la naturaleza química de los polímeros. Así, las interacciones entre los polímeros y entre los polímeros y problema pueden ser puentes de hidrogeno, interacciones de Van der Waals, fuerzas iónicas o interacciones hidrofóbicas.

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 Dx), sales (KCl, NaCl) y osmolitos (sacarosa, sorbitol) disueltos en un tampón de pH entre 7.5-8.0 (fosfato potasico, Tris-maleato). Las vesículas de plasmalema se separan en estos sistemas en la fase superior de polietilenglicol, mientras que las membranas intracelulares se separan en la interfase o en la fase inferior de dextrano. La alta latencia (70 a 95 %, dependiendo de las especies vegetales y del tejido) de la actividad H^+ -ATPasa sensible a vanadato indica que las vesículas de plasmalema obtenidas por este método están fuertemente selladas y presentan orientación "right-side out" (Larsson y col., 1984).

Para la purificación de plasmalema de callos de tomate, el sistema de partición de fases utilizado estuvo constituido por una solución acuosa conteniendo 5.6 % (p/p) de Dextrano T-500, 5.6 % (p/p) de polietilenglicol 3350, 0.5 M sacarosa, 5 mM KH_2PO_4 , pH 7.8 y 5 mM NaCl. La partición de fases se llevó a cabo en tubos de vidrio corex de 30 ml conteniendo 20 g de fases y 10-15 mg de proteína microsomal en 4 ml de tampón de partición. El conjunto se mezcló por inversión y, posteriormente, se centrifugó a 3.000xg durante 5 minutos, a 4 °C. La fase superior (U_1), recogida con una pipeta pasteur, fue añadida a una nueva fase inferior (L_2) de un segundo tubo de partición, una vez retirada su fase superior (U_2). El conjunto fue nuevamente mezclado por inversión y centrifugado, diluyéndose la fase superior U_1 y la fase inferior L_1 en 2 y 5 volúmenes, respectivamente, de 2 mM BTP-Mes, pH 7.5, 250 mM sacarosa, 1 mM DTT y 0.1 mM PMSF que fueron centrifugados a 150.000g (Ultracentrifuga Beckman, rotor 60-Ti) durante una hora, a 4°C. El sedimento de cada fase fue resuspendido en el tampón de conservación descrito anteriormente en el apartado C.1., congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C. La fase superior (U_1) contenía las vesículas de plasmalema y la fase inferior (L_1) vesículas de membranas intracelulares (Figura 3.).

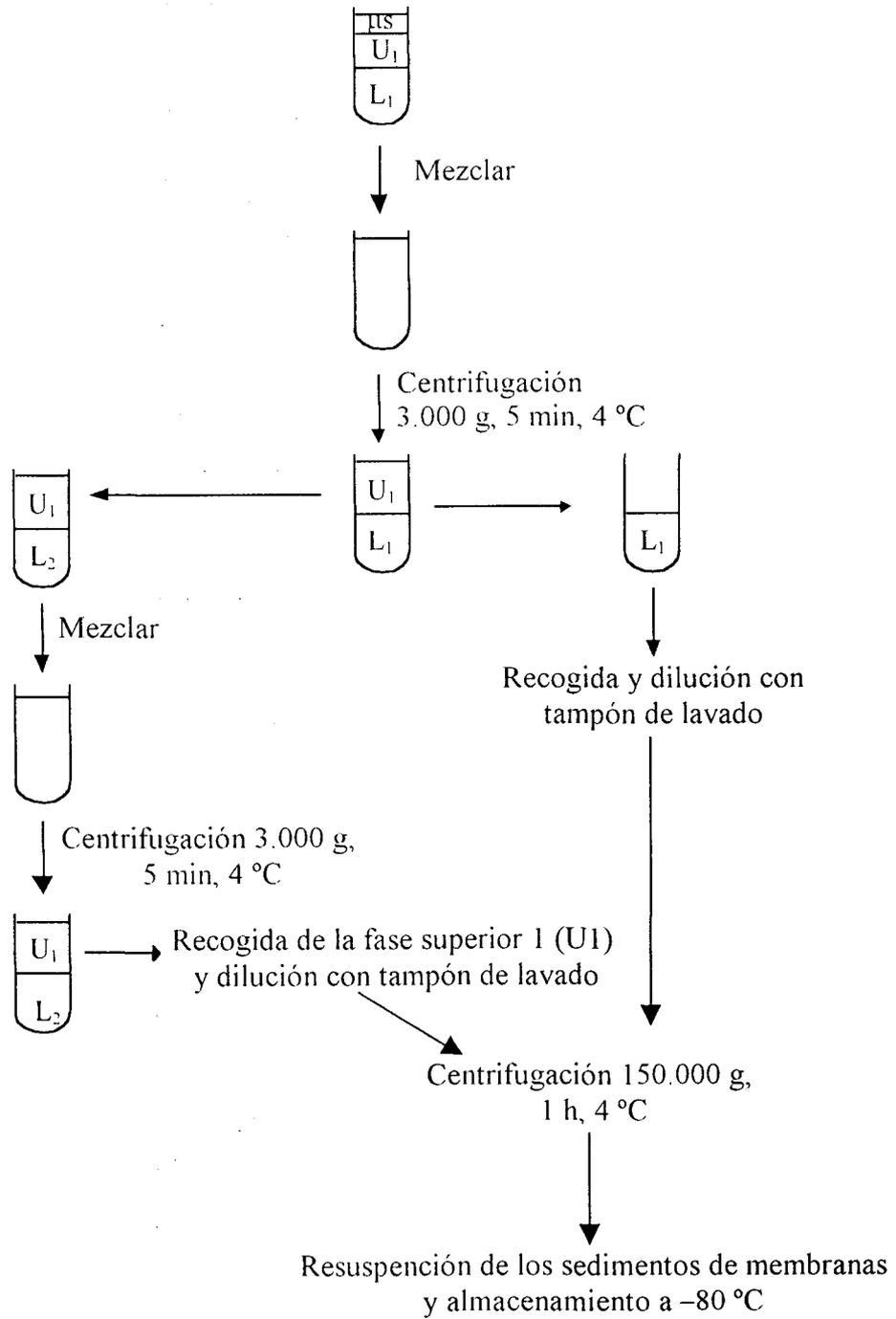


Figura 3. Proceso de aislamiento de membranas enriquecidas en plasmalema a partir de microsomas de callos por partición de fases en dextrano-polietilén glicol. μ s, microsomas; U, fase superior; L, fase inferior.

C. 3. Actividades enzimáticas asociadas a las membranas celulares

C.3.1. Actividad H⁺-ATPasa

Se ha seguido básicamente el método de Hodges y Leonard (1974), basado en la determinación del Pi liberado por la hidrólisis de ATP (Ames 1966). La actividad enzimática se llevó a cabo en un volumen final de 500 µl de medio de reacción (Tabla 3), iniciándose la reacción mediante adición de 6 µg de proteína microsomal o 4 µg de proteína de la fracción enriquecida en membrana plasmática. Tras 30 minutos de incubación a 27°C, la reacción fue detenida mediante la adición de 1 ml del reactivo de Ames compuesto por 1.66 % ácido ascórbico (p/v) y 0.35 % (NH₄)₆Mo₇O₂₄ (P/V) en ácido sulfúrico 1 N y suplementado con 0.75 % SDS (p/v). Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente a 820 nm (Espectrofotómetro Shimadzu, modelo 160) frente a una curva patrón de KH₂PO₄, expresándose los resultados en µmoles de Pi liberados por mg de proteína y por hora.

Tabla 3: Medios de reacción utilizados para la determinación de diferentes actividades ATPásicas.

	H ⁺ -ATPasa de		
	<i>Plasmalema</i>	<i>Tonoplasto</i>	<i>Mitocondria</i>
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)	-	7.5	7.5
NaN ₃ (mM)	2	2	-
KNO ₃ (mM)	50	-	50
KCl (mM)		50	
Ortovanadato (µM)	-	250	250

pH	6.5	8.0	8.0
----	-----	-----	-----

Teniendo en cuenta que, como consecuencia del proceso de extracción, las membranas aisladas podían cambiar su orientación respecto a la que poseen en la célula, la actividad ATPasa total fue determinada en presencia del Brij-58 a una concentración de 7.5 $\mu\text{g. ml}^{-1}$. La diferencia entre las actividades en presencia (actividad total) y ausencia (actividad basal) de Brij 58 se definió la actividad latente y la latencia de las vesículas como la actividad latente expresada en porcentaje de la actividad total (Galtier y col. 1988). La determinación de la actividad ATPasa en función de inhibidores específicos de este enzima, permitió establecer la actividad de diferentes enzimas ATPasas en el conjunto de membranas microsomales así como determinar el grado de purificación de la membrana plasmática aislada por partición de fases.

La actividad ATPasa del plasmalema, se definió como la actividad Mg^{2+} -ATPasa sensible a vanadato e insensible a molibdato, nitrato y azida (Serrano, 1990) y se determinó, a pH 6.5, como la diferencia de actividad en presencia y ausencia de 250 μM de Na_3VO_4 en el medio de reacción:

$$\Delta\text{Va} = \text{Actividad (+ KNO}_3 + \text{NaN}_3) - \text{Actividad (+ KNO}_3 + \text{NaN}_3 + \text{Va)}$$

La actividad ATPasa vacuolar, se definió como la actividad Mg^{2+} -ATPasa sensible a nitrato e insensible a molibdato, vanadato y azida (O' Neil y col. 1983) y se determinó, a pH 8.0, como la diferencia de actividad en presencia de 50 mM KCl ó 100 mM KNO_3 en el medio de reacción:

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

La actividad ATPasa asociada a la membrana mitocondrial, se definió como la actividad Mg^{2+} -ATPasa sensible a azida e insensible a molibdato, vanadato, y nitrato (Galtier y col. 1988) y se determinó, a pH 8.0, en presencia y ausencia de 2 mM Na_3N en el medio de reacción:

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

C.3.2. Actividad pirofosfatasa

La actividad pirofosfatasa (PPasa) se definió como la actividad de hidrólisis de pirofosfato estimulada por K^+ (Wang y col. 1986). Para su determinación, las membranas se incubaron en

ausencia y presencia de 100 mM KNO₃ en un medio conteniendo 25 mM BTP-Mes pH 8.0, 100 μM Na₂MoO₄, 2 mM NaN₃, 250 μM ortovanadato, 1 mM MgSO₄, 300 μM PPI, y 7.5 μg Brij 58. La actividad PPasa se calculó como la diferencia de actividad enzimática en presencia y ausencia de 100 mM KNO₃.

C.3.3. Actividad UDPasa latente

La actividad UDPasa latente, utilizada como marcador de las membranas del Aparato de Golgi (Green y col. 1983), se ensayó en un medio de reacción conteniendo 30 mM BTP-Mes, pH 6.5, 3 mM MnCl₂ y 3 mM UDP. La actividad UDPasa latente se definió como la diferencia de actividades en presencia y ausencia de 0.1 % Triton X-100.

C.3.4. Actividad NADH-citocromo c reductasa insensible a antimicina A

Esta actividad enzimática marcadora de membranas del retículo endoplasmático (Hodges y Leonard, 1974), se determinó incubando 30 μg de proteína de membrana en 3 ml de un medio de reacción conteniendo 50 mM KH₂PO₄, pH 7.5, 1.66 mM KCN, 30 μM citocromo c oxidado y 1 μM antimicina A. Tras 3 minutos de incubación a 25 °C, se inició la reacción por adición de 100 μM NADH, midiéndose espectrofotómetricamente el incremento de absorbancia a 550 nm resultante de la reducción del citocromo c exógeno. La utilización de un coeficiente de extinción molar de 18.5 mM⁻¹. cm⁻¹, permitió expresar la actividad enzimática en μmoles de citocromo c reducidos. mg⁻¹ de proteína. hora⁻¹.

C.3.5. Transporte de H⁺ dependiente de ATP

La determinación del transporte de protones dependiente de ATP se basó en la medida de la velocidad inicial de extinción de la fluorescencia de la sonda ACMA capaz de unir protones en el interior de las vesículas al ser sensible a pequeños cambios de pH y difundir fácilmente a través de las membranas celulares (Bennet y Spanwick, 1983). La extinción de fluorescencia del cromóforo

ACMA se midió espectrofluorimetricamente (Fluorímetro Shimadzu, modelo RF 540, provisto de un sistema de agitación magnética y termostatación) a unas longitudes de ondas de excitación y emisión de 415 nm y 485 nm, respectivamente.

Las membranas (150 μg de microsomas ó 50 μg de plasmalema) se incubaron 10 minutos, en oscuridad y a 27°C, en 1 ml de un medio de reacción compuesto por 50 mM BTP-Mes, pH6.5, 5 mM ATP, 100 mM KNO_3 , 250 mM sacarosa, 1 mM NaN_3 , 1 μM valinomicina y 1 μM ACMA, iniciándose la reacción por adición de 5 mM MgSO_4 (Figura 4.). El transporte de H^+ asociado a la ATPasa de plasmalema, se determinó como la diferencia de extinción de la fluorescencia del ACMA, a pH 6.5, en ausencia y presencia de 400 μM de vanadato.

A partir de los registros obtenidos se calcularon los parámetros que definieron la actividad bombeara de H^+ en las vesículas problema:

Velocidad inicial de extinción de fluorescencia (VQi). Define la pendiente inicial de la extinción de fluorescencia y resulta del cociente entre la emisión inicial de fluorescencia (F_0) en unidades arbitrarias y el tiempo necesario para la extinción total de fluorescencia (t_i). VQi se expresó como % Q. min^{-1} .

Velocidad específica de extinción de fluorescencia (VQs). Corresponde a la velocidad inicial de extinción de fluorescencia expresada por mg de proteína ($VQs = VQi/\text{mg prot}$) y en esta memoria se expresa como % Q. min^{-1} . mg^{-1} proteína.

Extinción máxima de fluorescencia (Qmax). Representa la proporción de emisión extinguida (F) respecto a la emisión inicial (F_0) de fluorescencia ($Q_{max} = F/F_0$) expresada en porcentaje.

Razón H^+ extruidos/ATP hidrolizado. Representa un índice de la estequiometria de la reacción enzimática catalizada por el enzima H^+ -ATPasa y estimada como la razón de la velocidad específica de extinción de fluorescencia ($\Delta\text{Va-VQs}$) y la actividad fosfohidrolítica del enzima ($\Delta\text{Va-ATPasa}$) sensibles a vanadato.

C.3.5.1. Estimación de la permeabilidad pasiva a los H^+ de las membranas

La permeabilidad pasiva de las membranas se estimó acoplado el transporte de protones asociado a la H^+ -ATPasa de plasmalema a la actividad hexoquinasa que utiliza el ATP para catalizar la reacción de la formación de glucosa-P a partir de glucosa. De esta forma impide la reacción de hidrólisis del ATP necesario para llevar a cabo el bombeo de H^+ por la enzima ATPasa.

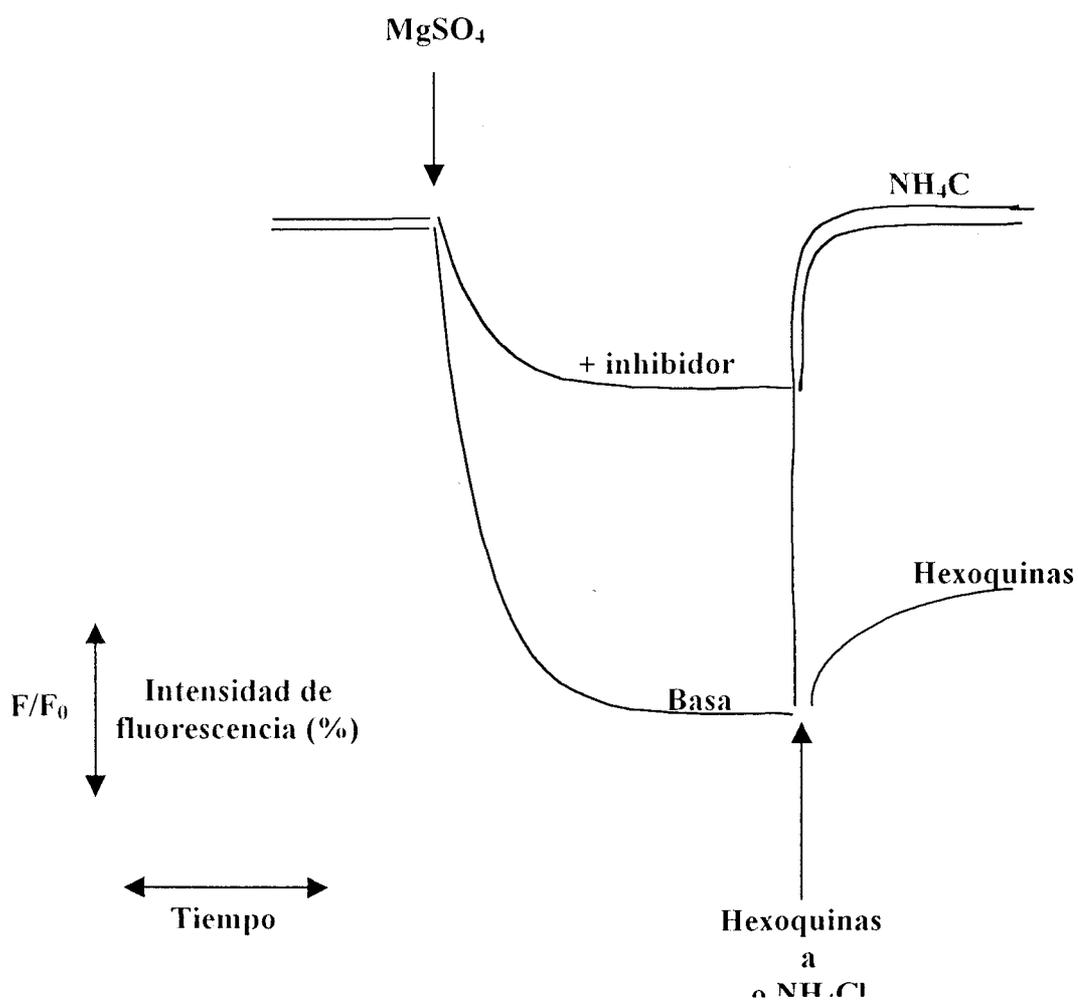


Figura 4. Esquema representativo de la extinción de fluorescencia del ACMA como consecuencia del transporte de H^+ dependiente de ATP en vesículas de membrana de callos de tomate.

Para realizar esta determinación, las vesículas de membrana se incubaron en el medio de reacción descrito anteriormente y una vez establecido el gradiente de H^+ creado por acción del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema, se adicionaron 25 mM glucosa y 10 unidades/ml hexoquinasa. La permeabilidad pasiva, representada por la capacidad de disipación del gradiente de H^+ creado por la H^+ -ATPasa, fue expresada como velocidad inicial de recuperación de la emisión de fluorescencia ($VQr = Fo/ti/mg\ prot. \% \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$) y como tiempo medio ($t_{1/2}$, min) necesario para recuperar el 50 % de la fluorescencia extinguida. Finalmente, para recuperar el valor inicial de emisión de fluorescencia, se disipó el gradiente de H^+ con 10 mM NH_4Cl que actuó como agente permeabilizante de la membrana (Figura 4.).

C.4. Detección inmunológica de la H^+ -ATPasa de plasmalema

La detección inmunológica de la H^+ -ATPasa de plasmalema se realizó mediante técnicas de inmunoblotting con anticuerpos específicos producidos en conejo frente a una proteína de fusión conteniendo el extremo carboxilo terminal de la H^+ -ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis thaliana*. Tras la separación de las proteínas microsomales por electroforesis en SDS-PAGE, estas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa que se incubó con el anticuerpo primario, revelándose la reacción antígeno-anticuerpo mediante anticuerpos secundarios ligados a fosfatasa alcalina.

C.4.1. Solubilización de las proteínas

Las proteínas microsomales 150 μ g se incubaron a 4 °C en 100 μ l de TCA al 10 % durante 20 min. Tras centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 15 min (Sorvall Microspin 12S), se adicionó al sedimento protéico resultante 1 ml de H_2O destilada y se mantuvo en hielo durante 25 minutos, con agitación cada 5 minutos. A continuación, se centrifugó a 12.000 g durante 3 min y las proteínas precipitadas se solubilizaron por incubación a temperatura ambiente durante 40 minutos 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 μ g. ml^{-1} de quimostatina. El material insoluble se eliminó por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 3 minutos.

C.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

La separación de las proteínas solubilizadas se llevó a cabo en geles discontinuos de poliacrilamida (Laemmli, 1970) en un equipo Mini Protean II de Bio-Rad para geles de 1 mm de espesor, utilizando como gel de resolución una solución al 10 % de una mezcla de acrilamida/bisacrilamida (30:0.8, p:p) y como gel de empaquetamiento una solución al 4% de la mezcla anterior de acrilamida/bisacrilamida (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de los geles de acrilamida utilizados para la separación por SDS-PAGE de las proteínas microsomaes de callos de tomate.

	Gel de Empaquetamiento	Gel de Resolución
Tris-HCl pH 8.8	-	375 mM
Tris-HCl pH 6.8	125 mM	-
SDS (P/V)	0.1 %	0.1 %
Acrilamida/Bisacrilamida (30:08)	4 %	10 %
Persulfato amónico (P/V)	0.05 %	0.05 %
TEMED (V/V)	0.1 %	0.05 %

En los geles de electroforesis se cargaron 150 µg de las proteínas microsomaes solubilizadas y patrones de peso molecular conocido (High Molecular Weight Standards, Bio-Rad). La separación se realizó a 100 voltios y temperatura ambiente, utilizando como tampón de electroforesis 25 mM Tris, 192 mM glicina, y 0.1 % SDS (p/v). Cuando el frente de azul de bromofenol se situó a 1 cm del borde inferior del gel, se detuvo la electroforesis procediéndose, posteriormente, a la tinción de los geles con azul de Coomassie o a su electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa para llevar a cabo la inmunodetección de la H⁺-ATPasa de plasmalema con anticuerpos específicos.

C.4.3. Tinción con Coomassie

El revelado de las distintas bandas de proteínas separadas en el gel de SDS-PAGE se realizó por incubación de los geles durante una hora con agitación constante, en una solución al 0.25 % de azul Coomassie R-250 en metanol, ácido acético y agua (40:10:50, v/v/v). Tras sucesivos lavados en una solución de metanol, ácido acético y agua (40:10:50, v/v/v) durante 4 horas, se hicieron visibles las diferentes bandas de proteínas en los geles.

C.4.4. Electrotransferencia

Las proteínas fueron transferidas del gel de electroforesis a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm de tamaño de poro (Bio-Rad) (Towbin y col., 1979). La transferencia se realizó en un equipo de Mini Trans-blotTM de Bio-Rad, a un voltaje constante de 100 V, durante una hora, en frío y utilizando un tampón constituido por 25 mM Tris, 192 mM glicina y 20 % metanol. A fin de visualizar el grado de transferencia y señalar las diferentes bandas de los patrones de peso molecular, la membrana de nitrocelulosa fue teñida con Ponceau S al 0.1%, (p/v) en 1 % (v/v) de ácido acético, previamente a la incubación con anticuerpos anti H⁺-ATPasa.

C.4.5. Inmunodetección de la H⁺-ATPasa de plasmalema

Con el objeto de bloquear las posibles reacciones inespecíficas del anticuerpo, la membrana de nitrocelulosa a la que habían sido transferidas las proteínas microsomales tras separación en SDS-PAGE fue incubada durante una hora a temperatura ambiente en 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl y 2 % (p/v) de leche en polvo desnatada que actúa como agente bloqueante. La membrana de nitrocelulosa se incubó con una dilución 1:500 del anticuerpo anti H⁺-ATPasa en el tampón de bloqueo descrito. Tras 15 horas de incubación a 4 °C con agitación, la membrana de nitrocelulosa fue sometida a 3 lavados sucesivos de 5 minutos con el tampón de bloqueo al objeto de eliminar el anticuerpo no fijado al filtro de nitrocelulosa.

Para el revelado de la reacción antígeno-anticuerpo la membrana de nitrocelulosa se incubó 3 horas con una dilución de 1:5000 del anticuerpo secundario ligado a la fosfatasa alcalina (anti IgG de conejo, Promega) en el tampón de bloqueo. Tras dos lavados de 5 minutos con el tampón de bloqueo, para eliminar los restos del anticuerpo secundario, y un lavado rápido con 100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂, se procedió al revelado de la reacción de la fosfatasa

alcalina utilizando como sustratos cromogénicos BCIP y NBT, incubando para ello la membrana de nitrocelulosa en una solución 100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂ conteniendo 33 µg. ml⁻¹ de BCIP y 16.5 µg. ml⁻¹ de NBT. Finalmente, la reacción de la fosfatasa alcalina fue detenida por lavado del filtro con agua destilada.

C.5. Análisis de los lípidos de la membrana plasmática

C.5. 1. Extracción de lípidos totales

La extracción de los lípidos totales a nivel de la fracción de plasmalema purificada por partición de fases (apartado C.2.) se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Vorbeck y Martinetti (1965) con algunas modificaciones. Sobre 1 mg de proteínas de plasmalema se adicionaron 4 ml de isopropanol hirviendo, manteniéndose durante 2 minutos a fin de inactivar las fosfolipasas (Douce, 1964). Se homogenizó el conjunto en Potter-Elvehjem y a continuación se añadieron, sucesivamente, 2 ml de isopropanol, 3 ml de una mezcla de cloroformo: isopropanol (1:1, v/v), dos veces, y 1.2 ml de cloroformo, siguiendo a cada adición una homogenización similar a la anterior. El homogenado fue filtrado a través de papel Whatman N° 1 y evaporado a sequedad en speed vacuum a 35 °C extrayéndose el residuo lipídico resultante con 6 ml de cloroformo: metanol (2:1, v/v). Seguidamente, se adicionó 1 ml de 1 % NaCl, centrifugándose el conjunto a 2.000 g durante 3 minutos. La fase inferior clorofórmica fue recogida y llevada a sequedad en speed vacuum a 35 °C disolviéndose el residuo seco obtenido en una mezcla de benceno: etanol (4:1, v/v), que se conservó a -80 °C hasta su posterior utilización.

El análisis de los ácidos grasos de lípidos totales de la membrana plasmática se realizó por cromatografía de gases según la metodología descrita en el apartado B.3.2. para el estudio de la composición en ácidos grasos de lípidos totales de callos utilizando el éster metílico del ácido heptadecanoico como patrón interno.

C.5.2. Separación de fosfolípidos

La separación de las diferentes moléculas fosfolípidicas de la membrana plasmática se realizó a partir del extracto de lípidos totales por cromatografía en capa fina según se indica en el

apartado B.3.3. Las diferentes bandas de lípidos separadas en la capa fina fueron reveladas y visualizadas mediante una breve exposición a vapores de yodo y observación a la luz ultra violeta. La identificación de cada uno de los fosfolípidos se llevó a cabo mediante el desarrollo cromatográfico de los lípidos problema frente a patrones.

C.5.3. Análisis de ácidos grasos de fosfolípidos

El análisis de ácidos grasos de diferentes fosfolípidos de la membrana plasmática se realizó por cromatografía en fase gaseosa como se describe en el apartado B.3.4. y B.3.5.

El índice de doble enlace se calculó como la suma siguiente:

$$\text{IDE} = 1 \times (\% 18:1) + 2 \times (\% 18:2) + 3 \times (\% 18:3) \text{ (Merillon y col., 1993)}$$

C.5.4. Análisis de esteroides libres

La composición y cuantificación de los esteroides libres totales de las vesículas de membrana plasmática, se ha realizado a partir de una alícuota del extracto de lípidos totales de plasmalema según se describe en el apartado B.3.6. para el análisis de estas moléculas en callos.

C.6. Determinación del grado de fluidez de la membrana plasmática

La anisotropía de fluorescencia permite obtener información sobre las propiedades de fluidez de las membranas (Shinitzki y Barenhloz, 1978). Cuando una luz polarizada es dirigida hacia un cromóforo cuyo momento dipolar de excitación está alineado con el vector eléctrico de la luz de excitación, el cromóforo absorbe preferencialmente esta luz. Puesto que los procesos de absorción son mucho más rápidos que las rotaciones moleculares, el uso de una luz polarizada crea una población de fluoróforos excitados con una orientación preferencial. Como la emisión de un fotón por el fluoróforo excitado requiere más tiempo que la absorción, el fluoróforo podrá reorientarse antes de que tenga lugar la emisión: definiéndose la polarización de fluorescencia resultante como anisotropía de fluorescencia en el estado estacionario.

$$r_s = (I_V - I_H)/(I_V + 2I_H)$$

Donde I_V y I_H son las intensidades medidas en dirección paralela y perpendicular al vector eléctrico de la luz de excitación.

En nuestro estudio, para determinar el grado de fluidez de la membrana plasmática de callos de tomate se han utilizado dos sondas Fluorescentes: DPH y TMA-DPH. La primera es una sonda de naturaleza hidrofóbica con gran afinidad por las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos de los fosfolípidos, lo que permite obtener información sobre la movilidad de dichas cadenas. La segunda, además de la región hidrofóbica, posee un grupo hidrofílico (amonio cuaternario), anclándose en la unión de la cabeza polar hidrofílica de los fosfolípidos con la región hidrofóbica de los ácidos grasos, quedando la parte hidrofóbica de la sonda alineada con dichos ácidos grasos. Esta sonda, permite obtener información sobre la fluidez de la superficie de la membrana (Lenz, 1989).

Para la determinación de la polarización de la sonda DPH incluida en la membrana se incubó 40 µg de proteína de membrana en 1 ml de 50 mM NaHCO₃ pH 7.0 que contenía 6 µM DPH, en condiciones de oscuridad y agitación durante 20 minutos a 27 °C. Las determinaciones con la sonda TMA-DPH se realizaron de manera similar a la descrita para el DPH, utilizando en ambos casos un espectrofluorímetro (Shimadzu modelo RF540), provisto de dos polarizadores entre cada uno de los monocromadores y la muestra, así como de sistemas de agitación magnética y termostatación. Las medidas se han llevado a cabo a unas longitudes de onda de excitación y emisión de 360 nm y 420 nm, respectivamente.

V. Resultados

A. Efecto del NaCl sobre el crecimiento de los callos, contenido en iones minerales y acumulación de solutos orgánicos

A.1. Crecimiento de los callos

El efecto de la salinidad sobre las plantas se manifiesta en primer lugar a nivel del crecimiento celular. Por ello, este componente fue uno de los primeros parámetros estudiados como índice de tolerancia al NaCl. En este sentido, se transfirieron 0.6 g de callos controles y adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl en fase exponencial de crecimiento a medios de multiplicación conteniendo diferentes concentraciones de NaCl. El crecimiento de dichos callos fue estudiado durante un tiempo de 7 semanas determinándose el índice de crecimiento relativo, pesos fresco y seco finales así como el contenido en materia seca (Figuras 1., 2., 3. y 4.; Tablas 1. y 2.).

Los callos controles y tratados con diferentes concentraciones de NaCl presentaban una curva sigmoidea de crecimiento con las características fases de retraso, una a dos semanas, fase exponencial, 4 semanas, y fase estacionaria. El efecto del NaCl sobre el crecimiento de los callos varió según la concentración del NaCl en el medio de cultivo y la duración del tratamiento salino (Figuras 1. y 2.).

En relación a los callos controles, la adaptación al NaCl no produjo cambios significativos ni en la duración de la fase inicial de retraso ni en el índice de crecimiento relativo de los callos durante esta fase de crecimiento. Sin embargo, durante la fase exponencial de crecimiento los callos adaptados a 25 y 50 mM NaCl muestran un incremento superior al 15 % en el índice de crecimiento relativo respecto a los callos controles mientras que los callos adaptados a 100 mM NaCl muestran una reducción del 40 % en dicho parámetro comparativamente a los callos controles (Figuras 1.a y 3.). Además, la adaptación a 25 y 50 mM NaCl indujo un incremento del 20 y 30 % en el peso seco, respectivamente, en comparación a los callos controles mientras que la adaptación a 100 mM NaCl disminuyó en un 8% el peso seco de los callos (Tabla 1.). En consecuencia, los callos adaptados a 25 y 50 mM NaCl no muestran diferencias significativas en el contenido en materia seca en relación al controles, mientras que los callos adaptados a 100 mM NaCl presentan mayor contenido en materia seca que los callos controles (Tabla 1.)

El desarrollo de los callos controles durante 7 semanas en medios con 25 mM NaCl no provocó cambios en el índice de crecimiento relativo, mientras que medios con 50 y 100 mM de NaCl provocaron una disminución en dicho parámetro de un 26 y un 59 %, respectivamente (Figuras 1.b. y 3.). Por otra parte, el crecimiento de los callos controles durante 7 semanas en

Resultados

presencia de 50 y 100 mM NaCl provoca una disminución del peso fresco de los callos, que en el caso de los callos crecidos en 100 mM NaCl se manifestó también en un importante descenso de un 35 % del peso seco de los mismos (Tabla 1.). El desarrollo de los callos controles durante un subcultivo en medios conteniendo 25 mM de NaCl no altera el contenido hídrico de los callos; mientras que el tratamiento con 50 ó 100 mM NaCl reduce significativamente dicho contenido (Tabla 1.).

Tabla 1. Peso fresco, peso seco y contenido en materia seca de callos de tomate desarrollados durante 7 semanas en medios de cultivo conteniendo diferentes concentraciones de NaCl. Los resultados son media de 4 experimentos independientes, representando letras diferentes en la misma columna valores significativamente diferentes según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan. P= 95%

Tratamientos	Peso fresco (g)	Peso seco (mg)	Contenido en materia seca (% PS/PF)
Callos controles	36.69 ^a	1100.7 ^a	3.00 ^a
Adaptados a:			
25 mM NaCl	42.40 ^b	1314.5 ^b	3.10 ^a
50 mM NaCl	42.57 ^b	1456.1 ^c	3.42 ^a
100 mM NaCl	21.87 ^c	1010.8 ^d	4.62 ^b
Controles desarrollados durante un subcultivo en:			
25 mM NaCl	36.70 ^a	1104.7 ^a	3.01 ^a
50 mM NaCl	27.06 ^d	1085.1 ^a	4.01 ^c
100 mM NaCl	14.83 ^c	711.7 ^c	4.80 ^d

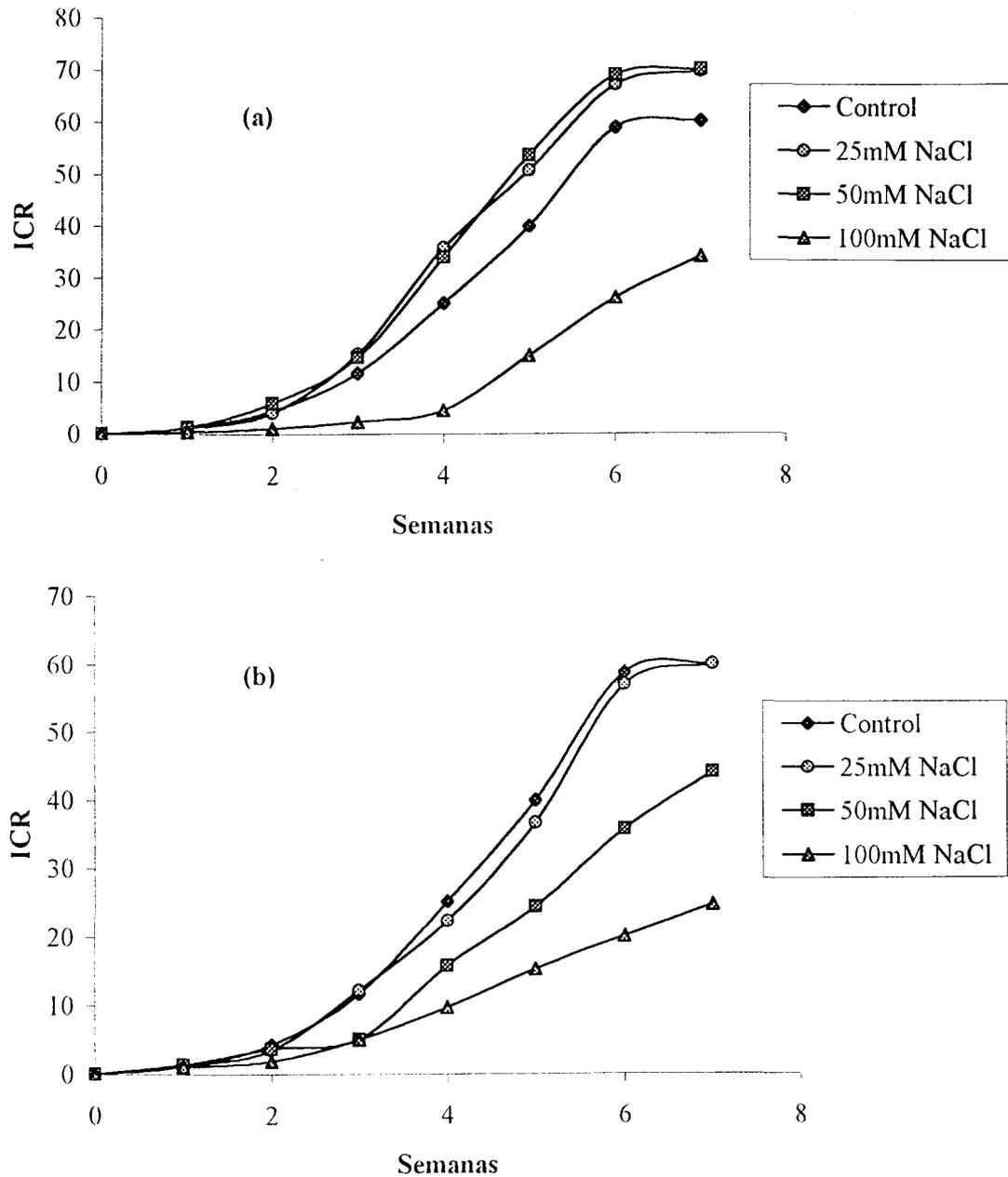
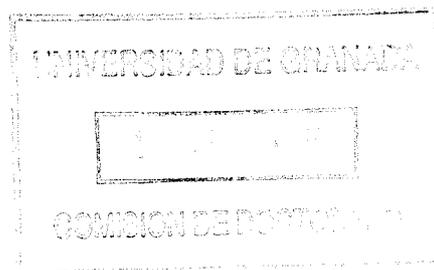


Figura 1. Índice de crecimiento relativo (ICR) de callos de tomate (a) callos controles y adaptados a distintas concentraciones de NaCl, (b) callos controles desarrollados durante un subcultivo en medios conteniendo distintas concentraciones de NaCl. Los resultados son media de 4 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.



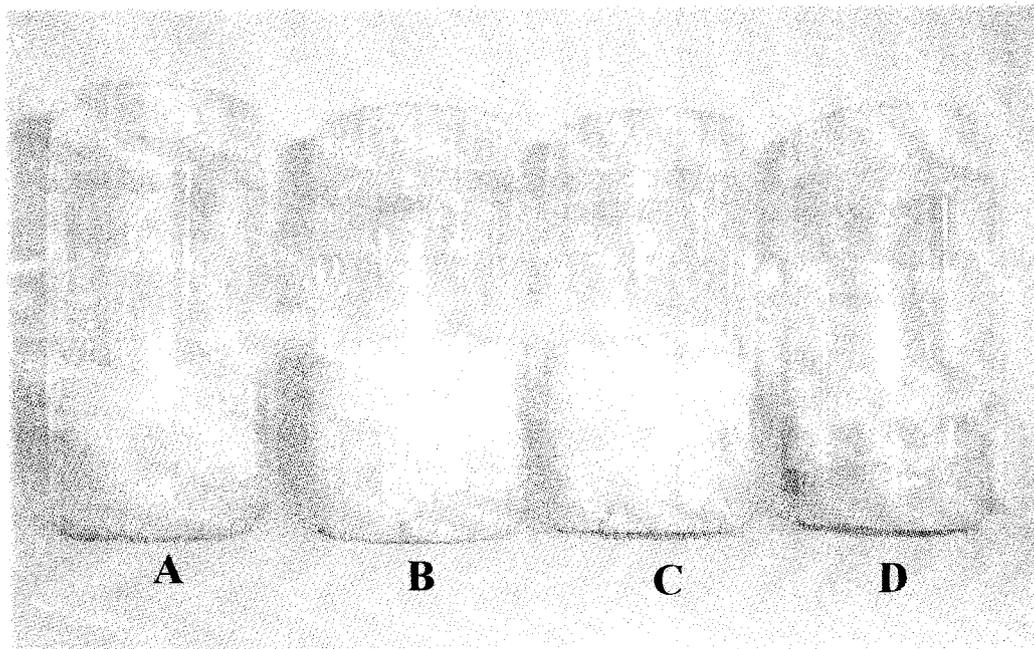


Figura 2. Callos controles y adaptados a diferentes concentraciones de NaCl en fase exponencial de crecimiento (4 semanas) de cultivo. A, Callos controles; B, Callos adaptados a 25 mM NaCl; C, Callos adaptados a 50 mM NaCl; D, Callo adaptado a 100 mM NaCl

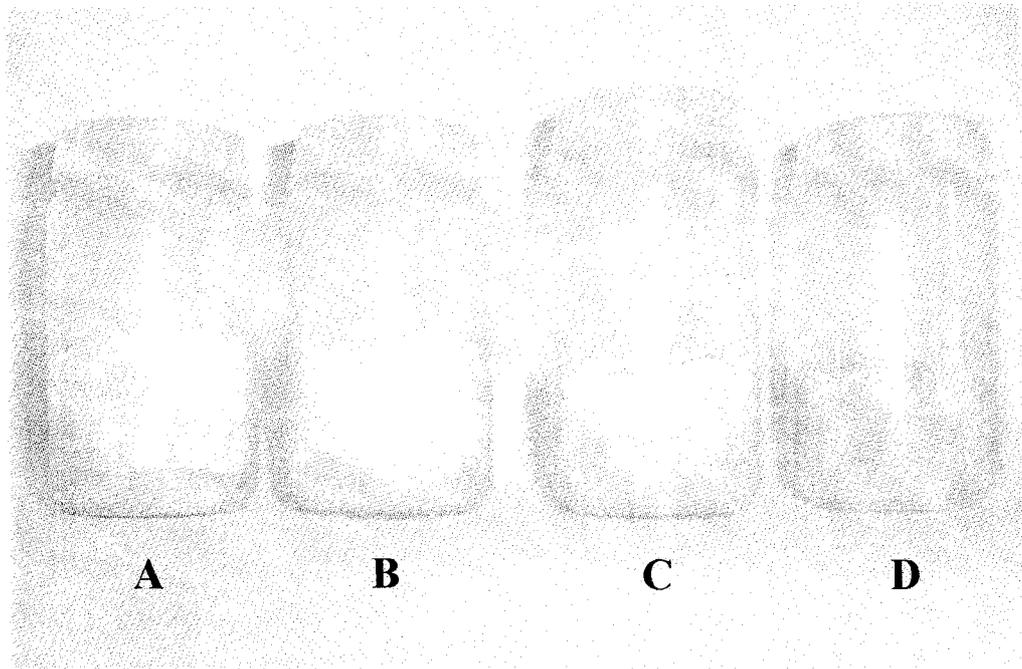


Figura 3. Callos controles desarrollados durante un subcultivo en ausencia de NaCl y en presencia de diferentes concentraciones de NaCl. A, sin NaCl; B, 25 mM NaCl; C, 50 mM NaCl; D, 100 mM NaCl)

Resultados

Para estudiar el grado de estabilidad de las propiedades adaptativas de los callos de tomate adaptados al NaCl (50 mM) se realizaron dos tipos de aproximaciones. Por una parte, los callos adaptados a 50 mM NaCl fueron transferidos a medios de cultivo suplementados con 100 mM NaCl durante un subcultivo y, por otra parte, los callos adaptados a 50 mM NaCl se deadaptaron mediante 6 subcultivo sucesivas en medios desprovistos de NaCl y posteriormente, se transfirieron nuevamente a medios suplementados con 50 mM NaCl durante un subcultivo. El desarrollo de los callos adaptados a 50 mM NaCl en presencia de 100 mM NaCl durante un subcultivo no produjo cambios significativos en el índice de crecimiento relativo, peso fresco y contenido en materia seca (Figura 4, Tabla 2.). La deadaptación indujo solo un pequeño descenso en el peso fresco y seco de los callos, y el cultivo de los callos deadaptados en presencia de 50 mM NaCl durante un subcultivo únicamente provocó un leve incremento en el contenido en materia seca (Tabla 2.).

Tabla 1. b. Peso fresco, peso seco y contenido en materia seca de callos de tomate adaptados a 50 mM NaCl y, posteriormente, cultivados en presencia de distintas concentraciones de NaCl durante uno o varios subcultivos Tras 7 semanas de cultivo. Los resultados son media de 4 experimentos independientes, representando letras iguales en la misma columna valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, P= 95%

Tratamientos salinos	Peso fresco (g)	Peso seco (mg)	Contenido en materia seca (% PS/PF)
Callo adaptado a 50 mM NaCl transferido a:			
medio conteniendo 50 mM NaCl durante un subcultivo	42.57 ^a	1456.1 ^a	3.42 ^a
medio control durante 6 subcultivos	40.42 ^b	1319.9 ^b	3.26 ^a
medio control durante 6 subcultivos y posteriormente, a medio conteniendo 50 mM NaCl durante un subcultivo	39.30 ^b	1419.9 ^a	3.61 ^b
medio conteniendo 100 mM NaCl durante un subcultivo	44.81 ^a	1451.9 ^a	3.24 ^a

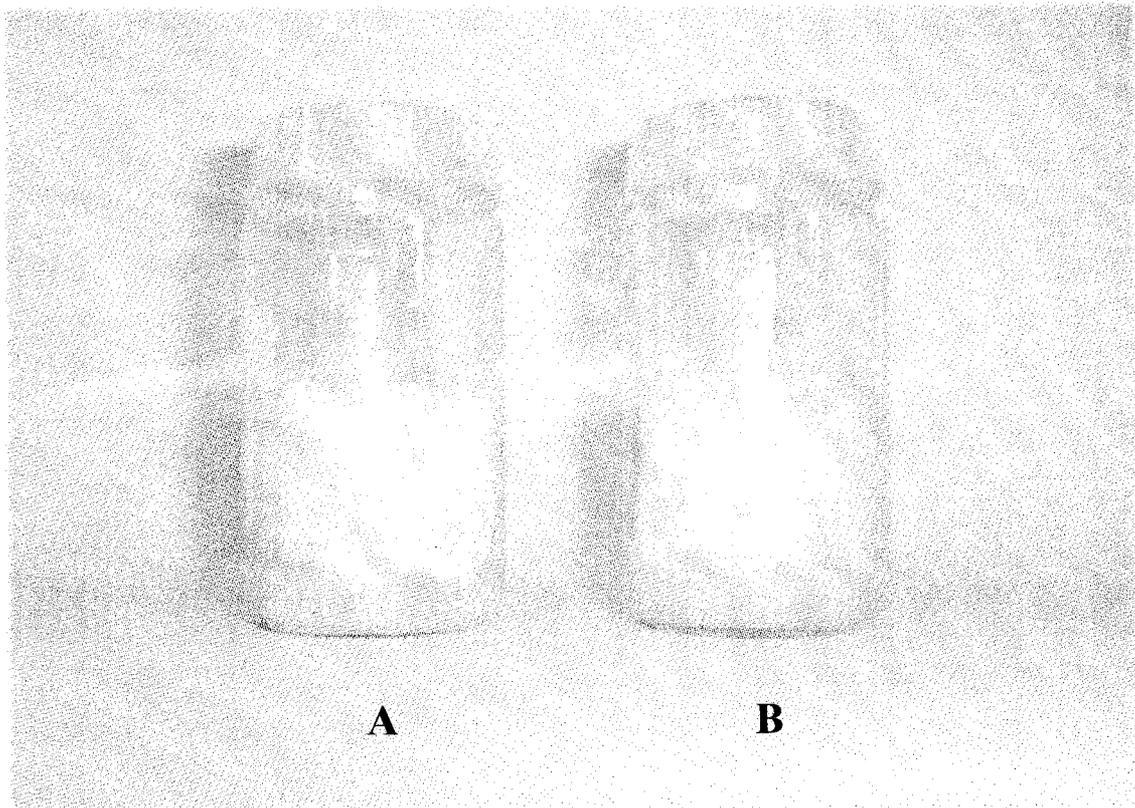


Figura 4. Callos adaptados a 50 mM NaCl mantenidos durante un subcultivo en medios conteniendo 50 mM NaCl (A) ó 100 mM de NaCl (B).

A.2. Diámetro celular

La adaptación de los callos a 50 mM NaCl no provocó cambios en el diámetro celular respecto al valor detectado en células de callos controles. Sin embargo, la adaptación de los callos a 100 mM NaCl indujo una reducción superior al 25 % en el diámetro celular de los callos (Tabla 3).

Tabla 3. Diámetro medio de células de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en μm , son media de 6 medidas independientes. Letras iguales en la misma columna, representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $P= 95\%$.

Tratamientos	Diámetro celular
Callos controles	30 ^a
Callos adaptados :	
50 mM NaCl	28 ^a
100 mM NaCl	22 ^b

A.3. Actividad respiratoria

En relación a los callos controles, los callos adaptados a 50 mM NaCl mostraron un incremento en la tasa respiratoria. La transferencia y mantenimiento durante 48 horas de los callos controles a medios conteniendo 100 mM NaCl provocó una disminución de la respiración celular no observándose diferencias significativas en el caso de callos adaptados a 50 mM NaCl (Tabla 4.).

Tabla 4. Respiración celular de callos controles y adaptados a 50 mM NaCl, y después de estresados durante 48 horas con 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{g CO}_2 \text{ liberado.g}^{-1}$ peso fresco.hora⁻¹, son media de 3 experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna, representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $P= 95\%$.

Tratamientos	Respiración ($\mu\text{g CO}_2, \text{g}^{-1}, \text{h}^{-1}$.)
Callos controles	247.6 ^a
+ 100 mM NaCl	168.8 ^b
Callos adaptados a 50 mM NaCl	290.7 ^c
+ 100 mM NaCl	264.3 ^c

A.4. Composición y contenido en iones inorgánicos

La Figura 5. a. muestra el contenido celular en Cl^- , K^+ , Na^+ y Ca^{2+} de callos de tomate control y adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl. El contenido de Cl^- y Na^+ en los callos adaptados al NaCl es muy superior al de los callos controles incrementándose proporcionalmente a la concentración de sal en el medio de cultivo. Por el contrario, el contenido de K^+ y Ca^{2+} es sensiblemente inferior en los callos adaptados. En consecuencia, la razón K^+/Na^+ es significativamente menor en los callos adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl que en los callos controles (Tabla 5.).

Los resultados obtenidos indican también que el contenido celular de Na^+ y Cl^- en los callos controles aumentó tras un subcultivo en presencia de diferentes concentraciones salinas, siendo dicho incremento proporcional a la concentración de NaCl en el medio de cultivo. Por otra parte, el contenido en iones K^+ y Ca^{2+} no se vió afectado significativamente tras mantener los callos controles durante un subcultivo en 25 mM NaCl, mientras que se redujó considerablemente en 50 y 100 mM NaCl (Figura 5.b.). Del mismo modo, la aplicación de NaCl durante un subcultivo a los callos controles indujó una mayor acumulación de Na^+ y Cl^- que en los callos adaptados al NaCl, lo que determina una mayor razón K^+/Na^+ en los callos adaptados (Tabla 5.)

El desarrollo de los callos adaptados a 50 mM NaCl durante un subcultivo en presencia de 100 mM NaCl, no afectó al contenido de K^+ y Ca^{2+} , observándose un pequeño incremento en el contenido de Na^+ y Cl^- (Figura 6.).

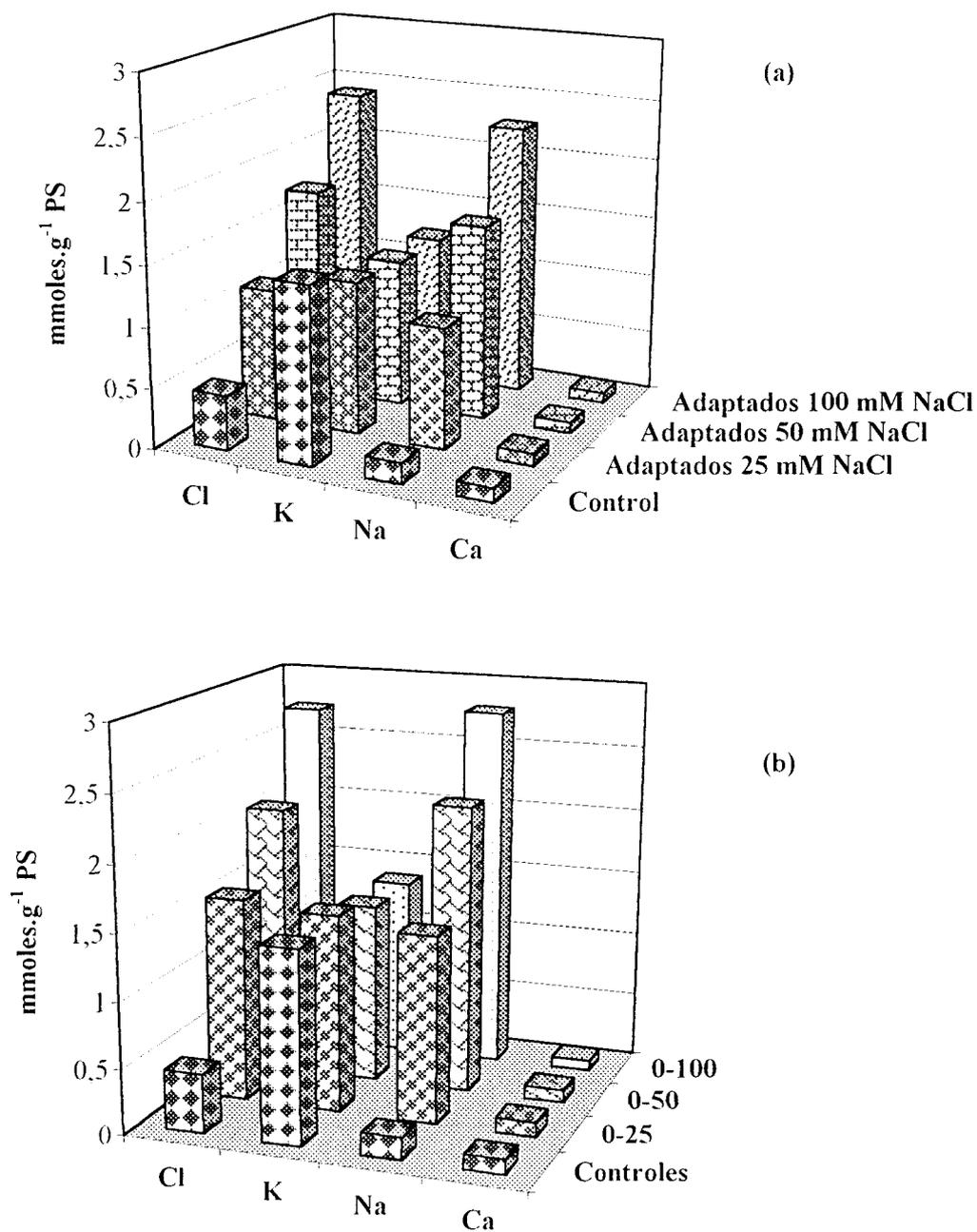


Figura 5. Contenido en iones Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- de callos de tomate. (a) callos controles y adaptados a distintas concentraciones de NaCl, (b) callos control desarrollados durante un subcultivo en medios con 25 (0-25), 50 (0-50) ó 100 (0-100) mM NaCl. Los resultados, expresados en mmoles. g⁻¹ de peso seco, son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

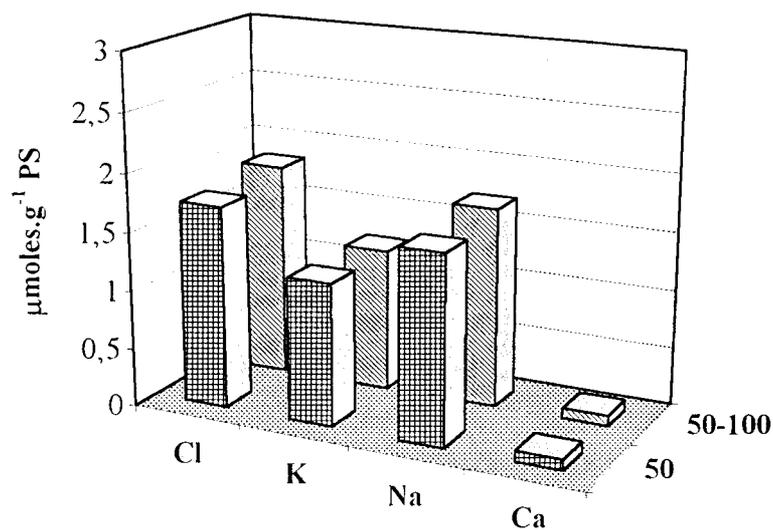


Figura 6. Contenido en iones Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , y Cl^- de callos adaptados a 50 mM NaCl (50) o de estos callos desarrollados durante un subcultivo en presencia de 100 mM NaCl (50-100). Los resultados, expresados en $\mu\text{moles.g}^{-1}$ de peso seco, son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

Resultados

Tabla 5. Razón K^+/Na^+ en callos controles y adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl y en callos controles y adaptados a 50 mM NaCl transferidos durante un subcultivo a medios con diferentes concentraciones salinas. Los resultados son media de 3 experimentos independientes. Letras iguales representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $P= 95\%$.

Tratamientos	K^+/Na^+
Callos controles	8.38 ^a
Callos adaptados:	
25 mM NaCl	1.26 ^b
50 mM NaCl	0.76 ^c
100 mM NaCl	0.54 ^d
Callos controles mantenidos un subcultivo en:	
25 mM NaCl	1.05 ^e
50 mM NaCl	0.62 ^f
100 mM NaCl	0.49 ^g
Callos adaptados 50 mM NaCl mantenido un subcultivo en 100 mM NaCl	0.71 ^c

Para determinar los cambios provocados por un estrés salino de corta duración sobre el contenido iónico celular, se analizó el contenido en iones Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} en los callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl disgregados en medio líquido de composición idéntica al medio de multiplicación del callo durante 12 horas a 27 °C y en oscuridad, y posteriormente filtrados e incubados durante una hora en 100 mM NaCl (apartado B.6.3. de Material y Métodos). Se observó, un fuerte incremento en la concentración celular de Na^+ y Cl^- , sobre todo, en los callos controles, mientras que el estrés de una hora con 100 mM NaCl redujo de forma generalizada el contenido en K^+ y Ca^{2+} , sobre todo, en los callos adaptados a 100 mM NaCl (Tabla 6.).

Tabla 6. Cambios inducidos en la concentración celular de Na^+ , Cl^- , K^+ y Ca^{2+} de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl tras una hora en 100 mM NaCl. Los resultados, expresados como porcentaje de la concentración de iones en condiciones de estrés respecto a los valores basales, son media de 3 experimentos independientes que difieren en mas de un 15 %.

Tratamientos	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺
Callos controles				
<i>Condiciones Basales (mmoles. g⁻¹)</i>	0.41	0.16	1.40	0.11
<i>+ estrés con 100 mM NaCl (%)</i>	229	547	114	85
Adaptados a 50 mM NaCl				
<i>Condiciones Basales (mmoles. g⁻¹)</i>	1.58	1.53	1.17	0.097
<i>+ estrés con 100 mM NaCl (%)</i>	124	190	82	81
Adaptados a 100 mM NaCl				
<i>Condiciones Basales (mmoles. g⁻¹)</i>	2.19	2.14	1.17	0.085
<i>+ estrés con 100 mM NaCl (%)</i>	143	139	49	81

A. 5. Componentes orgánicos solubles

El contenido intracelular de malato en los callos controles y adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl se muestra en la Figura 7. En comparación a los callos controles, la adaptación a 25, 50 y 100 mM NaCl indujo una disminución del contenido en malato.

Cuando los callos controles fueron cultivados en presencia de 25 mM NaCl durante un subcultivo no se vió afectado el contenido intracelular de malato, mientras que el desarrollo en medios suplementados con 50 ó 100 mM NaCl redujo significativamente dicho contenido en los callos. Por otra parte, la transferencia durante un subcultivo de los callos adaptados a 50 mM NaCl a medios conteniendo 100 mM NaCl no cambió significativamente la concentración intracelular de malato (Figura 8.).

La determinación del contenido intracelular en azúcares libres totales de los callos controles y adaptados a distintas concentraciones de NaCl mostrado en la Figura 9., indica una acumulación de estos tras la adaptación a la sal. En contraposición, el contenido intracelular en azúcares libres de los callos controles o adaptados a 50 mM NaCl no se afecta tras un subcultivo en medios con 25, 50 ó 100 mM NaCl (Figura 10.).

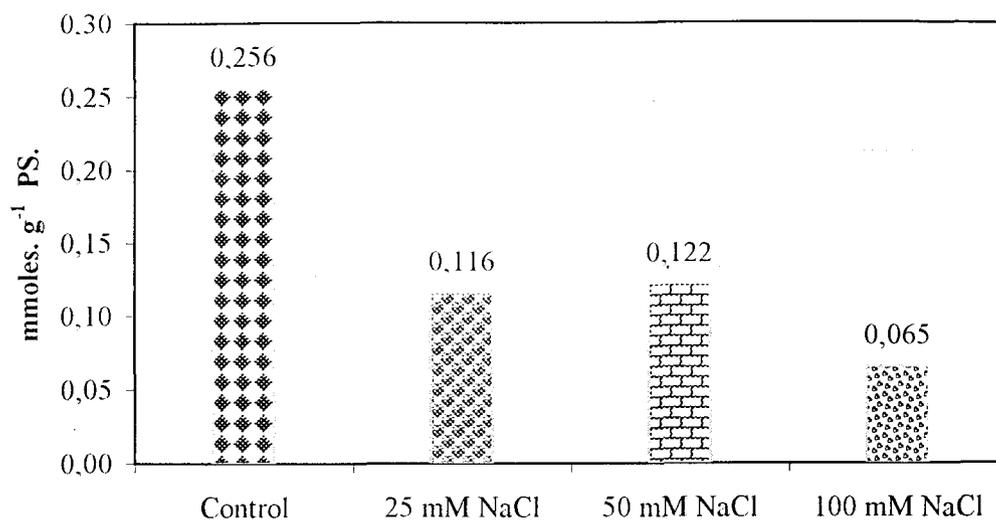


Figura 7. Contenido en malato de callos de tomate controles y adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en mmoles. g⁻¹ de peso seco, son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

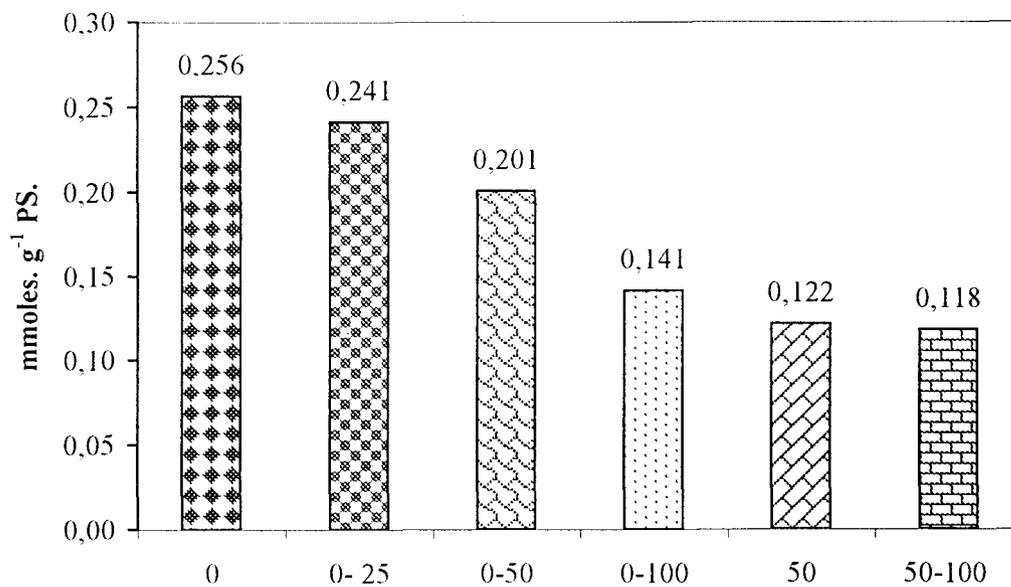


Figura 8. Contenido en malato de callos control y adaptados a 50 mM NaCl, tras ser transferidos durante un subcultivo a medios con diferentes concentraciones de NaCl. Los resultados, expresados en mmoles. g⁻¹ de peso seco, son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio. 0, callos controles; 0-25, callos controles mantenidos en 25 mM NaCl; 0-50, callos controles mantenidos en 50 mM NaCl; 0-100, callos controles mantenidos en 100 mM NaCl; 50, callos adaptados a 50 mM NaCl y 50-100, callos adaptados a 50 mM NaCl transferidos a 100 mM NaCl.

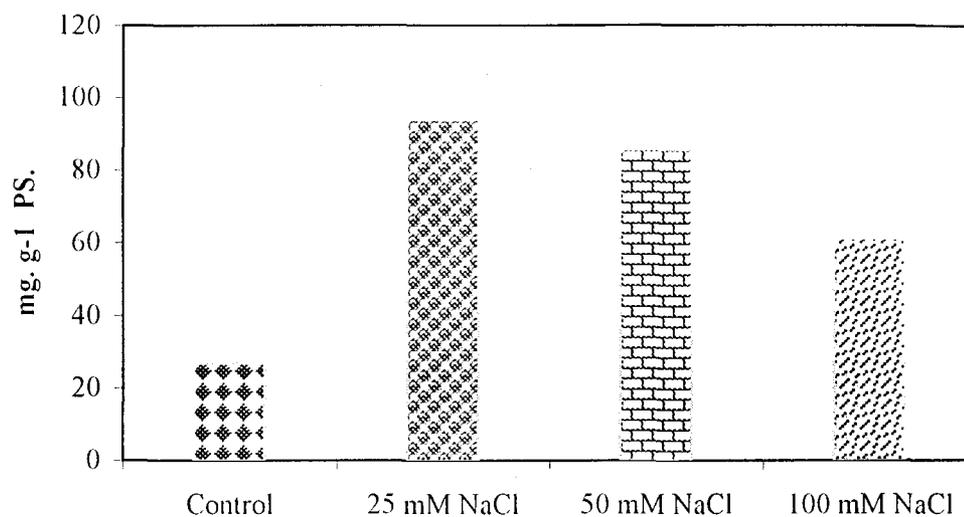


Figura 9. Contenido en azúcares libres totales de callos de tomate controles y adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en mg. g⁻¹ de peso seco, son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

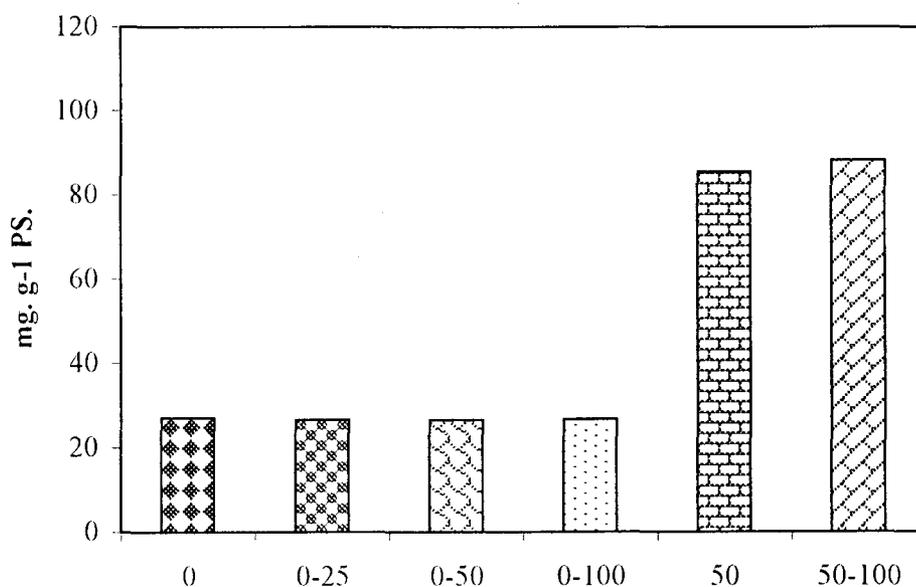


Figura 10. Contenido en azúcares libres totales de callos de tomate control y adaptados a 50 mM NaCl mantenidos durante un subcultivo en presencia de diferentes concentraciones de NaCl. Los resultados, expresados en mg. g⁻¹ de peso seco, son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio. 0, callos controles; 0-25, callos controles crecidos en 25 mM NaCl; 0-50, callos controles crecidos en 50 mM NaCl; 0-100, callos controles crecidos en 100 mM NaCl; 50, callos adaptados a 50 mM NaCl y 50-100, callos adaptados a 50 mM NaCl transferidos a 100 mM NaCl.

Resultados

En cuanto a los cambios en la composición y contenido en aminoácidos libres de callos de tomate, en respuesta a condiciones de adaptación o de mantenimiento durante un subcultivo en medios diferenciales de NaCl, los resultados indicados en la Tabla 7. y Figuras 11., 12., 13. y 14. muestran los siguientes diferencias: un incremento del contenido en cisteína+cistina, lisina, prolina, valina, isoleucina, leucina y fenilalanina y una reducción en ácido aspártico, ácido glutámico, asparragina, serina, arginina, metionina, glutamina y tirosina en callos adaptados a 25 ó 50 mM NaCl, respecto a los callos controles; un aumento del contenido en cisteína+cistina, prolina, treonina, alanina, valina, isoleucina y leucina y una disminución del contenido en ácido aspártico, ácido glutámico, asparragina, arginina, serina, metionina, glutamina, tirosina y fenilalanina en callos adaptados a 100 mM NaCl respecto a los callos controles (Figura 11. y 12.).

Por otra parte, el desarrollo de los callos controles en medios suplementados con NaCl durante un subcultivo no provocó cambios en el contenido total de aminoácidos, aunque tras un subcultivo en medios conteniendo 25 mM NaCl se detectó un incremento en el contenido en cisteína+cistina, lisina, valina y fenilalanina y una disminución en el contenido en ácido aspártico, ácido glutámico, serina, metionina y alanina. Un aumento del contenido en cisteína+cistina, lisina, prolina, valina, isoleucina y fenilalanina y una disminución de ácidos aspártico y glutámico, asparragina, serina, arginina, metionina, glutamina, alanina y tirosina en medios conteniendo 50 mM NaCl y un aumento muy significativo en el contenido de cisteína+cistina, lisina, valina, alanina, isoleucina, leucina y, sobre todo, de prolina, así como una disminución del contenido en glutamina, tirosina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparragina, serina, arginina y metionina, tras un subcultivo en medios con 100 mM NaCl (Figuras 13. y 14.).

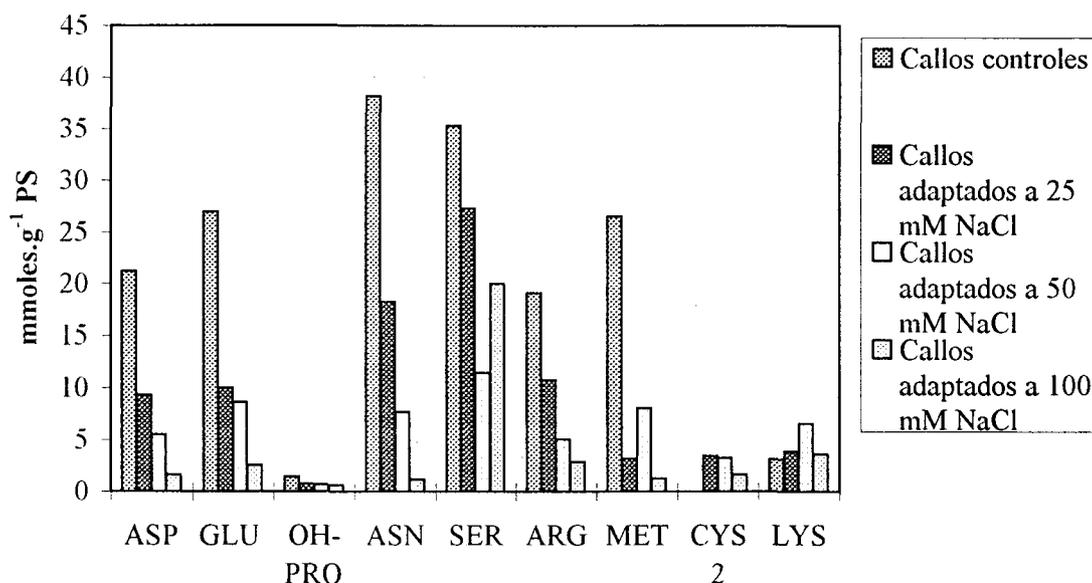


Figura 11. Composición y contenido en aminoácidos libres minoritarios de callos de tomate controles y adaptados a distintas concentraciones de NaCl. Los resultados, expresados en mmoles. g^{-1} de peso seco, son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

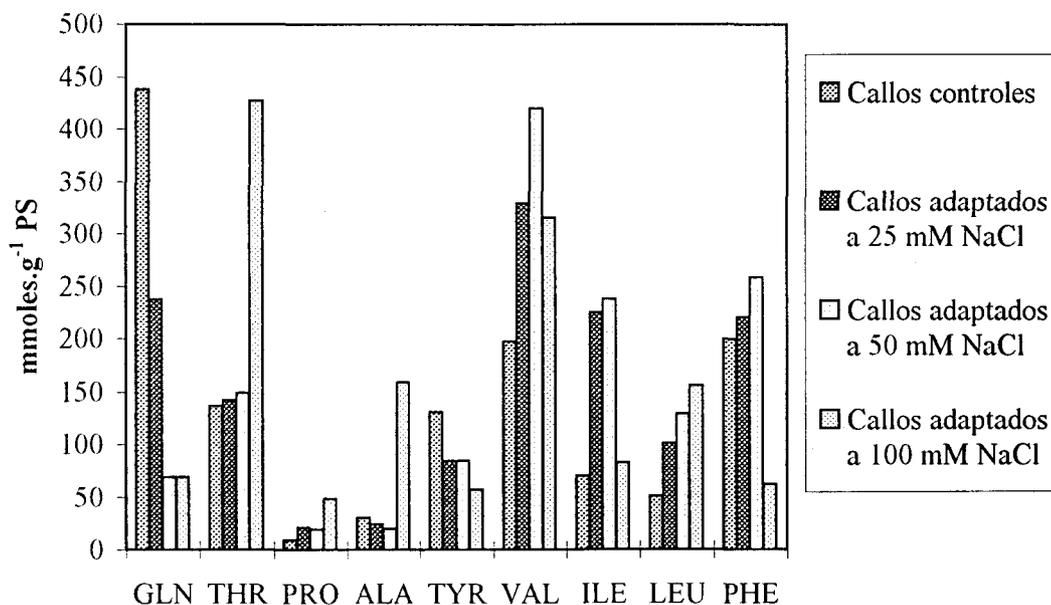
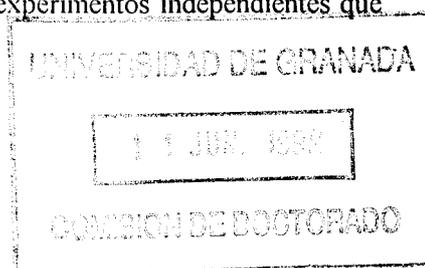


Figura 12. Composición y contenido en aminoácidos libres mayoritarios de callos de tomate control y adaptados a distintas concentraciones de NaCl. Los resultados, expresados en mmoles. g^{-1} de peso seco, son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.



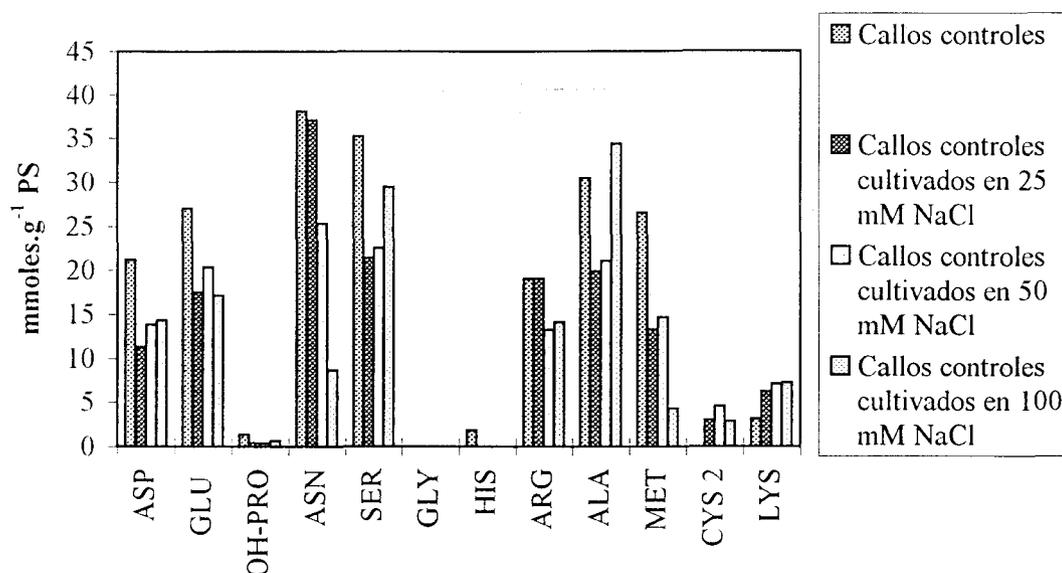


Figura 13. Composición y contenido en aminoácidos libres minoritarios de callos de tomate controles y, posteriormente, mantenidos durante un subcultivo en presencia de diferentes concentraciones de NaCl. Los resultados, expresados en $\text{mmoles} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso seco, son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

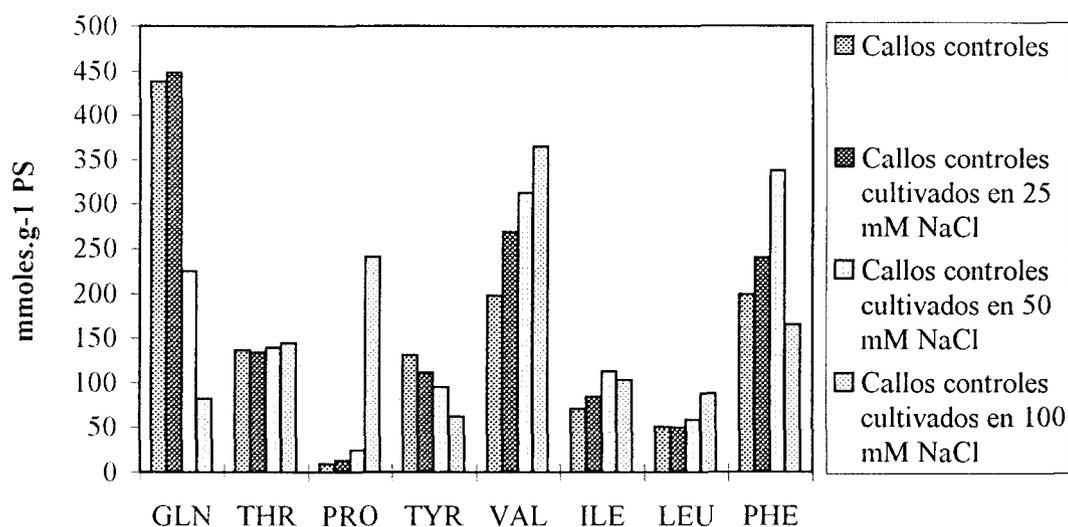


Figura 14. Composición y contenido en aminoácidos libres mayoritarios de callos de tomate controles y, posteriormente, mantenidos durante un subcultivo en presencia de diferentes concentraciones de NaCl. Los resultados, expresados en $\text{mmoles} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso seco, son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

Tabla 7. Contenido en aminoácidos libres totales de callos de tomate control y adaptados a distintas concentraciones de NaCl y de callos controles, posteriormente transferidos durante un subcultivo a medios diferenciales de NaCl. Los resultados, expresados en $\text{mmoles} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso seco, son media de 3 experimentos independientes.

Tratamientos	aminoácidos minoritarios	aminoácidos mayoritarios	aminoácidos totales
Callos controles	204.11 ^a	1232.49 ^a	1436.60 ^a
Callos adaptados a:			
25 mM NaCl	88.14 ^b	1364.00 ^b	1452.14 ^a
50 mM NaCl	56.92 ^b	1367.38 ^b	1424.30 ^a
100 mM NaCl	55.45 ^b	1328.26 ^b	1384.13 ^a
Callos controles crecidos durante un subcultivo en:			
25 mM NaCl	149.38 ^d	1349.58 ^c	1498.97 ^a
50 mM NaCl	143.37 ^d	1303.58 ^c	1447.26 ^a
100 mM NaCl	133.32 ^d	1249.32 ^a	1382.64 ^a

A.6. Contenido en proteína a nivel de callo y microsomas

La concentración en proteínas de callos controles y adaptados al NaCl y posteriormente crecidos durante un subcultivo en medios con distintas concentraciones de NaCl, así como de los microsomas aislados de dichos callos es similar (Tabla 8.).

Tabla 8. Contenido en proteína total en el callo y a nivel de microsomas de callos controles y adaptados al NaCl, así como de estos callos desarrollados durante un subcultivo en presencia de distintas concentraciones de NaCl. Los resultados, expresados como $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso seco de callo, son media \pm DE de 4 experimentos independientes.

Resultados

Tratamientos	Proteína Total	Proteína microsomal
	<i>mg. g⁻¹ PS</i>	<i>mg. g⁻¹ PS</i>
Callos controles	138.05 ±29.15	11.01±3.56
Adaptados a:		
25 mM NaCl	140.58 ±21.34	11.06±2.74
50 mM NaCl	135.18 ±21.05	11.18±2.13
100 mM NaCl	134.51 ±13.54	11.89±2.16
Controles crecidos durante un subcultivo en:		
25 mM NaCl	133.33 ±25.25	11.38±2.63
50 mM NaCl	137.49 ±14.89	11.99±2.28
100 mM NaCl	136.65 ±17.70	10.60±5.45
Adaptados a 50 mM NaCl crecidos durante un subcultivo en 100 mM NaCl	136.09 ±20.92	11.24 ±1.83

A.7. Cambios en la composición y contenido en lípidos.

En la Tabla 9. se muestra los valores correspondientes a la composición y contenido en lípidos totales de callos adaptados a 50 y 100 mM NaCl, así como a callos controles mantenidos en presencia de 50 ó 100 mM NaCl durante un subcultivo. La adaptación de los callos a 50 mM NaCl y el desarrollo de los callos controles en presencia de 50 ó 100 mM NaCl durante un subcultivo no afectaron significativamente al contenido en lípidos totales, mientras que la adaptación a 100 mM NaCl provocó un incremento de dicho contenido. Por otra parte, el porcentaje de fosfolípidos de los callos controles aumentó sensiblemente tras la adaptación a 50 y 100 mM NaCl, así como después de un subcultivo de los callos controles en medios suplementados con 50 ó 100 mM NaCl. En todas las condiciones de NaCl utilizadas, el contenido en esteroides libres totales de los callos no cambió significativamente; sin embargo, el porcentaje de estos componentes respecto a los lípidos totales, fue superior en los callos adaptados a 100 mM NaCl (29 %) respecto a los callos controles (10 %).

Resultados

En consecuencia, la razón esteroides libres/fosfolípidos es menor en los callos adaptados al NaCl que en los callos controles, no detectándose cambios significativos en dicha razón cuando los callos controles fueron desarrollados en medios con 50 ó 100 mM NaCl durante un subcultivo (Tabla 9).

Tabla 9. Lípidos totales, fosfolípidos y esteroides libres de callos controles, adaptados a 50 y 100 mM NaCl y de callos controles desarrollados durante un subcultivo en presencia de 50 y 100 mM NaCl. Los resultados, expresados como $\mu\text{g. mg}^{-1}$ de proteína y % respecto a lípidos totales, son media \pm DE de 3 experimentos independientes.

Tratamientos	Lípidos totales $\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	Fósforo lipídico $\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	%	Esteroides libres $\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	%	Esteroides /fosfolípidos
Callos controles	88.97 \pm 13.70	23.08 \pm 4.22	25.94	9.38 \pm 1.14	10.54	0.41
Callos adaptados						
50 mM NaCl	107.68 \pm 8.01	46.60 \pm 4.73	43.27	8.42 \pm 1.52	7.82	0.18
100 mM NaCl	231.56 \pm 3.94	47.43 \pm 15.65	20.48	8.30 \pm 0.80	29.75	0.17
Callos controles crecidos durante un subcultivo en:						
50 mM NaCl	98.50 \pm 8.20	22.29 \pm 2.74	22.63	10.66 \pm 2.10	10.82	0.48
100 mM NaCl	99.10 \pm 5.44	31.17 \pm 9.82	31.45	11.13 \pm 1.58	11.23	0.36

La composición en ácidos grasos de lípidos totales es común en callos controles y adaptados al NaCl, siendo los ácidos palmítico y linoléico los ácidos grasos mayoritarios en todos los tratamientos (Tablas 10. y 11.). La adaptación de los callos de tomate a 25 y 50 mM de NaCl no indujo cambios significativos en el contenido de ácidos grasos de lípidos totales, mientras que la adaptación a 100 mM NaCl provocó un notable incremento de estos componentes ácidos (Tabla 10.). Por otra parte, el crecimiento de los callos controles durante un subcultivo en medios diferenciales de NaCl no provocó cambios a nivel de la composición y del contenido en ácidos grasos de lípidos totales, incluso cuando se hicieron crecer en 100 mM NaCl (Tabla 11).

Tabla 10. Composición y contenido en ácidos grasos de lípidos totales de callos controles y adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{g. mg}^{-1}$ de proteínas y en mg. g^{-1} de peso seco, son media \pm DE de tres experimentos independientes.

Acido graso	Controles			25 mM NaCl			50 mM NaCl			100 mM NaCl		
	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	mg. g^{-1} PS	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	mg. g^{-1} PS	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	mg. g^{-1} PS	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	mg. g^{-1} PS	%
16:0	21.55 \pm 3.52	2.98 \pm 0.49	31.18	26.51 \pm 6.04	3.73 \pm 0.85	34.78	25.68 \pm 1.77	3.47 \pm 0.2	34.40	47.50 \pm 0.97	6.39 \pm 0.13	29.28
18:0	3.15 \pm 0.94	0.44 \pm 0.13	4.56	3.98 \pm 0.34	0.56 \pm 0.05	5.22	3.27 \pm 1.06	0.44 \pm 0.1	4.38	5.73 \pm 0.44	0.77 \pm 0.06	3.53
18:1	5.80 \pm 2.03	0.80 \pm 0.28	8.39	5.74 \pm 0.43	0.81 \pm 0.06	7.53	5.92 \pm 0.91	0.80 \pm 0.1	7.93	13.71 \pm 0.49	1.84 \pm 0.07	8.45
18:2	33.03 \pm 1.49	4.56 \pm 0.21	47.78	34.93 \pm 5.46	4.91 \pm 0.77	45.82	4.62 \pm 0.68	4.68 \pm 0.1	46.38	82.23 \pm 0.76	11.06 \pm 0.10	50.70
18:3	5.74 \pm 1.60	0.79 \pm 0.22	8.31	4.94 \pm 0.52	0.69 \pm 0.07	6.48	5.89 \pm 1.19	0.80 \pm 0.2	7.89	12.92 \pm 0.10	1.74 \pm 0.01	7.96
Total	69.28 \pm9.59	9.56\pm1.32		76.11 \pm12.80	10.70\pm1.80		75.38 \pm5.61	10.19\pm0.76		162.09 \pm2.76	21.80\pm0.37	

Tabla 11. Composición y contenido en ácidos grasos de lípidos totales de callos controles desarrollados durante un subcultivo en presencia de 25, 50 ó 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{g. mg}^{-1}$ de proteínas y en mg. g^{-1} de peso seco, son media \pm DE de tres experimentos independientes.

Acido graso	Controles			25 mM NaCl			50 mM NaCl			100 mM NaCl		
	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	mg. g^{-1} PS	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	mg. g^{-1} PS	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	mg. g^{-1} PS	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	mg. g^{-1} PS	%
16:0	21.55 \pm 1.24	2.98 \pm 0.49	31.18	23.85 \pm 0.26	3.18 \pm 0.04	33.83	22.37 \pm 2.47	3.08 \pm 0.34	32.46	22.51 \pm 1.30	3.08 \pm 0.18	32.24
18:0	3.15 \pm 1.40	0.44 \pm 0.13	4.56	2.60 \pm 0.52	0.35 \pm 0.07	3.69	2.89 \pm 0.61	0.40 \pm 0.08	4.19	2.91 \pm 0.71	0.33 \pm 0.10	3.48
18:1	5.80 \pm 2.84	0.80 \pm 0.28	8.39	4.88 \pm 0.41	0.65 \pm 0.06	6.92	4.39 \pm 0.37	0.60 \pm 0.05	6.37	4.42 \pm 0.03	0.66 \pm 0.05	6.86
18:2	33.03 \pm 0.36	4.56 \pm 0.21	47.79	34.06 \pm 0.36	4.54 \pm 0.15	48.30	33.95 \pm 0.38	4.67 \pm 0.05	49.25	34.15 \pm 0.57	4.64 \pm 0.08	48.51
18:3	5.74 \pm 2.34	0.79 \pm 0.22	8.31	5.28 \pm 2.49	0.70 \pm 0.27	7.49	5.36 \pm 1.91	0.74 \pm 0.26	7.77	5.39 \pm 1.19	0.85 \pm 0.16	8.92
Total	69.28 \pm8.18	9.56\pm1.32		70.68 \pm2.05	9.42\pm0.27		68.95 \pm5.74	9.48\pm0.79		69.37 \pm3.81	9.56\pm0.52	

Resultados

La adaptación de los callos de tomate a 50 ó 100 mM NaCl no provocó cambios en los porcentajes de ácidos grasos de los fosfolípidos purificados (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina), aunque incrementó significativamente el contenido de dichos ácidos grasos (Tabla 12.). En función del contenido en ácidos grasos y del análisis del contenido en fósforo lipídico total (Tabla 13.), es observable un mayor contenido en fosfolípidos en los callos adaptados a 50 y 100 mM NaCl que en los control, sin embargo, el desarrollo de callos controles durante un subcultivo en presencia de 50 ó 100 mM NaCl no indujo cambios en el contenido en fósforo lipídico.

Tabla 13. Contenido en fósforo a nivel de lípidos totales de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl, así como de callos controles crecidos durante un subcultivo en presencia de 50 y 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{g. mg}^{-1}$ de proteína total y mg. g^{-1} de peso seco son media \pm DE de tres experimentos independientes.

Tratamientos	Contenido en Pi	
	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	mg. g^{-1} PS
Callos controles	23.08 \pm 4.22	3.28 \pm 0.58
Adaptados a:		
50 mM NaCl	46.60 \pm 4.73	6.30 \pm 0.64
100 mM NaCl	47.43 \pm 15.65	6.38 \pm 0.76
Control desarrollados durante un subcultivo en:		
50 mM NaCl	22.29 \pm 2.74	3.06 \pm 0.37
100 mM NaCl	29.74 \pm 9.82	4.06 \pm 0.34

En los callos adaptados a 50 mM NaCl el contenido en fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina fue superior al de los callos controles: mientras que en callos adaptados a 100 mM NaCl, únicamente el contenido en fosfatidilcolina aumentó respecto a los callos controles. Ello dio lugar un incremento de la razón FC/FE en los callos adaptados a 100 mM respecto a los controles (Tabla 12.).

Tabla 12. Composición y contenido en ácidos grasos de fosfatidilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (FE) de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{g. mg}^{-1}$ de proteínas y en mg. g^{-1} de peso seco, son media \pm DE de tres experimentos independientes.

Acidos grasos	Controles			50 mM NaCl			100 mM NaCl		
	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	mg. g^{-1} PS	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	mg. g^{-1} PS	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	mg. g^{-1} PS	%
Fosfatidilcolina									
16:0	3.98 \pm 0.87	0.55 \pm 0.12	45.73	5.90 \pm 1.04	0.80 \pm 0.14	42.00	6.08 \pm 0.74	0.82 \pm 0.10	42.50
18:0	0.66 \pm 0.43	0.10 \pm 0.06	7.55	0.73 \pm 0.44	0.10 \pm 0.06	5.20	.94 \pm 0.37	0.13 \pm 0.05	6.60
18:1	0.40 \pm 0.14	0.05 \pm 0.02	4.58	0.67 \pm 0.07	0.09 \pm 0.01	4.78	0.75 \pm 0.37	0.10 \pm 0.05	5.23
18:2	3.55 \pm 0.72	0.49 \pm 0.10	40.80	6.46 \pm 1.41	0.87 \pm 0.19	45.97	6.31 \pm 1.26	0.85 \pm 0.17	44.06
18:3	0.12 \pm 0.07	0.02 \pm 0.01	1.35	0.29 \pm 0.22	0.04 \pm 0.03	2.05	0.23 \pm 0.07	0.03 \pm 0.01	1.60
Total	12.44 \pm3.21	1.72 \pm0.44		20.07 \pm4.54	2.71 \pm0.61		20.44 \pm4.04	2.76 \pm0.54	
Fosfatidiletanolamina									
16:0	4.23 \pm 1.52	0.58 \pm 0.21	40.75	6.93 \pm 1.85	0.94 \pm 0.25	38.24	4.00 \pm 1.11	0.54 \pm 0.15	36.25
18:0	0.63 \pm 0.14	0.09 \pm 0.02	6.10	1.14 \pm 0.22	0.15 \pm 0.03	6.30	0.72 \pm 0.30	0.10 \pm 0.04	6.49
18:1	0.21 \pm 0.07	0.03 \pm 0.01	2.00	0.27 \pm 0.15	0.04 \pm 0.02	1.50	0.23 \pm 0.22	0.03 \pm 0.03	2.10
18:2	4.57 \pm 1.09	0.63 \pm 0.15	43.97	8.55 \pm 0.18	1.16 \pm 0.16	47.15	5.29 \pm 1.04	0.71 \pm 0.14	47.99
18:3	0.74 \pm 0.14	0.10 \pm 0.02	7.17	1.23 \pm 0.37	0.17 \pm 0.05	6.81	0.79 \pm 0.22	0.11 \pm 0.03	7.17
Total	14.84 \pm4.24	2.05 \pm0.59		25.90 \pm5.39	3.50 \pm0.73		15.75 \pm4.14	2.12 \pm0.56	
FC/FE		0.84			0.77			1.3	

La composición y el contenido en esteroides libres de los callos adaptados al NaCl y tras desarrollados estos callos controles durante un subcultivo en presencia de diferentes concentraciones de NaCl se muestra en las Tablas 14. y 15. En todos los tratamientos, el estigmasterol y, sobre todo, el β -sitosterol fueron las especies moleculares mayoritarias mientras que el colesterol, brassicasterol y campesterol fueron detectados en pequeñas cantidades. La adaptación de los callos a 50 y 100 mM NaCl y el desarrollo de los callos controles en presencia de 50 ó 100 mM NaCl durante un subcultivo, no provocaron cambios significativos ni en la composición ni en el contenido de estas moléculas, lo que se tradujo en una constancia de la razón estigmasterol/ β -sitosterol.

B. Actividad extractora de H^+ por las células de callos desarrollados en medios diferenciales de NaCl

La actividad extractora de H^+ por células obtenidas tras la disgregación de callos controles y adaptados al NaCl se muestra en la Figura 15 y la Tabla 16. La adaptación de los callos de tomate a 25 y 50 mM NaCl indujo un notable incremento de dicha actividad mientras que, por el contrario, la adaptación a 100 mM NaCl inhibió claramente la capacidad bombeadora de H^+ .

Tabla 16. Velocidad media de extrusión de protones por células de callos de tomate controles y adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl: Efecto de la fusicocina y DCCD. Los resultados son media de tres experimentos independientes. Letras iguales en la misma fila, representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, P= 95%. N D. no detectado

Medio de reacción	Callos controles	Adaptados a 25 mM NaCl	Adaptados a 50 mM NaCl	Adaptados a 100 mM NaCl
$\mu\text{eq } H^+ \cdot g^{-1} \text{ PF. hora}^{-1}$				
Basal	0.54 ^a	0.95 ^b	0.97 ^b	0.35 ^c
+ 2 μM Fusicocina	1.08 ^a	1.70 ^b	1.80 ^b	0.80 ^c
+150 μM DCCD	ND.	ND.	ND.	ND.

Tabla 14. Composición y contenido en esteroides libres de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{g. mg}^{-1}$ proteínas y en $\mu\text{g. g}^{-1}$ de peso seco, son media \pm DE de tres experimentos independientes. N.D: no detectado.

Esteroides libres	Controles			50 mM NaCl			100 mM NaCl		
	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	$\mu\text{g. g}^{-1}$ PS	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	$\mu\text{g. g}^{-1}$ PS	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	$\mu\text{g. g}^{-1}$ PS	%
Colesterol	0.14 \pm 0.02	19.54 \pm 3.33	1.51	0.19 \pm 0.06	25.72 \pm 8.78	2.26	0.18 \pm 0.01	24.55 \pm 2.1	2.20
Brassicasterol	0.28 \pm 0.05	38.83 \pm 6.66	3.00	0.34 \pm 0.04	45.64 \pm 5.85	4.01	0.31 \pm 0.03	42.85 \pm 4.50	3.75
Campesterol	N.D.	N.D	N.D	0.44 \pm 0.11	59.41 \pm 14.63	5.22	0.35 \pm 0.05	47.10 \pm 6.25	4.22
Estigmasterol	2.38 \pm 0.16	328.50 \pm 22.26	25.38	2.17 \pm 0.24	293.63 \pm 32.18	25.80	2.04 \pm 0.20	274.99 \pm 26.87	24.61
β -Sitosterol	6.57 \pm 0.91	907.45 \pm 125.68	70.11	5.28 \pm 1.07	713.70 \pm 144.42	62.71	5.41 \pm 0.49	727.87 \pm 68.11	65.22
Contenido total	9.38 \pm 1.14	1294.33 \pm 157.94		8.42 \pm 1.52	1138.09 \pm 205.86		8.30 \pm 0.75	1116.02 \pm 107.82	
estigmasterol/ β -sitosterol		0.36			0.41			0.38	

Tabla 15. Composición y contenido en esteroides libres de callos controles desarrollados durante un subcultivo en presencia de 50 ó 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{g. mg}^{-1}$ proteínas y en $\mu\text{g. g}^{-1}$ de peso seco, son media \pm DE de tres experimentos independientes. N.D: no detectado

Esteroides libres	Controles			50 mM NaCl			100 mM NaCl		
	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	$\mu\text{g. g}^{-1}$ PS	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	$\mu\text{g. g}^{-1}$ PS	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	$\mu\text{g. g}^{-1}$ PS	%
Colesterol	0.14 \pm 0.02	19.54 \pm 3.33	1.51	0.18 \pm 0.02	24.63 \pm 2.49	1.68	0.15 \pm 0.02	20.22 \pm 2.16	1.33
Brassicasterol	0.28 \pm 0.05	38.83 \pm 6.66	3.00	0.22 \pm 0.04	30.24 \pm 4.98	2.06	0.39 \pm 0.05	53.02 \pm 6.49	3.49
Campesterol	N.D.	N.D	N.D	0.48 \pm 0.07	66.55 \pm 9.96	4.54	0.30 \pm 0.08	41.31 \pm 10.82	2.72
Estigmasterol	2.38 \pm 0.16	328.50 \pm 22.26	25.38	2.30 \pm 0.25	315.72 \pm 34.85	21.53	2.34 \pm 0.13	320.01 \pm 17.32	21.05
β -Sitosterol	6.57 \pm 0.91	907.45 \pm 125.68	70.11	7.48 \pm 1.72	1029.17 \pm 236.49	70.19	7.95 \pm 1.31	1085.76 \pm 179.69	71.42
Contenido total	9.38 \pm 1.14	1294.33 \pm 157.94		10.66 \pm 2.10	1466.32 \pm 288.77		11.13 \pm 1.58	1520.31 \pm 216.5	
estigmasterol/ β -sitosterol		0.36			0.31			0.21	

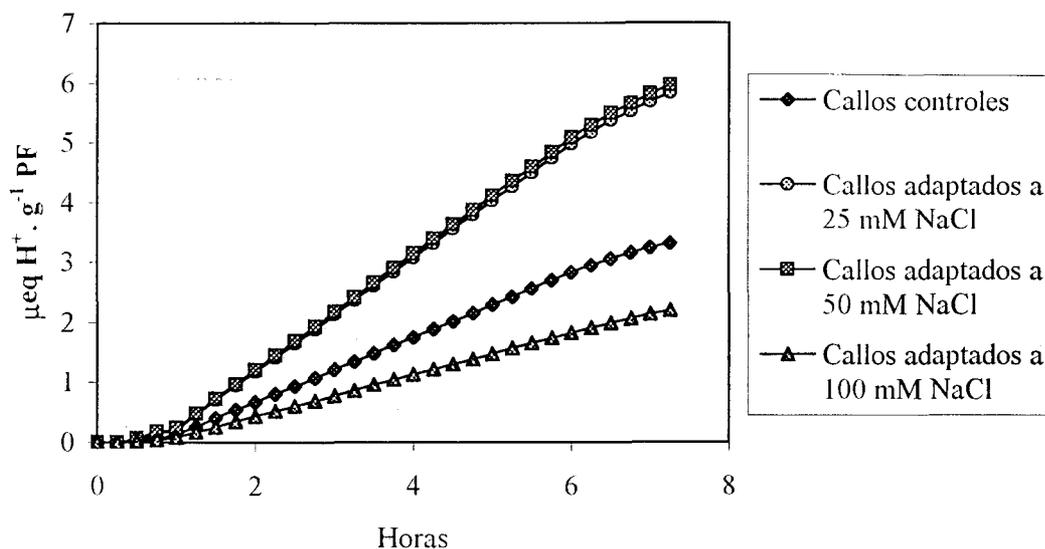


Figura 15. Cinética de extrusión de H^+ por células de callos de tomate controles y adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl. Los resultados, expresados como flujo acumulativo de protones por gramo de peso fresco, son media de 6 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

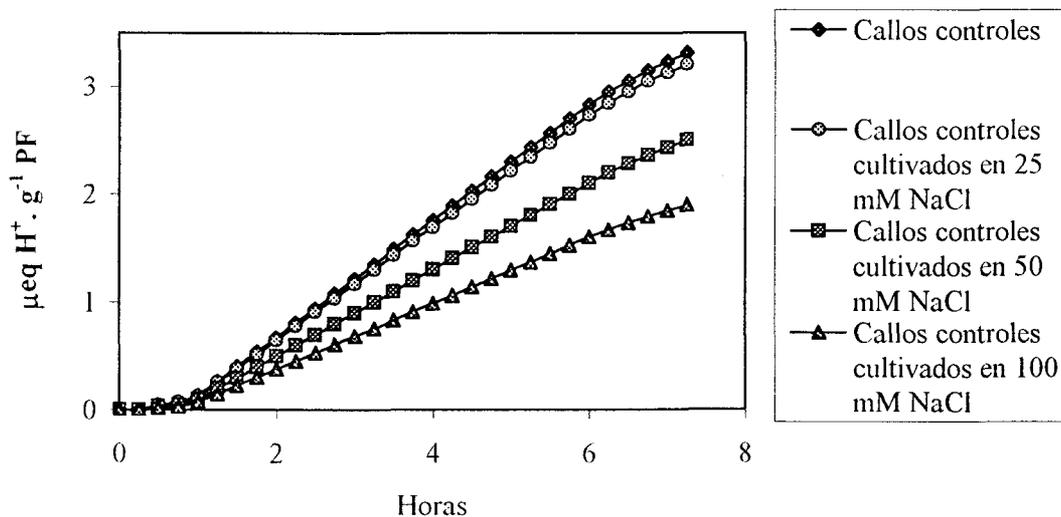


Figura 16. Cinética de extrusión de H^+ por células de callos de tomate controles y, posteriormente, transferidos durante un subcultivo a 25, 50 ó 100 mM NaCl. Los resultados, expresados como flujo acumulativo de protones por gramo de peso fresco, son media de 6 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

Resultados

La adición de Fusiococina 2 μM (toxina fungica activadora del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema) al medio de reacción incrementó muy significativamente la extrusión de H^+ en las células de callos controles y adaptados a todas las concentraciones utilizadas de NaCl, en tanto que en presencia de DCCD 150 μM se inhibió totalmente dicha actividad (Tabla 16.).

Por otra parte, el desarrollo de los callos controles durante un subcultivo en presencia de 25 mM NaCl no afectó la cinética de extrusión de H^+ por las células respecto a los controles, mientras que concentraciones de 50 o 100 mM NaCl inhibieron significativamente dicha actividad (Figura 16. y Tabla 17.).

Tabla 17. Velocidad media de extrusión de protones por células de callos de controles y posteriormente desarrollados durante un subcultivo en de 25, 50 ó 100 mM NaCl. Los resultados, expresados como $\mu\text{eq H}^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$, son media de tres experimentos independientes. Letras iguales representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $P=95\%$.

Medio de reacción	Callos controles	Callos controles desarrollados durante un subcultivo en		
		25 mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl
Basal	0.54 ^a	0.52 ^a	0.40 ^b	0.30 ^c

La adición de 100 mM NaCl al medio basal de reacción de la actividad extractora de H^+ tras 3 horas de incubación de las células en dicho medio, provocó un incremento significativo de la extrusión de H^+ durante 45-60 minutos, observándose, posteriormente, una ralentización de la velocidad de acidificación del medio por las células hasta volver a alcanzarse la tasa inicial de acidificación. El aumento de la actividad extractora de H^+ fue observable tanto en células de callos controles como adaptados al NaCl, aunque el incremento fue superior en células que procedían de callos controles y adaptados a 100 mM NaCl que de adaptados a 50 mM de NaCl (Figuras 17. y 18. y Tabla 18.). En todos los tratamientos, la adición de 2 μM fusiococina incrementó muy significativamente la actividad extractora de H^+ .

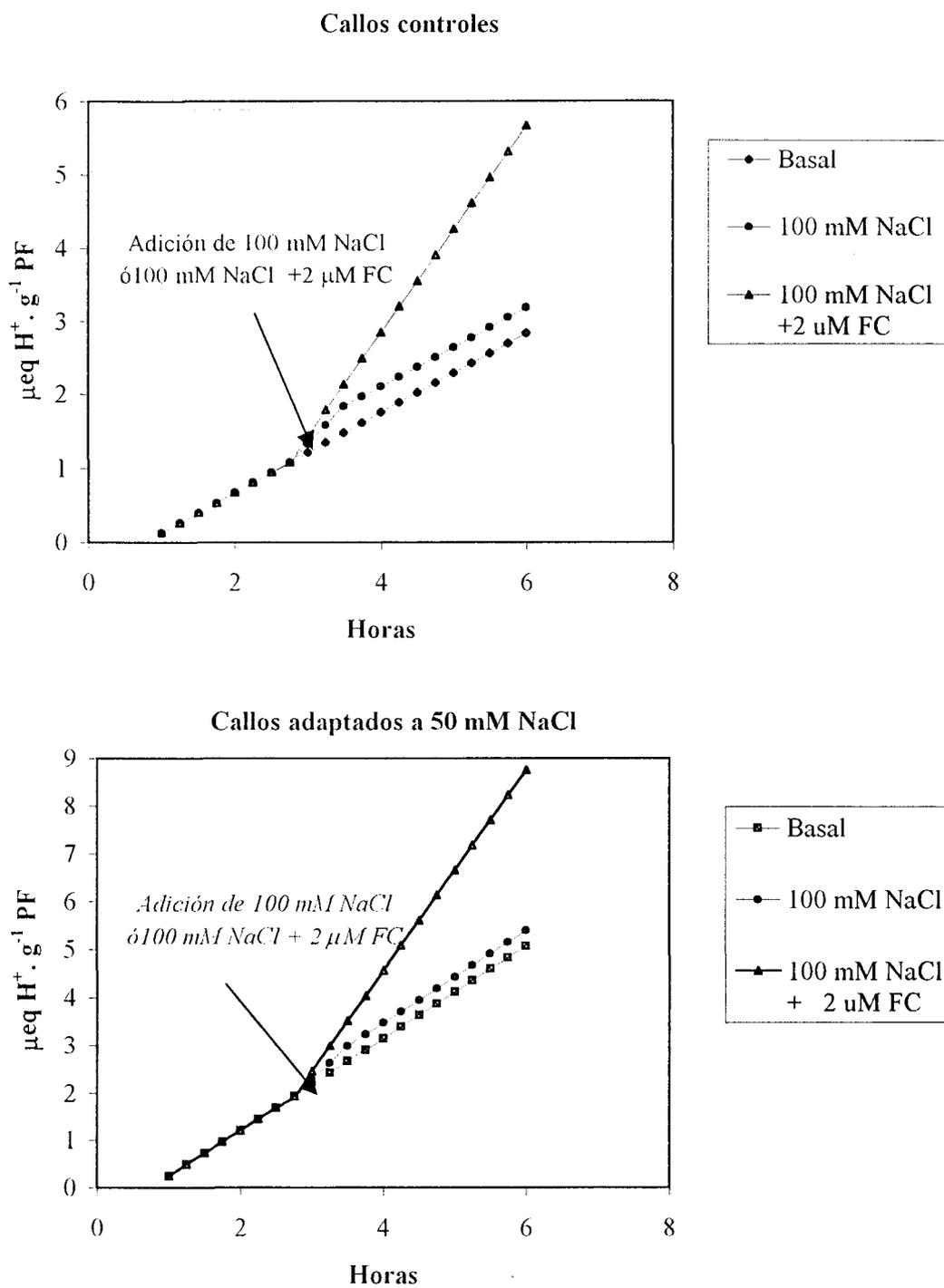


Figura 17. Efecto de la adición de 100 mM NaCl ó 100 mM NaCl + 2 μM FC sobre la extrusión de H^+ por células de callos de tomate control y adaptados a 50 mM NaCl. Los resultados, expresados como flujo acumulativo de protones por gramo de peso fresco, son media de 6 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

Callos adaptados a 100 mM NaCl

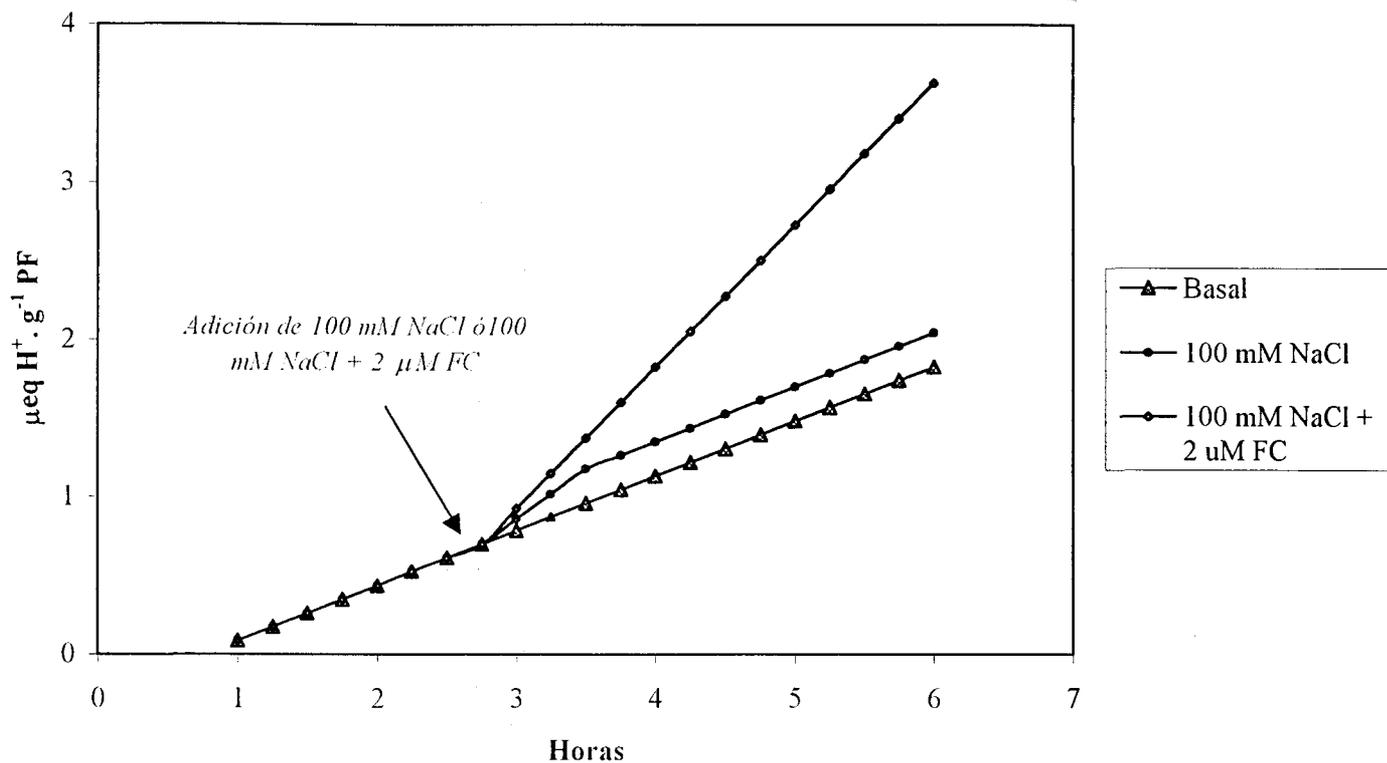


Figura 18. Efecto de la adición de 100 mM NaCl ó 100 mM NaCl + 2 μM FC sobre la extrusión de H^+ por células de callos adaptados a 100 mM NaCl. Los resultados, expresados como flujo acumulativo de protones por gramo de peso fresco, son media de 6 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

Resultados

Los resultados mostrados en la Tabla 18, indican que la inducción del incremento de la extrusión de H^+ es de un orden similar por adición de 100 mM NaCl, 100 mM KCl, 50 mM Na_2SO_4 , o 3.4 % sorbitol al medio de incubación de las células de los callos controles.

Tabla 18. Efecto de la adición de NaCl, KCl, Na_2SO_4 , y sorbitol al medio de reacción sobre la velocidad media de extrusión de protones por células de callos de tomate control y adaptados a 50 y 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en $\mu eq H^+ \cdot g^{-1} PF \cdot h^{-1}$, son media de tres experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna, representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $P= 95\%$. Los valores entre paréntesis representan la proporción de incremento de la capacidad bombeadora de protones respecto a las condiciones de medida basales. ND: No determinado.

Medio de Reacción	Velocidad media de extrusión de H^+		
	Control	50 mM NaCl	100 mM NaCl
Basal	0.54 ^a	0.97 ^a	0.35 ^a
+ 100 mM NaCl	1.01 ^b (1.86)	1.40 ^c (1.44)	0.65 ^c (1.84)
+ 100 mM KCl	1.00 ^b (1.85)	1.20 ^c (1.24)	0.64 ^c (1.84)
+ 50 mM Na_2SO_4	1.08 ^b (2.00)	ND	ND
+ 3.4 % Sorbitol	0.97 ^b (1.80)	ND	ND

B.1. Producción y consumo intracelular de H^+ dependiente de reacciones de carboxilación o decarboxilación

La absorción y metabolismo de nutrientes por las plantas envuelve la producción y consumo de H^+ , tanto dentro de las células como en el medio externo, existiendo evidencias experimentales de una estrecha regulación del pH intracelular. En general, en las reacciones metabólicas que envuelven a los H^+ como reactantes, las constantes de equilibrio aparente y parámetros relacionados, como cambio en la energía libre y potencial redox, muestran una dependencia del pH. Dos ejemplos muy importantes en biología son la hidrólisis de ATP y la oxidación de NADH o NADP. Entre los mecanismos para la regulación del pH citoplasmático, la propuesta hecha por Davies (1973) de que el pH del citoplasma puede ser controlado por regulación de grupos carboxílicos, relaciona este proceso con la actuación de los enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa y

Resultados

enzima málico. Así, ante un exceso de producción de OH^- (o consumo de H^+) aumenta el pH del citoplasma lo suficiente para aumentar la actividad del primer enzima, lo que conduce a la formación y disociación de ácido málico. Contrariamente, la producción de H^+ (o consumo de OH^-), disminuye el pH del citoplasma, inhibe la formación de malato, y activa el enzima málico con formación de piruvato, CO_2 y OH^- .

Los resultados del efecto de la sal sobre la actividad de estos enzimas se muestran en la Tabla 19. En los callos controles, no se detectaron variaciones significativas en dichas actividades, respecto a los callos adaptados a 25 y 50 mM NaCl, mientras que los callos adaptados a 100 mM NaCl mostraron un importante incremento de las actividades fosfoenolpiruvato carboxilasa y enzima málico.

Tabla. 19. Actividades fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y NADP-enzima málico (ME) en callos de tomate controles y adaptados a la sal, así como de estos callos desarrollados durante un subcultivo en distintas concentraciones de NaCl. Los resultados, expresados como nmoles de NADH oxidado (PEPC) o NADP reducido (ME), mg^{-1} de proteína, min^{-1} , son media de 3 experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna, representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $P=95\%$.

Tratamiento	Actividad PEPC <i>nmoles de NADH. mg⁻¹. min⁻¹</i>	Actividad ME <i>nmoles de NADP. mg⁻¹. min⁻¹</i>
Callos controles	9.50 ^a	19.97 ^a
Callos adaptado:		
25 mM NaCl	10.20 ^a	18.67 ^a
50 mM NaCl	10.03 ^a	19.57 ^a
100 mM NaCl	17.68 ^b	28.78 ^b
Callos controles desarrollados durante un subcultivo en:		
25 mM NaCl	9.88 ^a	20.12 ^a
50 mM NaCl	10.08 ^a	18.93 ^a
100 mM NaCl	8.94 ^a	19.02 ^a
Callo adaptado 50 mM NaCl desarrollado durante un subcultivo en 100 mM NaCl	9.89 ^a	20.05 ^a

El desarrollo de los callos controles, durante un subcultivo, en medios suplementados con 25, 50 ó 100 mM NaCl, y de los callos adaptados a 50 mM NaCl en medios suplementados con 100 mM NaCl, no indujo cambios significativos en las actividades de estas enzimas (Tabla 19.).

C. Estudios a nivel de membranas

C.1. Actividades H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa asociadas a la fracción microsomal.

La fracción microsomal definida como el conjunto de membranas celulares sedimentadas tras centrifugar a 100.000 g el sobrenadante procedente de la centrifugación del homogenado celular a baja velocidad, está constituida por vesículas de plasmalema, tonoplasto, Aparato de Golgi y retículo endoplasmático. Puesto que durante el proceso de obtención de la fracción microsomal, las vesículas de membrana que se obtienen pueden orientarse de forma natural o invertida, la determinación de la actividad total de los enzimas marcadores de dichas membranas requiere el uso de un detergente (en nuestro caso Brij 58). En general, la actividad basal corresponde a la actividad determinada en ausencia de detergente; la actividad total a la obtenida en presencia de Brij 58; y la actividad latente a la obtenida por diferencia entre las actividades total y basal. La latencia de las vesículas se define como la actividad latente expresada en porcentaje de la actividad total

En la tabla 20, se muestran las actividades de los enzimas H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa de microsomas obtenidos a partir de callos controles y adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl. En general, las distintas fracciones microsomales presentaron altas actividades ATPásicas asociadas al plasmalema (ΔVa -ATPasa) y, en menor medida, al tonoplasto (ΔNO_3 -ATPasa) y mitocondria (ΔN_3 -ATPasa). Las actividades H^+ -PPasa y H^+ -ATPasa sensibles a vanadato, nitrato y azida no experimentaron cambios notables tras la adaptación de los callos a 25 y 50 mM NaCl; mientras que la adaptación a 100 mM NaCl provocó una reducción de más de un 20 % en la actividad ΔVa H^+ -ATPasa y de más de un 40% en las actividades ΔNO_3 H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa.

Resultados

Tabla 20. Actividades H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa de membranas microsomales aisladas de callos de tomate controles y adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en micromoles de P_i mg^{-1} proteína h^{-1} , son media \pm DE de tres experimentos independientes.

Actividades enzimáticas	Callos controles	Callos adaptados		
		25 mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl
<u>H^+-ATPasa</u>				
Actividad basal (pH 6.5)	6.18 \pm 0.74	6.03 \pm 0.61	5.89 \pm 0.82	4.55 \pm 0.29
Actividad total (pH 6.5)	8.70 \pm 0.68	8.37 \pm 0.88	8.15 \pm 0.75	6.27 \pm 0.33
Actividad ΔV_a total (pH 6.5)	5.51 \pm 0.75	5.40 \pm 0.95	5.00 \pm 0.68	4.35 \pm 0.19
Actividad Total (pH 8.0)	4.97 \pm 1.03	5.12 \pm 1.15	5.05 \pm 1.21	3.66 \pm 0.14
Actividad ΔNO_3 total (pH 8.0)	1.50 \pm 0.42	2.09 \pm 0.94	1.50 \pm 0.63	0.87 \pm 0.11
Actividad ΔN_3 total (pH 8.0)	0.92 \pm 0.50	1.47 \pm 0.4	1.00 \pm 0.49	0.88 \pm 0.08
<u>H^+-PPasa</u>				
Actividad Total (pH 8.0)	1.35 \pm 0.35	1.88 \pm 0.75	1.40 \pm 0.30	0.78 \pm 0.15

Las actividades H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa de microsomas aislados de callos controles y, posteriormente, desarrollados durante un subcultivo en 25, 50 ó 100 mM NaCl se muestran en la Tabla 20. El crecimiento de los callos controles en medio de cultivo conteniendo 25 mM NaCl no indujo cambios significativos en las actividades ΔV_a -ATPasa, ΔNO_3 -ATPasa, ΔN_3 -ATPasa y H^+ -PPasa. Sin embargo, el mantenimiento e los callos controles durante un subcultivo en 50 y 100 mM NaCl inhibió considerablemente las actividades ΔV_a -ATPasa y ΔNO_3 -ATPasa, y no así las actividades ΔN_3 -ATPasa y H^+ -PPasa. Los resultados indicados en la Tabla 21, también muestran como el crecimiento durante un subcultivo de los callos adaptados a 50 mM NaCl en 100 mM NaCl no provocó cambios en ninguna de las actividades fosfohidrolíticas determinadas.

Resultados

Tabla 21. Actividades H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa asociadas a la fracción microsomal de callos controles y adaptados a 50 mM NaCl desarrollados durante un subcultivo en medios diferenciales de NaCl. Los resultados, expresados en micromoles de Pi. mg^{-1} proteína. h^{-1} son media \pm DE de tres experimentos independientes.

Actividades enzimáticas	Callos controles	Callos controles desarrollados durante un subcultivo en			Callos adaptados a 50 mM NaCl desarrollados durante un subcultivo en	
		25 mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl
<u>H^+-ATPasa</u>						
Actividad basal (pH 6.5)	6.18 \pm 0.74	7.00 \pm 0.71	5.30 \pm 1.17	5.03 \pm 0.08	5.89 \pm 0.82	5.80 \pm 0.93
Actividad total (pH 6.5)	8.70 \pm 0.68	9.77 \pm 0.93	7.32 \pm 0.37	7.00 \pm 0.15	8.15 \pm 0.75	7.95 \pm 0.72
Actividad ΔV_a total (pH 6.5)	5.51 \pm 0.75	6.50 \pm 1.00	4.60 \pm 0.20	4.06 \pm 0.56	5.00 \pm 0.68	4.90 \pm 0.57
Actividad Total (pH 8.0)	4.97 \pm 1.03	4.59 \pm 1.00	4.82 \pm 0.83	3.54 \pm 0.33	5.05 \pm 1.21	5.12 \pm 1.25
Actividad ΔNO_3 total (pH 8.0)	1.50 \pm 0.32	1.51 \pm 0.29	1.15 \pm 0.17	1.00 \pm 0.13	1.50 \pm 0.63	1.65 \pm 0.58
Actividad ΔN_3 total (pH 8.0)	0.92 \pm 0.50	0.98 \pm 0.07	1.07 \pm 0.12	0.90 \pm 0.17	1.00 \pm 0.49	0.98 \pm 0.53
<u>H^+-PPasa</u>						
Actividad Total (pH 8.0)	1.35 \pm 0.35	1.30 \pm 0.19	1.53 \pm 0.21	1.22 \pm 0.22	1.40 \pm 0.30	1.42 \pm 0.32

Por otra parte, tanto los callos adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl como los callos controles crecidos en presencia de dichas concentraciones salinas durante un subcultivo presentan valores similares de latencia lo que indica que tras la extracción de la fracción microsomal de los callos correspondientes a las distintos tratamientos, la proporción de vesículas de plasmalema con orientación natural o invertida es del mismo orden (Tabla 22.).

Resultados

Tabla 22. Latencia del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema determinada a nivel de la fracción microsomal de callos controles y adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl y, posteriormente, desarrollados durante un subcultivo en medios suplementados con 25, 50 ó 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en porcentaje de la actividad latente respecto a la actividad total a pH 6.5, son media \pm DE de 3 experimentos independientes.

Tratamientos	Latencia %
Callos controles	28.96 \pm 3.00
Adaptado a:	
25 mM NaCl	27.95 \pm 2.85
50 mM NaCl	27.73 \pm 2.32
100 mM NaCl	27.43 \pm 2.38
Controles desarrollados durante un subcultivo en:	
25 mM NaCl	28.35 \pm 2.43
50 mM NaCl	27.59 \pm 2.21
100 mM NaCl	28.14 \pm 1.54
Adaptados a 50 mM NaCl desarrollados durante un subcultivo en 100 mM NaCl	27.04 \pm 2.68

Para estudiar el efecto de un estrés de corta duración sobre las distintas actividades H^+ -ATPasas asociadas a las membranas microsomales, los callos se disgregaron durante 12 horas en medio líquido de composición idéntica al medio de multiplicación incubándose posteriormente durante una hora en sorbitol 1.6 %, 2 mM K_2SO_4 y 0.1 mM $CaSO_4$ a pH 6.8 en las condiciones descritas en Material y Métodos (apartado B.6.3.). Tras la incubación, se estresaron las células obtenidas durante 15 minutos por adición al medio de 100 mM NaCl y se aislaron las membranas microsomales de estas células, determinándose las actividades H^+ -ATPasas.

Como puede observarse en los resultados de la Tabla 23, el estrés por 100 mM NaCl no provocó cambios significativos en las actividades ΔVa -ATPasa, ΔNO_3 -ATPasa y ΔN_3 -ATPasa así como H^+ -PPasa de membranas microsomales de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl. Además, la latencia del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema medida a pH 6.5 fue similar para todos los tratamientos salinos, lo que indica que la proporción relativa de las vesículas de plasmalema con orientación natural o invertida era similar en todos los casos (Tabla 24.).

Resultados

Tabla 23. Efecto de un estrés de corta duración (15 minutos) con 100 mM NaCl sobre diferentes actividades H^+ -ATPasas y H^+ -PPasa de membranas microsomaes aisladas de callos controles y adaptados 50 y 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en micromoles de Pi. mg^{-1} proteína. h^{-1} , son media \pm DE de tres experimentos independientes.

Actividades enzimáticas	Callos controles		Callos adaptados a 50 mM NaCl		Callos adaptados a 100 mM NaCl	
	- NaCl	+ NaCl	- NaCl	+ NaCl	- NaCl	+ NaCl
H^+-ATPasa						
<i>pH 6.5</i>						
Actividad basal	5.37 \pm 0.80	4.82 \pm 0.72	5.12 \pm 0.93	5.23 \pm 0.38	3.88 \pm 0.81	3.33 \pm 1.19
Actividad total	7.56 \pm 1.05	6.83 \pm 1.02	7.08 \pm 1.02	7.22 \pm 1.12	5.45 \pm 1.36	4.67 \pm 1.81
Actividad ΔVa total	5.03 \pm 0.63	4.82 \pm 0.99	4.56 \pm 0.52	4.84 \pm 0.66	3.97 \pm 0.55	3.57 \pm 0.91
<i>pH 8.0</i>						
Actividad Total	3.84 \pm 0.83	3.92 \pm 0.77	3.79 \pm 0.89	3.77 \pm 0.85	2.65 \pm 0.24	2.62 \pm 0.28
Actividad ΔNO_3 total	1.37 \pm 0.47	1.70 \pm 0.57	1.37 \pm 0.12	1.25 \pm 0.46	0.79 \pm 0.28	0.95 \pm 0.48
Actividad ΔN_3 total	0.84 \pm 0.21	0.81 \pm 0.31	0.91 \pm 0.28	1.17 \pm 0.33	0.80 \pm 0.27	0.84 \pm 0.10
H^+-PPasa						
Actividad Total a pH 8.0	1.23 \pm 0.36	1.54 \pm 0.44	1.28 \pm 0.48	1.50 \pm 0.65	0.71 \pm 0.16	0.85 \pm 0.36

Tabla 24. Latencia del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema determinada a nivel de la fracción microsomal de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl tras ser sometidos a un estrés de 15 minutos con 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en porcentaje de la actividad latente a pH 6.5 respecto a la actividad total, son media \pm DE de 3 experimentos independientes.

Tratamientos	Latencia %
Callos controles	
-	28.96 \pm 2.57
+ estrés con 100 mM NaCl	29.42 \pm 2.83
Adaptados a 50 mM NaCl	
-	27.68 \pm 3.10
+ estrés con 100 mM NaCl	27.56 \pm 3.05
Adaptados a 100 mM NaCl	
-	28.81 \pm 2.00
+ estrés con 100 mM NaCl	28.69 \pm 2.31

C.2. Transporte de H⁺ dependiente de ATP en vesículas microsomales

La medida espectrofluorimétrica de extinción de fluorescencia de la sonda de pH ACMA, sirvió de base para estudiar el transporte de H⁺ dependiente de ATP en vesículas microsomales

Respecto a los callos controles, la adaptación de los callos a 25 y, sobre todo, 50 mM NaCl indujo un incremento de la velocidad específica de extinción de fluorescencia (VQs) y de la extinción máxima de fluorescencia (Qmax). Por el contrario, en las vesículas microsomales aisladas de callos adaptados a 100 mM NaCl dichos parámetros, relacionados con el transporte de H⁺ dependiente de ATP, aparecen fuertemente inhibidas (Tabla 25.).

Tabla 25. Transporte de H⁺ dependiente de ATP a nivel de vesículas microsomales de callos controles y adaptados a distintas concentraciones de NaCl. Los resultados, expresados como velocidad específica de extinción de fluorescencia (VQs) y como extinción máxima de fluorescencia (Qmax), son media de 3 experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, P= 95%.

Tratamientos	VQs % Q. min ⁻¹ . mg ⁻¹	Qmax % Q. mg ⁻¹
Callos controles	24.98 ^a	21.38 ^a
Adaptados a:		
25 mM NaCl	28.65 ^b	24.57 ^b
50 mM NaCl	34.80 ^c	28.76 ^c
100 mM NaCl	13.12 ^d	10.47 ^d

Para determinar si estos cambios en la actividad transportadora de H⁺ de vesículas de microsomas en función de los tratamientos salinos eran atribuibles al enzima H⁺-ATPasa de plasmalema, se determinó dicha actividad en presencia de ortovanadato 400 μM en el medio de reacción. Comparativamente con los callos controles, la actividad ΔVa-VQs de microsomas de callos adaptados a 25 y 50 mM NaCl, se estimuló significativamente. La estimulación no fue debida a cambios en la orientación de las vesículas, puesto que la latencia del enzima H⁺-ATPasa de

Resultados

plasmalema fue similar en los callos controles y adaptados al NaCl (Tabla 22.). Asimismo, la actividad fosfolitolítica del enzima de plasmalema no mostró cambios con la adaptación, por lo que consecuentemente, la razón H^+ extruidos/ ATP hidrolizado por dicho enzima fue superior en los callos adaptados a 25 y 50 mM NaCl (Tabla 26.).

Tabla 26. Actividad ΔVa -ATPasa basal, transporte de H^+ dependiente de ATP sensible a vanadato y razón H^+ extruidos/ ATP hidrolizado en microsomas de callos controles y adaptados al NaCl. Los resultados son media de 3 experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $P=95\%$.

Tratamientos	Hidrólisis de ATP	Transporte de H^+	H^+/ATP
	$\mu\text{moles. mg}^{-1}. h^{-1}$	$\% Q. \text{min}^{-1}. \text{mg}^{-1}$	
	ΔVa Basal	ΔVa -VQs	
Callos controles	4.40 ^a	10.21 ^a	2.3 ^a
Adaptados a:			
25 mM NaCl	4.33 ^a	13.10 ^b	3.0 ^b
50 mM NaCl	4.04 ^a	15.07 ^c	3.8 ^c
100 mM NaCl	3.38 ^b	7.10 ^d	2.1 ^a

Por el contrario, en los callos adaptados a 100 mM NaCl se observó una fuerte disminución tanto de la actividad ΔVa -ATPasa basal como el bombeo de H^+ asociado a la H^+ -ATPasa de plasmalema (ΔVa -VQs), de lo que resultó una razón H^+ extruidos/ATP hidrolizado del mismo orden en las vesículas de callos controles y adaptados a 100 mM NaCl (Tabla 26.).

Cuando los callos controles fueron transferidos durante un subcultivo a medios conteniendo 25 mM NaCl no se detectaron cambios notables en la actividad transportadora de H^+ , mientras que la transferencia a medios con 50 y, sobre todo, 100 mM NaCl inhibió la velocidad inicial de extinción de fluorescencia y la extinción máxima. Además, tanto la actividad basal ΔVa H^+ -ATPasa como, en mayor proporción, la velocidad inicial de transporte de H^+ sensible a vanadato (ΔVa -VQs) fueron inhibidas cuando los callos controles se transfirieron durante un subcultivo a 50 ó 100 mM NaCl (Tablas 27. y 28.).

Resultados

Tabla 27. Transporte de H^+ dependiente de ATP en vesículas microsomales de callos de tomate controles y adaptados a 50 mM NaCl desarrollados durante un subcultivo en medios suplementados con diferentes concentraciones de NaCl. Los resultados son media de 3 experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $P=95\%$.

Tratamientos	Transporte de H^+	
	VQs % $O. min^{-1}. mg^{-1}$	Q_{max} % $O. mg^{-1}$
Callos controles	24.98 ^a	21.38 ^a
Controles desarrollados en:		
25 mM NaCl	25.08 ^a	20.28 ^a
50 mM NaCl	20.73 ^b	17.64 ^b
100 mM NaCl	13.18 ^c	8.82 ^c
Callos adaptados a 50 mM NaCl	34.80 ^d	28.76 ^d
Adaptados a 50 mM NaCl desarrollados en 100 mM NaCl	34.72 ^d	28.73 ^d

Por otra parte, la transferencia de los callos controles durante un subcultivo a 25 y 50 mM NaCl no indujo cambios en la razón H^+ extruidos/ATP hidrolizado, mientras que la transferencia a 100 mM NaCl provocó una reducción significativa en dicha razón (Tabla 28.). En el caso de los callos adaptados a 50 mM NaCl, el mantenimiento en medios conteniendo 100 mM NaCl durante un subcultivo no alteró ni la extrusión de H^+ dependiente de ATP ni la actividad $\Delta Va H^+ - ATPasa$ basal, ni, por tanto, la razón H^+/ATP (Tabla 27. y 28.).

Las Tablas 29. y 30. muestran los resultados correspondientes al efecto de un estrés salino de corta duración (100 mM NaCl durante 15 minutos) sobre la hidrólisis de ATP y actividad transportadora de H^+ de membranas microsomales aisladas de callos controles y adaptados al NaCl. Las condiciones indicadas de estrés provocó un incremento en la velocidad inicial de transporte de H^+ (VQs) a nivel de las vesículas aisladas de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl, no observándose cambios en la extinción máxima de fluorescencia (Q_{max}).

Resultados

Tabla 28. Actividades ΔVa H^+ -ATPasa basal, transporte de H^+ dependiente de ATP sensible a vanadato y razón H^+ extruidos/ ATP hidrolizado en vesículas microsomales de callos control y adaptados a 50 mM NaCl crecidos durante un subcultivo en medios suplementados con diferentes concentraciones de NaCl. Los resultados son media de 3 experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan. P= 95%.

Tratamientos	Hidrólisis de ATP	Transporte de H^+	H^+/ATP
	$\mu\text{moles. mg}^{-1}. h^{-1}$	% Q. $\text{min}^{-1}. \text{mg}^{-1}$	
	ΔVa Basal	ΔVa -VQs	
Callos controles	4.40 ^a	10.21 ^a	2.3 ^a
Controles desarrollados en:			
25 mM NaCl	4.23 ^a	9.72 ^a	2.4 ^a
50 mM NaCl	3.77 ^b	8.29 ^b	2.2 ^a
100 mM NaCl	3.35 ^c	4.20 ^c	1.3 ^b
Callos adaptados a 50 mM NaCl	4.04 ^a	15.07 ^d	3.8 ^c
Adaptados a 50 mM NaCl desarrollados en 100 mM NaCl	3.94 ^a	14.68 ^d	3.7 ^c

Tabla 29. Efecto de un estrés de corta duración (15 minutos) por 100 mM NaCl sobre el transporte de H^+ dependiente de ATP en microsomas de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl. Los resultados son media de 3 experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, P= 95%.

Tratamientos	Transporte de H^+	
	VQs % Q. $\text{min}^{-1}. \text{mg}^{-1}$	Qmax % Q. mg^{-1}
Callos controles		
-	26.45 ^a	16.69 ^a
Estrés por 100 mM NaCl	44.60 ^b	17.52 ^a
Callos adaptados a 50 mM NaCl		
-	32.27 ^c	22.58 ^b
Estrés por 100 mM NaCl	46.14 ^a	23.91 ^b
Callos adaptados a 100 mM NaCl		
-	10.93 ^d	8.99 ^c
Estrés por 100 mM NaCl	15.30 ^c	9.67 ^c

Del mismo modo, un estrés por 100 mM NaCl durante 15 minutos incrementó la velocidad inicial de transporte de H⁺ dependiente de ATP sensible a vanadato (Tabla 30.) el cual no era debido a un cambio en la orientación de las vesículas ya que la actividad ΔVa H⁺-ATPasa basal no se vio afectada. En función de estos hechos, las condiciones de estrés aumentan la razón H⁺ extruidos/ATP hidrolizado se incrementó en los callos controles y en los adaptados a 50 y 100 mM NaCl (Tabla 30.).

Tabla 30. Efecto de un estrés de corta duración (15 minutos) por 100 mM NaCl sobre la actividades ΔVa H⁺-ATPasa basal, transporte de H⁺ dependiente de ATP sensible a vanadato y razón H⁺ extruidos/ ATP hidrolizado en vesículas de microsomas de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl. Los resultados son media de 3 experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, P= 95%.

Tratamientos	Hidrólisis de ATP	Transporte de H ⁺	H ⁺ /ATP
	$\mu\text{moles. mg}^{-1}. \text{h}^{-1}$	$\% Q. \text{min}^{-1}. \text{mg}^{-1}$	
	ΔVa Basal	ΔVa -VQs	
Callos controles			
-	2.91 ^a	10.81 ^a	3.7 ^a
<i>Estrés por 100 mM NaCl</i>	2.77 ^a	22.77 ^b	8.2 ^b
Callos adaptados a 50 mM NaCl			
-	2.08 ^a	18.53 ^c	8.9 ^c
<i>Estrés por 100 mM NaCl</i>	2.54 ^a	27.98 ^d	11.0 ^d
Callos adaptados a 100 mM NaCl			
-	2.40 ^a	8.26 ^e	3.4 ^e
<i>Estrés por 100 mM NaCl</i>	2.23 ^a	13.25 ^f	5.9 ^f

C.3. Detección inmunológica de la H⁺-ATPasa de plasmalema

La detección inmunológica del enzima H⁺-ATPasa de plasmalema, en las fracciones microsomales aisladas en función de los tratamientos salinos, se realizó mediante técnicas de inmunoblotting utilizando un anticuerpo policlonal específico de conejo que contenía el extremo carboxilo terminal del enzima H⁺-ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis thaliana*. Tanto en

microsomos de callos controles como de callos adaptados a 50 y 100 mM NaCl, el anticuerpo utilizado reconocía una banda de, aproximadamente, 100 KDa, si bien la intensidad de dicha banda era menor en los microsomos de callos adaptados a 100 mM NaCl que en los de callos controles y adaptados a 50 mM NaCl (Figura 19.).

C.4. Purificación del plasmalema: partición de fases

La purificación de plasmalema a partir de la fracción microsomal se ha realizado mediante partición en doble fase polímero acuosa. El sistema de partición estuvo compuesto por 5.6 % (P/P) dextrano T-500, 5.6 % (P/P) PEG 3350, 5 mM KH_2PO_4 (pH 7.8), 0.5 M sacarosa y 5 mM NaCl. En las fracciones obtenidas de las fases superior (U_1) e inferior (L_1) tras la partición de las membranas microsomales se determinaron las actividades de diferentes enzimas marcadoras de las distintas membranas celulares: H^- -ATPasa sensible a vanadato (marcador de plasmalema), H^+ -ATPasa sensible a nitrato (marcador de tonoplasto), H^- -ATPasa sensible a azida (marcador de mitocondria), UDPasa latente (marcador de Aparato de Golgi) y NADH citocromo c reductasa insensible a Antimicina A (marcador del retículo endoplasmático).

Es importante el hecho de que con este sistema de partición se ha conseguido una fracción membranaria U_1 compuesta en más del 80 % por plasmalema, en la que las actividades de los enzimas marcadoras de mitocondrias y tonoplasto eran prácticamente nulas y, muy bajas, las marcadoras del Aparato de Golgi y retículo endoplasmático (Tabla 31.). Por otra parte, el rendimiento en proteínas de dicha fracción enriquecida en plasmalema fue similar cuando se partió de callos controles y adaptados a 50 mM NaCl, representando aproximadamente 2,5 % de la fracción microsomal, mientras que en los callos adaptados a 100 mM NaCl el rendimiento fue muy superior alcanzando casi el 4 % de la proteína microsomal (Tabla 32.).



Figura 19. Immunoblot mostrando la unión de un anticuerpo anti H^+ -ATPasa de plasmalema a proteínas microsomas de callos de tomate controles (C) y adaptados a 50 (50) y 100 mM NaCl (100). En todos los casos se cargaron en los geles de electroforesis cantidades iguales de proteína microsomal (150 μ g). El peso molecular de alguna de las proteínas usadas como estándar se muestra a la izquierda de la figura.

Resultados

Tabla 32. Actividades de enzimas marcadores a nivel de microsomas y en las fases superior e inferior obtenidas tras someter a partición de fases las membranas microsomas de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl. Los resultados, expresados como $\mu\text{moles} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, son media \pm DE de 6 experimentos independientes. N.D. no detectado.

	Microsomas	Partición de fases	
		Fase superior (U1)	Fase inferior (L1)
Callo control			
<i>Actividad H^+-ATPasa total (pH 6.5)</i>	8.70 \pm 0.68	17.87 \pm 5.64	6.42 \pm 2.77
<i>Actividad ΔVa-ATPasa</i>	5.51 \pm 0.75	17.39 \pm 4.73	4.23 \pm 1.02
<i>Actividad ΔNO_3-ATPasa</i>	1.50 \pm 0.42	N.D.	2.90 \pm 0.23
<i>Actividad ΔN_3-ATPasa</i>	0.92 \pm 0.50	N.D.	1.0 \pm 0.72
<i>Actividad UDPasa latente</i>	4.53 \pm 0.43	1.88 \pm 0.61	9.25 \pm 2.04
<i>Actividad NADH citocromo <i>c</i> reductasa insensible a antimicina A</i>	10.81 \pm 3.29	1.92 \pm 0.70	12.07 \pm 2.18
Callos adaptados a 50 mM NaCl			
<i>Actividad H^+-ATPasa total (pH 6.5)</i>	8.15 \pm 0.75	18.67 \pm 5.00	4.20 \pm 1.75
<i>Actividad ΔVa-ATPasa</i>	5.00 \pm 0.68	18.20 \pm 4.32	3.50 \pm 1.28
<i>Actividad ΔNO_3-ATPasa</i>	1.70 \pm 0.63	N.D.	2.32 \pm 0.23
<i>Actividad ΔN_3-ATPasa</i>	1.00 \pm 0.49	N.D.	2.32 \pm 0.23
<i>Actividad UDPasa latente</i>	5.05 \pm 2.46	1.67 \pm 0.54	6.50 \pm 0.57
<i>Actividad NADH citocromo <i>c</i> reductasa insensible a antimicina A</i>	12.08 \pm 1.21	1.99 \pm 0.66	14.24 \pm 1.00
Callos adaptados a 100 mM NaCl			
<i>Actividad H^+-ATPasa total (pH 6.5)</i>	6.27 \pm 0.63	12.73 \pm 2.25	3.50 \pm 2.08
<i>Actividad ΔVa-ATPasa</i>	4.05 \pm 0.49	11.28 \pm 1.96	2.08 \pm 2.24
<i>Actividad ΔNO_3-ATPasa</i>	0.87 \pm 0.19	N.D.	0.95 \pm 0.62
<i>Actividad ΔN_3-ATPasa</i>	0.88 \pm 0.11	N.D.	2.04 \pm 0.51
<i>Actividad UDPasa latente</i>	5.34 \pm 1.34	2.36 \pm 1.05	11.84 \pm 2.59
<i>Actividad NADH citocromo <i>c</i> reductasa insensible a antimicina A</i>	5.03 \pm 0.92	0.6 \pm 0.25	3.30 \pm 0.15

Tabla 32. Contenido en proteína en la fase superior (U1) de la partición en Dextrano/PEG de los microsomas aislados de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{g. mg}^{-1}$ proteína microsomal, son media de 6 experimentos independientes. Letras iguales representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $P= 95\%$.

Tratamientos	Contenido en proteína ($\mu\text{g. mg}^{-1}$)
Callos controles	27.34 ^a
Adaptados a 50 mM NaCl	24.00 ^a
Adaptados 100 mM NaCl	39.95 ^b

C.4.1. Actividad H^+ -ATPasa

Respecto a los callos controles, la adaptación a 50 mM NaCl no provocó cambios en la actividad H^+ -ATPasa sensible a vanadato, mientras que la adaptación a 100 mM NaCl inhibió dicha actividad en un 35 % (Tabla. 31.).

La actividad H^+ -ATPasa total en plasmalema de los callos de tomate se ha determinado utilizando Brij 58 a una concentración superior a $7.5 \mu\text{g. ml}^{-1}$ (Figura 20.). El valor de la actividad H^+ -ATPasa, en presencia y ausencia de este detergente, permitió determinar que el 90 % de las vesículas de plasmalema aisladas por partición de fases presentaban una orientación natural (cara citoplasmática orientada hacia el interior de la vesícula aislada).

En cuanto al efecto de los inhibidores sobre la H^+ -ATPasa de plasmalema, 400 μM de ortovanadato sódico provoca la total inhibición del enzima (Figura 21.). Los tratamientos salinos no condicionaron el efecto de este inhibidor específico sobre el enzima H^+ -ATPasa de plasmalema (datos no mostrados).

En cuanto al efecto de la concentración de sustrato (ATP) sobre la actividad del enzima, los resultados mostrados en la Figura 22. indican que la actividad de H^+ -ATPasa sensible a vanadato presenta una curva de saturación de tipo Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos, constante de afinidad del enzima por el sustrato (K_m) y actividad máxima (V_{max}), determinándose por análisis de regresión lineal, muestran cambios significativos entre los callos controles y adaptados al NaCl (Figura 23. y Tabla 33.).

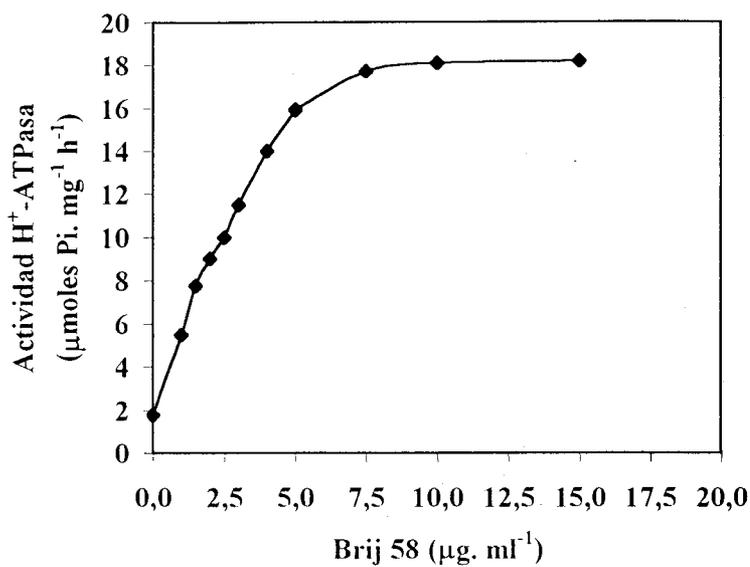


Figura 20. Efecto del Brij 58 sobre la actividad H⁺-ATPasa de vesículas de plasmalema purificadas de callos controles. Los resultados, expresados en micromoles de Pi. mg⁻¹ proteína h⁻¹, son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

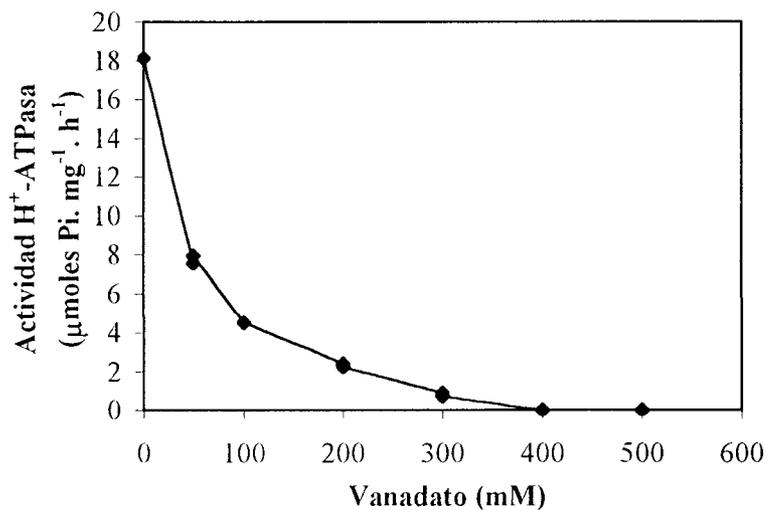


Figura 21. Efecto del ortovanadato sódico sobre la actividad H⁺-ATPasa de plasmalema de callos controles. Los resultados, expresados en micromoles de Pi. mg⁻¹ proteína h⁻¹, son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

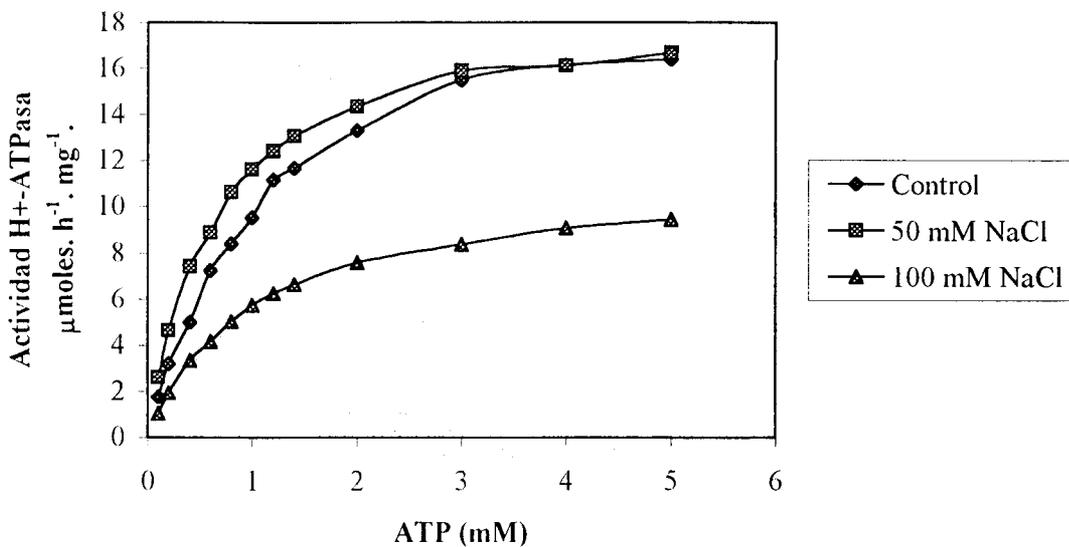


Figura 22. Efecto de la concentración de ATP sobre la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema de callos de controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl. Los valores son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

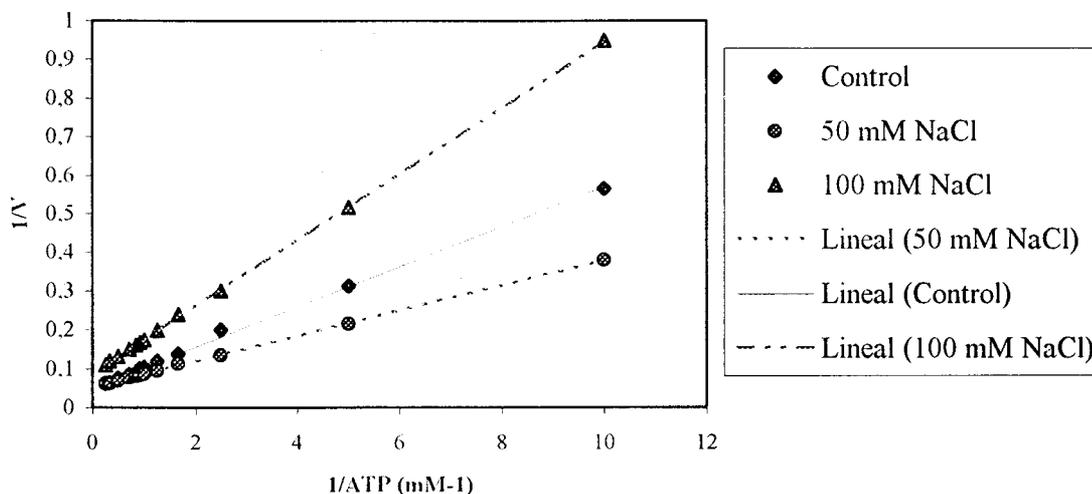


Figura 23. Representación de Lineweaver-Burck derivada de la cinética de saturación por sustrato correspondiente a la Figura 22. Los valores son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio. V: $\mu\text{moles} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Tabla 33. Parámetros cinéticos (K_m aparente para el Mg-ATP y V_{max}) del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl. Los resultados son media de 3 experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna, representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $P=95\%$.

Tratamientos	Ecuación de regresión	Coefficiente de correlación	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{moles Pi. mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
Callos controles	$y = 0.0518x + 0.0524$	$R^2 = 0.99$	0.988 ^a	19.08 ^a
Adaptados a 50 mM NaCl	$y = 0.0327x + 0.0536$	$R^2 = 0.99$	0.610 ^b	18.65 ^a
Adaptados a 100 mM NaCl	$y = 0.0859x + 0.0895$	$R^2 = 0.99$	0.960 ^a	11.17 ^b

Los valores de V_{max} , obtenidos a partir de la representación de Lineweaver-Burck (Figura 23.), son similares en los callos controles y adaptados a 50 mM NaCl, mostrando una fuerte inhibición en condiciones de 100 mM NaCl. El enzima H^+ -ATPasa de plasmalema mostró una mayor afinidad por el sustrato en condiciones de adaptación a 50 mM NaCl, al presentar valores de K_m de 0.61 mM frente a 0.99 mM y 0.96 del enzima de los callos controles y adaptados a 100 mM NaCl, respectivamente.

C.4.2. Transporte de H^+ dependiente de ATP

Como se ha indicado, el sistema de purificación de plasmalema por partición de fases en dextrano/PEG da lugar a la formación de vesículas con orientación mayoritariamente natural (cara citoplasmática de la membrana plasmática orientada hacia el interior de la vesícula) y puesto que la medida fluorimétrica del transporte de H^+ asociado al enzima H^+ -ATPasa sólo es posible en vesículas "inside-out", fue necesario la reorientación de las vesículas aisladas. Para ello, se utilizó Brij 58 que induce la inversión de las vesículas sin afectar a la permeabilidad de las mismas (Johansson y col., 1995). Tras ensayar el transporte de H^+ dependiente de ATP en presencia de diferentes concentraciones de Brij 58, pudo observarse como concentraciones de Brij 58 entre 0.010 y 0.075 % de Brij 58 en el medio de medida incrementaron la velocidad inicial de extinción de

Resultados

fluorescencia la cual se mantenía estable a concentraciones superiores de dicho compuesto. De aquí que las determinaciones del transporte de H^+ en vesículas de plasmalema se realizaran en presencia de 0.075 % de Brij 58 (Figura 24.).

En relación a las membranas de callos controles, la adaptación a 50 y 100 mM NaCl indujeron, respectivamente, un incremento y una inhibición de la actividad transportadora de H^+ (VQs y Q_{max}) en las vesículas de plasmalema (Tabla 34.). En presencia de ortovanadato (600 μ M), el transporte de H^+ dependiente de ATP se inhibió en un 80 % mientras que la bafilomicina (300 mM) y la azida (1 mM) no ejercieron efecto alguno sobre dicha actividad (Tabla 34.).

Respecto a las vesículas de plasmalema aisladas de callos controles, la actividad transportadora de H^+ dependiente de ATP y sensible a vanadato de los callos adaptados a 50 mM NaCl fue considerablemente superior, mientras que, por el contrario, en las vesículas de los callos adaptados a 100 mM NaCl dicha actividad se inhibió en casi un 50 % (Tabla 34.). En función de estos resultados, la razón H^+ transportados/ATP hidrolizado por el enzima H^+ -ATPasa sensible a vanadato fue muy superior en los callos adaptados a 50 mM NaCl (Tabla 35.).

Tabla 34. Transporte de H^+ dependiente de ATP en vesículas de plasmalema de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl. Los resultados son media de 4 experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan. P= 95%.

Tratamientos	Q_{max} total (%Q. mg^{-1} .)	VQs (%Q. min^{-1} . mg^{-1} .)			
		Total	ΔV_a	$\Delta Bafilomicina$	ΔN_3
Callos controles	1787.3 ^a	593.77 ^a	429.18 ^a	-	-
Adaptados a 50 mM NaCl	2618.19 ^b	1014.79 ^b	887.15 ^b	-	-
Adaptados a 100 mM NaCl	949.8 ^c	407.07 ^c	276.24 ^c	-	-

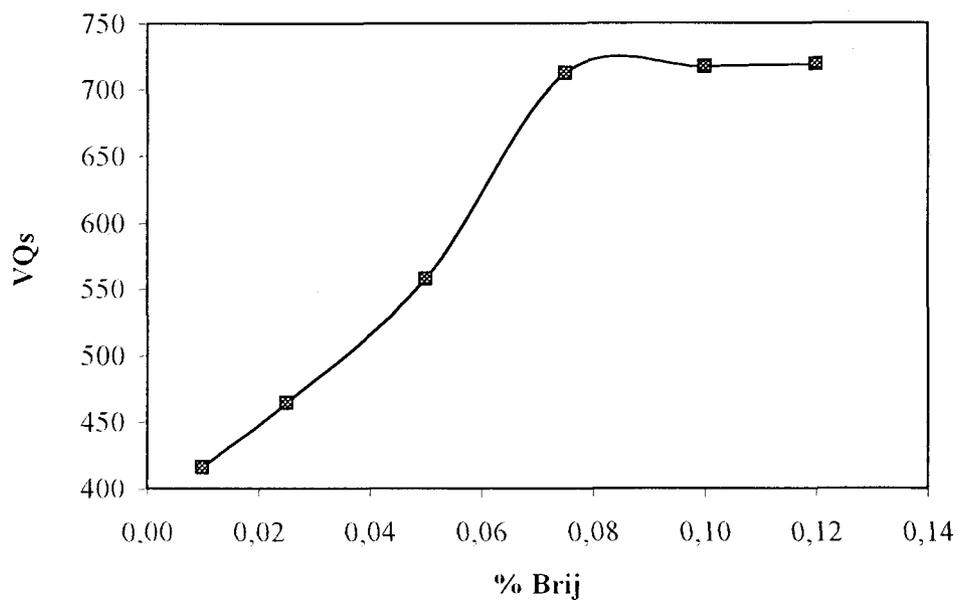


Figura 24. Efecto del Brij 58 sobre el transporte de H^+ dependiente de ATP en vesículas de plasmalema aisladas de callos de controles. Los resultados, expresados como velocidad inicial de extinción de fluorescencia $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{proteína}$ (VQs), son media de 3 experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

Tabla 35. Actividad fosfohidrolítica y de transporte de H^+ dependiente de ATP sensibles a vanadato y razón H^+ extruidos/ ATP hidrolizado en vesículas de plasmalema de callos controles y adaptados a 50 y 100 mM NaCl. Los resultados son media de 3 experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $P=95\%$.

Tratamientos	$\Delta Va H^+-ATPasa$ $\mu moles. mg^{-1}. h^{-1}.$	$\Delta Va-VQs$ $\%Q. min^{-1}. mg^{-1}.$	H^+/ATP
Callos control	17.39 ^a	429.18 ^a	24.70 ^a
Adaptados a 50 mM NaCl	18.20 ^a	887.15 ^b	48.74 ^b
Adaptados a 100 mM NaCl	11.28 ^b	276.24 ^c	24.50 ^a

C.4.3. Transporte pasivo de protones

El grado de permeabilidad a los H^+ de la membrana plasmática de los callos control y adaptados a 50 y 100 mM NaCl fue determinado midiendo el flujo pasivo de H^+ (Tabla 37.). Para ello, una vez que el gradiente de H^+ creado en las vesículas de plasmalema por el enzima $H^+-ATPasa$ alcanzó el equilibrio, se adicionó al medio de reacción 5 unidades/ml de hexoquinasa y 25 mM glucosa para disipar el gradiente de H^+ generado. La velocidad de disipación (VQr) es dependiente de la permeabilidad de las membranas a los H^+ .

Tabla 13. Transporte pasivo de protones en vesículas de plasmalema de callos de tomate. Los resultados, expresados como velocidad inicial de recuperación de fluorescencia en $\% \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ proteína (VQr) y como tiempo necesario para recuperar el 50 % del gradiente de H^+ creado ($T_{1/2}$), son media de 3 experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna, representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $P=95\%$.

Tratamientos	VQr ($\%Q. min^{-1}. mg^{-1}.$)	$T_{1/2}$ (min.)
Callos control	1762.19 ^a	3.4 ^a
Adaptados a 50 mM NaCl	1844.26 ^a	3.2 ^a
Adaptados a 100 mM NaCl	1239.83 ^b	4.6 ^b

Ninguno de los parámetros utilizados (velocidad de disipación del gradiente y tiempo necesario para recuperar el 50 % del gradiente de H^+ generado por la H^+ -ATPasa) se afectaron tras adaptar los callos controles a 50 mM NaCl, mientras que la adaptación a 100 mM NaCl provocó una disminución de ambos parámetros.

C.4.5. Componentes lipídicos de plasmalema

Los ácidos palmítico, estearico y oleico son los ácidos grasos mayoritarios de los lípidos totales de plasmalema. La adaptación a la sal indujo un incremento en el contenido total de ácidos grasos, una importante reducción del porcentaje de ácido linoléico así como de una disminución del índice de doble enlace respecto a las membranas de los callos controles (Tabla 38.).

Tabla 38. Composición y contenido en ácidos grasos de lípidos totales de plasmalema de callos controles y adaptados a 50 mM NaCl. Los resultados, expresados en % de ácidos grasos totales y en $\mu\text{g. mg}^{-1}$ de proteína, son media de 2 experimentos independientes que no difieren en más de un 10%.

Acido graso	Callos control		Adaptados a 50 mM NaCl	
	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	%
16:0	64.0	34.3	102.0	38.4
18:0 +18:1	91.5	49.0	139.5	52.6
18:2	27.9	14.9	11.4	4.3
18:3	3.4	1.8	12.5	4.7
Contenido Total	186.7		265.4	
IDE	59.8		49.0	

La Tabla 39. muestra el contenido de fosfolípidos totales y de diferentes moléculas fosfolípicas, así como la razón FC/FE en plasmalema de callos controles y adaptados a 50 mM

Resultados

NaCl. La adaptación a 50 mM NaCl indujo un incremento del contenido total en fosfolípidos, y de cada uno de los fosfolípidos identificados lo que no se tradujo en cambios importantes de la razón FC/FE.

Tabla 39. Contenido en fosfatidilcolina (FC), ácido fosfatídico (AF), fosfatidiletanolamina (FE) y otros fosfolípidos de plasmalema de callos controles y adaptados a 50 mM NaCl. Los resultados, expresados por $\mu\text{g. mg}^{-1}$ proteína, son media \pm DE de dos experimentos independientes. Letras iguales en la misma fila, representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan. P= 95%.

Fosfolípido	Callos control		Adaptados 50 mM NaCl	
	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.
FC	19.8	27.4 \pm 3.6	17.5	34.6 \pm 3.3
AF	19.0	26.3 \pm 6.3	22.6	44.7 \pm 7.9
FE	25.0	34.5 \pm 6.0	26.1	51.5 \pm 6.3
Otros	36.0	49.7 \pm 10.3	33.9	66.9 \pm 13.1
Fosfolípidos totales		138.1 ^a		197.6 ^b
Razón FC/FE		0.8 ^a		0.7 ^a

La composición y el contenido en ácidos grasos de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y ácido fosfatídico de plasmalema se muestra en la Tabla 40. La adaptación de los callos a 50 mM NaCl provocó cambios significativos en la composición de ácidos grasos de las tres moléculas fosfolípídicas analizadas, siendo los ácidos linoléico y sobre todo, palmítico los ácidos grasos mayoritarios tanto en plasmalema de callos controles como adaptados.

La adaptación al NaCl incrementó el grado de saturación de los ácidos grasos, al mismo tiempo que redujo el porcentaje de ácido linoléico de ácido fosfatídico y fosfatidiletanolamina (Tabla 40.).

Resultados

Tabla 40. Composición y contenido en ácidos grasos de fosfatidilcolina (FC), ácido fosfatídico (AF) y fosfatidiletanolamina (FE) de plasmalema de callos controles y adaptados a 50 mM NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{g. mg}^{-1}$ de proteína son media \pm DE de 2 experimentos independientes. N.D. No detectado.

Acido graso	Control		50 mM NaCl	
	$\mu\text{g. mg}^{-1}$	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$	%
FC				
16:0	13.2 \pm 1.2	69.0	13.8 \pm 1.0	57.1
18:0	1.0 \pm 0.3	5.5	2.9 \pm 0.4	12.4
18:1	1.5 \pm 0.1	7.7	2.8 \pm 0.5	11.5
18:2	2.9 \pm 0.8	15.2	4.0 \pm 0.3	16.6
18:3	0.5 \pm 0.1	2.6	0.7 \pm 0.1	2.7
IDE		46.08		52.86
AF				
16:0	11.2 \pm 2.2	60.86	23.91 \pm 3.5	69.13
18:0	1.3 \pm 0.3	7.1	1.0 \pm 0.4	12.0
18:1	1.2 \pm 0.6	6.3	1.0 \pm 0.2	11.5
18:2	4.4 \pm 1.2	24.1	4.8 \pm 1.2	16.6
18:3	0.3 \pm 0.1	1.6	0.6 \pm 0.2	2.7
IDE		59.21		35.72
FE				
16:0	16.0 \pm 2.2	66.3	27.0 \pm 2.8	75.1
18:0	1.8 \pm 0.2	7.3	2.3 \pm 0.5	6.5
18:1	1.5 \pm 0.2	6.0	2.2 \pm 0.3	6.1
18:2	4.4 \pm 1.6	18.3	3.4 \pm 1.0	9.3
18:3	0.5 \pm 0.2	2.0	1.1 \pm 0.2	3.0
IDE		48.69		33.80

En plasmalema de callos controles y adaptados a 50 mM NaCl el β -sitosterol y el estigmasterol fueron los esteroides libres mayoritarios. Comparativamente a las membranas de callos controles, la adaptación a 50 mM NaCl no indujo cambios significativos en el contenido de estas moléculas (Tabla 41.).

En la Tabla 42. se muestra el contenido de fosfolípidos y esteroides libres de la membrana plasmática de los callos controles y adaptados a 50 mM NaCl. El incremento significativo del contenido en fosfolípidos en las membranas de callos adaptados a 50 mM NaCl sin cambios en la tasa de esteroides libres, se traduce en una disminución de la razón esteroides libres/fosfolípidos.

Resultados

Tabla 41. Composición y contenido en esteroides libres de membrana plasmática de callos controles y adaptados a 50 mM NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{g. mg}^{-1}$ de proteína de plasmalema, son media \pm DE de 2 experimentos independientes. N.D. No detectado

Esteroides	Callos controles		Adaptados a 50 mM NaCl	
	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	%	$\mu\text{g. mg}^{-1}$ prot.	%
Colesterol	0.9 \pm 0.1	6.2	0.7 \pm 0.1	6.3
Campesterol	0.3 \pm 0.1	2.1	N.D.	N.D.
Estigmasterol	4.0 \pm 1.0	28.1	3.3 \pm 0.3	28.5
β -Sitosterol	9.0 \pm 1.6	63.6	7.7 \pm 2.8	65.2
Contenido total	14.1 \pm 3.0		11.7 \pm 4.0	

Tabla 42. Contenido en fosfolípidos y esteroides libres de plasmalema de callos controles y adaptados a 50 mM NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{g. mg}^{-1}$ de proteína, son media de 2 experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna, representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan. P= 95%.

Lípidos	Fosfolípidos	Esteroides libres	Esteroides/fosfolípidos
Callos control	138.06 ^a	14.11 ^a	0.10 ^a
Adaptados a 50 mM NaCl	197.63 ^b	11.75 ^a	0.06 ^b

C.4.6. Cambios en las propiedades de fluidez de la membrana plasmática

Los resultados de la Tabla 43. muestran el efecto de la adaptación al NaCl sobre la polarización de las sondas DPH y TMA-DPH, a nivel de las vesículas de plasmalema. Se observa una disminución en los valores de polarización de fluorescencia de la sonda DPH en las membranas de callos adaptados a 50 mM NaCl, en relación a los controles, mientras que los obtenidos utilizando la sonda TMA-DPH fueron superiores en las membranas de los callos adaptados a 50 mM NaCl.

Resultados

Tabla 43. Efecto de la adaptación del NaCl sobre la polarización de fluorescencia de las membranas de plasmalema marcadas con las sondas DPH y TMA-DPH. Los resultados son media de dos experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, P= 95%.

Tratamientos	DPH	TMA-DPH
Callos controles	0.2772 ^a	0.2417 ^a
Adaptados a 50 mM NaCl	0.2716 ^b	0.2482 ^b

VI. Discusión

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, manteniendo una alta razón K^+/Na^+ en el citoplasma celular. Por ello, en especies tolerantes, la capacidad para controlar los flujos iónicos constituye un mecanismo de tolerancia, por lo que la caracterización e identificación bioquímica de los mecanismos que regulan esta respuesta celular pueden ser claves en los programas de investigación y mejora vegetal. En este sentido, puesto que la mayoría de las especies cultivada de tomate presentan predominantemente una estrategia glicófitas, el estudio de aquellos procesos fisiológicos y bioquímicos en cultivos de tomate, regulados por las condiciones de estrés o adaptación al NaCl, puede coadyuvar a descifrar los mecanismos de tolerancia a este factor.

El cultivo de líneas celulares tolerantes a la salinidad viene constituyendo una herramienta de gran utilidad en el estudio de los mecanismos de tolerancia de las plantas a este factor ambiental. En los últimos años, se ha llevado a cabo gran número de investigaciones para conseguir plantas resistentes a la salinidad mediante selección in vitro de líneas celulares tolerantes a altas concentraciones de NaCl. Además, las líneas celulares tolerantes a la salinidad han sido de gran utilidad en el estudio de los mecanismos de defensa de las plantas frente al estrés salino. En nuestro caso, hemos obtenido callos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. var Pera) adaptados a diferentes concentraciones salinas que hemos utilizado como modelo experimental para profundizar en los mecanismos implicados en la tolerancia al NaCl.

El análisis del crecimiento de los callos controles y adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl ha revelado que la adaptación a bajas concentraciones de sal (25 y 50 mM) no provoca inhibición del crecimiento sino que por el contrario, induce una clara estimulación del mismo (Tabla 1. y Figuras 1.a. y 2.). La estimulación del crecimiento a bajas concentraciones salinas se ha descrito en diferentes tejidos (Woolly 1957; Taleisnik y Grunberg, 1994) y callos de tomate. Así, callos de *Lycopersicon esculentum* Var. Saint Pierre adaptados a 25 y 50 mM NaCl mostraron un incremento del crecimiento hasta un 85 % (Bourgeois-Chaillou y Guerrier, 1992) y callos de *Lycopersicon peruvianum* adaptados a concentraciones inferiores a 200 mM NaCl incrementaron su crecimiento hasta un 60 % (Hassan y Wilkins, 1988). Este incremento del crecimiento en condiciones de adaptación al NaCl se observa también a nivel de callos y células de otras variedades y especies entre ellas *Beta vulgaris* (Le Dily y col., 1990; Blumwald y Poole, 1987), tabaco (Ericson y Alfinito, 1984; Murata y col., 1994), *Pisum sativum* (Olmos y Hellín, 1996). En general, la

estimulación del crecimiento por bajos niveles de salinidad ha sido interpretada como el resultado de una mejora de las relaciones hídricas atribuible a la acumulación de iones (Munns y col., 1983). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, el contenido hídrico fue similar en los callos control y en los adaptados a 25 y 50 mM NaCl. Además de mejorar las relaciones hídricas, bajas concentraciones de Na^+ puede sustituir parcialmente al potasio en el metabolismo celular provocando una estimulación del crecimiento (Patnaik y Debata, 1997; Kumar y Sharma, 1989; Besford, 1978a; Besford, 1978b;). En callos de tomate, se podría conseguir un efecto de este tipo a concentraciones de 25 mM de NaCl que no afectan, en ningún caso, al crecimiento del callo.

En contraposición a este hecho, existen especies o variedades de especies en las que bajas concentraciones de NaCl resultan inhibitorias del crecimiento a nivel de callos o suspensiones celulares. Este es el caso de callos de *Oryza sativa* L (Kavi Kishor, 1988), *Citrus sinensis* y *Citrus aurantium* (Spiegel-roy y Ben-hayyim, 1985) adaptados a 30-50 mM de NaCl. En otros casos, la inhibición del crecimiento se observó a concentraciones superiores a 200 mM NaCl, por ejemplo, en líneas de callos de *Lycopersicon peruvianum* adaptadas a 350 mM NaCl (Hassan y Wilkins, 1988), callos de *L. esculentum* cv. saint pierre adaptadas a 75 y 100 mM NaCl (Bourgeois-Chaillou y col., 1987), callos de *Poncirus trifoliata* (Bouharmont y Beloualy, 1992), *Beta vulgaris*, (Le Dily y col., 1990), *Oryza sativa* (Kavi Kishor, 1988) desarrollados a concentraciones de NaCl superiores a 50 mM y callos de *Cymbopogon martinii* adaptados a concentraciones superiores a 100 mM NaCl (Patnaik y Debata, 1997).

en Nuestro caso, el crecimiento de los callos durante un subcultivo en 50 ó 100 mM NaCl, así como la adaptación de los callos a 100 mM NaCl provocó una inhibición del crecimiento (Tabla 1. y Figuras 1., 2. y 3.). En general, la reducción del crecimiento es una de las primeras respuestas de defensa que desarrollan las plantas bajo condiciones del estrés salino, dado que una menor división y elongación celular puede facilitar la acumulación de solutos orgánicos y la compartimentación de los iones en la vacuola (Tal, 1984; Cheesman, 1988; Iraki y col., 1989). Los resultados obtenidos a nivel de las medidas del diámetro celular corroboran esta hipótesis puesto que los callos adaptados a 50 mM NaCl muestran un crecimiento estimulado y no presentan cambios significativos en su diámetro celular respecto a los callos controles mientras que los callos adaptados a 100 mM NaCl presentan un crecimiento inhibido y muestran un diámetro celular menor (Tabla 3.) lo que indica una elongación celular menor. Al igual que en callos de tomate, la adaptación de las células de tabaco al NaCl induce una disminución del diámetro celular (Chang y col., 1996) que parece tener valor adaptativo.

El crecimiento de los callos de tomate no se vio afectado tras un subcultivo en medios con 25 mM NaCl indicando que el NaCl no es tóxico a estos niveles (Tabla 1. y Figuras 1.b. y 3.). Resultados similares fueron obtenidos en callos de *L. esculentum*. Mill. var Saint Pierre tratados con 25 mM NaCl (Bourgeais-Chaillou y col., 1987) mientras que una reducción del crecimiento se observa en callos derivados de hojas de las variedades Pera y Muchamiel de *L. esculentum* tratados con 35 mM NaCl (Cano y col., 1996) y en células de Citrus (Ben-Hayyim y col., 1987) a bajas concentraciones de NaCl.

La reducción del crecimiento de los callos control tratados con 50 mM NaCl durante un subcultivo fue debida principalmente a una pérdida del contenido en agua de dichos callos puesto que el peso seco final al cabo de un subcultivo fue similar al de los callos control. La elevada turgencia de los callos adaptados a 50 mM NaCl respecto a los callos controles desarrollados durante un subcultivo en presencia de 50 mM NaCl es indicativa de una acumulación de solutos que permiten el ajuste osmótico (Binzel y col., 1987). Por lo contrario, la reducción de crecimiento de los callos adaptados a 100 mM NaCl y de los callos control crecidos en presencia de 100 mM NaCl durante un subcultivo fue debida a una menor división celular ya que ambos tratamientos salinos provocaron una reducción considerable de los pesos frescos y secos de los callos (Tabla 1.).

La inhibición del crecimiento de tras un subcultivo en presencia de 50 ó 100 mM NaCl fue también indicada en suspensiones celulares de *Medicago* (Chaudhary y col., 1997), en suspensiones celulares y callos de *L. peruvianum* (Hassan y Wilkins, 1988; Tal y col., 1978) tratados con concentraciones superiores a 100 mM NaCl, en callos de *Pisum sativum* (Olmos y Hellín, 1996) tratados con 85.5 mM NaCl así como en callos de las variedades Pera, Muchamiel y Saint Pierre de *L. esculentum* (Cano y col., 1996; Bourgeais-Chaillou y col., 1987) crecidos en presencia de concentraciones de NaCl superiores a 50 mM NaCl. En contra posición con estos resultados, el crecimiento de callos de *Lycopersicon penneli* durante un subcultivo a concentraciones de hasta 175 mM NaCl induce una estimulación de crecimiento (Cano y col., 1996) mientras que el tratamiento de los callos de *Cymbopogon martinii* durante un subcultivo con concentraciones de hasta 50 mM NaCl no afectan significativamente el peso fresco y seco de los callos (Patnaik y Debata, 1997).

La transferencia de los callos de tomate adaptados a 50 mM NaCl a medios de cultivo suplementados con 100 mM NaCl durante un subcultivo no afectó el índice de crecimiento relativo de dichos callos mientras que el desarrollo de los callos control en presencia de 100 mM NaCl

durante un subcultivo inhibió notablemente el crecimiento, lo que sugiere que los callos adaptados a 50 mM NaCl han desarrollado mecanismos que les permiten afrontar altas concentraciones de NaCl (Figura 4. y Tabla 2.). Para que el caractere seleccionado pueda ser agriculturalmente útil, este debe manifestarse estable incluso en ausencia de estrés (Kochba y col., 1982; Salgado-Garciglia y col., 1985). En este trabajo, para corroborar la estabilidad del proceso adaptativo, los callos adaptados a 50 mM NaCl fueron retransferidos a medios conteniendo 50 mM NaCl tras 6 subcultivos en medios desprovistos de NaCl. La deadaptación de los callos y su posterior transferencia a medios suplementados con 50 mM NaCl no afectó al crecimiento de los mismos, lo que indica la persistencia de las características de tolerancia al NaCl inducido durante la adaptación a 50 mM NaCl. Resultados similares fueron obtenidos con callos de *Cymbopogon martinii* adaptados a 300 mM NaCl (Patnaik y Debata, 1997), y *Lycopersicon peruvianum* adaptados a 350 mM NaCl (Hassan y Wilkins, 1988).

Paralelamente a la estimulación del crecimiento, los callos adaptados a 50 mM NaCl mostraron un incremento de la tasa respiratoria que indicaría una mayor demanda de energía a fin de mantener una elevada actividad metabólica. En contraste con ello, el desarrollo de los callos control en presencia de 100 mM NaCl durante un subcultivo indujo una reducción de la tasa respiratoria que sugiere una ralentización del metabolismo celular por el estrés salino. Sin embargo, en los callos adaptados a 50 mM NaCl crecidos durante un subcultivo en presencia de 50 ó 100 mM NaCl los valores de respiración fueron similares confirmando la tolerancia de los callos adaptados a 50 mM NaCl (Tabla 4.).

La regulación de la composición iónica citoplasmática es un proceso clave en la tolerancia a la salinidad. En este sentido, se ha determinado el contenido intracelular de Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} en los callos de tomate sometidos a diferentes tratamientos salinos. En los callos de tomate adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl, el contenido en Na^+ y Cl^- incrementa proporcionalmente a la concentración de NaCl en el medio de cultivo, mientras que el contenido en K^+ muestra una pequeña reducción, resultando el conjunto en una disminución de la razón K^+/Na^+ (Figura 5.a. y Tabla 5.). El crecimiento de los callos control en presencia de diferentes concentraciones de NaCl no modificó el contenido en K^+ mientras que incrementó notablemente la concentración intracelular en Na^+ y Cl^- , dando lugar a concentraciones en Na^+ y Cl^- superiores a las observadas en los callos adaptados a las mismas concentraciones salinas (Figura 5.b.) y, en consecuencia a una razón K^+/Na^+ inferior (Tabla 5.). El hecho que en los callos adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl presenten un contenido menor en K^+/Na^+ respecto a los callos control desarrollados durante un subcultivo en

presencia de estas concentraciones de NaCl indica que los efectos negativos en la fisiología celular de la entrada de iones Na^+ en la célula (Jacobs y Hanson, 1985, Cramer y col., 1987b) y la permeabilidad a los iones K^+ hacia el exterior celular (Cramer y col., 1985) en condiciones salinas pueden ser aliviados en los callos adaptados al NaCl, al menos en parte, por una reducción en la permeabilidad a los iones K^+ y Na^+ en la membrana plasmática. (Murata y col., 1994). Todo ello indica que un mejor control de la absorción de Na^+ y/o una exclusión activa de Na^+ podrían ser unas de las estrategias de defensa adquiridas por los callos de tomate durante el proceso de adaptación.

Por otra parte, los callos adaptados a 50 mM NaCl crecidos durante un subcultivo en presencia de 100 mM NaCl muestran un ligero incremento del contenido en Na^+ y Cl^- sin cambios significativos en el contenido en K^+ en comparación con los callos adaptados a 50 mM NaCl (Figura 6.). En todos los casos la estrategia de adaptación al NaCl consiste en una regulación de la concentración intracelular de Na^+ vía un mejor control de la entrada y/o exclusión del mismo.

La exclusión de Na^+ fue también descrita en las líneas celulares tolerantes *Medicago sativa* y *Medicago media* que presentan un menor contenido en Na^+ en comparación a las líneas sensibles tras un estrés por NaCl (Shah, 1990; Chaudhary y col., 1997). Líneas celulares de *Citrus* tolerantes al NaCl sobrevivieron a elevados niveles de salinidad evitando parcialmente el NaCl (Ben-Hayyim y Kochba, 1983). Pandey y Ganapathy (1984) y Paek y col., (1982) relacionaron la sensibilidad al NaCl de los callos de *Cicer arietinum* y *Brassica campestris* con el exceso de Na^+ y Cl^- . Las células de tabaco (Binzel y col., 1987) y patata (Sabbah y Tal 1990) adaptadas al NaCl acumulan más Na^+ y Cl^- que las células no adaptadas y los callos de *Cymbopogon martinii* tolerantes al NaCl muestran un mayor contenido en Na^+ y K^+ que las líneas sensibles (Patnaik y Debata, 1997).

Es conocido que el equilibrio celular del contenido en Na^+ y K^+ es un factor importante en la tolerancia a la sal (Greenway y Muuns, 1980). En hierbas de forraje (Sudan grass), se ha observado que la tolerancia a la sal está asociada a la reducción en la absorción de Na^+ y Cl^- y a la entrada simultánea de iones esenciales como K^+ (Datta y col., 1996) (otro ejemplo de mayor K/Na). De acuerdo con ello, la tolerancia al NaCl estaría asociada a una mayor razón K^+/Na^+ en plantas tolerantes que en plantas sensibles, en condiciones de salinidad. Sin embargo en líneas de callos tolerantes al NaCl de *Vigna radiata* (Kumar y Sharma, 1989) y *Cymbopogon martinii* (Patnaik y Debata, 1997) altos niveles de Na^+ y bajos de K^+ son la característica de las líneas celulares adaptadas a la sal.

El hecho de que en callos adaptados a 50 mM NaCl la estimulación del crecimiento se acompaña de los altos niveles de Na^+ puede ser explicable en base a la utilización de Na^+ para

compensar la pérdida de iones K^+ , puesto que el Na^+ puede sustituir el K^+ en funciones inespecíficas (Kumar y Sharma, 1989) consiguiendo además un papel osmoregulador (Marsehner, 1971; Patnaik y Debata, 1997). En los callos adaptados a 100 mM NaCl, el contenido en K^+ no se modifica respecto al detectado en callos adaptados a 50 mM NaCl, mientras que el de Na^+ y Cl^- incrementa considerablemente lo que parece indicar que la inhibición del crecimiento observable en estos callos parece mas bien consecuencia del exceso de Na^+ y Cl^- que de la pérdida intracelular de K^+ ; indicando además que se ha sobrepasado el umbral de concentración intracelular de Na^+ en el que este ión puede sustituir el K^+ .

Los callos adaptados a 100 mM NaCl muestran un contenido en Na^+ del 5,2 % de peso seco mientras que los callos adaptados a 50 mM NaCl contienen un 3,71 % de peso seco de Na^+ indicando así que los límites de toxicidad de Na^+ en los callos de tomate se encuentran en el intervalo 4-5 % de peso seco. En este sentido, Rush y Epstein (1981) indicaron que el contenido en Na^+ en hojas de especies cultivadas de tomate empieza a ser tóxico a partir de niveles de 5 % de peso seco mientras que en las especies silvestre de *Lycopersicon* pueden contener hasta 20 % de peso seco de Na^+ en hojas.

El Ca^{2+} es un factor importante en la tolerancia de las plantas a la salinidad (Epstein, 1998), ya que condiciona la permeabilidad de las membranas celulares al Na^+ (Heyser y Nabors, 1981; Bañuls y Primo-Millo, 1992) y el mantenimiento del transporte de K^+ en presencia de Na^+ (Zhong y Laüchli, 1994; Liu y Zhu, 1998). Nuestros resultados muestran que tanto los callos adaptados a 50 y 100 mM NaCl como los callos control crecidos durante un subcultivo en presencia de 50 ó 100 mM NaCl presentan una leve reducción del contenido en Ca^{2+} con respecto a los callos control (Figura 5.). Esta disminución fue similar en los callos adaptados y estresados indicando que el contenido en Ca^{2+} no alcanzó niveles críticos que podrían afectar la supervivencia celular.

En plantas glicófitas, junto en la regulación del contenido iónico, la síntesis de osmolitos orgánicos es una de las principales estrategias de tolerancia a la salinidad (Bonhert y Jensen, 1996; Hare y col., 1998). En este contexto, se ha estudiado el efecto del NaCl sobre la composición y contenido en aminoácidos libres de los callos de tomate adaptados y no adaptados al NaCl. El análisis de la composición en aminoácidos libres de los callos de tomate muestra una gran diversidad de repuestas en función de la concentración del NaCl y la duración del tratamiento salino. De todos los cambios observados tanto a nivel del contenido como de la composición en aminoácidos libres totales, se destaca la gran acumulación de prolina intracelular en condiciones de estrés por 100 mM NaCl y la reducción en la concentración de dicho aminoácido tras el proceso de

adaptación (Figuras 12. y 14.). La acumulación de altos niveles de prolina en los callos control tratados con 100 mM NaCl durante un subcultivo indica el papel osmoregulador de este aminoácido en los primeros estadios de estrés o que la prolina mas que un marcador de tolerancia es un reflejo del daño. El alto nivel de acumulación endógena de prolina libre simultáneamente al incremento de la salinidad del medio externo fue corroborado por numerosos trabajos en diferentes plantas (Delauney y Verma, 1993; Kishor y col., 1995; Petrusa y Winicov, 1997; Rout y Shaw, 1998). Venekamp (1989) indica que la síntesis de prolina en condiciones de estrés hídrico también contribuye al control del pH citoplasmático. Así, en ausencia de estrés el exceso de H^+ es intercambiado por K^+ mientras que en condiciones de salinidad, la síntesis de prolina a partir de glutamato, que necesita 2 H^+ , podría representar un mecanismo adaptativo para reducir la acidez del citoplasma celular (Bellinger y Larher, 1978; Venekamp, 1989).

El hecho que los callos adaptados a 100 mM NaCl muestren concentraciones de prolina mas bajas que los callos crecidos durante un subcultivo en 100 mM NaCl no es contradictorio con un papel positivo de la prolina en la tolerancia al NaCl. Probablemente durante el proceso de adaptación se han inducido otros mecanismos de tolerancia al NaCl en la célula (Delauney y Verma, 1993), que pueden provocar a su vez la degradación de prolina intracelular. En este sentido, se ha sugerido que la prolina puede constituir la fuente mayoritaria de energía y nitrógeno durante la fase de recuperación post-estrés (Nash y col., 1982) en la que la prolina acumulada durante el estrés proporciona la energía para el crecimiento induciendo así la tolerancia a la salinidad (Taylor, 1996). Por otra parte, la disminución de los niveles de prolina en los callos adaptados al NaCl sugiere que este aminoácido no es un factor limitante de la tolerancia a la salinidad en tomate y que puede ser un síntoma del daño inducido por el estrés salino o hídrico (Chandler y Thorpe, 1987; Perez-alfocca, 1994b). En este sentido, Cano y col. (1996) también indicaron que la acumulación de prolina en callos de diferentes cultivos de tomate fue relacionada con una inhibición del crecimiento de los callos. Además, un mutante *sos1* de *Arabidopsis thaliana* muy sensible al estrés por NaCl acumula mas prolina que el tipo silvestre (Liu y Zhu, 1997). En plantas acuáticas, *Hydrilla verticillata*, especie sensible, acumula mas prolina en respuesta a un tratamiento por 0.5 % NaCl que las especies mas tolerantes *Najas gramenia* y *N. indica* (Rout y Shaw, 1998). Por el contrario, se ha observado que células de tabaco adaptadas al NaCl acumulan prolina a través de un incremento de su biosíntesis (Rhodes y Handa, 1989.) y que líneas tolerantes de callos de *Cymbopogon martinii* acumulan más prolina que las sensibles en condiciones de estrés salino (Patnaik y Debata, 1997).

Los callos de tomate adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl acumulan pequeñas cantidades de prolina (Figuras 12.) y aunque la concentración no es significativamente elevada para ejercer un papel osmoregulador, es posible que si sea suficiente para ejercer un papel protector de los enzimas y membranas celulares (Caplan y col., 1990).

El desarrollo durante un subcultivo de los callos control en presencia de 50 mM NaCl no provocó cambios significativos en la concentración de prolina (Figuras 14.) lo que sugiere que la acumulación de prolina es inducible solo cuando se alcanza un alto nivel de estrés salino y que este nivel dependerá de la presencia o ausencia de otros mecanismos de protección en los tejidos (Shah y col., 1990).

Paralelamente a los cambios inducidos por el NaCl en la concentración de prolina en los callos de tomate, se detectó un alto contenido intracelular en valina, treonina, alanina, isoleucina y leucina en los callos adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl (Figuras 12.). Dicha acumulación podría ser un indicador del papel osmoregulador de dichos aminoácidos en respuesta a la sal. No obstante, la valina, isoleucina y leucina parecen ser marcadores de estrés a la sal de acuerdo con los resultados obtenidos en callos de tres variedades de tomate con distintos grados de tolerancia al NaCl (Cano y col. 1996).

Además, a excepción de los callos control desarrollados durante un subcultivo en presencia de 25 mM NaCl, la sal indujo una reducción del contenido en glutamina que, por otra parte, constituye el aminoácido mayoritario en los callos control (Figuras 12. y 14.). Posiblemente, este menor contenido en glutamina se deba a su utilización en la biosíntesis de prolina y/o otros aminoácidos. En este sentido, numerosos trabajos describen la glutamina como el aminoácido mayoritario en numerosas plantas así como la reducción de su contenido en condiciones de estrés salino o hídrico (Rhodes y col., 1986; Olmos y Hellín, 1996)

Aunque la composición en aminoácidos fue diferente en los callos control tratados durante un subcultivo con NaCl y los adaptados a diferentes concentraciones salinas, el contenido total en aminoácidos fue similar en todos los casos (Tabla 7.). En este sentido, mutantes de *Nicotiana glauca* tolerantes al NaCl, KCl y PEG (Sumaryati y col., 1992) presentan el mismo contenido en aminoácidos libres totales que los callos control, si bien los mutantes tolerantes al NaCl acumulan 6 a 12 veces más prolina que los controles. Por lo contrario, se ha descrito un incremento del contenido en aminoácidos totales en presencia de NaCl. Así, en condiciones de estrés salino se ha observado una acumulación de los aminoácidos totales en los callos de *Pisum sativum* (Olmos y Hellín, 1996) y en callos de *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. P-73 (Perez-Alfocea y col., 1994b).

Los azúcares constituyen otro componente importante de la osmoregulación en respuesta al estrés salino. Por ello, se ha estudiado el efecto del NaCl sobre el contenido en azúcares solubles totales de callos de tomate (Figuras 9. y 10.). Los callos adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl acumulan azúcares solubles totales mientras que los callos control crecidos durante un subcultivo en presencia de 25, 50 ó 100 mM al NaCl no muestran cambios significativos en su contenido en azúcares solubles. Además, el desarrollo de los callos adaptados a 50 mM NaCl en presencia de 100 mM NaCl durante un subcultivo no afectó el contenido en azúcares solubles de dichos callos. Estos resultados indican que los azúcares son los solutos orgánicos principalmente involucrados en el ajuste osmótico en los callos de tomate adaptados al NaCl. En este sentido, numerosas glicófitas sometidas a estrés salino o osmótico acumulan azúcares (Greenway y Munns, 1980; Hasegawa y col., 1984; Jacomini y col., 1988; Hare y col., 1998; Gao y col., 1998) que además de intervenir en el ajuste osmótico en respuesta a la sal pueden contribuir a paliar el estrés oxidativo generado por la salinidad, neutralizando los radicales hidroxilo (Smirnov y Cumbes, 1989).

La acumulación de azúcares fue independiente del efecto de la sal sobre el crecimiento puesto que los callos adaptados a 25 y 50 mM NaCl crecían más que los controles mientras que el de los callos adaptados a 100 mM NaCl presentaron un crecimiento menor al de los callos controles. El ajuste osmótico mediante acumulación de azúcares solubles parece ser una de las estrategias fundamentales de la tolerancia al NaCl en los callos de tomate adaptados al NaCl.

El coste energético del ajuste osmótico con osmolitos orgánicos es bastante más elevado que el requerido para una acumulación de iones inorgánicos lo que determinaría una gran demanda para la síntesis de azúcares en los callos adaptados al NaCl. Olmos y Hellín (1996) indica que la inhibición del crecimiento de callos de *Pisum sativum* adaptados a 85.5 mM NaCl es probablemente debida a que la demanda en carbohidratos para el ajuste osmótico compite con la demanda para el crecimiento provocando así una reducción del mismo. Así, la adaptación a 100 mM NaCl podría afectar al crecimiento celular mediante una elevada competición entre la demanda en azúcares para el ajuste osmótico y el crecimiento celular. Sin embargo, esta hipótesis no explicaría el mayor crecimiento de los callos adaptados a 25 y 50 mM NaCl.

El malato es uno de los principales componentes orgánicos que intervienen en el ajuste osmótico en plantas superiores siendo además los enzimas que intervienen en la formación de este compuesto de crucial importancia en la regulación del pH citoplasmático (Kurkdjian y Guern, 1989). Por ello, se ha estudiado el efecto del NaCl sobre el contenido en malato en callos de

tomate control, adaptados al NaCl y estresados con diferentes concentraciones salinas. Los resultados muestran que los callos adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl así como los callos control crecidos durante un subcultivo en presencia de 50 ó 100 mM NaCl presentan una reducción del contenido en malato (Figuras 7. y 8.). El menor contenido en malato en los callos adaptados a 25 y 50 mM NaCl puede deberse a la elevada actividad metabólica reflejada en un crecimiento y una tasa respiratoria incrementados respecto a los callos control. En los callos adaptados a 100 mM NaCl y los callos control crecidos en presencia de 50 ó 100 mM NaCl presentan un crecimiento inhibido, la reducción de la concentración intracelular en malato puede ser debida a su contribución en el mantenimiento del pH citoplasmático. Puesto que el pH intracelular puede ser alterado en condiciones de estrés salino, la formación de malato a través del sistema bioquímico pH stat puede representar un mecanismo de tolerancia al estrés. En este sentido, mientras en *Pisum sativum* la adaptación de los callos a 85.5 mM NaCl provoca una reducción del contenido en los ácidos málico y cítrico (Olmos y Hellín, 1996), en *Lycopersicon esculentum* se detecto una acumulación de ácidos orgánicos del ciclo tricarboxílicos (citrato, malato) (Bourgeois-Chaillou y Guerrier, 1992; Santa-Cruz y col., 1998) en respuesta a un estrés salino.

Las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa y el NADP enzima málico, implicadas en las síntesis y consumo del malato, son particularmente sensibles al estrés salino, especialmente en plantas CAM. Por ello, la actividad de estos enzimas, marcadores de la tolerancia a la salinidad en plantas CAM, fue ensayada en callos de tomate controles adaptados al NaCl y crecidos en presencia de NaCl durante un subcultivo (Tabla 19.). Únicamente los callos adaptados a 100 mM NaCl mostraron un incremento en las actividades PEPC y NADP-enzima málico, lo que indica que en los callos de tomate la activación de estos enzimas solo se produce como consecuencia de la adaptación a altas concentraciones salinas. Dicha estimulación puede ser una estrategia de tolerancia al NaCl que permita un mejor control del pH citoplasmático a través de una regulación rápida de la acidificación (PEPC) y alcalinización (NADP-enzima málico) del citoplasma celular (Holtum y Winter, 1982). Por otra parte, los callos adaptados a 25 y 50 mM NaCl en los cuales no se indujieron las actividades PEPC y NADP-enzima málico respecto a los callos control, la regulación del pH citoplasmático se ejerce principalmente a través de otro mecanismo en el que interviene posiblemente bombas primarias de H⁺ a nivel de la membrana plasmática y/o tonoplasto.

La estimulación de los enzimas PEPC y NADP-enzima málico ha sido también detectada en otras plantas en respuesta a la sal. En *Mesembryanthemum crystallinum* L., la inducción del metabolismo CAM como respuesta adaptativa a altas concentraciones de NaCl, se manifiesta en un incremento de las actividades PEPC y NADP-enzima málico (Holtum y Winter, 1982). La

activación de ambas enzimas se observa también en dos genotipos tolerantes de *Pennisetum* como respuesta a un estrés por 25 ó 75 mM NaCl (Bouraima y col., 1987). Un tratamiento por diferentes concentraciones de NaCl de 3 especies de plantas acuáticas (*Hydrilla verticillata*, *Najas indica*, *N. gramenia*) provocó un incremento de la actividad PEPC únicamente en *Hydrilla verticillata*, la especie más sensible (Rout y Shaw, 1998).

En plantas superiores, la asimilación y extrusión de los iones a través de las membranas celulares depende principalmente del gradiente electroquímico de H^+ generado por la actuación de las bombas primarias H^+ -ATPasas y H^+ -PPasa. Con el objeto de determinar el papel de estas bombas en la adaptación a la sal se ha estudiado el efecto del NaCl sobre la extrusión de H^+ por células de tomate, así como el efecto del NaCl sobre las actividades H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa de vesículas de membranas aisladas de callos de tomate. A nivel de los callos adaptados a 25, 50 y 100 mM NaCl se observa un paralelismo entre el crecimiento celular y la actividad bombeadora de H^+ , de forma que concentraciones de NaCl que estimulan el crecimiento incrementan la extrusión de H^+ , mientras que concentraciones de NaCl inhibitorias del crecimiento inducen una disminución de la capacidad extractora de H^+ (Figura 15.). La extrusión de H^+ detectada en células de tomate es debida, en gran medida, a la actividad del enzima H^+ -ATPasa de la membrana plasmática ya que se estimula por fusicocina y se inhibe por DCCD (Tabla 16.).

Las actividades H^+ -ATPasas y H^+ -PPasa en vesículas microsomales son similares en los callos control y adaptados a 25 y 50 mM NaCl. El hecho de que la estimulación de la extrusión de H^+ en callos adaptados a 25 y 50 mM de NaCl no se acompaña de un incremento de las actividades H^+ -ATPasa a nivel de la membrana microsomal (Tabla 20.), sugiere que los posibles cambios inducidos por el NaCl sobre el enzima H^+ -ATPasa no deben afectar a la hidrólisis de ATP, sino más bien al transporte de H^+ asociado a este enzima. A diferencia de los callos adaptados a 25 y 50 mM NaCl, los adaptados a 100 mM NaCl, muestran una inhibición de la extrusión de H^+ a nivel celular que se corresponde a una inhibición de la actividad H^+ -ATPasa asociada a la membrana microsomal (Tabla 20.).

El estudio del transporte de H^+ dependiente de ATP a nivel de microsomas muestra que la adaptación de los callos de tomate a 25 y 50 mM NaCl induce un incremento de esta actividad (Tablas 25.). Estos resultados confirman que la mayor actividad extractora de H^+ en células de callos de tomate adaptados a 25 y 50 mM NaCl es en gran parte debida a una estimulación del transporte de H^+ dependiente de ATP a nivel de membrana microsomal. Del mismo modo, la reducción de la extrusión de H^+ por los callos adaptados a 100 mM NaCl se refleja en una

disminución del transporte H^+ dependiente de ATP en vesículas en membranas microsomas de dichos callos. La utilización de vanadato permitió concluir que tanto la extrusión de H^+ determinada en los callos de tomate como la actividad transportadora de H^+ dependiente de ATP asociada a los microsomas aislados de estos callos están asociados en gran medida a la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática. No obstante, el hecho de que la estimulación de la actividad transportadora de H^+ sensible a vanadato no se acompaña de un incremento de la actividad $\Delta Va-H^+$ -ATPasa microsomal indica que la adaptación de los callos al NaCl induce cambios en la estequiometría de la reacción catalizada por el enzima H^+ -ATPasa de plasmalema. Estos cambios, se reflejarían en una mayor razón H^+ extruidos /ATP hidrolizado en los callos adaptados a 25 y 50 mM NaCl (Tabla 26.). Contrariamente, en los callos adaptados a 100 mM NaCl, en los que induce una disminución tanto del transporte de H^+ dependiente de ATP sensible a vanadato como de la actividad $\Delta Va-H^+$ -ATPasa, la estequiometría de la reacción enzimática no se modifica como consecuencia de la adaptación al NaCl (Tabla 26.).

Los resultados obtenidos en callos control tratados con diferentes concentraciones de NaCl durante un subcultivo muestran una vez más el paralelismo entre el crecimiento de los callos de tomate y las actividades bombeadoras de H^+ in vivo e in vitro. Así, concentraciones del NaCl que tras un subcultivo no afectan al crecimiento (25 mM) no inducen cambios significativos en la extrusión de H^+ in vivo mientras que concentraciones del NaCl inhibitorias del crecimiento después de un subcultivo (50 y 100 mM) provocan una clara disminución de la capacidad bombeadora de H in vivo (Figura 16 y Tablas 17.).

Del mismo modo, los cambios inducidos en la actividad H^+ -ATPasa sensible a vanadato (Tabla 21.) y del transporte de H^+ dependiente de ATP (Tabla 27) después de un subcultivo en presencia de NaCl indican que concentraciones salinas que no afectan el desarrollo de los callos (25 mM NaCl) no inducen cambios significativos ni en las actividades H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa ni en el transporte de H^+ dependiente de ATP total y sensible a vanadato en las vesículas microsomas. No obstante, concentraciones de NaCl que inhiben el crecimiento (50 y 10 mM NaCl) inhiben las actividades H^+ -ATPasa sensible a vanadato, nitrato y azida así como del transporte de protones dependiente de ATP asociado a las membranas microsomas. En el caso de un estrés severo (100 mM NaCl), la inhibición del transporte de H^+ dependiente de ATP fue muy acusada y supuso una disminución de la razón H^+ extruidos/ ATP hidrolizado respecto a los callos control (Tabla 28.).

La adición de 100 mM NaCl al medio de incubación de las células de callos de tomate provoca un incremento transitorio (45 min) de la extrusión de H^+ tanto en callos controles como en los callos adaptados a 50 y 100 mM de NaCl (Figuras 17. y 18. y Tabla 18.). Este efecto también se ha observado en cultivos de células de *Dunaliella tertiolecta* en las que la adición de 100 mM NaCl al medio de incubación indujo una acidificación transitoria del medio externo durante mas de 2 horas (Kuchitsu y col., 1989). En callos de tomate la capacidad extractora de H^+ también se incrementó tras la adición de 100 mM de KCl, 50 mM de Na_2SO_4 ó 3.4% de sorbitol. Todo ello indica que la estimulación por la sal del bombeo de H^+ in vivo no es una respuesta específica al estrés por NaCl, ya que sales de diferentes cationes (Na^+ , K^+) o aniones (Cl^- , SO_4^{2-}) e incluso estreses de tipo osmótico (sorbitol) tienen el mismo efecto sobre el bombeo de H^+ (Tabla 18.). Todo ello indica además que la primera respuesta de las células frente al estrés salino se debe al componente osmótico de dicho estrés que, como se ha demostrado en diferentes orígenes vegetales, tiende a despolarizar la membrana provocando cambios en el metabolismo y en el pH intracelular, capaces de inducir la acidificación del medio externo (Kuchitsu y col., 1989).

El incremento de la capacidad bombeadora de H^+ por células de tomate tras la adición de 100 mM NaCl al medio de incubación estuvo acompañado de un aumento del transporte de H^+ dependiente de ATP total y sensible a vanadato sin cambios en las actividades de la H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa a microsomales (Tablas 23., 29. y 30.). Todo ello indica que la acidificación del medio externo tras la adición de 100 mM NaCl al medio de incubación de las células es debida, al menos en parte, a una activación del transporte de H^+ dependiente de ATP en las membranas de los callos de tomate y que esta activación determina una mayor razón H^+ extruidos/ATP hidrolizado por el enzima H^+ -ATPasa (Tabla 30.).

Existen multitudes de investigaciones en relación al efecto del estrés salino sobre los enzimas H^+ -ATPasas de plasmalema, tonoplasto y H^+ -PPasa de tonoplasto, las cuales parecen indicar que el efecto del NaCl sobre estos enzimas depende del grado de tolerancia de las plantas y de las condiciones experimentales utilizadas (concentración del NaCl, duración del estrés, estadio fisiológico de la planta, etc.). A este respecto, la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema, determinada en función de la hidrólisis de ATP y/o del transporte de protones asociado al enzima, se incrementan en raíces de especies halofitas como *Atriplex nummularia* (Braun y col., 1987) y *Salicornia bigelovii*. Torr (Ayala y col., 1996) expuestas al NaCl así como en callos de *Spartina patens* adaptados a altas concentraciones de NaCl (Wu y Seliskar, 1998) y en células de zanahoria (Reuveni y col., 1987) y tabaco (Watad y col., 1986) adaptadas al NaCl mientras que no se afecta en raíces de maíz (Zidan y col., 1990) y algodón (Hassidim y col., 1986) y se inhibe parcialmente

en raíces de tomate, pepino, *Plantago* (Erdei y col., 1980; Bruggemann y Janiesch, 1989, Gronwald y col., 1990) y girasol (Roldan y col., 1991; Ballesteros y col., 1998) expuestas al NaCl.

En especies como Citrus, el efecto del estrés salino sobre la actividad H^+ -ATPasa sensible a vanadato de microsomas de raíz, depende del genotipo considerado (Douglas y Walker, 1984).

Con relación al efecto del NaCl sobre la actividad ATPasa de tonoplasto, la adaptación de los callos de tomate a 100 mM NaCl y el desarrollo de los callos control en presencia de 50 ó 100 mM NaCl indujón una inhibición de esta actividad. Dicha inhibición fue descrita también en raíces de girasol (Ballesteros y col., 1996), en células de zanahoria (Colombo y Cercana, 1993) y raíces de plántulas de algodón (Hassidim y col., 1986) no se han mostrado cambios en dicha actividad ATPasa. Por el contrario, en células adaptadas de tabaco (Reuveni y col., 1990) y en raíces de cebada (Matsumoto y Chung, 1988), tomate (Sanchez-Aguayo y col., 1991) y *vigna radiata* (Nakamura y col., 1992), se ha observado un incremento de dicha actividad por el estrés salino.

La actividad pirofosfatasa de tonoplasto se incrementa en respuesta al NaCl como ocurre en tonoplasto de raíces de girasol expuestas a un estrés salino (Ballesteros y col., 1996) y en microsomas de células de *Acer pseudoplatanus* (Zingarelli y col., 1994) y *Daucus carota* (Colombo y Cercana, 1993) adaptadas al NaCl, y se inhibe en vesículas de tonoplasto de raíces de *Vigna radiata* (Nakamura y col., 1992) crecidas en presencia de sal.

De acuerdo con estos hechos, los mecanismos que determinan el control de la absorción selectiva de iones a nivel del plasmalema y tonoplasto deben jugar un papel muy importante en la tolerancia al estrés salino (Jeschke, 1984). En callos de tomate, la inhibición simultánea del crecimiento y de las actividades H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa en microsomas por el NaCl, refleja el efecto tóxico de esta sal sobre las membranas. En este sentido, se ha descrito que el NaCl desorganiza estas estructuras y altera su permeabilidad iónica (Chow y Barber, 1980; Thibaud y col., 1984), lo que conlleva la pérdida de iones a través de la membrana (Leopold y Wiling, 1984), la alteración de la selectividad Na^+/K^+ (Cramer y col., 1987a) y depolarización de la membrana (Katsuhara y Tuzawa, 1987). El estrés salino puede llevar a alteraciones de la estructura de las proteínas y lípidos (Criddle y col., 1989) tal como evidencian los cambios en el patrón proteico (Hurman y Tanaka, 1987; Belver y Travis, 1990), en la composición lipídica de las membranas (Kuiper, 1985) y en la relación proteínas/lípidos de membrana (Poljakoff-mayber, 1972.) como consecuencia de un estrés salino.

De acuerdo con lo anterior, la reducción de la actividad H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa, como consecuencia del estrés por NaCl, puede tener varias interpretaciones. El estrés salino podría reducir

el número de moléculas de H⁺-ATPasa y H⁺-PPasa por unidad de superficie de membrana, disminuir la relación entre dichas enzimas y las restantes proteínas de membrana o afectar la actividad catalítica de las enzimas como consecuencia de una alteración de los componentes de membrana (lípidos, esteroides y proteínas) (Criddle y col., 1989; Kuiper, 1985; Douglas y Sykes, 1985).

La determinación del contenido en proteína total de los callos de tomate demostró que ni la adaptación ni el desarrollo de los callos control en 25, 50 ó 100 mM NaCl durante un subcultivo inducía cambios significativos a nivel del contenido en proteína total o proteína microsomal (Tabla 8.). Además, la detección inmunológica de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática (Figura 19.) muestra que la cantidad de este enzima por mg de proteína microsomal no cambia significativamente como consecuencia de la adaptación a 50 mM NaCl lo que indica que dicha adaptación no provoca alteraciones en la síntesis de proteína H⁺-ATPasa. La comparación de las actividades fosfolíticas y transporte de H⁺ del enzima H⁺-ATPasa de callos control y adaptados a 50 mM NaCl indica que la adaptación a 50 mM NaCl induce cambios en la estequiometría de la reacción enzimáticas que ya ha sido descrita anteriormente por otros autores en H⁺-ATPasa de plantas y levadura (Dupont 1992; Venema y Palmgren, 1995). Sin embargo, los experimentos de inmunoblotting revelan que la adaptación a 100 mM NaCl induce una reducción del número de moléculas H⁺-ATPasa por mg de proteína de membrana lo que explicaría la reducción de la actividad de hidrólisis de ATP y del transporte de protones dependiente de ATP y una estequiometría de la reacción enzimática similar en estos callos respecto a los controles.

Por otra parte, el análisis de la composición lipídica de los callos de tomate muestra que el desarrollo de los callos control en presencia de diferentes concentraciones de NaCl durante un subcultivo no afectó la composición lipídica de los mismos (Tablas 9., 11., 13. y 15.) mientras que la adaptación a 50 y 100 mM NaCl induce un incremento del contenido en fosfolípidos totales sin cambios significativos en la composición en ácidos grasos de fosfolípidos y en el la composición y contenido en esteroides libres (Tablas 9., 10., 12., 13. y 14). El alto contenido en sitosterol (Mas del 60, 70 y 80%) en los esteroides libres totales los callos control y adaptados a 50 y 100 mM NaCl, respectivamente, concuerda con los resultados obtenidos por Brown y Dupont (1989) en fracciones de membrana de raíces de cebada. Sin embargo, en suspensiones celulares de *Catharanthus roseus* y *Amsonia elliptica* el esteroide mayoritario es el campesterol presente en una proporción del 60 % en los esteroides libres totales (Merillon y col., 1993; Uomori y col., 1992). Además, la adaptación a 50 mM NaCl incrementa el contenido en FC y FE mientras que en los callos adaptados a 100 mM

NaCl se observa un importante incremento en FC. Numerosos trabajos, indican que cambios en la razón FC/FE determinan cambios en la permeabilidad de las membranas celulares (Mansour, 1994). Puesto que la cantidad de fosfolípidos refleja la cantidad de membranas, el incremento en el contenido en fosfolípidos totales observado en los callos adaptados a 50 y 100 mM NaCl puede provenir de un aumento de las estructuras de membrana en condiciones de adaptación a la sal.

El incremento en fosfolípidos concuerda con los resultados descritos en hojas de plantas de jojoba en respuesta al estrés salino (Ben Rais y col., 1993), en raíces de diferentes especies halofitas de *Plantago* (Erdei y col., 1980), de *Beta vulgaris* (Stuiver y col., 1981) y hojas de trigo (Chetal y col., 1980), expuestas al NaCl. En contraposición, en algunas especies la sal no induce cambios ni en el contenido en fosfolípidos ni en las diferentes moléculas fosfolipídicas (Zenoff y col., 1994) e incluso se ha descrito una reducción del contenido total en lípidos en las algas como *Dunaliella salina* (Al-Hasan y col., 1987) y *Chondria tenuissima* (Stefanov y col., 1994) a altas concentraciones de NaCl.

Todos los resultados obtenidos en nuestro estudio tanto en callos adaptados como sometidos a diferentes condiciones de estrés sugieren que en callos de tomate la tolerancia a la salinidad puede deberse, al menos en parte, a una regulación efectiva del transporte de H^+ asociado al enzima H^+ -ATPasa de membrana plasmática mediante un aumento de la razón extruidos/ATP hidrolizado. Esta regulación facilitaría el transporte de iones y permitiría una osmoregulación más eficiente cuando las células se exponen al NaCl lo que podría estar asociado a cambios en los lípidos de la membrana plasmática.

Con el objetivo de profundizar en que medida la regulación del enzima H^+ -ATPasa de la membrana plasmática y de las propiedades de esta membrana determinan la capacidad de adaptación de los callos de tomate al NaCl, se ha llevado a cabo el aislamiento de una fracción altamente enriquecida en membrana plasmática por partición de fases en dextrano y polietilenglicol. Al igual que en microsomas, la actividad H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de los callos adaptados a 50 mM NaCl fue similar a la de los callos control mientras que el transporte de H^+ asociado a dicho enzima era mayor en los callos adaptados lo que provocaba en estos callos un incremento de la razón H^+ extruidos/ATP hidrolizado (Tabla 32., 35. y 36.). La mejora del acoplamiento entre la actividad fosfohidrolítica y el transporte de H^+ asociado a la H^+ -ATPasa de plasmalema fue también descrita en raíces de girasol (Ballesteros y col., 1998) y para la H^+ -ATPasa de levadura en respuesta a la glucosa (Venema y Palmgren, 1995).

El análisis de las curvas de actividad H^+ -ATPasa de plasmalema frente a la concentración de sustrato de este enzima pone de manifiesto en los callos adaptados una mayor afinidad al ATP (Figuras 22. y 23. y Tabla 34.). Por otra parte, dichos callos presentan una mayor velocidad máxima de la actividad extractora de H^+ asociada a la H^+ -ATPasa de plasmalema respecto a la de los callos control (Tablas 35. y 36.) lo que sugiere una utilización más eficiente de la energía metabólica como consecuencia de la adaptación a 50 mM NaCl. Por otra parte, en comparación con los callos control, los callos adaptados a 100 mM NaCl muestran una inhibición de la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema y del bombeo de H^+ asociado a este enzima. Dicha inhibición se corresponde con una reducción de la velocidad máxima de hidrólisis de ATP, no afectándose la afinidad de dicho enzima por el ATP (Figuras 22. y 23. y Tablas 34., 35. y 36.). Ello puede explicarse en base a una reducción del número de moléculas de enzima H^+ -ATPasa por mg de proteína de plasmalema en los callos adaptados a 100 mM NaCl tal como indican los resultados de inmunoblotting (Figura 19.).

El incremento de la afinidad al ATP por el enzima H^+ -ATPasa de plasmalema de callos adaptados a 50 mM NaCl fue también observado en callos de la planta halofita *Spartina patens* adaptados a 170 y 350 mM NaCl (Wu y Seliskar, 1998) mientras que en líneas celulares de la glicófita *Citrus sinensis* sensibles y tolerantes al NaCl no hubo cambios en los valores de V_{max} y K_m aparente para el ATP en la ATPasa de plasmalema como respuesta al NaCl del medio de cultivo (Ben-Hayyim y Ran, 1990).

El análisis de la permeabilidad pasiva a los protones en vesículas de membrana plasmática (Tabla 37.) indica que la elevada extrusión de H^+ en plasmalema aislado de callos adaptados a 50 mM NaCl no es debida a un incremento del flujo pasivo de H^+ a través la membrana plasmática puesto que los valores de permeabilidad pasiva fueron similares en los callos control y adaptados a 50 mM NaCl. Sin embargo, la adaptación a 100 mM NaCl induce una reducción de la permeabilidad pasiva a los H^+ en la membrana plasmática la cual podría constituir una estrategia de defensa frente al estrés salino al limitar el eflujo de H^+ y, en consecuencia, la entrada de Na^+ a la célula.

La mayoría de las plantas responden a los estreses ambientales cambiando la composición lipídica de las membranas celulares (Mazlack 1989; Thompson y col., 1989) habiéndose demostrado que cambios en la composición en fosfolípidos y esteroides pueden contribuir en la tolerancia a la salinidad y sequía (Norberg y Lijenberg, 1991; Mansour y col., 1994). Además, los componentes lipídicos de las membranas regulan la actividad de los enzimas de membrana

(Simmonds y col., 1982), entre ellas la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema (Yamanishi y Kasamo, 1993; Chung y Matsumoto, 1989; Cooke y col., 1994). Las interacciones lipidos-proteina estan llevados a cabo mediante un contacto directo entre los acidos grasos, lipidos o dominios lipidicos y la protiena. Mientras que cambios en la composicion de los grupos de la cabeza de lipidos puede alterar las interacciones electrostatica entre los dominios cargados de la superficie de la proteina y los grupos de la cabezas de lipidos, alteraciones en la region hidrocarbonada puede afectar el volumen libre de las cadenas acyl de acidos grasos. Esta ultima puede influir la conformación de la protiena, la geometria y las interacciones entre las proteinas de membrana, la fase acuosa y la fase lipidica (Israelachvili, 1985).

La membrana plasmática parece tener un papel crítico en la tolerancia a la salinidad (Kuiper 1984a, Tal 1985), ya que ciertos cambios en la composición y contenido en fosfolípidos y esterolés de plasmalema contribuyen a la tolerancia a la salinidad (Kuiper 1968, 1984b; Douglas 1985).

Nuestros resultados muestran que la adaptación a 50 mM NaCl induce un incremento del contenido en fosfolípidos totales de la membrana plasmática, debido principalmente a un aumento del contenido en FE y AF (Tablas 38., 39. y 40.). En este sentido, se sabe que las cabezas de los grupos polares de fosfolípidos pueden afectar la actividad de enzimas de membrana, en parte, mediante la densidad de carga superficial (Kasamo y Yamanishi, 1991; Merillon, 1993). Además, la estabilidad de las membranas también depende del balance entre los lípidos formadores y no-formadores de bicapa (Quinn, 1983); Así, mientras la FC tiende a formar una configuración bicapa, la FE tiende hacia una configuración hexagonal (Cullis y De Kruijff 1979; Gagné y col., 1985). Además, un alto contenido en colina en las cabezas polares de los fosfolípidos aumenta la fluidez de la membrana mientras que un alto contenido en etanolamina tiene el efecto contrario (Zull y Hopfinger 1969; Singer, 1981). Puesto que la adaptación de los callos de tomate a 50 mM NaCl indujo un incremento del contenido en FE, el enriquecimiento resultante en dominios no formadores de bicapa podría resultar en una membrana más rígida (Quinn, 1984). Sin embargo, Numerosos trabajos indican que la razón FC/FE es un factor determinante de la fluidez de las membranas celulares (Mansour y col., 1994). Dicha razón no presentó cambios significativos tras la adaptación al NaCl de los callos de tomate.

La longitud de la cadena y el grado de saturación de los ácidos grasos constituye también parámetros determinantes de las propiedades de los lípidos de membranas. La composición en ácidos grasos de FE y AF de la membrana plasmática de los callos adaptados a 50 mM NaCl muestra un incremento en la proporción de ácidos grasos saturados, especialmente 16:0, y en consecuencia una reducción del índice de doble enlace. Resultados similares han sido descritos en

raíces de trigo (Harwood 1984; Mansour y col., 1994) y *Spartina patens* (Wu y col., 1998), así como en suspensiones celulares de *Dunaliella salina* (Peeler y col., 1989) expuestas al NaCl. Estos cambios en la composición en ácidos grasos de fosfolípidos pueden alterar las propiedades de fluidez de la membrana (Rochester y col., 1987) ya que un incremento de los ácidos grasos saturados induce la formación de una fase gel en la membrana (Senaratna y col., 1984) que conduce a una bicapa lipídica menos fluida y menos permeable al NaCl (Kuiper, 1984b; Mansour y col., 1994; Wu y col., 1998).

Los esteroides libres son efectivos en la regulación de la estabilidad y permeabilidad de las membranas a los iones. En callos de tomate, la adaptación a 50 mM NaCl no afectó al contenido y composición en esteroides libres de la membrana plasmática (Tabla 41.), lo que, unido al incremento en fosfolípidos como consecuencia de la adaptación, provocó una disminución en la razón esteroides/fosfolípidos (Tabla 42.). Sin embargo, basándose en el mayor contenido en esteroides libres en los cultivos resistentes a la sal que en los cultivos sensibles (Kuiper, 1968; 1984a, Douglas 1985), numerosos autores indican la existencia de una correlación positiva entre la tolerancia a la sal y el aumento de la razón esteroides libres/fosfolípidos y/o el incremento en el contenido en esteroides libres (Kuiper, 1985; Douglas y Sykes, 1985; Blits y Gallagher, 1990; Mansour y col., 1994). El β -sitosterol fue el esteroide libre mayoritario en la membrana plasmática de los callos control y adaptados a 50 mM NaCl, lo que concuerda con los resultados obtenidos en otras plantas (Wu y col., 1998).

Las medidas de fluidez de la membrana generan información sobre la orientación y tasa de movimiento de las moléculas lipídicas en la membrana. En callos de tomate hemos determinado el grado de fluidez de la membrana plasmática en base a la determinación de los valores de polarización de fluorescencia de las sondas DPH y TMA-DPH. Los altos valores de polarización de la sonda TMA-DPH en la membrana plasmática de los callos adaptados a 50 mM NaCl (Tabla 43.) indican una disminución de la fluidez de la membrana a nivel de la matriz que definen las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos de los fosfolípidos, lo que confirma la correlación negativa entre el grado de saturación de los ácidos grasos de fosfolípidos y la fluidez de la membrana.

La utilización de la sonda DPH muestra que la adaptación de los callos de tomate a 50 mM NaCl induce una mayor fluidez de la matriz que definen las cabezas polares hidrofílicas de los fosfolípidos de la membrana plasmática (Tabla 43.). Esta mayor fluidez podría ser debida a una menor razón esteroides/fosfolípidos en los callos adaptados a 50 mM NaCl. En este sentido, numerosos trabajos correlacionan el incremento en la razón esteroides/fosfolípidos con la disminución de fluidez de la membrana plasmática (Kleinhaus, 1979; Merillon, 1993).

Varios autores indicaron que la actividad de las H^+ -ATPasas asociadas a las membranas podría afectarse como consecuencia de alteraciones en la accesibilidad del sustrato, inducidas por cambios en el microambiente lipídico que rodea al enzima (Matsumoto y Chung, 1988; Sandstrom y Cleland, 1989; Cooke y col., 1993; Cooke y col., 1994). Es bien conocido que los lípidos juegan un importante papel en la regulación de la funcionalidad de las proteínas integrales especialmente la H^+ -ATPasa (Carruthers y Melchior, 1986; Briskin, 1990; Serrano, 1990), de forma que cambios en las propiedades de la bicapa fosfolipídica y en el microambiente lipídico que rodea dichas proteínas (lípidos anulares), afectan las propiedades cinéticas de muchos enzimas. La asociación proteína-lípidos implica fosfolípidos y sus cadenas acyl (Sandermann, 1978) y esteroides (Grunwald, 1975) sin embargo se desconoce el mecanismo a través del cual los lípidos modulan la actividad H^+ -ATPasa. Existen dos teorías para explicar la regulación de la actividad H^+ -ATPasa por lípidos.

(a) la hipótesis "Annulus" (Simmonds y col., 1982) que se basa en una interacción directa lípid-proteína.

(b) cambios en la composición lipídica afectan la fluidez de la membrana que causa un cambio conformacional del enzima y en consecuencia su actividad.

Los esteroides al intercalarse entre las moléculas adyacentes de fosfolípidos interaccionan con los ácidos grasos provocando una disminución de la fluidez de la membrana. En el plasmalema, incrementos en la ordenación de las cadenas de ácidos grasos disminuyen la fluidez de la membrana y aumentan la energía de activación de los enzimas integrales (Raison, 1980; Douglas y Walker, 1984 y Kasamo y col., 1992; Navarri-Izzo y col., 1993), respuesta que ha sido atribuida a alteraciones en la conformación de centros activos del enzima (Boldryev, 1981; Evans y col., 1992; Cowan y col., 1993). Asimismo, el efecto de los esteroides sobre la fluidez de la membrana plasmática podría ser eliminado por insaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos (Kimmelberg y Papahadjopoulos, 1974), lo que sugiere que el microambiente lipídico que regula la actividad de estas proteínas de membrana debe ser relativamente saturado. Además, Merillon (1993) indica que una reducción de la razón esteroides/fosfolípidos induce una menor fluidez y/o cambios en la unión directa de lípidos-proteínas provocando así un incremento de las actividades de los enzimas unidos a las membranas celulares.

Así, los cambios en la estequiometría de la reacción catalizada por la H^+ -ATPasa de plasmalema de los callos adaptados a 50 mM NaCl podrían explicarse en base a una mayor saturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos comunicando una menor fluidez a dicha membrana lo que induciría, probablemente, cambios conformacionales responsables de un mayor transporte de H^+ por cada molécula de ATP hidrolizada.

Finalmente, indicar que aunque se han alcanzado algunos de los objetivos propuestos en este trabajo, se han abierto interrogantes que serían objeto de posteriores investigaciones dirigidas, especialmente, al estudio de la posibilidad de existencia de un antiporte Na^+/H^+ en el plasmalema de los callos adaptados a 50 mM NaCl cuyo papel principal consiste en la extrusión de Na^+ así como al estudio de los componentes bioquímicos y moleculares claves en la transducción de señales de estrés.

VII. Conclusiones

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1ª. La selección mediante sucesivos subcultivos de callos controles en medios suplementados de NaCl permitió el establecimiento de líneas celulares adaptadas a distintas concentraciones salina.

2ª. El crecimiento estimulado, la estabilidad de las propiedades adaptativas y la tolerancia a un estrés salino por 100 mM NaCl de los callos adaptados a 50 mM NaCl sugiere que dichos callos representan un buen modelo para el estudio de los mecanismos de tolerancia a la salinidad de los cultivos de tomate.

3ª. Los resultados del contenido en componentes celulares orgánicos y inorgánicos indican que la acumulación de azúcares solubles y la exclusión de Na^+ son dos procesos determinantes en la adaptación de los callos de tomate al NaCl y que un incremento del contenido celular en prolina es posiblemente un síntoma del daño inducido por el estrés salino.

4ª. La extrusión de H^+ *in vivo* por las células es parámetro muy sensible al NaCl tal como demuestra el paralelismo entre el crecimiento celular y la capacidad extractora de H^+ de los callos controles sometidos a condiciones de estrés o adaptación a la sal siendo el componente osmótico el primer intermediario del efecto negativo del estrés salino sobre las células.

5ª. La activación de la extrusión de H^+ por las células de callos de tomate inducida por la adaptación a 25 y 50 mM NaCl y por un estrés de corta duración por 100 mM NaCl es mediada en gran parte por una activación del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema.

6ª. La activación de los enzimas del pH stat, PEPC y enzima málico en los callos adaptados a 100 mM NaCl sugiere que cuando la adaptación a 100 mM NaCl induce una inhibición del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema, el mantenimiento del pH citoplasmático se lleva a cabo principalmente por consumo y producción de malato.

7ª. El estudio de las características cinéticas y el contenido en el enzima H^+ -ATPasa de plasmalema ha puesto de manifiesto que la adaptación a 100 mM NaCl provoca una reducción del contenido en moléculas de dicho enzima mientras que la adaptación a 50 mM NaCl provoca una activación del enzima mediante una mayor afinidad al sustrato y estequiometría de la reacción enzimática.

Conclusiones

8ª. La mayor afinidad al sustrato del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema sugiere una mayor eficiencia del enzima y una mayor disponibilidad de ATP para otros procesos metabólicos claves en la supervivencia de las células adaptadas al NaCl.

9ª. El incremento del grado de saturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana plasmática de los callos adaptados a 50 mM NaCl sugiere un posible papel de la composición lipídica en los cambios en la estequiometría de la reacción enzimática catalizada por la H^+ -ATPasa de plasmalema.

10ª. Una menor fluidez de la membrana plasmática determinada por una mayor grado de saturación de los ácidos grasos podría tener una importancia en la tolerancia al estrés salino, al limitar la entrada de los iones Na^+ y Cl^- y la pérdida de agua y K^+ .

*VIII. Referencias
Bibliográficas*

Referencias Bibliográficas

- Abel G. H. 1969. Inheritance of the capacity for chloride inclusion and chloride exclusion by soybean. *Crop Sci.* 9: 697-699.
- Ahmad, I.; Laher, F. y Stewart, G. R. 1979. Sorbitol, a compatible osmotic solute in *Plantago maritima*. *New Phytol.* 82: 671-678.
- Alexander L., Lassalles J. P. y Kado R. T. 1990. Opening of Ca^{2+} channels in isolated red bet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature.* 343: 567-570.
- Al-Hasan R. H., Ghannoum M. A., Sallal A.K., Abu-Elteen K. H. y Radwan S. S. 1987. *J. Gen. Microbiol.* 133: 2607.
- Arakawa T., Katayama M. y Takabe T. 1990. Levels of betaine aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves and roots of barley. *Plant cell Physiology.* 31: 797-803.
- Aslam. M., Huffaker. R. C. y Rains. D. W. 1984. *Plant Physiol.* 76: 321-325.
- Ayala F., O'Leary J. W. y Schumaker K. S. 1996. Increased vacuolar and plasma membrane H^+ -ATPase activities in *Salicornia bigelovii* Torr. In response to NaCl. *J. Exp. Bot.* 47: 25-32
- Bañuls J. y Primo-Millo E. 1992. Effect of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of citrus plants. *Physiologia Plantarum.* 86: 115-123.
- Balke N. E. y Hodges T. K. 1977. *Plant Science Letters.* 10: 319-325.
- 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. *Physiologia Plantarum.* 97: 259-268.
- Ballesteros. E., Kerkeb B., Donaire. J. P. y Belver. A. 1998. Effects of salt stress on H^+ -ATPase activity of plasma membrane-enriched vesicles isolated from sunflower roots. *Plant Science.* 134: 181-190.
- Barbier-Brygoo H., Epluritkine G., Klämbt D., Ghislain M. y Guern J. 1989. Functional evidence for an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 891-895.
- Bates G. W. y Goldsmith M. H. M. 1983. Rapid response of the plasma membrane potential in oat coleoptiles to auxin and their weak acids. *Planta.* 159: 231-37.
- Bellinger Y. y Larher F. 1987. Proline accumulation: a redox buffer? *Plant Physiol. (Life Sci. Adv.)* 6: 23-27.
- 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., Kafkafi U. y Ganmore-Neumann R. 1987. Role of internal potassium in maintaining growth of cultured *Citrus* cells on increasing NaCl and CaCl_2 concentrations. *Plant Physiol.* 85: 434-439.

- 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.
- Ben-Hayyim G. y Ran U.** 1990. Salt induced cooperativity in ATPase activity of plasma membrane-enriched fractions from cultured *Citrus* cells: Kinetics evidence. *Physiologia Plantarum.* 80: 210-216.
- Ben Raïs L., Alpha M. J., Baht J., Guillot-Salomon T. y Dubacq J. P.** 1993. Lipid and protein contents of jojoba leaves in relation to salt adaptation. *Plant Physiology and Biochemistry.* 31: 547-557.
- Bertl A. y Felle H.** 1985. Cytoplasmic pH of root hair cells of *Sinapis alba* recorded by pH sensitive micro-electrode. Does fusicoccin stimulate the proton pump by cytoplasmic acidification. *J. Exp. Bot.* 36 (168): 1142-1149.
- Besford. R. T.** 1978a. *Plant and Soil.* 50: 399-409.
- Besford. R. T.** 1978b. *Plant and Soil.* 50: 427-432.
- Bhaskaran S., Smith R. H. y Newton R. J.** 1985. Physiological changes in cultured sorghum cells in response to induced water stress. *Plant Physiol.* 79: 266-269.
- Bianchi G., Murelli C., Salamini F. y Bartels D.** 1991. Novel carbohydrate-metabolism in the resurrection plant, *Craterostigma plantagineum*. *Plant J.* 3: 355-359.
- Bialeski R. L.** 1982. Sugar alcohols. En: *Encyclopedia of Plant Physiology.* New Series, Vol 13a, Plant Carbohydrates I. Eds. Loewus F. A. y Tanner W. Springer-Verlag, Berlin. pp: 158-192.
- Bienfait F. y Lüttge U.** 1988. *Plant Physiol. Biochem.* 26: 665-671.
- Binzel M. L. Hasegawa P. M., Handa A. K. y Bressan R. A.** 1985. Adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 79: 118-125.
- 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. L., Hess F. D., Bressan R. A. y Hasegawa P. M.** 1988. Intracellular compartmentation of ions in salt-adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* 86: 607-614.
- Bouché-Pillon S., Fleurat-Lessard P., Frompnt J-C., Serrano R. y Bonnemain J-L.** 1994. Immunolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase in minor veins of *Vicia faba* L. in relation to phloem loading. *Plant Physiol.* 105: 691-697.
- Bouraima S., Vidal J., Lavergne D., Hoarau A. y Champigny M. L.** 1987. Effects of sodium chloride stress on phosphoenolpyruvate carboxylase, NADP-malic enzyme and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in shoots of pearl millet. *Phytochemistry.* 26 (5): 1329-1332.
- Bligny, R. y Douce, R.** 1980. *Bioch. Biophys. Acta.* 617, 254

Referencias Bibliográficas

- Blits, K. C., Gallagher, J. L. 1990. Effect of NaCl on lipid content of plasma membranes isolated from roots and cell suspension cultures of the dicot halophyte *Kosteletzkya virginica* (L.) Presl. *Plant. Cell. Report.* 9: 156-159.
- Blowers, D., Collinge, m., Gilroy, S., Harvey, M. y Trewaras, A. 1987. En: *Plant Membranes, Structure, Function, Biogenesis.* 63: 371-381.
- Blum A., Munns R., Passioura J. B., Turner N. C., Sharp R. E., Boyer J. S., Hguyen H. T., Hsiao T. C., Verma D. P. S. y Hong Z. 1996. Letters to the editor: Genetically engineered plants resiatnt to soil drying and salt stress: How to interpret osmotic relations? *Plant Physiol.* 110: 1051-1053.
- Blumwald, E. y Pool, R. J. 1987. salt tolerance in suspension culture of sugar beet. Induccion of Na⁺/H⁺ antiport activity at the tonoplast by growth in salt. *Plant Physiol.* 83: 884-887.
- Boggess S. F., Aspinall D. y Paleg L. 1976a. Stress metabolism IX. The significance of end-product inhibition of proline biosynthesis and of compartmentation in relation to stress induced proline accumulation. *Aust. J. Plant Physiol.* 3: 513-525.
- Boggess S. F., Stewart C. R., Aspinall D. y Paleg L. 1976b. Effect of water stress on proline biosynthesis from radioactive precursors. *Plant Physiol.* 58: 398-401.
- Boldryev A. A. 1981. Role of lipids in the functioning of Na, K-ATPase. *Stud. Biophys.* 84: 153-160.
- Boller T. y Wiemken. 1986. Dynamics of vacuolar compartmentation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 137-164.
- Bonhert H. J. y Jensen R. G. 1996a. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *TIBTECH.* 14: 89-97.
- Bonhert H. J. y Jensen R. G. 1996b. Metabolic Engineering for increased salt tolerance- The next Step. *Aust. J. Plant Physiol.* 23: 661-667.
- Bouharmont. J. y Beloualy, N. 1992. *Theor Appl Genet.* 83: 509-514.
- Bourgeois-Chaillou, P.y Guerrier, G. 1992. Salt responses in *Lycopersicon esculentum* calli and whole plants. *J. Plant Physiol.* 140: 494-501.
- Bourgeois -Chaillou P., Guerrier, G y Strullu, G. D. 1987. Adaptation au NaCl de *Lycopersicon esculentum* : étude comparative des cultures de cals ou de parties terminales de tiges. *Can. J. Bot.* 65: 1989-1997.
- Boutry M., Michelet B. y Goffeau A: 1989. Molecular loning of a family of plant genes encoding a protein homologous to plasma membrane H⁺-translocating ATPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 567-574.
- Bowler C., Neuhaus G., Yamagata H. y Chua N. H. 1994. Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell.* 77: 73-81.

- Bowman E. J., Mandala S. M., Taiz L. y Bowman B. J. 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 48-52.
- Bowman E. J. y Slayman C. W. 1979. *J. Biol. Chem.* 254: 2928-2934.
- Boyer, J. S. 1982. Plant productivity and environment. *Science*. 218: 443-448.
- Braun, Y., Hassidim, M., Lerner, H. R. y Reinhold, L. 1986. Studies on H⁺-translocating ATPase in plants of varying resistance to salinity. I. Salinity during growth modulates the proton pump in the halophyte *Atriplex nummularia*. *Plant Physiol.* 81: 1050-1056.
- Briskin D. P. 1990. The plasma membrane H⁺-ATPase of higher plant cells: biochemistry and transport function. *Biochem. Biophys. Acta.* 1019: 95-109.
- Briskin D. P., Thornley W. y Roti-Roti J. 1985. Target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase. *Plant Physiol.* 78: 642-644
- Brown A. D. 1990. *Microbial Water Stress Physiology. Principles and Perspectives.* Wiley, New York.
- Brown D. J. y Dupont F. M. C. 1989. Lipid composition of plasma membranes and endomembranes prepared from roots of Barley (*Hordeum vulgare* L.). Effect of salt. *Plant Physiol.* 90: 955-961.
- Bruggemann, W. y Janiesch, P. 1989. *Plant Physiol.* 134: 20-25.
- Burgos P. A., Roldan M., Agui I. y Donaire J. P. 1993. Effect of sodium chloride on growth, ion content, and hydrogen ion extrusion activity of sunflower and jojoba roots. *Journal of Plant Nutrition.* 16 (6): 1047-1058.
- Bush D. S. 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.* 46: 95-122.
- Cano E. A., Pérez-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.
- Caplan A., Claes B., Dekeyser R. y Van Montagu M. 1990. Salinity and drought stress in rice. In *The impact of biotechnology in agriculture* (Sangwan R. S. and Sangwan Norreel B. S., eds). Dordrecht: Kluwer Academic. pp. 391-402.
- Carruthers A. y Melchior D. L. 1986. How bilayer lipid affect membrane protein activity. *Trends Biochem. Sci.* 11: 331-335.
- Chan P. L., Damsz B., Kononowicz A. K., Reuveni M., Chen Z., Xu Y., Hedges K. Tseng C. C., Singh N. K., Binzel M. L., Narasimhan M. L., Hasegawa P. M. y Bressan R. A. 1996. Alterations in cell membrane structure and expression of a membrane-associated protein after adaptation to osmotic stress. *Physiologia Plantarum.* 98: 505-516.
- Chandler S. F. y Thorpe T. A. 1987. Proline accumulation and sodium sulfate tolerance in callus cultures of *Brassica napus* L. cv. Wester. *Plant Cell Reports.* 6: 176-179.

- Chanson A. y Pilet P. E. 1987. *Plant Physiol.* 84: 1431-1436.
- Chanson A. y Pilet P. E. 1988. *Plant Physiol.* 74: 643-650.
- Chanson A. y Pilet P. E. 1989. *Plant Physiol.* 90: 934-938.
- Chapman. D. 1984. En: *Liposome Technology. Vol. 1. Preparation of Liposomes.* Ed. G. Gregoriadis. pp. 1-18.
- Chaudhary M. T., Merrett M. J. y Wainwright S. J. 1997. Growth, ion content and proline accumulation in NaCl-selected and non-selected cell lines of lucerne cultured on sodium and potassium salts. *Plant Science.* 127: 71-79.
- Churchill K. A. y Sze H. 1983. *Plant Physiol.* 71: 610-617.
- Churchill K. A. y Sze H. 1984. *Plant Physiol.* 76: 490-497.
- Cheesman. J. M. 1988. *Plant Physiol.* 87: 547-550.
- Chetal S., Wagle D.S. y Nainawatee H. S. 1980. Phospholipid changes in wheat and barley leaves under stress. *Phytochemistry.* 19: 1393-1395.
- Chollet R. 1996. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a Ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 273-298.
- Chow. W. S. y Barber. J. 1980. *Biochem. Biophys. Acta* 589: 346-352.
- Chung G. C. y Matsumoto H. 1989. Localization of the NaCl-sensitive membrane fraction in cucumber roots by centrifugation on sucrose density gradients. *Plant Cell Physiol.* 30: 1133-1138.
- Coccuci M. C. y Marré E. 1984. Lysophosphatidylcholine activated, vanadate-inhibited Mg-ATPase from radish microsomes. *Biochem. Biophys. Acta.* 771: 42-52.
- Colombo. R. y Cercana. R. 1993. *J Plant Physiol.* 142: 226-229.
- Conconi A., Miquel M., Browse J. A. y Ryan C. A. 1996. Intracellular levels of free linolenic and linoleic acid increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol.* 111: 797-803.
- Cooke D. T., Burden R. S. 1990. Lipid modulation of plasma membrane-bound ATPases. *Physiologia Plantarum.* 78: 153-159.
- Cooke D. T., Burden R. S., James C. S., Seco T. y Sierra B. 1994. Influence of sterols on plasma membrane proton-pumping ATPase activity and membrane fluidity in oats shoots. *Plant Physiol. Biochem.* 32 (6): 769-773.
- Cooke D. T., Ros R., Burden R. S. y James C. S. 1993. A comparison of the influence of sterols on the specific activity of the H⁺-ATPases in isolated plasma membrane vesicles from oat, rye y rice shoots. *Physiologia Plantarum.* 88: 397-402.
- Cosgrove D. J. y Hedrich R. 1991. Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta.* 186: 143-153.

- Coté G. C. 1995. Signal transduction in leaf movement. *Plant Physiol.* 109: 729-734.
- Cowan D. S. C., Cooke D. T., Clarkson D. T. y Hall J. L. 1993. Lipid and sterol composition of plasma membranes isolated from stele and cortex of maize roots. *J. Exp. Bot.* 44(262): 991-994.
- Cram, W. J. 1976. Negative feedback regulation of transport in cells. The maintenance of turgor, volume and nutrient supply. *Encyclopedia of Plant Physiology: Transport in Plants*, ed. U. Luttge, m. G. Pitman, 2A: 284-316. Berlin/Heidelberg/New York: Springer.
- Cramer. G. R., Lynch. J., Lauchli. A. y Epstein. E. 1987a. *Plant Physiol.* 83: 510-516.
- Cramer G. R., Lynch J., Lauchli A. y Epstein E. 1987b. Influx of Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ into roots of salt-stressed cotton seedlings. *Plant Physiol.* 86:231-236.
- Cramer G. R., Lauchli A. y Polito V. S. 1985. Displacement of Ca²⁺ by Na⁺ from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress. *Plant Physiol.* 79: 207-211.
- Creelman R. A. y Mullet J. E. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 4114-4119.
- Creelman R. A. y Mullet J. E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 355-381.
- Criddle. R. S., Hansen. L. D., Breidenbach. R. W., Ward. M. R. y Huffaker. R. C. 1989. *Plant Physiol.* 90: 53-58.
- Cuartero Zueco J. Fernandez-Muñoz R. y Gonzalez-Fernandez J. J. 1995. Estreses Abioticos. en: *El cultivo de tomate*. Eds Nuez F. Mundi-Prensa. pp: 351-383.
- Cullis P. R. y Kruijff B. 1979. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* 559: 399-420.
- Czapski J. y Saniewski M. 1992. Stimulation of ethylene production and ethylene-forming enzyme in fruits of the non-ripening nor and rin tomato mutants by methyl jasmonate. *J. Plant Physiol.* 139: 265-268.
- Datta k. S., Kumar A., Varma S. K. y Angrish R. 1996. Effects of salinity on water relations and ion uptake in three tropical forage crops. *Indian J. Plant Physiol.* 2: 102-108.
- Davies D. D. 1986. The fine control of cytosolic pH. *Physiologia Plantarum.* 67: 702-706.
- De Boer B. 1997. Fusococcin- a key to multiple 14-3-3 locks. *Trends in Plant Science.* 2 (2): 60-66.
- Delauney A. J. y Verma D. P. S. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal.* 4 (2): 215-223.
- De Michelis M. I., Rasi-Cañdogno F. y Puliarello M. C. 1984. *Plant Science Letters.* 162: 111-117.

Referencias Bibliográficas

- De Witt N. D., Harper J. F. y Sussman M. R. 1991. Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. *Plant Physiol.* 1: 121-128.
- Douglas. T. J. 1985. NaCl effects on 4-desmethylsterol composition of plasma membrane-enriched preparations from *Citrus* roots. *Plant cell Environ.* 8: 687-692
- Douglas. T. J. y Sykes. S. R. 1985. Phospholipid, galactolipid and free sterols composition of fibrous roots from citrus genotypes differing in chloride exclusion ability. *Plant cell Environ.* 8: 693-699.
- Douglas. T. J. y Walker. R. R. 1984. Phospholipids, free sterols and adenosine triphosphate of plasma membrane-enriched preparations from roots of *Citrus* genotypes differing in chloride exclusion ability. *Physiologia Plantarum.* 62: 51-58.
- Downton, W. J. S. 1984. Salt tolerancia of food crops: perspectives for improvement. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 1: 183-201.
- Drayer L. y Van Haastert P. J. M. 1994. Transmembrane signalling in eucaryotes: a comparison between higher and lower eucaryotes. *Plant Molecular Biology.* 26: 1239-1270.
- Drennan P. M., Smith M. T., Goldsworthy D. y Van Staden J. 1993. The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* Welw. *Journal of Plant Physiol.* 142: 493-496.
- Drobak B. K. 1992. The plant phosphoinositide system. *Biol. Chem.J.* 288: 697-712.
- Drory A., Borohov A. y Mayak S. 1992. Transient water stress and phospholipid turnover in carnation flowers. *J. Plant Physiol.* 140: 116-120.
- 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.* pp. 91-100 (Cooke, D. T. and Clarkson, D. T.:Eds.). New York: Plenum Press.
- Dyas L. y Goad J. L. 1993. Steryl fatty acyl esters in plants. *Phytochemistry.* 34 (1): 17-29.
- Elthon T. E. y Stewart C. R. 1981. Submitochondrial location and electron transport characteristics of enzymes involved in proline oxidation. *Plant Physiol.* 67: 780-784.
- Epstein, E. 1998. How Calcium enhances plant salt tolerance. *Science.* 280: 1906-1907.
- Epstein E., Norlyn J. D., Rush D. W., Kingsbury R. W., Kelley D. B., Cunningham G. A.; y Wrona, A. F. 1980. Saline cultur of crop: a genetic approach. *Science.* 210: 399-404.
- Epstein E. y Rains D. W. 1987. Advances in salt tolerance. *Plant and Soil.* 99: 17-29.
- Eraso P. y Portillo F. 1994. Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by glucose. *J. Biol. Chem.* 269: 10393-10399.
- Erdei. L., Stuiver. B., y Kuiper. P. J. C. 1980. The effect of salinity on lipid composition and on activity of Ca²⁺ and Mg²⁺ stimulated ATPase in salt sensitive and salt tolerant *Plantago* species. *Physiologia Plantarum.* 49: 315-319.

- Ericson, M. C. y Alfinito, S. H. 1984. *Plant Physiol.* 74: 506-509.
- Espinosa-Borreguero F. y Alvarez-Tinaut M. C. 1991. Sistemas de transporte electrogénico de H^+ en las membranas citoplasmáticas de células vegetales. *Sociedad Española de Fisiología Vegetal*. 16: 19-44.
- Ettliger C. y Lehle L. 1988. Auxin induces rapid changes in phosphatidylinositol metabolites. *Nature*. 331: 176-178.
- Evans D. E., Askerlund P., Boyce J. M., Briars S. A., Coates D., Coates J., Cooke D. T. y Theodoulou F. 1992. Studies on the higher plant calmodulin-stimulated ATPase. In: *Transport and receptor proteins of plant membranes: molecular structure and function*. D. T. Cooke, D. T. Clarkson, eds New York: Plenum Press.
- Ewings N. N. y Bennet A. B. 1994. Assessment of the number of P-type H^+ -ATPase genes in tomato. *Plant Physiol.* 106: 547-557.
- Ewings N. N., Wimmers L. E., Meyer D. J., Chetelat R. T. y Bennet A. B. 1990. Molecular cloning of tomato plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Physiol.* 94: 1874-1881.
- Farmer E. E. y Ryan C. A. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell*. 4: 129-134.
- Felle H. y Bertl A. 1986. Light-induced cytoplasmic pH changes and their interrelation to the activity of the electrogenic proton pump in *Riccia fluitans*. *Biochem. Biophys. Acta*. 848: 176-182.
- Fernando M., Mehroke j. y Glass A. D. M. 1992. De novo synthesis of plasma membrane and tonoplast polypeptides of barley roots during short-term K^+ deprivation. In search of the high affinity K^+ transport system. *Plant Physiol.* 100: 1269-1276.
- Fischer W. N., Kwart M., Hummel S. y Frommer W. B. 1995. Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem* 270: 16315-16320.
- Flowers, T. J. y Yeo, A. R. 1988. Ion relations of salt tolerance. In: *Solute Transport in Plant Cells and Tissues*. pp. 392-416 (Baker, D. A. and Hall, J. L.; Eds.). New York: Longman.
- Frachisse J. M., Johannes E. y Felle H. 1988. The use of weak acids as physiological tools: a study of the effects of fatty acids on intracellular pH and electrical plasmalema properties of *Riccia fluitans* rhizoid cells. *Biochem. Biophys. Acta*. 938: 199-210.
- Frommer W. B., Hummel S. y Riesmeier J. W. 1993. Expression cloning yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 5944-5948.
- Gagné J., Stamatatos L., Diacovo T., Hui S. W., Yeagle P. L. y Silvius J. P. 1985. Physical properties and surface interactions of bilayer membranes containing N-methylated phosphatidyletanolamines. *Biochemistry*. 24: 4400-4408.

- Gale, J. 1982. Use of brackish and solar desalinated water in closed system agriculture, p. 315-323. En: A. San prietro (ed.). *Biosaline research. A look to the future*. Plenum, New York.
- Gallagher S. R. y Leonard R. T: 1982. *Plant Physiol.* 70: 1335-1340.
- Gao Z., Sagi M. y Lips S. H. 1998. Carbohydrate metabolism in leaves and assimilate partitioning in fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) as affected by salinity. *Plant Science*. 135: 149-159.
- Garbarino, J. E. y Dupont, F. M. 1988. NaCl induces a Na⁺/H⁺ antiport in tonoplast vesicles from barley root. *Plant Physiol.* 86: 231-236.
- Garbarino, J. E. y Dupont, F. M. 1989. Rapid induccion of Na⁺/H⁺ exchange activity in barley root tonoplast. *Plant Physiol.* 89: 1-4.
- Geigenberger P., Reimholz R., Geiger M., Merlo., Canale V. y Stitt M. 1997. Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta*. 201: 502-518.
- Giannini J. L., Gildensoph L. H. y Briskin D. P. Selective production of sealed plasma membrane vesicles from red beet (*Beta vulgaris*) storage tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* 254: 621-630.
- Gibrat R., Grouzis J. P., Rigaud J. y Grigon C. 1990. *Plant Physiol.* 93: 1183-189.
- Gibrat R., Romieu C. y Grigon C. 1983. A procedure for estimating the surface potential of charged or neutral membranes with 8-anilino-1-naphthalene-sulphonate probe. *Biochem. Biophys. Acta*. 736: 196-202.
- Girousse C., Bournoville R. y Bonnemain J.-L. 1996. Water deficit-induced changes in concentration in proline and some other amino acids in the phloem sal of alfalfa. *Plant Physiol.* 111: 109-113.
- Corham J., Wyn Jones R. G. y Bristol A. 1990. Parcial characterization of the trait for enhanced K⁺-Na⁺ discrimination in the D genome of wheat. *Planta*. 180: 590-597.
- Göring H. 1981. Plant responses to effects of adverse physical and chemical environmental factors. En: *Genetic Responses and Plant Breeding for Resistance to Diseases, Pests and Abiotic Environmental Conditions*. Eds. Brezhnev D. D. y Dorofeev V. F. Valvilov All-Union Scientific Reaserch Institute of Plant Industry, Leningrad. pp: 152-164.
- Grandmougin A., Benveniste P. y Hartmann M. A. 1989a. Effects of sterols on reconstitued plasma membrane H⁺-ATPase from maize roots. En: *Plant Membrane Transport: the Current Position*. Eds. Dainty J., De Michelis M. I., Marré E. y Rasi-Caldogno. Elsevier, Amsterdam. ISBN 0-444-81328-4. pp: 113-114.
- Grandmougin A., Benveniste P. y Hartmann M. A. 1989b. Plasma membrane-bound H⁺-ATPase from maize root cell: Effects of sterols. En: *Plant Membrane Transport: the Current Position*. Eds, Dainty J., De Michelis M. I., Marré E. y Rasi-Caldogno. Elsevier, Amsterdam. ISBN 0-444-81328-4. pp: 111-112.

- Greenway, H. y Munns, R. 1980. Mecanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 149-190.
- Gregory, D. P. y Ginsberg, L. 1984. *Biochem. Biophys. Acta* 769: 238-244.
- Gronwald, J. W., Suhayda, C. G., Tal, M. y Shannon, M. C. 1990. Reduction in plasma membrane ATPase activity of tomato roots by salt stress. *Plant Science.* 66: 145-153.
- Grouzis J. P., Gibrat R., Rigaud J., Ageorges A. y Grigon C. 1990. *Plant Physiol.* 93: 1175-1182.
- Hager A., Debus G., Edel H-G., Stransky H. y Serrano R. 1991. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high turnover pool of plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta.* 185: 527-537.
- Hamberg M. y Gardner H. W. 1992. Oxylin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance. *Biochem. Biophys. Acta.* 1165: 1-18.
- Handa S., Bressan R. A., Handa A. K., Carpita N. C. y Hasegawa P. M. 1983. Solute contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress. *Plant Physiol.* 73: 834-843.
- Handa S., Handa A. K., Hasegawa P. M. y Bressan R. A. 1986. proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant Physiol.* 80: 938-945.
- Hanson A. D., Nelson C. E. y Everson E. H. 1977. Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars. *Crop.Sci.* 17: 720-726.
- Hare P. D. y Cress W. A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation.* 21: 79-102.
- Hare P. D., Cress W. A. y Van Staden J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment.* 21: 535-553.
- 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. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1234-1238.
- Harper J. F., Manney L., De Witt N.D., Yoo M. H. y Sussman M. R. 1990. The *Arabidopsis thaliana* plasma membrane H⁺-ATPase multigene family. *J. Biol. Chem.* 265: 13601-13608.
- Harper J. F., Manney L. y Sussman M. R. 1994. The plasma membrane H⁺-ATPase gene family in *Arabidopsis*: genomic sequence of *AHA10* which is expressed primarily in developing seeds. *Mol. Gen. Genet.* 244: 572-587.
- Hartmann M. A. y Benveniste P. 1987. Plant Membrane sterols: isolation, identification, and biosynthesis. *Methods Enzymol.* 148: 632-650.
- Harwood J. L. 1984. Effects of the environment on the acyl lipids of algae and higher plants. In: *Structure, function and metabolism of plant lipids*. Eds, Siegenthaler P. A. y Eichenberger W. pp. 543-550. Elsevier, Amsterdam. ISBN 0-444-80626-1.

- Hasegawa P. M., Bressan R. A., Handa S. y Handa A. K. 1984. Cellular mechanisms of tolerance to water stress. *HortScience*. 19: 371-377.
- Hasegawa P. M., Bressan R. A., Nelson D. E., Samaras Y. y Rhodes D. 1993. Tissue culture in the improvement of salt tolerance in plant. En: *Monographs on Theoretical and Applied Genetics. Soil Mineral Stresses: Approaches to crop improvement*. Eds, A. R. Yeo y T. J. Flowers. Springer-Verlag, Berlin. pp:
- Hassan, N. S. y Wilkins, D. A. 1988. In vitro selection for salt tolerant lines in *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Cell Reports*. 7: 463-466.
- Hassidim M., Braun L., Lerner H. R. y reinhold L. 1986. Studies on H⁺ translocating ATPasas in plants of varying resistance to salinity. II. K⁺ strongly promotes development of membrane potential in vesicles from cotton roots. *Plant Physiol*. 81: 1057-1061.
- Hassidim M., Braun L., Lerner H. R. y reinhold L. 1990. Na⁺/K⁺ and K⁺/H⁺ antiport in root membrane vesicles isolated from the halophyte *Atriplex* and the glycophyte cotton. *Plant Physiol*. 94: 1795-1801.
- Heyser J. W. y Nabors M. W. 1981. Osmotic adjustment of cultured tobaccocells (*Nicotiana tabacum* var. Samsun) grown on sodium chloride. *Plant Physiol*. 67: 720-727.
- Hiatt A. J. 1967. Relationship of cell sap pH to organic acid change during ion uptake. *Plant Physiol*. 42: 294-298.
- Holtum J. A. M. y Winter K. 1982. Activity of enzymes of carbon metabolism during the induction of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta*. 155: 8-16.
- Hörtensteiner S., Martinoia E. y Amshein N. 1994. Factors affecting the reformation of vacuoles en evacuated protoplasts and the expression of the two vacuolar pumps. *Planta*. 192: 395-403.
- Houlné G. y Boutry M. 1994. Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding a plasma membrane H⁺-ATPase whose expression is restricted to anther tissues. *Plant J*. 5: 311-317.
- Hsiao T.C., Acevedo E., Fereres E. y Henderson D. W. 1976. Water stress, growth and osmotic ajustemente. *Philos. Trans. R. soc.* London 272: 479-500.
- Hu, C. A-A., Delauney A. J. y Verma D. P. S. 1992. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 9354-9358.
- Hurman. W. J. y Tanaka. C. K. 1987. *Plant Physiol*. 83: 517-524.
- Iraki. N. M., Bressan. R. A., Hasegawa., Carpita. N. C. 1989. *Plant Physiol*. 91: 39-47.
- Jacoby B. y Hanson J. B. 1985. Controls on ²²Na⁺ influx in corn roots. *Plant Physiol*. 77: 930-934.
- Jacomini E., Bertani A. y Mapelli S. 1988. Accumulation od polyethylene glycol 6000 and its effects on water content and carbohydrate level in water-stressed tomato plants. *Can. J. Bot.* 66: 970-973.

- Jennings, D. H. 1976. The effect of sodium chloride on higher plants. *Biol. Rev.* 51: 453-86.
- Jeschke, W. D. 1984. En: *Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement*. R. C. Staples y G. H. Toenniensen (eds.), pp. 37-66. Wiley-Interscience, New York.
- Johannes E. y Felle H. H. 1989. *Plant Physiol.* 77: 326-331.
- Johannes E. y Felle H. H. 1990. *Plant Physiol.* 93: 412-417.
- Johansson F., Sommarin M. y Larsson C. 1993. Fusaric acid activates the plasma membrane H⁺-ATPase by a mechanism involving the C-terminal inhibitory domain. *Plant Cell.* 5: 321-327.
- Karlsson J. 1975. *Biochem. Biophys. Acta.* 399: 356-363.
- Kartz A., Pick U. y Avron M. 1992. Modulation of Na⁺/H⁺ antiporter activity by extreme pH and salt in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 100: 1224-1229.
- Kasamo K., Kagita F., Yamanishi H. y Sakaki T. 1992. Low temperature-induced changes in the thermotropic properties and fatty acid composition of the plasma membrane and tonoplast of cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Plant Cell Physiol.* 33 (5): 609-616.
- Kasamo y Nouchi I. 1987. The role of phospholipids in plasma membrane ATPase activity in *Vigna radiata* L. (Mung bean), roots and hypocotyls. *Plant Physiol.* 83: 823-828.
- Katsuhara, M. y Tuzawa, M. 1987. *Protoplasma.* 138: 190-192.
- Kavi Kishor, P. B. 1988. *Journal of Experimental Botany.* Vol. 39, No. 199, pp. 235-240.
- Kavi Kishor P. B., Hong Z., Miao G-H, Hu C-A. y Verma D. P. S. 1995. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline products and confers osmotolerance in transgenic plant. *Plant Physiol.* 108: 1387-1394.
- Keller F. y Ludlow M. M. 1993. Carbohydrate metabolism drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *J. Exp. Bot.* 44: 1351-1359.
- Kimelberg H. K. y Papahadjopoulos D. 1974. Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions and cholesterol on (Na⁺ + K⁺)-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 249: 1071-1080.
- Kleinhaus F. W., Lees N. D., Bard M., Haak R. A. y Woods R. A. 1979. ESR determinations of membrane permeability in a yeast sterol mutant. *Chem. Phys. Lipids.* 23: 143-154.
- Klobus, G., Ward, M. R. y Huffaker, R. C. 1988. *Plant Physiol.* 87: 878-882.
- Kobayashi H., Murakami N. y Unemoto T. 1982. Regulation of cytoplasmic pH in *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* 257: 1346-1352.
- Kochba J. Ben-Hayyim G., Spiegel-Roy P., Saad S. y Neumann H. 1982. *Z. Pflanzenphysiol.* 106S: 111-118.

- Krauss, H. 1978. Osmotic regulation in algae. *Prog. Phytochem.* 5: 1-27.
- Kuchitsu K., Katsuhara M. y Miyachi S. 1989. Rapid cytoplasmic alkalization and dynamics of intracellular compartmentation of inorganic phosphate during adaptation against salt stress in a halotolerant unicellular green alga *Dunaliella tertiolecta*: ³¹P-Nuclear magnetic resonance study. *Plant Cell Physiol.* 30 (3): 407-414.
- Kuiper. P. J. C. 1968. Lipids in grape roots in relation to chloride transport. *Plant Physiol.* 43: 1367-1371.
- Kuiper. P. J. C. 1984a. Functioning of plant cell membranes under saline conditions: membrane lipid composition and ATPases. In: *Salinity tolerance in plants*. Eds. R. C. Staples., G. H. Toenniessen., J. Wiley. y Sons. New York. pp: 67-76. Wiley, new York, NY. ISBN 0-471-89674-8.
- Kuiper. P. J. C. 1984b. Lipid metabolism of higher plant as a factor in environmental adaptation. In: *Structure, function and metabolism of plant lipid*. Eds. Siegenthaler P. A. y Eichenberger W. pp. 525-530. Elsevier. Amsterdam. ISBN 0-44480626-1
- Kuiper. P. J. C. 1985. Environmental changes and lipid metabolism of higher plant. *Physiol. Plant.* 64: 118-122.
- 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.
- Kurkdjian A. y Guern J. 1989. Intracellular pH: Measurement and importance in cell activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 271-303.
- Kwart M., Hirner B., Hummel S. y Frommer W. B. 1993. Differential expression of two related amino acid transporters differing substrate specificity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 4: 993-1002.
- LaRosa P. C., Handa A. K., Hasegawa P. M. y Bressan R. A. 1985. Abscisic acid accelerates adaptation of cultured tobacco cells to salt. *Plant Physiol.* 79: 138-142.
- Laüchli A. 1990. En: *Calcium in Plant Growth and development*. American Society of Plant Physiologist. Symposium Series. Rockville. Eds, Leonard r. T. y Hepler p. K. Vol 4: 26-35.
- Laüchli A., Colmer T. D., Fan T. W. M. y Higashi R. M. 1994. Solute regulation by calcium in salt stressed plants. En: *Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants*. Ed, Cherry, J. H. Springer-Verlag. Berlin. pp: 443-461.
- Le Dily. F., Hagege. D., Billard. J. D., Boucaud. J. y Gaspar. Th. 1990. *Physiologia Plantarum.* 32 (4): 256-265.
- Leegood R. C. y Osmond C. B. 1990. The flux of metabolites in C₄ and CAM plants. En: *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Eds, Dennis D. T. y Turpin D. H. Essex: Longman sci. tech. pp: 274-298.
- Leigh R. A., Ahmad N. y Wyn Jones R. G. 1981. Assessment of glycinebetaine and proline compartmentation by analysis of isolated vacuoles. *Planta.* 153: 34-41.

- Leopold, A. C. y Wiling, R. P. 1984. En: *Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop improvement*; Eds. R. C. Staples., G. H. Toenniessen., J. Wiley. y Sons. New York. pp: 67-76.
- Lepiniec L., Vidal J., Chollet R., Gadal P. y Cretin C. 1994. Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution. *Plant Science*. 99: 111-124.
- Lerner H. R. 1985. Adaptation to salinity at plant cell level. *plant and Soil*. 89: 3-14.
- Lew R. R. y Spanswick R. M. 1984. *Plant Physiol*. 7: 1-6.
- Lin W. 1984. *Plant Physiol*. 74: 219-222.
- Liu J. Y Zhu J. K. 1997. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 114: 591-596.
- Liu J. Y Zhu J. K. 1998. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*. 280: 1943-1945
- Loewus F. A. y Dickinson D. B. 1982. Cyclitols. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*. New Series, Vol 13a. Plant Carbohydrates I. Eds. Loewus F. A. y Tanner W. Springer-Verlag, Berlin. pp: 193-216.
- Lone M. I., Kue J. S. H., Wyn Jones R. G. y Bright S. W. 1987. Influence of proline and glycinebetaine on salt tolerance of cultured barley embryos. *J. Exp. Bot.* 38: 479-490.
- Lynch J. Polito V.S. y Laüchli A. 1989. Salinity stress increases cytoplasmic Ca activity in maize root protoplast. *Plant Physiol*. 90: 1271-1274.
- Lynch D. V. y Steponkus P. L. 1987. Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv. Puma). *Plant Physiol*. 83: 761-767.
- Maas. E. V., Ogata. E. y Finkel. M. H. 1979. *Plant physiol*. 63: 139-143.
- Maathuis F. J. M. y Sanders D. 1993. Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 191: 302-307.
- Macri F. y Vianello A. 1987. *FEBS. Lett.* 241: 47-52.
- Maliga P. 1984. Isolation and characterisation of mutants in plant cell culture. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 35: 519-542.
- Manolson M. F., Rea P. A. y Poole R. J. 1985. *J. Biol. Chem.* 260: 12273-12279.
- Mansour, M. M. F., Van Hasselt, p. R. y Kuiper, P. J. C. 1994. Plasma membrane lipid alterations induced by NaCl in winter wheat roots. *Physiologia Plantarum*. 92: 473-478
- Marmé. D. 1982. The role of Ca²⁺ and calmodulin in plants. *What's New Plant Physiol*. 13: 37-40.
- Marquardt G. y Lüttge U. 1987. *J. Plant Physiol*. 129: 269-286.
- Marré E. 1979. Fusicoccin: a tool in plant physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 30: 273-288.

- Marré E. y Ballarin-Denti, A. 1985. The proton pumps at the plasmalema and the tonoplast of higher plants. *J. Bioenerg. Biomembr.* 17: 1-21.
- Marré M. T., Romani G. y Marré E. 1983. Transmembrane hyperpolarization and increased of K^+ uptake in maize roots treated with permeant weak acids. *Plant, Cell and Environment.* 6: 617-623.
- Marschner H. 1971. Why can sodium replace potassium in plants. *Colloq. Intl. Potash Inst.* 8: 50-63.
- Mathieu Y., Guern J., Pean M., Pasquier C., Beloeil J. C. y Lallemand J. 1986. Cytoplasmic pH regulation in *Acer pseudoplatanus* cells. II. Possible mechanisms involved in pH regulation during acid-load. *Plant Physiol.* 82: 846-852.
- Martiny-Baron G. y Scherer G. F. E. 1989. Phospholipid-stimulated protein kinase in plants. *J. Biol. Chem.* 264: 18052-18059.
- 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.
- Mazliak, P. 1977 en Tevini, M y Lichtenthaler H. K. (Ed.), *lipids and lipid polymers in high plants*, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 48-74
- Mazliak, P. 1989. Membrane response to environmental stresses: The lipid view point. Introduction over view. In: *Biological role of plant lipids*. Edited by Biacs P. A., Gruiz K. y Kremmer T. pp. 505-509. New york.
- McCue, K. F. y Hanson, A. D. 1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol.* 8: 358-362.
- Meins F. Jr. 1983. Heritable variation in plant cell culture. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34: 327-346.
- Memon A. R. y Boss W. F. 1990. Rapid light-induced changes in phosphoinositid kinases and H^+ -ATPases in plasma membrane in sunflower hypocotyls. *J. Biol. Chem.* 265: 14187-14121.
- Memon A. R., Chen Q. y Boss W. F. 1989. Inositol phospholipids activate plasma membrane ATPase in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 1295-1301.
- Michelet B. y Boutry M. 1995. The plasma membrane H^+ -ATPase. A highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol.* 108: 1-6.
- Michelet B., Lukaszewicz M., Dupriez V. y Boutry M. 1994. A plant plasma membrane proton-ATPase gene is regulated by development and environment and shows sign of translational regulation. *Plant Cell.* 6: 1375-1389.
- Mitchell P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature.* 191: 144-148.
- Moftah A. E. y Michel B. E. 1987. The effect of sodium chloride on solute potential and proline accumulation in soybean leaves. *Plant Physiol.* 83: 238-240.

- Moriau L., Bogaerts P., Jonniaux J-L. y Boutry M. 1993. Identification and characterization of a second plasma membrane H⁺-ATPase gene subfamily in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol. Biol.* 21: 955-963.
- Munns R., Greenway H. y Kirst C. O. 1983. Halotolerant eukariotes. In: *Encyclopedia of plant physiology*, New Series (O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond y H. Ziegler, eds), pp, 60-135. Springer-Verlag, Berlin. ISBN3-540-10907-2.
- Murata Y., Obi I., Yoshihashi M., Noguchi M., Kakutani T. 1994. Reduces permeability to K⁺ and Na⁺ ions of K⁺ channels in the plasma membrane of tobacco cells in suspension after adaptation to 50 mM NaCl. *Plant Cell Physiol.* 35 (1): 87-92.
- Nakamura. Y., Kasamo. K., Shimosato. N., Sakata. M. y Ohta. E. 1992. *Plant Cell Physiol.* 33: 139-149.
- Nash D., Paleg L. G. y Wiskich J. T. 1982. Effect of proline, betaines and others solutes on the heat stability of mitochondrial enzymes. *Aust. J. Plant Physiol.* 9: 47-57.
- Navarri-Izzo F., Quartacci M. F., Melfi D. y Izzo R. 1993. Lipid composition of plasma membranes isolated from sunflower seedlings grown under water-stress. *Physiologia Plantarum.* 87: 508-514.
- Neuhaus G., Bowler C., Kern R. y Chua N. H. 1993. Calcium/Calmodulin-dependent and independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell.* 73: 937-952.
- Niu X., Bressan R. A., Hasegawa P. M. y Pardo J. M. 1995. Ion Homeostasis in NaCl Environments. *Plant Physiol.* 190: 735-742.
- Niu X., Narasimhan M. L., Salzman R. A., Bressan R. A. y Hasegawa P. M. 1993a. NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. *Plant Physiol.* 103: 713-718.
- Niu X., Zhu, J. K.; Narasimhan M. L., Bressan R. A. y Hasegawa P. M. 1993b. Plasma membrane H⁺-ATPase gene expression is regulated by NaCl in cells of halophyte *Atriplex nummularia* L. *Planta.* 190: 433-438.
- Norberg, P. y Liljenberg, C. 1991. Lipids of plasma membranes prepared from Oat root cells. effect of induced water-deficit tolerance. *Plant Physiol.* 96: 1136-41.
- Ochoa S. 1955. Malic enzyme. *Methods Enzymol.* 1: 739-748.
- Oishi K., Raynor R. L., Charp P. A. y Kuo J. F. 1988. Regulation of protien kinase C by lysophospholipids. Potential role in signal transduction. *J. Biol. Chem.* 263: 6865-6871.
- Olmos E., Hellin E. 1996. Mechanisms of salt tolerance in a cell line of *Pisum sativum*: biochemical and physiological aspects. *Plant science.* 120: 37-45
- O'Neil S. D., Bennet A. B. y Spanswick R. M. 1983. *Plant Physiol.* 72: 837-846.

- Outlaw W. H. Jr. 1990. Kinetic properties of guard-cell phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. 186: 317-325.
- Paek K. Y., Chandler S. F. y Thorpe T. A. Physiological effects of Na₂SO₄ and NaCl on callus culture of *Brassica campestris*. *Plant Physiol*. 72: 160-166.
- Palmgren M. G., Sommarin M. 1989. Lysophosphatidyl choline stimulates ATP dependent proton accumulation in isolated oat root plasma membrane vesicles. *Plant Physiol*. 90: 1009-1014.
- Palmgren M. G., Sommarin M., Serrano R. y Larsson C. 1991. Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem*. 266: 20470-20475.
- Palmgren M. G., Sommarin M., Ulvskov P. y Jorgensen P. L. 1988. Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase from oat roots by lysophosphatidylcholine, free fatty acids and phospholipase A₂. *Physiologia Plantarum*. 74: 11-19.
- Palmgren M. G., Sommarin M., Ulvskov P. y Larsson C. 1990. Effects of detergents on the H⁺-ATPase activity of inside-out and right-side-out plant plasma membrane vesicles. *Biochem. Biophys. Acta*. 1021: 133-140.
- Pandey R. y Ganapathy P. S. 1984. Effects of NaCl-stress on callus cultures of *Cicer arietinum*: growth and ion accumulation. *J. Exp. Bot*. 35: 1194-1199.
- Pandey R. y Ganapathy P. S. 1985. The proline enigma. NaCl-tolerant and sensitive callus line of *Cicer arietinum*. *Plant Science*. 40: 13-17.
- Papadopoulos I. y Rendig. V. V. 1983. Tomato plant response to soil salinity. *Agron. J*. 75: 696-700.
- Pardo J. M. y Serrano R. 1989a. Structure of a plasma membrane H⁺-ATPase gene from the plant *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem*. 264: 8557-8562.
- Pardo J. M. y Serrano R. 1989b. Structure of a plasma membrane (H⁺)ATPase gene from *Arabidopsis thaliana* and amino acid sequence of three isoforms. En: *Plant Plasma Transport: The current Position*. Eds. Dainty J., De Michelis M. I., Marré E. y Rasi-Caldogno. Elsevier, Amsterdam. ISBN 0-444-81328-4. pp: 499-500.
- Parets-Soler A., Canas L. y Beltran J-P. 1993. Spatial and temporal induction of H⁺-ATPase during flower development in *Pisum sativum* L. *Plant Science*. 92: 57-67.
- Parets-Soler A., Pardo J. M. y Serrano R. 1990. Immunocytolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol*. 93: 1654-1658.
- Pastermak, D. 1982. Biosaline research in Israel: Alternative solutions to a limited fresh water supply. p. 39-57. En: A. San prietro (ed.). *Biosaline research. A look to the future*. Plenum, New York.
- Patnaik J. y Debata B. K. 1997. In vitro selection of NaCl tolerant callus lines of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. *Plant Science*. 124: 203-210.

- Pedchenko V. K., Nasirova G. F. y Palladina T. A. 1990. Lysophosphatidylcholine specifically stimulates plasma membrane H⁺-ATPase from corn roots. *FEBS. Lett.* 275: 205-208.
- Peeler, T. C., Stephenson, M. B., Einsparhr, K. J. y Thompson, G. A. Jr. 1989. Lipid characterization of an enriched plasma membrane fraction of *Dunaliella salina* grown in media of varying salinity. *Plant Physiol.* 89:970-976.
- Perez-Alfocea F., Santa Cruz A., Guerrier G. y Bolarin M. C. 1994b. NaCl stress induced organic solute changes on leaves and calli of *Lycopersicon esculentum*, *L. pennellii* and their interspecific hybrid. *J. Plant Physiol.* 143: 106-111.
- Perez C., Michelet B., Ferrant B., Bogaerts P. y Boutry M: 1992. Differential expression within a three-gene subfamily encoding a plasma membrane H⁺-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *J. Biol. Chem.* 267: 1204-1211.
- Perez-Prat E., Narasimhan M. L., Niu X., Botella M. A., Bressan R. A., Valpuesta V., Hasegawa P. M. y Binzel M. L. 1994. Growth cycle stage-dependent NaCl induction of plasma membrane H⁺-ATPase mRNA accumulation in de-adapted tobacco cells. *Plant, Cell and Environment.* 17: 327-333.
- Petrusa L. M. y Winicov I. 1997. Proline status in salt-tolerant and salt sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. *Plant Physiol. Biochem.* 35 (35): 303-310.
- Pilet P. E. 1982. En: *Plant Growth Substance*. Academic Press, New York. pp: 529-536.
- Pilon-Smith E. A. H., Ebskamp M. J. M. Paul M. J., Jeuken M. J. W., Weisbeek P. J. y Smeekens S. C. M. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* 107: 125-130.
- Plat P. J., Gelli A. y Blumwald E. 1994. Vacuolar chloride regulation of an anion-selective tonoplast channel. *J. Membr. Biol.* 140: 1-12.
- Poljakoff-mayber. A. 1972. En: *Ecological Studies 15. Plant in saline environment*. Eds. A. Poljakoff-mayber y gale. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. pp. 97-117.
- Poole R. J. 1988. Plasma membrane and tonoplast. En: *Solute Transport in Plant Cells and Tissues*. Eds, Baker D. A. y Hall J. L. John Wiley and Sons, New York. pp: 83-105.
- Pope A. J. y Leigh R. A. 1987. *Planta.* 172: 91-100.
- Quinn P. J. 1983. models for adaptive changes in cell membranes. *Biochem. Soc. Trans.* 11: 329-331.
- Quinn P. J. 1984. Polar lipid structures and the ability of cell membranes. In: *Structure, function and metabolism of plant lipids*. Eds. Siegenthaler P. A. y Eichenberger W. pp. 331-338. Elsevier, Amsterdam. ISBN 0-444-80626-1
- Rains D. W., Croughan T. P. y Stavarek S. J. 1980. Selection of salt-tolerant plants using tissue culture. En: *Genetic engineering of osmoregulation. Impacto on plant productivity for food, chemicals, and energy*. Eds. Rains D. W., Valentine R. C. y Hollaender A. Plenum Press, New York. pp: 279-292.

- Rains D. W. y Epstein E. 1967. Sodium absorption by Barley roots: root of the dual mechanisms of alkali cation transport. *Plant Physiol.* 42: 314-318.
- Raison J. K. 1980. Membrane lipids-structure and function. In: *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise*. P. K. Stumpf y E. E. Conn. eds. pp. 57-83. Academic Press. NY.
- Ram N. V. R. y Nabors M. W. 1986. Salinity tolerance. En: *Biotechnology Application and Reaserch*. Eds. Cheremissinoss P. N. y Ouellette R. P. Technomic Publications, Inc., Lancaster. pp: 623-642.
- Randall S. K. y Sze H. 1986. *J. Biol. Chem.* 261: 1364-1371.
- Rasi-Caldogno F., Pugliarello M. C. y De Michelis M. C. 1985. *Plant Physiol.* 77: 200-205.
- Raven J. A: 1985. pH regulation in plants. *Sci. Prog. Oxford* 69: 495-509.
- Rayapati P. J. y Stewart C. R. 1991. Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. *Plant Physiol.* 95: 787-791.
- Rea P. A. y Poole R. J. 1985. *Plant Physiol.* 77: 46-52.
- Rea P. A. y Sanders D. 1987. Tonoplast energization: two pumps, one membrane. *Plant Physiol.* 81: 131-141.
- Rentsch D., Hirner B., Schmeizer E. y Frommer W. B. 1996. Salt-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by supression of yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell.* 8: 1437-1446.
- Reuveni. M., Colombo. R., Lerner. H. R., Pradet. A. y Poljakoff-Mayber. 1987. Osmotically induced proton extrusion from carrot cells in suspension culture. *Plant Physiol.* 85: 383-388.
- Reuveni. M., Bennet. 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.
- Rhodes, D. y Handa, H. 1989. Amino acid metabolism in relacion to osmotic adjustment in plant cells. En: *Biochemical and Physiological Mechanisms Associated with Environmental Stress Tolerance*. NATO ASI series. Vol. G19 (ed. J. H. Cherry) pp. 41-62. Springer-Verlag, Berlin.
- Rhodes, D., Handa, H., Bressan R. A. 1986. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiol.* 82: 890-903.
- Rochester C. P., Kjellbom P. y Larsson C. 1987. Lipid composition of plasma membranes from barley leaves and roots, spinach leaves and cauliflower inflorescences. *Physiologia Plantarum.* 71: 257-263.
- Roldan. M., Donaire. J. P., Pardo. J. M. y Serrano. R. 1991. regulation of root plasma membrane H⁺-ATPase in sunflower seedlings. *Plant Sci.* 79: 163-172.
- Römheld V., Müller C. y Marschner H. 1984. *Plant Physiol.* 76: 603-606.

- Rozema, J. 1978. On the ecology of some halophytes from a beach plain in the Netherlands. *PhD Thesis*. Vrije Univ., Amsterdam, the Netherlands. 191pp.
- Rozema, J.; Rozema-Dijst, E.; Freijsen, A. H. J. y Huber, J. J. L. 1978. Population differentiation within *Festuca rubra* L. with regard to soil salinity and soil water. *Oecologia* (Berlin) 34: 329-41.
- Rush D. W. y Epstein E. 1981a. Comparative studies on the sodium, potassium and chloride relations of a wild halophytic and domestic salt sensitive tomato species. *Plant Physiol.* 68: 1308-1313.
- Rush D. W. y Epstein E. 1981b. Breeding and selection for salt tolerance by the incorporation of wild germplasm into domestic tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106 (6): 699-704.
- Sabbah S. y Tal M. 1990. Development of callus and suspension cultures of potato resistant to NaCl and Manitol and their responses to stress. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 21: 119-128.
- Sakmann, E. 1986. En: *Intracell. Calcium Regul. Proc. Int. Symp. 1984*. Ed. B. Hermann. Manchester Univ. Press: Manchester U.K. pp. 105-120.
- Salgado-Garciglia R., Lopez-Gutierrez F. y Ochoa-Alejo N. 1985. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 5: 3-12.
- Samuels A. L., Fernando M. y Glass A. D. M. 1992. Immunofluorescent localization of plasma membrane H⁺-ATPase in barley roots and effects of K nutrition. *Plant Physiol.* 99: 1509-1514.
- Sanchez-Aguayo, I. y Gonzalez-Utor, A. L. y Medina, A. 1991. *Plant Physiol.* 96: 153-158.
- Sandstrom R. P. y Cleland R. E. 1989. Comparison of the lipid composition of aot root and coleoptile plasma membrane. Lack of short-term change in response to auxin. *Plant Physiol.* 90: 1207-1213.
- Santa-Cruz A., Perez-Alfocea F., Caro M. y Acosta M. 1998. Polyamines as short-term salt tolerance traits in tomato. *Plant Science.* 138: 9-16.
- Santoni V., Vansuyt G. y Rossignol M. 1993. Indoleacetic pretreatment of tobacco plants in vivo increases the in vitro sensitivity to auxin of the plasma membrane H⁺-ATPase from leaves and modifies the polypeptide composition of the membrane. *FEBS. Lett.* 326: 17-20.
- Sawyer D. B. y Andersen O. S. 1989. Platelet-activating factor is a general membrane perturbant. *Biochem. Biophys. Acta.* 987: 129-132.
- Scalla R., Amory A., Riguid A. y Goffeau A. 1983. *Eur. J. Biochem.* 132: 525-530.
- Scarpa A. y De Gier J. 1971. *Biochim. Biophys. Acta.* 241: 789-797
- Scarborough G. A: 1977. Properties of the *Neurospora crassa* plasma membrane ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 180: 384-393.

- Schachtman D. P. y Schroeder J. I. 1994. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plant. *Nature*. 370: 655-658.
- Schachtman D. P., Tyerman S. D. y Terry B. R. 1991. the K^+/Na^+ selectivity of a cation channel in the plasma membrane of root cells does not differ in salt tolerant and salt sensitive wheat species. *Plant Physiol.* 97: 598-605.
- Schaller G. E. y Sussman M. R. 1988. *Planta*. 173: 509-518.
- Scherer G. E. y André B. 1989. A rapid response to a plant hormone: auxin stimulates phospholipase A_2 in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 111-117.
- Schroeder J. I., Ward J. M. y Gassmann W. 1994. Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K^+ channels in higher plants: biophysical implications for K^+ uptake. *Annu. Rev. Biophys. Biochem. Struct.* 23: 441-471.
- Senaratna T., Mc Kersie B. D. y Stinson R. H. 1984. Association between membrane phase properties and deshydration injury in soybean axes. *Plant Physiol.* 76: 759-762.
- Serrano R. 1984. Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Curr. Topics Cell. Regul.* 23: 87-126.
- Serrano R. 1988. Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta.* 949: 1-28.
- Serrano, R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann. Rev Plant Physiol.* 40: 61-94.
- Serrano R. 1990. Plasma membrane ATPase. In: *The plant plasma membrane*. C. Larsson y I. M. Moller. eds. pp. 127-153. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Serrano R. 1996. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *International Review of Cytology.* 165: 1-52.
- Serrano, R. y Villalba J. M. 1993. Bomba de protones de la membrana vegetal. *Investigación y Ciencia*. Enero. 62-69.
- Shah S. H., Wainwright J. y Merrett M. J. 1990. The interaction of sodium and calcium chlorides and light on growth, potassium nutrition, and proline accumulation in callus cultures of *Medicago sativa* L. *New Phytol.* 116: 37-45.
- Shanon M. C. y Nobles C. L. 1995. Variation in salt tolerance and ion accumulation among subterranean clover cultivars. *Crop Sci.* 35: 798-804.
- Shimazaki K., Kinoshita T. y Nishimura M. 1992. Involvement of calmodulin and calmodulin-dependent myosin light chain kinase in blue light-dependent H^+ pumping by guard cell protoplasts from *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* 99: 1416-1421.
- Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. 1996. Molecular responses to drought and cold stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 161-167.

- Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115: 327-334.
- Siedow. 1991
- Simmonds A.C., East J. M., Jones O. T., Rooney E. K., Mc Whirter J. y Lee A. G. 1982. Annular and non-annular binding sites on the (Ca²⁺-Mg²⁺)ATPase. *Biochem. Biophys. Acta.* 693: 398-406.
- Simon E. W. 1974. Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytol.* 73: 377-420.
- Singer M. 1981. Permeability of phosphatidylcholine and phosphatidyletanolamine bilayers. *Chem. Phys. Lipids.* 29: 253-267.
- Singer S. J. y Nicolson G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175: 720-731.
- Skerrett M. y Tyerman S. D. 1994. A channel that allowa inwardly directed fluxes of anions in protoplast derived from wheat roots. *Planta.* 192: 295-305.
- Smirnoff N. y Cumbes Q. J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry.* 28: 1057-1060.
- Smith F. A. y Raven J. A. 1979. Intracellular pH and its regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30: 289-311.
- Smolenska-Sym G. y Kacperska A. 1996. Inositol 1,4,5-triphosphate formation in leaves of winter oilseed rape plants in response to freezing, tissue water potential and abscisic acid. *Physiologia Plantarum.* 95: 692-698.
- Solioz M. 1984. *Trends Biochem. Sci.* 9: 309-312.
- Spanswick R. M. 1981. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 267-289.
- Spiegel-roy. P. y Ben-hayyim. G. 1985. *Plant and Soil.* 89: 243-252.
- Shannon, M. C. 1984. Breeding, selection, and the genetics of salt tolerance, p. 231-254. En: R. C. Staples y G. H. Toenniensen (eds.). *Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement.* Wiley, New York.
- Stavarek S. J., Croughan T. P. y Rains D. W. 1980. Regeneration of plants from long -term cultures of alfalfa cells. *Plant Science Letters.* 19: 253-261
- Stavarek S. J. y Rains D. W. 1984. The development of tolerance to mineral stress. *Hort. Science.* 19: 377-382.
- Stefanov K., Seizova K., Elenkov I., Kuleva L., Popov S. y Dimitrova-Konaklieva S. 1994. *Botanica Marina.* 37: 445.
- Stelzer, r.y Lauchli, A. 1978. Salt and flooding tolerance of *Puccinellia peisonis* III. Distribution and localization of ions in the plant. *Z. Pflanzenphysiol.* 88:437-48.

- Stenz H-G., Heumann H. G. y Weisenseel M. H. 1993. High concentration of plasma membrane H^+ -ATPase in root caps of *Lepidium sativum* L. *Naturwissenschaften*. 80: 317-319.
- Stewart C. R., Morris C. J. y Thompson J. F. 1966. Changes in aminoacid content of excised leaves during incubation. *Plant Physiol.* 41: 1585.
- Stuiver C. E. E., Kuiper P. J. C., Maeschner H. y Kylin A. 1981. Effects of salinity and replacement of K^+ by Na^+ on lipid composition in two sugar beet inbred lines. *Physiologia Plantarum*. 52: 77-82.
- Sumaryati, S.; Negrutiu, I. y Jacobs, M. 1992. Characterization and regeneration of salt and water-stress mutants from protoplast culture of nicotiana plumbaginifolia (Viviani). *Theoretical and Applied genetics*. 83: 613-619.
- Sussman M. R. 1994. Molecular analysis of protiens in the plant plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* 45: 211-234.
- Sussman M. R. y Harper J. F. 1989. Molecular biology of the plasma membrane of higher plant. *Plant Cell*. 1: 953-960.
- Sze H. 1983. *Biochem. Biophys. Acta*. 732: 587-594.
- Sze H. 1984. H^+ -translocating ATPases of the plasma-membrane and tonoplast of plant cells. *Physiologia Plantarum*. 61: 683-91.
- Sze H. 1985. H^+ -translocating ATPase. Advances using membrane vesicles. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 175-208.
- Szoke A., Miao G.H., Hong Z. y Verma D. P. S. 1992. Subcellular location of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductasw in root/nodule and leaf of soybean. *Plant Physiol.* 99: 1642-1649.
- Tal M. 1984. En: Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement. R. C. Staples y G. H. Toenniensen (eds.). pp. 301-321. *Wiley-Interscience*, New York.
- Tal M. 1985. Genetics of salt tolerance in higher plants: Theoretical and practical considerations. *Plant and Soil*. 89: 199-226.
- Tal M., Heikin H. y Dehan K. 1978. *Z. Pflanzenphysiol.* 86: 231-240.
- Tal M., Katz A., Heikin H. y Dehan K. 1979. Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: Proline accumulation in *Lycopersicon esculentum* Mill., *L. Peruvianum* Mill. y *Solanum pennellii* cor. treated with NaCl and polyethyleneglycol. *New Phytol.* 82: 349-355.
- Taleisnik E. y Grunberg K. 1994. Ion Balance in tomato cultivars differing in salt tolerance. I. Sodium and potassium accumulation and fluxes under moderate salinity. *Physiologia Plantarum*. 92: 528-534.
- Taylor C. B. 1996. Proline and water deficit: ups, downs, ins. and outs. *The Plant Cell*. 8: 1221-1224.

- Thibaud. J. B., Romieu. Ch., Gibrat. R., Grouzis. J. P. y Grignon. C. 1984. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 114: 207-213.
- Thibaud. J. B., Soler A. y Grignon. C. 1986. *Plant Physiol.* 81: 847-853.
- Thompson G. A., Einspahr K., Hocho S., Peeler T. C. y Stephenson M. 1989. Metabolic responses of plant cell to stress. In: *Biological role of plants lipids*. Edited by Biacs P. A., Gruiz K. y Kremmer T. pp. 497-504. New york.
- Tilcock. C. P. S., Cullis. P. R. y Gruner. S. M. 1988. *Biochemistry.* 27: 1415-1429.
- Treichel, S. 1986. The influence of NaCl on Δ^1 -pyrroline carboxylate reductase in proline-accumulating cell suspension cultures of *Mesembryanthemum rodiflorum* and other halophytes. *Plant Physiol.* 67: 173-181.
- Tu S. I., Brauer D. y Nungesser E. 1990. *Plant Physiol.* 93: 1102-1109.
- Tu S. I., Nagahashi G. y Brouillette J. N. 1987. *Arch. Biochem. Biophys.* 256: 625-637.
- Ullrich-Eberius C. I., Novacky A. y Van Bell A. J. 1984. *Planta.* 161: 45-52
- Vara F. y Serrano R. 1982. *J. Biol. Chem.* 257: 12826-12830.
- Venekamp J. H. 1989. Regulation of cytosol acidity in plants under conditions of drought. *Plant Physiol.* 76: 112-117.
- Venema K. y Palmgren M. G. 1995. Metabolic modulation of transport coupling ratio in yeast plasma membrane H^+ -ATPase. *Journal of Biological Chemistry.* 270: 19659-19667.
- Vick B. A. 1993. Oxygenated fatty acid of the lipoxigenase pathway. En: *Plant Lipid Metabolism*. Ed. Moore T. S. Boca raton. FL: CRC Press. pp: 167-191.
- Villalba J. M., Lützelshwab M. y Serrano R. 1991. Immunocytolocalización of plasma membrane of H^+ -ATPase in maize coleoptiles and enclosed leaves. *Planta.* 185: 458-461.
- Wagner G. P. y Mulready P. 1983. *Biochem. Biophys. Acta.* 728: 267-280.
- Walker T. y Douglas R. 1984. *Physiologia Plantarum.* 62: 51-58
- Walker R. R. y Leigh R. A. 1981a. *Planta.* 153: 140-149
- Walker R. R. y Leigh R. A. 1981b. *Planta.* 153: 150-155
- Wang Y., Leigh R. A., Kaestner K. H. y Sze H. 1986. *Plant Physiol.* 81: 497-502.
- Wang Y. y Sze H. 1985. *J. Biol. Chem.* 260: 10434-10443.
- Ward J. M. y Schroeder J. I. 1994. Calcium activated K^+ channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell.* 6: 669-683.

- Watad. A. E. A., pesci. P. A., Reinhold. L. y Lerner. H. R. 1986. *Plant Physiol.* 81: 454-459.
- Watad A. E. A., Reinhold L. y Lerner H. R. 1983. Comparison between a stable NaCl-selected *Nicotiana* cell line and the wild type. *Plant Physiol.* 73: 624-629.
- Watad A. E. A., Reuveni M., Bressan R. A. y Hasegawa P. M. 1991. Enhanced net K^+ uptake capacity of NaCl-adapted cells. *Plant Physiol.* 95: 1265-1269.
- Weiler E. W., Albercht T., Groth B., Xia Z. K. y Luxem M. 1993. Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendril coiling response of *Bryonia dioica*. *Phytochemistry.* 32: 591-600.
- Weretilnyk E. A. y Hanson A. D. 1989. Betaine aldehyde deshydrogenase from spinach leaves: purification, in vitro translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 271: 56-63.
- Weretilnyk E. A. y Hanson A. D. 1990. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 2745-2749.
- White P. J., Marshall J. y Smith A. C. 1990. *Plant Physiol.* 93: 1063-1070.
- Willeford K. O. y Wedding R. T. 1987. pH effects on the activity and regulation of the NaD malic enzyme. *Plant Physiol.* 84: 1084-1087.
- Williamson C. L. y Slocum R. D. 1992. Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase (*pro C*) gene in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* 100: 1464-1470.
- Woolley. J. T. 1957. Sodium and silicon as nutrient for the tomato plant. *Plant Physiol.* 32: 317-321.
- Wu J. y Seliskar D. M. 1998. Salinity adaptation of plasma membrane H^+ -ATPase in the salt marsh plant *Spartina patens*: ATP hydrolysis and enzyme kinetics. *J. Exp. Bot.* 49 (323): 1005-1013.
- Wu J., Seliskar D. M. y Gallagher L. 1998. Stress tolerance in the marsh plant *Spartina patens*: Impact of NaCl on growth and root plasma membrane lipid composition. *Physiologia Plantarum.* 102: 307-317.
- Wyn Jones, R. G. y Gorham, J. 1986. The potential for enhancing the salt tolerance of wheat and other important crop plants. *Outlook Agri.* 15: 33-39.
- Wyn Jones, R. y Pollard A. 1983. Proteins, enzymes and inorganic ions. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*. New Series, Vol 15B. Eds. Läuchli A. y Pirson A. Springer-Verlag, Berlin. pp: 528-562.
- Yamanishi H. y Kasamo K. 1993. Modulation of the activity of purified tonoplast H^+ -ATPase from lipids. *Plant Cell Physiol.* 34: 411-419.

Yeagle P. L. 1989. Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB J.* 3: 1833-1842.

Yoshiba Y., Kiyosue T., Katagiri T., Ueda H., Mizoguchi T., Yamaguchi-Shinozaki K., Wada K., Harada Y. y Shinozaki K. 1995. Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J.* 7: 751-760.

Zenoff A. M., Hilal M., Galo M. y Moreno H. 1994. Changes in roots lipid composition and inhibition of the extrusion of protons during salt stress in two genotypes of soybean resistant or susceptible to stress. Varietal differences. *Plant Cell Physiol.* 35 (5): 729-735.

Zhong H. y Laüchli A. 1994. Spatial distribution of solutes, K, Na, Ca and their deposition sites in the growth zone of primary cotton roots: effects of NaCl and CaCl₂. *Planta.* 194: 34-41.

Zidan. I., Azaizeh. H. y Neuman. P. M. 1990. *Plant Physiol.* 93: 7-11.

Zingarelli. L., Anzani. P. y Lado. P. C. 1994. *Physiol Plant.* 91: 510-516.

Zorec R. y Tester M. 1992. Cytoplasmic calcium stimulates exocytosis in a plant secretory cell. *Biophys. J.* 63: 864-867.

Zull J. E. y Hopfinger A. J. 1969. Potential energy field about nitrogen in choline and ethanolamine: biological function at cellular surface. *Science.* 165: 512-513.

IX. Abreviaturas

Abreviaturas

ACMA	9-amino-6-cloro-2-methoxyacridine
ATP	Adenosintrifosfato
ATPasa	Adenosintrifosfatasa
BCIP	Cromogenicos 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
Brij 58	polioxietilencetil eter
BSA	Albumina bovina
BSTFA	Bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida
BTP	1,3-bis(tri(hidroxiometil-metilamino)propanol)
DCCD	N,N-diciclohexilcarbodiimida
DE	Desviación estándar
DES	Dietilstilbestrol
DPH	1,6-difenil-1,3,5,-hexatrieno
DTT	Ditiotitol
Dx	Dextrano
EDTA	Acido dietildiaminotetracetico
EGTA	Acido N,N,N',N'-tetraceticoetilenglicol-bis(β ,3-aminoetileter)
Hepes-NaOH	Acido N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfic
IgG	inmunoglobulina G
KDa	Kilodalton
Km	Constante de Michaelis-Menten
Mes	Acido 2,N-morfolin-etanolulfonico
NADH	Nicotinamida adenin dinucleotido
NADP	Nicotinamida adenin dinucleotido fosfato
NBT	Azul de nitrotetrazolium
PEG	polietilenglicol
PPasa	pirofosfatasa
PITC	
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVP-40	Polivinilpirrolidona 40
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
SDS	Dodecilsulfatosodico
TEA	Trietilamina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamida
TMA-DPH	1-(4-trimetilamoniofenil)6-fenil-1,3,5-hexatrieno
Tris	Trishidroximetil-aminometano
UDP	Uridin 5'-difosfato
UDPasa	Uridin 5'-difosfatasa
16:0	Acido palmítico
18:0	Acido esteárico
18:1	Acido oleico
18:2	Acido linoleico
18:3	Acido linolénico



Biblioteca Universitaria de Granada



01053008