

L. Chávez, L.M. González

**MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA TOLERANCIA
DE LAS PLANTAS A LA SALINIDAD**

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **105** N.º 4 (231-256), 2009

Mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia de las plantas a la salinidad

L. Chávez, L.M. González

Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov". Carretera Vía Manzanillo Km 17. Bayamo. Granma. Cuba. E-mail: lchavez@dimitrov.cu

Resumen

La salinidad es uno de los factores abióticos más importantes por sus impactos negativos en las cosechas a nivel mundial, reduciendo el rendimiento de los principales cultivos de importancia económica en más de un 50 por ciento. Se describen los mecanismos moleculares fundamentales que utilizan las plantas para su adaptación a condiciones salinas estresantes, entre ellos se encuentran el mantenimiento de la homeostasis iónica, la síntesis de compuestos osmoprotectores, la reducción del daño por estrés oxidativo y el papel del ácido abscísico.

Palabras clave: Estrés salino, Plantas transgénicas, ABA, Homeostasis iónica.

Summary

Molecular mechanisms in plant salt tolerance

Salinity is one of the most important abiotic factors for its negative impacts on yield crops around the world with a reduction higher than 50 percent in many crops of economic importance. The fundamental molecular mechanism for the plant adaptation to saline conditions as the maintenance of the ionic homeostasis, the synthesis of osmotic protector compounds, the reduction of damage for oxidative stress and the abscisic acid role are described in plant salt tolerance.

Key words: Saline stress, Transgenic plants, ABA, Ionic homeostasis.

Introducción

El desarrollo de plantas tolerantes a la salinidad es una necesidad para mantener y elevar la producción agrícola (Munns *et al.*, 2006). Los programas de mejoramiento convencional para obtener plantas que toleren el estrés salino han obtenido un éxito muy limitado debido a la complejidad del carácter. El lento progreso en los programas de mejora puede atribuirse al pobre conocimiento o entendimiento de los mecanismos moleculares de tolerancia a la salinidad. Además, comprender las bases moleculares de la tolerancia de las plantas a la salinidad

también ayudará a mejorar la tolerancia a la sequía y a las temperaturas extremas, porque el estrés osmótico es común a estos estreses abióticos (Chinnusamy *et al.*, 2005).

Las plantas responden al estrés salino a tres niveles diferentes: celular, tisular y de planta completa (Munns y Tester, 2008). Es por ello que para entender satisfactoriamente la tolerancia de las plantas a la salinidad, los mecanismos a cada nivel deben estudiarse individualmente (Larcher, 2003).

El objetivo de este trabajo es describir algunos de los mecanismos moleculares fundamentales que utilizan las plantas para su adaptación

a condiciones salinas estresantes, entre ellos, el mantenimiento de la homeostasis iónica, la síntesis de compuestos osmoprotectores, la reducción del daño por estrés oxidativo y el papel del ácido abscísico.

ciclo celular reduciendo la expresión y actividad de ciclinas y proteínas quinasa dependientes de ciclinas, lo que trae como resultado menos células en los meristemos, y un crecimiento limitado.

La salinidad y sus efectos nocivos sobre los cultivos

El estrés salino afecta al desarrollo de la planta, incluyendo la germinación, el crecimiento vegetativo y el desarrollo reproductivo. También limita indirectamente la productividad de las plantas a través de sus efectos adversos en microorganismos simbióticos beneficiosos.

La salinidad afecta el crecimiento y producción de los cultivos porque reduce el potencial hídrico de la solución del suelo, por lo que disminuye la disponibilidad de agua, y crea un desequilibrio nutritivo, dada la elevada concentración de elementos (Na^+ , Cl^-) que pueden interferir con la nutrición mineral y el metabolismo celular (Amini *et al.*, 2007). En consecuencia, los diversos efectos observados a distinta escala, desde reducción de turgencia y crecimiento, hasta la pérdida de la estructura celular por desorganización de membranas e inhibición de la actividad enzimática, son el producto combinado del estrés hídrico, la toxicidad iónica y el desequilibrio nutricional (Parida y Das, 2005; Vijayan, 2008).

La salinidad afecta la fotosíntesis (Chaves, 2009), principalmente a través de la reducción del área foliar, el contenido de clorofila y la conductancia estomática, y en menor extensión a través de una disminución de la eficiencia del fotosistema II (Chinnusamy *et al.*, 2005). Los efectos adversos de la salinidad pueden atribuirse al efecto del estrés salino sobre el ciclo celular y la diferenciación. La salinidad detiene temporalmente el

Tolerancia de las plantas a la salinidad

De acuerdo con la tolerancia a las condiciones de salinidad en el suelo, las plantas pueden ser clasificadas en aquellas que requieren o toleran altas concentraciones de sales, o halófitas, y las que no toleran la presencia excesiva de sales, o glicófitas. Existen categorías intermedias entre ambos grupos –pseudohalófitas–, así como plantas que, sin ser halófitas, requieren sodio como elemento esencial. La sensibilidad de las plantas a las sales varía durante el desarrollo fenológico, dependiendo de la especie, el cultivar y factores ambientales (Munns, 2002).

Se ha planteado que en la evolución de los mecanismos de tolerancia y adaptación de las plantas al estrés salino así como a diferentes factores abióticos estresantes, puede observarse la existencia de grados de susceptibilidad y de tolerancia muy diferentes, tanto desde el punto de vista de los mecanismos, como de la amplitud y distribución entre las diversas especies, e incluso variedades y ecotipos dentro de una misma especie. Esto evidencia la diversidad de estrategias que han desarrollado las plantas, para mantener una respuesta altamente refinada ante la amplia gama de estrés a que son expuestas las mismas (González, 2002).

La mayoría de las especies comestibles de granos y vegetales son glicófitas muy susceptibles a la salinidad del suelo, aún cuando la conductividad eléctrica sea menor de 4dS/m. Especies tales como: frijoles (*Phaseolus vulgaris*), berenjena (*Solanum melongena*), maíz (*Zea mays*), papa (*Solanum tuberosum*), y

caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), son muy susceptibles; mientras que la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) y la cebada (*Hordeum vulgare*), pueden tolerar una CE de más de 7 dS/m. La remolacha y la cebada, sin embargo, son muy sensibles durante la fase de germinación, en cambio son muy tolerantes durante las fases posteriores de desarrollo (Chinnusamy *et al.*, 2005).

La respuesta adaptativa, para lograr tolerar la salinidad, debe interconectar tres aspectos en la actividad de la planta. El primero es prevenir o reparar el daño o la detoxificación. El segundo es el control de la homeostasis, incluye la homeostasis iónica y la osmótica que deben ser re-establecidas frente a las nuevas condiciones de estrés. En tercer lugar, el control del crecimiento, debe reanudarse pero con una tasa reducida (Zhu, 2001).

Para que una planta se adapte a las condiciones salinas, se deben activar múltiples mecanismos: debe aumentarse la capacidad de obtener y/o retener agua, y debe restituirse la homeostasis iónica (Bargmann *et al.*, 2009). Estos mecanismos de adaptación se reflejan macroscópicamente como un menor crecimiento, modificación de la relación parte aérea/raíz, limitación de la expansión foliar, y son consecuencia de cambios bioquímicos (incremento de la síntesis de ácido abscísico y solutos osmoprotectores) y fisiológicos (alteración de la permeabilidad de las membranas a los iones y al agua, cierre estomático, disminución de transpiración y fotosíntesis, etc). Esta respuesta adaptativa está gobernada por señales moleculares que regulan la relación con el medio externo (por ejemplo, cambios en la actividad de canales y transportadores de membranas) y por la activación y transcripción de genes entre cuyos efectos está la modificación de rutas biosintéticas que resultan en ajuste osmótico y la protección de las estructuras celulares (Zhou *et al.*, 2007).

El interés por mejorar la tolerancia de los cultivos a la salinidad ha ido creciendo en los últimos años, empleando métodos de mejora y selección tradicionales o la producción de organismos modificados genéticamente (Cuartero *et al.*, 2006). La incorporación de genes procedentes de parentales silvestres tolerantes, la domesticación de plantas halófilas silvestres, y la identificación de caracteres relacionados con tolerancia empleando marcadores moleculares (Owuso, 2008), o bien la incorporación de genes cuya expresión modifica mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados en la tolerancia (Sairam y Tyagi, 2004).

A continuación nos referiremos a algunos mecanismos moleculares que son utilizados por las plantas para su tolerancia al estrés salino.

Mecanismos moleculares implicados en la tolerancia de las plantas a la salinidad

Mantenimiento de la homeostasis iónica

Como hemos expresado con anterioridad el establecimiento de la homeostasis iónica es un requerimiento esencial para que las plantas sobrevivan en condiciones de estrés salino (Bargmann *et al.*, 2009). La regulación del flujo iónico es necesaria para que las células mantengan adecuada concentración de iones esenciales y baja la concentración de iones tóxicos (Senadheera, 2009). Bajo estrés salino, el mantenimiento de la homeostasis de K⁺ y Na⁺ es de vital importancia en células vegetales. Estas necesitan mantener altas las concentraciones de K⁺, entre 100 y 200 mM, para realizar de forma adecuada las reacciones metabólicas (Rodríguez-Pérez, 2006); por lo que se puede plantear que la tolerancia a la salinidad requiere no solo la adaptación a la toxicidad provocada por el Na⁺, sino también, a la adquisición de K⁺, cuya toma por la

planta se afecta debido a la semejanza química entre ambos iones (Wang *et al.*, 2007). De ahí que las membranas y sus componentes necesarios para la toma y distribución de iones y solutos, se consideran determinantes en el desarrollo de plantas tolerantes a la salinidad (Senthilkulmar *et al.*, 2005). Los transportadores, canales, simportes y antiportes, son los principales involucrados en el fenómeno de transporte a nivel de planta. Por otro lado los niveles de sodio, deben ser menores que 1mM en el citoplasma, cualquier exceso tiene que ser excluido fuera de la célula o almacenado dentro de la vacuola (Vera-Estrella *et al.*, 2005).

Daños causados por el exceso de Na⁺:

1. Interrupción del equilibrio iónico: el influjo de Na⁺ disipa el potencial de membrana y facilitan la toma de Cl⁻ en contra del gradiente químico.
2. El Na⁺ es tóxico al metabolismo celular y tiene efecto deletéreo en el funcionamiento de algunas enzimas.
3. Altas concentraciones de Na⁺ causan desbalance osmótico, desorganización de la membrana, reducción en el crecimiento, inhibición de la división y expansión celular.
4. Altos niveles de Na⁺ también conducen a la reducción en la fotosíntesis y al incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (Mahajan y Tuteja, 2005).

Mientras que, como hemos visto, el exceso de Na⁺ en las células, conduce a respuestas fisiológicas que afectan los procesos de división y crecimiento a nivel celular (Tester y Davenport, 2003; Zhu, 2003; Shi *et al.*, 2003), el potasio, es uno de los elementos minerales esenciales en las células vegetales.

Las funciones del K⁺ en la célula vegetal son:

1. Mantener el balance osmótico.
2. Participar en los procesos de apertura y cierre estomático.

3. Ser cofactor esencial para muchas enzimas tales como la piruvato quinasa.
4. Mantener la turgencia celular.
5. Unir los ARNt a los ribosomas, de ahí su importancia en la síntesis de proteínas (Chinnusamy *et al.*, 2005).

El mantenimiento de altas concentraciones de K⁺ y bajas concentraciones de Na⁺ en el citosol se logra a través de una regulación coordinada de los transportadores para H⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Na⁺. Las H⁺-ATPasas de la membrana plasmática, sirven como bombas primarias, que generan un gradiente protónico, que facilita el transporte de otros solutos, incluyendo el Na⁺ y K⁺ (Zhao *et al.*, 2008). Este sistema es un componente de la respuesta de la planta a la salinidad. Las células vegetales emplean, además del transporte activo primario, mediado por H⁺-ATPasas, el transporte activo secundario, mediado por canales y cotransportadores, para mantener en el citosol concentraciones altas de K⁺ y bajas de Na⁺ (Bartels y Ramanjulu, 2005).

Existe una mayor comprensión sobre los sistemas de transporte y mecanismos regulatorios que median la relación Na⁺/K⁺ en células vegetales; éstos corresponden a los sistemas de transporte de alta y baja afinidad ubicados en el plasmalema y en el tonoplasto (Demidchik *et al.*, 2002; Zhu, 2002; Zhu, 2003). Las proteínas integrales de membrana actúan como transportadoras, sufriendo un cambio conformacional durante el transporte del ión y operando en contra de gradientes de concentración energizados por gradientes electroquímicos (antiporte Na⁺/H⁺, simporte K⁺/H⁺, simporte K⁺/Na⁺) (Berthomieu *et al.*, 2003; Sul *et al.*, 2003). Un tipo de transportador de los iones Na⁺ y K⁺ bien reconocido es el perteneciente a la familia de los HKT, identificado y evaluado en *Arabidopsis* (Rus *et al.*, 2004), arroz (Fukuda *et al.*, 2004) y trigo (Laurie *et al.*,

2002), entre otros. El HKT, transportador de alta afinidad para K^+ y descrito en *Arabidopsis*, funciona acoplado al Na^+ y contribuye al suministro de este ión en suelos salinos. Bajo concentraciones altas de Na^+ , el HKT puede tener más importancia fisiológica en el transporte de Na^+ que en el de K^+ (Rus *et al.*, 2004).

En arroz (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) se demostró que el suministro de Na^+ y K^+ está mediado por diferentes transportadores y que el K^+ se bloquea por el transportador de Na^+ . La expresión del OsHKT1 y el HKT4 demuestra que éstos son transportadores de alta y baja afinidad para Na^+ . Los transportadores OsHKT están involucrados en el transporte de Na^+ en arroz, y el OsHKT1 media específicamente el suministro de Na^+ en las raíces cuando estas plantas son deficientes en K^+ (Fukuda, 2004).

Existen transportadores muy selectivos para el K^+ , con una elevada afinidad por este ion (10-50 mM), pero que también pueden transportar Na^+ con baja afinidad y ser bloqueados por altas concentraciones de Na^+ en el medio (Rodríguez-Navarro, 2000). Entre estos transportadores están los de tipo KUP-HAK de cebada y *Arabidopsis*. Por el contrario, Los transportadores de HKT manifiestan una alta afinidad por Na^+ y en sistemas heterólogos se comportan como simportes Na^+/K^+ o uniportes de Na^+ (Horie *et al.*, 2001). Su función fisiológica es incierta pero la evidencia genética indica que la proteína HKT1 de *Arabidopsis* es una vía sustancial de entrada de Na^+ en la planta (Rus *et al.*, 2001). El transportador de baja afinidad, LCT1, también es permeable al Na^+ , pero su contribución relativa a la captación de Na^+ es desconocida.

Los canales iónicos constituyen otro sistema de transporte que permite la disipación rápida de un gradiente iónico establecido a

través del plasmalema. Se conocen tres tipos de canales que pueden mediar en la entrada o salida de iones como K^+ y Na^+ a través del plasmalema (Rodríguez-Navarro, 2000), denominados canales rectificadores de entrada de K^+ (KIRC), canales rectificadores de salida de K^+ (KORC), y canales independientes del voltaje (VIC) (Rubio *et al.*, 2004). La selectividad K^+/Na^+ de estos canales iónicos varía ampliamente (Demidchik, 2007). Los canales KIRC y KORC son altamente selectivos para K^+ en condiciones fisiológicas de crecimiento. Sin embargo, los canales de tipo KIRC pueden permitir una entrada significativa de Na^+ a largo plazo en un medio salino, debido a que en esas condiciones presentan una conductividad iónica máxima y el gradiente electroquímico de Na^+ es elevado (Amtmann y Sanders, 1999). Por el contrario, aunque los canales de tipo VIC representan una pequeña fracción de la conductividad total de la membrana, no discriminan entre Na^+ y K^+ . Considerando en su conjunto la abundancia y características funcionales de los distintos canales iónicos, se ha estimado que los VIC constituyen la vía principal de entrada de Na^+ en las células vegetales (Amtmann y Sanders, 1999). La actividad de los VIC parece modulada por nucleótidos cíclicos (cAMP y cGMP), por lo que podrían ser equivalentes a los canales de tipo CNCG (cyclic nucleotide-gated channels) caracterizados originalmente en células animales y que también están presentes en las células vegetales (Donalson *et al.*, 2004).

Si se produce una entrada importante de Na^+ en el citosol, la relación K^+/Na^+ fisiológica debe ser restablecida para evitar el efecto tóxico del Na^+ (Anil *et al.*, 2007). Esto se consigue en algunas especies con un sistema de transporte localizado en la membrana vacuolar (tonoplasto), que permite acumular Na^+ en la vacuola de manera activa, en contra del gradiente electroquímico del

Na⁺. Este sistema consiste en un antiportador Na⁺/H⁺ (denominado NHX) que acopla la entrada de Na⁺ a la salida de H⁺. La presencia de una actividad antiportadora Na⁺/H⁺ se detectó primero en tonoplasto de especies tolerantes a salinidad como remolacha y cebada, donde se inducía por la presencia de NaCl en el medio (Barkla y Pantoja, 1996). No obstante, la evidencia molecular disponible indica que estas proteínas son ubicuas en las plantas. En el genoma de *Arabidopsis thaliana*, completamente secuenciado, se reconocen hasta 6 isoformas diferentes de genes *NHX* (Maser *et al.*, 2001; Yokoi *et al.*, 2002). La compartimentación del Na⁺ en la vacuola, al tiempo que libera al citosol del exceso de Na⁺, contribuye a disminuir el potencial osmótico y ajustar el potencial hídrico celular para permitir la absorción de agua durante el estrés salino. Además, la proteína NHX1 de *Arabidopsis* tiene la capacidad de transportar tanto Na⁺ como K⁺, pudiendo contribuir al balance osmótico celular y tisular en cualquier condición de crecimiento de la planta (Leidi y Pardo, 2002).

Verma y colaboradores (2007) clonaron una nueva isoforma del antiporte vacuolar Na⁺/H⁺ en *Pennisetum glaucum* (PgNHX1), la cual contiene cinco dominios transmembrana en contraste con la isoforma de *Arabidopsis* AtNHX1 que contiene nueve dominios transmembranales. La sobreexpresión de PgNHX1 en arroz también confiere tolerancia a la salinidad debido a que las plantas transgénicas desarrollan un sistema radical más extenso y completan su ciclo de vida en presencia de 150 mM de NaCl.

Otro sistema importante para conseguir la reducción del Na⁺ citosólico es la expulsión al medio extracelular, proceso también conocido como extrusión (Flowers y Colmer, 2008). La extrusión de Na⁺ se produce en hongos y algunas especies de algas marinas

por bombas (ATPasas) transportadoras de Na⁺ (Gimmler, 2000), mientras que en la mayoría de las algas y en plantas superiores está mediada por antiportadores Na⁺/H⁺ del plasmalema (Blumwald *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2000). La actividad de antiportadores Na⁺/H⁺ en el plasmalema, que expulsan Na⁺ al exterior de la célula en un intercambio por H⁺, requiere un gasto energético ya que debe efectuarse en contra de un gradiente de potencial electroquímico. La inducción en tomate de una ATPasa transportadora de H⁺ de plasmalema por el estrés salino podría responder a la necesidad de generar el gradiente de protones requerido por el antiportador Na⁺/H⁺ (Kalampanayil y Wimmers, 2001).

Se ha sugerido que la extrusión de Na⁺ podría constituir a largo plazo un serio problema en las células de algunos tejidos, como las hojas, ya que la acumulación extracelular de Na⁺ podría ser aún más dañina que su inclusión al generar un déficit hídrico extremo (Yeo, 1998). Además de reducir el contenido celular de Na⁺, el antiportador Na⁺/H⁺ del plasmalema de *Arabidopsis*, SOS1, también media en el transporte de Na⁺ desde la raíz al mesófilo foliar y es esencial para la redistribución del Na⁺ entre los tejidos vegetales (Shi *et al.*, 2002). Un factor determinante del daño celular en arroz es la deshidratación producida por la acumulación de sales en el espacio extracelular (Flowers *et al.*, 1991) de la que podría no ser ajena la actividad de ese antiporte. Sin embargo, el balance neto de la actividad antiportadora Na⁺/H⁺ en el plasmalema deber ser positivo para la planta ya que los mutantes *sos1* de *Arabidopsis*, carentes de dicha actividad, son extremadamente sensibles a NaCl. Por razones todavía desconocidas, los mutantes sin SOS1 o en los que su actividad está disminuida (mutantes SOS2 y SOS3) son incapaces de tomar K⁺ a bajas concentraciones exteriores (Zhu, 2000).

Papel del calcio en la respuesta de la planta al estrés salino

El papel del ión Ca^{2+} en la respuesta de las plantas a salinidad resulta esencial, por su papel señalizador, su función estructural en la membrana y su efecto sobre la actividad de algunos transportadores iónicos (Klimecka y Muszynska, 2007). La presencia de Ca^{2+} puede reducir la magnitud del efecto negativo de la salinidad en el crecimiento, fenómeno que se ha atribuido al efecto estabilizador de la membrana y al mantenimiento de su capacidad selectiva (Marschner, 1995). El Ca^{2+} extracelular podía reducir la pérdida de K^+ inhibiendo los canales de salida KORC (Murata *et al.*, 2000), y disminuir la entrada de Na^+ mediante la inhibición de canales KIRC y sobre todo VIC (Maathuis y Amtmann, 1999). Por otra parte, el Ca^{2+} intracelular tendría un papel no menos esencial en la absorción de K^+ y la selectividad K^+/Na^+ en condiciones salinas mediante la modulación de otros transportadores iónicos como SOS1 (Zhu, 2000). La expresión del gen SOS1 es dependiente del complejo SOS2/SOS3, donde SOS2 es una proteína quinasa y SOS3 es una proteína sensora de Ca^{2+} (Hussain *et al.*, 2008). Se conoce que el papel del Ca^{2+} es complejo, ya que actúa como intermediario en la cascada de señales que conducen a la transcripción de numerosos genes involucrados en la respuesta adaptativa (Chinnusamy *et al.*, 2005).

Proteínas LEA, HSP y poliaminas

Proteínas LEA

La salinidad, así como las altas temperaturas y la sequía, pueden causar la desnaturalización y la pérdida de sus funciones en numerosas proteínas. Las HSP (siglas en inglés: heat shock protein) y las proteínas LEA (siglas en inglés: late embryogenesis abun-

dance) ayudan a proteger las proteínas celulares contra el estrés, controlando el plegamiento y la conformación de las proteínas estructurales y enzimas (Wang *et al.*, 2004). Además se ha demostrado que las proteínas LEA y las chaperonas están involucradas en la protección de moléculas, tales como enzimas, lípidos y ARNm, de la deshidratación (Sairam y Tyagi, 2004).

Durante el desarrollo y la maduración, cuando tiene lugar una desecación natural, las semillas acumulan transcritos y proteínas en una concentración relativamente alta, por esta razón, donde primero se encontraron estas proteínas, fueron llamadas LEA (Kalemba y Pukacka, 2007). Las proteínas LEA son un grupo de proteínas inducibles por el ABA y originalmente se sugirió que pueden estar asociadas con la tolerancia a la desecación durante la maduración de la semilla y también inducidas por la salinidad y el déficit de agua (Vital Vas *et al.*, 2007). Las proteínas LEA se agrupan en al menos seis familias, en base a homología en su secuencia aminoacídica. El déficit de agua, la alta osmolaridad y bajas temperaturas, conllevan a la acumulación de un grupo de proteínas LEA. Actualmente se ha demostrado que estas proteínas pueden preservar la estructura proteica (Umezawa *et al.*, 2006) y la integridad de la membrana, preservando el agua, impidiendo la desnaturalización de proteínas y renaturalizando las proteínas ya desplegadas, además secuestrando iones en los tejidos estresados (Sairam y Tyagi, 2004).

Se han identificado varios grupos de proteínas LEA en cereales, de las cuales las pertenecientes al grupo 2, también llamadas deshidrinas son las proteínas solubles más eminentes, inducidas por el estrés osmótico (Roychoudhury y Basu, 2008).

El gen HVA1 que codifica para la proteína LEA es inducido por el ABA y varios tipos de

estrés, por ejemplo la salinidad. Plantas transgénicas de arroz que expresan el HV1, conducida por un promotor constitutivo del gen de la actina, mostraron un incremento significativo de la tolerancia a la salinidad (Xu *et al.*, 1996). Los mecanismos involucrados en la acción de este gen no están claros pero los autores proponen que el incremento de la tolerancia a la salinidad pudiera deberse a la estabilización de estructuras celulares.

Otros investigadores evaluaron la tercera generación de plantas transgénicas de avena (*Avena sativa* L.) que expresan el gen HVA1 de cebada, el gen de la β -glucuronidasa (*uidA*; *gus*) y el gen de resistencia a herbicidas *bar*. En comparación con las plantas control, las plantas transgénicas mostraron mayor crecimiento y un significativo incremento en la tolerancia a condiciones salinas estresantes (200 mM NaCl) para características como: altura de la planta, área foliar, longitud de la raíz, longitud de la panícula, número de espigas por panícula, número de tallos por planta, entre otras características. Plantas transgénicas de tabaco expresan el gen Rab16A, proveniente de la variedad india de arroz Pokkali, que codifica para una proteína LEA del grupo 2. La expresión del gen está controlada por un promotor inducible por la salinidad, lo que conlleva a una acumulación de la proteína en las hojas de las plantas transgénicas sometidas a este tipo de estrés. Las mismas mostraron un incremento significativo en la tolerancia a la salinidad y tasas de crecimiento sostenidas bajo condiciones estresantes. Adicionalmente mostraron un incremento en la producción de osmolitos tales como azúcares reducidos, prolina y poliaminas. También mostraron una mejor maquinaria antioxidante y un balance mineral más favorable, lo que se reflejó en los reducidos niveles de peróxido de hidrógeno y de peroxidación lipídica, menor pérdida de clorofila, así

como menor acumulación de sodio y mayor acumulación de potasio. Estos resultados establecen el posible papel del gen Rab16A en conferir tolerancia a la salinidad sin afectar el crecimiento y el rendimiento de las plantas transformadas. También sugieren el considerable potencial de los genes que codifican para el grupo 2 de proteínas LEA, para obtener plantas tolerantes a la salinidad a través de la ingeniería genética (Roy-Choudhury, 2007).

HSP

La familia de proteínas Dnak/Hsp70, chaperonas moleculares pueden unirse a otras proteínas en estado no nativo y ayudarlas a alcanzar su conformación funcional, en la mayoría de los casos con gasto de ATP (Boston *et al.*, 1996). Tabaco transgénico transformado con el gen Dnak1, que proviene de la cianobacteria halotolerante *Aphanotese halophytica*, que sobreexpresan estas proteínas en el citosol (Sugino *et al.*, 1999). Después de tres días de tratamiento con 0.6 M de NaCl, la tasa de fijación de CO₂ fue marcadamente mejor en las plantas transgénicas. El contenido de sodio en las plantas control se incrementó después del tratamiento salino, mientras que permaneció constante en las plantas transgénicas.

Se han descrito correlaciones positivas entre los niveles de varias HSP y la tolerancia al estrés (Wang *et al.*, 2004). Zhou y colaboradores (2007) encontraron la inducción de cinco genes homólogos, inducidos por el estrés salino en plántulas de tomate, con funciones de chaperona, entre los cuales se encontraban las HSP (U217418, U218323). Por otro lado se ha estudiado ampliamente el incremento en la expresión de HSP bajo condiciones de estrés abiótico, a través de la genómica funcional y la proteómica, en diferentes especies de plantas (Kore-eda *et al.*, 2004).

Poliaminas

Las poliaminas (PAs) son moléculas nitrogenadas alifáticas presentes en todos los organismos vivos y ubicuas en el reino vegetal (Moschou *et al.*, 2008). En los últimos años se han recopilado numerosas evidencias respecto al rol que estos compuestos juegan en la respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico, y respecto a su función como potenciales compuestos antioxidantes. La diamina putrescina, la triamina espermidina y la tetraamina espermina son las tres principales poliaminas que se encuentran en los organismos vivos. A pH fisiológico se encuentran cargadas positivamente y esta propiedad les permite interactuar con macromoléculas que poseen carga negativa, como el ADN, el ARN, proteínas y fosfolípidos. De esta manera las PAs están implicadas en la regulación de las propiedades físicas y químicas de la membrana, la estructura de los ácidos nucleicos y la modulación de actividades enzimáticas, además de ser reconocidas como esenciales en los procesos de proliferación y diferenciación celular. En las plantas, la putrescina se forma mediante la descarboxilación de la arginina o de la ornitina, reacción catalizada por la arginina descarboxilasa (ADC) o por la ornitina descarboxilasa, respectivamente (Liu *et al.*, 2006).

La diamina putrescina y las poliaminas, espermidina y espermina están presentes probablemente en todas las plantas, mientras que la diamina cadaverina, aparece dentro de la familia *Leguminosae*. En condiciones de salinidad y sequía, las poliaminas y las actividades enzimáticas involucradas en su síntesis se incrementan sustancialmente. Su función en situaciones de estrés salino pudieran ser, estabilizar el ADN mitocondrial y cloroplástico, estimulación de la biosíntesis proteica y estabilización de biomembranas (Roy y Wu, 2000).

En los últimos años se ha utilizado la ingeniería genética para incrementar la biosíntesis de

varias poliaminas específicas, lo que ha posibilitado obtener plantas tolerantes al estrés salino. El aumento en la expresión de la enzima arginina descarboxilasa, induce un incremento significativo en los niveles de putrescina y pequeño incremento en los niveles de espermina y espermidina (Vinocourt, 2005).

Kasubaba y colaboradores (2004) trabajaron para sobreexpresar el ADNc de la enzima espermidina sintasa de *Curcubita ficifolia* en *Arabidopsis thaliana* y obtuvieron elevados niveles de espermidina y consecuentemente un incremento en la tolerancia a varios tipos de estreses.

La acumulación de putrescina durante el estrés ambiental se correlaciona con el incremento de la actividad de la enzima arginina descarboxilasa en avena. Estudios con zanañoria transgénica, que expresa la enzima ornitín descarboxilasa (ODC) mostraron que estas plantas fueron significativamente más tolerantes al estrés salino y a la sequía (Bonhert *et al.*, 1995).

Las poliaminas han ganado importancia en el escape de las plántulas de condiciones adversas. Lin y Kao (1995) señalaron un incremento en los niveles de espermidina en condiciones salinas, pero un bajo nivel de putrescina en el tallo y las raíces de plántulas de arroz. La acumulación de espermidina espermina con el incremento de la actividad de la enzima ADC en plántulas de arroz juega un papel específico en la tolerancia a la salinidad.

Plantas transgénicas de arroz con el ADNc de ADC, mostraron un incremento de la biomasa en condiciones de estrés salino, comparados con las plantas utilizadas como control. Plantas de maíz sometidas a estrés salino durante 8 días incrementan su contenido de putrescina y espermidina en sus raíces y hojas, siendo el incremento en las hojas mayor que el de las raíces (Caldevia *et al.*, 1999).

Síntesis de compuestos osmoprotectores

El ajuste osmótico mantiene el contenido celular de agua cuando se presenta una reducción en el potencial osmótico, como consecuencia de la acumulación de solutos orgánicos en el citoplasma y en la vacuola en situaciones de estrés por salinidad en el suelo (Serraj y Sinclair, 2002). Los solutos compatibles (osmolitos, citosolutos) son metabolitos hidrofílicos, entre los que se destacan azúcares (sacarosa y fructosa), aminoácidos (prolina y betaína), glicerol, manitol y otros metabolitos de bajo peso molecular (Chen y Murata, 2002; Pommerrenig *et al.*, 2007). Los solutos compatibles no interfieren con el metabolismo normal de las células; se acumulan en el citoplasma y en la vacuola en altas concentraciones bajo condiciones de estrés osmótico, tienen un papel primario en el mantenimiento de la disminución del potencial osmótico en el citosol y están involucrados en la estabilidad de proteínas y estructuras celulares (Zhu, 2003; Bartels y Ramanjalu, 2005). En general, son varios los efectos de los solutos compatibles en las plantas: los azúcares, por ejemplo, interactúan con las cabezas polares de los fosfolípidos para prevenir la fusión de la membrana (Chen y Murata, 2002); los aminoácidos, por su parte, pueden actuar como osmolitos en la regulación del transporte de iones y tienen efecto en la síntesis y la actividad enzimática (Ray, 2002).

En los siguientes epígrafes haremos referencia individual a varios compuestos osmoprotectores y cómo sus rutas metabólicas, tanto de síntesis como de degradación, han sido objeto de manipulación a través de la ingeniería genética para la obtención de plantas tolerantes al estrés salino.

Prolina

La prolina es un aminoácido que constituye el compuesto osmoprotector más común que se

acumula en las plantas en respuesta al estrés hídrico y a la salinidad (Chen *et al.*, 2007). Aunque la prolina puede sintetizarse a partir del glutamato o la ornitina, el glutamato es el principal precursor en la síntesis de la prolina, en células osmóticamente estresadas (Hur *et al.*, 2004). La ruta biosintética de la prolina incluye dos enzimas importantes: pirrolín carboxilato sintetasa (P5CS) y pirrolín carboxilato reductasa (Parvaiz y Satyawati, 2008). Los transcritos correspondientes a los ADN complementarios que codifican para estas enzimas, se acumulan en la célula como respuesta al tratamiento con NaCl. Ambos pasos catalíticos son claves para el desarrollo de estrategias para la aumentar la producción de prolina en determinadas plantas. Además, los intermediarios en la biosíntesis y el catabolismo de la prolina, tales como la glutamina y el pirrolín-5-carboxilato, pudieran incrementar la expresión de varios genes regulados osmóticamente en el arroz (Iyer y Caplan, 1998).

La acumulación de prolina se ha provocado en diferentes especies de plantas incrementando su síntesis o impidiendo su degradación, mediante la manipulación de las enzimas P5CS y prolina deshidrogenasa. La sobreexpresión en tabaco del gen P5CS provenientes de frijol mungo resultó en la acumulación de prolina 18 veces más que las plantas control, incrementando la producción de biomasa en condiciones de estrés salino (Kishor *et al.*, 1995)

La expresión del transgén de la enzima P5CS de frijol, bajo el control de un promotor inducible por el estrés, conduce a la sobreproducción inducida por estrés de la enzima P5CS y la acumulación de prolina en plantas transgénicas de arroz. La segunda generación de plantas transgénicas mostraron un incremento en la biomasa bajo estrés salino (Zhu *et al.*, 1998).

La transformación genética de plantas de *Arabidopsis* con la enzima prolina deshidrogenasa antisentido (Mani *et al.*, 2002) o

“knockout” de esta enzima (Nanjo *et al.*, 2003), conllevó al incremento de la acumulación de la prolina libre y a un mejor crecimiento bajo condiciones salinas. En trigo se observa que la actividad de la enzima glucanil kinasa (GK), y las concentraciones de prolina y glicín betaína se incrementan durante el estrés y tienen mayor actividad en los brotes que en las raíces (Nayyar, 2003). En plantas de maíz se observa un incremento considerable en la acumulación de prolina; igualmente, se presenta un incremento en la actividad de la enzima prolina deshidrogenasa (PDH), tanto en maíz como en trigo.

Glicín-betaína

La glicín betaína se sintetiza a partir de la colina en dos pasos, el primero es catalizado por la enzima colina monooxigenasa conduciendo a la síntesis de aldehído de betaína, el cual es posteriormente oxidado por la enzima betaín aldehído deshidrogenasa. El estrés por salinidad induce ambas actividades enzimáticas (Sairam y Tyagi, 2004). Se ha demostrado que la acumulación de glicín-betaína en células de un número de halófitas y bacterias es una respuesta adaptativa a la salinidad. La oxidación de la colina a aldehído de betaína es la ruta biosintética predominante en los organismos productores de betaína (Rhodes y Hanson, 1993). El primer paso difiere entre varios organismos acorde al tipo de enzima. Este paso es catalizado por una flavoproteína-oxidasa (COXEC1.1.3.17) en algunas bacterias y hongos, por una monooxigenasa soluble dependiente de ferredoxina (CMO) en los cloroplastos de plantas superiores, o por una colina deshidrogenasa asociada a membrana pobremente caracterizada (CDHEC1.1.99.1) (Huang *et al.*, 2000).

Se ha informado por Lilius y colaboradores que plantas de tabaco transgénico con un

gen de *E. Coli* que codifica para la enzima colina deshidrogenasa, fueron más tolerantes a condiciones salinas que las plantas sin modificar, la tolerancia se midió como diferencia en el peso seco (Lilius *et al.*, 1996). Li y colaboradores (2003) clonaron el gen de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa proveniente de *Suaeda liaotungensis* y lo utilizaron para mejorar la tolerancia a la salinidad en plantas transgénicas de tabaco.

Por otro lado se ha comprobado que existen evidencias genéticas de que la glicín betaína mejora la tolerancia a la salinidad en cebada y en maíz (Arakawa, 1990). Líneas isogénicas de cebada que contienen diferentes niveles de glicín betaína, muestran diferentes capacidades para el ajuste osmótico.

El gen *cod A*, aislado de la bacteria del suelo *Artrobacter globiformis*, codifica la colina oxigenasa. Esta enzima convierte la colina en glicín betaína. La transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con el gen *codA*, posibilita que las plantas acumulen glicín betaína y se incrementa la tolerancia al estrés salino (Hayashi *et al.*, 1997). Las semillas de estas plantas transgénicas son capaces de germinar en 300 mM de NaCl, mientras las semillas de tipo silvestre no fueron capaces de germinar. Además las plantas transgénicas mantienen la actividad del fotosistema II bajo estrés salino.

Plantas transgénicas de arroz que expresan el gen *codA*, pero con la proteína codificada directamente en los cloroplastos, son más tolerantes que las plantas transgénicas que expresan la enzima en el citosol. Este resultado sugiere que la función protectora de la glicín betaína es más eficiente cuando es producida en el organelo fotosintético.

Otro paso en la síntesis de glicín betaína es catalizado por la enzima betaín deshidrogenasa (BADH). Plantas transgénicas de tabaco que expresan el gen *BADH* acumularon una mayor cantidad de glicín betaína en el

citósol y en los cloroplastos, exhibiendo un incremento en la tolerancia al estrés salino (Holmstrom *et al.*, 2000). También mostraron una disminución de la fotoinhibición durante el estrés salino lo que causó un incremento en el peso fresco relativo, en relación del fenotipo silvestre. Similares resultados de obtuvieron en plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan la enzima BADH de espinaca, en lugar de la BADH de un organismo procariota (Sakamoto *et al.*, 1998).

Los niveles de glicín betaína en especies de la familia *Poaceae* se correlacionan con la tolerancia a la salinidad. Los géneros altamente tolerantes *Spartina* y *Distichlis* acumulan los mayores niveles de glicín betaína, las especies moderadamente tolerantes acumularon niveles intermedios y las especies sensibles acumulan bajos niveles de glicín betaína o no la sintetizan (Sairam y Tyagi, 2004).

Alcoholes- azúcares

Manitol

El polialcohol manitol es una molécula que puede actuar como osmoprotector. Plantas de tabaco transgénico transformadas con el gen *mtID* de *E. Coli*, que codifica para la enzima manitol-1-P deshidrogenasa, acumularon manitol y mostraron un incremento en el crecimiento de las plantas sometidas a estrés salino, en comparación con las plantas control (Tarczynski *et al.*, 1993). Estudios posteriores revelaron que el incremento en el contenido de manitol no fue suficiente para explicar la tolerancia, basándose solamente en el ajuste osmótico por lo que se asignó a esta molécula una posible función antioxidante (Karakas *et al.*, 1997). Plantas de *Arabidopsis* transformadas con el mismo gen, fueron capaces de germinar en presencia de una concentración inhibitoria de sales. Sin embargo, a diferencia de las plantas de tabaco transformadas, las plantas de *Arabidopsis* no toleraron el estrés salino prolongado.

Otros investigadores obtuvieron tres líneas transgénicas de arroz con el mencionado gen *mtID* y demostraron que la biosíntesis y la acumulación de manitol en plantas se correlaciona con la tolerancia al estrés salino de las mismas (Su *et al.*, 1999). Plantas de trigo transgénico con este gen fueron más tolerantes al estrés por sequía y por salinidad (Abebe *et al.*, 2003). Las plantas transformadas mostraron un incremento en la biomasa altura de la planta y número de tallos secundarios. Sin embargo la cantidad de manitol acumulado fue muy pequeña para tener en cuenta su efecto como osmolito y se sugiere que pudiera actuar como desactivador de radicales libres, aunque también pudiera actuar como protectores y estabilizadores de enzimas, o estructuras de membranas que son sensibles a deshidratación o daños inducidos por el exceso de algunos iones (Parvaiz y Satyawati, 2008).

Sorbitol

Este azúcar alcohol de glucosa se encuentra en una variedad de especies, usualmente como constituyente de la semilla. La acumulación de sorbitol se ha reportado en muchas plantas de cultivo (Kuo *et al.*, 1990). En el género *Rosaceae*, su función es servir como carbohidrato de translocación. En la planta halotolerante *Plantago maritima* se ha encontrado en partes vegetativas (Pommering, 2007). En esta planta el incremento de la salinidad de 0 a 400 mol m⁻³ conlleva a un incremento de 8 veces la concentración de sorbitol en los tejidos del tallo y de 100 veces en los tejidos de la raíz. La acumulación de sorbitol en esta planta tiene función osmorreguladora y su acumulación en semillas sugiere que puede contribuir a la tolerancia a la desecación del embrión maduro.

Pinitol-ononitol

Los alcoholes cíclicos pinitol y ononitol se almacenan en una variedad de especies

expuestas a condiciones salinas, o acumuladas en especies tolerantes cuando se exponen a un ambiente salino. Plantas halófitas facultativas tales como *M. crystallinum*, acumulan estos compuestos solamente cuando se someten a estrés hídrico y salino. La ruta sintética propuesta consiste en la metilación del mioinositol para obtener el intermediario ononitol, seguido de la epimerización a pinitol (Sairam y Tyagi, 2004). Se aisló un ADN complementario que codifica para la enzima inositol-metil-transferasa, inducida en plantas de *Mesembryanthemum* por el NaCl (Vernon *et al.*, 1992). Se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco que expresan esta enzima. El crecimiento de las plantas transformadas y sin transformar es similar en ausencia de estrés, pero en presencia de condiciones salinas las plantas transgénicas mostraron ventajas con respecto a las plantas control.

Trealosa

El metabolismo del carbono y los niveles de azúcares específicos se afectan severamente por el estrés abiótico. La trealosa es un disacárido no reductor presente en muchas bacterias y hongos, así como en muchas plantas superiores tolerantes al estrés hídrico. Las funciones que se sugieren para la trealosa son proteger las membranas y proteínas de las células expuestas al estrés hídrico y reducir la agregación de proteínas desnaturalizadas (Parvaiz y Satyawati, 2008).

Pequeños aumentos en los niveles de trealosa en plantas transgénicas conllevan a una mayor tasa fotosintética y a una disminución del daño fotooxidativo durante el estrés. Se supone que la trehalosa protege las biomoléculas del estrés salino y otros tipos de estrés ambientales, por su capacidad reversible de absorción de agua y evitar los daños producidos por la desecación (Pena, 2003).

Plantas que expresan enzimas relacionadas con la síntesis de la trealosa (ots A) mostraron un incremento en la tolerancia a la salinidad (Pilon-Smith *et al.*, 1998). El gen de levadura que codifica la enzima trehalosa-6-P-sintetasa introducido en tabaco y melón mejora la tolerancia al estrés salino, medida como el aumento del crecimiento de la planta. Sin embargo los autores observaron muchos efectos pleiotrópicos en estas plantas transgénicas, lo que sugiere que esta molécula está involucrada en otros procesos fisiológicos de la planta (Borsani, 2003).

Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo

La salinidad como causa del estrés oxidativo

Un efecto secundario de la salinidad es la formación de especies reactivas del oxígeno o radicales libres (Koprivova *et al.*, 2008). Durante la fase luminosa de la fotosíntesis se genera oxígeno molecular. Factores abióticos estresantes que inhiben las funciones del ciclo de Calvin (como la fijación de CO₂ y el consumo de NADPH₂) agravan la situación. El estrés salino induce el cierre de los estomas, limitando la disponibilidad de CO₂ en la célula (Sirichandra *et al.*, 2009) mientras que al mismo tiempo prosigue el transporte electrónico provocado por la luz. La absorción de luz por las hojas excede entonces la demanda de la fotosíntesis, y el exceso de energía de excitación conduce a una sobrerreducción de la cadena de transporte electrónico. En términos moleculares, un desbalance en el consumo del NADPH₂, en la asimilación (durante la fijación del carbono) y la necesidad de la cadena de transporte electrónico de regenerar el aceptor electrónico en el fotosistema I (NADP), puede conducir a la transferencia del electrón a aceptores alternativos. La formación de

especies reactivas del oxígeno se inicia entonces por la reducción univalente del oxígeno, o por la transferencia del exceso de energía de excitación al oxígeno. La transferencia de electrones (uno, dos o tres) conduce a la generación del radical superóxido, peróxido de hidrógeno, o al radical hidroxilo, respectivamente (Mittler, 2002).

En resumen podemos plantear que la secuencia más probable de eventos que ocurren con el incremento de la salinidad es: déficit fisiológico de agua, cierre de los estomas regulados por el ABA, baja disponibilidad de CO₂, sobrerreducción de la cadena de transporte electrónico y finalmente la generación de radicales libres. Esta condición llamada estrés fotooxidativo o estrés oxidativo, es también un término subrayado en la respuesta de las plantas a otros tipos de estrés como la sequía, temperaturas extremas y exceso de luz (Jithesh *et al.*, 2006).

Después del tratamiento estresante con NaCl ocurre el estrés oxidativo en muchas especies de plantas (del Río, 2006). Se ha señalado el papel importante del radical superóxido y el peróxido de hidrógeno en los daños que sufre la planta sometida a estrés salino, en *Vigna unguiculata*, *Vigna catjang* y *Oryza sativa*. Otros estudios han establecido la relación entre el incremento de la capacidad antioxidante y la tolerancia a la salinidad en diferentes especies tales como chícharo, tomate y cítricos (Jithesh *et al.*, 2006). Todos estos estudios confirman que en plantas sometidas a estrés salino existe un desbalance entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la actividad antioxidante, conduciendo a un daño por estrés oxidativo.

Mecanismos de defensa de las plantas frente al estrés oxidativo

Las especies reactivas del oxígeno en ausencia de mecanismos protectores pueden cau-

sar daños serios en diferentes estructuras y funciones celulares (Del Río, 2006). El radical hidroxilo es un radical libre altamente tóxico, capaz de iniciar la peroxidación lipídica y dañar el ADN, las proteínas y otras moléculas pequeñas (Liu *et al.*, 2008). Las plantas por tanto deben ser protegidas adecuadamente por un número de mecanismos antioxidantes para eliminar los radicales libres. Las vías de la planta para enfrentar el estrés oxidativo comprenden dos componentes, los enzimáticos y los no enzimáticos (Dastidar *et al.*, 2006).

Los componentes no enzimáticos son antioxidantes tales como el tocoferol (Liu *et al.*, 2008), carotenoides, ascorbato y glutatión, que son moléculas *scavengers* o desactivadores de radicales libres (Hung *et al.*, 2005). Los componentes enzimáticos comprenden enzimas tales como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa, ascorbato peroxidasa (APX) (Gulen *et al.*, 2008), monohidroascorbato reductasa (MHAR) y glutatión reductasa (GR) (Stafandiari *et al.*, 2007).

Varios grupos de trabajo han desarrollado plantas transgénicas, que sobreexpresan genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo, y en muchos casos se ha logrado corroborar la correspondencia entre la tolerancia a la salinidad y los niveles de compuestos antioxidantes (Kellós *et al.*, 2008). Tanaka y colaboradores examinaron el papel potencial de la enzima SOD en la protección contra el estrés salino. En presencia de altas concentraciones de sal, las plantas transgénicas tuvieron una elevada actividad APX, alrededor de 1.5 veces mayor que las plantas control. La actividad SOD total se mantuvo a niveles elevados. Se encontró que la actividad del fotosistema II y el transporte electrónico en los cloroplastos, fueron mayores en las plantas transgénicas bajo estrés salino comparados con las plantas nativas. Estos resultados sugieren que un incremento en los niveles de APX y SOD, son factores impor-

tantes para la tolerancia a la salinidad en arroz (Tanaka *et al.*, 1999).

Se han obtenido plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan la enzima glutatión-S-transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GRX). Las plantas transformadas mostraron las actividades específicas de GST y GPX dos veces mayor que las plantas sin transformar. No obstante el incremento en el pool de glutatión oxidado, las plántulas transgénicas exhiben un incremento de su tolerancia a la salinidad (Roxas *et al.*, 1997). Se había reportado previamente que la sobreexpresión de la enzima GR en plantas transgénicas conduce a elevados niveles de glutatión reducido, incrementando la tolerancia a la salinidad y al estrés oxidativo en hojas (Fayer *et al.*, 1991). Por tanto podemos plantear que la influencia del estado oxidativo del glutatión en la tolerancia al estrés salino en plantas aún no está determinada.

Una estrategia alternativa para eliminar el daño oxidativo bajo estrés salino podría ser suprimir la producción de especies reactivas del oxígeno. Aunque el papel de la fotorrespiración en condiciones de estrés es todavía muy controversial, pudiera funcionar como una posible ruta de disipación del exceso de energía luminosa (Osmond y Grace, 1995). Numerosos estudios sugieren que el paso limitante en la fotorrespiración es la reasimilación del amonio catalizada por la enzima glutamin-sintetasa cloroplástica GS2 (Wallsgrave *et al.*, 1987). Cuando las plantas de arroz se transformaron con la GS2 (Hashida *et al.*, 2000) acumularon 1.5 veces más GS2 que las plantas control. Estas plantas transgénicas tienen aumentada su capacidad para realizar la fotorrespiración y un incremento en la tolerancia al estrés salino.

El incremento en las actividades de las enzimas SOD, APX, CAT y GR en condiciones de salinidad y de otros tipos de estrés abiótico, y su comparativamente mayor actividad en

genotipos tolerantes de trigo se ha reportado por Sairam y colaboradores (Sairam *et al.*, 1997). El incremento de la actividad de SOD, APX, GR, DHAR, CAT y POX en respuesta al estrés salino, así como su mayor actividad antioxidante en especies y variedades tolerantes se ha reportado por varios investigadores, (Roxas *et al.*, 2000).

Sairam y Srisvastava 2002, reportaron comparativamente mayores actividades de las enzimas Cu/Zn SOD, Fe-SOD, APX y GR en la fracción cloroplástica y la actividad Mn-SOD en la fracción mitocondrial, en genotipos tolerantes de trigo, en respuesta al estrés salino. Otros investigadores reportaron un incremento producido por el NaCl, la expresión de ARNm y en la actividad de las enzimas Mn-SOD, APX, DHAR y GR, en chícharo cultivar Granada, mientras que en el cultivar sensible *Chillis*, no se observaron cambios significativos en los niveles de ARNm ni en la actividad de las enzimas estudiadas (Hernández *et al.*, 2000).

Muy pocos trabajos se han hecho en el desarrollo de plantas transgénicas que sobreexpresen actividad enzimática antioxidante bajo estrés salino (Sairam y Tyagi, 2004). Roxas y colaboradores reportan la sobreexpresión en tabaco de la enzima glutatión-S-transferasa y GPX sometidas a una variedad de estreses. El tratamiento con estrés salino inhibe el crecimiento del genotipo silvestre y causó un incremento en la peroxidación lipídica, mientras que en las plantas transformadas no ocurrió peroxidación lipídica (Roxas *et al.*, 2000). Estudios con arroz transgénico que sobreexpresa la enzima SOD proveniente de levadura mostraron un incremento en los niveles de ascorbato peroxidasa y SOD cloroplástica en las plantas transformadas comparadas con el genotipo silvestre, mostrando a su vez mayor tolerancia a la salinidad.

Otros investigadores han estudiado el papel del sistema de la glioxalasa en la tolerancia

al estrés. El sistema de la glioxalasa es ubicuo en la naturaleza y consiste en dos enzimas, la glioxalasa I y II, que actúan coordinadamente para convertir el 2-oxoaldehído en 2-hidroxiácido, utilizando el glutatón reducido. Su función primaria parece ser, eliminar el metilglioxal, sustrato primario de la glioxalasa I, un compuesto tóxico conocido que disminuye el crecimiento y reacciona con el ADN y las proteínas. Plantas de tabaco se transformaron con ADN complementario de Gly I proveniente de *Brassica Juncea*. Las plantas transgénicas mostraron significativa tolerancia al estrés salino, lo que se correlacionó con el grado de expresión de Gly I. La inducción del gen de la glioxalasa I en respuesta al estrés salino y estrés osmótico, también se observó en tomate (Espartero *et al.*, 1995). Plantas transgénicas que sobreexpresan la glioxalasa mostraron un incremento en la tolerancia a la salinidad.

Papel del ABA en la tolerancia al estrés salino

ABA y la señalización del estrés abiótico

El ABA fue descubierto en la década de 1960, en frutos jóvenes de algodón, inicialmente con el nombre de abscisina. Desde entonces esta hormona se ha encontrado en gran número de especies de plantas. Las funciones del ABA más documentadas son: intervenir en los procesos de maduración de la semilla (Feurtado y Kermode, 2007), adquisición de tolerancia a la desecación, dormancia de la semilla y retardo en su germinación, así como promover el cierre de los estomas. El ABA, en realidad, ayuda a las semillas a sobrepasar las condiciones de estrés y germinar solamente cuando las condiciones son propicias para la germinación y el crecimiento (Himmelbach *et al.*, 2003). El ABA también impide la germinación precoz de embriones prematuros.

Durante el crecimiento vegetativo el ABA es la principal hormona que confiere tolerancia al estrés abiótico, fundamentalmente a la salinidad y la sequía (Mahajan y Tuteja, 2005; Rosado *et al.*, 2006). El cierre estomático, promovido por el ABA, en condiciones de sequía, previene la pérdida de agua del interior de la célula y por tanto el ABA es llamada la hormona del estrés.

Los procesos que activan la síntesis de ABA y la inhibición de su degradación conllevan a la acumulación de ABA. Muchos genes involucrados en la biosíntesis del ABA se han clonado, los cuales incluyen la zeaxantina epoxidasa, conocido como ABA1 en *Arabidopsis* (Mari *et al.*, 1996), 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) (Tan *et al.*, 1997), ABA aldehído oxidasa y ABA3 conocido como LOS 5 (Xiong *et al.*, 2001). La ruta biosintética de esta hormona ha sido completamente dilucidada con la identificación del gen ABA4 que codifica para la enzima neoxantina sintasa, que parece esencial para la biosíntesis de novo del ABA durante el estrés hídrico (North *et al.*, 2007).

Se sabe que la salinidad, así como la sequía y el frío causan un incremento en la biosíntesis y acumulación del ABA, activando genes que codifican para las enzimas que participan en la biosíntesis del ABA, las cuales pueden ser catabolizadas al terminar el estrés. Muchos genes de respuesta al estrés son activados por el ABA, y este a su vez puede estimular la retroalimentación de los genes de su propia biosíntesis, aunque probablemente a través de fosfoproteínas dependientes de calcio (Rodríguez, 2005).

Desde el punto de vista de la tolerancia a la salinidad y otros tipos de estrés la función del ABA, parece ser la regulación del balance hídrico en la planta y la tolerancia al estrés osmótico.

Por otro lado numerosos experimentos indican que existen vías dependientes e inde-

pendientes de ABA para la inducción de los genes relacionados con el estrés abiótico (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). La expresión inducida de ABA frecuentemente depende de la presencia de elementos que actúan en cis llamados ABRE, a los cuales se unen factores de transcripción bZIP conocido como proteínas que unen ABRE (AREB) o factores AREB (Wasilewska, *et al.*, 2008). Análisis genéticos muestran que no está clara la línea divisoria entre las vías dependiente e independiente de ABA.

La aplicación del ABA a las plantas imita el efecto de una condición de estrés. Como muchos tipos de estrés abiótico conducen en última instancia a la desecación de la célula y a un desbalance osmótico, existe un solapamiento entre los patrones de expresión de los genes del estrés después del frío, la sequía, la salinidad y la aplicación del ABA. Esto también sugiere que varias señales del estrés y el ABA comparten elementos comunes en sus vías de señalización, y estos elementos comunes se entrelazan unos con otros para mantener la homeostasis (Leung y Giraudat, 1998).

Se han reportado estudios con numerosos mutantes de *Arabidopsis* deficientes de ABA, nombrados *aba1*, *aba2*, *aba3* (Koornneef *et al.*, 1998) y *aba4* (North, 2007). También se han informado mutantes deficientes de ABA en especies como el tabaco, tomate y maíz (Liotenberg *et al.*, 1999). Sin el tratamiento estresante, el crecimiento de estos mutantes es comparable con el fenotipo silvestre. Bajo estrés salino los mutantes muestran pobre crecimiento (Xiong *et al.*, 2001). Los mutantes sometidos a estrés por sequía se marchitan rápidamente y mueren si el estrés persiste. Mientras que bajo estrés salino los mutantes deficientes de ABA muestran pobre crecimiento.

Los mutantes *abi1* y *abi2* de *Arabidopsis* son dominantes y mostraron insensibilidad al ABA exógeno durante la germinación. Estos

mutantes también exhiben mal funcionamiento de los estomas. Los genes *ABI1* y *ABI2* codifican las enzimas homólogas serina/treonina proteín fosfatasa 2C (Xiong y Zhu, 2001) y pueden tener funciones solapadas.

El papel del ABA en la tolerancia al estrés osmótico es bien conocido (Rock *et al.*, 2000; Zhu, 2002) y también existen varias evidencias del papel del ABA en el control de la homeostasis iónica. Por ejemplo, el contenido de ABA se incrementó ligeramente solamente en las hojas de los cultivares de arroz tolerantes al salinidad versus los cultivares sensibles. Este incremento en el contenido de ABA se acompañó por una mejor razón K/Na (Bhora *et al.*, 1995). También el transporte y la acumulación de K en raíces de plantas superiores está regulado por el ABA. Otros resultados indican que la actividad de los canales de K, regulada por el ABA en raíces de maíz y *Arabidopsis*, que la regulación de K en las raíces es, al menos en parte, mediada por el canal iónico.

Muchas plantas responden a los altos niveles salinos secuestrando iones dentro de la vacuola. Este proceso está mediado por un antiporte vacuolar Na/H que utiliza el gradiente protónico para concentrar iones en contra de su gradiente (Verma *et al.*, 2007). Una caracterización de cinco antiportes de Na/H, mostró que dos transcriptos de ellos, *AtNHX1* y *AtNHX2*, se acumulan en respuesta al ABA. Sin embargo esta acumulación no ocurre en mutantes *aba1-2* indicando que la respuesta al estrés de estos genes depende del ABA (Yokoi *et al.*, 2002). Se han aislado numerosos ADN complementarios que codifican para bombas iónicas de membranas tales como ATPasas y V-ATPasa. La acumulación de estos transcriptos se provoca debido a la salinidad, alguno de ellos siendo regulados por el ABA (Tsiantis *et al.*, 1996). También es importante para la homeostasis iónica el incremento del Ca^{++} citoplasmático libre que es inducido por el ABA, un evento regulado

por la ADP ribosa cíclica (Wu *et al.*, 1997). La identificación de ARNm inducidos por el estrés o por el ABA, que codifican una proteína de membrana que se une al calcio (Fransen *et al.*, 1996) y una fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol en *A. thaliana* (Hirayama *et al.*, 1995), respectivamente, proporcionan evidencia indirecta de la participación del calcio en la señalización del ABA en tejidos vegetativos. El aislamiento del gen RD20, una proteína que une el calcio que está inducida por el ABA y el estrés salino, sugiere una relación entre el estrés salino, el ABA y las vías señalizadoras del calcio.

Como hemos dicho en capítulos anteriores, los genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de prolina, glicín betaína y el el pinito/ononitol, se expresan en varias especies de plantas como respuesta al estrés salino. El gen P5CS, involucrado en la biosíntesis de la prolina a partir del glutamato, se acumula en *Oryza sativa* y *A. thaliana* en respuesta al estrés salino y al ABA (Sairam y Tyagi, 2004).

Algunos de los genes encargados de la respuesta a la salinidad son aquellos que codifican proteínas involucradas en la regulación de otros genes de respuesta a la salinidad. Los genes reguladores son en su mayoría factores de transcripción y proteínas quinasas. En *Arabidopsis thaliana*, la expresión del gen del receptor semejante a proteína quinasa se induce en respuesta a la salinidad y al ABA (Mahajan y Tuteja, 2005).

Otro gen que codifica la fosfolipasa C específica del fosfatidil inositol, se expresa en respuesta a la salinidad y a la sequía. Esta enzima hidroliza el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato, para producir inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) y 1,2-diacilglicerol. El IP3 abre los canales de Ca^{2+} en la membrana del retículo endoplasmático, causando el eflujo de este catión hacia el citoplasma. Este gen

también se expresa en presencia del ABA (Mahajan y Tuteja, 2005).

El IP3 tiene una función crucial en las oscilaciones citosólicas del Ca^{2+} durante la señalización del ABA y el estrés salino. Los análisis de expresión transiente revelaron que el IP3 y los canales de Ca^{2+} , activados por la ADP ribosa cíclica, participan en las oscilaciones citosólicas del Ca^{2+} mediadas por el ABA. Esta hormona induce la expresión y actividad de la enzima ADP ribosil ciclasa, la cual sintetiza la ADPIC. Se ha demostrado además, la relación de una proteína G heterotrimérica, en la transducción de la señal del ABA durante la regulación de las células acompañantes (Chinnusamy *et al.*, 2005)

El análisis genético de los mutantes deficientes de ABA *los5/aba3* y *los6/aba1* de *Arabidopsis* mostró que el ABA juega un papel central en la expresión de genes regulados por el estrés osmótico (Xiong, 2001). La expresión de los genes de respuesta al estrés tales como RD29A, RD22, COR15A, COR47 y P5CS se redujo severamente o se bloqueó completamente en el mutante *los5*; mientras que en *los6*, la expresión de RD29A, RD19, COR15A, COR47, KIN1 y ADH, fue menor que en el fenotipo silvestre. Por tanto se plantea que la vía dependiente de ABA tiene una función esencial en la expresión de los genes de respuesta al estrés osmótico.

Consideraciones finales

La aplicación de la ingeniería genética en el mejoramiento de los cultivos para su tolerancia a la salinidad es decisiva para la producción de alimentos y la seguridad alimentaria de la humanidad. Sin embargo el progreso obtenido en este sentido ha sido limitado, por la carencia de un conocimiento completo de las bases moleculares de la

tolerancia y la poca disponibilidad de genes que confieren tolerancia al estrés.

Aunque el progreso en el mejoramiento de la especies cultivadas para su tolerancia al estrés salino ha sido lento, existen razones considerables para el optimismo. Estas incluyen el desarrollo reciente en el área de la biología molecular vegetal, específicamente el desarrollo de marcadores moleculares (Owuso, 2008), el secuenciamiento de genomas completos de plantas modelo tales como *Arabidopsis*, la disponibilidad de herramientas para la aplicación de la genética reversa, que ofrecen soluciones a las complejas interrogantes que plantea la tolerancia de las plantas al estrés salino (Hussain, 2008).

Desafortunadamente, a pesar de los grandes avances alcanzados, aun permanecen muchas interrogantes por responder, en relación con la respuesta de la planta frente a la salinidad, por lo cual se impone continuar los esfuerzos encaminados a lograr mayores progresos en la comprensión de estos fenómenos, como una vía para la obtención de plantas tolerantes y lograr la disminución de los perjudiciales efectos que la salinidad provoca en la producción agrícola internacional.

Bibliografía

- Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC, 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.* 131: 1748-1755.
- Ahmad I, Larhar F, Stewart GR, 1979. Sorbitol: a compatible osmotic solute in *Plantago maritima*. *New Phytol.* 82: 671-678.
- Amini F, Ehsanpour AA, Hoang QT, Shin JS, 2007. Protein pattern changes in tomato under in vitro salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology.* 54 (4): 464-472.
- Amtmann A, Sanders D, 1999. Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research.* 29: 75-113.
- Anil VS, Krishnamurthy H, Mathew MK, 2007. Limiting cytosolic Na⁺ confers salt tolerance to rice cells in culture: a two-photon microscopy study of SBFI-loaded cells. *Physiologia Plantarum* 129, 607-621.
- Apse MP, Blumwald E, 2002. Engineering salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 146-150.
- Arakawa K, Katayama M, Takabe T, 1990. Levels of betaine and betaine aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves and etiolated leaves and roots of barley. *Plant Cell Physiol.* 31: 797-803.
- Ashrat M, 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science.* 13: 17-42.
- Bargmann BOR, Laxalt AM, Riet B, Schooten B, Merquiol E, Testerink C, Haring MA, Bartels D, Munnik T, 2009. Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell Physiol.* 50(1): 78-89.
- Barkla BJ, Pantoja O, 1996. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology.* 47: 159-184.
- Bartels D, Ramanjulu S, 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Plant Sci.* 24, 23-58.
- Berthomieu PG, Conejero A, Nublát W, Brackenbur C, Lambert C, Savio N, Uozumi S, Oiki K, Yamada, Cellier F, 2003. Functional analysis of At A HKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* 22: 2004-2014.
- Bhora JS, Dooffling H, Dooffling K, 1995. Salinity tolerance of rice with reference to endogenous and exogenous abscisic acid. *J. Agron. Crop. Sci.* 174: 79-86.
- Bohnert HJ, Nebson DW, Jensen RG, 1995. Adaptation to environmental stress. *Plant Cell.* 7: 1099-1111.

- Borsani O, Valpuesta V, Botella MA, 2003. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell and Organ Culture*. 23: 1001-115.
- Boston R, Viitanen P, Vierling E, 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* 32: 191-222.
- Caldevia HDQM, Caldevia G, 1999. Free polyamine accumulation in unstressed and NaCl stressed maize plants. *Agron. Lusit.* 47, 209-215.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C, 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103(4): 551-560.
- Chen MQ, Wei HB, Cao JW, Liu RJ, Wang YL, Zheng CY, 2007 Expression of bacillus subtilis *proBA* genes and reduction of feedback inhibition of proline synthesis increases proline production and confers osmotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40, 396-403.
- Chen T, Murata N, 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Plant Biol.* 5. 250-257.
- Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu J, 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* 45, 437-448.
- Cuartero J, Bolarín MC, Asíns MJ, Moreno V, 2006. Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany*, 57(5): 1045-1058.
- Cuartero J, Yeo AR, Flowers TJ, 1992. Selection of donors for salt-tolerance in tomato using physiological traits. *The New Phytologist*, 121: 63-69.
- Cushman JC, 2001. Osmoregulation in plants: implications for agriculture. *Am. Zool.* 41, 758-769.
- Del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB, 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant. Physiol.* 141: 330-335.
- Demidchik V, Maathuis FJM, 2007. Physiological roles of non selective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist* 18, 387-404.
- Demidchik V, Tester M, 2002. Sodium fluxes through non selective cation in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 128. 379-387.
- Donalson L, Ludidi L, Knigh Mr, Gehring C, Denby K, 2004. Salt and osmotic stress cause rapid increases in *Arabidopsis thaliana* cGMP levels. *FEBS Letters.* 569: 17-320.
- Espinosa-Ruiz A, Belles JM, Serrano R, Culiañez-Macia FA, 1999. *Arabidopsis thaliana* AtHAL3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. *The Plant Journal*, 20: 529-539.
- Estafandiari E, Shekari F, Shekari F, Estafandiari M, 2007. The effect of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. *Not. Bot. Hort. Agobot. Cluj.* 35(1): 48-55.
- Evangelou VP, 1994. Influence of sodium on soils of humid regions. En: *Handbook of Plant and Crop Stress* (M. Pessarakli, ed) Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 31-62.
- Feurtado JA, Kermod AR, 2007. A merging of paths. In *Abscisic Acid and Hormonal Cross-Talk in the Control of Seed Dormancy Maintenance and Alleviation*, Bradford, K, and Nonogaki H, eds (Oxford, UK: Blackwell Publishing), Chapter 8. pp. 176-211.
- Flowers TJ, Colmer TD, 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* 179, 945-963.
- Frandsen G, Muller-Uri F, Nielsen M, Mundy J, Skriver K, 1996. Novel plant Ca(2+)-binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress. *J. Biol. Chem.* 271: 343-348.
- Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, Tanaka H, Miyao A, Hirochika H, Tanaka Y, 2004. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol.* 45, 146-159.

- García M, Medina E, 2003. Crecimiento y acumulación de prolina en dos genotipos de caña de azúcar sometidos a salinización con cloruro de sodio. *Agronomía Colombiana*. 20: 168-179.
- Gimmler H, 2000. Primary sodium plasma membrane ATPases in salt-tolerant algae: facts and fictions. *Journal of Experimental Botany*. 51: 1171-1178.
- Gülen H, Çetinkaya C, Kadyoölu M, Kesici M, Cansev A, Eri A, 2008. Peroxidase Activity and Lipid Peroxidation in Strawberry (*Fragaria X ananassa*) Plants Under Low Temperature. *J. Biol. Environ. Sci.* 2(6), 95-100.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ, 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51: 463-499.
- Hayashi H, Alia Mustardy L, Deshniem P, Ida M, Murata N, 1997. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.* 12: 133-142.
- Hernandez JA, Jimenez A, Mullineaux, Sevilla PF, 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum*) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Biol.* 23: 853-862.
- Himmelbach A, Yang Y, Grill E, 2003. Relay and control of abscisic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 470-479.
- Hirayama T, Ohto C, Mizoguchi T, Shinozaki K, 1995. A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3903-3907.
- Holmstrom KO, Somersalo S, Mandal A, Palva TE, Welin B, 2000. Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J. Exp. Bot.* 51: 177-185.
- Hong B, Barg R, Ho TH, 1992. Developmental and organ-specific expression of an ABA- and stress-induced protein barley. *Plant Mol. Biol.* 18: 663-674.
- Horie T, Yoshida K, Nakayama H, Yamada K, Oiki S, Shinmyo A, 2001. Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *The Plant Journal*, 27, 129-138.
- Huang J, Hirji R, Adam L, Rozwadowski KL, Hammerlindl JK, Keller WA, Selvaraj G, 2000. Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol.* 122: 747-756.
- Hung SH, Yu CW, Lin CH, 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 1-10.
- Hur J, Jung KH, Lee CH, An H, 2004. Stress-inducible *osp5cs2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Science*. 167: 417-426.
- Hussain TM, Chandrasekhar T, Hazara M, Sultan Z, Saleb BK, Gopal GR, 2008. *Biotech. Mol. Biol. Rev.* 3 (1): 8-13.
- Iyer S, Caplan A, 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiol.* 116: 203-211.
- Jithesh MN, Prashanth SR, Sivaprakash KR, Parida AK, 2006. Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *Journal of Genetics*. 85 (3): 237-245.
- Kalampanayil BD, Wimmers LE, 2001. Identification and characterization of salt-stress-induced plasma membrane H⁺-ATPase in tomato. *Plant, Cell and Environment*. 24: 999-1005.
- Kalembe EM, Pukacka S. Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection: a short review. *Biological Lett*, 2007. 44(1): 3-16.
- Karakas B, Ozias-Akins P, Stushnoff C, Suefferheld M, Rieger MJ, 1999. Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant Cell Environ.* 20: 609-616.
- Kasubaba Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara S, 2004. Overexpression of spermidine synthase

- enhances tolerance to multiple environmental stresses and up regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell. Physiol.* 45: 712-722.
- Kellös T, Timár I, Szilágyi V, Szalai G, Galiba G, Kocsy G, 2008. Effect of abiotic stress on antioxidants in maize. *Acta Biologica Szegediensis.* 52(1): 173-174.
- Kishor KB, Hong Z, Miso GH, Hu CA, Verma DP, 1995. Overexpression of D-xylose-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plant. *Plant. Physiol.* 108: 1387-1394.
- Klimecka M, Muszynska G, 2007. Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochimica.* 54(2): 219-233.
- Koornneef M, Leon-Kloosterziel KM, Schwartz SH, Zeevaart JAD, 1998. The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 83-89.
- Koprivova A, North KA, Kopriva S, 2008. Complex signaling network in regulation of adenosine 5'-phosphosulfate reductase by salt stress in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology.* 146: 1408-1420.
- Kore-eda S, Cushman MA, Akselrod I, Bufford D, Fredrickson M, Clark E, Cushman JC. 2004. Transcript profiling of salinity stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Gene.* 27: 83-92.
- Kuo TM, Doehlert DC, Crawford CG, 1990. Sugar metabolism in germinating soybean seeds. *Plant Physiol.* 93: 1514-1520.
- Larcher W, 2003. *Physiological plant ecology.* 4th ed. Springer, Germany. 231 p.
- Laurie E, Feeney K, Maathuis F, Heard P, Brown S, Leigh R, 2002. A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *The Plant J.* 32(2): 139-154.
- Leidi O, Pardo JM, 2002. Tolerancia de los cultivos al estrés salino: qué hay de nuevo. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias, Secretaría de Investigaciones, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, N° II; <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Investigacion/revista/rev2/5.htm>*
- Leung J, Giraudat J, 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 199-222.
- Li QL, Gao XR, Yu XH, Wang XZ, An LJ, 2003. Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda liaotungensis* and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco. *Biotechnol. Lett.* 25: 1431-1436.
- Liljus G, Holmberg N, Bulow L, 1996. Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase.
- Lin CC, Kao CH, 1995. Levels of endogenous polyamines and NaCl inhibited growth of rice seedlings. *Plant Growth Regul.* 17: 15-20.
- Liotenberg S, North H, Marion-Poll A, 1999. Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant. Physiol. Biochem.* 37: 341-350.
- Liu J-H, Nada K, Honda C, Kitashiba H, Wen X-P, Pang X-M, Moriguchi T, 2006. Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response. *J. Exp. Bot.* 57: 2589-2599.
- Liu X, Hua X, Guo J, Qi D, Wang L, Liu Z, Jin Z, Chen S, Liu G, 2008. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing VTE1 for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Lett.* 30: 1275-1280.
- Maathuis FJM, Sanders D, 2001. Sodium uptake in *Arabidopsis* roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiology.* 127: 1617-1625.
- Mahajan S, Tuteja N, 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 444: 139-158.
- Mani S, van de Cotte B, van Montagu M, Verbruggen N, 2002. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to pro-

- line and its analogs in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 128: 73-83.
- Marin E, Nussaume L, Quesada A, Gonneau M, Sotta B, 1996. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 15: 2331-2342.
- Marschner H, 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition. Academic Press Ltd, London.
- Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirsch K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJ, Sanders D, Harper JF, Tchiew J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Gueriot ML, 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 126: 1646-67.
- Mittler R, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
- Moschou PN, Paschalidis KA, Delis ID, Andriopoulou AH, Lagiotis JD, Yakoumakis DI, Roubelakis-Angelakis KA, 2008. Spermidine Exodus and Oxidation in the Apoplast Induced by Abiotic Stress Is Responsible for H₂O₂ Signatures That Direct Tolerance Responses in Tobacco. *The Plant Cell.* 20: 1708-1724.
- Munns R, 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant. Cell. Environ.* 25, 239-250.
- Munns R, Tester M, 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology.* 59: 651-681.
- Munns R, James RA, Lauchli A, 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany.* 57(5): 1025-1043.
- Murata Y, Katsura S, Obi I, Kakutani T, 2000. Alterations in Ca²⁺-binding on plasma membrane after adaptation to salt stress of tobacco cells in suspension. *Plant and Cell Physiology* 41: 1286-1292.
- Nanjo T, Fujita M, Seki M, Kato T, Tabata S, Shinzaki K, 2003. Toxicity of free proline revealed in an Arabidopsis T-DNA tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.* 44: 541-548.
- Nayyar H, 2003. Variation in osmoregulation in differentially drought-sensitive wheat genotypes involves calcium. *Biol.Plant.* 47 (4), 541-547.
- North HM, De Almeida A, Boutin JP, Frey A, To A, Botran L, Sotta B, Marion-Poll A, 2007. The Arabidopsis ABA deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J.* 50, 810-824.
- Owuso K, 2008. Expressed sequence tags (ESTs) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) emerging molecular marker tools for improving agronomic traits in plant biotechnology. *African Journal of Biotechnology.* 7(4): 331-341.
- Parida AK, Das AB, 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 60: 324-349.
- Parvaiz A, Satyawati S, 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants – a review. *Plant Soil Environ.* 54, (3): 89-99.
- Penna S, 2003. Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends Plant Sci.* 8: 355-357.
- Pilon-Smits E, Terry N, Sears T, Kim H, Zayed A, Hwang S, Van Dun K, Voodg E, Verwoerd T, Krutwagen R, Goddijn O, 1998. The Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J. Plant Physiol.* 152: 525-532.
- Pommerrenig B, Papini-Terzi FS, Sauer N, 2007. Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant Physiol.* pp.106-151.
- Ray V, 2002. Role of amino acids in plants responses to stresses. *Biol. Plant.* 45(4), 481-487.
- Rengel Z, 1992. The role of calcium in salt toxicity. *Plant, Cell and Environment*, 15: 625-632.
- Rhodes D, Hanson AD, 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in

- higher plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 357-384.
- Rock CD, 2000. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.* 148: 357-396.
- Rodríguez M, Canales E, Borrás-Hidalgo O, 2005. Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biocnología Aplicada.* 22: 1-10.
- Rodríguez-Navarro A, 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1469: 1-30.
- Rosado A, Amaya I, Valpuesta V, Cuartero J, Botella MA, Borsani O, 2006. ABA- and ethylene-mediated responses in osmotically stressed tomato are regulated by the TSS2 and TOS1 loci. *Journal of Experimental Botany.* 57(12): 3327-3335.
- Roxas VP, Sundus AL, Garrett DK, Mahan JR, Allen RD, 2000. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that over express glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 41: 1229-1234.
- Roy M, Wu R, 2000. Arginine decarboxylase transgene expression and analysis of environmental stress tolerance in transgenic rice. *Plant Sci.* 160: 869-875.
- Roychoudhury A, Roy C, Sengupta DN, 2007. Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous lea gene Rab16A from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress. *Plant Cell Resp.* 26(10): 1839-1859.
- Roychoudhury A, Basu S, 2008. Overexpression of an abiotic-stress inducible plant protein in the bacteria *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (18), pp. 3231-3234.
- Rubio L, Rosado A, Linares-Rueda A, Borsani O, García-Sánchez M, Valpuesta V, Fernandez JA, Botella MA, 2004. Regulation of K^+ transport in tomato roots by the *tss1* locus implications in salt tolerance. *Plant Physiology.* 134: 452-459.
- Rus A, Lee B, Muñoz A, Sharkhuu A, Zhu J, Bresnan R, Hasegawa P, 2004. AtHKT1 facilitates Na^+ homeostasis and K^+ nutrition in planta. *Plant Physiol.* 136, 2500-2511.
- Sairam RK, Srivastava GC, 2002. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long-term salt stress. *Plant Sci.* 162: 897-904.
- Sairam RK, Deshmukh PS, Shukla DS, 1997. Tolerance to drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. *J. Agron. Crop Sci.* 178: 171-177.
- Sairam RK, Tyagi A, 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science.* 86(3): 407-421.
- Sakamoto A, Alia A, Murata N, Murata A, 1998. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant. Mol. Biol.* 38: 1011-1019.
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF, 2002. Calcium at the crossroads of signaling, *Plant Cell* 14 (suppl.) S401-S417.
- Senadheera P, Singh RK, Maathuis FJM, 2009. Differentially expressed membrane transporters in rice roots may contribute to cultivar dependent salt tolerance. *Journal of Experimental Botany Advance Access published April 24, 2009.* 1-11.
- Senthilkumar P, Jithesh MN, Parani M, Rajalashmi S, Praseetha K, Parida A, 2005. Salt stress effects on the accumulation of vacuolar H-ATPase subunit c transcripts in wild rice. *Current Science.* 89(8): 1386-1393.
- Serraj R, Sinclair T, 2002. Osmolyte accumulation: Can it really help increase in crop yield under drought conditions? *Plant. Cell. Environ.* 25, 333- 341.
- Shi H, Lee B, Wu S, Zhu J, 2003. Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol.* 21. 81-85.
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK, 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proceedings National Academy of Sciences USA,* 97: 6896-6901.

- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2): 221-227.
- Sirichandra C, Wasilewska A, Vlad F, Valon C, Leung J, 2009. The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. *Journal of Experimental Botany* 60(5):1439-1463.
- Su J, Chen PL, Wu R, 1999. Transgene expression of mannitol-1-phosphate dehydrogenase enhanced the salt stress tolerance of the transgenic rice seedlings. *Sci. Agric. Sin*, 32, 101-103.
- Sugino M, Hibino T, Tanaka Y, Nii N, Takabe T, Takabe T, 1999. Overexpression of *DnaK* from a halotolerant cyano-bacterium *Aphanothece halophytica* acquires resistance to stress in transgenic tobacco plants. *Plant Sci.* 146: 81-88.
- Sul H, Balderas E, Vera-Estrella R, Golldack D, Quigley F, Zhao C, Pantoja O, Bohnert H, 2003. Expression of the cation transporter McHKT1 in a halophyte. *Plant. Mol. Biol.* 52, 967-980.
- Tan BC, Schwartz SH, Zeevaart JAD, Mc-Carty DR, 1997. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12235-12240.
- Tarczynski M, Jensen R, Bohnert H, 1993. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259: 508-510.
- Tester M, Davenport R, 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91, 503-527.
- Tsiantis MS, Bartholomew DM, Smith JA, 1996. Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H(1) ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J.* 9: 729-736
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, 2006. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 113-122.
- Vera-Estrella R, Barkla BJ, García-Ramírez L, Pantoja O, 2005. Salt stress in *Thellungiella halophila* activates Na⁺ transport mechanisms required for salinity tolerance. *Plant Physiol.* 139: 1507-1517.
- Verma D, Singla-Pareek SL, Rajagopal D, Reddy MK, Sopory SK, 2007. Functional validation of a novel isoform of Na⁺/H⁺ antiporter from *Pennisetum glaucum* for enhancing salinity tolerance in rice. *J. Biosci.* 32(3): 621-8.
- Vernon DM, Bohnert HJ, 1992. A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophytes *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J.* 11: 2077-2085.
- Vijayan K, 2009. Approaches for enhancing salt tolerance in mulberry (*Morus L*) -A review. *Plant Omics Journal.* 2(1): 41-59.
- Vinocur B, Altman A, 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitation. *Curr. Opin. Biotechnology.* 16: 123-132.
- Vitam Vas P, Kosava K, Prasil I, 2007. Proteome analysis in plant stress research. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 43 (1): 1-6.
- Wang SM, Zhang JL, Flowers TJ, 2007. Low-affinity Na⁺ uptake in the halophyte *Suaeda maritima*. *Plant Physiology* 145, 559-571.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A, 2004. Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends. Plant. Sci.* 9: 244-252.
- Wasilewska A, Florina V, Sirichandra C, Redkob Y, Jammesc F, Valona C, Frei N, Leunga F, 2008. An Update on Abscisic Acid Signaling in Plants and More... *Molecular Plant.* 1 (2), 198-217.
- Wu Y, Kuzma J, Marechal E, Graeff R, Lee HC, Foster R, Chua NH, 1997. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in *Arabidopsis* in plants. *Science* 278: 2126-2130.
- Xiong L, Zhu JK, 2001. Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol. Plant.* 112: 152-166.
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho TH, Wu R, 1996. Differential expression *HVA 1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt of salt- stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* 110: 249-257.

- Yeo AR, 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49: 915-929.
- Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM, 2002. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporter in the salt stress response. *Plant J.* 30: 529-539.
- Zhao J, Barkla B, Marshall J, Pittman JK, Hirschi KD, 2008. The *Arabidopsis* cax3 mutants display altered salt tolerance, pH sensitivity and reduced plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 227, 659-669.
- Zhou S, Wei S, Boone B, Levy S, 2007. Microarray analysis of genes affected by salt stress in tomato. *African Journal of Environmental Science and Technology*. Vol. 1 (2): 014-026.
- Zhu JK, 2002. Salt drought stress signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53: 247-273.
- Zhu BC, Su J, Chang MC, Verma DPS, Fan YL, Wu R, 1998. Over expression of a delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Plant Sci.* 139, 41-48.
- Zhu JK, 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124, 941-948.
- Zhu JK, 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Plant Biol.* 6, 441-445.
- (Este artículo científico fue aprobado por el Consejo Editorial del Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov" en fecha 15 de Noviembre de 2008 y no ha sido publicado con anterioridad en ningún tipo de publicación)
- (Aceptado para publicación el 2 de julio de 2009)