

REVISION

Cambios metabólicos y de expresión génica en plantas superiores en respuesta al estrés salino

Valpuesta, V.; Berteli, F.; Pérez-Prat, E.; Corrales, E.; Narasimham, M.; Botella, M.A.; Bressan, R.A.; Pliego, F.; Hasegawa, P.M.

RESUMEN

La salinización del suelo y de las aguas de riego son factores que limitan de forma importante la producción agrícola. Los daños causados por la salinidad en plantas son el resultado tanto del déficit hídrico como del efecto negativo de altas concentraciones salinas. A nivel molecular la exposición a sal inicia cambios en la expresión tanto de nuevos genes como de genes constitutivos. En hojas de tomate hemos encontrado que tanto la actividad como el contenido de proteína enzimática glutamato sintasa dependiente de ferredoxina aumentan significativamente como resultado de la exposición de este tejido vegetal a elevadas concentraciones de NaCl (12 g/l, 12 h). Este cambio se explica por la función esencial de esta enzima en la síntesis del ácido glutámico que es precursor directo de la prolina, sintetizada como soluto osmótico compatible en esta especie. Por otro lado, estudios en cultivos celulares de tabaco adaptados a concentraciones de NaCl de 428 mM muestran un aumento de 2 veces en el nivel de ARN mensajero de una posible Ca^{2+} -ATPasa de retículo endoplásmico. Los cambios observados forman parte de la respuesta de estos tipos celulares para mantener los gradientes iónicos necesarios, intra y extracelulares, que le dan el carácter de tolerancia al medio salino. Los cambios de expresión observados, en tomate y tabaco, constituyen aspectos diversos de la compleja respuesta celular en plantas superiores a las condiciones de estrés impuestas por el entorno salino.

Palabras clave: Estrés salino; prolina; glutamato sintasa; *L. esculentum*; cDNA; mRNA; Ca^{2+} ; ATPasa; cultivos celulares; *N. tabacum* L.

Valpuesta, V.; F. Bertelli; E. Pérez-Prat; E. Corrales; M. Narasimham; M.A. Botella; R.A. Bressan; F. Pliego; P.M. Hasegawa, 1992. Higher plants response to salt stress on metabolic changes and gene expression. Agriscientia, IX Nº 1 : 55-63.

ABSTRACT

Salinity limits agricultural production. The detrimental effects of salinity result from both the water deficit and the specific action of ions. Salt stress initiates molecular events involving the change of expression of unique genes and genes functioning in normal cell metabolism. Exposure of detached tomato leaves to high NaCl concentration (12 g/l, 12 h) resulted in a significant increase of activity and protein ferredoxin-dependent glutamate synthase. This increase may be explained by the role of this enzy-

me in the synthesis of glutamate required for the proline synthesis occurring under salt stress in this plant tissue. On the other hand, NaCl shock of tobacco cells adapted to 428 mM NaCl induced a two-fold increase on the level of a messenger RNA encoding for a putative endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. This change may be related to the maintenance of ion homeostasis in tobacco cells which is critical for their adaptation to saline environment.

The changes reported for tomato and tobacco constitute partial aspects of the complex plant response to salt stress.

V. Valpuesta, F. Berteli, E. Pérez-Prat, E. Corrales y M.A. Botella, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Málaga, España. F. Pliego, Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Málaga, España. M. Narasimham, R.A. Bressan y P.M. Hasegawa, Center for Plant Environmental Stress Physiology, Purdue University, U.S.A.

INTRODUCCION

Los suelos salinos cubren una extensión entre 400 y 900 millones de hectáreas de la superficie del planeta, y una tercera parte del suelo cultivable se considera afectada por la salinidad (Mesoud, 1974). Las soluciones más inmediatas a este problema tales como la reducción de la evaporación o el lavado de las sales del suelo con agua de calidad no son fáciles, ni técnica ni económicamente. Una solución paralela es la obtención de variedades de cultivos tolerantes a altos niveles salinos. Sin embargo, para abordar con éxito un objetivo como éste es esencial conocer exhaustivamente cómo es la respuesta de las plantas, tanto a nivel fisiológico como bioquímico, a una elevada concentración salina en el medio externo. Actualmente sólo se tiene un conocimiento limitado de esta respuesta, a pesar de los numerosos estudios que se han emprendido.

El problema puede definirse como la necesidad de entender las respuestas de las plantas, tanto a nivel metabólico como de expresión génica, a concentraciones no fisiológicas, o fluctuantes, de la concentración salina. El estudio de este problema ha sido abordado por numerosos grupos que han utilizado diferentes especies vegetales como modelos y diversas aproximaciones experimentales. Sus resultados se han recogido en excelentes revisiones (Lüttge and Smith, 1984; Cushman *et al.*, 1990) a las que hay que remitirse. No obstante, para introducir los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, que sólo afectan a aspectos muy específicos de la interacción planta medio salino, hay que hacer algunas consideraciones previas. Así es necesario distinguir entre los estudios dirigidos a conocer

la respuesta inmediata de las plantas a una elevación súbita de la concentración iónica externa, respuesta que normalmente es transitoria y constituye un mecanismo de supervivencia, de aquellos estudios dirigidos a conocer los mecanismos que permiten a una planta desarrollar su ciclo vital a elevadas concentraciones iónicas, respuesta que podría considerarse como permanente. En el primer caso se podría hablar de adaptación inmediata y en el segundo de tolerancia propiamente dicha. Las aproximaciones experimentales y los modelos biológicos estudiados son completamente diferentes y, obviamente, también lo son las conclusiones obtenidas y la significatividad de las mismas. No obstante, ambos procesos ocurren en la naturaleza y han de estudiarse, siendo la información obtenida en cada caso útil y, en cierto modo, complementaria.

En un principio se puede afirmar que la salinidad tiene dos efectos dañinos sobre la fisiología de las plantas, por un lado ocasiona un incremento del potencial hídrico externo y por otro lado hay un efecto específico de los iones en los diferentes procesos metabólicos y fisiológicos. El primer efecto es percibido como un déficit de agua por la planta por lo que provoca en ésta una respuesta semejante a la que se da en el caso de estrés hídrico; el segundo efecto es consecuencia de la elevación de las concentraciones intracelulares de iones en la planta y sería más específica del estrés salino. Mientras que en la naturaleza ambas situaciones de estrés ocurren con frecuencia de forma simultánea, sin embargo experimentalmente es posible simular condiciones de estrés hídrico sin que se dé estrés salino, pero no es cierto lo opuesto. El resultado es que numerosas respuestas de las plantas encontradas en situación

de estrés salino también se han indicado que ocurren en estrés hídrico. Estas consideraciones son importantes a la hora de valorar los resultados habidos en estudios sobre estrés salino.

Cushman *et al.* (1990) de forma acertada han delimitado las respuestas metabólicas que necesitan de estudios fisiológicos con las herramientas de la genética molecular en el caso del estrés salino (Cushman *et al.*, 1990). Estas son 1) Los cambios que ocurren en el metabolismo del carbono para hacerlo más eficiente en las condiciones adversas del estrés, 2) La acumulación de osmolitos compatibles en el interior celular para contrarrestar los gradientes iónicos extra e intracelulares, 3) La capacidad de compartimentación de los iones en orgánulos para evitar sus efectos deletéreos en el metabolismo celular, y 4) Los cambios en el metabolismo energético y el crecimiento de la planta que se producen bajo condiciones de estrés salino.

Los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, y que se resumen en la presente comunicación, se han centrado en dos de estas respuestas. Por un lado se ha estudiado la acumulación de osmolitos compatibles, lo que se ha hecho dentro del contexto de respuesta a corto plazo de las plantas a una elevación rápida de la concentración de NaCl externa. Por otro lado se han abordado los problemas de la compartimentación de iones, y en este caso se ha hecho dentro de un contexto de tolerancia de la planta, es decir en especies que de forma permanente toleran concentraciones de NaCl no fisiológicas para dicha especie.

Acumulación de prolina en hojas de tomate como respuesta adaptativa a elevadas concentraciones externas de NaCl

La síntesis y acumulación de solutos orgánicos es una respuesta común de adaptación de plantas tanto a un déficit hídrico como a un estrés salino. Estos compuestos incluyen aminoácidos como la prolina, pero también se sintetizan compuestos de amonio cuaternario como la glicil-betaína, polialcoholes como el glicerol y el inositol y azúcares como la sacarosa. La síntesis de estos solutos osmóticos compatibles en el caso del estrés salino parece ocurrir de forma que los compuestos no compatibles, iones, son secuestrados en la vacuola en tanto que los compatibles se acumulan fundamentalmente en el citosol (Leigh *et al.*, 1990).

En el caso del tomate se ha encontrado que es la prolina el osmorregulador sintetizado. Este aumento de prolina en respuesta a una elevación en

la concentración de NaCl externa no se ha explicado completamente a nivel metabólico, es decir a nivel de aquellas enzimas alteradas en situación de estrés y cuyo cambios resultan en un mayor contenido intracelular de este aminoácido. De forma general se sabe que el aumento de prolina ocurre tanto como consecuencia de un incremento de su síntesis como por una disminución de su degradación (Rhodes *et al.*, 1986). Sin embargo, los estudios realizados de las enzimas que catalizan los diferentes pasos de las vías biosintética y degradativa de este aminoácido (Figura 1) no han permitido asignar a alguna de ellas una función reguladora, y por tanto responsable directa del aumento neto de prolina producido en estas condiciones de estrés. Sin duda, tal conocimiento abriría una puerta para una posible manipulación del contenido de este aminoácido en aquellas especies cuya tolerancia al estrés salino, e hídrico, requieren un ajuste osmótico eficiente.

De las rutas metabólicas que se conocen como responsables de la síntesis de prolina (Figura 1) se ha demostrado que es la que se inicia en el aminoácido glutamato y no en la ornitina lo que es esencial en situación de estrés osmótico (Rhodes *et al.*, 1986). Se sabe además que el glutamato puede producirse bien por hidrólisis de proteínas,

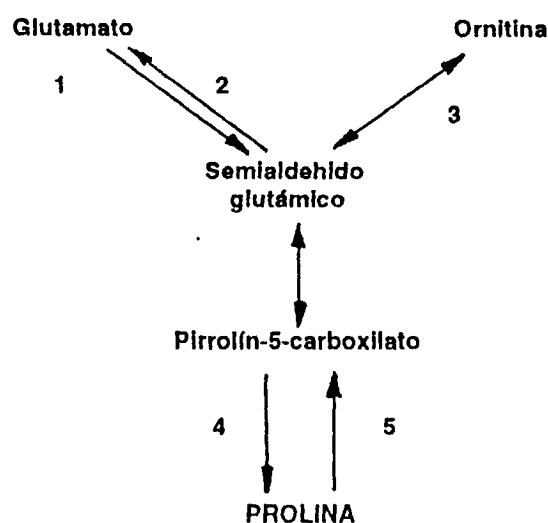


Figura 1. Vías metabólicas de síntesis de prolina. Las enzimas son: 1. Pírrrolín-5-carboxilato (P5C) sintasa; 2. P5C deshidrogenasa; 3. Ornitina aminotransferasa; 4. P5C reductasa; 5. prolina oxidasa

por reacciones de transaminación y por las reacciones catalizadas por el denominado ciclo GS-GOGAT (Figura 2). En hojas de tomate separadas de la planta y tratadas a través del pecíolo con una solución nutritiva que contenía NaCl a concentración de 12 g/l hay un aumento de prolina que es simultáneo a un aumento del total de aminoácidos (Tabla 1), mientras que el contenido de proteínas totales aumenta a las 6 horas, y a las 24 horas permanece en los valores iniciales. Consecuentemente la disponibilidad de glutamato, necesaria para la síntesis de prolina, no puede explicarse por la hidrólisis de las proteínas o por transaminación a partir de otros aminoácidos. Esta síntesis debe ser consecuencia de un incremento del flujo a través del ciclo GS-GOGAT (Figura 2).

El ciclo GS-GOGAT lo constituyen dos enzimas, glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT). Es una vía metabólica muy estudiada al catalizar un proceso tan esencial como es la incorporación de nitrógeno inorgánico, amonio, a esqueletos carbonados para formar nitrógeno orgánico, glutamato (Lea *et al.*, 1990). En aquellos tejidos donde la producción de amonio es importante, como ocurre durante la fijación de nitrógeno en nódulos y la fotorrespiración en te-

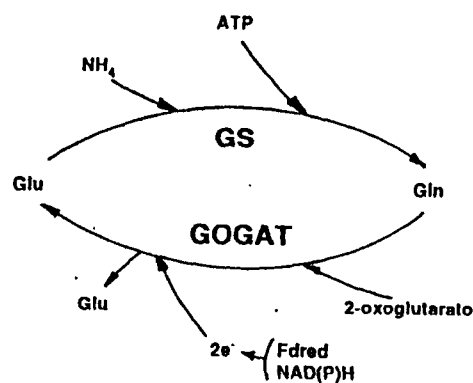


Figura 2. Ciclo GS (glutamina sintetasa)- GOGAT (glutamato sintasa) para la asimilación de NH_4 en plantas superiores.

Tabla 1. Cambios en el contenido de prolina, del total de aminoácidos, de proteína y en el peso fresco de hojas cortadas de tomate y tratadas con NaCl (12 g/l) durante 24 horas.

Hojas de tomate cortadas por el pecíolo fueron introducidas en 10 ml de una solución de nutrientes estándar, que contenía sacarosa 50 mM y glutamato 1 mM. Los tratamientos salinos se hicieron por adición de NaCl hasta una concentración final de 12 g/l y el tratamiento se prolongó durante 24 horas. La determinación de aminoácidos se hizo en extracto metanólico de las hojas después de su separación por HPLC. Las proteínas se determinaron por el método de Bradford en el extracto de hojas obtenido en tampón.

	TIEMPO DE TRATAMIENTO (HORAS)				
	Control			NaCl	
	0	6	24	6	24
Prolina (umoles/gpf)	0.4	0.5	2.4	1.1	4.3
Aminoácidos totales (umoles/gpf)	2.5	1.8	4.4	3.3	7.7
Proteínas (mg/gpf)	10.1	13.1	9.7	15.8	9.5
Peso fresco (% control 0 h)	100	—	108	—	85

Tabla 2. Valores medios de actividades glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa dependiente de ferredoxina (Fd-GOGAT) en hojas cortadas de tomate y tratadas con 12 g/l de NaCl.

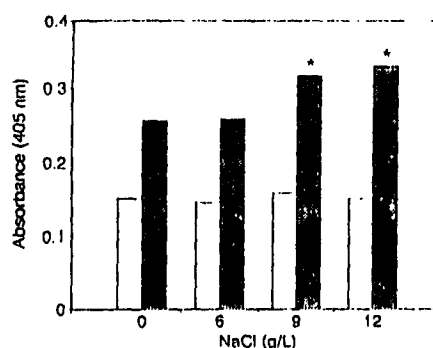
Extractos crudos de hojas introducidas por el peciolo en la solución tratamiento fueron ensayados para las actividades enzimáticas GS y Fd-GOGAT. La actividad GS se midió por el ensayo hidroxamato sintetasa y la actividad GOGAT por cuantificación del glutamato producido en la reacción usando metil viológeno como donador de electrones.

	Tiempo tratamiento (h)		
	0	6	24
GS (U/mg prot)			
Control	0.26 ± 0.08	0.26 ± 0.05	0.27 ± 0.05
NaCl	0.26 ± 0.08	0.16 ± 0.03	0.21 ± 0.02
Fd-GOGAT (U/mg prot)			
Control	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.01
NaCl	0.03 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01

jididos verdes, este ciclo está muy regulado, fundamentalmente a nivel de la primera enzima GS pues es la que tiene al amonio como sustrato (Edwards and Coruzzi, 1989).

El estudio en hojas de tomate del efecto del NaCl en las enzimas del ciclo muestra que el incremento producido en prolina se corresponde con un incremento de la actividad GOGAT en este tejido, concretamente la dependiente de ferredoxina al tratarse de un tejido verde, pero no hay alteración de la actividad GS (Tabla 2).

La cuantificación de la actividad enzimática en un extracto vegetal da una información fisiológica limitada, por tanto es importante conocer si el cambio en actividad se corresponde con un cambio en la cantidad de proteína. La disponibilidad de anticuerpos policlonales de conejo monoespecíficos frente a la enzima Fd-GOGAT de tomate (Botella *et al.*, 1988) permitió comprobar mediante reacción de éstos con la proteína transferida a filtros de nitrocelulosa si se producía un aumento de la cantidad de proteína Fd-GOGAT en hojas de tomate como resultado del tratamiento con sal. Efectivamente fue así y dicho incremento se pudo cuantificar utilizando los mismos anticuerpos y la técnica del ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 3 donde se comprueba que el tratamiento con concentraciones crecientes de NaCl a cultivos hidropónicos de tomate ocasiona un aumen-

**Figura 3.** Cuantificación por ELISA del aumento de la proteína Fd-GOGAT en hojas de tomate de plantas creciendo en cultivo hidropónico después de la adición de NaCl.

Extractos de hojas creciendo en cultivo hidropónico y tratadas durante 12 h bajo luz continua con concentraciones crecientes de NaCl en el medio de cultivo, solución de Hoagland II diluida 2 veces, se utilizaron para cuantificar la proteína Fd-GOGAT por la técnica del ELISA utilizando como anticuerpos primarios los de conejo monoespecíficos frente a esta proteína. Las barras blancas corresponden al control con el suero no inmune.

to de la proteína Fd-GOGAT en las hojas de las plantas tratadas.

Estos resultados muestran por primera vez cómo una proteína enzimática implicada en la vía

metabólica que conduce a la síntesis de prolina incrementa sus niveles estacionarios como resultado del tratamiento con NaCl. El hecho de que sea esta enzima y no la otra del ciclo, la GS, la que esté regulada en esta situación de estrés puede explicarse en base a 1) su actividad es 10 veces inferior a la GS lo que la hace más idónea para su regulación, habida cuenta que en una vía metabólica determinada son aquellas enzimas con la menor actividad las candidatas a ser reguladoras del flujo y, por tanto, posibles puntos de regulación, y 2) en las condiciones de estrés salino el flujo a través del ciclo GS-GOGAT debe incrementarse no tanto para asimilar más amonio como para producir más glutamato que es utilizado en la síntesis de prolina necesitando para ello de esqueletos carbonados que se incorporan en forma de 2-oxoglutarato precisamente en la reacción catalizada por esta enzima Fd-GOGAT.

Si es la única enzima reguladora de la vía metabólica que conduce hasta prolina es difícil de afirmar, más bien podría pensarse que comparte la regulación del flujo de esta vía en unión con otras enzimas de acuerdo con los modelos de control de regulación de flujos metabólicos (Kacser, 1987), donde usualmente el control del flujo metabólico en una determinada vía es compartido por varias enzimas de la ruta metabólica. Lo que sí explica este cambio detectado en la actividad y enzima Fd-GOGAT es la necesidad de glutamato y energía lumínica necesarias para que haya síntesis de prolina inducida por estrés salino, tal como han indicado con anterioridad otros autores (Rajagopal, 1977).

Cambios en la expresión de Ca^{2+} -ATPasa en células de tabaco tolerantes a NaCl

Otra situación metabólica abordada en nuestros estudios es la de la compartimentación de iones en respuesta al estrés salino. El problema metabólico es diferente, y también lo es el modelo experimental utilizado, que en este caso fueron células de tabaco en suspensión adaptadas a una concentración en NaCl de 428 mM. El contexto es por tanto de tolerancia y no de respuesta adaptativa a corto plazo.

La adaptación de cultivos celulares de tabaco hasta una concentración de 428 mM de NaCl (Binzel, 1985) constituye un modelo adecuado para estudiar los factores que determinan su tolerancia. En estas líneas celulares tolerantes se había descrito que el secuestro y compartimentación de iones constituía una de las estrategias desarrolladas por el cultivo y que precisamente les confería

la tolerancia. En efecto, las células de tabaco creciendo a una concentración de NaCl de 428 mM acumulaban Na^+ y Cl^- en vacuola hasta unas concentraciones de 780 y 624 mM, respectivamente, mientras que la concentración citosólica de estos iones se mantenía 96 mM (Binzel, 1988).

La capacidad de controlar los niveles citosólicos de iones implica a numerosos componentes de la membrana plasmática y el tonoplasto, considerándose que es el gradiente electroquímico de iones la principal fuente de energía que dirige el transporte de solutos a través de las membranas plasmática y vacuolar (Reinhold, 1990). Las principales bombas que generan el gradiente electroquímico de protones son las H^+ -ATPasas de membrana plasmática y tonoplasto. Las primeras pertenecen al grupo denominado tipo V en tanto que las segundas pertenecen al grupo denominado tipo E_1-E_2 o tipo P. Incluidas en este grupo se encuentran las Ca^{2+} -ATPasas de membrana plasmática y de retículo sarcoplásmico. La hipótesis era que la acumulación de iones y solutos orgánicos descritas en las células de tabaco adaptadas a NaCl (Binzel, 1988), que es esencial para la adaptación y crecimiento de estas células al entorno salino, podría resultar de un cambio en la regulación de la actividad o en la cantidad de proteína de estas ATPasas.

El análisis de secuencias de aminoácidos de las ATPasas tipo P indicó que existían dominios comunes a todas ellas (Serrano, 1989), fundamentalmente los que se encuentran implicados en la fosforilación de la enzima, que es un paso obligado del mecanismo de reacción de estas enzimas, y en la unión del sustrato. Así el uso de un oligonucleótido sintético complementario del que codifica el dominio **MTGDGVNDA**, altamente conservado y responsable de la unión al ATP en estas ATPasas, permitió cribar una clonoteca de cDNA en el vector lambda gt11 construida a partir de células de tabaco adaptadas a NaCl.

Esta aproximación permitió aislar un clon de cDNA cuyo inserto de tamaño aproximado de 1.5 kb reunía las siguientes características: 1) La secuencia de aminoácidos deducida para el péptido correspondiente presentaba la mayor identidad (69%) con la Ca^{2+} -ATPasa de retículo endoplásmico de *Drosophila* y *Artemia* (Figura 4). 2) Hibridaba con un único mensajero de tamaño de 4.4 kb presente tanto en las células de tabaco en suspensión como en raíz, tallo y hoja de plantas de tabaco. 3) Los niveles de estos mensajeros eran superiores, 3-4 veces, en células adaptadas a NaCl y se inducían hasta 2 veces por

	* * *
pH27	QDIVRLKEDGEVAMTGDGVNDAPALKLADIGIAMG
Artemia	SK..EY.QGM..IS.....K.E.....
SERCA1b	SK..EY.QSYD.IT.....K.E.....
SERCA2a	SK..EF.QSFD.IT.....K.E.....
SERCA3	SR..EN.QSFN.IT.....K.E.....
PMCA1	GI.DSTVS.QRQ...V...T..G...K..V.F...

Figura 4. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida para el clon de cDNA aislado a partir de células de tabaco, en el dominio correspondiente a la unión del ATP, con las secuencias de otras Ca^{2+} -ATPasas. La secuencia codificada por el clon aislado de células de tabaco tolerantes a NaCl (pH 27) se compara con la de una Ca^{2+} -ATPasa de retículo endoplásmico de *Artemia*, las tres clases identificadas en mamíferos para Ca^{2+} -ATPasa de retículo endoplásmico (SERCA1b, SERCA2a, SERCA3) y la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de cerebro de rata. Aminoácidos idénticos al pH 27 se indican por un punto (*). Se indica el dominio conservado de unión al ATP (—) así como los aminoácidos implicados en la unión al ATP (*).

un tratamiento con NaCl, pero sólo en las células adaptadas a esta sal (Figura 5).

Así pues la tolerancia al NaCl en células de tabaco va acompañada de un mayor nivel de transcritos de una Ca^{2+} -ATPasa, probablemente de retículo endoplásmico, y una inducción de la misma por tratamiento con NaCl. Es importante indicar que el efecto de inducción por NaCl sólo ocurre en un momento del ciclo celular, día 12, cuando el cultivo se encuentra en su fase lineal del crecimiento.

Estos resultados suponen un cambio cualitativo en los encontrados hasta ahora en la bibliografía sobre estrés salino en la medida que se aportan datos moleculares del sistema de transducción de señales en plantas superiores. El Ca^{2+} es un segundo mensajero en el sistema de transducción de señales en plantas (Pérez-Prat *et al.*, 1992) y como tal necesita un control fino de su concentración citosólica, que debe mantenerse en el rango submicromolar. En el control de los niveles de Ca^{2+} intervienen los diversos sistemas de transporte de este ion en la membrana plasmática y sistema de endomembranas. La entrada de Ca^{2+} a la célula parece ocurrir de forma pasiva y las concentraciones citosólicas se mantienen bajas por su transporte al exterior (Ca^{2+} -ATPasa y antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$) o su secuestro en retículo endoplásmico (Ca^{2+} -ATPasa) y vacuola (Ca^{2+} -ATPasa y antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$). Los cambios observados en el clon aislado H27, que corresponde a una Ca^{2+} -ATPasa de retículo endoplásmico están directamente relacionados con el control de los ni-

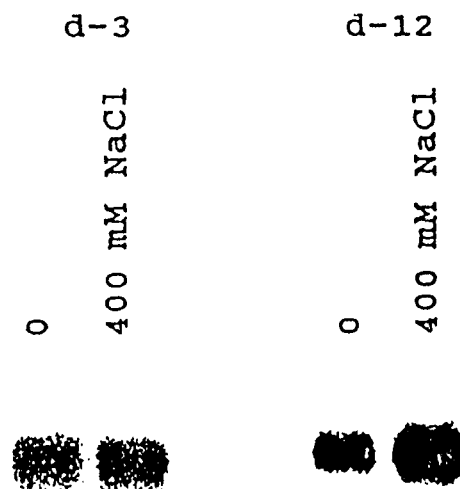


Figura 5. Hibridación del inserto del clon de cDNA aislado de células de tabaco (pH 27) con RNA de células de tabaco tolerantes al NaCl y tratadas con NaCl.

Células de tabaco tolerantes a 428 mM de NaCl, pero mantenidas en ausencia de NaCl, se expusieron a 400 mM de NaCl durante 24 h bien a los 3 días (d-3, fase de latencia) o 12 días (d-12, fase exponencial tardía de crecimiento) después de la inoculación en medio fresco. El RNA total (10 ug) aislado a partir de estas células se analizó por hibridación con el inserto del clon H27.

veles citosólicos de este ion, al ser esta proteína de membrana responsable del transporte de Ca^{2+} desde el citosol al interior del retículo.

Se sabe además que la exposición a sal eleva la concentración citosólica de Ca^{2+} (Laüchli, 1990) que debe reducirse hasta aquellos niveles que exigen un funcionamiento normal del proceso de transducción de señales mediado por el Ca^{2+} en las células vegetales. Por tanto, el mantenimiento de unos niveles citosólicos de Ca^{2+} controlados es esencial en muchos procesos metabólicos celulares, incluyendo la adaptación a altas concentraciones de NaCl, y de aquí los cambios detectados por nosotros en células de tabaco tolerantes.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El estudio de la respuesta de las plantas a una situación de estrés salino no es fácil habida cuenta de que se trata de una situación fisiológica compleja. Esta complejidad es consecuencia fundamentalmente de dos características inherentes a la propia respuesta de las plantas. Una es que se trata de una respuesta con frecuencia **sistémica**, es decir que implica al organismo en su totalidad con sus diferentes tejidos y tipos celulares. La otra característica es que se trata de una respuesta **multigénica**, es decir afecta a la expresión de numerosos genes. De esta forma los resultados aportados por nuestro grupo de trabajo, aunque significativos, no dejan de ser parciales en la línea más reduccionista de la Bioquímica y la Biología Molecular. Su interpretación, por tanto, debe hacerse teniendo presente la información aportada por los fisiólogos y su posible alcance práctico debe contrastarse con opinión de genéticos y mejoradores. Es importante conocer el alcance limitado de la información aportada por la aproximación molecular, sin duda poderosa en sus herramientas pero incompleta en sus conclusiones fisiológicas.

Con todo, hay que indicar que existen aún aspectos moleculares en los que la información actualmente asequible es mínima, si no inexistente. El primer aspecto es el de la **recepción** del estímulo externo por parte de la planta. La importancia de la información que suministraría es paralela a la dificultad metodológica para obtener dicha información. El otro aspecto también bastante desconocido concierne a la cadena de **transducción** de señales, es decir todo el conjunto de segundos mensajeros que conectan y regulan la conexión de la señal externa con la respuesta génica. En la medida en que se posea información sobre estos dos aspectos, se podrá tener un conocimiento más completo de la respuesta de la planta y podrá pensarse en la posi-

bilidad de manipulación genética para la mejora en su respuesta a este estrés.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido parcialmente financiada por la DGICYT, Proyecto AGR91-0858CO2-01, España.

BIBLIOGRAFIA

- Massoud F.I. 1974. Salinity and alkalinity as soil degradation hazards. FAO/UNEP. Expert Consultation on Soil Degradation. FAO. Rome.
- Lüttge U., J.A.C. Smith, 1984. Structural, biophysical, and biochemical aspects of the role of leaves in plant adaptation to salinity and water stress. *En*: R.C. Staples, G.H. Toenniessen, eds. Salinity Tolerance in Plants. John Wiley & Sons, New York, pp. 125-150.
- Cushman J.C., E.J. DeRocher, H.J. Bohnert, 1990. Gene expression during adaptation to salt stress. *En*: F.J. Katterman, ed.. Environmental Injury to Plants Academic Press, New York, pp. 173-203.
- Leigh R.A., N. Ahmad, R.G. Wyn Jones, 1981. Assessment of glycinebetaine and proline compartmentation by analysis of isolated beet vacuoles. *Planta* 153: 34-41.
- Rhodes D., S. Handa, R.A. Bressan, 1986. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiol.* 82: 890-903.
- Lea P.J., S.A. Robinson, G.R. Stewart, 1990. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate, and asparagine. *En*: P.K. Stumpf, E.E. Conn, eds., The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise, vol. 16. Academic Press, San Diego, pp. 121-159.
- Edwards J.W., G.M. Coruzzi, 1989. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Cell* 1: 241-248.
- Botella J.R., J.P. Verbelen, V. Valpuesta, 1988. Immunocytolocalization of ferredoxin-GOGAT in the cells of green leaves and cotyledons of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* 87: 255-257.
- Kacser H. 1987. Control of metabolism. *En*: P.K. Stumpf, E.E. Conn, eds., The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise, vol. 11. Academic Press, San Diego, pp. 39-67.
- Rajagopal V., V. Ralabramanian, S.K. Sinha, 1977. Diurnal fluctuations in relative water content, nitrate reductase and proline content in water-stressed and non-stressed wheat. *Physiol. Plant.* 40: 69-71.
- Binzel M.L., P.M. Hasegawa, A.K. Handa, R.A. Bressan, 1985. Adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 79: 118-125.
- Binzel M.L., F.D. Hess, R.A. Bressan, P.M. Hasegawa, 1988. Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* 86: 607-614.

- Reinhold L., Y. Braun, M. Hassidim, H.R. Lerner, 1990. The possible role of various membrane transport mechanisms in adaptation to salinity. *En: J.H. Cherry, ed., Biochemical and Physiological Mechanisms Associated with Environmental Stress Tolerance*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 24-31.
- Serrano R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 40: 61-94.
- Pérez-Prat E., M.L. Narasimham, M.L. Binzel, M.A. Bottella, Z. Chen, V. Valpuesta, R.A. Bressan, P.M. Hasegawa, 1992. Induction of a putative Ca^{2+} -ATPase mRNA in NaCl adapted cells. *Plant Physiol.* (En prensa).
- Laüchli A. 1990. Calcium, salinity and the plasmamembrane. *En: R.T. Leonard, P.K. Hepler, eds., Calcium in Plant Growth and Development*. ASPP, pp. 26-35.