

Tolerancia de los cultivos al estrés salino: qué hay de nuevo

LEIDI Eduardo O. **PARDO** José M.

Departamento de Biología Vegetal, **Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla**,
CSIC, Avda. Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, España.
E-mail: leidi@irnase.csic.es

Resumen

La salinidad es un problema grave en muchas zonas áridas, donde el riego ha ido aumentando paulatinamente la concentración de sales solubles en el suelo y reduciendo el potencial productivo de muchos cultivos. La salinidad puede inhibir la germinación y el crecimiento de las plantas, reduciendo el rendimiento o la calidad del producto. Esta revisión resume parte del conocimiento acumulado durante varias décadas sobre los principales efectos de la salinidad en los cultivos y los últimos avances en el estudio de los mecanismos de tolerancia, que han dado lugar a nuevas alternativas para reducir el impacto negativo de la salinidad en la producción agraria.

Palabras clave:

absorción, agua, homeostasis iónica, osmoregulación, salinidad, tolerancia

Crop tolerance to salinity: what is new?

Summary

Salinity is a major problem in arid areas of the world where irrigation has been increasing soluble salt concentration in the soils and reducing crop productivity. Salinity inhibits seed germination, reduces plant growth limiting crop yield, and affects crop quality. This article summarizes the research carried out on physiology of crops under salt stress and the latest advances in the study of basic mechanisms of adaptation and their biotechnological applications for reducing the negative impact of salinity in crop productivity.

Key words:

ion homeostasis, osmoregulation, salinity, salt-tolerance, uptake, water

Introducción

Los problemas por salinidad aparecen cuando se concentran sales solubles procedentes del regadío en suelos productivos, proceso que se denomina salinización secundaria. Este fenómeno afecta a la Humanidad desde el inicio de la Agricultura, y existen registros históricos de migraciones provocadas por la salinización del suelo cultivable. La actividad antrópica ha incrementado la extensión de áreas salinizadas al ampliarse las zonas de regadío con el desarrollo de grandes proyectos hidrológicos, que han provocado cambios en el balance de agua y sales de los sistemas hidrogeológicos. La proporción de suelos afectados por salinidad se cifra en un 10% del total mundial, y se estima que entre 25 y 50 % de las zonas de regadío están salinizadas (Rhoades *et al.*, 1992). Los problemas de anegamiento y salinización secundaria son importantes en las zonas de regadío por uso de agua en exceso, ya sea por sistemas de riego poco eficientes, sistemas de distribución defectuosos o malas prácticas de riego. Con frecuencia, menos del 60% del agua aplicada se emplea en transpiración del cultivo (Jensen *et al.*, 1990). El incremento paulatino de la salinidad del suelo o la necesidad de emplear aguas de riego con una concentración de sales superior a la aconsejada limita el potencial de producción de los cultivos, en su mayoría especies glicófitas seleccionadas por su rápida tasa de crecimiento y alto rendimiento (Maas, 1986). Además de la limitación en la disponibilidad de agua, la salinidad afecta las propiedades estructurales y físico-químicas del suelo, que pueden imponer un estrés adicional al crecimiento de los cultivos (Evangelou, 1994).

En las zonas afectadas por salinidad, la principal solución ha sido la sustitución

de cultivos sensibles por otros más tolerantes. Las técnicas de lavado de suelos han reducido el problema en algunos países, pero los costos de esta tecnología no están siempre al alcance de otros, por lo que se ha recurrido al empleo de cultivos con mayor tolerancia, como remolacha azucarera, cebada, algodón, etc., para reemplazar cultivos tradicionales (Shannon, 1997). Sin embargo, esta opción puede no tener interés por problemas de mercado, particularidades climáticas o necesidades nutricionales de la población, por lo que resulta más importante disponer de variedades tolerantes en los principales cultivos (arroz, trigo, soja, hortalizas, etc.). Esta necesidad es aún mayor cuando la calidad del agua de riego es menor, por las prioridades establecidas (consumo humano y actividad industrial) en casos de sequía.

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 producción de organismos modificados genéticamente. 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 (Ashraf, 1994; Shannon, 1997; Yeo, 1998), o bien la incorporación de genes cuya expresión modifica mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados en la tolerancia (Jain y Selvaraj, 1993; Yeo, 1998; Hasegawa *et al.*, 2000).

La salinidad afecta el crecimiento y producción de los cultivos al reducir el potencial hídrico de la solución del suelo, disminuyendo así la disponibilidad de agua, y al crear un desequilibrio nutritivo dada la ele-

vada concentración de elementos (Na^+ , Cl) que pueden interferir con la nutrición mineral y el metabolismo celular. 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 de estrés hídrico, toxicidad iónica y desequilibrio nutricional.

Para conseguir la adaptación 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. 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 (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.

A continuación se describen con más detalle algunos de los aspectos más estudiados en los últimos años relacionados con la respuesta a salinidad. Dada la gran cantidad de información disponible, esta revisión no pretende ser exhaustiva, y remite al lector interesado en cuestiones específicas a las revisiones que tratan el tema desde perspectivas agronómicas (Wyn Jones y Gorham, 1983a; Maas, 1986;

Ashraf, 1994; Shannon, 1997), ecofisiológicas (Flowers *et al.*, 1977; Greenway y Munns, 1980; Yeo, 1983; Grattan y Grieve, 1994; Jacoby, 1994) y bioquímicas (Yeo, 1998; Hasegawa *et al.*, 2000).

Absorción de agua.

Uno de los efectos más evidentes del estrés salino es la reducción en la capacidad de absorción de agua, que se puede manifestar como los efectos del estrés hídrico: reducción de expansión foliar y pérdida de turgencia. Una célula vegetal expuesta a un medio salino equilibra su potencial hídrico perdiendo agua, lo que produce la disminución del potencial osmótico y del de turgencia. Esta situación genera señales químicas (aumento del Ca^{2+} libre intracelular, síntesis de ABA, etc.) que desencadenan posteriores respuestas adaptativas (Hasegawa *et al.*, 2000). Durante el proceso de ajuste se produce la acumulación de solutos orgánicos e inorgánicos que reducen el potencial osmótico celular (Wyn Jones y Gorham, 1983b), y la reducción en la conductividad hidráulica de las membranas, posiblemente por disminución del número o apertura de los canales de agua (acuaporinas) (Cervajal *et al.*, 1999). Una vez recuperada la turgencia, se puede restablecer el crecimiento (Jacoby, 1994). Los cambios macroscópicos que se observan bajo condiciones de salinidad, como reducción del área foliar y de la relación parte aérea/raíz, entre otros cambios también reflejan el ajuste necesario para recuperar el balance hídrico. Por la importancia de los flujos hídricos en los procesos de ajuste osmótico celular, la actividad de las acuaporinas debe jugar un papel clave entre los mecanismos de adaptación al estrés (Maurel y Chrispeels, 2001). En *Arabidopsis*, el estrés salino produce la activación del gen que codifica una proteí-

na homóloga a la acuaporina de tonoplasto (Pih *et al.*, 1999). Algunos autores (Maurel *et al.*, 1997) han sugerido que la regulación de las acuaporinas de plasmalema y tonoplasto tendría un papel en los procesos de osmoregulación celular. Frente al estrés salino se observa el aumento de succulencia (Ashraf, 1993; Leidi y Sáiz, 1994; Reimann y Breckle, 1995), adaptación desarrollada aparentemente más para la reducción de la pérdida de agua que para el mantenimiento de la actividad fotosintética (Fischer y Turner, 1978; Longstreth y Nobel, 1979).

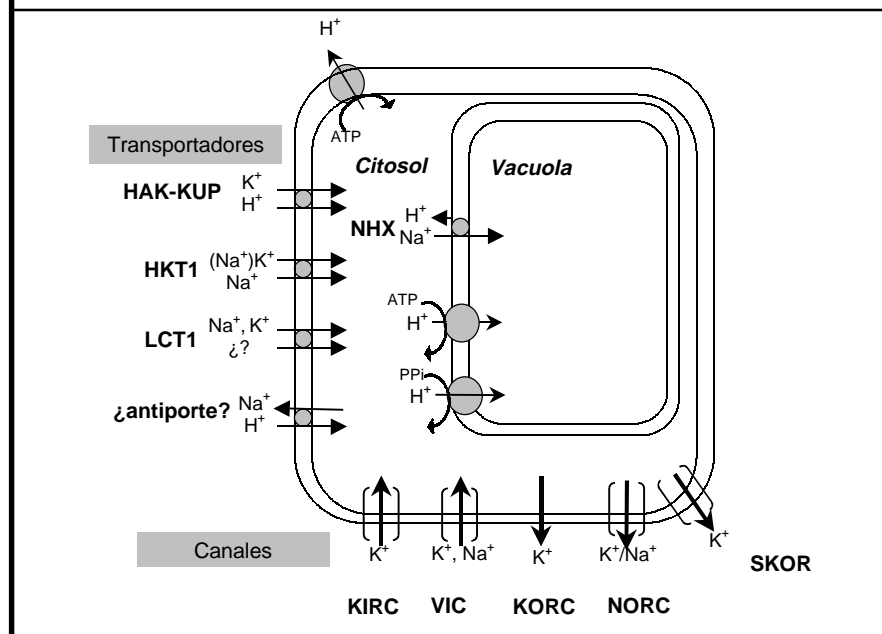
Absorción de iones.

En un suelo salino, la elevada concentración de iones Na^+ y Cl^- (o SO_4^{2-}), produce una interferencia en la absorción de

nutrientes (K^+ , Ca^{2+} , NO_3^-) e impide la captación de los mismos, al tiempo que pueden alcanzar niveles citosólicos tóxicos para el metabolismo celular. El mantenimiento del equilibrio iónico de la célula frente a los cambios del medio externo, esto es la homeostasis iónica, depende de las proteínas de membrana que regulan el flujo de iones, como las bombas de protones (ATPasas y pirofosfatasa), transportadores secundarios y canales iónicos (Figura 1) (Niu *et al.*, 1995; Maathuis y Amtmann, 1999). Uno de los factores determinantes de la tolerancia celular a la salinidad reside en la capacidad de mantener una alta relación K^+/Na^+ en el citosol. Un caso aparte lo constituye la entrada de aniones, que pueden interferir con la absorción de nutrientes como Ca^{2+} y NO_3^- e inducir deficiencias, o bien presentar distinto grado de toxicidad (Cl^- o SO_4^{2-}) (Grattan y Grieve, 1994).

FIGURA 1.

La actividad de bombas de H^+ (ATPasas y pirofosfatasa), transportadores secundarios y canales iónicos en las células vegetales permite el mantenimiento de la homeostasis en condiciones de salinidad. La concentración de 100-150 mM K^+ y una baja concentración de Na^+ en el citosol puede mantenerse por la actividad coordinada de los distintos sistemas de transporte iónico en las membranas celulares.



La raíz, como principal órgano de absorción de agua y iones, tiene gran importancia en la respuesta a corto y largo plazo al estrés salino. En este órgano se sintetiza ácido abscísico (ABA), una de las señales tempranas de estrés capaz de producir cambios fisiológicos locales (conductividad hidráulica) y a distancia (cierre estomático) (Hartung *et al.*, 2002). Las características anatómicas y morfológicas de la raíz pueden tener gran influencia en la capacidad de adaptación a la salinidad (Reinhardt y Rost, 1995; Maggio *et al.*, 2001).

La entrada de K^+ y Na^+ en la célula se produce por la acción de transportadores y canales iónicos del plasmalema (Figura 1). Existen transportadores muy selectivos para el K^+ , con una elevada afinidad por K^+ (10-50 mM), pero que también pueden transportar Na^+ con baja afinidad y ser bloqueados por altas concentraciones de Na^+ en el medio (Maathuis y Amtmann, 1999; Rodríguez-Navarro, 2000). Entre estos transportadores están los de tipo KUP-HAK de cebada y *Arabidopsis* (Santa-María *et al.*, 1997). 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^+ (Wang *et al.*, 1998; Rubio *et al.*, 1995; 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.*, 2001a). El transportador de baja afinidad, LCT1, también es permeable al Na^+ , pero su contribución relativa a la captación de Na^+ es desconocida (Schachtman *et al.*, 1997) (Figura 1).

Los canales iónicos constituyen otro sistema de transporte que permite la disipación rápida de un gradiente iónico establecido a través del plasmalema (Maathuis y Amtmann, 1999). En la actualidad se

conocen tres tipos de canales que pueden mediar en la entrada o salida de iones como K^+ y Na^+ a través del plasmalema (Maathuis y Amtmann, 1999; Rodríguez-Navarro, 2000), denominados canales rectificadores de entrada de K^+ (KIRC), canales rectificadores de salida de K^+ (KORC), y canales independientes del voltaje (VIC) (Figura 1). La selectividad K^+/Na^+ de estos canales iónicos varía ampliamente. 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^+ (Amtmann y Sanders, 1999). 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 (Maathuis y Sanders, 2001).

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^+ . 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 (Mäser *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 (Glenn *et al.*, 1999). 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 (Venema *et al.*, 2002).

Otro sistema importante para conseguir la reducción del Na⁺ citosólico es la expulsión al medio extracelular (Figura 1). La extrusión de Na⁺ se produce en hongos y algunas especies de algas marinas por bombas (ATPasas) transportadoras de Na⁺ (Haro *et al.*, 1993; 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 po-

dría 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 (Wu *et al.*, 1996). 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).

El papel del ión Ca²⁺ 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 (Rengel, 1992; Bressan *et al.*, 1998). La presencia de Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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) (Figura 1). 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 (Liu y Zhu, 1997; 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+} (Zhu, 2000). En la actualidad se sabe 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 (Bressan *et al.*, 1998; Pardo *et al.*, 1998; Trewavas y Malhó, 1998).

Translocación de iones.

El flujo de agua provocado por la transpiración foliar produce el movimiento de sales desde las raíces hasta las hojas. En las raíces, los solutos que entran siguiendo el flujo transpiratorio, se mueven por el apoplasto, y si atraviesan la membrana de una célula radical, continúa su transporte por el simplasto hasta alcanzar el xilema. En teoría, el movimiento de iones por el apoplasto se interrumpe en la endodermis: la impermeabilidad de las paredes de las células endodérmicas engrosadas con suberina y lignina (banda de Caspary) impiden el libre flujo. En este punto, los iones deberían atravesar la barrera selectiva de las membranas para continuar su camino hacia los vasos del xilema (Clarkson, 1991). Sin embargo, en algunas especies como arroz, existen sitios de paso donde los iones pueden saltarse la barrera selectiva de membranas y continuar su curso en el flujo transpiratorio por vía apoplástica (Yadav *et*

al., 1996; García *et al.*, 1997).

En todo este camino hasta llegar al sistema xilemático, el flujo de iones encuentra células especializadas, con un sistema vacuolar desarrollado, donde los sistemas de transporte a través de membranas plasmática o vacuolar descritos previamente pueden contribuir a la selectividad en el transporte de iones a las hojas (Jeschke, 1984). Una de las características diferenciales entre especies tolerantes o sensibles al estrés salino ya descritas hace tiempo (Lessani y Marschner, 1978; Läuchli, 1984) era la capacidad transportar los iones Na^+ desde la raíz a la parte aérea y la retranslocación inversa posterior. Trabajos más recientes han señalado diferencias en la actividad de ATPasas de plasmalema y tonoplasto en las raíces de cultivos tolerantes y sensibles (cebada y arroz) posiblemente relacionadas a las diferencias en compartimentación radical del Na^+ y su retranslocación desde la parte aérea (Nakamura *et al.*, 1996). Algunas de las proteínas involucradas en la carga y descarga xilemática de iones K^+ y Na^+ han sido identificadas. El antiportador Na^+/H^+ SOS1 se expresa preferentemente en los tejidos vasculares, en la interfase entre el parénquima xilemático y los vasos del xilema, y en la epidermis de los tejidos poco diferenciados cercanos al meristemo de la raíz (Shi *et al.*, 2002). SOS1 parece funcionar bidireccionalmente para controlar la contenido de Na^+ en el xilema. Mientras que los mutantes *sos1* de *Arabidopsis* presentan un contenido más bajo de Na^+ en el fluido xilemático que las plantas control cuando se crecen en un medio con una baja concentración de NaCl (25 mM), la situación se revierte en condiciones de alta salinidad (100 mM). Estos resultados sugieren que en condiciones fisiológicas de crecimiento SOS1 podría cargar activamente Na^+ en el xilema para su translocación controlada a la parte aérea y su acumulación en el mesófilo foliar. Por

el contrario, cuando el estrés sódico es importante, SOS1 podría expulsar Na^+ al medio en el ápice de la raíz y reabsorber el Na^+ del xilema en tejidos más diferenciados, retrasando así el aporte de Na^+ a la parte aérea con la corriente de evapotranspiración (Shi *et al.*, 2002). El canal de K^+ SKOR, de tipo KORK, media la descarga de K^+ al xilema (Gaymard *et al.*, 1998). Mutantes deficientes en SKOR presenta un bajo contenido de K^+ en el fluido del xilema y en la parte aérea. SKOR se acumula preferentemente en la estela de la raíz de *Arabidopsis* y su expresión se inhibe por ABA, apoyando la hipótesis de que el control de la translocación de K^+ a la parte aérea es una de las respuestas al déficit de agua.

Los cambios inducidos por el estrés salino en la ultraestructura, morfología y desarrollo de tejidos especializados (endodermis y exodermis) del la raíz (Harvey *et al.*, 1985; Sanchez-Aguayo y González-Utor, 1992; Reinhardt y Rost, 1995) reflejan los cambios adaptativos conducentes al control de la absorción y transporte de agua y iones a la parte aérea.

Compuestos osmóticamente activos y/o protectores.

El K^+ es uno de los principales solutos empleados para el ajuste osmótico en células vacuoladas o poco vacuoladas (Greenway y Munns, 1980; Wyn Jones y Gorham, 1983b). En estas últimas, el papel más importante en el ajuste osmótico lo tienen diferentes compuestos orgánicos (azúcares, aminoácidos, etc.). Uno de los principales cambios bioquímicos durante la adaptación a salinidad resulta en la acumulación de esos compuestos orgánicos con actividad osmótica. Se consideran solutos compatibles porque no inhiben el metabolismo celular mientras generan el potencial osmótico requerido para permitir la absorción de agua en condiciones de menor potencial hídrico. En algunos casos tienen más función protectora y/o estabilizante de membranas y enzimas que propiamente osmótica (Hasegawa *et al.*, 2000). Entre los metabolitos más frecuentes se indican aminoácidos, azúcares y compuestos de amonio cuaternario (Tabla 1). Algunos de estos compuestos podrían actuar como protectores físico-químicos reemplazando el agua de la superficie de proteínas y membranas por su naturaleza hidrofílica (Rhodes y Hanson, 1993), mientras que otros podrían tener una función de protección química desactivando radicales libres (Smirnov y Cumbes, 1989).

TABLA 1.

| Compuestos sintetizados en las plantas en respuesta al estrés salino y su posible función. | |
|--|---|
| Compuesto | Función |
| Polióles (manitol, sorbitol, ononitol, pinitol, etc) | Osmótico, reducción de radicales libres |
| Trehalosa | Osmótico, protección de estructuras celulares |
| Fructanos | Idem |
| Betaína, glicinbetaína | Protección de proteínas y membranas |
| Derivados de dimetilsulfonio | Id. |
| Prolina | Osmótico |
| Ectoína | Id. |

Mejora de la tolerancia al estrés salino.

La tolerancia de un cultivo a la reducción de la producción por salinidad es un carácter complejo, que involucra respuestas al estrés iónico y osmótico a nivel celular, la coordinación de esas respuestas a nivel de organismo y su interacción con el medio circundante (Cheeseman, 1988; Yeo, 1998). Los mecanismos que confieren tolerancia a nivel celular pueden no tener efecto a nivel de planta. En la planta se asocian células diferenciadas con distinta función (absorción, transporte, asimilación de carbono), y espacialmente separadas y enfrentadas a condiciones ambientales distintas (Yeo, 1998). Ya se ha mencionado la importancia de la morfología y anatomía radical, y no es menor la importancia de la morfología foliar, y de las distintas variables ambientales que pueden modificar la absorción de iones y transpiración en un ecosistema agrícola: un cultivo responde como una comunidad vegetal, de forma diferente a la unidad, por la interacción entre individuos y el medio ambiente.

Una de las aproximaciones al estudio de la tolerancia al estrés ha sido con el empleo de métodos estadísticos y mapeo genómico, con lo que se consigue asociar el fenotipo de un carácter cuantitativo con marcadores genéticos. Esto se consigue con el análisis de loci de caracteres cuantitativos o QTL (quantitative trait locus) (Quarrie, 1996). El análisis genético por QTL permite emplear un número manejable de variables asociadas a un carácter fisiológico complejo (por ejemplo, absorción, selectividad y compartimentación iónica) (Prioul *et al.*, 1997). En arroz, cultivo en el que la tolerancia se asocia con la exclusión de Na^+ y a una mayor capacidad de absorción de K^+ , la capacidad de mantener una alta relación K^+/Na^+ está regida por la acción de genes aditivos y dominantes (Gregorio y Senadhira, 1993).

Recientemente se encontraron QTL asociados a la absorción de K^+ y Na^+ y la selectividad K^+/Na^+ que podrían emplearse como marcadores en la mejora genética por tolerancia a salinidad (Flowers *et al.*, 2000; Koyama *et al.*, 2001). Sin embargo, en otros cultivos la identidad de los caracteres relacionados con tolerancia es menos evidente. Por ejemplo, en tomate y algodón, donde la tolerancia al estrés salino parece estar más relacionada a una compartimentación efectiva del ión Na^+ en las células que a una alta selectividad o exclusión a nivel radical, no existen marcadores fisiológicos definidos (Cuartero *et al.*, 1992; Leidi y Gorham, 1998; Romero-Aranda *et al.*, 2001).

El carácter poligénico de la tolerancia al estrés salino ha sido el principal obstáculo para la mejora genética (Shannon, 1997). Por métodos de mejora genética tradicional, como selección y cruzamientos, se han conseguido variedades o líneas más productivas para condiciones de salinidad en cultivos como alfalfa, arroz, cebada, sorgo, tomate y trigo (Ashraf, 1994; Flowers y Yeo, 1995). Este proceso de mejora ha tenido éxito dependiendo de la variabilidad genética y la heredabilidad para el carácter de tolerancia del cultivo. No resulta fácil encontrar métodos de selección apropiados, o separar el componente ambiental de la variabilidad fenotípica, por lo que la selección asistida con el empleo de QTL es uno de los desarrollos más interesantes para la mejora de la resistencia al estrés abiótico (Quarrie, 1996). Las posibilidades actuales de analizar la respuesta al estrés a nivel genómico permitirán determinar la contribución de muchos genes a la respuesta inicial al estrés y al fenotipo de tolerancia (Bohnert *et al.*, 2001).

Desde las etapas tempranas del cultivo de tejidos y la multiplicación *in vitro*, uno de los métodos propuestos para la mejora de

tolerancia ha sido la selección o adaptación de suspensiones celulares o callos bajo condiciones de salinidad y aprovechamiento de la variación somaclonal para posterior regeneración de plantas con mayor tolerancia (Dix y Street, 1975; Nabors *et al.*, 1980). En algunos casos, este método dio fruto a individuos más tolerantes pero sin interés agronómico (Hasegawa *et al.*, 1980) y en otros casos a cultivares que no han tenido una difusión comercial importante (Flowers y Yeo, 1995).

Mediante las nuevas herramientas de biología molecular, la mejora de la tolerancia puede extenderse a cultivos donde no existe variabilidad genética en respuesta al estrés salino o la heredabilidad de los caracteres de interés sea muy baja. El avance en este campo estará asegurado cuanto mejor se conozcan los factores determinantes de la tolerancia (a nivel celular y de organismo).

Los estudios moleculares realizados en los últimos años han permitido obtener una larga lista de genes que se inducen en respuesta al estrés salino (Zhu *et al.*, 1997). Muchos de estos genes no contribuirían a la tolerancia, al no regular mecanismos implicados directamente en la respuesta adaptativa sino que estarían inducidos por daño celular (Zhu, 2000).

La diversidad de las respuestas frente al estrés salino ha generado dos corrientes de pensamiento sobre las estrategias a seguir en la mejora por métodos moleculares. Una de estas corrientes propone que se debe recurrir a la modificación simultánea de diferentes procesos fisiológicos para conseguir una tolerancia efectiva al estrés salino. El punto de vista alternativo mantiene que se puede mejorar la tolerancia con modificaciones de uno o pocos genes relacionados, por ejemplo, con el transporte iónico o la sín-

tesis de compuestos osmóticos y protectores (Hasegawa *et al.*, 2000).

En la **Tabla 2** se presentan las transformaciones realizadas en distintas especies vegetales en las que se ha observado un fenotipo de tolerancia a sal o en la expresión de mecanismos relacionados. La transformación de plantas con genes aislados de distintos organismos ha permitido expresar caracteres de relacionados con mayor tolerancia al estrés salino, como la actividad de transportadores iónicos (Apse *et al.*, 1999), sus sistemas de regulación (Pardo *et al.*, 1998), o sistemas enzimáticos que modifican la pared celular (Amaya *et al.*, 1999), reducen los daños por estrés oxidativo (Roxas *et al.*, 2000) o conducen a la síntesis de compuestos con función osmótica o protectora del metabolismo celular (Tarczynski *et al.*, 1993; Kavi Kishor *et al.*, 1995).

Distintos ejemplos permiten comprobar que la expresión de genes relacionados con la homeostasis iónica, a través de la actividad o la regulación de los sistemas de transporte, aumentan la tolerancia al estrés salino (**Tabla 2**). Así, la sobreexpresión de genes que codifican proteínas reguladoras de la actividad de la bomba de Na⁺ en levadura (HAL1, HAL3, calcineurina), aumentan la tolerancia al estrés salino en ese organismo (Serrano y Gaxiola, 1994) y también en plantas superiores, como la expresión del gen HAL1 en *Arabidopsis* y tomate (Gisbert *et al.*, 2000; Rus *et al.*, 2001b; Yang *et al.*, 2001), donde se produce a través de una mejora de la selectividad K⁺/Na⁺. Los genes procedentes de levadura (CNA, CNB) que codifican calcineurina, proteína que se asocia a Ca²⁺, suministran mayor tolerancia a la levadura y al tabaco (Mendoza *et al.*, 1996; Pardo *et al.*, 1998), a través de aumentar la selectividad K⁺/Na⁺ en levadura, pero no es tan evidente esta función en tabaco (Leidi y Pardo, no publicado).

Tabla 2.

| Relación de especies modificadas en las que la expresión génica ha modificado la tolerancia al estrés salino. | | | |
|---|--|--|--|
| Especie | Producto génico, gen | Efecto/ Metabolito | Referencia |
| Alfalfa | Factor de transcripción, Alfin1 | Crecimiento radical | Winicov y Bastola (1999) Winicov (2000) |
| Arabidopsis | Proteína reguladora, AtHAL3a | Síntesis de glicinbetaina | Espinosa-Ruiz <i>et al.</i> (1999) |
| | Colina oxidasa, codA | Síntesis de manitol | Hayashi <i>et al.</i> (1997) |
| Arroz | Manitol-1-fosfato deshidrogenasa, mt1D | Síntesis de manitol | Thomas <i>et al.</i> (1995) |
| | Factor de transcripción, DREB1A | Síntesis proteínas de estrés | Kasuga <i>et al.</i> (1999) |
| | Colina oxidasa, codA | Síntesis de glicinbetaina | Sakamoto <i>et al.</i> (1998) |
| | Pirrolin carboxilato sintetasa, p5cs | Síntesis de prolina | Kavi-Kishor <i>et al.</i> (1995) Zhu <i>et al.</i> (1998) |
| Tabaco | Glutamino sintetasa cloroplástica, GS2 | Asimilación de amonio de la fotorespiración | Hoshida <i>et al.</i> (2000) |
| | Proteína LEA grupo 3, HVA1 | Proteína de estrés. | Xu <i>et al.</i> (1996) |
| | Proteína quinasa OsCDPK7 | Protección de estructuras. | Saijo <i>et al.</i> (2000) |
| | Colina deshidrogenasa, betaA | Transducción de señales | Lilius <i>et al.</i> (1996) |
| | Mio-inositol o-metiltransferasa, IMT1 | Síntesis de D-ononitol | Sheveleva <i>et al.</i> (1997) |
| | Manitol-1-fosfato deshidrogenasa, mt1D | Síntesis de manitol | Tarczynski <i>et al.</i> (1993) |
| Tomate | Glutación transferasa, NT107 | Protección antioxidante | Roxas <i>et al.</i> (2000) |
| | Calcineurina, CNA y CNB | Selectividad K ⁺ /Na ⁺ ? | Pardo <i>et al.</i> (1998) |
| | Ca ²⁺ -proteína (EhCaBP) | Transducción de señales? | Pandey <i>et al.</i> (2002) |
| | Antiporte Na ⁺ /H ⁺ vacuolar, NHX1 | Compartimentación vacuolar | Zhang y Blumwald (2001) |
| | Betaina aldehído deshidrogenasa, BADH1 | Síntesis de betaína | Moghaieb <i>et al.</i> (2000) |

Otra proteína también asociada a Ca²⁺ (EhCaBP), confiere tolerancia a salinidad en tabaco (Pandey *et al.*, 2002). Sistemas de transporte iónico, como el antiportador vacuolar Na⁺/H⁺, confieren mayor tolerancia al estrés salino en Arabidopsis y tomate, al incrementar aparentemente la compartimentación vacuolar del Na⁺ (Apse *et al.*, 1999; Zhang y Blumwald, 2001).

La obtención de plantas genéticamente modificadas con mayor capacidad de acumulación de compuestos orgánicos con función protectora (prolina, betaína y glicín betaína) ha resultado en fenotipos con mayor tolerancia a salinidad (Hayashi *et al.*, 1997; Kavi-Kishor *et al.*, 1995; Lilius *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998). La modificación de otros factores (moléculas señal, factores de transcripción, etc.) (Tabla 2) también tiene efecto

en la respuesta de la planta y son objetivos promisorios en la búsqueda de tolerancia por el efecto pleiotrópico que tienen sobre los genes y proteínas de estrés (Yeo, 1998; Hasegawa *et al.*, 2000). Por ejemplo, la sobreexpresión del factor de transcripción DREB1A activa de manera coordinada los genes de estrés que contienen secuencias DRE (desiccation response element) en sus promotores. La utilización de un bucle regulador en el que el gen DREB1A se autoamplifica sólo en condiciones de estrés ambiental, aumenta la tolerancia de las plantas a la desecación, la salinidad y el frío, sin los efectos negativos que tiene la sobreexpresión del gen silvestre sobre el crecimiento en condiciones ambientales favorables (Kasuga *et al.*, 1999). La acción sobre mecanismos de homeostasis iónica parece prometedora en cuanto a que permite mejorar el

ajuste osmótico sin comprometer carbono y nitrógeno en la síntesis de metabolitos

osmóticamente activos, posiblemente con mayor coste para el metabolismo celular (Hasegawa *et al.*, 2000).

Conclusiones

A pesar de los avances enumerados en el conocimiento de mecanismos de tolerancia y de los logros alcanzados, quedan aspectos importantes por considerar y estudiar en el futuro, como la regulación temporal y espacial de los distintos sistemas descritos, el efecto de la expresión en otros cultivos, el impacto en la productivi-

dad del agrosistema, etc., para una valoración agronómica realista. Sin embargo, la visión amplia y precisa que se tiene sobre el problema, y los métodos actualmente disponibles para la profundización del estudio como fenómeno complejo, han cambiado las perspectivas y abren muchas más posibilidades para la mejora de la tolerancia de los cultivos a la salinidad.

Bibliografía

AMAYA, I.; BOTELLA, M.A.; DE LA CALLE, M.; MEDINA, M.I.; HEREDIA, A.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M.; QUESADA, M.A. y VALPUESTA, V. 1999. Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Letters*, 457: 80-84.

AMTMANN, A. y SANDERS, D. 1999. Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research*, 29: 75-113.

APSE, M.P.; AHARON, G.S.; SNEDDEN, W.A. y BLUMWALD, E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 285: 1256-1258.

ASHRAF, M. 1993. Effect of sodium chloride on water relations and some organic osmotica in arid zone plant species *Melilotus indica* (L.) All. *Tropenlandwirt*, 94: 95-102.

ASHRAF, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 13: 17-42.

BARKLA, B.J. y PANTOJA, O. 1996. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 47: 159-184.

BLUMWALD, E.; AHARON, G.S. y APSE, M.P. 2000. Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 140-151.

BOHNERT, H.J.; AYOUBI, P.; BORCHERT, C.; BRESSAN, R.A.; BURNAP, R.L.; CUSHMAN, J.C.; CUSHMAN, M.A.; DEYHOLOS, M.; FISCHER, R.; GALBRAITH, D.W.; HASEGAWA, P.M.; JENKS, M.; KAWASAKI, S.; KOIWA, H.; KORE-EDA, S.; LEE, B.H.; MICHALOWSKI, C.B.; MISAWA, E.; NOMURA, M.; OZTURK, N.; POSTIER, B.; PRADE, R.; SONG, C.P.; TANAKA, Y.; WANG, H. y ZHU, J.K. 2001. A genomics approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39: 295-311.

BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. y PARDO, J.M. 1998. Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends in Plant Science*, 3: 411-412.

CARVAJAL, M.; MARTÍNEZ, V. y ALCARAZ, C.F. 1999. Physiological function of water channels as affected by salinity in roots of paprika pepper. *Physiologia Plantarum*, 105: 95-101.

CHEESEMAN, J.M. 1988. Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiology*, 87: 547-550.

CLARKSON, D.T. 1991. Root structure and sites of ion uptake. En: *Plant roots – the hidden half* (Y. Waisel, A. Eshel, U. Kafkafi, eds), Marcel Dekker, New York, p. 417-453.

CUARTERO, J.; YEO, A.R. y FLOWERS, T.J. 1992. Selection of donors for salt-tolerance in tomato using physiological traits. *The New Phytologist*, 121: 63-69.

DIX, P.J. y STREET, H.E. 1975. Sodium chloride-resistant cultured cell lines from *Nicotiana sylvestris* and *Capsicum annum*. *Plant Science Letters*, 5: 231-237.

ESPINOSA-RUIZ, A.; BELLES, J.M.; SERRANO, R. y CULIÑEZ-MACIA, F.A. 1999. *Arabidopsis thaliana* AtHAL3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. *The Plant Journal*, 20: 529-539.

EVANGELOU, V.P. 1994. Influence of sodium on soils of humid regions. En: *Handbook of Plant and Crop Stress* (M. Pessarakli, ed) Marcel Dekker, Inc. New York, p. 31-62.

FISCHER, R.A. y TURNER, N.C. 1978. Plant productivity in the arid and semiarid zones. *Annual Review of Plant Physiology*, 29: 277-317.

FLOWERS, T.J.; TROKE, P.F. y YEO, A.R. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 28: 89-121.

FLOWERS, T.J.; HAJIBAGHERI, M.A. y YEO, A.R. 1991. Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant, Cell and Environment*, 14, 319-325.

FLOWERS, T.J. y YEO, A.R. 1995. Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 875-884.

FLOWERS, T.J.; KOYAMA, M.L.; FLOWERS, S.A.; SUDHAKAR, C.; SINGH, K.P. y YEO, A.R. 2000. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. *Journal of Experimental Botany*, 51: 99-106.

GARCÍA, A.; RIZZO, R.J.; BARTOS, S.L.; SENADHIRA, D.; FLOWERS, T.J. y YEO, A.R. 1997. Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice, and the mechanism of sodium:potassium selectivity differs between rice and wheat. *Plant, Cell and Environment*, 20: 1167-1174.

GAYMARD, F.; PILOT, G.; LACOMBE, B.; BOUCHEZ, D.; BRUNEAU, D.; BOUCHEREZ, J.; MICHAUX-FERRIERE, N.; THIBAUD, J.B. y SENTENAC H. 1998. Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into de xylem sap. *Cell*, 94: 647-655.

GIMMLER, H. 2000. Primary sodium plasma membrane ATPases in salt-tolerant algae: facts and fictions. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1171-1178.

GISBERT, C.; RUS, A.M.; BOLARÍN, M.C.; LÓPEZ-CORONADO, J.M.; ARRILLAGA, I.; MONTESINOS, C.; CARO, M.; SERRANO, R. y MORENO, V. 2000. The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiology*, 123: 393-402.

GLENN, E.P.; BROWN, J.J. y BLUMWALD, E. 1999. Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews in Plant Science*, 18: 227-255.

GRATTAN, S.R. y GRIEVE, C.M. 1994. Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments. En: Handbook of Plant and Crop Stress (M. Pessarakli, ed) Marcel Dekker, Inc. New York, p. 203-226.

GREENWAY, H. y MUNNS, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. Annual Review of Plant Physiology, 31: 149-190.

GREGORIO, G.B. y SENADHIRA, D. 1993. Genetic analysis of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics, 86: 333-338.

HARO, R.; BAÑUELOS, M.A.; QUINTERO, F.J.; RUBIO, F. y RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. 1993. Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. Physiologia Plantarum, 89: 868-874.

HARTUNG, W.; SAUTER, A. y HOSE, E. 2002. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? Journal of Experimental Botany, 53: 27-32.

HARVEY, D.M.R.; STELZER, R.; BRANDTNER, R. y KRAMER D. 1985. Effects of salinity on ultrastructure and ion distributions in roots of *Plantago coronopus*. Physiologia Plantarum, 66: 328-338.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. y HANDA, A.K. 1980. Growth characteristic of NaCl-selected and non-selected cells of *Nicotiana tabacum* L. Plant and Cell Physiology, 21: 1347-1355.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU J.K. y BOHNERT, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 51: 463-499.

HAYASHI, H.A.; MUSTARDY, L.; DESHNIUM P.; IDA M. y MURATA, N. 1997. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase: accumulation of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. The Plant Journal, 12: 133-142.

HORIE, T.; YOSHIDA, K.; NAKAYAMA, H.; YAMADA, K.; OIKI S. y 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.

HOSHIDA, H.; TANAKA, Y.; HIBINO, T.; HAYASHI, Y.; TANAKA, A. y TAKABE, T. 2000. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. Plant Molecular Biology, 43: 103-111.

JACOBY, B. 1994. Mechanisms involved in salt tolerance in plants. En: Handbook of Plant and Crop Stress (M. Pessarakli, ed) Marcel Dekker, Inc. New York, p. 97-123.

JAIN, R.K. y SELVARAJ, G. 1997. Molecular genetic improvement of salt tolerance in plants. Biotechnology Annual Review, 3: 245-267.

JENSEN, M.E.; RANGELEY, W.R. y DIELEMAN, P.J. 1990. Irrigation trends in world agriculture. En: *Irrigation of Agricultural Crops*. Amer. Soc. Agron., Madison, Wisconsin, p. 31-67.

JESCHKE, W.D. 1984. K^+ - Na^+ exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance. En: *Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement* (R.C. Staples, G.H. Toenniessen, eds.) John Wiley and Sons, New York, p. 37-66.

KALAMPANAYIL, B.D. y WIMMERS, L.E. 2001. Identification and characterization of salt-stress-induced plasma membrane H^+ -ATPase in tomato. *Plant, Cell and Environment*, 24: 999-1005.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. y SHINOZAKI, K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 17: 287-291

KAVI KISHOR, P.B.; HONG, Z.; MIAO, G.H.; HU, C.A.A. y VERMA, D.P.S. 1995. Overexpression of pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, 108: 1387-1394

KOYAMA, M.L.; LEVESLEY, A.; KOEBNER, R.M.D.; FLOWERS, T.J. y YEO, A.R. 2001. Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. *Plant Physiology*, 125: 406-422.

LÄUCHLI, A. 1984. Salt exclusion: An adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. En: *Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement* (R.C. Staples, G.H. Toenniessen, eds) John Wiley and Sons, New York, p. 171-187.

LEIDI, E.O. y SAIZ, J.F. 1997. Is salinity tolerance related to Na accumulation in Upland cotton (*Gossypium hirsutum*) seedlings? *Plant and Soil*, 190: 67-75.

LEIDI, E.O. y GORHAM, J. 1998. Salt and water stress tolerant cotton. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 42 Cotton (Y.P.S. Bajaj, ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 227-242.

LESSANI, H. y MARSCHNER, H. 1978. Relation between salt tolerance and long-distance transport of sodium and chloride in various crop species. *Australian Journal of Plant Physiology*, 5: 27-37.

LILIUS, G.; HOLMBERG, N. y BULOW, L. 1996. Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Bio/technology*, 14:177-180.

LIU, J. y ZHU, J.K. 1997. An Arabidopsis mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proceedings National Academy of Sciences Academy of Sciences USA*, 94: 14960-14964.

LONGSTRETH, D.J. y NOBEL, P.S. 1979. Salinity effects on leaf anatomy. Consequences for photosynthesis. *Plant Physiology*, 63: 700-703.

MAAS, E.V. 1986. Salt tolerance of plants. *Applied Agricultural Research*, 1: 12-26.

MAATHUIS, F.J.M. y AMTMANN, A. 1999. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Annals of Botany*, 84: 123-133.

MAATHUIS, F.J.M. y SANDERS, D. 2001. Sodium uptake in *Arabidopsis* roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiology*, 127: 1617-1625.

MAGGIO A., HASEGAWA P.M., BRESSAN R.A., CONSIGLIO M.F. y JOLY, R.J. 2001. Unravelling the functional relationship between root anatomy and stress tolerance. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 999-1004.

MARSCHNER, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition. Academic Press Ltd., London.

MÄSER P.; THOMINE, S.; SCHROEDER, J.I.; WARD, J.M.; HIRSCH, K.; SZE, H.; TALKE, I.N.; AMTMANN, A.; MAATHUIS, F.J.; SANDERS, D.; HARPER, J.F.; TCHIEU J.; GRIBSKOV, M.; PERSANS, M.W.; SALT, D.E.; KIM, S.A. y GUERINOT, M.L. 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126:1646-67

MAUREL, C.; TACNET, F.; GÜCLÜ, J.; GUERN J. y RIPOCHE, P. 1997. Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 94: 7103-7108.

MAUREL, C. y CHRISPEELS, M.J. 2001. Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology*, 125: 135-138.

MENDOZA, I.; QUINTERO, F.J.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. y PARDO, J.M. 1996. Activated calcineurin confers high tolerance to ion stress and alters the budding pattern and cell morphology of yeast cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 23061-23067.

MOGHAIEB, R.E.A.; TANAKA, N.; SANEOKA, H.; HUSSEIN, H.A.; YOUSEF, S.S.; EWADA, M.A.F.; ALY M.A.M. y FUJITA, K. 2000. Expression of betaine aldehyde dehydrogenase gene in transgenic tomato hairy roots leads to the accumulation of glycine betaine and contributes to the maintenance of the osmotic potential under salt stress. *Soil Science and Plant Nutrition*, 46: 873-883.

MURATA, Y.; KATSURA, S.; OBI I. y 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.

NABORS, M.W.; GIBBS, S.E.; BERNSTEIN, C.S. y MEIS, M.E. 1980. NaCl-tolerant tobacco plants from cultured cells. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 97: 13-17.

NAKAMURA, T.; OSAKI, M.; ANDO M. y TADANO T. 1996. Differences in mechanisms of salt tolerance between rice and barley plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 42: 303-314.

NIU, X.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. y PARDO, J.M. 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology*, 109: 735-742.

PANDEY, G.K.; REDDY, V.S.; REDDY, M.K.; DESWAL, R.; BHATTACHARYA, A. y SOPORY, S.K. 2002. Transgenic tobacco expressing *Entamoeba histolyca* calcium binding protein exhibits enhanced growth and tolerance to salt stress. *Plant Science*, 162: 41-47.

PARDO, J.M.; REDDY, M.P.; YANG, S.; MAGGIO, A.; HUH, G.H.; MATSUMOTO, T.; COCA M.A.; PAINO-D'URZO, M.; KOIWA, H.; YUN, D.J.; WATAD, A.A.; BRESSAN, R.A. y HASEGAWA, P.M. 1998. Stress signaling through Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. *Proceedings National Academy of Sciences, USA* 95: 9681-9686.

PIH, K.T.; LIM, J.H.; KANG, S.G.; PIAO, H.L.; JIN, J.B. y HWANG, I.H. 1999. Characterization of two new channel protein genes in *Arabidopsis*. *Molecules and Cells*, 9: 84-90.

PRIOUL, J.P.; QUARRIE, S.; CAUSSE, M. y DE VIENNE, D. 1997. Dissecting complex physiological functions through the use of molecular quantitative genetics. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1151-1163.

QUARRIE, S.A. 1996. New molecular tools to improve the efficiency of breeding for increased drought resistance. *Plant Growth Regulation*, 20: 167-178.

REIMANN, C. y BRECKLE, S.W. 1995. Salt tolerance and ion relations of *Salsola kali* L.: differences between ssp. *tragus* (L.) Nyman and ssp. *ruthenica* (Iljin) Soo. *The New Phytologist*, 130: 37-45.

REINHARDT, D.H. y ROST, T.L. 1995. Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environmental Experimental Botany*, 35: 563-574.

RENGEL, Z. 1992. The role of calcium in salt toxicity. *Plant, Cell and Environment*, 15: 625-632.

RHOADES, J.D.; KANDIAH, A. y MASHALI, A.M. 1992. The use of saline waters for crop production. *FAO Irrigation and Drainage paper* 48.

RHODES, D. y HANSON, A.D. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulphonium compounds in higher plants. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 44: 357-384.

RODRÍGUEZ-NAVARRO A. 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469: 1-30.

ROMERO-ARANDA, R.; SORIA T. y CUARTERO, J. 2001. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science*, 160: 265-272.

ROXAS, V.P.; LODHI, S.A.; GARRETT, D.K.; MAHAN, J.R. y ALLEN, R.D. 2000. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant and Cell Physiology*, 41: 1229-1234

RUBIO, F.; GASSMANN, W. y SCHROEDER, J.I. 1995. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science*, 270:1660-1663.

RUS, A.M.; YOKOI, S.; SHARKHUU, A.; REDDY, M.; LEE, B.H.; MATSUMOTO, T.K.; KOIWA, H.; ZHU, J.K.; BRESSAN, R.A. y HASEGAWA, P.M. 2001a. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 98:14150-14155.

RUS, A.M.; ESTAÑ, M.T.; GISBERT, C.; GARCÍA-SOGO, B.; SERRANO, R.; CARO, M.; MORENO, V. y BOLARÍN, M.C. 2001b. Expressing the yeast HAL1 gene in tomato increases fruit yield and enhances K⁺/Na⁺ selectivity under stress. *Plant Cell and Environment*, 24: 875-880.

SAIJO, Y.; HATA, S.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K. y IZUI, K. 2000. Over-expression of a single Ca²⁺ dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *The Plant Journal*, 23: 319-327.

SAKAMOTO, A.; ALIA, H.H. y MURATA, N. 1998. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycine betaine and tolerance to salt and cold. *Plant Molecular Biology*, 38: 1011-1019.

SANCHEZ-AGUAYO I. y GONZÁLEZ-UTOR, A.L. 1992. Quantitative determination of changes induced by NaCl in vacuoles and cellular size of *Lycopersicon esculentum* root cells. *Plant, Cell and Environment*, 15: 867-870.

SANTA-MARÍA, G.; RUBIO, F.; DUBCOVSKY, J. y RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. 1997. The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell*, 9: 2281-2289.

SCHACHTMAN, D.P.; KUMAR, R.; SCHROEDER, J.I. y MARSCH, E.L. 1997. Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 94: 11079-11084.

SERRANO, R. y GAXIOLA, R. 1994. Microbial models and salt stress tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13: 121-138.

SHANNON, M.C. 1997. Adaptation of plants to salinity. *Advances in Agronomy*, 60: 75-120.

SHEVELEVA, E.; CHMARA, W.; BOHNERT, H.J. y JENSEN, R.G. 1997. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiology*, 115: 1211-1219.

SHI, H.; ISHITANI, M.; KIM, C. y ZHU, J.K. 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 97: 6896-6901.

SHI, H.; QUINTERO, F.J.; PARDO, J.M. y ZHU, J.K. 2002. The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter *SOS1* controls long distance Na⁺ transport in plants. *The Plant Cell* (en prensa).

SMIRNOFF, N. y CUMBES, Q.J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochem.*, 28: 1057-1060.

TARCZYNSKI, M.C.; JENSEN, R.G. y BOHNERT, H.J. 1993. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science*, 259: 508-510.

THOMAS, J.C.; SEPAHI, M.; ARENDALL, B. y BOHNERT, H.J. 1995. Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environment*, 18: 801-806.

TREWAVAS, A.J. y MALHÓ, R. 1998. Ca²⁺ signalling in plants cells: the big network ! *Current Opinion Plant Biology*, 1: 428-433.

VENEMA, K.; QUINTERO, F.J.; PARDO J.M. y DONAIRE, J.P. 2002. The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ exchanger *AtNHX1* catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes *Journal of Biological Chemistry* (en prensa)

WANG, T.B.; GASSMANN, W.; RUBIO, F.; SCHROEDER, J.I. y GLASS, A.D.M. 1998. Rapid upregulation of *HKT1*, a high-affinity potassium transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium. *Plant Physiology*, 118: 651-659.

WINICOV, I. y BASTOLA, D.R. 1999. Transgenic overexpression of the transcription factor *Alfin1* enhances expression of the endogenous *MsPRP2* gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants. *Plant Physiology*, 120: 473-480.

WINICOV, I. 2000. *Alfin1* transcription factor overexpression enhances plant root growth under normal and saline conditions and improves salt tolerance in alfalfa. *Planta*, 210: 416-422.

WU, S.J.; DING, L. y ZHU, J.K. 1996. *SOS1*, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* 8, 617-627.

WYN JONES, R.G. y GORHAM, J. 1983a. Aspects of drought and salt tolerance in higher plants. En: *Genetic Engineering of Plants. An Agricultural Perspective* (T. Kosige, C.P. Meredith, A. Hollaender, eds) Plenum Press, New York, p. 355-370.

WYN JONES, R.G. y GORHAM, J. 1983b . Osmoregulation. En: Encyclopedia of Plant Physiology, vol. 12C. Physiological Plant Ecology III (O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler, eds) Springer-Verlag, Berlin, p. 35-58.

XU, D.; DUAN, X.; WANG, B.; HONG, B.; HO, T.D. y WU, R. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* 110: 249-257.

YADAV, R.; FLOWERS, T.J. y YEO, A.R. 1996. The involvement of the transpirational bypass flow in sodium uptake by high- and low-sodium-transporting lines of rice developed through intravarietal selection. *Plant, Cell and Environment*, 19: 329-336.

YANG, S.X.; ZHAO, Y.X.; ZHANG, Q.; HE, Y.K.; ZHANG, H. y LUO, D. 2001. HAL1 mediate salt adaptation in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Res.* 11: 142-148. **YEO, A.R.** 1983. Salinity resistance: physiologies and prices. *Physiologia Plantarum* 58: 214-222.

YEO, A.R. 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany* 49: 915-929.

YOKOI, S.; QUINTERO, F.J.; CUBERO, B.; RUIZ, M.A.; BRESSAN, R.A.; PARDO, J.M. y HASEGAWA, P.M. 2002. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal* (en prensa)

ZHANG, H.X. y BLUMWALD, E. 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology*, 19: 765-768.

ZHU, J.K.; HASEGAWA, M. y BRESSAN, R.A. 1997. Molecular aspects of osmotic stress in plants. *CRC Critical Review of Plant Science*, 16: 253-277.

ZHU, B.; SU, J.; CHANG, M.C.; VERMA, D.P.S.; FAN Y.L. y WU, R. 1998. Overexpression of a pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Plant Science* 139: 41-48.

ZHU, J.K. 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124, 941-948.