

MONOGRAFÍA

ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DEL ESTRÉS SALINO EN PLANTAS

Autores: MsC. Leticia Fuentes Alfonso
Ing. Maryla Sosa del Castillo
Lic. Yunel Pérez Hernández

**Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”,
CP. 44740.**

Email: yunel.perez@umcc.cu

INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivos están expuestos a diferentes tipos de estreses, los cuales pueden ser originados por la actividad del hombre o causas naturales como la contaminación del aire, sequía, temperatura, intensidad luminosa y limitaciones nutricionales. Debido a que las plantas poseen limitados mecanismos para evitar el estrés, estas han desarrollado flexibles vías para adaptarse a los cambios medioambientales (Zhu, 2001).

La salinidad de los suelos precede al origen de la civilización humana y continúa siendo en la actualidad el mayor estrés abiótico que perjudica la productividad y calidad de las cosechas. Aproximadamente el 20% del área cultivada a nivel mundial y cerca de la mitad de las tierras irrigadas son afectadas por este factor. Zonas extensas como en California (aproximadamente la mitad del área de cultivo está afectada por la salinidad), Pakistán, la cuenca mediterránea, Australia y el sur de Asia (Malik *et al.*, 1986). Dicho fenómeno tiende a aumentar en los suelos de regadío, por el inevitable aporte de sales minerales disueltas en las aguas utilizadas con este fin.

Hasta la fecha han sido numerosos los estudios realizados para dilucidar las implicaciones a nivel molecular y los mecanismos bioquímicos que se desarrollan en los organismos vivos, a partir de este estrés medioambiental (Iwata *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2002; Zhu 2002).

Los trabajos con plantas transgénicas, basados en novedosas técnicas de la biología molecular, han permitido por su parte, conocer cuales genes proveen protección bajo determinadas condiciones estresantes. En la actualidad se producen estos tipos de plantas con el objetivo de mejorar la tolerancia a la salinidad y la sequía. No obstante, los trabajos basados en la combinación de métodos biotecnológicos y selectivos, como el cultivo *in vitro*, (Consoli *et al.*, 1996) aun constituyen una herramienta útil en la búsqueda de variedades más resistentes o tolerantes.

La presente monografía tiene como objetivo analizar los principales estudios bioquímicos, fisiológicos y genéticos que se han realizado referentes al estrés salino y las consecuencias que provocan en las plantas.

DESARROLLO

I. Generalidades de los suelos salinos.

1.1. Causas de la salinidad en los suelos.

Los suelos salinos se caracterizan por presentar niveles tóxicos de cloruro de sodio y sulfato de sodio. Los valores de conductividad eléctrica en extractos saturados de suelo salino oscilan alrededor de 4.0 dS/m ($\approx$ 40 mM NaCl; Marschner 1995).

El origen de los distintos tipos de sales en el suelo puede ser muy diverso. Pudiendo ser de manera general de origen natural o antrópico.

Origen natural

Las sales pueden proceder de algunas rocas fundamentalmente de tipo sedimentarias que contienen sales como minerales constituyentes; también pueden llegar a originarse estas sales por alteración de los minerales que conforman la roca madre. En las zonas costeras, los fenómenos naturales como los huracanes también pueden introducir a la tierra una considerable cantidad de sales provenientes del mar. Por otra parte las sales disueltas en el agua pueden formar acumulaciones salinas por evaporación, siendo esta una de las principales causas de la salinidad. El viento proveniente de regiones áridas también puede contribuir al proceso de salinización, arrastrando gran cantidad de sales, principalmente carbonatos, sulfatos y cloruros que se encuentran en suspensión. Los suelos no muy profundos pueden además tomar una parte de las sales del manto freático, que ascienden por capilaridad. Otra vía por la cual puede incrementarse los niveles de sales en el suelo, constituye la descomposición de residuos de plantas a partir de sus tejidos, otras veces las plantas contribuyen a la descomposición de minerales relativamente insolubles y a partir de ellos se forman sales. Sin embargo, el aporte en sales por esta vía carece de importancia de manera global, al comparar la salinidad de los suelos con o sin vegetación.

Contaminación por el hombre

El hombre también ha contribuido a este proceso por diversos motivos:

- La actividad agraria y en especial el riego, cuando no se ha tenido el suficiente control de las agua con determinado contenido de sales.
- La pérdida de la productividad de las tierras trae consigo problemas de salinidad.
- La movilización de tierras que pueden traer la aparición de rocas salinas en la superficie del terreno.
- El empleo excesivo de fertilizantes en zonas de actividad agrícola muy intensa.
- Las regiones cercanas a las zonas industriales pueden sufrir el proceso de salificación.

II. Señales bioquímicas inducidas por estrés salino en las plantas

2.1 Primera señal del estrés salino: Estrés osmótico.

Todas las formas de vida que se conocen en la actualidad, requieren del agua como medio para las reacciones metabólicas en el interior celular. Para las células vegetales, la presión de turgencia generada por el agua es también una fuerza motriz de la expansión celular. Sin embargo, el crecimiento vegetativo de las plantas puede ocurrir solamente dentro de un determinado intervalo de cantidad de agua, el cual puede ser medido por el estado de energía libre de las moléculas de agua –potencial de agua (Ψ_w). En una célula dada, Ψ_w consiste fundamentalmente en la presión y el potencial osmótico. Mientras la planta pueda mantener una presión de turgencia positiva, las células logran por lo general ajustar su potencial osmótico para satisfacer los requerimientos de agua en toda la planta y mantener un balance hídrico.

Entrada de iones Na^+ hacia el interior celular

La diferencia de potencial eléctrico en la membrana citoplasmática de las células vegetales es de -140 mV, lo cual favorece el transporte pasivo de Na^+ hacia el interior de la célula, especialmente cuando la concentración extracelular de Na^+ es elevada. El exceso extracelular de Na^+ entra a la célula a través de transportadores proteicos de alta afinidad por el K^+ (HKT1, en Inglés) y canales y transportadores de cationes no selectivos, lo que provoca una disminución en la relación K^+/Na^+ en el citosol. La expresión de transportadores de *Arabidopsis thaliana* (ATHKT1, en Inglés) homólogos a HKT1 de trigo en oocitos de *Xenopus*, provocaron un influjo de Na^+ , lo cual sugiere que ATHKT1 podría estar involucrado en la entrada de Na^+ en las plantas (Uozumi et al., 2000).

Los cambios significativos en el potencial de agua por incremento de la salinidad en el suelo, genera primariamente un estrés osmótico en las plantas, las cuales pueden interrumpir sus actividades celulares normales, o incluso causarles la muerte. Bajo condiciones naturales, las elevadas concentraciones de sales y la sequía constituyen las mayores causas de estrés osmótico para las plantas. Similares transportadores de *Eucalyptus* (EcHKT1 y EcHKT1) cuando fueron expresados en oocitos, mostraron un influjo de Na^+ y K^+ , sin embargo la permeabilidad al Na^+ fue mucho mayor que para el K^+ cuando las concentraciones extracelulares de ambos iones eran iguales (Liu et al., 2001). Estos resultados sugieren que en plantas de manera general, HKT1 podría estar asociado a un influjo de Na^+ de baja afinidad.

2.2. Señales provocadas por el estrés salino a nivel celular y molecular

El estrés salino afecta no sólo la homeostasis celular sino también la homeostasis iónica en las células vegetales. Los excesos de iones Na^+ y Cl^- pueden provocar cambios conformacionales en las proteínas estructurales y/o cambios en el potencial eléctrico de la membrana citoplasmática; mientras que el estrés osmótico provoca la pérdida de la turgencia y cambios en el volumen celular. Los cambios en la turgencia inducidos por el estrés osmótico y el exceso de iones Na^+ y Cl^- pueden actuar como señales de estrés salino.

Los sensores candidatos para el estrés iónico incluye transportadores y canales iónicos y proteínas de afinidad por iones sobre la membrana plasmática o en el medio intracelular (Zhu 2002). Bajo concentraciones elevadas de iones Na^+ , este catión puede entrar a la célula por canales iónicos

no específicos, lo cual puede provocar despolarización de la membrana citoplasmática, y esto podría significar también una señal de estrés, como es sabido, por activación de canales de calcio (Sanders et al., 1999). La pérdida de turgencia por otra parte provoca cambios en el volumen y retracción de la membrana citoplasmática de la pared celular, de esta forma los receptores de quinasa unidos a membrana, canales y transportadores iónicos, proteínas transmembranas que están en contacto con la pared celular y proteínas semejantes a la integrina, pueden experimentar cambios conformacionales o un agrupamiento, pudiendo de esta manera actuar también como sensores del estrés osmótico.

Estudios realizados por Iwata et al., 2001 con *Spyrogira*, mostraron que la actina F que se encuentran formando parte del citoesqueleto, también podría constituir una señal de estrés, ya que estos trabajos mostraron una regulación de la organización de los microtúbulos por la presión de turgencia. Los microtúbulos y los microfilamentos del citoesqueleto han estado implicados en el desarrollo de señales en plantas bajo estrés por frío (Viswanathan y Zhu 2002). Esto podría estar dado a que el citoesqueleto conecta diferentes organelos de la célula con la membrana citoplasmática, y este podría detectar cambios en el volumen celular por estrés osmótico y transducir la señal de cambio a canales internos de Ca^{+} u otros componentes de señalización.

La salinidad induce la acumulación y biosíntesis de la hormona vegetal ácido absícico (ABA) (Jia et al., 2002) y también induce la acumulación de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Hernández et al., 2001). Evidencias actuales sugieren que las señales primarias de estrés (estrés iónico y osmótico) son transducidas a través de canales de Ca^{+} así como vías por medio de receptores de kinasa; mientras que las señales secundarias de estrés, tales como ABA, etileno, el H_2O_2 , así como otros mensajeros secundarios intracelulares como fosfolípidos, también regulan la tolerancia de las plantas al estrés salino. Algunas de estas señales pueden no estar confinadas a sitios de estrés primario como las raíces y el movimiento de las mismas hacia otras partes de la planta contribuye a la coordinación de las respuestas en toda la planta en condiciones estresantes.

III. Efecto del estrés salino sobre los procesos biológicos naturales de las plantas: Germinación y crecimiento.

Las cantidades excesivas de sal en el suelo afectan de manera adversa el crecimiento y desarrollo de las plantas. Procesos biológicos como la germinación de la semilla y su vigor, crecimiento vegetativo, floración y desarrollo del fruto son afectados por las altas concentraciones de sales.

Como resultado del estrés osmótico, las plantas pueden responder con un amplio rango de respuestas fisiológicas a nivel molecular, celular y de organismo (Hasegawa et al., 2000). Estas incluyen, por ejemplo, cambios en el desarrollo y la morfología de las plantas (inhibición del crecimiento apical, incremento en el crecimiento de las raíces y cambios en el ciclo de vida), ajuste en el transporte iónico (concentración, expulsión y secuestro de iones) y cambios metabólicos (metabolismo del carbono y la síntesis de solutos compatibles).

Sin embargo, no todas las plantas responden de manera similar frente al estrés salino, y este hecho está relacionado con los distintos rangos de tolerancia que presentan los organismos vegetales a la salinidad. En este sentido las plantas han sido clasificadas como glicofíticas o halofíticas de acuerdo a su capacidad para crecer en un medio con elevada concentración de sales. Las plantas halófitas pueden tolerar rangos salinos elevados, sin embargo la mayoría de las plantas son glicofíticas y no pueden tolerar el estrés salino.

En estudios realizados en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, sobre tolerancia a la salinidad con *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, una leguminosa forrajera capaz de desarrollarse en suelos pobres y ácidos, considerada por algunos autores (Gonela et al., 2004) como moderadamente tolerante a la salinidad; las semillas de Stylo CIAT-184 fueron previamente esterilizadas y puestas a germinar en cámara húmeda con diferentes concentraciones de NaCl (control 0 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM y 100 mM).

Bajo las condiciones diseñadas el rango óptimo de germinación resultó ser entre 10-20 mM de cloruro de sodio (Figura 1 y 2). Este resultado pudiera estar dado por una entrada de iones sodio y cloruro hacia el interior de la semilla, creando un gradiente osmótico favorable para un proceso de imbibición más rápido y por tanto un mayor porcentaje de germinación. Por otra parte, concentraciones moderadas de NaCl podría favorecer los procesos metabólicos intracelulares en el desarrollo de las plántulas.

El porcentaje de germinación disminuyó significativamente por encima de 30 mM de NaCl, debido probablemente al efecto tóxico del cloruro de sodio, al desestabilizar la homeostasis que tiene lugar no solamente a nivel celular, sino también en toda la planta.

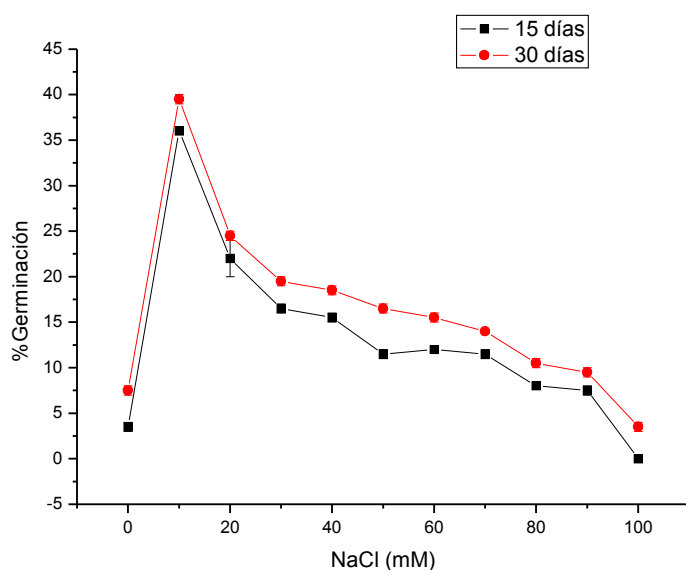


Figura 1. Porcentaje de semillas germinadas de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 a diferentes concentraciones de cloruro de sodio.

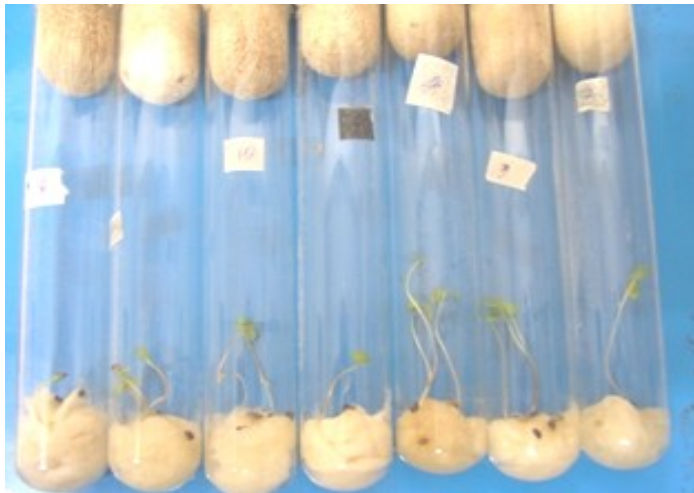


Figura 2. Plántulas de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 germinadas en algodón estéril con diferentes concentraciones de NaCl, de derecha a izquierda (control 0 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM y 100 mM).

A 0,1 M NaCl se obtuvo el menor porcentaje de germinación y las plántulas que lograron germinar fueron severamente afectadas, especialmente el desarrollo de las raíces. Es interesante señalar que las semillas llegan a germinar incluso pasados dos meses de estar sembradas en la mayor concentración, aunque su sistema radicular se afecta posteriormente.

IV. Mecanismos moleculares de las plantas para combatir el estrés salino

En general, las respuestas de las plantas frente al estrés salino pueden ser de tres tipos:

- Mantenimiento de la homeostasis.
- Detoxificación de compuestos dañinos.
- Recuperación del crecimiento.

4.1 Mantenimiento de la Homeostasis

La concentración elevada de elementos cargados como iones en el citosol, pueden cambiar la concha de hidratación de macromoléculas como proteínas, provocando cambios conformacionales en la estructura tridimensional de estas moléculas que pueden conllevar a la inactivación de las mismas.

Una estrategia desarrollada por las plantas y en general por todos los organismos vivos (Yancey et al., 1982), para evitar que suceda este fenómeno y facilitar la absorción de agua y restaurar el estrés hiperosmótico; ha sido la síntesis y acumulación de compuestos osmóticamente activos llamados osmolitos biocompatibles. El término biocompatible se le ha dado a estas sustancias en virtud de que presentan baja interferencia en el funcionamiento de las macromoléculas, incluso a elevadas concentraciones. Los osmolitos más comunes incluyen azúcares, polioles, ácidos grasos y sus derivados.

Un osmolito que ha recibido mucha atención es la prolina. La acumulación de prolina bajo diferentes condiciones de estrés abiótico ha sido reportada en muchas especies (Delauney y Verma 1993). El papel beneficioso de la prolina en el incremento de la tolerancia a estreses abióticos en las plantas ha sido

demostrado en los últimos años (Hong et al., 2000; Ronde et al., 2000). Sin embargo, en estudios realizados con plantas transgénicas, la magnitud del incremento en prolina parece significativamente demasiado bajo para el ajuste osmótico total de la planta (Zhu 2001), a pesar de existir la posibilidad de que existan elevados niveles de prolina en células específicas o en compartimentos subcelulares.

Además de la función que desempeñan los osmolitos en el mantenimiento del estado natural de las macromoléculas, estos compuestos presentan la capacidad de eliminar las especies reactivas del oxígeno (Hong et al., 2000), aunque en la actualidad no están esclarecidos los mecanismos.

Una vez que las proteínas son inactivadas por el efecto de la presión osmótica, tienen que ser eliminadas para evitar la formación de agregados macromoleculares. En este caso, las células inician la degradación de las proteínas dañadas o la destrucción completa de la célula (apoptosis), ambos procesos han sido observados en las células de plantas estresadas (Katsuhara 1997). El mayor sistema proteolítico en eucariontes es la degradación mediada por ubiquitinas en el proteoma (Ciechanover et al., 2000).

4.2. Homeostasia iónica

El mantenimiento de la homeostasis iónica en las plantas es un factor crítico para combatir el estrés por altas concentraciones de sales. Los procesos más importantes para el mantenimiento de la homeostasis iónica constituyen: la acumulación celular, secuestro y exportación, y el transporte de iones a larga distancia. Estudios sobre regulación de genes han sugerido que varias ATPasas, canales proteicos para el paso del agua y transportadores iónicos son regulados por el estrés salino tanto a nivel de transcripción como a nivel de biosíntesis de proteínas.

El papel de varios de los transportadores iónicos en las plantas tolerantes a salinidad, ha sido un punto de mucha atención durante los últimos tiempos. Se han obtenido grandes progresos en la caracterización de transportadores iónicos y la evaluación funcional de los mismos en la tolerancia a este estrés.

En las células de las plantas superiores, los iones Na^+ son excluidos de las células o confinados en sus vacuolas principalmente por bombas Na^+/H^+ (antiportadores), bombas proteicas que hacen uso del gradiente de pH generado por ATPasas H^+ localizadas en la membrana citoplasmática o ATPasas H^+ presentes en el tonoplasto o pirofosfatasa H^+ . Existen varios genes que codifican para antiportadores Na^+/H^+ en el genoma de *Arabidopsis*. El primero de estos genes que fue caracterizado es el *AtNHX1*, el cual codifica para un antiportador de tonoplasto homólogo al antiportador Na^+/H^+ *Nhx1* de levadura (Nass y Rao 1999). La función del gen *AtNHX1* en plantas tolerantes a salinidad fue demostrado por Apse et al., 1999 al concluir que su sobreexpresión confiere tolerancia a salinidad en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Esto indica que la actividad antiportador Na^+/H^+ en el tonoplasto puede limitar la capacidad de las plantas glicofíticas en la acumulación de Na^+ en la vacuola.

4.1.1 Ruta de respuesta iónica

En la ruta de respuesta a estrés iónico se han identificado varios mutantes de *Arabidopsis* hipersensibles a sal (Zhu, 2002). Las pruebas de alelismo por pares cruzados entre los mutantes revelan que estos mutantes se agrupan en 5 categorías de complementación, definiendo 5 genes de tolerancia a la sal: SOS1, SOS2, SOS3, SOS4, SOS5.

SOS1 codifica para un antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática. Mutaciones en SOS1 convierten a plantas de *Arabidopsis* en extremadamente sensibles al estrés por sal y requieren de mayores niveles de K^+ para un crecimiento normal (Shi *et al.*, 2000). SOS1 es esencial para la homeostasis iónica (Shi *et al.*, 2003). Recientemente se han obtenido plantas transgénicas de *Arabidopsis* sobreexpresando SOS1 que son más tolerantes a la salinidad que los controles no transgénicos (Shi *et al.*, 2002).

El gen SOS2 codifica una Ser/Thr quinasa (Qiu *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la actividad quinasa del dominio catalítico de SOS2 situado en el extremo N-terminal de la proteína es requerida para la función de SOS2 en la tolerancia a sal (Qiu *et al.*, 2002). El dominio regulador de la región C-terminal de SOS2 es también esencial (Zhu, 2002).

El gen SOS3 es una proteína de unión a calcio que actúa como efector de los mecanismos celulares de señalización por calcio. Se ha demostrado que SOS3 interactúa específicamente con la proteína SOS2 formando un complejo mediado por la señal de calcio en respuesta a estrés salino (Qiu *et al.*, 2002). SOS2 y SOS3 son requeridos para la activación de la expresión de SOS1 que a su vez regula la homeostasis iónica en plantas (Qiu *et al.*, 2002). Por tanto, parece que estos tres genes participan en la misma vía de transducción de señales en respuesta al estrés iónico provocado por el cloruro de sodio.

SOS4, se encuentra presente en todos los tejidos de la planta, codifica una piridoxal quinasa que está implicada en la biosíntesis del piridoxal 5 fosfato, una forma activa de la vitamina B6 (Shi *et al.*, 2002). Se ha demostrado que SOS4 regula la homeostasis de Na^+ y K^+ modulando las actividades de los transportadores de iones (Shi *et al.*, 2002). El gen SOS4, además, complementa un mutante de *Escherichia Coli* defectivo en piridoxal quinasa.

Por último SOS5 codifica una proteína putativa de la pared celular (Shi *et al.*, 2003). SOS5 juega una función importante en la expansión celular en *Arabidopsis* (Shi *et al.*, 2003). Bajo estrés salino los extremos de las raíces del mutante SOS5 se hinchan y el crecimiento radicular se detiene. El fenotipo de hinchamiento celular es causado por expansión anormal de células epidérmicas, corticales y endodérmicas (Shi *et al.*, 2003).

La expresión de SOS1 es fuerte en células que bordean el xilema en la planta. Bajo concentraciones estresantes de sal (100 mM de cloruro de sodio), elevadas concentraciones de Na^+ se acumulan en ápices de mutantes sos1 en comparación con los tipos salvajes (no mutados). Estos resultados sugieren que SOS1 podría extraer Na^+ del xilema y por tanto prevenir un exceso acumulativo de Na^+ en los ápices (Shi *et al.*, 2002). Plantas transgénicas de

Arabidopsis sobreproductoras de *SOS1*, mostraron una mejorada tolerancia y una menor acumulación de Na^+ en el xilema del tallo, así como en el ápice, en comparación con el tipo salvaje. Esto demostró que el exflujo de Na^+ de las células de la raíz y el transporte de Na^+ a larga distancia dentro de la planta bajo estrés salino son regulados por *SOS1* (Shi et al., 2003), el cual en cambio es regulado por el complejo quinasa *SOS3-SOS2*.

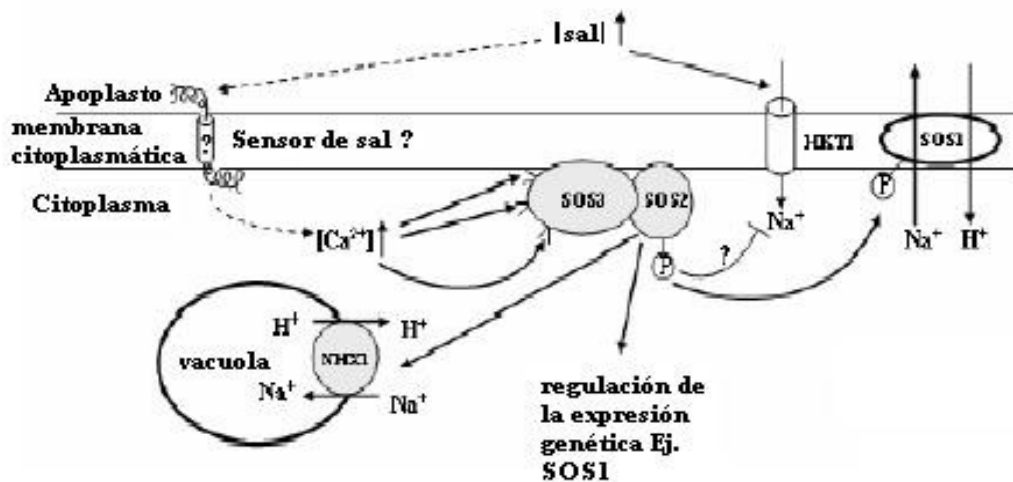


Figura 3. Ruta SOS para la regulación de la homeostasis iónica bajo estrés salino. El estrés salino induce señales de Ca^{2+} que son percibidas por *SOS3*, el cual activa la quinasa *SOS2*. La quinasa *SOS2* activada fosforila la bomba Na^+/H^+ (*SOS1*), la cual entonces bombea Na^+ fuera del citosol. El complejo quinasa *SOS3-SOS2* también regula los niveles de transcripción de *SOS1* y otros genes. También puede regular la acumulación de Na^+ por activación de *NHX1* y también puede restringir la entrada de Na^+ al citosol, por ejemplo inhibiendo la actividad de transportador de iones Na^+ *HKT1* en la membrana plasmática (Viswanathan y Zhu, 2003).

4.2 Detoxificación de compuestos dañinos

4.2.1 Especies reactivas del oxígeno (EROs)

Las especies reactivas del oxígeno son generadas por procesos metabólicos normales como la fotorespiración y la oxidación de ácidos grasos.

El oxígeno tiene un rol vital en la respiración como receptor terminal de electrones, pues se reduce formando agua; pero una pequeña cantidad forma radicales libres al aceptar un menor número de electrones. De este modo el oxígeno puede reducirse sucesivamente al anión superóxido (O_2^-) al incorporar un electrón, a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al aceptar dos y al radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) al aceptar 3 electrones (McCord, 2000).

El peróxido de hidrógeno no es un radical, pero puede generarlos al estar en contacto con iones metálicos como el hierro y el cobre (Kasprzak, 2002).

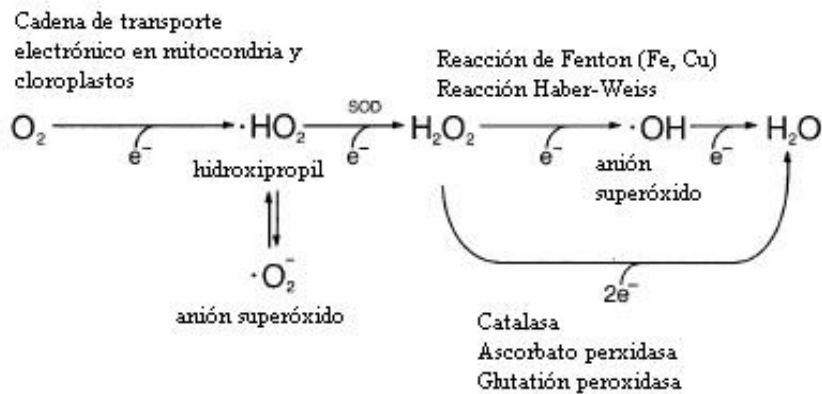


Figura 4. Ruta metabólica de las especies reactivas del oxígeno. Algunas de las enzimas más importantes son ilustradas (Mori y Schroeder, 2004).

Las especies radicálicas del oxígeno son altamente tóxicas e interactúan con moléculas orgánicas tales como proteínas, lípidos, carbohidratos, incluso con el ADN, provocando en ellas diversos cambios estructurales que conducen a alteraciones de tipo funcional (Maher y Schubert, 2000); las cuales repercuten en la fisiología de las células y como consecuencia en la de los organismos (Datta et al., 2000).

Las plantas expuestas a ambientes desfavorables como altas concentraciones de sales, pueden incrementar la producción de EROs tales como singletes de oxígeno, radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$).

4.2.2 Sistemas antioxidantes en las plantas

Las plantas poseen dos mecanismos fundamentales para eliminar las especies reactivas del oxígeno, la vía no enzimática y la vía enzimática, utilizando una batería de enzimas antioxidantes.

Sistema no enzimático

Dentro de los antioxidantes no enzimáticos podemos citar diferentes moléculas de bajo peso molecular como las vitaminas E y C, el glutatión, los β carotenos, los flavonoides y algunos oligoelementos (González y col., 2000). Entre los compuestos citados anteriormente, el más importante es el glutatión, que constituye un componente celular común. Dentro de las funciones biológicas del mismo encontramos el ajuste genético, actúa como precursor en la síntesis de la fitoquelatina y sirve como sustrato a la enzima glutatión S-transferasa.

Sistema enzimático

Las enzimas antioxidantes constituyen un grupo de enzimas que intervienen en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno. Las principales enzimas antiestrés están representadas por: Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POX), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (Zhang et al., 1995; Lee y Lee, 2000). Otras enzimas de este grupo que desempeñan un papel importante son: la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión peroxidasa (GPX) (Payton et al., 2000).

La enzima superóxido dismutasa participa en la dismutación del radical superóxido en agua y peróxido de hidrógeno (Scandalios, 1993). La catalasa por sí misma es capaz de transformar la molécula de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, algo similar a la función que realizan las peroxidasa; sin embargo APX, elimina el H_2O_2 por la vía Asada-Halliwell en un ciclo donde se regenera el ácido ascórbico y participan además otras enzimas como MDHAR, DHAR y GR.

Evidencias recientes indican una relación entre el incremento de las actividades SOD, APX, CAT y GR bajo condiciones de estrés salino y otros tipos de estreses como temperatura y sequía, siendo aun más significativo este incremento en aquellas especies y variedades tolerantes a estos estreses (Sairam et al., 1998; Sairam et al., 2000). De manera similar varios autores han encontrado una incrementada actividad SOD, APX, GR, DHAR, CAT y POX en respuesta al estrés por salinidad, así como una elevada actividad antioxidante en especies y variedades tolerantes (Gómez et al., 1999; Hernández et al., 2000). Este último reportó un incremento en la expresión de ARNm por inducción con NaCl y un aumento de la actividad Mg-SOD, APX, GR y MDHAR en guisante cv. Granada.

En el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, se realizó un estudio de estrés oxidativo inducido por salinidad durante la germinación de semillas de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184. En semillas germinadas en un rango de 0 mM hasta 100 mM de NaCl; la actividad peroxidasa detectada en los extractos crudos de los tallos por el método del guaiacol, mostró un incremento en aquellas plantas germinadas en concentraciones elevadas de NaCl.

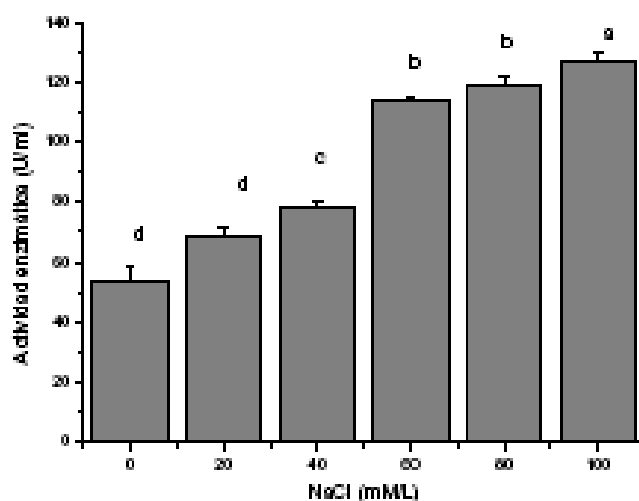


Figura 2. Actividad peroxidasa en plántulas de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184. germinadas en condiciones de estrés por salinidad. Letras diferentes indican diferencias significativas según Prueba SNK.

Zeinab y col. en el 2001 obtuvo incrementos similares en la actividad POX trabajando con cultivares de tomate sometidos a estrés salino con

concentraciones entre 10 mM y 100 mM. Sin embargo, otros estudios con variedades sensibles a NaCl, los niveles de ARNm de las enzimas Mn-SOD, APX, GR y MDHAR no mostraron cambios significativos cuando fueron sometidas a estrés salino (Hernández et al., 1999).

En trabajos con plantas transgénicas de tabaco, Roxas et al., 2000, reportó una sobreexpresión de glutatión S-transferasa (GST) y glutatión peroxidasa bajo variedades de estreses. El tratamiento con estrés salino inhibió el crecimiento del tipo salvaje causando peroxidación lipídica, mientras que las plantas transformadas redujeron el daño oxidativo.

V. Estrategias para mejorar la tolerancia al estrés

Los avances recientes en el mapeo de genomas de plantas y las técnicas de biología molecular, ofrecen una nueva oportunidad para el esclarecimiento de la regulación de los genes involucrados en el estrés salino y los mecanismos en los cuales participan para la recuperación del balance osmótico en las plantas afectadas. Estos avances biotecnológicos proveerán de nuevas herramientas para la siembra de plantas en ambientes estresado. Los mapas genéticos ya han sido desarrollado para la mayoría de los cultivos que incluye el arroz, el trigo, maíz, sorgo y tomate, haciendo esto posible para los científicos localizar características genéticas deseables utilizando los marcadores moleculares. Los marcadores genéticos permiten a los investigadores encontrar loci que controlan la resistencia al estrés sin tener que realizar mediciones fenotípicas, de esta manera se reduce la necesidad de llevar a cabo extensas pruebas de campo ahorrando tiempo y espacio.

Otra estrategia molecular la cual depende de la clonación de genes y la tecnología de transformación en plantas, es la ingeniería genética de genes seleccionados dentro de las líneas élites de cultivo. Las razones que permiten el éxito de los experimentos transgénicos se basan en los siguientes aspectos: los genes de interés, una técnica efectiva para transferir los genes deseados de una especie a otra y las secuencias promotoras para la regulación de la expresión de los genes. Entre estos aspectos el primero constituye el factor limitante. En la actualidad se han realizado numerosos ensayos para aislar aquellos genes cuya expresión es inducido por estrés (Bartels et al., 1993). Los genes que responden ante el estrés pueden ser analizados por dos vías fundamentales. Una de ellas está basada sobre la información bioquímica relevante que puede aportar una enzima, proteína, una reacción bioquímica o un fenómeno de tipo fisiológico. La otra vía es indirecta y está basada por ejemplo, en la hibridización diferencial.

La lista de genes cuya transcripción es regulada en respuesta al estrés crece cada día. El entendimiento de los mecanismos que regulan la expresión de genes y la capacidad para transferir genes de otros organismos hacia las plantas, expandirá las formas en que las plantas podrán ser utilizadas. Para explotar todo el potencial que de estos resultados, es esencial que el conocimiento sea aplicado a importantes especies ecológicas y agrícolas de plantas.

Aunque la estrategia por mejora convencional no ha fructificado en la mayor parte de los casos. Existen algunos ejemplos como variedades de arroz y trigo desarrolladas por medio del cruzamiento con otras variedades.

Las especies autóгамas con muy bajos niveles de cruzamientos como *Stylosanthes guianensis* o por la producción de híbridos estériles en esta especie (Stace y Edye, 1984). Han impulsado el desarrollo de nuevas estrategias con el empleo de diferentes métodos de selección y cruzamiento (CIAT, 1993, Cameron et al., 1997). Varios autores han sugerido el empleo de técnicas de cultivo de tejidos y diferentes metodologías para la manipulación genética como complemento de los programas de mejora (Consoli et al., 1996; Dornellas, Vieira y Appezato-da- Gloria., 1992; Godwin et al., 1990).

En estudios realizados por Fuentes (2001) se corroboró la posibilidad de obtener regenerantes a partir de los tres explantes de Stylo- CIAT-184 mediante el cultivo *in vitro*, utilizando medios de cultivos adecuados. La búsqueda de nuevos clones mutantes beneficiosos, obtenidos a partir de medios de cultivos inductores de mutaciones, sigue siendo una vía para la mejora de esta especie en particular. De esta forma y unido a la estrategia de buscar rasgos bioquímicos que implique una mayor resistencia a la salinidad como la sobreexpresión de enzimas antioxidantes, estaríamos frente a una alternativa de menor costo y tiempo.

CONCLUSIONES

A pesar de la considerable información que se ha venido acumulando en los últimos años, sobre el efecto de la salinidad en las plantas. Aún se desconocen aspectos moleculares y fisiológicos de las causas y efectos que este estrés medioambiental provoca. En estos tiempos, el estudio sobre los mecanismos que median los procesos de estreses abióticos tiene una gran vigencia dado a que la salinización de los suelos continúa siendo el factor abiótico más importante que afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas y la productividad en el caso de los cultivos agrícolas.

BIBLIOGRAFÍA

Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A. & Blumwald E. (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Arabidopsis*. *Science* **285**, 1256–1258.

Bartels, D. *et al.*, 1993. Desiccation related gene products analysed in a resurrection plant and in barley embryos. In *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress: Current Topics in Plant Physiology* (eds Close, T. J. and Bray, E. A.), An American Society of Plant Physiologist Series, Rockville, Maryland, pp. 119–127.

Cameron, D. F.; Charchar, M. J. D'A.; Fernández, C. D.; Kelemu, S. and Chakraborty, S. 1997. Biodiversity, epidemiology and virulence of *Colletotrichum gloeosporioides*. III. Field evaluation of *Stylosanthes* species for

anthracnose resistance in their centre of diversity. *Tropical Grasslands* **31**: 402-407.

Ciechanover A., Orian A. & Schwartz A.L. (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessay* **22**, 442–451.

Consoli, L.;Vieira, M. L. C.; Lopes de Souza, C. Jr. and Garcia, A. A. F. 1996. Tissue culture effects on quantitative traits in *Stylosanthes guianensis* (Leguminosae). *Brazilian Journal of Genetics*. **19**: 3, 469-474.

Datta, K., Sinha, S., Chattopadhyay, P. 2000. Reactive oxygen species in health and disease. *Natl. Med. J. India*. **13**:304–310.

Delauney A. & Verma D.P.S. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal* **4**, 215–223.

Dornelas, M. C., Vieira, M. L. C. and Appezatto da Gloria, B. 1992. Histological Analysis of Organogenesis and Somatic Embryogenesis Induced in Immature Tissues of *Stylosanthes scabra*. *Annals of Botany* **70**: 477-482.

Fuentes, Leticia. 2001. Estudio de la organogénesis indirecta de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184. Tesis presentada en opción de la maestría en Biología Vegetal. Universidad de La Habana.

Godwin, I. D., Cameron, D. F. and., Gordon, G. H. 1990. Variation among somaclonal progenies from three species of *Stylosanthes*. *Austr. J. Agric. Res.* **41**: 645- 656.

González, M.C., Betancourt, M., Ortiz, R. 2000. Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*. **25**:1–9.

Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K. & Bohnert H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 463–499.

Hernández JA, Ferrer MA, Jiménez A, Barceló AR, Sevilla F (2001) Antioxidant systems and O₂·-/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol* **127**:817 – 831

Hernandez, J. A., Campillo, A., Jimenez, A., Alarcon, J. J. and Sevilla, F., Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytol.*, 1999, **141**, 241– 251.

Hong Z., Lakkineni K., Zhang Z. & Verma D.P.S. (2000) Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology* **122**, 1129–1136.

Iwata K, Tazawa M, Itoh T (2001) Turgor pressure regulation and the orientation of cortical microtubules in *Spirogyra* cells. *Plant Cell Physiol* **42**:594-598.

Izumi C. Mori and Julian I. Schroeder, 2004. Reactive Oxygen Species Activation of Plant Ca²⁺ Channels. A Signaling Mechanism in Polar Growth, Hormone Transduction, Stress Signaling, and Hypothetically Mechanotransduction. *Plant Physiology*, Vol. 135, pp. 702–708.

Jia W, Wang Y, Zhang S, Zhang J (2002) Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J Exp Bot* 53:2201-2206

Kasprzak, K.S. 2002. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 32:958–967.

Katsuhara M. (1997) Apoptosis-like cell death in barley roots under salt stress. *Plant Cell Physiology* **38**, 1091–1093.

Liu W, Fairbairn DJ, Reid RJ, Schachtman DP (2001) Characterization of two *HKT1* homologues from *Eucalyptus camaldulensis* that display intrinsic osmosensing capability. *Plant Physiol* 127:283-294.

Maher, P., Schubert, D. 2000. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:1287–1305.

Malik, K.A. Aslam, Z and Naqui, M., 1986. Kallar grass-a plant for saline land. The Nuclear Institute for Agriculture and Biology, Faisalabad.

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants, 2nd edition, Academic Press, London.

McCord, J.M. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108:652–9.

Nass R. & Rao R. (1999) The yeast endosomal Na⁺/H⁺ exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiology* **145**, 3221–3228.

Qui, Q., Guo, Y., Dietrich, A.M., Schumaker, K.S., Zhu, J. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:8436-8441.

Ronde J.A.D., Spreeth M.H. & Cress W.A. (2000) Effect of antisense L-proline-5-glutamate carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stress. *Plant Growth Regulation* **32**, 13–26.

Roxas, V. P., Sundus, A. L., Garrett, D. K., Mahan, J. R. and Allen, R. D., Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that over express glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.*, 2000, 41, 1229–1234.
Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* 11:691-706.

Shi H., Ishitani M., Kim C. & Zhu J.-K. (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **97**, 6896–6901.

Shi, H., Lee, B., Wu, S. and Zhu, J. (2003). Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 21:81-85.

Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M. and Zhu J.K. (2002). The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter *SOS1* controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell*. 14:465-477.

Stace, H. M. and Edye, L. A., (eds). 1984. In: *The Biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney: Academic Press,

Uozumi N, Kim EJ, Rubio F, Yamaguchi T, Muto S, Tsuboi A, Bakker EP, Nakamura T, Schroeder JI (2000) The *Arabidopsis HKT1* gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol* 122:1249-1259.

Viswanathan Chinnusamy and Jian-Kang Zhu, 2003. Plant Sal Tolerance. Topics in Current Genetics, Vol. 4. Plant Response to Abiotic Stress.

Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowles RD, Somero GN (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte system. *Science* 217:1214-1222

Zhu J.-K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* **6**, 66–71.

Zhu J-K (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53:247-273.

Zhu, J. K., 2006. Over expression of a delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Trends Plant Sci.* 66–72.

Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.Biol.* 53, 247-273.

