

Provi. T. 14/80

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL ENZIMA H<sup>+</sup>ATPasa,  
COMPOSICION LIPIDICA Y FLUIDEZ EN  
PLASMALEMA Y TONOPLASTO DE RAICES DE  
GIRASOL Y JOJOBA: EFECTO DEL NaCl**

***Pedro Antonio Burgos Bonel***  
**1993**

T  
15  
21

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad  
Fecha 17 NOV. 1993  
ENTREGA 2056

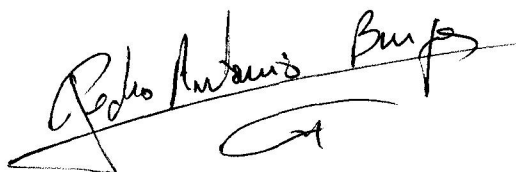
**ESTUDIO COMPARATIVO DEL ENZIMA H<sup>+</sup>ATPasa,  
COMPOSICION LIPIDICA Y FLUIDEZ EN  
PLASMALEMA Y TONOPLASTO DE RAICES DE  
GIRASOL Y JOJOBA: EFECTO DEL NaCl**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
GRANADA  
Nº Documento 59666391  
Nº Copia 21217142

***Pedro Antonio Burgos Bonel***  
**1993**

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL ENZIMA H<sup>+</sup>-ATPasa, COMPOSICION LIPIDICA  
Y FLUIDEZ EN PLASMALEMA Y TONOPLASTO DE RAICES DE GIRASOL Y  
JOJOBA: EFECTO DEL NaCl**

Memoria que presenta el Licenciado en Ciencias  
Biológicas Pedro Antonio Burgos Bonel para optar al  
grado de Doctor



Fdo. Pedro Antonio Burgos Bonel

VºBº

LOS DIRECTORES DEL TRABAJO



Fdo. Juan Pedro Donaire Navarro  
Doctor en Farmacia  
Profesor de Investigación  
del C.S.I.C.



Isabel Agüí Martín  
Doctora en Farmacia  
Profesor titular  
Dpto Biología Celular

La presente Memoria ha sido realizada en la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín del C.S.I.C. con la ayuda de una Beca del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) a través de la Universidad de Granada.

Me gustaría expresar en estas líneas mi agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro me han ayudado durante el periodo de realización de este trabajo, que en alguna medida han ayudado a la finalización del mismo.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a los Directores de esta Tesis Doctoral, Dr. Juan Pedro Donaire Navarro e Isabel Agüí Martín, no sólo por sus valiosas enseñanzas y amplio significado de la investigación que en mí ha confiado, sino también por su ayuda y dedicación al trabajo, y por su gran categoría humana. Todo ello, ha hecho posible la realización de esta Memoria, al tiempo que ha constituido una acertada guía de mi labor.

Agradecer a mis compañeros de laboratorio, Nuria Ferrol, Pilar Rodríguez, Emilia Ballesteros, Andrés Belver, Jose Manuel Moya y Manuel Díaz su gran ayuda y muestras de compañerismo que han hecho posible superar los momentos más difíciles con éxito.

Mi reconocimiento a Dña Concepción Santiago por su ayuda tanto como compañera como por su labor a la hora de la mecanografía de esta Memoria.

Por último, mi gratitud a todas aquellas personas (compañeros del CSIC y amigos) que de una u otra manera han hecho posible que este trabajo viera la luz.

A todos ellos mi más sincero agradecimiento.

# INDICE

<b>I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS</b> .....	1
<b>II. REVISION BIBLIOGRAFICA</b> .....	4
<b>1. JOJOBA Y GIRASOL COMO PLANTAS DE INTERES AGRONOMICO</b> .....	5
1.1 Jojoba ( <i>Simmondsia chinensis</i> (Linch) Schneid) .....	5
1.1.1. Descripción taxonómica.....	5
1.1.2. Condiciones ecológicas para su supervivencia .....	6
1.1.3. Factores agronómicos.....	7
1.2 Girasol ( <i>Helianthus annuus</i> L).....	8
1.2.1. Origen y difusión.....	8
1.2.2. Descripción taxonómica.....	9
1.2.3. Factores ecológicos y agronómicos.....	10
<b>2. PROBLEMATICA DE LA SALINIDAD</b> .....	10
2.1 Límite de supervivencia de las plantas superiores frente a la salinidad.....	11
2.2 Alteraciones a nivel de las membranas.....	12
2.3 Mecanismos de tolerancia a la salinidad .....	13
2.3.1 Aspectos generales de la tolerancia.....	13
<b>3. SISTEMAS DE EXTRUSION DE H<sup>+</sup> EN PLANTAS</b> .....	17
3.1 H <sup>+</sup> -ATPasa de la membrana plasmática.....	20
3.1.1. Descubrimiento y relaciones evolutivas.....	20
3.1.2. Estructura y mecanismos de acción.....	23
3.1.3. Cinética e inhibidores de la H <sup>+</sup> -ATPasa.....	26
3.1.4. Regulación de la actividad H <sup>+</sup> -ATPasa.....	29
3.1.4.1 Regulación por proteínas kinasa.....	30
3.1.4.2 Regulación por lisofosfolípidos.....	32
3.2 Sistemas redox de la membrana plasmática.....	33
<b>III. MATERIAL Y METODOS</b> .....	35

AMATERIALVEGETAL.....	36
B.TECNICASEXPERIMENTALES.....	36
1. ESTUDIOS PRELIMINARES.....	36
1.1. Germinación de las semillas.....	36
1.2. Determinación de la concentración adecuada de NaCl: crecimiento de la raíz, actividad ATPasa y bombeo de H <sup>+</sup> en microsomas.....	37
2. PREPARACIONES DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES.....	38
2.1. Aislamiento de microsomas.....	38
2.2. Purificación del plasmalema.....	39
2.3. Purificación de la membrana vacuolar (tonoplasto).....	39
2.4. Determinación del contenido en proteínas.....	40
3. MEDIDA DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ASOCIADAS A LAS MEMBRANAS PURIFICADAS.....	40
3.1. H <sup>+</sup> -ATPasa.....	40
3.2. DPasa 41.....	41
3.3. NADH citocromo c reductasa insensible a antimicina A.....	41
3.4. NADH ferricianuro oxidoreductasa.....	42
3.5. NADH oxidasa.....	42
4. DETERMINACION FLUORIMETRICA DEL FLUJO DE H <sup>+</sup> .....	42
4.1. Evaluación del registro.....	43
5. ANALISIS LIPIDICO.....	43
5.1. Extracción de lípidos totales.....	43
5.2. Separación de diferentes categorías lipídicas.....	44
5.3. Análisis de ácidos grasos de lípidos totales.....	45
5.4. Análisis de las diferentes categorías lipídicas.....	45



6. PURIFICACION DE ESTEROLES LIBRES .....	46
6.1. Análisis de esteroides libres .....	46
7. DETECCION INMUNOLOGICA DE LA H <sup>+</sup> -ATPasa DE PLASMALEMA.....	46
7.1. Preparación de la muestra.....	46
7.2 SDS-PAGE.....	47
7.3 Electrotransferencia.....	48
7.4. Immunoblotting con el anticuerpo de la ATPasa .....	48
7.5. Tinción de los geles .....	49
8. DETERMINACION DEL GRADO DE FLUIDEZ DE LAS MEMBRANAS .....	50
<b>IV RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
1. ESTUDIOS PRELIMINARES.....	54
1.1. Crecimiento de la raíz, actividad H <sup>+</sup> -ATPasa y de bombeo de H <sup>+</sup> a nivel de microsomas, en función de los tratamientos salinos.....	54
2. PREPARACION DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES: PURIFICACION DE TONOPLASTO Y PLASMALEMA DE RAICES.....	58
3. MEDIDA DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ASOCIADAS A LAS MEMBRANAS PURIFICADAS.....	59
4. EFECTO DEL NaCl EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL ENZIMA H <sup>+</sup> -ATPasa DE PLASMALEMA Y TONOPLASTO .....	68
4.1. Características de la actividad H <sup>+</sup> -ATPasa deplasmalemaytonoplasto.....	68
4.1.1. Cinética enzimática.....	68
4.1.2. Efecto de la concentración de proteína.....	72
4.1.3. Efecto del pH y la temperatura.....	74
4.1.4. Efecto de los iones metálicos .....	74

4.1.5. Efecto de la LFC .....	77
4.1.6. Efecto de inhibidores de la actividad enzimática .....	77
4.2. Características del flujo de H <sup>+</sup> dependiente de ATP	
de plasmalema y tonoplasto .....	94
4.2.1. Cinética enzimática .....	94
4.2.2. Efecto de la concentración de proteínas .....	98
4.2.3. Efecto del pH .....	98
4.2.4. Efecto de la concentración de KCl y CaCl <sub>2</sub> .....	101
4.2.5. Efecto del LFC .....	101
4.2.6. Efecto de los inhibidores .....	101
4.2.7. Efecto de los aniones sobre el flujo de H <sup>+</sup> dependiente de ATP .....	106
5. EFECTO DEL NaCl SOBRE LAS PROPIEDADES FISICO QUIMICAS	
DE LAS MEMBRANAS PURIFICADAS .....	110
5.1. Permeabilidad de las membranas .....	110
5.2. Fluidez de las membranas .....	110
6. EFECTO DE NaCl SOBRE LOS COMPONENTES DE LA MEMBRANA:	
PROTEINAS Y LIPIDOS .....	115
6.1. Perfil proteico .....	115
6.1.1. Detección inmunológica de la ATPasa de plasmalema .....	118
6.2. Composición lipídica .....	118
6.2.1. En raíces .....	118
6.2.2. En membranas microsomales .....	119
<b>DISCUSION</b> .....	126
<b>CONCLUSIONES</b> .....	136
<b>VII BIBLIOGRAFIA</b> .....	138

# **INTRODUCCION**

La salinidad ha constituido un fenómeno importante en la historia de la humanidad y en el sistema agrícola sobre el cual ésta se asentó. Ciertos niveles de salinidad son muy negativos para el desarrollo de las plantas. Las plantas que toleran ambientes salinos desarrollan una serie de mecanismos de resistencia encaminados a la supervivencia en dichos ambientes. Entre estos mecanismos nos encontramos la compartimentación celular y los mecanismos de transporte a través de las membranas, capaces de bombear hacia el exterior o hacia la vacuola gran parte de las sales que difunden. El potencial electroquímico de protones (creado por las bombas electrogénicas como las ATPasas y cadenas redox) pueden conducir a la salida de  $\text{Na}^+$  del citoplasma mediante un antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a nivel del plasmalema y/o tonoplasto. Por ello, el estudio del transporte de  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  es esencial para determinar la resistencia de los cultivos a la salinidad.

En todos estos fenómenos, la composición de las membranas (lípidos y proteínas) resulta esencial en la resistencia de estas plantas a dicho estrés ya que va a determinar las propiedades y características de las mismas. La integridad de la membrana va a determinar el flujo de sustancias a través de ella y la permeabilidad selectiva, que es de gran importancia en la tolerancia al estrés salino.

Por tanto, el estudio del efecto del estrés salino sobre la actividad bombeadora de  $\text{H}^+$ , ATPasa, composición lipídica y protéica de las membranas, es importante para conocer el papel de éstas en el mecanismo fisiológico de la tolerancia. En este contexto, el aislamiento y purificación de las vesículas de plasmalema y tonoplasto representa un apoyo experimental clave para el estudio de los procesos de transporte.

Un mejor conocimiento de las respuestas bioquímicas y fisiológicas que gobiernan la adaptación permitiría aumentar las áreas cultivables tan necesarias para obtener alimentos y fibras en una sociedad donde la población está en constante aumento. En este sentido un estudio de los mecanismos de resistencia de plantas con diferente tolerancia a la sal como son la jojoba

(*Simmondsia chinensis* Link, Schneid.) y el girasol (*Helianthus annuus* L.) permitiría un mejor conocimiento de alguno de estos mecanismos de resistencia a este estrés ambiental así como la selección de clones más tolerantes a zonas áridas y semiáridas de Andalucía.

El trabajo se ha enfocado hacia el estudio y caracterización del efecto del estrés salino sobre la actividad ATPasa y la actividad bobeadora de H<sup>+</sup> en vesículas de plasmalema y tonoplasto purificadas de raíces de plántulas de girasol y jojoba crecidas en cultivo hidropónico bajo diferentes concentraciones salinas. Así como, se ha estudiado el efecto del estrés por NaCl sobre el porcentaje de ácidos grasos de lípidos totales de membranas microsomales de ambas plantas.

**R E V I S I O N**  
**BIBLIOGRAFICA**

## 1. JOJOBA Y GIRASOL COMO PLANTAS DE INTERES AGRONÓMICO.

### 1.1. JOJOBA, *Simmondsia chinensis*(Link) Schneid.

La jojoba es una planta en expansión, debido a que sus semillas poseen una elevada cantidad de ceras líquidas. Estas ceras se usan casi exclusivamente en la industria de cosmética ya que, al estar el cultivo en fase de selección, sus semillas alcanzan un elevado precio en el mercado que sólo puede soportar esta industria. Sin embargo, otros usos podrían ser: como lubricante, capaz de soportar altas temperaturas y presiones; agente graso conservador, en el teñido de la industria del cuero; antiespumante, en la fabricación de penicilina; fuente de ácidos y alcoholesalifáticos de cadena larga; así como en la fabricación de ceras sólidas, champús, barnices y pinturas.

Una vez extraídas las ceras de la semilla, queda un residuo rico en proteínas (26%) que podría ser utilizado como alimento para el ganado, siempre que se eliminen previamente las toxinas existentes en el mismo (los glucósidos cianogénicos simondsina y simondsina-2-ferrulato) (García-Berenguer, 1984).

Por último, esta planta, al estar adaptada a climas áridos y semiáridos, con bajo aporte de agua y elevada salinidad, puede utilizarse contra el proceso de desertización.

#### 1.1.1. Descripción taxonómica.

La jojoba fue descrita en 1821 por Link, el cual la denominó *Buxus chinensis* (fam. *Buxaceae*). Posteriormente, Nutt (1884) la llamó *Simmondsia californiana*, siendo Schneider en 1907 quien le dió el nombre con el que se la conoce hoy en día de *Simmondsiaceae* dentro del orden Euphorbiales.

Se trata de un arbusto frondoso, xerofítico, dioico, aunque existen variedades salvajes monoicas poco productivas, perenne y provistos de un sistema radical pivotante. Sus hojas son pequeñas, opuestas, sésiles, ovaladas o lanceoladas, gruesas, de consistencia coriácea, cuyo mesófilo sólo contiene parénquima en empalizada y gran número de haces conductores de diámetro pequeño. Las flores son pequeñas, actinomorfas, hipoginas, apétalas y unisexuales, conteniendo las masculinas 10-12 estambres, solitarias o en razimos y las femeninas de color pardo, generalmente solitarias, con un gineceo sincárpico tricarpelar, con un óvulo anátropo por lóculo, con estigmas decídúos y endospermo de

desarrollo nuclear.

El fruto es una cápsula loculicida, con una única semilla en la mayoría de los casos, rara vez con dos o tres semillas. Estas son oleaginosas, con dos cotiledones, casi hirsuta de peso, forma, color y contenido de ceras variables (Cronquist, 1981).

### 1.1.2. Condiciones ecológicas para su supervivencia.

Esta planta tiene su origen en el continente americano, estando localizada su área natural entre los 23-31° latitud norte y los 105-125° longitud este (sur de California, oeste de Arizona, norte de la baja California). En la tabla 1 se muestran las condiciones ambientales de estas regiones.

En cuanto al suelo, es una planta rústica, es decir, puede crecer en un número variable de suelos, mientras éstos presenten un buen drenaje (textura gruesa, liviana o media) con buena penetración de H<sub>2</sub>O. El pH del suelo puede variar entre 5 y 8. Soporta suelos salinos y alcalinos e irrigación con agua salada. Se encuentra formando parte del bosque espinoso o bosque de leguminosas con espacios intermedios ocupados por estratos abiertos de arbustos o suculentas perennes (Spinzi, 1984).

Tabla 1. Condiciones ambientales de las áreas geográficas donde se localiza la jojoba.

FACTORES	CONDICIONES
Iluminación	13h 30' en invierno
Temperatura	-6 -46°C
Precipitaciones	120 - 500 mm anuales
Altitud	0 - 1500 m

La jojoba no soporta las heladas, sufriendo daños irreparables a temperaturas inferiores a -6°C. Las altas temperaturas (? 50°C) no causan daños aparentes. Su adaptación a estos ambientes (alta temperatura y déficit hídrico) se debe a sus características anatómicas, morfológicas y fisiológicas que al evitar las pérdidas de agua, determinan un uso más eficiente de la misma: hojas con cutícula y paredes epidérmicas gruesas, pelos epidérmicos en las hojas, parénquima lagunar ausente, estomas y cavidad subestomática pequeña, numerosos haces vasculares de diámetro pequeño, existencia de células secretoras de componentes fenólicos, alto porcentaje de materia seca (Benzioni y Dunstone, 1986).



El fuerte desarrollo del sistema radicular le permite la extracción del agua subterránea durante la época de sequía. Así mismo, la disposición vertical de las hojas, provoca que la radiación que recibe sea mayor al amanecer y al atardecer, cuando las tasas de transpiración son bajas (Begg 1980).

Todas estas adaptaciones encaminadas a realizar un control del estado hídrico, tienen como consecuencia que los niveles de intercambio gaseoso sea bajo y, por tanto, el crecimiento es muy lento.

### 1.1.3. Factores agronómicos.

La adaptación que presenta la jojoba para poder vivir en climas áridos y semiáridos reduce la capacidad de competencia con otras plantas en climas moderados, investigándose la selección de variedades más productivas y resistentes, de acuerdo con las siguientes etapas:

- Estudio de la planta en su hábitat natural, lo que permite conocer su ciclo de vida y la respuesta fisiológica al ambiente.

- Introducción en áreas potencialmente adecuadas para su cultivo y comprobación de la respuesta al mismo.

- Comprobación en parcelas experimentales de las líneas seleccionadas frente a diferentes condiciones ambientales.

- Actualmente el cultivo de jojoba se lleva a cabo a partir de semillas, sembrando éstas directamente o realizando en un principio un semillero, el cual es posteriormente trasladado a bolsas y al emplazamiento definitivo (Lemoyne 1981). Así mismo, se está intentando la reproducción vegetativa por medio del entaquillado y por cultivos *in vitro* (García-Berenguer, 1984).

Como la jojoba es una planta dioica y anemógama, es necesario que la plantación conste de un número determinado de pies masculinos y femeninos. En los cultivos comerciales, se ha comprobado que la proporción hembra/macho más adecuada es la de 6/1 (Smith, 1984).

La época de siembra es muy variable dependiendo del país donde se realice. En España, la mejor época de siembra es a finales de primavera, debido a la elevada temperatura que necesita la jojoba para germinar (21-28°C) y a las necesidades de agua en este periodo (García-Berenguer, 1984). En este sentido, para asegurar una buena plantación es necesario

suministrar la suficiente humedad en los primeros estadios de la planta y en la época de floración (Benzioni Dunstone, 1986, Hamer, 1984), siendo, por supuesto necesario eliminar las malas hierbas. (Rothman,1984; Spinzi, 1984).

La planta florece aproximadamente a los dos años, estabilizándose los productos a los 4 o 5 años (Garcia-Berenguer,1984).Aunque se trata de una planta de clima árido y semiárido, se ha comprobado que una irrigación y fertilización idóneas provoca un aumento del crecimiento y de la productividad (Benzioni, 1984; Ludeke, 1984).

Las plagas y enfermedades de la jojoba se dan sobre todo en plantas jóvenes, siendo producidas por animales (hormigas, lepidópteros, gusanos, ácaros, etc.)y hongos (*Phytophthora, Fusarium, Rhizoctonia, Verticillium,Phymatotricum, Aspergillus, Penicillium, Colletotrichum*) (Aragao y Oliveira, 1984; Garcia-Berenguer,1984).

Por todo ello, la importancia de este cultivo, tanto desde el punto de vista industrial como ecológico, unido a la similitud entre su área de origen y la región mediterránea, ha provocado que esta especie se introduzca cada vez más en dicha región como alternativa a otras especies industriales en regresión y como freno de la desertización.

## 1.2 GIRASOL(*Helianthus annuus L.*)

El girasol es una planta oleaginosa con un alto contenido de aceite en sus semillas (45-50%), el cual es considerado uno de los mejores aceites vegetales, tanto por su composición de ácidos grasos esenciales para la nutrición animal y humana, como por su contenido de provitaminas y vitaminas liposolubles (A,D y E).

El aceite de peor calidad es utilizado en la industria como lubricante y para la obtención de jabones, tintes y papel. Los residuos (torta) del girasol, de alto contenido y calidad de proteínas obtenidas tras la extracción del aceite, se utilizan para la alimentación del ganado; además el girasol se usa como planta forrajera, cuando se recolecta en el momento de la floración y como planta melífera por la calidad de la miel.

En España, a partir de 1963, las áreas de cultivo del girasol aumentaron en gran escala, siendo Andalucía, Castilla-La Mancha y Extremadura las regiones con mayor dedicación a este cultivo (Del Valle, 1987).

### 1.2.1. Origen y difusión

En 1753, Linneo realizó las primeras descripciones considerando a la planta originaria

de México, Virginia y Canadá, en donde crece de forma espontánea. En la actualidad la mayor parte de las variedades de girasol (Peredovick, Smena, Issanka, Récord) utilizadas son originarias de Rusia, que sigue siendo el principal productor. La necesidad de obtener híbridos que mantengan una variabilidad genética, resistente a enfermedades, ataque de insectos, salinidad, etc., con una alta calidad de las semillas, es el desafío que en la actualidad tienen planteado los investigadores en el campo de la Mejora Vegetal.

La diversidad genética del girasol cultivado, puede conseguirse por cruce con especies salvajes de *Helianthus*, constituyendo la exploración para la localización y recogida de especies salvajes uno de los procesos más difíciles para la conservación de la diversidad genética (Seiler, 1988). A este respecto, el conocimiento del habitat de las especies naturales de girasol es importante como fuente de las características específicas que se necesiten. De aquí, la importancia de la preservación del germoplasma como fuerza de variabilidad genética (Laferriere, 1986). Por ejemplo, algunas especies nativas de regiones salinas pueden poseer genes de resistencia a la salinidad, habiéndose encontrado variedades de *Helianthus annuus* que tienen una resistencia a este factor muy elevada, algunas de las cuales sobreviven a concentraciones salinas de hasta 800 mM (Chandler y Jan, 1984).

Por todo ello, es posible concluir que, aún quedando mucho potencial genético por explotar para adaptar el girasol a ambientes estresados, el género *Helianthus*, además de constituir el stock genético básico del girasol cultivado, aporta características específicas para la mejora del cultivo.

### 1.2.2. Descripción taxonómica.

En 1756, Linneo describe 9 especies del género *Helianthus*, añadiendo posteriormente otras dos especies. Más recientemente, Schilling y Heise (1981) agruparon a los diferentes individuos descritos en 49 especies y 19 subespecies. Gran parte de la confusión creada, a la hora de clasificar las especies de girasol, se ha debido a la existencia de un gran número de híbridos interespecíficos en el género y a los diferentes niveles de ploidía de algunas especies, que determinan que los taxonomistas no pueden definir fácilmente las especies puras.

Las especies más conocidas son, *Helianthus annuus* y *Helianthus tuberosus*, siendo la primera la especie cultivada. Esta es una planta de la familia de las Compuestas, dentro del orden Asterales; herbácea, anual, cuyo ciclo de vida oscila entre 120-150 días. La raíz

pivotante llega a los 2 metros de profundidad, con numerosas raíces secundarias cerca de la superficie del suelo, y el tallo vigoroso, erecto, de 1 a 3 metros de altura, cilíndrico, con la parte externa asurcada, pubescente y fistuloso. Las hojas grandes, con el limbo muy desarrollado y largo peciolo, alternas, ovaladas, de borde aserrado y superficie áspera, y las flores son sésiles, reunidas en capítulos; las marginales (flores liguladas) son lanceoladas y estériles, sirven para atraer a los insectos; las flores tubulares son hermafroditas con corola gamopétala, actinomorfa y ovario ínfero unilocular. Tiene fecundación cruzada por medio de insectos y el fruto es un aquenio, comprimido y alargado (7-17mm).

### 1.2.3. Factores ecológicos y agronómicos.

Temperatura, humedad y suelo son los principales factores ambientales que determinan el crecimiento del girasol. La planta crece bien en regiones de clima templado o templado cálido, con temperaturas relativamente altas (25°C) y ausencia de heladas. Sin embargo se adapta bien a las oscilaciones de temperatura, por lo que puede cultivarse en un amplio rango de condiciones climáticas

Requiere lluvias regulares, tanto en la fase de crecimiento como en la de formación y llenado de semillas. Puede resistir la sequía, debido a la capacidad de su sistema radicular de explorar y obtener agua de las capas profundas del suelo y por soportar la deshidratación temporal de sus tejidos. Así mismo, se adapta mejor en terrenos arcillo-arenosos, permeables, con agua freática más bien superficial y ricos en materia orgánica.

Tras el laboreo, para conservar la estructura del suelo y mejorar la utilización de los elementos nutritivos y el agua, se procede a la siembra. Esta, ha de realizarse con humedad y temperatura óptimas. El abonado debe llevarse a cabo en profundidad para que sean bien aprovechados por el cultivo, recomendándose que éste no se realice durante más de cuatro años consecutivos en el mismo suelo, así como un adecuado control fitosanitario (Del Valle, 1987)

## 2. PROBLEMATICA DE LA SALINIDAD.

La salinidad ha constituido un fenómeno importante en la historia de la humanidad y en el sistema agrícola sobre el cual ésta se asentó. En la actualidad este problema en

agricultura queda limitado a las regiones áridas o semiáridas, donde las precipitaciones son bajas y la sal no es lixiviada de la zona del suelo en la que crecen las plantas.

A causa de la salinización, grandes áreas geográficas no son aptas para la agricultura y, otras muchas, están en peligro de perderse debido a que la mayoría de las plantas de cultivo son muy poco tolerantes a este factor ambiental. Parte de estas áreas podrían convertirse en zonas agrícolas productivas siempre que fuera posible resolver alguno de los siguientes aspectos tecnológicos (Hale y Orcutt, 1982):

-Obtención de una forma de desalinización barata y eficiente del agua marina, utilizable como agua de riego.

-Selección de plantas resistentes y productivas capaces de crecer en medios salinos.

El primer aspecto no se ha conseguido aún, los métodos de desalinización del agua resultan demasiado caros. En cuanto a la selección de plantas, es un aspecto que se encuentra en desarrollo. Sin duda, el mejor conocimiento de los mecanismos de tolerancia a la salinidad permitirá aumentar las áreas cultivables tan necesarias para obtener alimentos y fibras en una sociedad donde la población está en constante aumento.

## **2.1 LIMITES DE SUPERVIVENCIA DE LAS PLANTAS SUPERIORES FRENTE A LA SALINIDAD.**

El estrés salino puede venir determinado por gran variedad de sales: cloruros, sulfatos, carbonatos y bicarbonatos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ; sin embargo, la mayoría de los daños provocados por la salinidad se deben, principalmente, a la presencia de elevadas concentraciones de  $\text{NaCl}$ .

Atendiendo a la supervivencia en medios salinos, los ecólogos clasifican a las plantas de halofitas, que crecen en suelos con altas concentraciones de sal sin sufrir daños aparentes, y glicofitas, que no pueden crecer en presencia de altas concentraciones salinas (Hale y Orcutt, 1982). En cuanto al grado de resistencia a este factor, las halofitas se dividen a su vez en euhalofitas, que toleran una salinidad extrema, y oligohalofitas, que sólo toleran una moderada salinidad. (Takada 1959). Por otra parte, las halofitas que pueden vivir en medios sin sal se les denomina halofitas facultativas (Ungar et al, 1969), mientras que si, tienen requerimientos salinos se les denomina halofitas estrictas u obligadas (Wisemböck, 1969).

A pesar de estas diferenciaciones ecológicas, lo que realmente existe es un espectro continuo de niveles de tolerancia, desde las especies más sensibles, afectadas por 50 mM de NaCl, hasta especies que pueden completar su ciclo de vida en presencia de elevadas concentraciones de NaCl (500 mM).

El límite de tolerancia de las plantas a la salinidad viene determinado, en primer lugar, por una inhibición del crecimiento.

En base a ello los vegetales pueden clasificarse en los grupos indicados en la tabla 2.

Conviene tener en cuenta que los límites de tolerancia de las plantas a la salinidad están afectados por diversos factores, entre los cuales cabe destacar la fase de crecimiento y los agentes ambientales. En relación al primer factor, la tolerancia cambia a lo largo del ciclo de vida de la planta. Así, en algunos casos, las plantas son más sensibles a la salinidad en la época de la floración y germinación (Poljakoff-Mayber, 1972).

Por otra parte, factores ambientales como una alta humedad relativa inducen la tolerancia, debido posiblemente a una disminución de los niveles de transpiración (Hoffan y Rawlin, 1971; Hoffan et al, 1971). Por el contrario, una intensidad luminosa elevada y altas temperaturas, reducen la tolerancia a la salinidad (Nieman y Poulsen, 1971; Françoise y Goodin, 1972).

## 2.2 ALTERACIONES A NIVEL DE MEMBRANA.

Como en el caso de otros estreses, se considera que el daño primario causado por el estrés salino tiene lugar a nivel de la estructura y función de la membrana celular (Greenway y Munns, 1980; Navari-Izzo et al, 1988). La salinidad desorganiza la membrana y altera su permeabilidad, dando lugar a un eflujo de iones al exterior celular (Simón, 1974; Pala et al, 1977). Una variación en el medio iónico produce cambios en la relación proteínas/lípidos de la membrana (Poljakoff-Mayber, 1972), habiéndose establecido la existencia de una fuerte correlación entre salinidad y contenido de esteroides (Kuiper, 1984; Hata et al, 1987; Navari-Izzo et al, 1988). Así, el contenido total de esteroides decrece con la salinidad, manteniéndose constante la razón entre sus diferentes moléculas. Del mismo modo, como se ha indicado anteriormente, la salinidad produce una variación en el patrón protéico de la membrana plasmática de raíces de cebada (Hurkman y Tanaka, 1987).

TABLA 2  
 LIMITES DE TOLERANCIA DE LAS PLANTAS A LA SALINIDAD

	CONCENTRACION DE ClNa mM	TIPO DE PLANTA
I) HALOFITAS	≥400	<i>Suaeda maritima</i> <i>Atriplex nummularia</i>
	>200	<i>Atriplex hastata</i> <i>Spartina townsendii</i>
II) HALOFITAS Y GLICOFITAS		
a) Tolerantes	≈200	<i>Festuca rubra</i> <i>Gossypium</i> <i>Hordeum</i>
b) Intermedias	>100	<i>Lycopersicon</i>
c) Sensible	<100	<i>Phaseolus</i> <i>Glycine</i>
III) GLICOFITAS MUY SENSIBLES	minimas	Citricos Aguacates Frutales de hueso

## **2.3.MECANISMOS DE TOLERANCIA A LA SALINIDAD.**

### **2.3.1 Aspectos generales de la tolerancia.**

Las plantas que crecen en ambientes salinos han de desarrollar mecanismos que les permitan vivir en estos medios. En el esquema 1, se indican las diferentes formas que tienen las plantas para soportar dicho estrés.

Las raíces de plantas que poseen la capacidad de excluir sales tóxicas, deben poseer una impermeabilidad a altas concentraciones de estos iones en el medio externo, lo que consiguen mediante la formación de barreras que impiden la libre difusión (Weatherley,1982; Gorham et al, 1985) tales como:

- Suberización de la pared celular de la endodermis, lo que implica que el agua tenga que fluir a través de la membrana celular, poco permeable al  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ .
- Formación de una segunda endodermis por suberificación de las paredes celulares del córtex interno.
- Disminución de la permeabilidad de las capas epidérmicas por pérdida de pelos radicales, así como suberificación de la exodermis o formación de una peridermis.

A nivel celular, el mantenimiento de la permeabilidad diferencial de la membrana depende del balance entre iones monovalentes ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ ) y divalentes (principalmente  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Levitt, 1972; Greenway y Munns, 1980; Ben-Hayyim et al,1987;Cramer et al, 1987). Cuando se produce un desequilibrio, por elevadas concentraciones de  $\text{Na}^+$ , la permeabilidad aumenta, provocando la entrada masiva de  $\text{Na}^+$  en la célula por influjo pasivo.

La excreción de sales, requiere la presencia de una bomba de  $\text{Na}^+$  en el plasmalema, que funciones en presencia de altas concentraciones externas de este catión (Tal,1985).

El mecanismo de dilución de sales es la causa del fenómeno de succulencia, dependiente del mantenimiento de paredes celulares delgadas y con alta plasticidad. Esto permite al tejido una expansión celular continuada, siempre que haya tenido lugar una absorción suficiente de agua capaz de contrarrestar los incrementos de sales en el citoplasma (Hale y Orcutt, 1982; Munns et al, 1983).

Las plantas pueden tolerar el estrés salino, bien impidiendo la formación de un desequilibrio en el balance iónico, secretando sales a la vacuola, o bien, tolerando dicho desequilibrio mediante la formación de compuestos solubles y estructuras de membrana,



capaces de mantener las actividades bioquímicas de la célula frente a los cambios iónicos inducidos por la salinidad (Lerner, 1985).

El primer mecanismo es similar al de tolerancia osmótica. En soluciones hipertónicas las plantas mantienen su turgor incrementando la concentración de sales o de solutos orgánicos (Hale y Orcutt, 1982; Tal, 1985). Ya en 1955, Arnold admitió que la absorción de iones puede ser utilizada por las plantas como principio osmótico para compensar la disminución del potencial hídrico externo (Greenway y Munns, 1980; Wyn Jones y Gorham, 1983; Binzel et al, 1988). En los microorganismos las altas concentraciones internas de sales parecen deberse a una alta permeabilidad celular y a la ausencia de bombas de extrusión de  $\text{Na}^+$  a nivel de plasmalema. Así, en especies halofíticas como *Avicenia nítida*, se ha comprobado la existencia de bombas de  $\text{Na}^+$ , las cuales se inhiben a altas concentraciones de este ión (Gess 1970).

En plantas superiores la situación es más compleja que en microorganismos debido, sobre todo, a los fenómenos de transporte desde la raíz a la parte aérea. La diferencia más notable entre especies tolerantes y sensibles a la salinidad, se refiere a una mayor velocidad de transporte de  $\text{Na}^+$ , en la tolerante, desde la raíz al brote (Erdey y Kuiper, 1979).

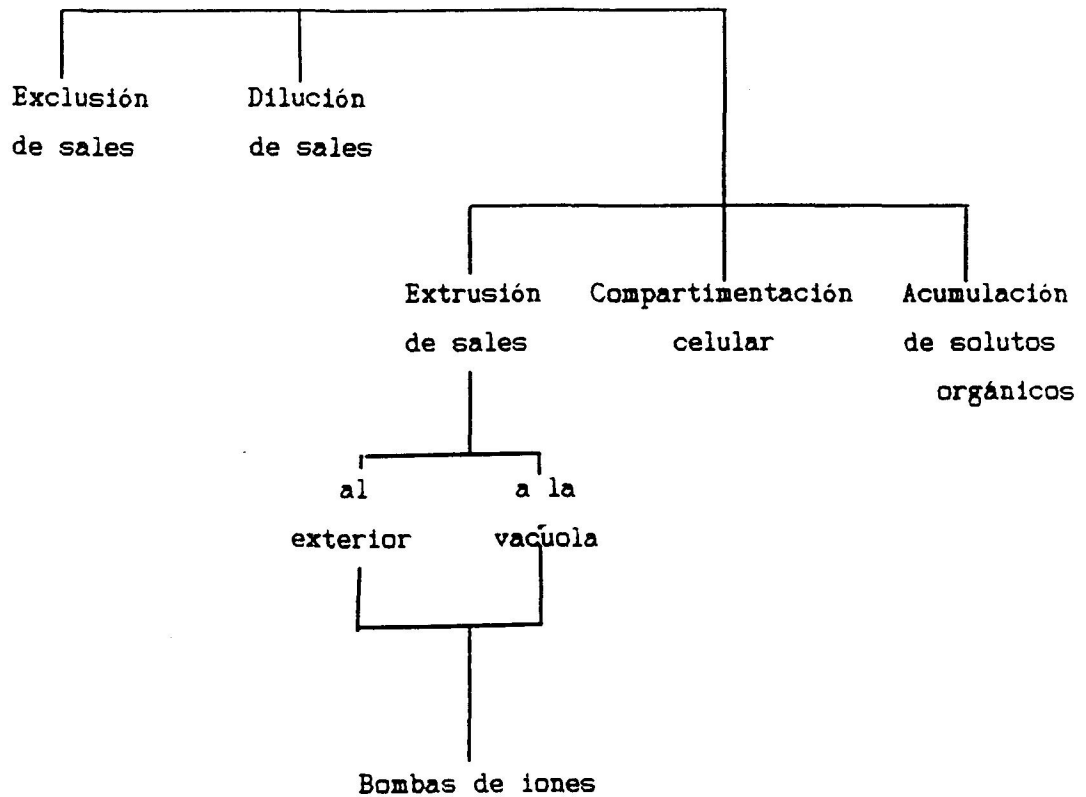
En la planta sensible un menor transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea es debido a una extrusión activa de este ión a nivel del xilema, vía células de transferencia, durante el transporte ascendente (Johanson y Cheesman, 1983; Johanson et al, 1983; Gorham, 1985). En el caso de halofitas, la absorción y transporte de  $\text{Na}^+$  es más pronunciado que en las especies moderadamente tolerantes, siendo el ajuste osmótico principalmente debido a la absorción de  $\text{Na}^+$  (Munns et al, 1983). En algunos casos se ha sugerido que el  $\text{Na}^+$  puede sustituir al  $\text{K}^+$  en la regulación de ciertas actividades enzimáticas (Flowers y Läuchli, 1983).

La necesidad de eliminar el  $\text{Na}^+$  del citoplasma, para evitar la toxicidad provocada por el ión, hace de la compartimentación una de las características más importantes de la tolerancia a la salinidad. El paso de sodio del citoplasma a la vacuola, provoca la deshidratación de este compartimento, lo cual se evita mediante un rápido ajuste osmótico por solutos orgánicos compatibles (Stewart et al, 1977; Storey y Wyn Jones, 1977; Reed et al, 1986; Binzel et al, 1988).

Los solutos orgánicos requeridos para el mantenimiento del equilibrio osmótico son derivados de polialcoholes y compuestos nitrogenados: glicinabetaína, azúcares (Flowers

Esquema 1. Mecanismos de resistencia al estrés salino que permiten a las plantas la supervivencia en medios con elevada salinidad

MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA SALINIDAD



et al, 1977; Greenway y Munns, 1980; Matoh et al, 1988). Todos ellos, además de contribuir al balance osmótico en el citoplasma, ejercen un efecto protector frente a la presencia de elevadas concentraciones de electrolitos. Paleg (1981) propuso que estos solutos osmorreguladores estabilizan ciertas enzimas protegiéndolos contra posibles cambios conformacionales causados por iones minerales (Greenway y Munns, 1980; Incharoensakdi et al, 1986).

La tolerancia del desequilibrio del balance iónico ha sido explicado por un rápido cambio en el mecanismo de la planta (Strogonov 1964). Aún no se conocen cuáles son los compuestos específicos que deben formarse ante un balance iónico alterado, aunque para numerosos autores podría tratarse de proteínas (Ericson y Alfinito, 1984; Sing et al, 1984; Sing et al, 1985; Sach y Ho, 1986; Hurkman y Tanaka, 1987). Así, en las bacterias euhalofitas obligadas, algunos enzimas son inactivados irreversiblemente en ausencia de altas concentraciones salinas. Por el contrario, en plantas halofitas y glicofitas se ha comprobado que muchos sistemas enzimáticos presentan la misma sensibilidad a la sal, lo que podría ser explicado por la fuerte compartimentación del  $\text{Na}^+$  en las halofitas (Greenway y Osmond, 1972; Greenway y Munns, 1980; Hajibagheri et al, 1987; Matoh et al, 1988).

Si, como se supone, el efecto primario de la salinidad tiene lugar a nivel de la membrana, el mecanismo de tolerancia tendría que estar relacionado con las propiedades de estas estructuras, dependientes a su vez, de cambios en sus componentes fundamentales (lípidos y proteínas).

### **3. SISTEMAS DE EXTRUSION DE $\text{H}^+$ EN PLANTAS**

La Teoría Quimiosmótica desarrollada por Mitchell (1961) para explicar la transducción energética en la célula (mitocondrias, cloroplastos y bacterias fotosintéticas), alertó a los bioquímicos de la importancia del gradiente de  $\text{H}^+$  en la transferencia energética efectuada a nivel de otras membranas biológicas. Casi una década después de que Mitchel emitiera esta afirmación, las reacciones químicas correspondientes a las oxidaciones biológicas seguían siendo consideradas conceptualmente diferentes de los procesos fisiológicos relacionados con el transporte de iones y control del pH. Así, mientras un grupo de científicos postulaba la existencia de reacciones de óxido-reducción

y reacciones de deshidratación que conducen a la formación de ATP, otros investigadores consideraban que existían flujos iónicos, dependientes de la capacidad de adsorción de iones por los componentes citoplasmáticos y de los mecanismos de transporte activo. De hecho, la única conexión que se estableció entre ambas hipótesis fue la consideración del ATP como la moneda metabólica transferible desde las reacciones bioenergéticas a las de transporte iónico. Sin embargo, a raíz de la hipótesis de Mitchell, se consideró que la finalidad esencial de los sistemas bioenergéticos es almacenar energía, creando una diferencia de potencial electroquímico de  $H^+$ , utilizable para la síntesis de ATP y para el transporte iónico.

Durante el proceso evolutivo de los vegetales fue necesaria la creación de un gradiente electroquímico mediante un bombeo de  $H^+$  para la interconversión de energía. Ello determinó que se elaboraran una gran variedad de sistemas para este propósito, entre los cuales se incluyen determinadas actividades enzimáticas, principalmente ATPasas y estructuras implicadas en cadenas redox (Marré y Ballarin-Denti, 1985; Nelson, 1988).

Aunque existen referencias bibliográficas anteriores a 1960 en relación a la extrusión de  $H^+$  en células vegetales, fue a partir de esta fecha cuando, gracias a estudios electrofisiológicos desarrollados por diferentes investigadores (Higinbotham, 1964; Slayman, 1965; Spanwick y col., 1967), se llegó realmente a la conclusión de que los potenciales de membrana medidos experimentalmente no podían deberse a una simple difusión de iones, sino que más bien parecían ser fuertemente dependientes del metabolismo. Kitasato (1968) demostró estos hechos al comprobar la existencia de bombas de  $H^+$  localizadas en las membranas celulares, cuya actividad se relacionó posteriormente con el nivel de ATP (Slayman y col., 1973), lo que hizo pensar que las bombas de  $H^+$  eran verdaderas ATPasas.

Posteriormente, mediante técnicas fluorimétricas realizadas en vesículas de membranas naturales selladas o en liposomas que contenían ATPasas reconstituidas, se ha podido establecer una relación directa, tanto en plasmalema como en tonoplasto, entre la actividad ATPasa y el flujo de  $H^+$  (Malpartida y Serrano, 1981; Bennet y Spanswick, 1984; Uchida y col., 1985; Sze, 1985; De Michelis y Spanswick, 1986; Hedrich y col., 1986).

Los numerosos estudios realizados en relación con la existencia y caracterización de las  $H^+$ -ATPasas de membranas vegetales (Marré y Ballarin-Denti, 1985; Serrano, 1985;

Kasamo, 1986; Rea y Poole., 1986; Nelson, 1988), ha determinado que, en general, las bombas de  $H^+$  se consideren sinónimos de  $H^+$ -ATPasas. Sin embargo, se han encontrado bombas de  $H^+$  que no se corresponden con ATPasas y que también podrían generar la fuerza motriz protónica necesaria para el transporte de nutrientes, como son las bacteriorrodopsinas (proteínas bombeadoras de  $H^+$  cuya actividad es dependiente de la luz, presentes en bacterias halofíticas),  $H^+$ -PPasas y sistemas redox.

En la actualidad se considera que el transporte activo primario en plantas superiores se realiza mediante sistemas de transporte electrogénico de  $H^+$ , que dirigen la extrusión de  $H^+$  desde el citoplasma hacia el exterior, a través del plasmalema, o bien hacia la vacuola, a través del tonoplasto. La actuación de estas bombas trae como consecuencia una diferencia de potencial eléctrico a nivel del plasmalema y del tonoplasto, así como una diferencia de pH en los principales compartimentos celulares, aproximadamente neutro en el citoplasma y ácido en la vacuola (fig. 1). La extrusión de  $H^+$  se utiliza fundamentalmente para impulsar y regular la velocidad de transporte de diferentes solutos inorgánicos (cationes y aniones) y orgánicos (azúcares, aminoácidos, reguladores del crecimiento...), mediante sistemas de transporte secundario "antiport" o "simport".

Entre los sistemas primarios de transporte electro-génico de  $H^+$  en membranas de células vegetales figuran los siguientes:

- 1)  **$H^+$ -ATPasas:** bombas de  $H^+$  dependientes de la hidrólisis de ATP. Están localizadas en plasmalema y tonoplasto, así como en membranas de mitocondrias, cloroplastos y bacterias fotosintéticas.
- 2) **Sistemas redox:** bombas de  $H^+$  dependientes de NAD(P)H asociadas a procesos de óxido-reducción. Se localizan en el plasmalema, membranas de mitocondrias y cloroplastos y membrana plasmática de bacterias fotosintéticas.
- 3)  **$H^+$ -PPasas:** bombas de  $H^+$  dependientes de la hidrólisis de pirofosfatos. Están localizadas en el tonoplasto, membranas de mitocondrias, cloroplastos y bacterias fotosintéticas.

A continuación se describen los sistemas implicados en la extrusión de  $H^+$  en el plasmalema; prestando una especial atención a la  $H^+$ -ATPasa, generalmente considerada como la principal responsable de la extrusión de  $H^+$  a nivel de la membrana plasmática, hasta el punto de considerarse que cualquier otra alternativa, como el sistema redox, no resulta significativa desde un punto de vista fisiológico (Crane y col. 1985; Sze, 1985; Serrano 1985, 1987).

### **3.1. $H^+$ -ATPasa DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA**

#### **3.1.1 Descubrimiento y relaciones evolutivas**

La existencia de bombas de  $H^+$ , dependientes de ATP, en la membrana plasmática se puso de manifiesto gracias a trabajos fisiológicos sobre el transporte activo (Poole, 1978) y a estudios electrofisiológicos, basados en medidas de potencial eléctrico a través de la membrana plasmática de células de algas (Spanswick, 1981). El trabajo pionero de Hodges y col. (1972) representa el primer paso hacia la caracterización molecular de esta proteína. Estos autores indicaron la presencia, en membrana plasmática parcialmente purificada, de una ATPasa estimulada por  $K^+$ , que era diferente de la ATPasa de cloroplastos y mitocondrias. Posteriormente, la actividad bombeadora del enzima fue demostrada en vesículas de membranas aisladas (Sze, 1985), así como en liposomas reconstituidos que contenían ATPasa parcialmente purificada (Serrano, 1983).

Las diferentes ATPasas identificadas en las membranas biológicas se han clasificado en dos grandes grupos: (E-P) ATPasas y ( $F_0$ - $F_1$ )ATPasas, que difieren en sus características bioquímicas y estructurales (tabla 3). La ATPasa de membrana plasmática de hongos y plantas se incluyen en el grupo de las (E-P)ATPasas, siendo los únicos sistemas de este grupo que, al igual que las ( $F_0$ - $F_1$ )ATPasas, sólo extruyen  $H^+$ .

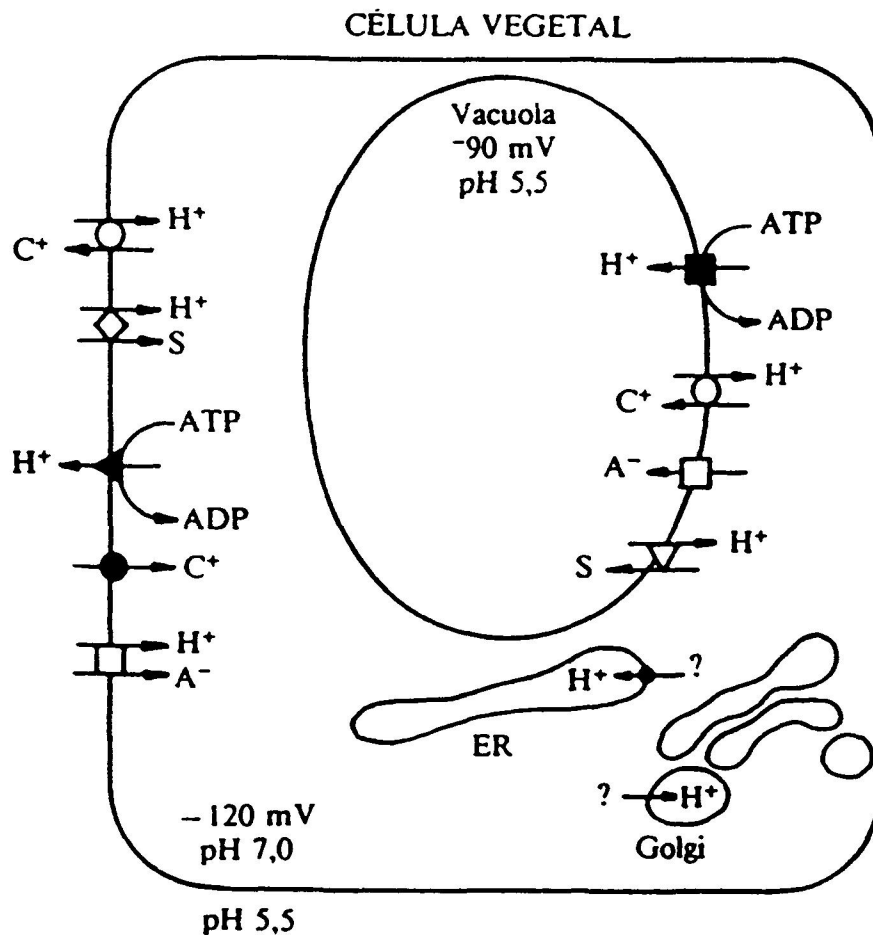


Figura 1. Esquema de actuación de las H<sup>+</sup>-ATPasas (bombas electrogénicas primarias) de plasmalema y tonoplasto y sistemas de transporte activo secundario de solutos acoplado al gradiente de H<sup>+</sup> en una célula vegetal. El transporte de cationes (C<sup>+</sup>), aniones (A<sup>-</sup>) y azúcares (S) se realiza mediante sistemas antiport, simport y uniport. (Tomado de Sze, 1985).

**Tabla 3.** Propiedades de las ATPasas bombeadoras de cationes. (Pedersen y Carafoli, 1987a,b).

	(F <sub>0</sub> -F <sub>1</sub> )ATPasas	(E-P)ATPasas
<b>Membranas</b>	Bacterias Mitochondrias Tilacoides Sistema vacuolar	Bacterias Membrana plasmática Retículo endoplasmático
<b>Catión bombeado</b> Ca <sup>++</sup> /H <sup>+</sup>	H <sup>+</sup>	H <sup>+</sup> , H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ,
<b>Inhibidores</b>	DCCD (10 <sup>-6</sup> M) Nitrato (10 <sup>-2</sup> M)	Vanadato (10 <sup>-6</sup> M)
<b>Subunidades</b> kD	F <sub>1</sub> : 3 catalíticos y 3 de 50-80 kD F <sub>0</sub> : 6-12 proteolípidos de 8-16 kD Otras subunidades en diferentes enzimas	Catalítico de 70-140 kD Otras subunidades de 10-50 en diferentes enzimas
<b>Mecanismo</b> fosfato	Intermediario no fosforilado Cooperación de subunidades catalíticas	Intermediario Acil- Monómero activo

El estudio de la secuencia de aminoácidos, deducida de la correspondiente secuencia de nucleótidos, ha permitido establecer un origen evolutivo diferente para las (E-P) ATPasas y (F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub>) ATPasas. Las relaciones evolutivas entre las diferentes (E-



P) ATPasas ha llevado al establecimiento de 5 niveles diferentes:  $H^+(?)\text{-}K^+\text{-ATPasa}$ ;  $H^+\text{-ATPasa}$ ;  $Ca^{++}/H^+\text{-ATPasa}$ ;  $Na^+/K^+\text{-ATPasa}$  y  $H^+/K^+\text{-ATPasa}$ .

Se considera que todas las ATPasas indicadas proceden de una bomba ancestral común: una  $H^+/K^+\text{-ATPasa}$  similar a las del primer grupo considerado. Posteriormente, el cotransporte de  $K^+$  desapareció al desarrollarse las  $H^+\text{-ATPasas}$  altamente electrogénicas de membrana plasmática de hongos y plantas. La especialización del intercambio  $Na^+\text{-}K^+$  representa una característica distintiva de la ATPasa de la membrana plasmática de animales, probablemente relacionada con condiciones de vida en el mar (alto contenido en  $Na^+$ ). Por último, la sustitución del intercambio  $Na^+\text{-}K^+$  por  $Ca^{++}\text{-}H^+$  fue un importante y complicado paso evolutivo para alcanzar una eficiente homeostasis relacionada con el  $Ca^{++}$ .

### 3.1.2. Estructura y mecanismos de acción

La  $H^+\text{-ATPasa}$  de hongos y plantas superiores existe probablemente como un oligómero de un polipéptido de 100 KD (Dufour y Gofeau, 1980; Bowman y col., 1985; Briskin y col., 1985; Chadwick y col., 1987). Sin embargo mediante experimentos de reconstitución se ha comprobado que el polipéptido simple funciona como tal  $H^+\text{ATPasa}$  (Goormaghtigh y col., 1986).

La figura 2 recoge la estructura específica de la  $H^+\text{ATPasa}$  propuesta por Serrano (1990). La mayor parte de las regiones hidrofílicas del enzima están orientadas hacia el lado citoplasmático de la membrana, mientras que sólo una pequeña proporción de la cadena polipeptídica está expuesta hacia el lado externo. El polipéptido presenta ocho regiones hidrofóbicas que atraviesan la membrana, constituidas por unos 20 aminoácidos, que pueden formar hélice  $\alpha$ , las cuales, junto con los trozos laterales de la membrana, pueden constituir canales transmembranarios. En el enzima existen siete tramos, a los que se denomina "regiones conservadas", en los que la secuencia de aminoácidos es común con el resto de las (E-P)ATPasas. La región conservada 3, que contiene el intermediario fosforilado, estaría localizada en la apertura citoplasmática del canal, en una posición ideal para acoplar el transporte de  $H^+$  con la hidrólisis de ATP. Las regiones conservadas 4-7 constituyen el "dominio de la kinasa" y están involucradas en la unión del ATP y formación de intermediarios

fosforilados. Las regiones 1 y 2 constituyen el "dominio de la fosfatasa", que cataliza la hidrólisis de intermediarios fosforilados.

El **mecanismo de acción** propuesto por Serrano (1990) para las (E-P)ATPasas está recogido en la figura 3. De acuerdo con este modelo las (E-P)ATPasas pueden presentar dos conformaciones que alternan durante el ciclo catalítico. En la conformación E<sub>1</sub> el dominio de la kinasa es activo, pero el dominio de la fosfatasa no lo es, y el centro activo responsable de la unión del H<sup>+</sup> en la entrada del canal, liga a los H<sup>+</sup> con gran afinidad en el lado citoplasmático de la membrana. En la conformación E<sub>2</sub> el dominio de la fosfatasa es activo, mientras que el dominio de la kinasa no lo es, y el centro que liga al H<sup>+</sup> en la entrada del canal queda orientado hacia el lado externo de la membrana, presentando una baja afinidad por el H<sup>+</sup>. Por tanto, para que el enzima complete su ciclo catalítico debe haber una alternancia de ambas conformaciones y de esta forma dirigir el bombeo de H<sup>+</sup>. El cambio conformacional parece estar dirigido por la fosforilación de la región conservada 3 ya que al estar localizada en la entrada del canal, un cambio conformacional concertado puede modificar tanto la afinidad y la orientación del canal como los dominios de la fosfatasa y de la kinasa.

Recientemente se ha establecido que el C-terminal constituye un "dominio autoinhibidor" en la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática (Palmgren, 1991). La eliminación de esta constricción trae como consecuencia la activación del bombeo de H<sup>+</sup> a través de la membrana. La interacción inhibidora entre este dominio y el lugar catalítico parece estar modulada por diferentes mecanismos: unión de moléculas efectoras, fosforilación, control a nivel genético o proteólisis parcial con liberación de un segmento terminal de 7 KDa (figura 4).

En **resumen**, de acuerdo con lo anteriormente expuesto, no se puede esperar que la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática en células vivas esté dirigida por un mecanismo simple. Por el contrario parece más probable que las señales de los factores de crecimiento de las plantas puedan ser traducidas a la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática a través de mecanismos diferentes que puedan modular la actividad del enzima.

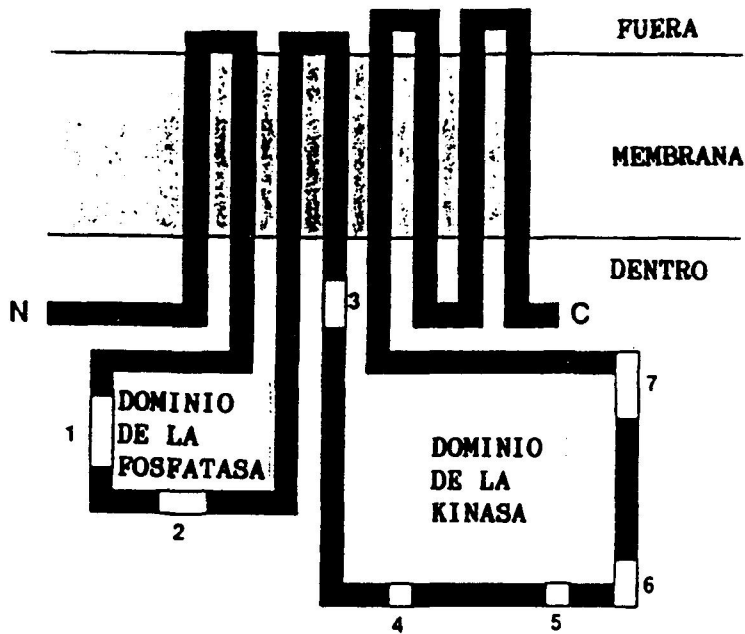


Figura 2 Modelo de la estructura transmembranaria y dominios funcionales de las (E-P)ATPasas, en el que se indica la localización de las siete regiones conservadas. (Tomado de Serrano, 1990).

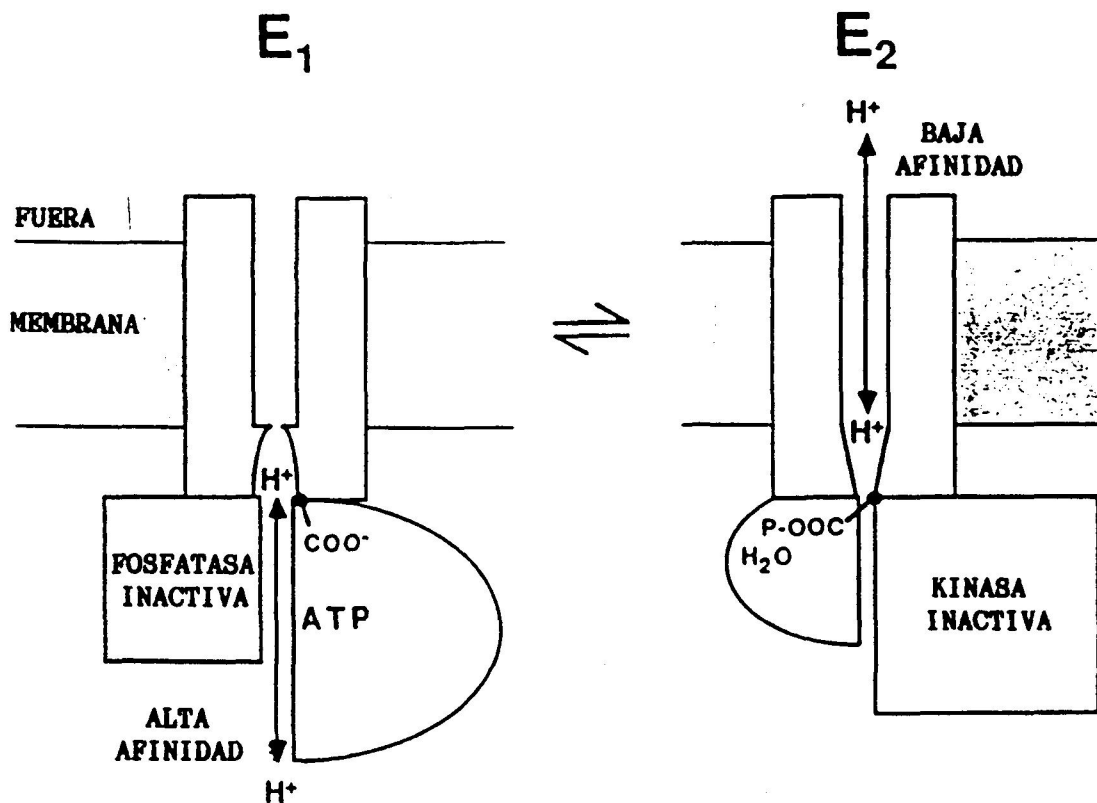


Figura 3. Modelo del mecanismo de acoplamiento de la hidrólisis de ATP y el transporte de  $H^+$  en las (E-P)ATPasas. (Tomado de Serrano, 1990).

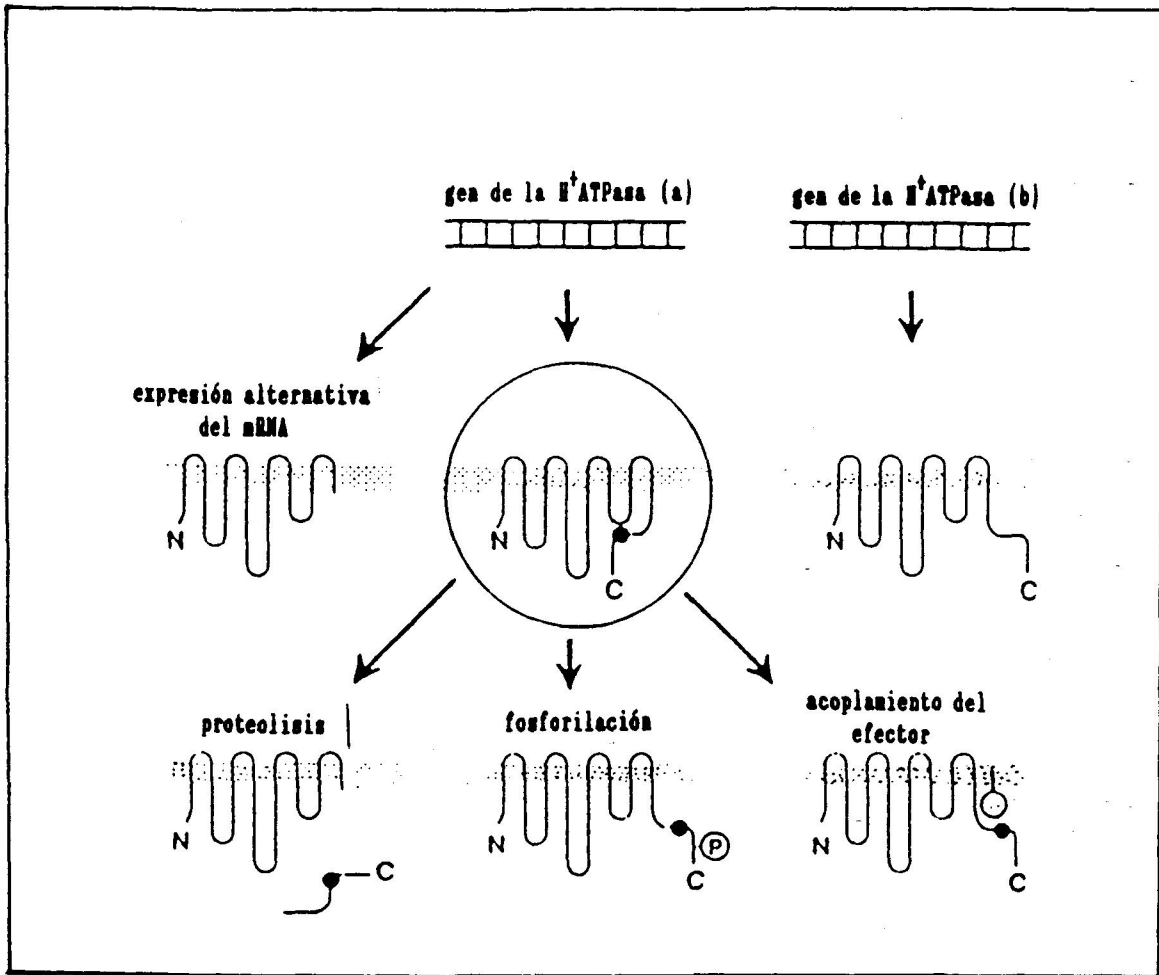


Figura 4. Posibles modos de regulación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática. La presencia de un inhibidor interno en el dominio del C-terminal del enzima implica que puedan existir distintos mecanismos reguladores. (Tomado de Palmgren, 1991).

### **3.1.3. Cinética e inhibidores de la H<sup>+</sup>-ATPasa**

El sustrato específico de la H<sup>+</sup>-ATPasa es el Mg-ATP (Balke y Hodges, 1975; Cocucci y Marré, 1984; Bennet y col., 1985), mientras que otros nucleótidos trifosfatos, ADP o monoésteres fosfato sólo representan del 5 al 10% de la actividad que se obtiene con ATP (Vara y Serrano, 1982; Cocucci y Marré, 1984).

En presencia de Mg-ATP se obtiene una cinética hiperbólica con valores de Km comprendidos entre 0.3 y 0.7 mM, en la que el exceso de Mg libre, ATP, ADP y Pi actúan como inhibidores. Aunque el Mg<sup>++</sup> es probablemente el cofactor fisiológico de la H<sup>+</sup>-ATPasa, puede ser reemplazado por Mn<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup> o Zn<sup>++</sup> (Harada y col., 1990). El Ca<sup>++</sup> no muestra actividad, aunque en presencia de Mg<sup>++</sup> una concentración de 0.2 a 0.4 mM de Ca<sup>++</sup> produce un 50% de inhibición (Vara y Serrano, 1982; Cocucci y Marré, 1984; Kasano, 1986). El K<sup>+</sup> es un activador moderado de la ATPasa de membrana plasmática, presentando a pH ácido una cierta especificidad: (K<sup>+</sup> ≥ Rb<sup>+</sup> ≥ Na<sup>+</sup> ≥ Li<sup>+</sup>), que no se detecta a pH fisiológico (Anton y Spanswick, 1986; Vara y Serrano, 1982).

Un máximo de actividad del enzima H<sup>+</sup>-ATPasa se obtiene a 38°C (Leonard y Hodges, 1973; Cocucci y Marré, 1984), mientras que a 30°C ésta se reduce en un 50%. En relación con la estequiometría H<sup>+</sup>/ATP se han descrito valores comprendido entre 0.8 (Brauer y col., 1989) y 1.0 (Serrano, 1985; Briskin, 1990).

Entre los **inhibidores de la H<sup>+</sup>-ATPasa** de la membrana plasmática figuran los siguientes:

**Cu<sup>++</sup> (SO<sub>4</sub>Cu) y mercuriales (paracloromercuribenceno-sulfonato).** Inhibidores inespecíficos de ATPasas de membrana plasmática, mitocondrial y vacuolar. Su acción se debe al bloqueo de grupos sulfhidrilos del centro activo del enzima (Katz y Sussman, 1987).

**Vanadato.** Inhibidor general de fosfohidrolasas que forman intermediarios fosforilados (Macara, 1980), por tanto también inhibe fosfatasas ácidas (Gallagher y Leonard, 1982). Es un inhibidor efectivo de la ATPasa de membrana plasmática; aunque presenta algunos inconvenientes: es de penetración lenta en células intactas (Ball y

col., 1987); el metabolismo celular lo reduce a vanadil, forma no activa (Willsky y col., 1984); por último, en función del pH y la concentración, tiene tendencia a formar compuestos de coordinación de orden superior (Coen y col., 1986).

**Eritrosina B.** Inhibidor efectivo de la ATPasa de membrana plasmática *in vitro* e *in vivo*; también inhibe la ATPasa vacuolar (Cocucci, 1986).

**DCCD (diciclohexilcarbodimida).** Actúa a nivel de la hidrólisis del ATP impidiendo la fosforilación del enzima (Scalla y col., 1983; Cid y col., 1987). También puede afectar las propiedades de permeabilidad de la membrana plasmática (Borst-Pauwels y col., 1983). La inhibición de la ATPasa de membrana plasmática se debe a la reacción covalente del compuesto con el enzima, en un lugar que no corresponde con el centro activo, ya que el Mg-ATP no protege frente al inhibidor (Cid y col., 1987; Sussman y Surowy, 1987; Oleski y Bennet, 1987).

**DES (Dietilestilbestrol).** Inhibe la ATPasa de membrana plasmática, así como la de membrana mitocondrial y vacuolar (Pedersen y Carafoli, 1987a). Actúa inhibiendo la hidrólisis del ATP y la fosforilación del enzima (Scalla y col., 1983; Cid y col., 1987), así como alterando la permeabilidad de la membrana plasmática (Borst-Pauwels y col., 1983).

La identificación de ATPasa de plasmalema en fracciones microsomales, e incluso en membrana plasmática purificada, es difícil por la existencia en el homogenado de una gran diversidad de enzimas capaces de hidrolizar ATP (Tabla 4). Hasta el momento, no se conocen inhibidores específicos de la ATPasa de la membrana plasmática, por lo que sólo una combinación de varios inhibidores puede constituir un ensayo suficientemente específico del enzima. Así, la actividad fosfohidrolasa medida a pH 6.5 en presencia de ATP,  $SO_4Mg$ ,  $NO_3K$  (inhibidor de la ATPasa vacuolar), azida (inhibidor de la ATPasa mitocondrial y del cloroplasto) y molibdato (inhibidor de la fosfatasa ácida) correspondería a la ATPasa de la membrana plasmática y/o a la apyrasa. De estos dos enzimas, sólo la ATPasa de la membrana

plasmática es sensible al dietilestilbestrol, por lo tanto esta combinación de inhibidores proporcionaría un ensayo específico. Sin embargo, en la práctica esto sólo es posible cuando la ATPasa de membrana plasmática es relativamente abundante (Serrano, 1990).

**Tabla 4.** Enzimas que hidrolizan ATP en homogenados de tejidos de plantas (Serrano, 1990)

Enzimas	pH	sustrato	cofactor	Activadores	Inhibidores
ATPasa mitocondrial y tilacoidal	8-9	ATP>GTP	Mg <sup>++</sup> >Ca <sup>++</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Oligomicina (1µM, sólo mitocondrias) Azida (1mM), Nitrato (50mM), DCCD (1µM)
ATPasa vacuolar	7-8	ATP>GTP	Mg <sup>++</sup> >Ca <sup>++</sup>	Cl <sup>-</sup>	Nitrato (20mM), DCCD (10µM) N-etilmaleimida (10µM), DES (0.1 mM) Eritrosina B (50µM)
H <sup>+</sup> -ATPasa plasmalema	6-7	ATP>>NTP	Mg <sup>++</sup>	K <sup>+</sup>	DCCD (0.1mM), DES (0.1mM) Eritrosina B (50µM), Vanadato (50µM)
Fosfatasa ácida	4-6	ésteres fosfato	Ninguno	Ninguno	Molibdato (0.1mM), Vanadato (0.1mM)
Apirasa	6-7	NTP, NDP	Ca <sup>++</sup> , Mg <sup>++</sup>	Ninguno	No se conocen

### 3.1.4. REGULACION DE LA ACTIVIDAD H<sup>+</sup>-ATPasa

El papel clave atribuido a la H<sup>+</sup>-ATPasa en el metabolismo, ha llevado a considerar que la actividad de este enzima estaría modulada por todos los factores que controlan o alteran la fisiología de las plantas, tales como la luz, el turgor celular, las fitohormonas, fitotoxinas, daños mecánicos y tratamientos térmicos.

La inducción de la apertura del estoma por la luz está basada en la estimulación de la bomba de H<sup>+</sup> de las células de guarda, lo que determina una absorción masiva de K<sup>+</sup> y aumento del turgor (Assmann y col., 1985; Shimazaki y col., 1986; Serrano E. y col., 1988).

La disminución del turgor celular produce un estímulo del bombeo de H<sup>+</sup> (Reinhold y col., 1984; Wyse y col., 1986; Reuveni y col., 1987), lo que parece ser un hecho clave en la osmorregulación. Como en el caso de las células de guarda, la absorción de K<sup>+</sup> se activa de forma secundaria, lo que determina un aumento del turgor.

Prácticamente todas las **hormonas vegetales** interaccionan con el bombeo de  $H^+$ . Las auxinas activan el enzima  $H^+$ -ATPasa de plasmalema en las zonas de crecimiento de la parte aérea, promoviendo la elongación celular (Rayle y Cleland 1977; Marre, 1979; Evans, 1985; Brummell y Hall, 1987;), mientras que las citoquininas activan el bombeo en los cotiledones (Marre, 1979); el ácido abscísico inhibe el bombeo de  $H^+$  en diferentes partes de la planta: en células oclusivas (induciendo el cierre del estoma); en las semillas en germinación (inhibiendo el proceso germinativo); y en raíces (inhibiendo la carga del xilema) (Luttge y Higinbotham, 1979; Marre, 1979).

La fusicoccina (Marre, 1979) y la siringomicina (Bidwai y Takemoto, 1987; Bidwai y col., 1987), **fitotoxinas** producidas por microorganismos patógenos, parece que activan el bombeo de  $H^+$  de todos los tejidos vegetales, a través de un efecto sobre la actividad  $H^+$ -ATPasa de plasmalema.

Finalmente, el bombeo de  $H^+$  también se inhibe por **daños mecánicos** y tratamientos térmicos a altas y bajas temperaturas (Hanson y Trewavas, 1982).

El mecanismo de regulación de la  $H^+$ -ATPasa por estos factores no ha sido aún elucidado. Se ha especulado si las variaciones en el bombeo de  $H^+$  son el reflejo de una modulación a nivel de la cantidad del enzima  $H^+$ -ATPasa o de su actividad. Sin embargo, la rápida respuesta de la mayoría de los efectores sugiere que el mecanismo de acción más probable sería la modificación de la actividad del enzima.

#### **3.1.4.1. Regulación por proteínas kinasas**

Parece que la actividad de la  $H^+$ -ATPasa está regulada por proteínas kinasas, mecanismo regulador más frecuente en eucariotas (Hunter, 1987). La cuestión que se plantea es establecer la naturaleza de la proteína kinasa y de los mensajeros intracelulares que activan estas proteínas kinasas, generadas por los factores externos anteriormente discutidos.

En levaduras el mensajero intracelular que regula la actividad fisiológica de las proteínas kinasas es el cAMP (Hanes y Bostian, 1987), obtenido por actuación de la adenil ciclase activada por la acidificación intracelular. Sin embargo, en plantas no se



han encontrado proteínas kinasas activadas por cAMP (Ranjeva y Boudet, 1987). Por tanto, la naturaleza de los mensajeros intracelulares que activan las proteínas kinasas está por dilucidar. Entre los posibles activadores de las proteínas kinasas en plantas superiores figuran los siguientes:

1) **Concentración micromolar de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular** (Schaller y Sussman, 1988). El mecanismo de regulación del  $\text{Ca}^{++}$  sería el siguiente: un incremento del  $\text{Ca}^{++}$  intracelular determina un incremento de la fosforilación de la proteína, probablemente catalizada por proteínas kinasas activadas por  $\text{Ca}^{++}$ , lo que provocaría una inhibición de la ATPasa. Así, por ejemplo, la respuesta a los choques térmicos y mecánicos parece estar mediada por la absorción de  $\text{Ca}^{++}$  a través de canales abiertos por despolarización (Rincon y Hanson, 1986), lo que podría explicar la inhibición de la ATPasa en tejidos de plantas sometidos a estos tratamientos. Por el contrario, la auxina y la luz, disminuyen el nivel de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular (Hepler y Wayne, 1985), con lo cual se elimina la fosforilación inhibitoria de la ATPasa producida por proteínas kinasas dependientes de  $\text{Ca}^{++}$ .

2) **Acidificación citosólica.** El hecho de que tanto la auxina como la fusicoccina provoquen una acidificación citosólica (Brummer y col., 1985; Felle y col., 1986), así como la activación de la ATPasa de la membrana plasmática y del crecimiento por elongación (Vesper y Evans, 1979; Brummer y col., 1984; Hager y Moser, 1985; Romani y col., 1985), ha llevado a la conclusión de que la acidificación es el primer mensajero intracelular que interviene en la activación de la ATPasa. Una interpretación simple de este mecanismo podría estar basada en el hecho de que el pH óptimo para la actividad de la ATPasa es de 6.5, más ácido que el pH citoplasmático normal (Brummer y Parish, 1983). Sin embargo, a tiempos más largos (más de 30 minutos) la fusicoccina provoca una alcalinización citosólica, durante la cual la bomba de  $\text{H}^+$  permanece activada (Reid y col., 1985; Marre y col., 1986). La explicación de este hecho paradójico podría estar, tal y como se ha descrito en levaduras (Caspari y col., 1985; Purwin y col., 1986), en que una acidificación transitoria dispararía la activación del bombeo de  $\text{H}^+$ , lo que daría como resultado una alcalinización

intracelular. Esta activación estable, desencadenada por la acidificación, podría ser el resultado de la actividad de una proteína kinasa; a este respecto, es sugerente el hecho de que se haya encontrado una proteína kinasa ligada a la membrana plasmática, con un pH óptimo ácido (Schaller y Sussman, 1988). Sin embargo, todavía no se conoce de qué forma la auxina y la fusicoccina pueden aumentar la acidez del citosol.

3) **Turnover de fosfatidilinositoles de plasmalema.** Tanto la luz (Morse y col., 1987; Morse y col., 1989; Memon y Boss, 1989; Memon y Boss, 1990) como la auxina (Ettliger y Lehle, 1988), activan la fosfolipasa C, induciendo rápidos cambios en el nivel de metabolitos de los fosfatidilinositol (inositol trifosfato y diacilglicerol), los cuales parecen estar implicados en la transducción de señales para la regulación de la H<sup>+</sup>-ATPasa. El diacilglicerol es un potente activador de la proteína kinasa C en animales (Nishizuka, 1986) y plantas (Schafer y col., 1985; Olah y Kiss, 1986); no habiendo sido demostrada aún la fosforilación de la ATPasa por proteína kinasa C.

#### 3.1.4.2. Regulación por lisofosfolípidos

Los lisofosfolípidos (detergentes naturales que se forman por la acción de las fosfolipasas sobre los fosfolípidos) son activadores altamente específicos de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática (Palmgren y Sommarin, 1989; Pedchenko y col., 1990). El hecho de que las auxinas activen la fosfolipasa A (PLA) (Scheren y André, 1989) y que esta fosfolipasa se haya encontrado en membrana plasmática (Palmgren y col., 1988), sugiere un efecto de estas hormonas, a través de los lisofosfolípidos, sobre la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática.

Existen pruebas concluyentes de que el efecto estimulante de los lisofosfolípidos no está relacionado con sus propiedades como detergente, al haberse comprobado que a concentraciones micromolares los lisofosfolípidos estimulan el bombeo de H<sup>+</sup> en vesículas de plasmalema de raíces de avena, sin que se afecte la permeabilidad pasiva de la membrana a los H<sup>+</sup> (Palmgren y Sommarin, 1989). El efecto de los lisofosfolípidos podría ser directo (provocando un cambio conformacional que desplazaría el dominio inhibitor), o indirecto, a través de su acción sobre otras

proteínas (por ejemplo una proteína kinasa estimulada por lípidos) (Oishi y col., 1988; Martiny-Baron y Scherer, 1989).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la acción primaria de las auxinas sobre la H<sup>+</sup>-ATPasa se realizaría de acuerdo con el siguiente esquema:

IAA —————> IAA-RAM —————> ★ GTP-proteínas —————> ★ PLA<sub>2</sub>

PLA<sub>2</sub> + fosfolípidos —————> lisofosfolípidos —————> ★ H<sup>+</sup>ATPasa

### 3.2. SISTEMAS REDOX DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Es un hecho actualmente incuestionable que todas las células vegetales contienen sistemas de transporte de electrones transmembranarios capaces de reducir el ferricianuro y otros aceptores exógenos de electrones. Durante varias décadas se ha intentado establecer la posible participación de estos sistemas en diferentes procesos fisiológicos, habiendo sido descartada la existencia de un acoplamiento directo entre la cadena redox y el transporte activo de iones a través de la membrana (Conway, 1951; Lündegardh, 1955; Robertson, 1968), dado el papel predominante de la H<sup>+</sup>-ATPasa en el transporte iónico (Sze, 1985; Serrano, 1985, 1987). Contrariamente, una de las funciones mejor establecidas es su participación en otro proceso relacionado con la nutrición mineral: la reducción de Fe<sup>+++</sup> a Fe<sup>++</sup>, requisito previo para que este elemento pueda ser absorbido a través de la raíz (Chaney y col., 1972). Asimismo, a través de su actividad peroxidásica, interviene en la síntesis de lignina de la pared celular (Elstner y Heupil, 1976; Mäder y Amberg-Fischer, 1982; Halliwell, 1987), en la formación de sustancias antisépticas del tipo de los taninos (Bell, 1981), que formarían parte de las estrategias de las células encaminadas a la defensa frente a agentes patógenos.

Los sistemas redox transmembranarios también parece estar implicados en el

control de la elongación y proliferación celular (Lin, 1984; Crane y col., 1984; Barr y col., 1985; Maller y Berczi, 1986; Morré y col., 1986). Parece ser que esta acción se ejercería a través de una oxidasa específica, activada por auxina, lo que la diferencia del resto de las oxidasas de la membrana plasmática (Morré y col., 1988; Brightman y col., 1988). Igualmente, se ha sugerido una posible participación de estos sistemas en la regulación de la fluidez de la membrana, a través de su asociación con la actividad acil-CoA desaturasa (Holloway, 1971).

Por último, destacar que, aunque el enzima NADPH tioredoxin reductasa, especialmente relacionado con la reducción de grupos disulfuro de proteínas de membrana (Holmgren, 1988), también podría actuar como una NADPH ferricianuro reductasa, dependiendo de su orientación en la membrana, participando en la reducción de ferricianuro, con la consiguiente oxidación del NADPH citosólico.

En la tabla 5 se indican diferentes actividades oxidorreductasas de la membrana plasmática, manifestada a través de distintos sistemas enzimáticos (Crane y col., 1979, 1988).



# **MATERIAL Y METODOS**

## A. MATERIAL VEGETAL

La elección de un material vegetal adecuado es siempre fundamental a la hora de optimizar los resultados de la investigación. Así mismo, la necesidad de minimizar las variables que puedan influir en los procesos a estudio, hace necesario una estandarización, en lo posible, de las condiciones en las cuales deban de realizarse los experimentos.

En los trabajos llevados a cabo en plantas, la concentración del medio nutritivo, las condiciones ambientales, y el estado fisiológico de la planta, son algunos de los factores que afectan profundamente a los procesos de absorción y transporte iónico. Así, la absorción de nutrientes se ven favorecidas bajo condiciones óptimas de aireación, humedad, temperatura y con un aporte mínimo de nutrientes, al inducir en el tejido la aceleración de una serie de procesos fisiológicos que se desencadenan durante el curso normal de la germinación y formación de la nueva plántula (respiración, biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos, síntesis de lípidos de membrana, potenciación de la absorción y transporte iónico).

En el presente trabajo se han utilizado semillas certificadas de girasol (*Helianthus annuus L. var. híbrido simple enano*) suministradas por Koipesol S.A. y semillas de jojoba (*Simmondsia chinensis (Link) Schneid.*) recolectadas de plantas crecidas en campos de experimentación en Sorbas (Almería), y conservadas posteriormente entre 4 y 7°C.

## B. TECNICAS EXPERIMENTALES

### 1. ESTUDIOS PRELIMINARES

#### 1.1 Germinación de las semillas

Al tratarse de plantas leñosas y herbáceas y la inexistencia de un híbrido comercial fijado en el caso de la jojoba (la semilla viene directamente de la planta del campo), el proceso de desinfección de las semillas de partida tuvo que ser diferente para cada planta.

Cien gramos de semillas de girasol se desinfectaron con hipoclorito sódico al 20% durante 15 minutos, lavándose posteriormente con abundante agua del grifo durante media hora, seguido de 3 lavados de 10 minutos con agua destilada. A continuación, se hicieron germinar durante 24 horas entre papeles de filtro humedecidos con agua destilada, al cabo de

las cuales eran traspasadas a cultivos hidropónicos en recipientes de plástico conteniendo la solución nutritiva. El sistema incluía unas mallas de acero inoxidable sobre las que se hacían descansar gasas de 3 mm de diámetro de luz, al objeto de ayudar a la fijación de la plántula durante su crecimiento.

En el caso de la jojoba, las semillas sufrieron una desinfección mucho más fuerte. Así, alrededor de 200 semillas, inicialmente lavadas con jabón, mantenidas durante 1 min. en alcohol y lavadas 1 hora con benlate al 4% (fungicida), fueron desinfectadas con hipoclorito sódico al 20% 15 minutos. Tras eliminar el desinfectante con agua de grifo abundante durante 30 minutos y 3 lavados sucesivos de 10 minutos con agua destilada, se hicieron germinar entre papeles de filtro humedecidos con agua destilada. En estas condiciones, después de 7 días de cultivo se obtenían plántulas con raíces de 3 a 4 cm, las cuales eran transferidas a sistemas hidropónicos similares a los anteriormente descritos para el girasol.

Las plántulas mantenidas en dichos sistemas durante 3 días en oscuridad, 26°C, 70% HR y en  $\text{CaSO}_4$  0.2 mM, eran trasladadas a cámaras de cultivo con condiciones controladas de iluminación ( $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ; día:oscuridad, 16:8 horas), de temperatura (26°C) y humedad relativa (70%), y en solución nutritiva (diluida 1/10) preparada de acuerdo con la fórmula propuesta por Skok (1957), como aporte de los macronutrientes, y por Hoagland (1950), como aporte de los micronutrientes. Para estudiar el efecto del NaCl sobre los parámetros bioquímicos y fisiológicos a investigar, dicha solución ha sido suplementada con las concentraciones de NaCl adecuadas a cada tratamiento. Tras 4 días de tratamientos se procedía a la recolección del material utilizado en los distintos experimentos.

### **1.2 Determinación de las concentraciones adecuadas de NaCl: crecimiento de la raíz, actividad ATPasa y bombeo de $\text{H}^+$ en microsomas**

Se han utilizado diferentes concentraciones salinas para comprobar los niveles límites de toxicidad provocados por el ClNa, como la concentración que inducía una clara senescencia en los tejidos a utilizar, así como aquellas concentraciones que sin provocar cambios aparentes en el crecimiento, pudiera inducir cambios en los parámetros bioquímicos a investigar. El crecimiento de la raíz se ha cuantificado en función de las determinaciones del peso fresco y peso seco. El peso fresco (P.F.) se obtuvo una vez eliminada el agua adsorbida con papel de filtro y el peso seco (P.S.) tras desecar las raíces en estufa a 70°C

durante 24 horas (Lachica 1967). Los resultados se expresan como mg de P.F. ó P.S. por unidad de tejido.

## 2. PREPARACION DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES

### 2.1 Aislamiento de microsomas

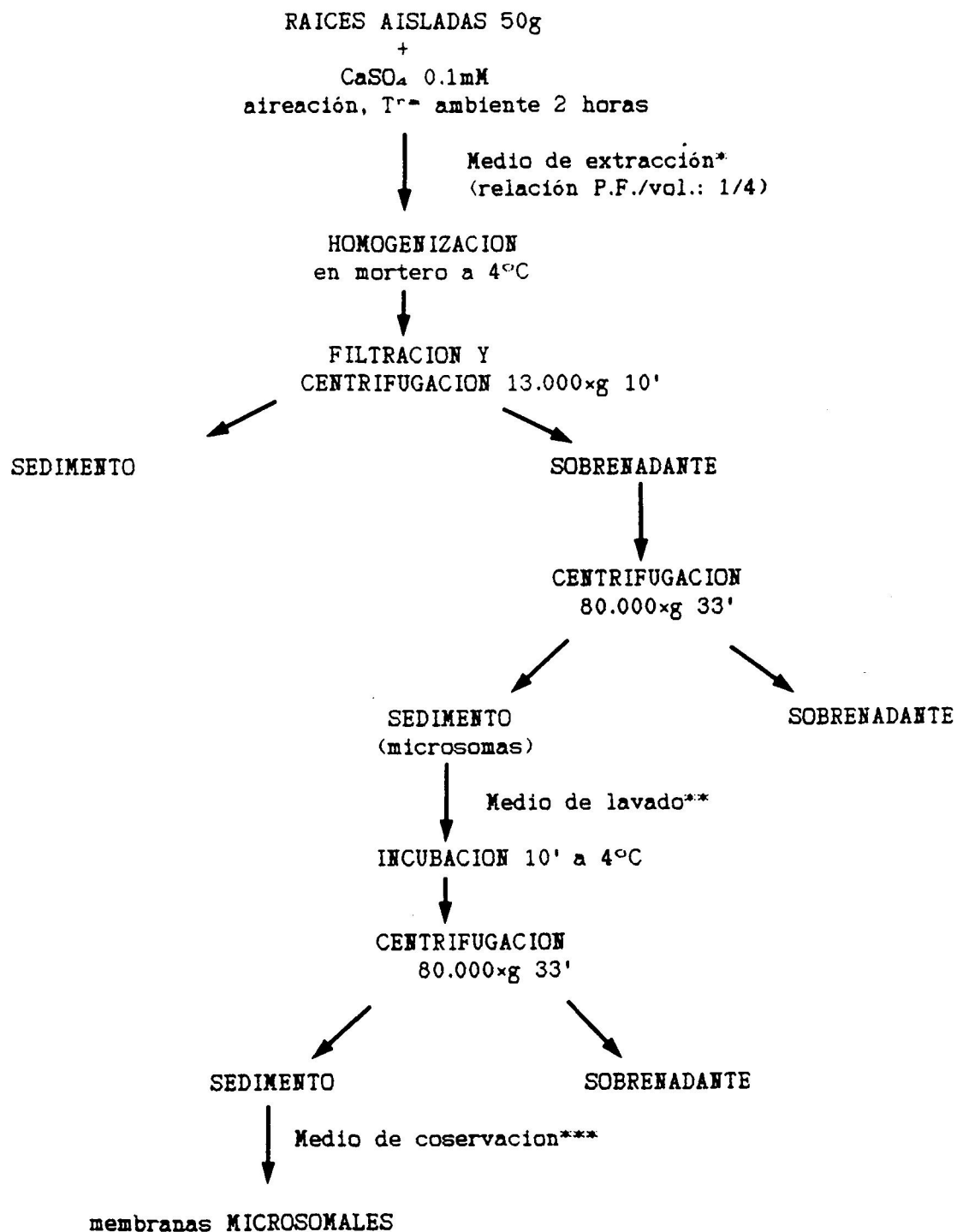
Para la obtención de vesículas microsomales se ha utilizado la técnica propuesta por De Michelis y Spanswick (1986) con algunas modificaciones, la cual permite recuperar un porcentaje muy elevado de membranas.

En el esquema de la figura 4 se indican los pasos seguidos para el aislamiento de microsomas. Para ello, las raíces lavadas con agua destilada para eliminar las sales adheridas, se homogenizan, en mortero a 4°C, con tampón de homogenización manteniendo una proporción 1/3 de peso fresco de raíces por volumen de medio, suplementado con PVPP (10%). El homogenado se filtra a través de 4 capas de gasa, se centrifuga a 3000xg durante 10 minutos, volviendo a centrifugar el sobrenadante a 80000xg durante 35 minutos. El sedimento así obtenido se resuspende en tampón de conservación, almacenándose a -70°C, hasta su utilización.

	Tampón de homogenización	Tampón de conservación
Glicerol	10%	10%
BSA	0,5%	
Tris-Mes pH 7,6	25mM	
Sacarosa	250mM	250mM
MgSO <sub>4</sub>	2mM	
ATP	2mM	
EGTA	2mM	
DTT	2mM	1mM
PMSF	2mM	1mM
Tris-Mes pH 7,0		2mM



Esquema 4 - *Proceso de obtención de una fracción microsomal de raíces de plántulas de girasol con una alta actividad H<sup>+</sup>-ATPasa sensible al vanadato.*



## **2.2 Purificación del plasmalema**

Se utilizó el método de Larson y col. (1987), separándose la membrana plasmática del resto de membranas mediante un sistema de partición de doble fase polímero-acuosa. Se parte del extracto microsomal, 1 ml el cual es adicionado sobre 8 g del sistema de partición de fases que formado por:

- Dextrano T-500 al 6%
- PEG 3350 al 6%
- Fosfato monopotásico 5mM, pH 7.8
- Sacarosa 250mM
- Cloruro potásico 5mM

Se mezcla el conjunto, se centrifuga a 5000xg durante 5 minutos, se toma la fase superior y se añade a una nueva fase inferior, volviéndose a mezclar bien y centrifugándose en las mismas condiciones. La fase superior correspondiente a la segunda partición y la fase inferior de la primera, se recogen independientemente y se diluyen 7 veces en tampón Tris-Mes 2mM pH 7.6, conteniendo DTT 2mM y PMSF 1mM. Tras una centrifugación a 80000xg durante 1 hora se toma el sedimento resultante y se resuspende en el tampón de suspensión de los microsomas, almacenándose en alícuotas de pequeños volúmenes a -80°C hasta su utilización posterior. La fase superior está enriquecida, principalmente, en plasmalema, mientras que la fase inferior lo es en otras membranas y restos de plasmalema.

## **2.3 Purificación de la membrana vacuolar (tonoplasto)**

Una aceptable purificación del tonoplasto se consigue utilizando la centrifugación diferencial en gradiente discontinuo de sacarosa. Para ello, 1ml de la suspensión de microsomas es depositado sobre un gradiente discontinuo de sacarosa preparado a base de 4 bandas conteniendo 45 %, 33 %, 22 % y 16 % (P/P) de sacarosa disuelta en tampón Tris-Mes 5mM pH 7.6, conteniendo DTT 2mM. Se centrifuga el gradiente a 80000xg durante 2 horas en rotor SW28. Las membranas, que se disponen en las interfases 16/22, 22/33 y 33/44, se recogen y diluyen 6 veces con Tris-Mes 2mM pH 7.6, conteniendo DTT 1mM, PMSF 1mM y se centrifugan a 80000xg durante 1 hora. Finalmente, se toma el sedimento de membranas y se resuspende en el medio de suspensión de microsomas. El tonoplasto se acumula entre las fases de 22 % y 33 % de sacarosa.

#### **2.4 Determinación del contenido en proteínas**

La cuantificación de las proteínas de membranas se realizó por el método Bradford ( ), frente a una curva patrón realizada con albúmina bovina.

### **3. MEDIDA DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ASOCIADAS A LAS MEMBRANAS PURIFICADAS**

#### **3.1 H<sup>+</sup> ATPasa**

Se ha utilizado el método de Hodges y Leonard (1974) con algunas modificaciones, basado en la determinación del P<sub>i</sub> liberado por la hidrólisis del ATP (Ames, 1966). Un alicuota la suspensión de membranas (8 µg de proteínas en el caso de las membranas microsomales, 3 µg de proteínas de plasmalema y 5 µg de tonoplasto, respectivamente), se incuban 30 minutos a 30°C en 500 µl de un medio conteniendo BTP-ClH 25mM pH 6.5, KCl 100mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 100µM, MgSO<sub>4</sub> 3mM y ATP-BTP 3mM. Transcurrido ese tiempo se paraliza la reacción enzimática con el reactivo de Ames (ácido ascórbico 10%, molibdato amónico 0.42% y sulfúrico 2%) suplementado con SDS (5%) y se valora espectrofotométricamente a 820 nm el P<sub>i</sub> liberado (espectrofotómetro marca Shimadzu mod. 160) frente a una curva patrón de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Los resultados se expresan en µmol P<sub>i</sub> /mg proteína/h.

Para determinar la proporción de vesículas con orientación invertida como consecuencia del proceso de extracción, se analiza la actividad ATPasa en presencia de lisofosfatidil-colina 0.1 mM (LFC) que actúa como permeabilizante de las membranas. La actividad ATPasa latente se define como la diferencia entre la actividad en presencia y en ausencia de LFC y la latencia como la actividad ATPasa latente expresada en porcentaje de la actividad ATPasa en presencia de LFC (Galtier y col. 1988).

La determinación de la actividad ATPasa en presencia de inhibidores específicos para cada membrana, permite establecer la proporción de las diferentes membranas celulares que existen en los extractos problemas.

#### ATPasa sensible a NO<sub>3</sub>

Se estimó la cantidad de tonoplasto existente en el extracto de membranas como la

actividad  $Mg^{2+}$ -ATPasa sensible a nitrato (O'Neil y col. 1983). La reacción se llevó a cabo a pH 7.5 en presencia de LFP 0.1mM y de KCl ó  $KNO_3$  100mM, definiéndose la actividad sensible a nitrato como la diferencia entre las actividades en presencia de KCl y  $KNO_3$ .

#### ATPasa sensible a $N_3$ .

Se considera que la actividad  $Mg^{2+}$ -ATPasa sensible a azida corresponde a las membranas mitocondriales. Se determina a pH 8.5 en presencia de LFP 0.1 mM, definiéndose la actividad como la diferencia obtenida en ausencia y en presencia de  $NaN_3$  (Galtier y col.1988).

#### ATPasa sensible a ortovanadato sódico e insensible a $NO_3^-$ y $N_3^-$ .

La actividad  $Mg^{2+}$ -ATPasa sensible a vanadato e insensible a nitrato y azida se identifica con el plasmalema, Determinándose a pH 6.5 en medio de reacción conteniendo LFC 0.1 mM,  $NaN_3$  1 mM,  $KNO_3$  100 mM y  $\pm$  vanadato  $250\mu M$  (Serrano, 1990).

### **3.2 IDPasa**

La actividad IDPasa latente corresponde a la actividad enzimática marcadora del aparato de Golgi (Green, 1983). Se determina tomando entre 3 y 8  $\mu g$  de proteína de las membranas problemas e incubándolos en 500  $\mu l$  de medio de reacción (50mM Tris-HCl pH 7.2, 100mM KCl, 3mM IDP, 3mM  $MgSO_4$ , 0.1mM  $NaMoO_4$ ) con o sin LFC 0.1mM durante 30 minutos a 30°C. La reacción se detiene por la adición de 1 ml de reactivo de Ames, y la actividad se determina espectrofotométricamente a 820 nm, utilizando para preparar la curva patrón una solución acuosa de  $KH_2PO_4$ .

### **3.3 NADH-citocromo c reductasa insensible a antimicina A**

El seguimiento de esta actividad enzimática permite cuantificar el contenido en retículo endoplasmático existente en las membranas problemas. La medida se lleva a cabo mediante la adición 50  $\mu g$  de proteínas de membrana en 1 ml de medio de reacción (50mM  $KH_2PO_4$  pH 7.5, 1.66mM KCN,  $30\mu M$  citocromo c oxidado,  $1\mu M$  antimicina A y  $100\mu M$  NADH). Se determina espectrofotométricamente a 500 nm el aumento de densidad óptica debido a la reducción del citocromo c (Hodges y Leonard, 1974). La utilización de un coeficiente de

extinción molar de  $18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  permitió expresar los resultados en  $\mu\text{moles}$  de citocromo c reducidos/mg proteína/hora.

### 3.4 NADH-ferricianuro óxidoreductasa

La actividad NADH-ferricianuro óxidoreductasa fue analizada espectrofotométricamente a 420 nm (Sandelius y col. 1986). 20  $\mu\text{g}$  de proteína de membrana se incuban en 1ml de medio de reacción constituido por Tris-Mes 25mM pH 7.0 y  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  100mM y tras 3 minutos 25°C la reacción se inicia por la adición de NADH 100 $\mu\text{M}$ . La actividad enzimática en nmoles de ferricianuro reducidos/mg proteína/minuto se determina utilizando un coeficiente de extinción molar para este compuesto de  $1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 3.5 NADH oxidasa

La actividad NADH oxidasa se determinó espectrofotométricamente en función de la disminución de la absorbancia a 340 nm (Brightmann y col. 1988). Para ello, 1 ml de medio de reacción conteniendo Tris-Mes 25mM pH 7.0, sacarosa 0.1M,  $\text{CaCl}_2$  10mM, KCl 10mM, NaCl 10mM y 20  $\mu\text{g}$  de proteínas de membrana se incuban 5 minutos a 25°C, iniciándose la reacción por la adición de NADH 100 $\mu\text{M}$ . La actividad NADH oxidasa se determina utilizando un coeficiente de extinción molar del compuesto oxidado de  $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  expresándose los resultados en nmoles de NADH oxidados/mg proteína/minuto.

## 4. DETERMINACION FLUORIMETRICA DEL FLUJO DE $\text{H}^+$

La actividad bombadora de  $\text{H}^+$  a nivel de las vesículas de las membranas purificadas se determinó mediante la medida de la extinción de fluorescencia del cromóforo ACMA, producida como consecuencia de la unión de  $\text{H}^+$  a dicha molécula, lo cual provoca la disminución de la emisión fluorescente de la misma. Además, la facilidad para atravesar las membranas biológicas hacen de este fluoróforo un buen indicador del gradiente de pH que se forma a través de estas estructuras como consecuencia de la actuación de las bombas electrogénicas de  $\text{H}^+$  (Bennet y Spanswick, 1983). Ello, hace posible asociar el bombeo de  $\text{H}^+$  a la hidrólisis de ATP, ayudando, de esta forma, a caracterizar de manera más completa estos sistemas bioelectrogénicos de las membranas.

Para la medida de la extinción de la emisión de fluorescencia del ACMA se ha

utilizado un espectrofluorímetro marca Shimadzu modelo RF 540, provisto de sistema de agitación magnética y termostatación, en el que se habían fijado las siguientes condiciones:

- L exc=412    rendija 10 nm

- l em=485    rendija 10 nm

Entre 20 y 50 ug de proteína se incubaron durante 5 minutos en 1 ml de medio de reacción compuesto por BTP-HCl 50mM pH 6.5, para plasmalema y, pH 7.0, para tonoplasto, KCl 100mM, ACMA 1 $\mu$ M, ATP-BTP 3mM, en oscuridad y 26°C, iniciándose la reacción por adición de MgSO<sub>4</sub> 3mM. Cuando la reacción alcanza el estado de equilibrio, se inactiva la actividad ATPasa con inhibidores específicos o bien se adiciona EDTA 10mM para determinar el flujo pasivo de H<sup>+</sup> a través de la membrana. Posteriormente, se disipa el gradiente con permeabilizantes hasta recuperar el valor inicial de la emisión de fluorescencia.

#### 4.1 Evaluación del registro de medida

En función del registro obtenido, se calculan los parámetros que definen la actividad bombeadora de H<sup>+</sup>:

\* *Velocidad inicial de extinción (Quenching VQ<sub>1</sub>)*. Define la pendiente inicial de la curva, resultando del cociente entre la emisión inicial y el tiempo necesario para que dicha emisión se extinga por completo.

\* *Velocidad específica de extinción (VQS)*. Corresponde a la velocidad inicial expresada por mg de proteína.

\* *Extinción máxima (Q<sub>max</sub>)*. Se define así a la proporción de emisión extinguida respecto a la emisión inicial.

## 5. ANALISIS LIPIDICO

### 5.1 Extracción de lípidos totales

#### A nivel de tejido entero

Aproximadamente 2 g de raíces se adicionan sobre 6 ml de isopropanol hirviente, manteniéndose 3 minutos para inactivar las fosfolipasas del tejido (Douce, 1964). Se deja enfriar y se homogeniza en omni-mixer (Sorvall) durante 1 minuto. Seguidamente se

adicionan 3 ml de isopropanol, 4.5 ml de cloroformo-isopropanol (1:1, v:v) dos veces y finalmente 6 ml de cloroformo, siguiendo a cada adición una homogenización durante 1 minuto. Se filtra el homogenado y se evapora el filtrado en rotavapor a 30°C. Se recoge el residuo lipídico con cloroformo (de 3 a 5 ml), se le añade 1 ml de NaCl 1%, se agita y se centrifuga 3 minutos a 2000xg para separar las fases. Se toma la fase inferior clorofórmica que contiene los lípidos, se evapora en rotavapor a 30°C y se disuelve el residuo lipídico en mezcla benceno:etanol (4:1, v/v) conservándose a -20°C hasta utilización (Vorbeck y Martinetti, 1965).

#### A nivel de membranas

El método de extracción de los lípidos totales de membranas es básicamente el mismo. Aproximadamente 5 mg de proteínas de membrana se adicionan sobre 4 ml de isopropanol hirviendo y se homogeniza el conjunto en potter (10 subidas/bajadas). Posteriormente, se añade en el mismo potter 1 ml de isopropanol, 2.5 ml de cloroformo-isopropanol dos veces y 3 ml de cloroformo, siguiendo a cada adición una homogenización similar. Se filtra, se evapora el filtrado y se recoge el residuo con cloroformo, añadiendo 1 ml de NaCl 1%. Como para los lípidos de tejido entero se agita, centrifuga y se recoge la fase inferior clorofórmica, evaporándose el disolvente y disolviéndose el residuo en mezcla benceno-etanol (4:1) conservándose a -20°C hasta su utilización.

#### **5.2 Separación de diferentes categorías lipídicas**

A partir del extracto de lípidos totales se han separado las diferentes categorías lipídicas utilizando la técnica de cromatografía en capa fina. Las placas (0.5 mm de espesor) de gel de sílice (siicagel G, Merck) son activadas 30 minutos a 110°C, depositándose el extracto de lípidos totales en el origen de la placa bajo una corriente de nitrógeno.

Para el desarrollo de la placa se ha utilizado la mezcla de disolventes usada por Garner (1968) modificada por Grenier y col. (1972), que ha permitido una separación satisfactoria de los fosfolípidos (en el origen) de los galactolípidos y triglicéridos. Se inicia con un primer desarrollo, hasta la mitad de la placa, con la mezcla acetona:ácido acético:agua (100:2:1; v:v:v). Se seca muy bien la placa bajo una corriente de argón y se desarrolla en la segunda mezcla de desarrollo compuesta por hexano:éter dietílico:ácido acético (80:20:1; v:v:v), hasta

que el disolvente alcance el final de la placa. De nuevo se seca la placa con argón, revelándose las diferentes bandas de lípidos con rodamina 6G al 0,1%, que son visualizadas con luz ultravioleta.

### **5.3 Análisis de ácidos grasos de lípidos totales**

La extracción y metilación de los ácidos grasos de la solución de lípidos totales se ha llevado a cabo según la técnica de Metcalfe y col. (1966) modificada por Lechevallier (1966). Un alicuta del extracto de lípidos totales es evaporado con argón en tubo de rosca (pirex). A continuación se saponifican los ácidos grasos durante 15 minutos a 65°C con 2.5 ml de sosa metanólica al 2%. Posteriormente, se adicionan 2 ml de Trifluoruro de Boro en Metanol (14%) para metilar los ácidos grasos por calentamiento a 65°C durante 20 minutos. Transcurrido ese tiempo se enfrían los tubos y se extraen los ésteres metílicos de ácidos grasos con 5 ml de pentano.

La cuantificación, separación e identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se hace por cromatografía en fase gaseosa utilizando una columna semi capilar de vidrio (Supelco SP-2330 de 30 metros) a una temperatura programada de 150 a 170°C con incrementos de temperatura a razón de 0.4°C/minuto, utilizando como patrón interno el éster metílico del ácido heptadecanoico que no está presente en las muestras problema.

### **5.4 Análisis de ácidos grasos de diferentes categorías lipídicas**

Para determinar la composición y contenido de ácidos grasos de las distintas categorías lipídicas separadas por cromatografía en capa fina, se raspan con espátula las bandas correspondientes a cada uno de los lípidos y se metilan directamente sus ácidos grasos con 2.5 ml de Trifluoruro de Boro en Metanol (14%) tras calentar a 85°C durante 30 minutos. A continuación se adicionan 5 ml de pentano, se agita y se centrifuga a 2000xg 5 minutos para separar bien las fases acuosa y pentánica, recogiendo ésta última con los ésteres metílicos de los ácidos grasos. Los ácidos grasos se separan y cuantifican por cromatografía en fase gaseosa de forma análoga a la anteriormente descrita para los ácidos grasos de lípidos totales.



## **6. PURIFICACION DE ESTEROLES LIBRES**

Los esteroles libres del tejido entero y de las membranas aisladas han sido purificados a partir de la banda correspondiente a Diglicéridos + Esteroles obtenida tras separar por cromatografía en capa fina según Mangold (1961) el extracto de lípidos totales. La banda correspondiente a esos componentes es separada de la placa, eluida con cloroformo, y posteriormente extraída con este disolvente sucesivamente por 3 veces.

### **6.1 Análisis de esteroles libres**

La composición y cuantificación de los esteroles libres se ha llevado a cabo a partir de un alicuota del extracto clorofórmico antes obtenido. Evaporando a sequedad, se sila con 0.1 ml de BSTFA a 60°C durante 30 minutos, determinándose los derivados silados de los esteroles por cromatografía de gases (cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 5730A) a temperatura de 275°C, utilizando una columna semicapilar Supelco SPB-1 de 30 metros. La cuantificación de los distintos esteroles se determinó frente a patrones de concentraciones conocidas.

## **7. DETECCION INMUNOLOGICA DE LA H<sup>+</sup>ATPasa DE PLASMALEMA**

La detección por medio de anticuerpos de una proteína de membrana requiere llevar a cabo los siguientes pasos:

- Solubilización de las proteínas de la muestra, fundamental para eliminar aquellos contaminantes que puedan interferir en la reacción inmunológica
- Separación, por técnicas electroforéticas, de las proteínas solubilizadas. Ello permite purificar al máximo la proteína que se busca y un mayor conocimiento de la misma.
- Transferencia de las proteínas separadas a un sustrato adecuado para la reacción antigénica.
- Detección de la reacción.

### **7.1 Preparación de la muestra**

La solubilización de las proteínas de las membranas purificadas de jojoba y girasol se ha realizado utilizando el método de Laemli (1970). Para ello, se incubó la muestra en el

tampón de Laemli a 37°C durante 30 minutos y se centrifuga a 12000 rpm 10 minutos (MicroSpin 12S, Sorvall) para eliminar los restos no solubilizados.

**Tampón de Laemli**

- Tris-HCl.....
- Glicerol..... 10%
- SDS..... 2%
- β-mercaptoetanol..... 0,4 ml
- Azul de bromofenol..... 0,05%
- Quimostatina..... 100 mg/ml
- PMSF..... 4 mM

**7.2 SDS-PAGE**

Utilizamos el equipo Protean II de electroforesis de BioRad para geles de 20 cm de longitud x 16 cm de ancho x 1 mm de espesor, los cuales contenían 15 cm de gel de resolución y 5 cm de gel de empaquetamiento.

Las proteínas solubilizadas en el tampón de Laemli y las proteínas patrones de pesos moleculares conocidos (BioRad) son cargadas en el gel, realizándose la electroforesis a temperatura constante de 15°C y en las siguientes condiciones electroforéticas: corriente constante de 24 mA/gel, aumentándose a 36 mA/gel una vez que la muestra a penetrado en el gel de resolución, parándose la electroforesis cuando el frente de azul de bromofenol llegó a 1 cm del borde inferior del gel.

	<b>Gel de Resolución</b>	<b>Gel de Empaquetamiento</b>	Tris-HCl 1,5M pH 8,8 -----
			375 mM
Tris-HCl 0,5M pH 6,8 -----			----- 125 mM
SDS -----	0,1%	----- 0,1%	
Acrilamida/bisacrilamida -----	7,5%	----- 4%	
APS -----	0,05%	----- 0,75%	
TEMED -----	0,05%	----- 0,15%	

### **7.3 Electrotransferencia**

Cuando termina la electroforesis, se incuba un gel en una solución fijadora (Metanol: Acido acético: Agua, 50:12:38 v:v:v) para su posterior tinción con plata, y el otro se utiliza para realizar la transferencia a papel de nitrocelulosa. El gel destinado a la transferencia se incuba 30 minutos en el tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,02% SDS, 20% Metanol).

Las proteínas fueron electroforéticamente transferidas a membranas de nitrocelulosa utilizando un sistema Trans-Blot™ Cell (Bio-Rad). Las condiciones de la transferencia fueron: corriente constante 135 mA, mantenida durante toda la noche (aproximadamente 13 horas), aumentando la corriente a 300 mA durante una hora para asegurar la total transferencia de las proteínas.

Una vez finalizada la transferencia se toma el papel de nitrocelulosa y se tiñe con Ponceau (un colorante de proteínas) para comprobar que la transferencia ha sido buena y para señalar con lápiz los patrones de peso molecular, ya que el colorante desaparece con el tiempo y sería difícil calcular posteriormente el peso molecular de la proteína que buscamos. Se lava varias veces con agua destilada para eliminar el ponceau y se seca, pudiéndose almacenar entre papeles de celulosa, en oscuridad y a 4°C durante varios días.

Para asegurarse mejor de que la transferencia fué buena se puede fijar el gel en metanol/acético (50%/12%) y teñirlo posteriormente con plata.

### **7.4 Inmunoblotting con el anticuerpo de la ATPasa**

En principio se procede al bloqueo de todas las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo a proteínas microsomales e incluso a la nitrocelulosa incubándose una hora a temperatura ambiente con 150 ml de TBSL (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 2% leche en polvo desnatada como agente bloqueante). Para la detección de los antígenos (ATPasa) se incuba, durante toda la noche, el papel de nitrocelulosa con el anticuerpo anti-ATPasa (759-760, cedido por R. Serrano) diluido 1:1250 con TBSL. Se lava 3 veces con TBSL durante 5 minutos cada vez para eliminar el exceso de anticuerpo no fijado y el anticuerpo fijado de forma inespecífica.

La observación del anticuerpo fijado a la proteína se hace mediante la incubación durante 3 horas en una dilución 1:5000 en TBSL con el anticuerpo secundario (anti IgG de

conejo) ligado a la fosfatasa alcalina (Promega). Finalizada la incubación se realizan dos lavados con TBSL para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, se hace un lavado rápido con el tampón de la fosfatasa alcalina (100 mM Tris-HCl pH 9,0, 100 mM sacarosa, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) para eliminar el TBSL. La reacción de la fosfatasa alcalina se revela utilizando sustratos cromogénicos [BCIP (33 µg/ml) / NBT (16,5 µg/ml) en tampón de la fosfatasa alcalina], desarrollándose el color en oscuridad y a temperatura ambiente. La reacción se para lavando con agua destilada.

#### **7.5 Tinción con plata de los geles**

Los geles fueron fijados y teñidos con AgNO<sub>3</sub> según el procedimiento descrito por Blum y col. (1987) que consiste:

- \*Fijación durante al menos 1 hora en Metanol:Ac acético:Agua (50:12:38).
- \*Dos lavados sucesivos durante 20 minutos con etanol al 50% y uno de 20 minutos con etanol al 30%.
- \*Pretratamiento durante 1 minuto con 0,2 g/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. 5 H<sub>2</sub>O
- \*Cuatro lavados sucesivos de 20 segundos con agua destilada.
- \*Tinción durante 20 minutos con 2 g/l AgNO<sub>3</sub> y 0,75 ml/l 37% formaldehído.
- \*Dos lavados de 20 segundos con agua destilada
- \*Revelado durante varios minutos con una solución conteniendo 60 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,5 ml/l 37% formaldehído y 4 mg/ml Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.
- \*Dos lavados de 1 minuto con agua destilada.
- \*Detención del revelado con la solución de fijado
- \*Lavado durante al menos 20 minutos con metanol al 50% (así se puede guardar a 4°C durante 1 a 10 días).

El secado de los geles teñidos se llevó a cabo mediante previa incubación en una solución de metanol al 30% y posteriormente con 3% de glicerol, ambas durante 30 minutos a 4°C y agitación. Finalmente los geles fueron secados a vacío entre papel de acetato de celulosa a 80°C durante 2 horas en un secador de geles.

## 8. DETERMINACION DEL GRADO DE FLUIDEZ DE LAS MEMBRANAS

La anisotropía de fluorescencia permite obtener información sobre las propiedades de fluidez de las membranas (Shinitzki y Barenhloz, 1978).

Cuando una luz polarizada es dirigida hacia un cromóforo cuyo momento dipolar de excitación está alineado con el vector eléctrico de la luz de excitación, el cromóforo absorbe preferencialmente esta luz. Puesto que los procesos de absorción son mucho más rápidos que las rotaciones moleculares, el uso de una luz polarizada crea una población de fluoróforos excitados con una orientación preferencial. Como la emisión de un fotón por el fluoróforo excitado requiere más tiempo que la absorción, el fluoróforo podrá reorientarse antes de que tenga lugar la emisión; definiéndose la polarización de fluorescencia resultante como anisotropía de fluorescencia en el estado estacionarios:

$$r_s = \frac{I_v - I_H}{I_v + 2 I_H}$$

donde  $I_v$  e  $I_H$  son las intensidades medidas en direcciones paralela y perpendicular al vector eléctrico de la luz de excitación.

Cuanto mayor sea la reorientación del fluoróforo durante el tiempo de vida del estado excitado mayor será la anisotropía observada, de manera que  $r_s = 0$  cuando el fluoróforo se reorienta completamente, es decir,  $I_v = I_H$ .

La anisotropía es sensible a movimiento molecular del fluoróforo durante el tiempo de vida de estado excitado y la transferencia de energía entre cromóforos. Para soluciones muy diluidas del fluoróforo, donde no se pueden producir procesos de transferencia de energía, la anisotropía está relacionada sólo con la difusión rotacional de la molécula. En el caso de especies esféricas que rotan en un medio isotrópico, esta relación viene dada por la ecuación de Perrin:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{K T_r}{\eta v}$$

K=constante de Boltzman

T=temperatura

$\eta$  = viscosidad del disolvente

$\tau$  = tiempo de vida del estado excitado

v = volumen de las especies que difunden

Según esta ecuación, podemos ver que la anisotropía depende de la temperatura, viscosidad del medio y de las dimensiones y forma de las especies que difunden. Por tanto, cuando la sonda está insertada en una membrana biológica el valor de polarización de la sonda nos permite obtener información sobre la viscosidad y las propiedades de fluidez de la membrana.

En nuestro estudio se han utilizado dos sondas fluorescentes: 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) y 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH). La primera es una sonda de naturaleza hidrofóbica con gran afinidad por las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos de los fosfolípidos, lo que permite obtener información sobre la movilidad de dichas cadenas. La segunda además de la región hidrofóbica posee un grupo hidrofílico (amonio cuaternario), anclándose en la unión de la cabeza polar hidrofílica de los fosfolípidos con la región hidrofóbica de los ácidos grasos y quedando la parte hidrofóbica de la misma alineada con dichos ácidos grasos. Esta sonda permite obtener información sobre la fluidez de la superficie de la membrana (Lenz, 1989).

La determinación de la anisotropía en estado estacionario de la sonda DPH incluida en la membrana, en función de la temperatura, permitió medir las transiciones termotrópicas de las membranas en estudio. El marcaje de las vesículas con la sonda se realizó mediante la incubación, en condiciones de oscuridad y agitación durante 20 minutos a 10°C, de 50  $\mu$ g de proteína de membrana y DPH 6  $\mu$ M en 1 ml de NaHCO<sub>3</sub> 50mM pH 7.0. Las determinaciones se llevaron a cabo cada 2°C entre 10 y 44°C, incrementándose la temperatura a una velocidad de 4°C/minuto con un baño refrigerado, dejando un tiempo de equilibrio de 5 minutos para cada temperatura.

Las determinaciones con la sonda TMA-DPH se realizaron de manera similar a la descrita para el DPH, con la diferencia de que las incubaciones y las medidas se realizaron a 25°C.

Las medidas se realizaron en un espectrofluorímetro marca Shimadzu modelo RF540

provisto de dos polarizadores entre cada uno de los monocromadores y la muestra, así como de un sistema de agitación magnética y termostatación. Las condiciones de medida fueron

$$\lambda_{exc} = 360 \text{ nm} \quad \text{rendija} = 10\text{nm}$$

$$\lambda_{emis} = 420 \text{ nm} \quad \text{rendija} = 10\text{nm}$$

Al objeto de eliminar el efecto de la luz dispersada por las membranas, a las intensidades de emisión polarizada vertical y horizontalmente se les restó las correspondientes intensidades polarizadas de un blanco conteniendo la preparación sin la sonda.

# **RESULTADOS**



La caracterización de la acción primaria del NaCl a nivel de las membranas celulares estudiando los efectos provocados por dicho factor abiótico sobre la composición bioquímica y propiedades físico-químicas de estas estructuras, podría proporcionar información para un mejor conocimiento de la resistencia al estrés salino.

Los resultados que se derivan del desarrollo de los objetivos propuestos, han sido obtenidos utilizando membrana vacuolar (tonoplasto) y membrana plasmática (plasmalema) purificadas a partir de raíces de plántulas de girasol y jojoba.

## 1. ESTUDIOS PRELIMINARES

### 1.1 Crecimiento de la raíz, actividad H<sup>+</sup>ATPasa y de bombeo de H<sup>+</sup> a nivel de microsomas, en función de los tratamientos salinos

En un primer estudio, se ha realizado un seguimiento del efecto del NaCl en el medio de cultivo sobre el crecimiento radicular y sobre las actividades H<sup>+</sup>ATPasa de plasmalema y de tonoplasto y sobre el bombeo de H<sup>+</sup> a ellas asociado, en membranas microsomales aisladas de raíces de girasol y jojoba, enriquecidas en dichas membranas, cultivadas en medios diferenciales de NaCl. El objeto de este estudio preliminar fué definir una concentración salina que, afectando lo menos posible el crecimiento, provocara cambios significativos en alguno de los parámetros bioquímicos indicados.

En las tablas 1, 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos al respecto. Es observable como los tratamientos utilizados provocan inhibición en el crecimiento de las raíces de jojoba, incluso a 50mM NaCl, mientras que en girasol únicamente a una concentración de 100mM comienza a ser significativa la inhibición (Tabla 1).

En cuanto al efecto del NaCl sobre la actividad H<sup>+</sup>ATPasa de plasmalema y de tonoplasto, determinado a nivel de microsomas, no se observa efecto negativo alguno, a las concentraciones ensayadas de la sal, en las membranas de los dos plantas (Tabla 2). Aunque concentraciones de 125mM NaCl provocaban, en microsomas de girasol, una clara inhibición del enzima de plasmalema ( $\Delta Va$ ) (datos no mostrados), sin embargo, el hecho de que a esas concentraciones, las plántulas y, por supuesto, sus raíces, mostraban un acentuado estado de senescencia, no nos permitía la utilización de esta concentración

**Tabla 1.** Crecimiento de raíces de girasol y jojoba cultivadas durante 8 y 14 días respectivamente en condiciones estandar de cultivo y en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de NaCl. Valores expresados como mg de peso fresco (P.F.) o mg de peso seco (P.S.).

Tratamiento	Peso Fresco	Peso Seco
Girasol testigo	240 ab	9.4 ab
" 50 mM NaCl	250 a	9.8 a
" 75 mM "	230 b	9.0 b
" 100 mM "	188 c	7.3 c
Jojoba testigo	262 a'	29.8 a'
" 50 mM NaCl	235 b'	25.8 b'
" 75 mM "	201 c'	21.7 c'
" 100 mM "	170 d'	17.0 d'
" 150 mM "	130 e'	13.8 e'

Los resultados son la media de tres experimentos independientes. Los números seguidos de una misma letra no difieren significativamente a un nivel de significación del 0.05

**Tabla 2.** Efecto de la concentración de NaCl en el medio de cultivo de las plántulas, sobre la actividad H<sup>+</sup> ATPasa correspondiente a plasmalema ( $\Delta V_a$ ), tonoplasto ( $\Delta NO_3^-$ ), y mitocondria ( $\Delta N_3^-$ ), determinada en microsomas aislados de raíces de girasol y jojoba

Tratamiento de NaCl	$\Delta V_a$	$\Delta NO_3$	$\Delta N_3$	
G I R A S O L	0mM	23.8a	12.5a	13.9a
	50mM	22.2ab	11.4a	13.7a
	75mM	21.0ab	13.3a	14.2a
	100mM	19.3b	14.4a	15.2a
J O J O B A	0mM	16.3a	15.5a	11.3a
	50mM	17.6a	15.2a	9.9a
	75mM	16.1a	15.0a	10.4a
	100mM	15.5a	14.0a	9.3a
	150mM	14.3a	13.7a	8.5a

Los resultados expresados en  $\mu\text{mol Pi} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteína} \times \text{h}^{-1}$ , son la media de cuatro experimentos independientes; letras iguales en cada columna representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, P=95%

**Tabla 3.** Efecto del NaCl en el medio de cultivo de las plántulas, sobre el bombeo de H<sup>+</sup> dependiente de la actividad H<sup>+</sup> ATPasa de plasmalema ( $\Delta V_a$ ), tonoplasto ( $\Delta NO_3^-$ ), determinada a nivel de microsomas aislados de raíces de girasol y jojoba

Tratamiento	Velocidad inicial de extinción (VQi)		
	VQi total	+ Va	+ NO3
Girasol testigo	12.1a	5.7a	11.4a
Girasol 100mM NaCl	20.5b	15.5a	11.1a
Jojoba testigo	18.6a	9.5a	11.3a
Jojoba 100mM NaCl	20.9a	10.3a	10.1

Los resultados son la media de cuatro experimentos independientes; letras iguales en cada columna representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, P=95%

como tratamiento salino estandar. En los estudios posteriores, los efectos de una concentración 100mM NaCl sobre el bombeo de H<sup>+</sup> dependiente de la actividad H<sup>+</sup>ATPasa, determinados a nivel de microsomas, permiten indicar que, únicamente en microsomas de girasol, tiene lugar un incremento del flujo de H<sup>+</sup> por el tratamiento salino, el cual parece depender de un efecto a nivel de la membrana vacuolar (tonoplasto) (Tabla 3).

Los resultados preliminares indicados, referidos al efecto del NaCl sobre el crecimiento de las raíces y sobre las actividades H<sup>+</sup>ATPasas y bombeo de H<sup>+</sup> dependiente de ATP, investigadas a nivel de membranas microsomales, aisladas de raíces de jojoba y girasol, sugieren que un estudio de estos y otros parámetros bioquímicos, así como de algunas propiedades físico-químicas, a nivel de membranas de plasmalema y tonoplasto purificadas a partir de raíces desarrolladas en medios diferenciales de NaCl, podría aportar algunos datos sobre la participación de estas estructuras celulares en la tolerancia a la salinidad.

## **2. PREPARACION DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES: PURIFICACION DE TONOPLASTO Y PLASMALEMA DE RAICES**

Una vez determinada la concentración de NaCl más adecuada para la investigación de los objetivos propuestos, se procedió a la purificación de la membrana plasmática (plasmalema) y de la membrana vacuolar (tonoplasto). Se ha partido de los microsomas obtenidos de raíces de plántulas de girasol y jojoba cultivadas durante 8 y 14 días, respectivamente, según se indicó en Material y Métodos. Se definen los microsomas como el conjunto de membranas celulares integradas, principalmente, por vesículas de plasmalema, tonoplasto, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplasmático, las cuales se separan en el sedimento que queda de la centrifugación a 80000 xg durante 35 minutos.

Para definir el grado de pureza del plasmalema y tonoplasto se han utilizado marcadores específicos para cada una de estas membranas, habiéndose seguido los siguientes métodos para su purificación:

- En primer lugar se intentó la separación de las membranas mediante el uso de un

gradiente discontinuo de sacarosa con varias fases. Los resultados derivados de esta separación se muestran en la tabla 4, donde se observa como en girasol no se producía una buena separación de dichas membranas, mientras que el tonoplasto de raíces de jojoba quedaba, fundamentalmente, en la interfase 22/30% de sacarosa, y el plasmalema en las interfases 30/35% y 35/40%. Una reducción del número de bandas de densidad de sacarosa en el gradiente (Tabla 5) y la utilización de un colchón de sacarosa (Tabla 6) o de dextrano (Tabla 7), no mejoró la separación de las membranas.

Ante la precaria purificación de plasmalema utilizando un gradiente de sacarosa, se intentó la separación mediante el sistema de partición en doble fase, polímero acuosa, compuesta por dextrano, PEG, tampón fosfato, pH 7.8, de sacarosa 250mM y KCl 5mM.

Tras probar distintas concentraciones de polímero, tampón fosfato y KCl (Tabla 8), obtuvo un óptimo de purificación, con muy poca contaminación del resto de membranas para las condiciones: dextrano 6%, PEG 6%, tampón fosfato 5mM pH 7.8, y KCl 5mM para el girasol y la jojoba. En este sistema de partición la contaminación por mitocondria es prácticamente nula y la contaminación por tonoplasto no llega a superar el 10%.

Un óptimo en la purificación del plasmalema de jojoba se ha conseguido tomando la interfase 33/45% del gradiente de sacarosa. Es este gradiente el rendimiento en plasmalema era superior (8%) en relación al de microsomas (1.3%). En cuanto a la membrana plasmática de raíces de girasol los resultados obtenidos son similares con tampón fosfato 10mM y KCl 30mM a los obtenidos con tampón fosfato 5mM y KCl 5mM; sin embargo, hemos escogido aquel que aporta una menor fuerza iónica, puesto que al ser el objetivo estudiado del efecto de un ión como el  $\text{Na}^+$  sobre las membranas, una fuerza iónica elevada podría interferir en los resultados.

Se puede concluir que se ha conseguido un buen grado de purificación para el plasmalema de raíces de girasol y de jojoba, mientras que, en el caso del tonoplasto, su purificación sólo ha sido posible partiendo de raíces de jojoba.

### **3. MEDIDA DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ASOCIADAS A LAS MEMBRANAS PURIFICADAS**

En las tablas 9 y 10 se muestran las actividades de los enzimas marcadores

**Tabla 4.** Distribución de actividades ATPasas en fracciones de membranas obtenidas por gradiente discontinuo de sacarosa a partir de membranas microsomales de raíces de girasol y jojoba cultivadas en medios estandar.

% sac.	GIRASOL				JOJOBA			
	$\Delta Va$	$\Delta NO_3$	$\Delta N_3$	%prot	$\Delta Va$	$\Delta NO_3$	$\Delta N_3$	%prot
0/22	-	-	-	-	12.6	8.8	2.4	2.1
22/30	10.1	3.0	2.4	2.6	9.9	18.5	4.3	5.8
30/35	37.7	12.0	8.0	8.7	21.1	15.0	5.4	7.6
35/40	22.9	14.2	17.2	16.9	17.1	12.9	11.7	16
40/45	18.1	15.4	20.3	10.2	13.1	16.6	18.9	19.6
ppto	2.0	2.2	2.6	3.5	3.0	12.0	14.3	13.1

Resultados expresados en  $\mu\text{mol Pi/mg proteína/hora}$

