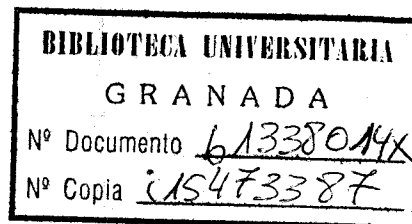


t 4/29



Universidad de Granada
Facultad de Ciencias

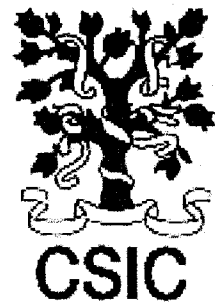
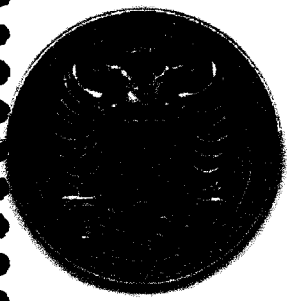
Tesis Doctoral



Mecanismos bioquímicos y moleculares de tolerancia a la salinidad en especies cultivada y silvestre de tomate: papel de los enzimas translocadores de iones de plasmalema y tonoplasto

Badea Kerkeb
2000





Universidad de Granada
Facultad de Ciencias

Tesis Doctoral

**Mecanismos bioquímicos y moleculares de tolerancia a la
salinidad en especies cultivada y silvestre de tomate: papel de
los enzimas translocadores de iones de plasmalema y
tonoplasto**

Badea Kerkeb
2000



Mecanismos bioquímicos y moleculares de tolerancia a la salinidad en especies cultivada y silvestre de tomate: papel de los enzimas translocadores de iones de plasmalema y tonoplasto

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 31/5/00
ENTRADA NUM. 1.824

Memoria que presenta la licenciada en
Ciencias Biológicas Badea Kerkeb para
optar al grado de Doctor

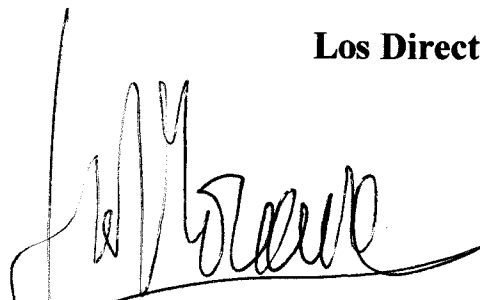


Fdo. Badea Kerkeb

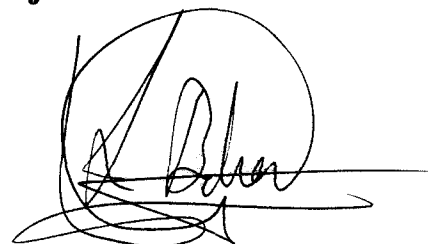
UNIVERSIDAD DE GRANADA
22 MAYO 2000
COMISION DE DOCTORADO

VºBº

Los Directores del trabajo



Fdo. Juan Pedro Donaire Navarro
Doctor en Farmacia
Profesor de Investigación del CSIC



Fdo. Andrés Belver Cano
Doctor en Ciencias Biológicas
Científico Titular del CSIC

Esta Memoria ha sido realizada durante los años 1995-2000 en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de las plantas de la estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.) con la ayuda de beca del Ministerio de Enseñanza superior de Marruecos.

Deseo expresar mi mas sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido de una forma u otra a la realizaci3n de esta Memoria.

Esta gratitud va dirigida en primer lugar a los directores de esta Tesis Doctoral, los Drs. Andr3s Belver Cano y Juan Pedro Donaire Navarro, por la seriedad, coherencia, honestidad y rigurosidad en la orientaci3n del trabajo; tambi3n por intentar inculcarme, con gran paciencia, los conocimientos cientificos necesarios para poder alcanzar una s3lida base para mi formaci3n cientifica.

*Agradexco igualmente a la Dra Nuria Ferrol, no solo por el suministro de la sonda de ADN ribos3mico, sino tambi3n por su disponibilidad y acertado asesoramiento cientifico en la parte molecular de esta Memoria. A los Drs. Jose Rom3n Perex-Casti3eira y Aurelio Serrano (I.B.V.F., CSIC, Sevilla), por habernos acogido en su laboratorio y ayudado en la clonaci3n de la V-PPasa de tomate. Al Dr. Marcel Bucher (Federal Institute of Technology, ETH, Zurich) por habernos cedido amablemente la genoteca de ADNc de pelos radiculares de tomate (*L. esculentum*). A los Drs. Ram3n Serrano (IPV-CSIC, Valencia), Alan Bennett (Universidad de California, Davis) y Masayoshi Maeshima (Universidad de Nagoya, Japon), por su amable cesi3n de anticuerpos contra la PM-ATPasa, V-ATPasa y V-PPasa, respectivamente. Al Dr. Jesus Cuartero (Estaci3n Experimental La Mayora, CSIC, M3laga), por el suministro de las semillas utilizadas en este trabajo. Al Dr. Jose Manuel Garcia Garrido, por sus buenos consejos y sugerencias, adem3s de la cesi3n de algunos de sus protocolos, sobre la*

parte molecular de esta Memoria. A los Drs. Manuel Lachica, María Dolores Mingorance y Dorotea Rubi, por su ayuda en la determinación de los componentes inorgánicos, así como al Dr. Manuel Gómez por su ayuda en la puesta a punto del cultivo hidropónico de tomate. A mi tutora, la Dra. Carmen Lluich Plá por el interés prestado en el curso de esta investigación y por resolver con gran rapidez y eficiencia las cuestiones burocráticas.

Agradezco especialmente a mis compañeros de laboratorio, a Conchi Santiago, Anabel Molina, Eva Aceituno, Marina Romano y Juana Segura por la inapreciable ayuda y asistencia técnica que me han prestado en algunas etapas de este trabajo, así como a Loubna Kerkel, Mari Carmen Martín, Pilar Rodríguez, Pablo Bueno y Kees Venema, por haber compartido con todos ellos horas intensas de trabajo individual y en equipo, así como gratos momentos.

Deseo también agradecer a mis "vecinos" de laboratorio, miembros del grupo de Radicales Libres del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, por su valiosa colaboración en el análisis densitométrico, especialmente a Eva y Marta, por su compañerismo y simpatía.

Finalmente agradezco a todo el personal de la Estación Experimental del Laidín, sobre todo a los servicios de Informática y Biblioteca.

Quiero también expresar mi especial gratitud a todas mis amigas que hicieron posible superar con éxito los momentos difíciles y además compartir los buenos, especialmente a Samira, Fatima, Lamiae, Mariam, Salwa, Kautar y Jamila, sin olvidar a Rosario, Isabel y Natalia, chicas que compartieron hogar conmigo durante mi estancia en Granada, a las cuales deseo a todas ellas mucha suerte para alcanzar sus metas.

A mi tío, el Dr. Omar Kerkel, por estar siempre cerca de nosotros, sobre todo, tras el fallecimiento de mi padre, especialmente por facilitarme las tareas burocráticas para poder estar aquí. Debo agradecer a mi prima Rachida Nejar, por sus consejos y sus muestras de aliento constante a pesar de la distancia. A mi primo Hossain Oulad Yakhlef, por hacerme la inscripción en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, y por sus muestras de amistad y fraternidad. Gracias por todo y te deseo mucha suerte para finalizar tu tesis.

Quisiera expresar mi infinita gratitud a todos los miembros de mi familia quienes por su amor, paciencia y comprensión confiaron en mí y lo sacrificaron todo por apoyarme, y que sin ellos no hubiera sido posible la culminación del presente trabajo.

A ti, Abuela, fuente de amor y sabiduría, te deseo una larga vida con salud entre nosotros.

A mis hermanos, Abdrahman, Rajae, Wafae, Sanae, Sakina, Abdelah, Asma, Rabia, Nabila, Mouhamed y Latifa, gracias por todo lo que habeis hecho por mí.

A mi Madre, fuente de cariño, paciencia y lucha, gracias por ofrecerme la oportunidad de acabar mis estudios, dándome siempre lo mejor de ti. Por eso y por otras muchas razones, lo menos que puedo hacer es dedicarte este trabajo que tanto esfuerzo me ha costado.



A la memoria de mi Padre

*A mi madre, mi Abuela y
mis Hermanos.*



Indice


I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	1
II. ANTECEDENTES CIENTIFICOS.....	5
A. LA SALINIDAD COMO FACTOR AMBIENTAL DE ESTRÉS.....	7
A.1. Descripción del problema.....	7
A.2. Susceptibilidad de las plantas a la salinidad:	
respuesta específica del tomate.....	8
A.3. Perspectiva biológica.....	9
A.4. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento y	
metabolismo de las plantas.....	11
B. MECANISMOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES	
RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA.....	15
B.1. Mantenimiento del equilibrio osmótico.....	22
B.2. Mantenimiento de la homeostasia iónica: sistemas de transporte	
a través de membrana.....	25
B.2.1. P-H ⁺ -ATPasa y transportadores secundarios de la membrana	
plasmática implicados en el flujo de Na ⁺ y Cl ⁻	29
B.2.2. Papel de la compartimentación vacuolar: V-H ⁺ -ATPasa,	
V-H ⁺ -PPasa y transportadores secundarios implicados en	
el flujo de Na ⁺ y Cl ⁻	47
B.3. Sistema coordinado de la transducción de la señal de estrés salino:	
papel de Ca²⁺ en de pH citoplasmático.....	65
III. PLAN DE TRABAJO	
IV. MATERIAL Y METODOS.....	12
A. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	77

B. DETERMINACION DE PARAMETROS FISIOLÓGICOS.....	78
B.1. Crecimiento y contenido hídrico.....	78
B.2. Determinación de osmóticos orgánicos.....	79
B.2.1. Azúcares solubles totales.....	79
B.2.2. Prolina.....	79
B.3. Determinación del contenido mineral.....	80
C. DETERMINACION DE COMPONENTES BIOQUÍMICOS.....	80
C.1. Análisis de lípidos.....	80
C.1.1. Extracción de lípidos totales.....	81
C.1.2. Separación de diferentes categorías lipídicos.....	81
C.1.3. Análisis de ácidos grasos de lípidos totales y diferentes categorías lipídicas.....	82
C.2. Análisis de enzimas del sistema <i>pH-stat</i> bioquímico.....	83
C.2.1. Actividades PEP carboxilasa y enzima málico.....	83
C.3. Actividades enzimáticas asociadas a membranas intracelulares.....	84
C.3.1. Obtención de membranas microsomales de diferentes tejidos.....	84
C.3.2. Purificación de vesículas de plasmalema.....	86
C.3.3. Purificación de vesículas de tonoplasto.....	86
C.3.4. Determinación de proteínas.....	87
C.3.5. Actividades fosfohidrolasas.....	88
C.3.5.1. Actividad ATPasa.....	88
C.3.5.2. Actividad PPasa de tonoplasto.....	90
C.3.5.3. Actividad UDPasa latente.....	90
C.3.6. Actividad NADH cit c reductasa insensible a antimicina A.....	91
C.3.7. Determinación del transporte de H ⁺ en vesículas de membranas.....	91
C.3.7.1. Fundamento de la medida.....	91
C.3.7.2. Transporte de H ⁺ dependiente de ATP.....	92
C.3.7.3. Transporte de H ⁺ dependiente de PPI.....	92
C.3.8. Medida de la actividad antiporte Na ⁺ /H ⁺	93

C.3.9. Análisis electroforético e inmunoensayos.....	95
C.3.9.1. Preparación de la muestra. Solubilización.....	96
C.3.9.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....	
(SDS-PAGE).....	96
C.3.9.3. Tinción y secado de los geles.....	97
C.3.9.4. Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa	
(<i>Western Blotting</i>).....	97
C.3.9.5. Inmunodetección de la H ⁺ -ATPasa de plasmalema y	
de la H ⁺ -ATPasa y H ⁺ -PPasa de tonoplasto.....	98
D. DETERMINACION DE LA EXPRESION DE PROTEINAS DE	
MEMBRANAS DE TONOPLASTO.....	99
D.1. Extracción de ARN total de los tejidos de tomate.....	100
D.2. Obtención de un fragmento de ADNc de 0.55 kb homólogo	
a la V-PPasa vacuolar de tomate por transcripción inversa del	
ARN y PCR (RT-PCR).....	101
D.2.1. Transcripción inversa del ARN.....	101
D.2.2. Amplificación por PCR.....	102
D.2.3. Clonaje del producto de PCR.....	103
D.3. Obtención de un fragmento de ADNc de 0.77 kb homólogo a la	
subunidad A de la V-ATPasa vacuolar de tomate a partir	
de una genoteca de ADNc.....	104
D.3.1. Extracción de ADN de fago.....	105
D.3.2. Escrutinio de la genoteca de ADNc por PCR.....	105
D.3.3. Clonaje del producto de PCR.....	106
D.4. Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala.....	106

D.5. Secuenciación de ADN.....	108
D.6. Análisis de la expresión génica por hibridación Northern.....	108
D.6.1. Marcaje de las sondas de ADNc con ³² P-dCTP por cebamiento al azar.....	108
D.6.2. Separación del ARN en geles desnaturalizantes de formaldehído.....	109
D.6.3. Transferencia del ARN a filtros de membranas de nylon cargadas positivamente (<i>Northern blot</i>).....	110
D.6.4. Condiciones de hibridación.....	110
D.5.5. Autorradiografía.....	111
D.6.5. Cuantificación de los niveles de expresión génica.....	111
V. Resultados.....	112
A. ESTUDIOS PRELIMINARES.....	113
A.1 Definición del modelo experimental: elección del material vegetal y condiciones de cultivo.....	114
B. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD EN ESPECIES DE TOMATE OBJETO DE ESTUDIO.....	115
B.1. Parámetros fisiológicos.....	116
B1.1. Crecimiento.....	117
B1.2. Contenido hídrico.....	118
B.1.3 Contenido de prolina y azúcares totales en los tejidos.....	119
B.1.4. Contenido de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺	120
B.2. Parámetros bioquímicos.....	121
B.2.1. Funcionalidad de las bombas primarias y secundarias de plasmalema en respuesta al estrés salino.....	121
B.2.1. Funcionalidad de las bombas primarias y secundarias	

de tonoplasto en respuesta al estrés salino.....	122
B.2. Determinación de la expresión génica de proteínas de tonoplasto.....	123
VI. DISCUSION.....	124
VII. CONCLUSION.....	200
VII. BIBLIOGRAFIA.....	250



I. Introducción
y objetivos


El estudio de las bases fisiológicas, bioquímicas y moleculares que definen la respuesta de las plantas al estrés salino, en íntima conexión con los mecanismos que controlan la nutrición, constituyen aspectos de la biología de una gran trascendencia, sobre todo, en regiones con suelos salinizados los cuales interfieren el normal crecimiento y desarrollo de los cultivos. Para el estudio de este objetivo primario, es importante poseer un mejor conocimiento de los cambios fundamentales que tienen lugar en las plantas superiores expuestas a estrés por NaCl, lo cual contribuirá a mejorar la asimilación de los nutrientes por la planta, a una optimización del metabolismo vegetal a nivel de tejidos, células y orgánulos subcelulares, y a la definición de marcadores moleculares utilizables para la transformación de plantas mediante la transferencia de genes por los métodos de DNA recombinante. Todo ello, con el objeto de abrir una nueva perspectiva en la obtención de plantas más productivas y tolerantes a la salinidad.

Por otra parte, es indudable la importancia del origen vegetal a utilizar en estos estudios. En este trabajo se ha utilizado el tomate por ser uno de los cultivos hortícolas con mayor trascendencia económica a nivel regional, nacional y mundial, y por constituir un material clásico en programas de mejora, al poseer una serie de atributos que lo hacen idóneo para la manipulación genética y para estudios fisiológicos, bioquímicos y de biología molecular. A este respecto, un aspecto fisiológico clave en la tolerancia del tomate, como en la mayoría de las plantas, a la salinidad es la capacidad para regular los flujos iónicos, de forma que muchas especies cultivadas de tomate, moderadamente sensibles a la sal, presentan predominantemente una estrategia glicofítica, basada en la exclusión de iones, en combinación con la síntesis de solutos orgánicos para su ajuste osmótico.

Un enfoque adecuado del problema planteado requería la posibilidad de relacionar procesos fundamentales de la célula con los mecanismos de tolerancia al NaCl, habiendo resultado clave el hecho de que el efecto negativo de la sal sobre el crecimiento de las plantas, derive de una combinación de efectos nutritivos, toxicidad iónica y desequilibrios nutricionales causados por la interferencia del NaCl con la absorción y el transporte de nutrientes. Ello conecta la respuesta de las plantas a este tipo de estrés ambiental con la

compartimentación celular y con el transporte activo y facilitado de iones a través de las membranas intracelulares, principalmente plasmalema y tonoplasto. En este sentido, el transporte de H^+ y, sobre todo, las bombas electrogénicas que requieren ATP o PPi (ATPasas y PPasas) son componentes bioquímicos fundamentales de dichas membranas, que deben controlar la respuesta a este tipo de estrés, al regular el funcionamiento de los transportadores secundarios de Na^+ y Cl^- (antiportes Na^+/H^+ y transportadores de iones Cl^-) y el pH citoplasmático.

Tomando como base estos hechos, en este trabajo se ha llevado a cabo un estudio de algunos componentes bioquímicos relacionados con el control del flujo iónico en la célula con la finalidad de contribuir a la definición de marcadores biológicos de interés para su posterior aplicación en la mejora de este cultivo. Para ello se han utilizado una serie de estrategias las cuales incluyen la determinación de la actividad, contenido, expresión génica y regulación de los enzimas H^+ -ATPasas y H^+ -PPasa, así como del antiporte Na^+/H^+ de la membrana plasmática y del tonoplasto de raíz y parte aérea de plántulas de tomate sometidas a tratamientos diferenciales de NaCl.



II. Antecedentes científicos

A. LA SALINIDAD COMO FACTOR AMBIENTAL DE ESTRES

A.1. Descripción del problema

La salinidad del suelo es uno de los factores ambientales que incide más negativamente en la productividad agrícola y limita el uso potencial de nuevas áreas de cultivo (Flowers y Yeo 1995). El 40 % de la superficie mundial corresponde a regiones áridas y semiáridas caracterizadas por suelos secos debido a la escasez de lluvias, temperaturas extremas y una alta velocidad de evaporación, donde la producción agrícola depende fuertemente de la irrigación y de un eficiente manejo de los recursos hídricos. En estas condiciones, el efecto acumulativo del uso continuado de aguas que contienen sales disueltas, unido a una gran velocidad de evaporación y baja capacidad de lixiviación de algunos suelos, así como el uso de elevadas cantidades de fertilizantes en ciertas áreas de cultivo y de la penetración del agua del mar en zonas costeras y marismas, ocasionan el fenómeno de salinización de los suelos (Downton 1984, Ashraf 1994, Serrano y Gaxiola 1994, Flowers y Yeo 1995). Además, la demanda de agua de alta calidad, debido tanto al incremento de la población humana como el desarrollo industrial, conlleva el uso cada vez más frecuente de aguas de baja calidad en la agricultura, de forma que la sobreexplotación de acuíferos está produciendo la salinización del suelo, por intrusión de agua de mar, lo que agrava el problema tanto desde el punto de vista ecológico como económico (Heinrichs 1988).

Se calcula que un 40 % del área mundial dedicada a regadío, está afectada por la salinidad, especialmente aquellas más productivas, como California, el sur de Asia y gran parte del área mediterránea. Dentro de esta última, algunas de las zonas más afectadas son las marismas del Sur, Almería, Murcia, Alicante y Valle del Ebro (Ayers y col. 1960), así como toda la franja atlántica de la costa marroquí (Choukrallah 1986). Por todas estas razones, la salinidad de suelos y aguas constituye una verdadera amenaza para la agricultura, puesto que la mayoría de las plantas cultivadas, entre ellas el tomate, se ven afectadas en mayor o menor medida por este factor ambiental.

A.2. Susceptibilidad de las plantas a la salinidad: respuesta específica del tomate

La salinidad de los suelos está mayoritariamente determinada por el NaCl, aunque también pueden tener cantidades considerables de otras sales como Na₂SO₄, CaSO₄, MgCl₂ y Na₂CO₃ (Epstein y Rains 1987). La toxicidad de cada ión varía según la planta: el Cl⁻ es el componente tóxico para cítricos (Bañuls y Primo-Millo 1992) y soja (Abel 1969), mientras que el Na⁺ resulta más tóxico para el tomate (Rush y Epstein 1981), trigo (Gorham y col. 1990) y *Arabidopsis* (Sheahan y col. 1993).

Tabla 1. Clasificación de las plantas según su capacidad de soportar altas concentraciones de NaCl sin daño aparente (Greenway y Munns 1980).

Grupos	Umbral de daño	Especies
Grupo I. Halófitas		
I _A .	400 mM NaCl	<i>Suaeda maritima</i> , <i>Atriplex nummularia</i>
I _B .	>200 mM NaCl	<i>Atriplex hastata</i> , <i>Spartina townsendii</i>
Grupo II. Halófitas y Glicófitas		
<i>Tolerantes</i>		
II _A . Halófitas monocoliledoneas	200 mM NaCl	<i>Festuca rubra</i> , <i>Puccinella peisonis</i> , <i>Gossypium</i> , <i>Hordeum</i>
II _B . Glicófitas		
<i>Intermedias</i>		
<i>Sensibles</i>	>100 mM NaCl	<i>Lycopersicon</i>
	<100 mM NaCl	<i>Phaseolus</i> , <i>Glycine</i>
Grupo III. Glicófitas		
Muy sensibles	<50 mM NaCl	Cítricos, Aguacates, Frutales de hueso

El crecimiento de las plantas se afecta negativamente cuando la concentración de sales alcanza un valor umbral, a partir de la cual, dicho efecto puede variar dentro de un amplio rango, en función de la capacidad genética de las especies, estadio de desarrollo, interacciones ambientales y tipo de ion (Shannon 1984). En función de las concentraciones umbrales que son capaces de soportar sin sufrir daños aparentes,

después de 1 a 6 meses de cultivo en condiciones salinas, las plantas se han clasificado en diferentes grupos (**Tabla 1, Greenway y Munns 1980**).

El cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ha adquirido gran importancia económica en todo el mundo, ocupando una superficie de casi 3 millones de hectáreas con una media anual de producción superior a setenta millones de toneladas (**F.A.O 1995**). Se trata de una planta perenne que se desarrolla bien en un amplio rango de latitudes, tipos de suelos, temperatura y sistemas de cultivo, los cuales han experimentado cambios rápidos y notables durante las últimas cuatro décadas, estableciéndose hoy en día reglamentos específicos de cultivo y producción integrada bajo abrigo (**Belda y Lastres 2000, Anónimo 2000**). La principal razón de estos cambios ha sido la experiencia de factores limitantes para la continuidad del cultivo intensivo en el suelo natural, entre ellos, la salinización, que provoca alteraciones generalizadas en el metabolismo de esta planta. Dichas alteraciones se reflejan en un sistema radical de menor desarrollo, hojas adultas abarquilladas, hojas jóvenes pequeñas, de color verde más intenso y enrolladas sobre si mismas, racimos con menor número de flores, frutos mas pequeños y necrosis del sistema vascular (**Cuartero y col. 1995**).

El tomate cultivado pertenece al grupo de sensibilidad intermedia (**Tabla 1**), aunque puede haber una variación interespecífica e intraespecífica con la existencia de especies y de variedades cultivadas que presentan una tolerancia diferencial a la salinidad, abarcando un amplio rango de sensibilidad al estrés por este factor, y en las que la altura del tallo y el crecimiento de la hoja fueron los parámetros de crecimiento más afectados (**Dehan y Tal 1978, Shannon 1984, Cuartero y col. 1992, Perez-Alfocea y col. 1993, Cano y col. 1996, Santa-Cruz y col. 1999**).

A.3. Perspectiva biológica

Para disminuir el impacto de la salinidad en la Agricultura, se ha venido desarrollando estrategias tanto de tipo tecnológico como biológico, las cuales no deberían ser alternativas una de otra, sino complementarias (**Flowers y Yeo 1995**). En la primera se incluyen unas buenas prácticas de irrigación y drenaje, como la

optimización del riego para minimizar el uso de agua de media o baja calidad (con alto contenido de sales) y evitando la salinización secundaria, así como la regeneración del suelo mediante el lavado de las sales con agua de buena calidad (no siempre disponible). La segunda estrategia se basa en el aumento de la tolerancia de los cultivos mediante genética convencional o ingeniería genética.

Desde la perspectiva biológica, de especial importancia en agricultura sostenible, una primera aproximación a la solución de este problema ha venido de la mano de la mejora por genética clásica. Esta se ha basado inicialmente en criterios de selección agronómica, tales como rendimiento de la cosecha o supervivencia (Epstein y Rains 1987, Noble y Rogers 1992), y más recientemente, en el uso de criterios de selección basados en procesos fisiológicos concretos relacionados con la tolerancia, con objeto de identificar y seleccionar aquellos genotipos más tolerantes y su utilización como donadores de rasgos que confieren tolerancia (Noble y Rogers 1992, Cuartero y col. 1992).

Si bien, la aplicación de técnicas de mejora genética a la obtención de plantas tolerantes a la sal ofrece grandes posibilidades, también ha conllevado dificultades, debido a que la tolerancia a este factor está regulada por genes muy diversos y a que la respuesta al estrés tiene lugar tanto a nivel celular como a nivel de planta entera (Flowers y Yeo 1995, Bohnert y Jensen 1996, Yeo 1998). A todo lo anterior se une la dificultad para combinar, en el proceso de selección, dos rasgos multigénicos como son la tolerancia a la sal y la productividad agrícola (Flowers y Yeo 1995). De ahí que, a pesar del esfuerzo realizado y de las numerosas investigaciones llevadas a cabo para descifrar los mecanismos de tolerancia a la salinidad, los programas de mejora desarrollados hayan tenido un éxito limitado (Bohnert y Jensen, 1996, Yeo 1998).

Al mismo tiempo y/o alternativamente, prescindiendo de toda polémica social actual sobre organismos modificados genéticamente, la ingeniería genética puede constituir un método rápido y general para la mejora de plantas de interés agronómico, para lo que se requiere la identificación y aislamiento de genes relevantes de halotolerancia. En este sentido, aunque se ha discutido que la introducción de genes que codifican a simples proteínas funcionales puedan contribuir cualitativamente al incremento de un rasgo tan complejo como la

tolerancia a la sal (Yeo 1998), se han obtenido resultados positivos con la expresión de genes procedentes de organismos no vegetales (bacterias o levaduras) (Tarszczyński y col. 1993, Pilon-Smits y col. 1995, Saneoka y col. 1995, Bordás y col. 1997, Arrillaga y col. 1998), o con la sobreexpresión de genes que son componentes normales del mecanismo de adaptación de la planta o de especies relacionadas (Kishor y col. 1995, Apse y col. 1999, Espinosa-Ruiz y col. 1999). Así mismo, una estrategia novedosa y muy prometedora parece ser la manipulación de genes implicados en las rutas de transducción de señales o en la activación transcripcional de múltiples genes (factores de transcripción), que al controlar diferentes características fisiológicas (p.e., la homeostasia iónica) parece incrementar la tolerancia de forma cualitativa y cuantitativa (Pardo y col. 1998). Además, en virtud de la conexión existente entre varias rutas de defensa contra diferentes estreses (sal, frío, sequía), la manipulación de dichos genes podría ocasionar una protección cruzada frente a diferentes tipos de estrés (Serrano 1996, Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 1997, Serrano y col. 1999).

Todos estos resultados han hecho concebir esperanzas de que una mayor profundización en la investigación de las respuestas de las plantas a la salinidad y de sus mecanismos de tolerancia, así como la identificación de marcadores bioquímicos y/o génicos derivados de ellos, facilitarían la selección y/o la mejora de variedades más tolerantes. No cabe duda, que para llevar a cabo este desafío, se requiere el esfuerzo combinado de fisiólogos, bioquímicos, biotecnólogos y mejoradores, cuya cooperación abra las posibilidades de un aumento de la productividad (y calidad) en áreas de cultivo afectadas por la salinidad.

A.4. Efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento y metabolismo de las plantas

El efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas se debe a la combinación de tres efectos (Greenway y Munns 1980, Shannon y col. 1994): a) el estrés hídrico causado por el potencial hídrico más negativo del medio (hiperosmótico) de la raíz que provoca la disminución de la actividad química de agua y la pérdida del turgor, b) la toxicidad iónica específica asociada

normalmente a la excesiva absorción de iones Na^+ y Cl^- , c) la perturbación de la nutrición mineral causada por el exceso de Na^+ o Cl^- que conduce a una menor absorción o a una alteración de la distribución de iones esenciales como el K^+ , Ca^{2+} , nitrato o fosfato.

Estos efectos negativos dan lugar, en plantas más o menos sensibles, a un rango de respuestas que van desde la reducción del turgor, inhibición de las funciones de membrana, de determinadas actividades enzimáticas y producción de radicales libres, hasta la disminución de la fotosíntesis e inducción de deficiencias iónicas, interferencia del Cl^- con los sitios aniónicos implicados en el ligamiento de ARN y de metabolitos aniónicos como bicarbonatos, carboxilatos y azúcares fosfatos. De otro lado, el Na^+ puede interferir con los sitios catiónicos implicados en el ligamiento de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . La consecuencia general de todos estos efectos es la reducción del crecimiento, que en caso de extrema severidad del estrés, puede llevar a la muerte de la planta. Diferentes autores han recopilado esta multitud de manifestaciones fisiológicas, bioquímicas y moleculares en plantas cultivadas bajo condiciones salinas (**Greenway y Munns 1980, Shannon 1984, Hasegawa y col. 1986, Cheeseman 1988, Hurkman 1992, Rengel 1992, Munns 1993, Shannon y col. 1994, Niu y col. 1995, Serrano y Gaxiola 1994, Inzé y Van Montagu 1995, Serrano 1996, Yeo 1998, Serrano y col. 1999**).

A diferencia de las plantas halófitas, las glicófitas reducen rápidamente su crecimiento bajo condiciones salinas, afectándose más la parte aérea que la raíz (**Greenway y Munns 1980**), aunque en algunos casos la raíz resultó ser particularmente sensible (**Thiel y col. 1988**). En tomate (**Snapp y Shannan 1992**), maíz (**Cramer y col. 1988**) y algodón (**Cramer y col. 1985**) se ha observado que el crecimiento de la raíz puede resultar igualmente afectado que la parte aérea.

Ha existido una gran controversia acerca de la causa primaria responsable de la disminución del crecimiento de plantas glicófitas por la salinidad, resultando difícil discernir la importancia relativa de los efectos osmóticos, iónicos y desequilibrios nutricionales. Algunos autores han sugerido que este efecto rápido tiene lugar primariamente en la raíz, debido a un efecto osmótico más que iónico (**Neumann y col. 1988, Munns 1993, Ortiz y col. 1994**), a través de una reducción

en el volumen celular (Iraki y col. 1989). La causa primaria de esta reducción del volumen celular es también controvertida, pudiendo provenir de una disminución del turgor causado por el déficit hídrico (Neumann y col. 1988), y/o de una extensibilidad reducida de la pared celular (Iraki y col. 1989), a través de una alteración en el metabolismo de sus componentes polisacarídicos (Iraki y col. 1989, Cachorro y col. 1993, Zhong y Läuchli 1993).

El crecimiento de la parte aérea estaría regulado por el estatus hídrico de la raíz, mediado por señales químicas, como el ácido abscísico y citoquininas inducidas por el efecto osmótico del estrés salino (Wolf y col. 1990, Davies y Zhang 1991, Lerner y Amzallag 1994), aunque también se ha postulado que dichas señales son de naturaleza hidráulica (Kramer 1988).

En contraste con el concepto de la raíz como sensor primario del estrés salino, otros autores habían mostrado en maíz una inhibición de la elongación de las hojas, independientemente de la raíz (Cramer y Bowman 1991). Dicho efecto inhibitorio sobre la parte aérea, estaría localizado en los tejidos en crecimiento y no en las hojas maduras, merced a una disminución del turgor, derivado del déficit hídrico causado por el componente osmótico del estrés (Thiel y col. 1988, Cramer y Bowman 1991). Alternativamente, se ha propuesto como causa primaria una alteración en la nutrición de las células del meristemo apical de la parte aérea (Lazof y Läuchli 1991).

Algunos autores han indicado que la salinidad podría afectar el crecimiento de las plantas al disminuir la cantidad de fotosintatos que llegan a la zona de crecimiento, vía reducción de la fotosíntesis por unidad de área de hoja, o de su transporte por el floema (Greenway y Munns 1980). Sin embargo, se ha demostrado que la inhibición del crecimiento bajo condiciones salinas era mucho mayor que la inducida sobre la capacidad fotosintética por unidad de área de hoja, lo que indicaba que la acción sobre la fotosíntesis no era la causa primaria (Cheeseman 1988, Myers y col. 1990).

Actualmente, se piensa que el efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento sigue un modelo bifásico (Munns 1993), consistente en la inhibición en una fase muy temprana, por una reducción del suministro de agua debido a un efecto osmótico inespecífico de las sales, que se continúa en una fase más tardía (días,

semanas), por un efecto iónico específico, a causa de la alta concentración intracelular de iones Na^+ y Cl^- , que provocan daños a nivel celular y aceleran la senescencia de las hojas. Para **Munns (1993)**, esto quiere decir, que no son las sales absorbidas las que controlan el crecimiento a través de la disminución del turgor, la fotosíntesis o las actividades enzimáticas, sino más bien que la elevación de la concentración de sal en hojas viejas es lo que acelera su muerte, de manera que la pérdida de las mismas afecta al suministro de asimilados y hormonas a las regiones más jóvenes, y por tanto, a su crecimiento.

No obstante, se desconoce por el momento el mecanismo primario de la toxicidad por sales. Resultados recientes en levaduras y plantas superiores han mostrado blancos específicos de toxicidad por Na^+ como el enzima 3'-fosfoadenosino-5'-fosfatofosfatasa, codificado por la familia de genes HAL2, que participa en la ruta de activación de sulfato (**Murguía y col. 1995, Gil-Mascarell y col. 1999**).

Otro de los efectos primarios del estrés salino sobre el crecimiento se había atribuido a un daño en las membranas celulares ejercido por el componente iónico del estrés, como resultado de una alteración de la estructura y funcionalidad de las mismas, a través de cambios inducidos en sus componentes lipídicos y/o protéicos (**Brown y Dupont 1989, Belver y Travis 1990, Hurkman 1992, Rodriguez Rosales y col. 1999**). Este daño en las membranas explicaría la alteración en procesos tales como fotosíntesis, respiración y absorción y transporte de nutrientes minerales (**Läuchli y Epstein 1990**).

Se había postulado que una acción tóxica rápida del estrés salino sobre las membranas podría provenir del desplazamiento por el Na^+ de los iones Ca^{2+} asociados a la membrana plasmática y otros sistemas endomembranarios (**Lynch y Läuchli 1988**). Ello tendría como consecuencia una alteración de la homeostasia del Ca^{2+} intracelular y constituiría la respuesta primaria de las células de las raíces al estrés salino, lo que explicaría la gama de alteraciones observadas en respuesta a la sal (**Läuchli 1990, Rengel 1992**). Asimismo, este efecto explicaría la protección del Ca^{2+} de los efectos adversos de la salinidad sobre las plantas (**Lauchli 1990**). Actualmente, el papel relevante del Ca^{2+} en la tolerancia a la salinidad se entiende en el contexto de la función de este elemento como

segundo mensajero celular. Resultados recientes han indicado que el estrés salino es percibido por la planta a través de un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico (Lynch y col. 1989, Kinght y col. 1997), probablemente mediado por el metabolismo de los fosfoinosítidos (Pical y col. 1999), que activaría una cascada de proteínas quinasas y fosfatasas dependiente de este ion. Esta respuesta, a su vez, regularía una batería de proteínas implicadas en la tolerancia a la sal (Bressan y col. 1998, Serrano y col. 1999, apartado II.B.3), de manera que una persistencia del estrés, que llegara a superar los mecanismos homeostáticos de defensa, ocasionaría todos los efectos negativos asociados a la salinidad (Rengel 1992).

Cualquiera que sea la causa primaria implicada en este estrés abiótico, la disminución del crecimiento en condiciones salinas parece tener connotaciones adaptativas, puesto que parte de la energía usada normalmente en el crecimiento y desarrollo, se desvía hacia procesos de mantenimiento de los mecanismos involucrados en la tolerancia al estrés, tales como la regulación de las concentraciones intracelulares de iones, síntesis de solutos orgánicos compatibles y el mantenimiento de la integridad de las membranas (Cheeseman 1988, Shannon y col. 1994).

B. MECANISMOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA

Las plantas pueden adoptar dos tipos de respuestas adaptativas frente a la salinidad. Por un lado, las que se engloban en un mecanismo de evitación, mediante el desarrollo de funciones y estructuras celulares que protegen de dichas condiciones. Por otro lado, un mecanismo de tolerancia mediante el cual las células adaptan sus funciones para que puedan operar con altas concentraciones intracelulares de sales. Con frecuencia, en las plantas se dan simultáneamente estos dos tipos de respuesta (Greenway y Munns 1980). De hecho, ambas denominaciones suelen confundirse bajo el nombre genérico de mecanismos de tolerancia y, a lo largo de este trabajo, se seguirán utilizando sin distinción.

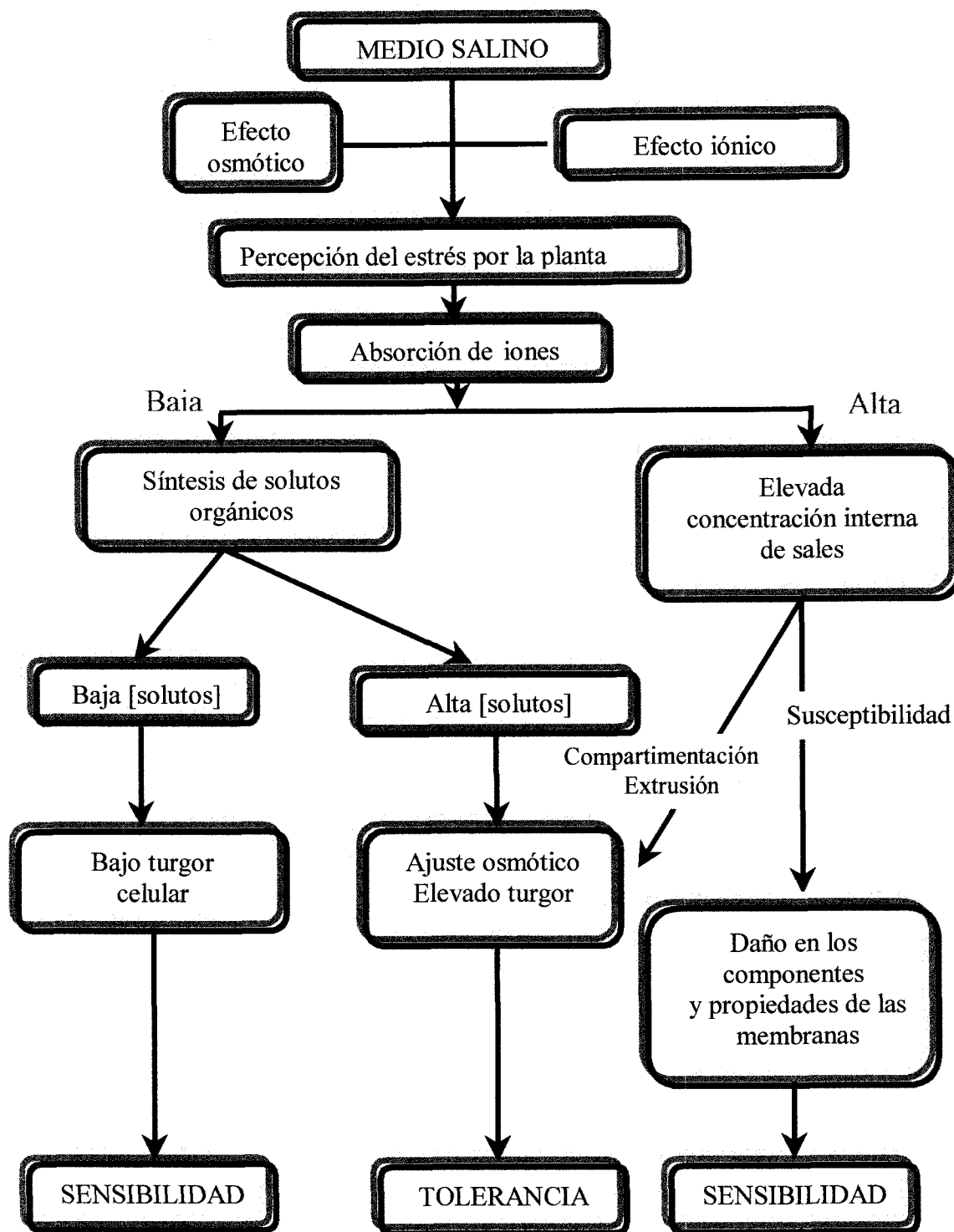


Figura 1. Mecanismo básico de tolerancia a la salinidad.

En general, las plantas que toleran ambientes salinos han desarrollado básicamente dos tipos de estrategias (**Greenway y Munns 1980, Jeschke 1984, Cheeseman 1988, Fig. 1**): la estrategia glicofítica, basada predominantemente en la exclusión de iones de la raíz y/o parte aérea, en combinación con la síntesis de solutos orgánicos para su ajuste osmótico; y la estrategia halofítica, basada en la alta velocidad de absorción y transporte de iones, y cuya acumulación en determinados tejidos y su compartimentación subcelular evita la toxicidad iónica, al tiempo que contribuye significativamente al ajuste osmótico. Aparte de las plantas propiamente halófitas, la mayoría de las especies cultivadas suelen presentar una estrategia glicofítica, aunque algunas especies glicofíticas tolerantes pueden exhibir rasgos halofíticos (**Tal 1984, Shannon 1984**).

El hecho de que el ajuste osmótico por iones inorgánicos absorbibles sea energéticamente menos costoso, en comparación con la síntesis de moléculas orgánicas por la célula, hacen que estos rasgos halofíticos sean altamente deseables para su utilización en programas de mejora (**Tal 1984, Shannon 1984**).

A nivel celular, los mecanismos de tolerancia a la salinidad descansan sobre tres aspectos interrelacionados, ya referidos anteriormente (**Shannon y col. 1994, Serrano 1996**) (**Fig. 2**): a) el mantenimiento del equilibrio osmótico en relación con el tonoplasto y con el medio externo, requiere la síntesis en el citoplasma de solutos orgánicos compatibles (prolina, sacarosa, azúcares, etc.), y/o en conjunción con b) el mantenimiento de la homeostasia iónica, es decir, el control de la absorción de iones y su compartimentación intracelular (vacuolas), de manera que se mantengan las concentraciones de iones en el citoplasma dentro de un rango de 100 a 200 mM de K^+ , 1 a 30 mM Na^+ y Cl^- y 100 a 200 nM Ca^{2+} , requiriéndose una alta selectividad para el K^+ sobre el Na^+ , del Mg^{2+} sobre el Ca^{2+} , y del fosfato sobre el cloro o el nitrato y c) un apropiado y coordinado sistema de transducción de la señal de estrés, en la que una serie de moléculas (segundos mensajeros) deben regular a proteínas implicadas en el transporte iónico y el mantenimiento del turgor o la expresión de los genes que las codifican.

A nivel del organismo, las plantas han desarrollado un amplio rango de cambios anatómicos y fisiológicos para el control del transporte de iones y agua y su distribución a nivel de tejidos y del organismo entero. De acuerdo con el modelo

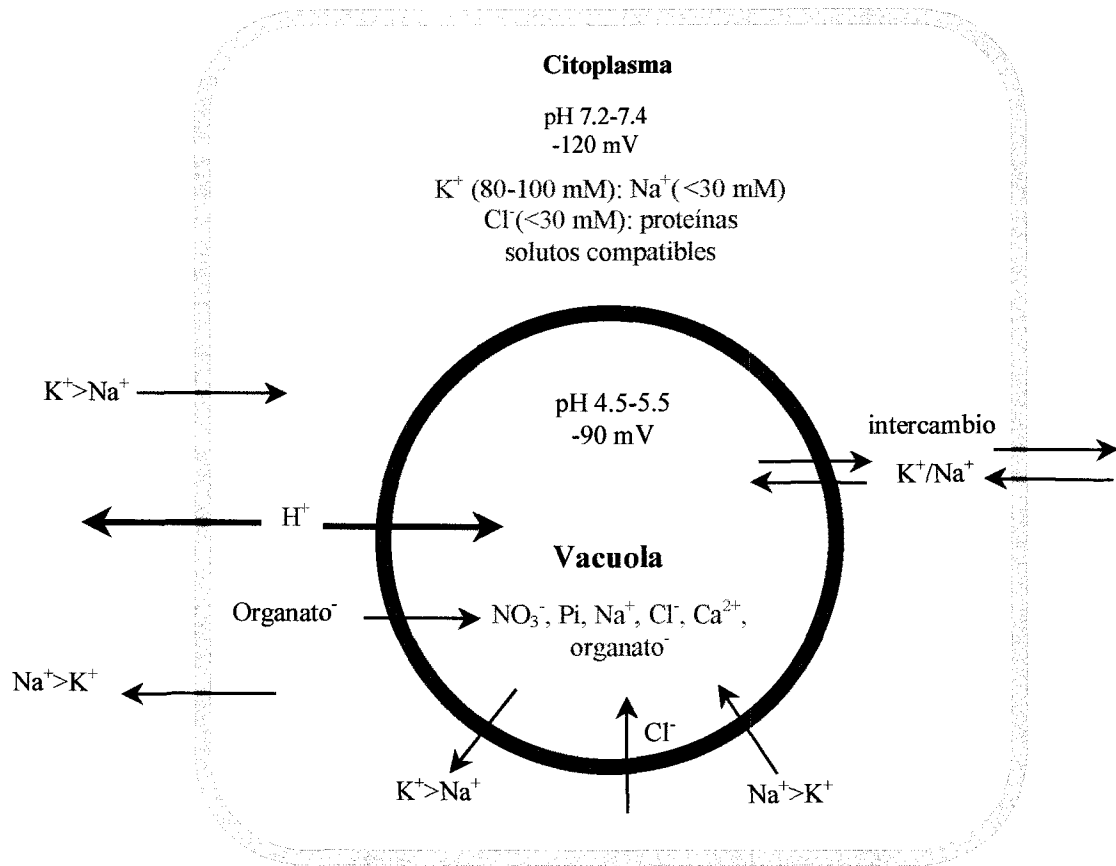


Figura 2. Mecanismos de tolerancia de las plantas a la salinidad a nivel celular, mostrando la compartimentación intracelular de iones y solutos, y osmorregulación.

conceptual de transporte de agua y solutos a nivel de la raíz (Clarkson 1993, Fig. 3), la absorción de iones y agua en este tejido tiene lugar primariamente en el plasmalema de las células epidérmicas y corticales. Posteriormente, son transportados, vía simplasto, a través de los plasmodesmos de células adyacentes, hasta las células de la estela, siendo finalmente, liberados a los vasos del xilema, vía apoplasto, a través del plasmalema de las células de la estela o, directamente, desde las células parenquimáticas del xilema.

La ruta apoplástica, otra vía de entrada de agua e iones, está formada por el entramado de las paredes celulares de las células de la raíz. Esta ruta, de difusión pasiva, y por tanto, no selectiva, puede interrumpirse, a partir de la zona de diferenciación de la raíz, por la presencia de zonas suberinizadas en las paredes de las células de la endodermis (banda de Caspary), restringiendo el paso de iones y agua, forzando la entrada al simplasto de la estela a través del plasmalema de estas células.

A nivel radicular, los mecanismos que controlan la absorción selectiva de iones y su compartimentación intracelular gobiernan la tolerancia relativa a la salinidad (Cheeseman 1988, Niu y col. 1995, Serrano 1996). La absorción por las raíces de grandes cantidades de iones Na^+ y Cl^- provoca la alteración de la absorción y, por tanto, del contenido de otros iones, particularmente K^+ y Ca^{2+} (Läuchli y col. 1994), resultando de especial importancia en la tolerancia a la sal el mantenimiento de la selectividad entre el K^+ y el Na^+ en el citoplasma (Greenway y Munns 1980, Shannon y col. 1994). De acuerdo con el modelo anterior de transporte a través de la raíz, la selectividad K^+/Na^+ debe estar controlada a nivel de tres membranas (Fig. 3): el plasmalema de células epidérmicas y corticales y el tonoplasto de la raíz, aspectos que serán revisados con detalle en el apartado II.B.2 de esta memoria.

Otro punto de control de la selectividad K^+/Na^+ se establece a nivel del plasmalema de las células parenquimáticas del xilema, responsables de la carga activa de iones en el xilema, y por tanto, de la concentración relativa de iones que llega a la parte aérea por la corriente xilemática (Pitman 1984). En muchas especies glicofíticas, con altas razones K^+/Na^+ en partes aéreas, la liberación preferente de K^+ en el xilema o la reabsorción de Na^+ de la savia xilemática, conduce a una mejora en

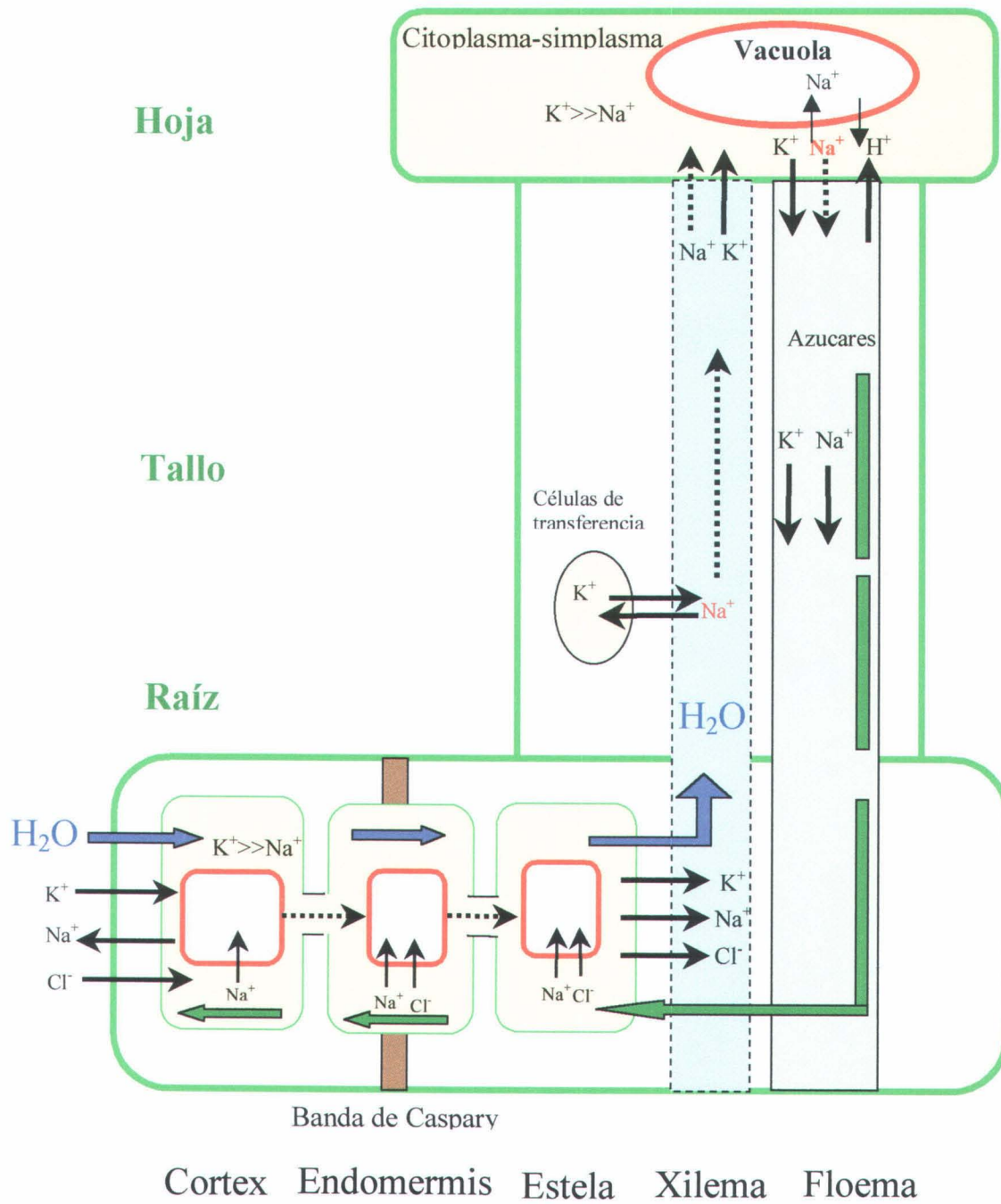


Figura 3. Esquema general de transporte de iones a nivel de la planta entera mostrando la diferentes rutas de control de la selectividad del K^+ en relación al Na^+ .

la selectividad K^+/Na^+ . Concretamente, en legumbres, existe un mecanismo de exclusión de Na^+ de la parte aérea basado en el intercambio Na^+/K^+ en las células parenquimáticas del xilema, con apariencia de células de transferencia, a nivel de las partes proximales del tallo y de la raíz (Fig. 3, **Läuchli 1984, Kramer 1984**). Este mecanismo de exclusión de Na^+ de las hojas confiere tolerancia a una salinidad de intensidad y duración moderada, ya que las capacidades de almacenamiento de estas células son rápidamente saturadas (**Läuchli 1984**).

La liberación de iones en los vasos del xilema, estaría dirigida por el gradiente electroquímico de H^+ generado por la acción de una H^+ -ATPasa, localizada en el plasmalema de las células parenquimáticas frontera con los vasos del xilema. Se ha demostrado que el plasmalema purificado del tejido de la estela de raíces de maíz, contiene una H^+ -ATPasa con propiedades similares a la del cortex (**Cowan y col. 1993**). Así mismo, se ha detectado un alto contenido de ATPasa en la periferia de las células parenquimáticas del xilema de raíz de cebada (**Parets-Soler y col. 1990, Samuels y col. 1992, Palmgren 1998**).

A nivel foliar, los mecanismos de respuesta al estrés salino son también complejos y, probablemente, presentan una mayor variación entre especies. De igual forma que en la raíz, los mecanismos de transporte a través del plasmalema y tonoplasto de las células de la hoja son los responsables últimos de la distribución de solutos a nivel intracelular y de tejido (**Niu y col. 1995, Rausch y col. 1996**).

Un mecanismo de tolerancia a la salinidad, más eficiente y barato energéticamente que la exclusión de Na^+ a la parte aérea, es la inclusión de sales. Se basa en una alta velocidad de transporte de iones, acoplada con una compartimentación subcelular en las vacuolas de las células de la hoja. En especies halofíticas, como *Atriplex*, o glicofitas tolerantes, como algunas especies y variedades de cebada y tomate, existe una preferencia por la liberación de Na^+ al xilema, eliminando con ello el Na^+ del citoplasma de la raíz, al tiempo que el Na^+ y el Cl^- , que se transportan por el xilema ayudan en la adaptación osmótica de la parte aérea bajo condiciones salinas (**Jeschke 1984**).

Para evitar la acumulación excesiva de sales en tejidos fotosintéticos, algunas plantas acumulan diferencialmente el NaCl en determinadas zonas de la hoja, o en hojas maduras (**Jeschke 1984**). En plantas halófitas pueden encontrarse adaptaciones

anatómicas especiales que evitan dicha acumulación. Por ejemplo, en *Suaeda maritima* se produce un fenómeno de succulencia, que no es más que un mecanismo de dilución de sales, en función de un aumento en la razón vacuola/citoplasma tamaño celular y de una alta velocidad de crecimiento (Munns 1993). Un mecanismo alternativo que se da en este tipo de plantas, es la formación de estructuras acumuladoras de sales en superficies epidérmicas de hojas y tallos, que excretan al exterior a través de la cutícula, por medio de glándulas de sal o, que la acumulan en células "ampollas" que rompen al exterior una vez saturadas (Jeschke 1984).

B.1. Mantenimiento del equilibrio osmótico

El estrés hídrico causado por el componente osmótico de la salinidad, y que es común a otros estreses como la sequía y frío, conlleva a la pérdida del turgor necesario para la expansión celular y a procesos destructivos irreparables en las proteínas y membranas celulares (Serrano y Gaxiola 1994). Las plantas glicófitas (y halófitas) típicamente responden a la pérdida del turgor restableciendo el equilibrio osmótico mediante la síntesis y acumulación, principalmente en citosol, de osmolitos compatibles con la actividad de los enzimas, del tipo de los polioles (glicerol, sorbitol, manitol, pinitol), azúcares no reductores (fructano, trehalosa y sacarosa), ácidos orgánicos (ácido málico) y algunos aminoácidos y derivados (prolina y glicina-betaína) (McCue y Hanson 1990, Pilon-Smith y col. 1995, Bohnert y col. 1995, Bohnert y Jensen 1996, Hare y col. 1998).

Entre los osmorreguladores indicados, la prolina es el que más frecuentemente se acumula en condiciones de estrés osmótico, principalmente sequía y salinidad. El papel de la prolina en la tolerancia al estrés osmótico se apoya en la mayor tolerancia al NaCl detectada en mutantes acumuladores de prolina obtenidos por mutagénesis química, variación somaclonal o ingeniería genética (Mc Cue y Hanson 1990, Delauney y Verma 1993, Taylor 1996, Petrusa y Winicov 1997, Nanjo y col. 1999), si bien, en algunos casos su acumulación o su síntesis se inicia cuando el daño celular es evidente, indicando que la síntesis de prolina no siempre constituye un

marcador de tolerancia (Perez-Alfocea y col. 1994, Cano y col. 1996, Liu y Zhu 1997).

El control de la síntesis de prolina en plantas es bastante complejo, al existir dos vías biosintéticas regulables a nivel de la actividad de los enzimas o la expresión de los genes implicados en las mismas. La biosíntesis de prolina se lleva a cabo en el citoplasma celular a partir de ornitina o de glutamato, vía pirrolina-5-carboxilato, ésta última inducible en condiciones de estrés por salinidad y deficiencia en nitrógeno (Delauney y Verma 1993). Las dos primeras etapas de la vía pirrolina-5-carboxilato (P5C) están catalizadas en plantas, animales y bacterias por un enzima bifuncional con actividades glutamato 5-quinasa y glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa, denominado 1-pirrolina-5-carboxilato sintasa, (P5CS), que posteriormente es convertido a prolina por la P5C reductasa. La expresión de P5CS en plantas está inducida por el estrés salino y osmótico (Liu y Zhu 1997), habiéndose demostrado que la sobreexpresión de P5CS en tabaco conlleva un incremento en la concentración de prolina, al tiempo que determina una mayor productividad en condiciones de déficit hídrico (Kishor y col. 1995).

Además de ser un soluto compatible, la prolina parece jugar un papel importante en la morfogénesis, ya que plantas transgénicas antisentido para la P5CS mostraban anormalidades morfológicas en diferentes tejidos, que se suprimieron por adición exógena de L-prolina (Nanjo y col. 1999). Así mismo, la prolina puede constituir una fuente nitrogenada o una reserva de ATP utilizable por las plantas durante la recuperación del estrés. Así, la oxidación de prolina a 1-pirrolina-5-carboxilato por el enzima prolina deshidrogenasa ubicada en la membrana interna de la mitocondria permite acoplar la degradación de prolina a la formación ATP (Elthon y Stewart 1981), siendo el gen que la codifica reprimido por estrés hídrico e inducido tras la recuperación del estrés (Kiyosue y col 1996).

La glicina-betaína es otro de los osmorreguladores orgánicos que también se acumulan en algunas plantas en condiciones de estrés osmótico. Se sintetiza en el estroma cloroplastidial por medio de la colina monooxigenasa y betaína-aldehído deshidrogenasa, siendo este último inducible por estrés osmótico, y clave en la tolerancia de maíz (Saneoka y col. 1995).

La sacarosa y/o los azúcares reductores solubles son los principales solutos orgánicos involucrados en el ajuste osmótico en numerosas especies glicófitas sometidas a estrés osmótico o salino (**Pilon-Smith y col. 1995, Ishitani y col. 1996, Gao y col. 1998**). En este sentido, el estrés hídrico o salino se acompaña de modificaciones en el reparto de fotosintatos (**Geigenberger y col. 1997, Gao y col. 1998**) que pueden contribuir al mantenimiento del turgor celular (**Pilon-Smith y col. 1995**). Así, el almidón plastidial representa una reserva de azúcares que puede ser rápidamente convertida en sacarosa en condiciones de estrés (**Geigenberger y col. 1997**). Por otra parte, el estrés osmótico o salino favorece la síntesis de sacarosa a través de la activación de sacarosa fosfato sintasa (SPS), enzima que cataliza la formación de sacarosa-6-P a partir de UDP-glucosa y fructosa-6-P (**Toroser y Huber 1997**). La acumulación de sacarosa en respuesta al estrés salino puede ser también atribuida a una disminución de la degradación de este disacárido, consecuencia de una menor actividad invertasa ácida (**Gao y col. 1998**). A este respecto, se ha descrito la existencia de una correlación positiva entre la acumulación de sacarosa en hojas de plantas sometidas a estrés salino, el incremento de la actividad SPS y la disminución de la actividad invertasa ácida, lo que limitaría el uso de sacarosa como reserva energética, y, en consecuencia, podría disminuir el crecimiento celular (**Geigenberger y col. 1997, Gao y col. 1998**).

Además de su papel como osmorregulador, los azúcares pueden jugar otras funciones en plantas estresadas. Así, la acumulación de azúcares solubles en respuesta a la sal permite paliar el estrés oxidativo causado por la salinidad, debido a la capacidad de algunos de estos solutos para neutralizar los radicales hidróxilo (**Hare y col. 1998**). Además, los azúcares no solamente son importantes para el crecimiento de la planta, sino que también afectan a los sistemas sensores que regulan la expresión de una variedad de genes involucrados en la fotosíntesis, respiración, síntesis y degradación de almidón y sacarosa y metabolismo nitrogenado (**Koch 1996**).

B.2. Mantenimiento de la homeostasia iónica: sistemas de transporte a través de las membranas

De los antecedentes expuestos, resulta evidente que los procesos de regulación de los flujos de iones y su concentración intracelular (homeostasia iónica) juegan un papel central en la tolerancia de las plantas a la salinidad, cualquiera que sea el mecanismo adaptativo utilizado. A nivel de planta entera, constituye un mecanismo fisiológico global, resultado integrado de muchos determinantes bioquímicos y fisiológicos que operan a nivel celular, tisular y del organismo, todos ellos bajo control génico, y que incluye la regulación de la absorción a nivel del cortex de la raíz, la acumulación y liberación de iones de la estela al xilema, reabsorción de iones por las células parenquimáticas del xilema, translocación al floema y su compartimentación en hojas viejas (Cheeseman 1988, Noble y Rogers 1992). De ahí que, la identificación y caracterización bioquímica y génica de cada uno de estos determinantes biológicos son claves para la utilización de la tecnología del ADN recombinante en los programas de mejora de la tolerancia (Serrano y Gaxiola 1994, Serrano y col. 1999).

En función de estos hechos, la distribución de iones y solutos a nivel intracelular y de tejido dependen en último término de los sistemas de transporte ubicados en las membranas celulares, específicamente, la membrana plasmática y la membrana vacuolar (tonoplasto) (Fig. 4). Antes de pasar a la descripción y funcionalidad de dichos sistemas, se repasan brevemente los conceptos básicos y terminología usados en el campo del transporte a través de membranas.

En general, las moléculas de agua, iones y solutos pasan a través de las membranas por dos tipos de mecanismos (Bush 1993): a) difusión simple, en la que el agua, iones y solutos de pequeño tamaño atraviesan las membranas a favor de su gradiente de energía potencial, a una velocidad dependiente de su coeficiente de permeabilidad a la bicapa lipídica; b) transporte facilitado, por medio de sistemas de transporte específicos, identificados como proteínas de membrana, y a favor del gradiente de energía potencial. El transporte facilitado, puede ser pasivo, cuando los solutos se mueven a través de transportadores (uniportadores) o canales a favor de su gradiente de energía potencial, o bien activo, cuando la translocación de los

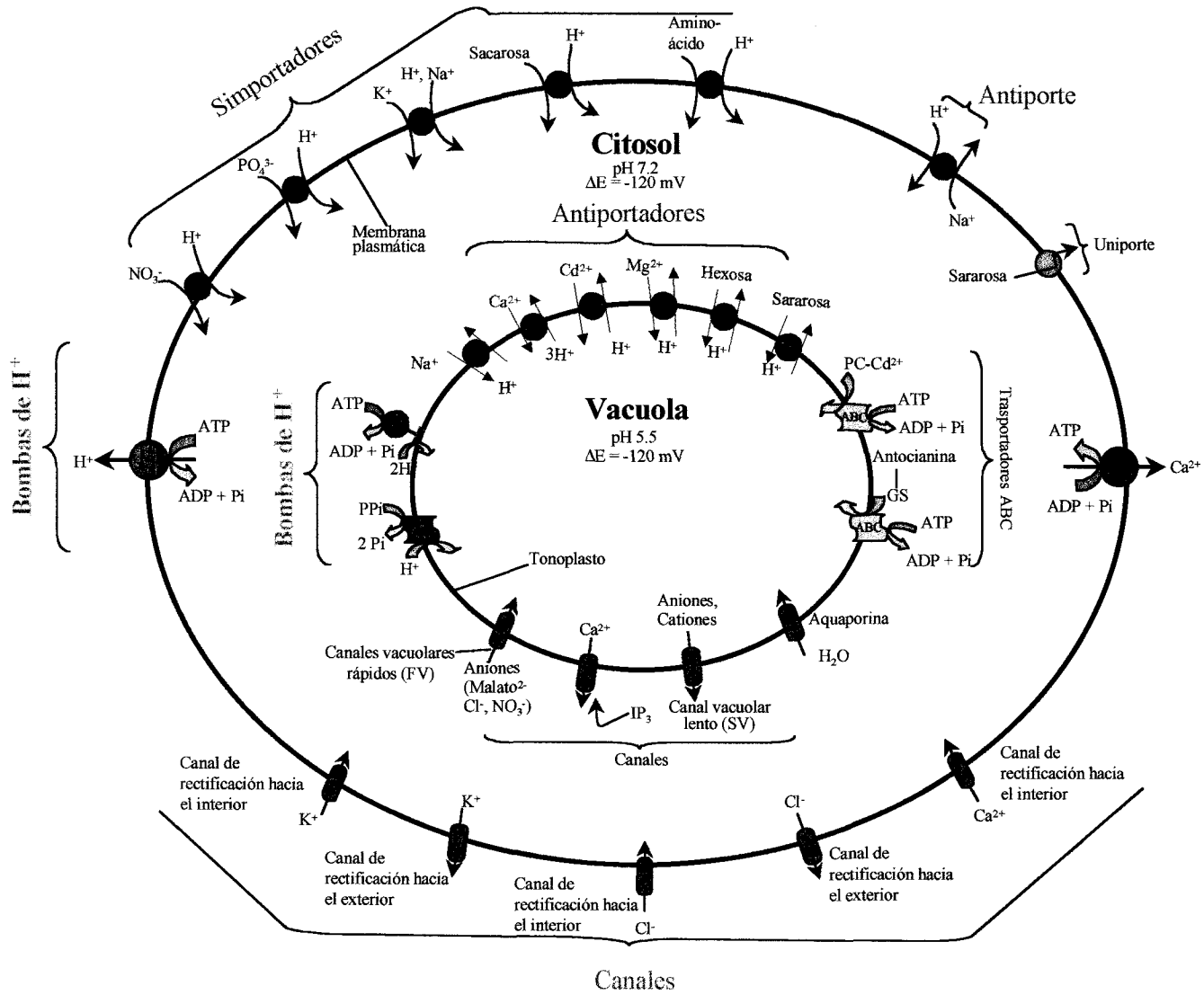


Figura 4. Esquema general de los distintos sistemas de transporte primario y secundario localizados en la membrana plasmática y tonoplasto de una célula vegetal simplificada. Bombas primarias (en rojo), como la ATPasa de membrana plasmática, bombean H^+ fuera de la célula, generando un gradiente electroquímico de H^+ (interior -120 mV , en relación al exterior). Una V-ATPasa y una V-PPasa electrogénica (en rojo) acidifican la vacuola. La fuerza proton motriz suministra la energía para la absorción y liberación de solutos a través del tonoplasto por medio de diferentes transportadores secundarios. Tomado de **Poole (1998)**.

solutos a través de la membrana se lleva a cabo en contra de un gradiente de concentración o de potencial eléctrico, requiriendo aporte de energía externa suministrada por el metabolismo celular.

El transporte activo, a su vez, puede ser primario, cuando la translocación está ligada a una reacción química exergónica que suministra la energía necesaria para el proceso (la hidrólisis de ATP, PPi). Dentro de esta categoría se encuentran las bombas iónicas. El transporte activo secundario, describe un proceso en el que la translocación de un soluto en contra de su gradiente electroquímico está acoplado al flujo de otro soluto que se está moviendo a favor de su gradiente de potencial electroquímico. A esta categoría pertenecen los sistemas simportes (flujo de ambos solutos en la misma dirección) y antiportes (en dirección opuesta).

Los procesos de transporte activo primario a través de las membranas celulares de plantas superiores están constituidos por sistemas de transporte electrogénico de H^+ ubicados, principalmente, en plasmalema y tonoplasto (Serrano 1985, Sze 1985). De la actuación de estas bombas primarias de H^+ se deriva la creación de una diferencia de potencial eléctrico a través de estas membranas, así como una diferencia de pH, próximo a la neutralidad en el citoplasma, y ácido en la vacuola (Fig. 4). El gradiente electroquímico generado por el bombeo de H^+ , constituye la energía o fuerza motriz para el transporte de diferentes solutos (cationes, aniones, azúcares y otras sustancias), mediante una batería de transportadores secundarios ubicados en estas estructuras (Serrano 1989, Sze y col. 1992, Rea y Poole 1993, Serrano y Villalba 1993, Sze y col. 1999, Fig. 4), tal y como predice la teoría quimiosmótica de Mitchell (Mitchell 1976). Asimismo, entre las funciones definidas por los autores anteriormente citados, las bombas de H^+ controlan el pH citoplasmático y juegan un papel clave en la regulación de la turgencia y volumen celular, homeostasis de la composición iónica intracelular, apertura y cierre de los estomas, carga del floema y xilema, regulación de la elongación celular y de la síntesis de la pared celular, mantenimiento del potencial de membrana y otras funciones esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Debido a que estas funciones están claramente afectadas en plantas estresadas por la salinidad, parece lógico pensar que el estrés salino debe de ejercer algún efecto sobre estos

enzimas bombreadores de protones. Este aspecto será revisado mas adelante en relación a cada sistema particular de bombeo de H^+ .

En plantas, el transporte electrogénico de H^+ se lleva a cabo por medio de enzimas H^+ -ATPasas asociados fundamentalmente a plasmalema y tonoplasto, y H^+ -PPasa de tonoplasto (Serrano 1985, Zhen y col. 1997, Palmgren 1998, Sze y col. 1999). Un gran número de trabajos ya habían puesto de manifiesto la presencia de estas ATPasas electrogénicas en vesículas de membrana aisladas de diferentes tejidos (revisado por Sze 1985, Serrano 1985). En estas vesículas, la extrusión electrogénica de H^+ , por parte de cada una de estas fosfohidrolasas, provocan la formación de un gradiente eléctrico ($\Delta\psi$) y químico (ΔpH), que contribuyen a la formación del gradiente electroquímico transmembranario ($\Delta\mu H^+$):

$$\Delta\mu H^+ = \Delta\psi + 59\Delta pH$$

En vesículas aisladas, el potencial de membrana ($\Delta\psi$) se establece en ausencia de iones permeantes, mientras que la generación de un ΔpH requiere la presencia de iones permeantes que disipen dicho potencial (Sze 1985).

La capacidad para la absorción de iones a través de un canal puede calcularse por la ecuación de Nernst (Palmgren 1998):

$$\Delta E = 58/z \text{ mV} (\log [C]_{\text{ext}}/[C]_{\text{int}})$$

donde $[C]_{\text{ext}}$, $[C]_{\text{int}}$, z y ΔE son las concentraciones de cationes externas e internas, la carga del ion y el potencial de membrana (en mV), respectivamente. Con un potencial típico de -120mV , un canal permite 100 veces la acumulación de un cation monovalente dentro de la célula. Si se usa un simportador, los cationes pueden acumularse a un mayor nivel, según la ecuación siguiente (Palmgren 1998):

$$\Delta E = 58/(z+nH^+) \text{ mV} (\Delta pH + \log [C]_{\text{ext}}/[C]_{\text{int}})$$

donde nH^+ es el número de H^+ transportados por ión y ΔpH es el gradiente de pH ($pH_{\text{cir}} - pH_{\text{ext}}$). Con un potencial de membrana de -120 mV y $\Delta pH=2$, la acumulación intracelular de un catión monovalente con H^+ puede llegar a ser teóricamente un millón de veces.

B.2.1. P-H⁺-ATPasa y transportadores secundarios de la membrana plasmática implicados en el flujo de Na⁺ y Cl⁻

El plasmalema de las células corticales, como primer punto de entrada al simplasto, debe ser altamente selectivo para el K⁺, bien por influjo selectivo de K⁺ y/o extrusión activa de Na⁺. La extrusión de Na⁺ a nivel de plasmalema puede tener lugar por acción de Na⁺-ATPasas o por un mecanismo antiportador Na⁺/H⁺ acoplado a un gradiente electroquímico de H⁺. Si bien existen evidencias del funcionamiento de bombas primarias de Na⁺ en hongos (Haro y col. 1993, Rodríguez-Navarro y col. 1994), la extrusión de Na⁺ en plasmalema de células vegetales parece tener lugar por acción de un mecanismo antiporte Na⁺/H⁺ (Serrano 1985, Hassidim y col. 1990).

En cuanto a la relevancia de las bombas primarias de H⁺ en la tolerancia a la salinidad, como determinantes del control del transporte de iones a nivel del plasmalema, será tratada a continuación.

P-H⁺-ATPasa

Las P-ATPasas comprenden una superfamilia de proteínas implicadas en el bombeo activo de sustratos a través de las membranas. Pueden agruparse en 5 grandes grupos en función más bien de la especificidad del sustrato que del origen evolutivo (Axelsen y Palmgren 1998), incluyéndose la ATPasa de plasmalema de plantas superiores en la subfamilia de tipo IIIA, y a la que pertenecen también, dado su similitud, las H⁺-ATPasas de hongos (Serrano 1989, Axelsen y Palmgren 1998).

El enzima H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de plantas (EC. 3.6.1.35) es un miembro de la familia de las P-ATPasas. Presenta una única subunidad catalítica de aproximadamente 100 KD, activa en forma monomérica como en forma homodimérica, y forma un intermediario fosforilado, mediante enlace aspartil-fosfato, durante su ciclo de reacción, inhibible por vanadato (Palmgren 1998, Axelsen y Palmgren 1998, Sze y col. 1999). Se ha purificado

Tabla 2. Tipos de bombas de H^+ asociadas a la membrana plasmática y sistemas endomembranarios de células vegetales y propiedades bioquímicas básicas. N.I.= no inhibida. (Recopilado de Sze 1985, Serrano 1990, Sze y col. 1992, Rea y Poole 1993, Sze y col. 1999 y sus referencias).

Propiedades	P- H^+ -ATPasa	V- H^+ -ATPasa	V- H^+ -PPasa
Localización celular	Membrana plasmática	Endomembrana, vacuola	Endomembrana, vacuola
Peso molecular	100 kD (n=1 a 2)	Complejo 650 kD (8 a 10 sub diferentes)	81 kD (n=1 a 2)
Velocidad (ion/s)	60 (variable)	60 (variable)	38 a 82
Estequiometría	0 a 1 H^+ /ATP	2 a 3 H^+ /ATP	1 H^+ /PPi
Intermediario ciclo de reacción	Aspartil fosfato	--	--
pH óptimo	6.5-7.5	7.0-8.0	7.0-8.5
Sustrato	ATP>>NTP	ATP>GTP>NTP	PPi
Km (ATP o PPi)	0.3-1.4 mM	0.1-0.2 mM	15-30 μ M
Cofactor	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}
Activadores			
<i>Aniones</i>	no efecto	Cl ⁻ , Br ⁻ >I ⁻ >HCO ₃ ⁻ >SO ₄ ⁻	no efecto
<i>Cationes</i>	K ⁺ >NH ₄ ⁺ >Rb ⁺ >Cs ⁺ >Na ⁺ >Li ⁺	no efecto	K ⁺ >NH ₄ ⁺
Inhibidores			
Concentraciones para >90% inh.			
<i>Vanadato</i>	50 μ M	N.I.	N.I.
<i>Nitrato</i>	N.I.	20 mM	N.I.
<i>Molibdato</i>	N.I.	N.I.	N.I.
<i>Azida</i>	N.I.	N.I.	N.I.
<i>Oligomicina</i>	N.I.	N.I.	N.I.
<i>Bafilomic. A1</i>	N.I.	10 nM	N.I.
<i>1,1difosfonatos</i>	N.I.	N.I.	10-100 μ M
<i>DCCD</i>	100 μ M	10 μ M	>100 μ M
<i>DES</i>	100 μ M	100 μ M	>100 μ M
<i>Eritrosina B</i>	50 μ M	50 μ M	

de diversos orígenes vegetales y caracterizado a nivel bioquímico, tanto en vesículas de membrana y proteoliposomas como en preparaciones purificadas del enzima solubilizado con detergentes (Sze 1985, Serrano 1985, 1988b, 1990; Briskin 1990, Palmgren, 1998).

En la **Tabla 2** se muestran las características más relevantes del enzima, recopilados de los trabajos mencionados, en comparación con otras fosfohidrolasas transportadoras de H^+ de interés en esta memoria. El pH óptimo es de 6.5, mostrando una estequiometria variable de 0 a 1 H^+ transportados por ATP hidrolizado y una cinética de saturación michaeliana frente al Mg-ATP, con valores de K_m entre 0.3 y 1.4 mM. El Ca^{2+} no sustituye al Mg^{2+} , e inhibe la actividad ATPásica a muy bajas concentraciones. El enzima se estimula por cationes monovalentes sobre todo a pH ácido: $K^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ > Na^+, Li^+$ y por algunos aniones permeantes como (Cl^-, Br^-, NO_3^-) que estimulan la formación del gradiente de pH, al disipar el gradiente eléctrico intravesicular.

Este tipo de ATPasa se caracteriza por ser altamente sensible a ortovanadato, si bien al ser éste un inhibidor general de enzimas que forman intermediario fosforilado, inhibe también a fosfatasas ácidas y otras ATPasas como las localizadas en el RE (Kawata y Yoshida 1988). De forma menos específica, el enzima se inhibe por eritrosina B, DCCD, DES y DIDS, siendo insensible a oligomicina, azida, NO_3^- y bafilomicina, los dos primeros compuestos, inhibidores específicos de F-ATPasas, y los últimos de las V-ATPasas.

El gen que codifica la H^+ -ATPasa de plasmalema fue inicialmente clonado y secuenciado en levadura (Serrano y col. 1986), y en *Arabidopsis thaliana* (Pardo y Serrano 1989, Harper y col. 1989), habiéndose obtenido posteriormente más de 20 secuencias completas de genes de H^+ -ATPasa de diferentes especies vegetales (Palmgren 1998, Axelsen y Palmgren 1998). Asimismo, se ha comprobado que el enzima de plantas superiores puede estar codificado por varias isoformas génicas. Se han identificado hasta 11 genes en *Arabidopsis thaliana* (Harper y col. 1990), 7 en tomate (Ewing y Bennett 1994), 4 en *Nicotiana plumbaginifolia* (Boutry y col. 1989), 2 en *Oryza sativa* (Ookura y col. 1994), y 2 en *Solanum tuberosum* (Harms y col. 1994).

Hasta el momento no se ha resuelto la estructura tridimensional de esta proteína a nivel atómico (**Palmgren y Harper 1999**). Si bien, recientemente se han obtenido resoluciones de hasta 8 Å para la estructura de H⁺-ATPasa de membrana plasmática de *Neurospora* (**Auer y col. 1998**). Estas estructuras confirman muchas de las predicciones obtenidas por análisis de las secuencias (**Fig. 5, Serrano 1989, Briskin 1990, Serrano y Villalba 1993, Axelsen y Palmgren 1998, Palmgren y Harper 1999**). La comparación de las secuencias de la proteína, compuesta por 920-950 aminoácidos (100 kD), en diversos orígenes vegetales, pone de manifiesto la existencia de 10 regiones hidrofóbicas compuestas por 17-24 residuos en configuración alfa-hélice, capaces de atravesar la bicapa lipídica, que determinan la estructura tridimensional de la misma, en la que el extremo amino y carboxilo terminal estarían orientados hacia el citoplasma (**Fig. 5**). Asimismo, en los orígenes estudiados, existen 8 regiones o motivos altamente conservados que se sitúan en las regiones hidrofílicas de la proteína, orientados hacia la cara citoplasmática de la membrana formando parte, probablemente, del centro activo.

En levaduras, el dominio N-terminal es el más variable en longitud y secuencia. Esta región contiene la mayoría de los determinantes antigénicos que, aunque no se conoce exactamente su función, parecen ser imprescindibles para su correcta ubicación en la membrana plasmática. Existen dos dominios o bucles citoplasmáticos que parecen contener los centros activos. El mayor de ellos, con actividad kinasa y sitio de unión del ATP, cataliza la formación del intermediario fosforilado en el residuo aspartato de una secuencia altamente conservada, DKTGT, conteniendo probablemente cuatro de los motivos altamente conservados (motivos e, t, g, h). El dominio de menor tamaño, con actividad fosfatasa, cataliza la hidrólisis del intermediario fosforilado y contiene los tres primeros lugares conservados del enzima (motivos a, b, c). El extremo C-terminal, también variable en longitud y secuencia, parece constituir un dominio autoinhibitorio del enzima que bloquea de forma regulable el centro activo (**Palmgren y col. 1991**). El canal de H⁺ estaría formado por el grupo de 4 a 6 alfa-hélices transmembranario (**Axelsen y Palmgren 1998**).

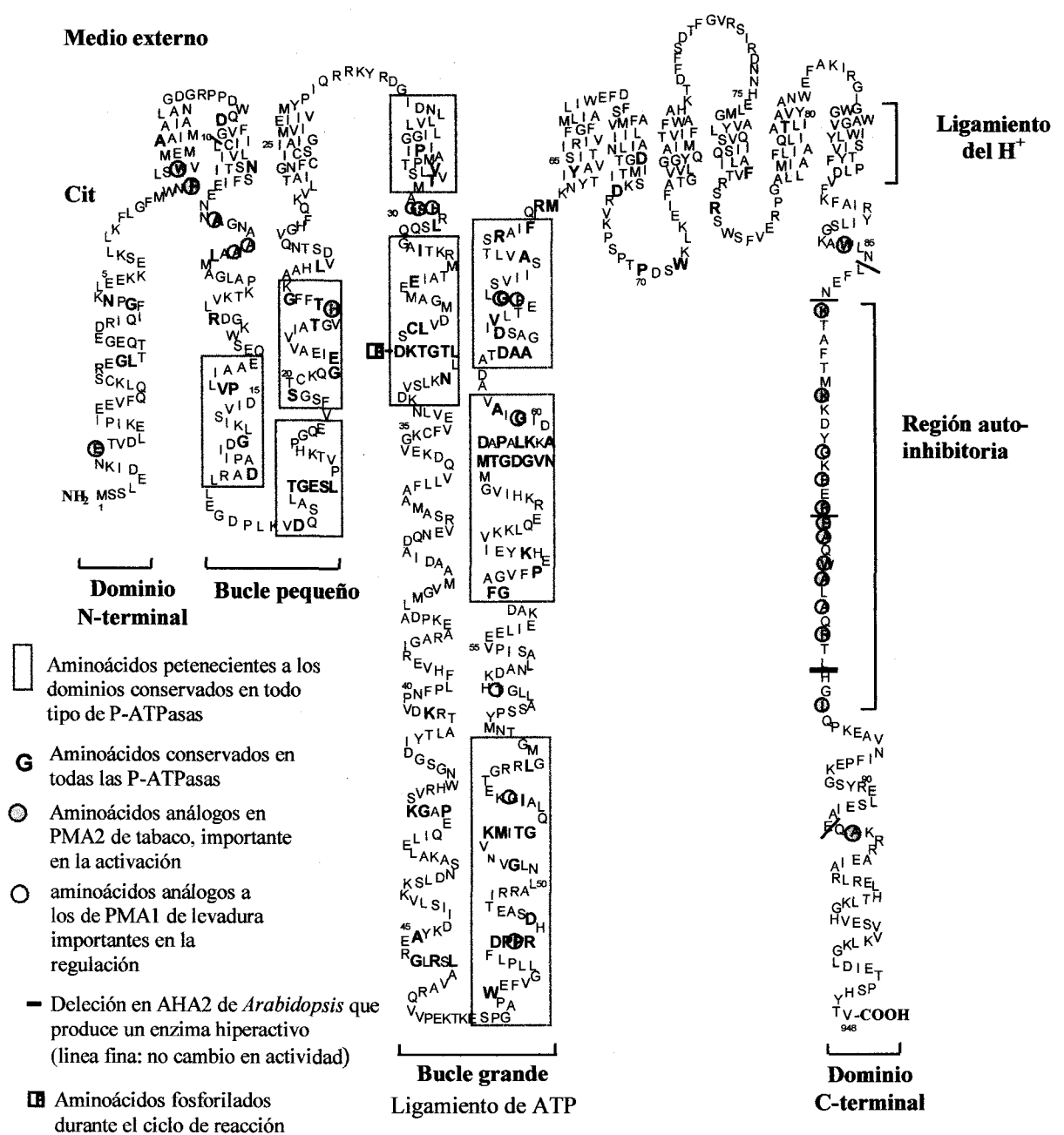


Figura 5. Representación de la estructura primaria de la H⁺-ATPasa (AHA2) de *Arabidopsis*. La cadena lineal, compuesta de 920-950 aminoácidos, se pliega en las membranas celulares y configura una estructura muy compleja. El modelo esbozado destaca los dominios funcionales (fosfatasa, quinasa e inhibidor). Tomado de *Palmgren (1998)*.

En cuanto al mecanismo de acción, se ha propuesto un modelo de acoplamiento energético entre la hidrólisis de ATP y el transporte de H^+ para las P-ATPasas, basado en la existencia de dos conformaciones, E1 y E2 (Palmgren y Harper 1999, Fig. 6). El ciclo catalítico comienza por la captación, desde el lado citoplasmático de la membrana, de un protón y ATP por la forma E1, por lo que tiene una alta afinidad, dando lugar a la forma E2. Tras la hidrólisis del ATP, el enzima fosforilado E2 muestra una baja afinidad por ATP y por el H^+ . Teniendo en cuenta que los sitios de hidrólisis de ATP y de transporte de H^+ están separados en el espacio, la comunicación entre estos dos sitios debe implicar un importante cambio conformacional que lleva aparejado, primeramente, la oclusión del H^+ dentro de la bomba y, posteriormente la liberación del mismo en la cara externa de la membrana plasmática. Una vez desfosforilado, el enzima recupera la conformación E1 de alta afinidad por el H^+ y ATP, desde el lado citoplasmático de la membrana, concluyendo el ciclo de reacción.

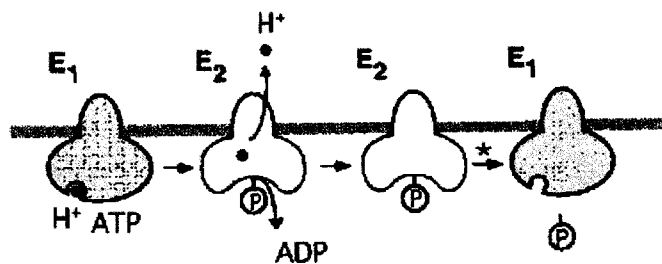


Figura 6. Modelo hipotético para el ciclo catalítico de las P-ATPasas. Tomado de Palmgren y Harper (1999).

La H^+ -ATPasa juega un papel central en la nutrición y crecimiento de las plantas (revisado por Serrano 1985, 1988a, 1989, 1990, Serrano y Villalba 1993, Palmgren 1998). La evidencia experimental de la participación del enzima en estos procesos, está basada en la extrapolación de los estudios bioquímicos llevados a cabo *in vitro*. El estudio con mutantes de levadura (Serrano 1988a,

Gaber 1992) ha demostrado que la H^+ -ATPasa de plasmalema es esencial para el crecimiento celular al regular la actividad bombeadora de protones y el transporte de nutrientes. Por tanto, una evidencia concluyente para determinar el papel fisiológico del enzima en plantas, debe provenir de la disponibilidad de plantas mutantes con alteraciones en la ATPasa (Serrano 1989, Serrano y Villalba 1993, Palmgren 1998).

La funcionalidad del enzima H^+ -ATPasa de la membrana plasmática ha sido estudiada a nivel de vesículas aisladas y con el enzima reconstituido en liposomas (Sze 1985, Palmgren 1998). Dichos estudios han demostrado que el enzima funciona como una bomba de protones capaz de generar la fuerza protón motriz que establece un potencial de membrana de -120 a -160 mV negativo en el interior y un gradiente de pH de 1.5 a 2 unidades (ácido en el exterior) a través de la membrana plasmática. La absorción de H^+ por las células vegetales es energéticamente muy favorable debido al potencial de membrana negativo en el interior y a la baja concentración de H^+ en el citoplasma, comparado con el apoplasto. Por ello, este enzima sirve como primera fuente de energía para el transporte secundario de nutrientes por medio de una batería de transportadores y canales específicos. (Palmgren 1991, Sze y col. 1999, Palmgren y Harper 1999) (Fig. 4).

La ATPasa de plasmalema también parece estar implicada en la carga de nutrientes inorgánicos en el xilema de la raíz, en la carga de nutrientes orgánicos en el floema, y en los cambios de turgor responsables de la apertura y cierre de los estomas (Serrano 1985, 1990). Estos hechos están apoyados por los estudios de inmunolocalización del enzima con anticuerpos específicos y por estudios de fusión del promotor con genes informadores. Dichos estudios han demostrado la presencia del enzima en tejidos especialmente implicados en el transporte, del tipo de células guarda de los estomas, floema, parénquima xilemático, endodermis, periciclo y epidermis de la raíz (Parets-Soler y col. 1990, Samuels y col. 1992, Bouché-Pillon y col. 1994, Frias y col. 1996, DeWitt y col. 1996). Asimismo, dichos estudios han mostrado que diferentes isoformas exhibían un modelo distinto de expresión específico de tejido (Harper y col. 1994, DeWitt y Sussman 1995, Michelet y Boutry 1995, Frias y col. 1996, DeWitt y col. 1996).

Es conocido que los iones entran en la raíz por los transportadores (canales o simportadores) localizados en la membrana plasmática de las células epidérmicas (**Fig. 4**). Así, la absorción de K^+ depende directamente del gradiente electroquímico de protones generado por la H^+ -ATPasa (**Serrano 1989, Palmgren 1998**). Este catión entra a través de células de la raíz por sistemas de transporte de alta afinidad que permite la asimilación del K^+ a bajas concentraciones extracelulares (**Schachtman y Schroeder, 1994**), y por sistemas de baja afinidad implicados en la absorción de K^+ a altas concentraciones externas que funcionan como canales (**Anderson y col. 1992, Sentenac y col, 1992, Cao y col, 1995**), los cuales se abren por medio de la hiperpolarización del plasmalema producida por la H^+ -ATPasa (**Michelet y Boutry 1995**). El transporte de aniones por las raíces se lleva a cabo por sistemas simportadores acoplados a H^+ y canales (**Chrispeels y col. 1999**). El transporte de agua necesario por el establecimiento del turgor se lleva a cabo por medio de canales llamados aquaporinas, localizados tanto en el plasmalema como en el tonoplasto (**Chrispeels y col. 1999**). La absorción de agua es dependiente de las concentraciones cambiantes de solutos en el citosol, principalmente K^+ , los cuales se transportan merced al gradiente electroquímico de protones generado por la H^+ -ATPasa.

Se ha implicado también a la ATPasa en la elongación celular inducida por auxina, de acuerdo con la teoría del crecimiento ácido (**Rayle y Cleland 1992**). Según esta teoría, la acidificación de la pared celular, causada por la acción de la H^+ -ATPasa, sería la responsable de la relajación de la misma, permitiendo así la elongación celular forzada por la presión de turgor. Se ha demostrado que la estimulación de la actividad H^+ -ATPasa por auxina requiere la inducción de la síntesis *de novo* del enzima, vía transcripción del gen que la codifica (**Hager y col. 1991, Frias y col. 1996**), a diferencia de la acción de la fusicocina, que parece actuar metabólicamente (**Rasi-Caldogno y col. 1993**). Sin embargo, existen numerosos trabajos que cuestionan el papel de las auxinas en la regulación de la H^+ -ATPasa (**Ewing y Bennett 1994, Harms y col. 1994, Jahn y col. 1996**), y las evidencias recientes indican que las auxinas influirían en dicha regulación a través de la modulación de la apertura y cierre de los canales rectificadores de K^+ hacia el

interior (Blatt y Thiel 1994) y canales de aniones hacia el exterior (Zimmermann y col. 1994).

Otra función propuesta para este enzima, es el control del pH intracelular, constituyendo lo que se ha denominado el *pH-stat* biofísico, en conexión con la síntesis de ácido málico, *pH-stat* bioquímico, que suministra H^+ al citosol, que junto a los procedentes de la vacuola y del medio externo, constituyen la fuente de H^+ en el citoplasma (apartado II.B.3, Raven y Smith 1979, Gout y col. 1992).

Teniendo en cuenta, los papeles fisiológicos claves atribuidos a la H^+ -ATPasa de plasmalema, no resulta extraño que la actividad de este enzima esté regulado por factores ambientales que controlan o alteran la fisiología de las plantas tales como la luz, turgor celular, todas las fitohormonas, fitotoxinas producidas por patógenos y diferentes estreses como daños mecánicos, déficit hídrico, temperatura y metales pesados (Serrano 1989 y 1990, Palta 1990, Meharg 1993, Michelet y Boutry 1995, Palmgren 1998).

Mención especial merece el efecto de la salinidad sobre esta ATPasa. A pesar de los progresos en el análisis de una relación estructura-función del enzima, no se ha establecido aún una relación clara entre el estrés por NaCl y la expresión y/o regulación de esta bomba de H^+ . Así, se han obtenido resultados dispares dependiente del tejido, estadio vegetativo, intensidad y duración del tratamiento, métodos de obtención y determinación enzimática (Rausch y col. 1996). En glicófitas como el tomate, la actividad ATPasa de plasmalema de raíces se inhibió parcialmente (Gronwald y col. 1990, Sanchez-Aguayo y col. 1991), no se inhibió (Suhayda y col. 1990) o incluso se estimuló junto a la actividad transportadora de H^+ (Wilson y Shannon 1995). Asimismo, dicha actividad se inhibió en pepino (Matsumoto y Chung 1988), girasol (Ballesteros y col. 1998), especies de plantago (Bruggeman y Jaeniesh 1989), mientras que se incrementó en *Vigna radiata* (Nakamura y col. 1992) y en halófitas como *Atriplex nummularia* (Braun y col. 1986) y *Salicornia bigelovii* (Ayala y col. 1996). Sin embargo, el estrés salino no afectó la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema de algodón (Hassidim y col. 1986) y células de zanahoria (Colombo y Cerana 1993), ni tampoco el contenido o la expresión del mismo en plantas etioladas de girasol

(Roldán y col. 1991). En células de tabaco y en raíces de *Atriplex nummularia*, la actividad extractora de H^+ *in vivo* asociada al enzima se vió incrementada tras el tratamiento con NaCl (Braun y col. 1986, Watad y col. 1991), respuesta que pudo ser mediada, al menos en parte, por una mayor expresión del gen que la codifica, de manera que el incremento del ARNm de H^+ -ATPasa sólo fue detectable durante el periodo de adaptación al NaCl (Niu y col. 1993b, Perez-Prat y col. 1994).

En general, el efecto de NaCl sobre la expresión del gen y la actividad H^+ -ATPasa se ha correlacionado positivamente con la tolerancia a este factor. Las plantas halófitas exhiben mayores niveles de transcripción y /o actividad H^+ -ATPasa que las glicófitas (Niu y col. 1995, Rausch y col. 1996), aunque también en tomate (*Lycopersicon esculentum*. Mill. cv. Large Cherry red), se ha descrito un aumento de ARNm de H^+ -ATPasa en raíces y hojas tras ser expuestas al NaCl (Binzel 1995). En este sentido, un espaldarazo al importante papel que puede jugar la H^+ -ATPasa de plantas en la tolerancia a la sal ha venido de la producción de un mutante *knock-out* para la isoforma AHA4 de *Arabidopsis thaliana*, obtenido por inserción de ADN-T (Krysan y col. 1996). Dicho mutante, homocigótico para *aha4-1*, mostró un fenotipo altamente sensible al NaCl, lo que sugiere que AHA4, que se expresa en ápices radiculares y endodermis, se requiere para la respuesta de las plantas al estrés salino (Palmgren y Harper 1999).

Aunque no está del todo dilucidado, y menos aún en el caso de la salinidad, la modulación de la actividad H^+ -ATPasa de plasmalema por toda esta gama de señales ambientales parece ser indirecta, implicando mecanismos de transducción de señales (Serrano 1989). En la célula vegetal, la hidrólisis mediada por receptores específicos de inositol fosfolípidos y los cambios en la concentración del Ca^{2+} citosólico constituyen rutas de transducción de señales extracelulares a través de membrana plasmática (Poovaiah y Reddy 1993, Drøbak 1993, Axelsen y Palmgren 1998). Así, el estrés salino parece ejercer cambios rápidos en el metabolismo de los fosfoinosítidos en *Dunaliella* (Einspahr y col. 1988) y en células de zanahoria (Cho y col. 1993), e incrementa el contenido del Ca^{2+} citosólico en protoplastos de raíz de maíz y en plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Lynch y col. 1989, Knight y col. 1997). Estos resultados han llevado a proponer que la respuesta

primaria al estrés salino es la perturbación de la homeostasis del Ca^{2+} citosólico, el cual originaría todas las respuestas encontradas en las plantas bajo condiciones salinas y que afectaría la actividad de quinasas dependiente de Ca^{2+} y Ca^{2+} -Calmodulina, implicadas en la activación-inactivación de numerosos sistemas enzimáticos, incluyendo la H^+ -ATPasa de plasmalema (Rengel 1992, Shimazaki y col. 1992, Sussman 1994, Lino y col. 1998, Palmgren 1998, De Nisi y col. 1999). Teniendo en cuenta que diferentes mensajeros derivados del metabolismo de los fosfoinosítidos estimulan la actividad ATPasa de plasmalema de hipocotilos de girasol (Memon y col. 1989, Memon y Boss 1990), podría pensarse en la eventualidad de una regulación de la ATPasa por estrés salino, a través de los mecanismos indicados.

Las rutas moleculares por la cual estas señales ambientales pueden regular la actividad ATPasa de plasmalema son poco conocidas. Según Palmgren (1991) y Michelet y Boutry (1995) pueden implicar al menos dos mecanismos distintos: a) regulación pretraduccional, tal como la inducción de la expresión génica de la H^+ -ATPasa; b) modificación postraduccional de las moléculas preexistentes del enzima. No obstante, la rapidez de la mayoría de los efectos producidos por la ATPasa, ha sugerido que el mecanismo de acción más probable podría ser la modificación postraduccional del enzima (Serrano 1989). Sin embargo, es importante resaltar que este enzima está codificado por una familia multigénica cuyos miembros o isoformas parecen ser reguladas y/o expresadas diferencialmente (Sussman 1994, Michelet y Boutry 1995). En este sentido, existe una gran evidencia de que diferentes isoformas de tomate (Ewing y col. 1990, Ewing y Bennett 1994), *Arabidopsis thaliana* (Harper y col. 1990, 1994) y *Nicotiana plumbaginifolia* (Perez y col. 1992), se expresaron diferencial y específicamente en función del tipo de tejido, células, estado de desarrollo y condiciones ambientales. AHA3 se expresó preferentemente en células acompañantes del floema (DeWitt y col. 1991, DeWitt y Sussman, 1995), AHA2, principalmente en pelos radiculares (Sussman 1994), AHA9 y AHA10 se expresaron específicamente en anteras (Houlne y Boutry 1994) y semillas (Harper y col. 1994), respectivamente. Asimismo, las isoformas pueden diferir en sus características bioquímicas o reguladoras por diferentes efectores, generando un equipo de bombas de H^+ funcionalmente distintas. El

estudio funcional de tres isoformas diferentes (AHA1-3) de *Arabidopsis thaliana*, expresadas en RE de levadura mostró diferentes K_m 's para el ATP, pH óptimo, sensibilidad a inhibidores, activación por lisofosfatidilcolina y V_{max} (**Palmgren y Christensen 1994**). En esta misma línea, se ha especulado que el crecimiento inducido por auxina está mediado por una isoforma que responde específicamente a esta hormona (**Hager y col. 1991, Serrano 1993, Frias y col. 1996**).

Uno de los mecanismos funcionales de regulación postraduccional de la H^+ -ATPasa es la modificación que afecta directamente a las moléculas del enzima preexistentes a través del dominio autoinhibitorio localizado en la región C-terminal del enzima. Dicho mecanismo, se puso de manifiesto mediante la eliminación del dominio C-terminal (**Figs. 5 y 7**) por proteólisis controlada, resultando una forma activada del enzima, caracterizada por un incremento de la V_{max} y de la afinidad al ATP, y por una alcalinización del pH óptimo (**Palmgren y col. 1990a, Palmgren 1991, Palmgren y Christensen 1993, Lanfermeijer y col. 1996, Jahn y col. 1997, Palmgren 1998**).

Desde esta perspectiva, la interacción inhibidora entre el dominio inhibitorio y el sitio catalítico y/o el sitio de ligamiento a los protones puede regularse por varios mecanismos:

a) Desplazamiento del dominio por ligamiento de moléculas efectoras como lisofosfolípidos y fusicocina, las cuales mimetizan el efecto de eliminación por proteólisis controlada del dominio C-terminal autoinhibitorio (**Palmgren y Sommarin 1989**). Estudios bioquímicos y moleculares recientes han demostrado que la fusicocina se une a un complejo receptor de la membrana plasmática que incluye tanto el dominio autoinhibitorio C-terminal de la H^+ -ATPasa como la proteína 14-3-3 (**Johansson y col. 1993, Jahn y col. 1997, De Boer 1997, Baunsgaard y col 1998, Palmgren 1998, Sze y col. 1999, Oecking y Hagemann 1999, Chung y col. 1999**). Los lisofosfolípidos parecen activar la H^+ -ATPasa provocando el desplazamiento del dominio autoinhibitorio, o probablemente estimulando una proteína kinasa (**Martiny-Baron y Scherer 1989, Scherer y col. 1993**). Otros lípidos como los esteroides activarían la H^+ -ATPasa por mecanismos aún poco conocidos (**Cooke y Burden 1990, Cooke y col. 1994**).

b) El desplazamiento del dominio carboxilo terminal puede llevarse a cabo reversiblemente por mecanismos de fosforilación, por medio de una proteína kinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina, o por desfosforilación, mediante una proteína fosfatasa, que son capaces de cambiar la actividad de la bomba *in vivo* (Sussman 1994, Xing y col 1996, Palmgren 1998, De Nisi y col. 1999, Olsson y col. 1999, Fuglsang y col. 1999, Svennelid y col. 1999). Esta regulación por fosforilación/desfosforilación constituye uno de los mecanismos claves de modulación de la actividad ATPasa, por efecto de diferentes señales ambientales vía segundos mensajeros,

c) Eliminación del dominio C-terminal por proteólisis endógena (Palmgren y col. 1990a y 1991, Palmgren y Christensen 1993, Regenber y col 1995, Lanfermeijer y col. 1996, Jahn y col. 1997, Palmgren 1998) o por corte y unión alternativa de intrones/exones (*alternative mRNA splicing*) que generen enzimas sin el dominio C-terminal. Sin embargo, no se han encontrado evidencias que apoyen dichos mecanismos (Palmgren 1998).

De acuerdo con todos estos resultados, se ha propuesto un modelo de regulación postraducciona de la H^+ -ATPasa de plasmalema, a través del dominio C-terminal autoinhibitorio (Fig. 7, Palmgren 1998, Sze y col. 1999). Según este modelo, la H^+ -ATPasa existe en un estado de baja actividad y en un estado de alta actividad con una alta afinidad por ATP y H^+ . La fusicocina induciría una fuerte interacción entre la proteína 14-3-3 y el dominio C-terminal de la H^+ -ATPasa, modificación que, de alguna manera, estabilizaría el estado de alta actividad del enzima. Así mismo, la fosforilación de residuos serina y treonina en la H^+ -ATPasa podría facilitar o inhibir el ligamento de la proteína 14-3-3 al enzima. Algunos estreses ambientales, hormonas y luz, podrían conducir a la activación o inactivación de proteína quinasas y/o fosfatasas, alterando el estado de fosforilación, de lo que resultará, en función del modo de acción, la estabilización del estado de baja o alta actividad de la proteína.

De acuerdo con la hipótesis de un cambio conformacional del dominio C-terminal, podría explicarse el incremento de la razón de acoplamiento de H^+ /ATP (forma activada) en plasmalema de raíz de girasol (Ballesteros y col. 1998) y la activación de la H^+ -ATPasa de plasmalema de *Spartina patens* (Wu y Seliskar

1998), observadas bajo condiciones salinas. Este hecho ya se había observado en levadura por efecto de la glucosa (Venema y Palmgren 1995). Recientemente, se ha comprobado que mutaciones simples en el dominio C-terminal incrementaban dicha razón, sugiriéndose que el cambio de conformación inactiva a activa podría implicar un solo residuo (Baunsgaard y col. 1996, Morsomme y col. 1998, Axelsen y col 1999).

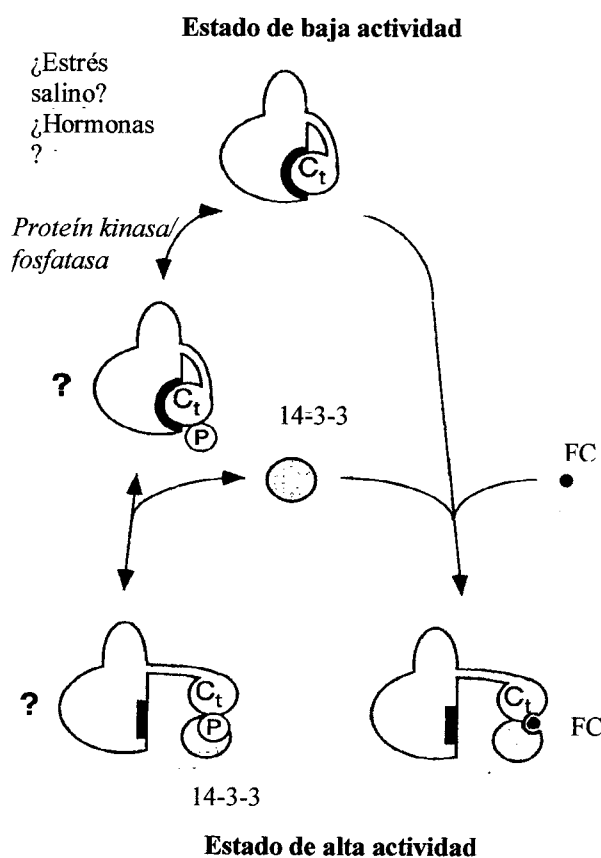


Figura 7. Modelo de regulación de la H^+ -ATPasa de plasmalema que implica al dominio C-terminal y su interacción con la proteína 14-3-3, que explica la acción de la fusicocina y la regulación por fosforilación/desfosforilación. FC, fusicocina; Ct, dominio C-terminal; P, fosforilación. Tomado de Palmgren 1998, modificado por Sze y col. (1999).

Transportadores secundarios implicados en el flujo de Na⁺ y Cl⁻

La existencia de altas concentraciones de NaCl en el medio extracelular determina el establecimiento de un gradiente electroquímico de Na⁺ entre el interior y el exterior celular que conlleva la entrada de este catión en la célula vegetal y altera los procesos de absorción de otros iones como el K⁺.

El K⁺ es un ion monovalente esencial en el crecimiento de las plantas (Maathuis y col. 1997). En la célula vegetal, las concentraciones citoplásmicas de K⁺ son relativamente altas mientras que las concentraciones de Na⁺ son relativamente bajas, lo que indica que existen mecanismos selectivos de absorción de K⁺ y de exclusión de Na⁺ del citoplasma. En suelos salinos, K⁺ y Na⁺ compiten por entrar en las células de la raíz lo que puede ocasionar un efecto negativo sobre el crecimiento de la planta (apartado II.B.1), donde las concentraciones de sodio a menudo exceden las de K⁺. De aquí, que la selectividad K⁺:Na⁺ sea un factor esencial en la tolerancia a la sal, determinada por los mecanismos que controlan la absorción de Na⁺, que como se verá mas abajo interactúan con las del K⁺, así como los que controlan la concentración citoplásmica de Na⁺. No cabe duda que el desarrollo de técnicas electrofisiológicas como el *patch-clamp* (pinzamiento de membrana) (Hedrich y Schroeder 1989), junto a las técnicas moleculares aplicadas a modelos microbianos (bacterias y levaduras) han ayudado al conocimiento de las proteínas que controlan el movimiento de K⁺ y Na⁺ a través de las membranas de la célula vegetal.

El hecho de no encontrarse canales selectivos de Na⁺ y la normal interacción entre el K⁺ y Na⁺ ha llevado a la idea que el Na⁺ entra normalmente a través de los sistemas de transporte de K⁺. Básicamente, las raíces utilizan para la absorción de K⁺ sistemas de baja afinidad que funcionan como canales y sistemas de alta afinidad (Km de 10-30 μM) que parecen funcionar como simportes K⁺-H⁺ (Schachtman y Schroeder 1994, Chrispeels y col. 1999). Se han identificado un gran número de canales de K⁺ en varios tipos de células vegetales (Schachtman y Liu 1999, Amtmann y Sanders 1999, Tabla 3, Fig. 8).

Tabla 3. Transportadores secundarios implicados en el transporte de Na^+ y K^+ en plantas. Tomado de *Schachtman y Liu (1999)*.

Transportadores	Modo	Localización	Caracterización	Selectividad K^+/Na^+
KAT/AKT Canales en dirección hacia el interior	Difusión pasiva	Plasmalema	Molecular y electrofisiología <i>in planta</i> y en sistemas heterólogos	Alta selectividad por el K^+
HKT1 Transporte de K^+ de alta afinidad	Energizado por el Na^+	Desconocido	Molecular y electrofisiología en sistemas heterólogos	Transporta Na^+ y K^+
KUP o HAK transporte de K^+ de alta afinidad	Desconocido	Desconocido	Molecular y radioisótopos en sistemas heterólogos	Algo permeable al Na^+
NSC Canales de cationes no selectivos	Difusión pasiva	Plasmalema	Electrofisiología <i>in planta</i>	Alta permeabilidad al Na^+
AtNXH1 Antiporte Na^+/H^+	Energizado por H^+	Vacuola y plasmalema	Molecular y radioisótopos <i>in planta</i> en sistemas heterólogos	Desconocido
LCT1 Transporte de cationes de baja afinidad	Desconocido	Desconocido	Molecular y radioisótopos en sistemas heterólogos	Transporta Na^+ y K^+

Los canales de K^+ en dirección hacia el interior (KAT1, AKT1, KST1), identificados en *Arabidopsis* y *Solanum*, son responsables de la absorción de K^+ por la raíz a concentraciones extracelulares de K^+ relativamente altas (baja afinidad), participando también en la absorción de K^+ cuando la concentración extracelular es baja o cuando los transportadores de alta afinidad son bloqueados (Hirsch y col. 1998, Schachtman y Liu 1999). La isoforma KAT1 en *Arabidopsis thaliana* se expresa predominantemente en tejido foliar, células guarda y tejido vascular de raíces y tallos (Lagarde y col 1996). Estos canales son altamente selectivos para el K^+ por lo que no parecen participar en la absorción de

Na⁺ en presencia de una concentración externa fisiológica de K⁺ (Maathuis y col. 1997).

Los canales de K⁺ en dirección hacia el exterior, menos específicos, podrían ser una posible vía de absorción de Na⁺ durante la despolarización inducida por NaCl (Murata y col 1994). Una regulación efectiva de la apertura de estos canales permitiría controlar la entrada de Na⁺ y la pérdida de K⁺ (Amtmann y col. 1997) y podría constituir un mecanismo de adaptación a este tipo de estrés (Yeo y 1998). Trabajos llevados a cabo en células de tabaco parecen corroborar esta idea, ya que el eflujo de K⁺ fue menor en células adaptadas a NaCl que en la línea de células no adaptadas (Murata y col. 1994).

También se han descrito canales de cationes no selectivos (NSC), muy permeables a un rango de cationes monovalentes, que podrían jugar un importante papel en la absorción de Na⁺ (Amtmann y Sanders 1999). Estos canales se inhiben por bajas concentraciones de Ca²⁺ externo (Laüchli y col. 1994). Sería deseable que en condiciones salinas estos canales presentaran una actividad reducida, contribuyendo a un incremento de la tolerancia. Sin embargo, se desconoce su mecanismo de regulación y la identidad molecular de los mismos. Recientemente, se ha identificado un gen que codifica a un transportador de cationes de baja afinidad (LCT1), que complementaba a un mutante de levadura incapaz de absorber K⁺, el cual fue responsable de la absorción de Na⁺, Rb⁺ a baja afinidad y que se bloqueaba por concentraciones milimolares de Ca²⁺ (Schachtman y col. 1997). Se desconoce todavía su localización y si es un canal o un transportador. Estos detalles son importantes para la determinación del papel fisiológico de estos nuevos transportadores en plantas (Amtmann y Sanders 1999, Shachtman y Liu 1999).

Uno de los sistemas de absorción de K⁺ de alta afinidad es el llevado cabo por HKT1, originalmente identificado en trigo como un simporte K⁺/H⁺ y que parece catalizar tanto el simporte K⁺-Na⁺ cuando el Na⁺ esta a concentración μ M, como el simporte Na⁺-Na⁺, cuando el Na⁺ esta a concentración mM (Schachtman y Schroeder 1994, Rubio y col 1995, Schachtman y Liu. 1999). Se han encontrado homólogos de HKT1 en cebada (Wang y col 1998), arroz (Golldak y col 1997) y *Arabidopsis* (Schachtman y Schroeder 1994). HKT1 participa tanto

en la absorción de K^+ a alta afinidad, como la de Na^+ a baja afinidad cuando los sitios de K^+ están bloqueados (Gassmann y col. 1996). No obstante, el papel fisiológico de HKT1 en la tolerancia al NaCl no está claro. El hecho de que se exprese en las células corticales, y que el Na^+ no se requiera para el crecimiento, es indicativo de que este sistema no sea el mecanismo de absorción primario para el K^+ , ni por tanto, constituya una ruta de entrada mayoritaria de Na^+ en la célula. Sin embargo, cuando se expresa en oocitos de *Xenopus*, HKT1 participa en la absorción de Na^+ tanto a alta y como a baja afinidad (Rubio y col. 1995, Gassmann y col. 1996). Ello, y que diferentes mutaciones en el gen expresado en levadura incrementa la selectividad $K^+:Na^+$, sugiere su implicación en la homeostasia iónica de las células donde se expresan (Rubio y col. 1995, Rubio y col. 1999).

Otros transportadores de alta afinidad que podrían jugar un papel importante en la adquisición de K^+ y en la selectividad $K^+:Na^+$ es la familia KUP/HAK, descrita en *Arabidopsis* y cebada, y que codifica a proteínas similares a las identificadas en bacterias y hongos, demostrándose que el Na^+ reduce el transporte de K^+ en al menos dos miembros de esta familia, lo que representaría también una ruta importante de absorción de Na^+ en las células vegetales (Santa-Maria y col. 1997, Fu y Luan 1998).

Otro factor importante de tolerancia a la sal que contribuye a la determinación de la razón K^+/Na^+ en los tejidos de plantas superiores es el mecanismo de regulación de las concentraciones citoplasmáticas de Na^+ . Así, las proteínas que tienen una función en el intercambio Na^+/H^+ (o antiporte) contribuyen a la regulación de la concentración citoplasmática por el eflujo de Na^+ desde el citoplasma hacia la vacuola o hacia fuera de la célula a través de la membrana plasmática (Dupont 1992, Barkla y col. 1995, Schachtman y Liu 1999).

En cuanto a la compartimentación de Na^+ en la vacuola, éste es particularmente un importante mecanismo de mantenimiento de una alta razón $K^+:Na^+$ en las células de plantas superiores, que será tratado con detalle en el apartado II.B.2.2.

Respecto al mecanismo del eflujo de Na^+ a través del plasmalema de plantas superiores, se ha propuesto, sobre la base de estudios fisiológicos y bioquímicos, la existencia de un sistema antiporte Na^+/H^+ en raíces de tomate (Mennen y col. 1990) o en vesículas de membranas aisladas de algodón (Hassidim y col. 1990), tomate (Wilson y Shannon 1995) y trigo (Allen y col. 1995), no encontrándose todavía ninguna evidencia de tipo molecular. Sin embargo, en la membrana plasmática de levadura se han descrito dos tipos de mecanismos de eflujo de Na^+ : un sistema antiporte NHA1/SOD2 (Prior y col. 1996) y una Na^+ -ATPasa (ENA1), que es una P-ATPasa de plasmalema que hidroliza ATP para bombear el Na^+ fuera de la célula (Haro y col. 1993, Fig. 8).

En lo que respecta a la absorción de Cl^- , la diferencia de potencial que se establece a través de la membrana plasmática cuando se alcanza y mantiene la homeostasia iónica, constituye una barrera termodinámica para el influjo de este anión, incluso a concentraciones relativamente altas, si bien, una absorción activa puede ser mediada por un simportador Cl^-/H^+ (Niu y col. 1995). Por el contrario, la despolarización de la membrana derivada de la absorción de Na^+ detiene la absorción pasiva de Cl^- a través de los canales aniónicos (Skerret y Tyerman 1994). El Cl^- , una vez absorbido a través del plasmalema, sería transportado desde el citoplasma a la vacuola a través de canales selectivos de aniones (apartado II.B.2.2) (Plant y col. 1994).

B.2.2. Papel de la compartimentación vacuolar: V- H^+ -ATPasa, V- H^+ -PPasa y transportadores secundarios implicados en el flujo de Na^+ y Cl^-

Tanto en plantas halófitas como en glicófitas tolerantes, existe una clara correlación entre compartimentación vacuolar y tolerancia a la salinidad (Flowers y col. 1977, Greenway y Munns 1980). Ello reporta dos ventajas fisiológicas: la recuperación del turgor por el ajuste osmótico con sales, y la evitación de la toxicidad iónica en el citoplasma. El mecanismo de inclusión de Na^+ y Cl^- en la vacuola, el cual se asocia a un transporte de K^+ en dirección al citoplasma, constituye

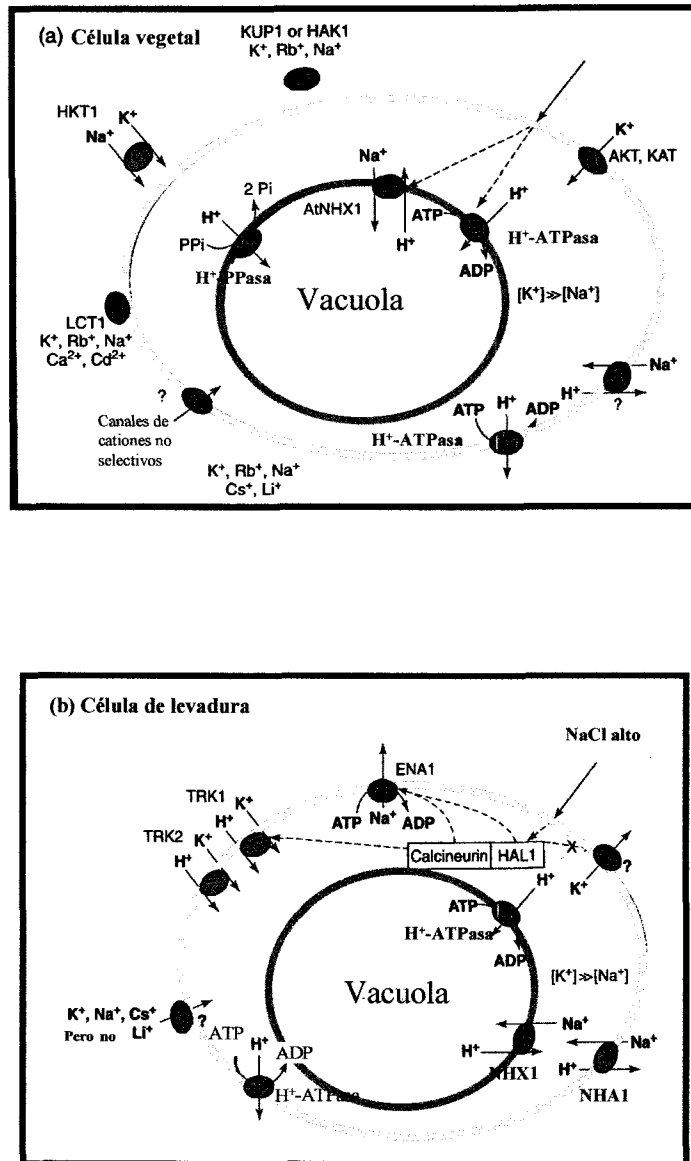


Figura 8. Modelo que muestra los procesos de transporte implicados en el mantenimiento de la homeostasia $K^+ : Na^+$ en el citoplasma de plantas (a) y levaduras (b). La falta de flechas de algunos sistemas indica que el modo de transporte es desconocido. En plantas, *AtNHX1* es un antiporte Na^+ / H^+ . En levadura, las proteínas *TRK* son transportadores de K^+ ; *NHX1* y *NHA1* son antiportes Na^+ / H^+ , mientras que *ENA1* es una Na^+ -ATPasa. Mecanismos que no se han descrito a nivel molecular se indican con una ?. Factores reguladores como la calcineurina y *HAL1* juegan un papel importante en la modulación del influjo de K^+ y Na^+ . Tomado de **Schachtman y Liu (1999)**.

uno de los mecanismos más importantes de control de la selectividad K^+/Na^+ en el citoplasma (Jeschke 1984, Figs. 2 y 3).

La inclusión de Na^+ en la vacuola se lleva a cabo por la acción de un antiporte Na^+/H^+ acoplado a un gradiente electroquímico de H^+ (Blumwald y Poole 1985, Blumwald 1987, Garbarino y Dupont 1989), mientras que la acumulación de iones Cl^- tiene lugar a través de canales iónicos, por efecto del potencial de membrana positivo en el interior (Hedrich y Schroeder 1989). El gradiente electroquímico de H^+ es generado por la acción de las ATPasas y PPasas del tonoplasto (Barkla y col. 1995, Gaxiola y col. 1999). Todos estos sistemas serán revisados en relación a su posible papel en los mecanismos de tolerancia a la salinidad.

V-H⁺-ATPasa

Numerosos estudios llevados a cabo en vesículas de tonoplasto aisladas de tejidos y células intactas de plantas han demostrado la existencia de dos bombas de H^+ que actúan en paralelo, H^+ -ATPasa (V-ATPasa) y H^+ -pirofosfatasa (V-PPasa), las cuales son capaces de generar un gradiente electroquímico de H^+ que energiza el transporte acoplado de iones y solutos a través de la membrana vacuolar (Figs. 4 y 8, Sze 1985, Hedrich y Schroeder 1989, Sze y col. 1992, Chanson 1993, Rea y Poole 1993, Barkla y Pantoja 1996, Zhen y col 1997, Sze y col. 1999), desconociéndose hasta el momento, como se complementan entre sí. En este apartado revisaremos específicamente la H^+ -ATPasa de tonoplasto (EC.3.6.1.3.).

La H^+ -ATPasa de tonoplasto pertenece a la familia de las V-ATPasas, en la que se integran todas las bombas de protones de características bioquímicas y moleculares comunes, independientemente de la localización, y que se distribuyen ampliamente en orgánulos y sistemas endomembranarios de eucariotas, incluyendo vacuolas, lisosomas, endosomas, gránulos de cromafina, aparato de Golgi y vesículas revestidas de clatrina (Barkla y Pantoja 1996, Sze y col. 1999). En plantas superiores, además de en vacuolas, el enzima está presente en Golgi, RE y vesículas revestidas de clatrina (Nelson 1992).

El papel fisiológico de la H⁺-ATPasa de tonoplasto es conducir los iones y metabolitos al compartimento vacuolar, en virtud del gradiente electroquímico de H⁺ creado por el enzima. De hecho, los iones y metabolitos no son simplemente depositados en la vacuola, sino que están sometidos a un intercambio continuo con los componentes citoplasmáticos, lo que contribuye al mantenimiento del equilibrio citosólico. Esta función homeostática se pone de manifiesto en la regulación del pH citoplásmico, ajuste osmótico, acumulación y movilización de ácidos orgánicos y control de las concentraciones de iones inorgánicos, como el calcio y fósforo, en el citoplasma (**Boller y Wiemken 1986, Blumwald 1987, Taiz 1992, Barkla y Pantoja 1996, Sze y col. 1999**). No obstante, su ubicua distribución en eucariotas indica que su esencialidad no está limitada solo a la energización del transporte de iones y flujos de metabolitos, sino que juega un papel importante en el tráfico y fusión de membrana, secreción y distribución intracelular de proteínas, aspectos todos ellos, enmarcados en procesos dinámicos como la biogénesis de vacuolas, formación de la placa celular durante la división celular y la secreción de materiales hacia la membrana plasmática de las células vegetales (**Sze y col. 1999, Marty 1999**).

Las V-ATPasas se han caracterizado a nivel bioquímico en vesículas enriquecidas en tonoplasto de diferentes tejidos vegetales (**Sze 1985, Marré y Ballarin-Denti 1985, Blumwald 1987**) y se han solubilizado y reconstituido funcionalmente en liposomas (**Kasamo y col. 1991, Ward y Sze 1992, Bañuls y col. 1994**). En la **Tabla 2**, se muestran sus características bioquímicas más relevantes, en comparación con otras bombas transportadoras de H⁺.

A diferencia de las P-ATPasas, las V-ATPasas de tonoplasto son insensibles al vanadato y no forman intermediario fosforilado. El enzima se inhibe por nitrato y bafilomicina A₁ y es insensible a azida y oligomicina, estos últimos, inhibidores específicos de las F-ATPasas (**Sze 1985, Blumwald 1987, Ward y Sze 1992, White 1994**). Asimismo, este tipo de ATPasas es insensible a los cationes, y se estimulan por aniones en la secuencia Cl⁻, Br⁻ > I⁻ > HCO₃⁻ > SO₄²⁻, en base a su capacidad de disipar el potencial de membrana, vía canales de aniones (**Sze 1985**). En el caso del Cl⁻, su estimulación como anión permeante se superpone a su

acción directa sobre el enzima, la cual parece estar acoplado a una activación del bombeo de H^+ (Ward y Sze 1992). Puesto que el Cl^- citoplasmático en células vegetales es de 30-90 mM, la estimulación directa del Cl^- sobre la V-ATPasa puede ser importante en la regulación del gradiente de pH y potencial de membrana a través de la vacuola (Sze y col. 1992).

El enzima es también sensible a agentes bloqueantes de fosfohidrolasas que transportan H^+ como DCCD, eritrosina B y DES (Blumwald 1987). El DCCD parece unirse específicamente a la subunidad de 16 kDa que forma el canal de transporte de H^+ (Sze y col. 1992). El DIDS inhibe también la ATPasa de tonoplasto por su interacción con los lugares específicos de unión a aniones (Sze 1985).

El ATP es el sustrato preferido para las reacciones de hidrólisis y, en menor proporción, el GTP, CTP, UTP, ADP, GDP, AMP, GMP, CMP y p-NPP, en orden decreciente. El enzima requiere Mg^{2+} para su actividad, aunque puede ser reemplazado por el Mn^{2+} . La afinidad (K_m) para el sustrato, el Mg-ATP, es menor que la de la ATPasa de plasmalema, teniendo un valor aproximado de 0.1-0.2 mM, con una estequiometría variable de 2 a 3 H^+ transportados por cada ATP hidrolizado y siendo su pH óptimo comprendido entre 7 y 8.5 (Sze 1985, Davies y col. 1994).

Como puede observarse en la Figura 9, la V-ATPasa posee una típica estructura de cabeza y pedúnculo, como se ha comprobado por microscopía electrónica y tinción negativa con el enzima vacuolar de remolacha (Getz y Klein 1995). Dicha estructura es en general muy conservada en la mayoría de eucariotas conformando un complejo multimérico de proteínas compuesto de un sector integral (V_o), embebido en la membrana, de 250 a 300 kD, responsable de la translocación de H^+ , y un sector periférico (V_1), expuesto hacia la cara citoplasmática, de 500-600 kD, responsable de la hidrólisis de ATP (Sze y col. 1992, Sze y col 1999, Figura. 9). Si bien, se han clonado la mayoría de las subunidades del enzima de plantas (Tabla 5), la mayor parte de la información obtenida sobre la estructura-función de dichas subunidades ha provenido del estudio llevado a cabo en levaduras como sistema modelo. Según el esquema de la Fig 9 y Tabla 4, (Sze y col 1999), el complejo V_1 , estaría compuesto de 5-8

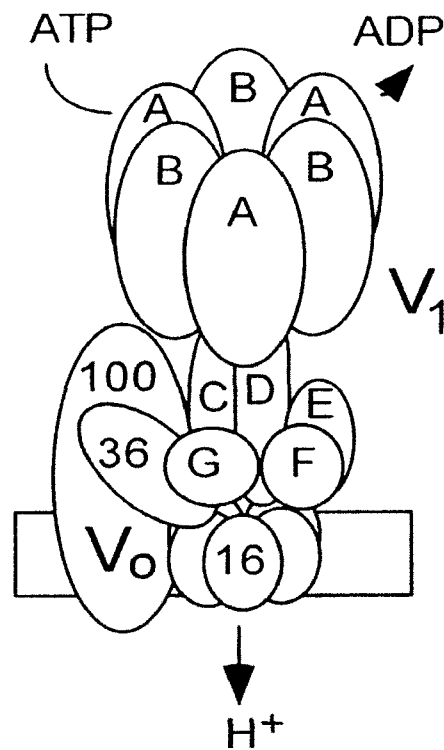


Figura 9. Estructura típica de una V-ATPasa (multímero de 650 kD) del sistema endomembrana de plantas. El complejo periférico, V₁, incluye las subunidades catalíticas (70 kD) y reguladora (60 kD), y varias subunidades accesorias de funciones poco conocidas. El complejo integral embebido en la membrana, V₀, lo forman 6 copias del proteolípido de 16 kD, capaces de unirse al DCCD, junto con otras subunidades integrales formando el canal para el transporte de H⁺. Tomado de Sze y col. (1992) y (1999).

subunidades diferentes incluyendo la A (rango de 67-72 kD), B (rango 55 a 60 kD), C (40-50 kD), D (32-34 kD), E (27-31 kD), F (13-14 kD) y G (12-13 kD), con una estequiometria de A₃B₃CDEFG.

Tabla 4. Estructura y función de las subunidades de las V-ATPasas de plantas y levaduras *k.d.* = *Kalanchoe diargremontiana*. Tomado de *Sze y col. (1999)*.

Subunidad	Función	Subunidad (kD)				Loci correspondiente en levadura
		Avena	k.d.	remolacha	levadura	
Sector V ₁						
A	Ligamiento ATP catalítico	70	72	67	69	VMA1
B	Ligamiento ATP no catalítico	60	56	55	60	VMA2
H	Estabilización V ₁			52	54	VMA13
	Desconocido	44	48	44		
C	Estabilidad V ₁ , actividad	42	42	42	42	VMA5
D	Pedúnculo central, acoplamiento	32			32	VMA8
E	Ensamblaje V ₁ , actividad	29	28	29	27	VMA4
F	Contacto puente V ₁ -V _o	13			14	VMA7
G	Acoplamiento V ₁ y V _o	12			13	VMA10
Sector V _o						
a	Ensamblaje, distribución	100	97	100	100	VPH1/STV1
b	Ensamblaje V _o , estabilidad	36		32	36	VMA6
c	Translocación de protones	16	16	16	17	VMA3
c'	Translocación de protones				17	VMA11
c''	Translocación de protones	24		19	23	VMA16

La subunidad A es la subunidad catalítica, deducida por su sitio de unión a nucleótidos y por su secuencia de aminoácidos, y está estrechamente relacionada a otras proteínas que unen nucleótidos (Stevens y Forgac, 1997). La subunidad B tiene también un sitio de unión a nucleótidos, aunque no es catalítico y parece tener una función de regulación. Otras subunidades del complejo V₁, que a menudo se describen como accesorias, son esenciales, como han demostrado diferentes aproximaciones bioquímicas, incluidas el ensamblaje a mutantes de levadura *vma*, y parecen jugar diferentes papeles, desde servir de puente entre los complejos V₁-V_o, la estabilización del subcomplejo V₁, y probablemente,

promover el acoplamiento de la hidrólisis de ATP al transporte de H^+ (Tabla 4). El análisis de la secuencia de las subunidades A y B de diferentes plantas y hongos, ha evidenciado una relación evolutiva con las F-ATPasas, sugiriéndose que ambas evolucionaron de un tipo ancestral común (Gogarten y Taiz 1992, Gogarten y col. 1992). Asimismo, la similar apariencia física con las F-ATPasas es consistente con la similitud en sus propiedades enzimáticas, si bien a diferencia de la F-ATPasa, la V-ATPasa es insensible a azida y oligomicina, y de forma similar, sensible a aniones (inhibida por nitrato y estimulada por Cl^-). Se ha sugerido que la identificación de la ATPasa de tonoplasto en fracciones de membrana no purificadas, en base a su inhibición por nitrato, debe llevarse a cabo en presencia de azida y oligomicina (O'Neill y col. 1983, Poole y col. 1984).

El complejo V_o de plantas es menos conocido. Está formado de 3 a 5 subunidades, siendo la más común a todas las formas conocidas de V_o , la subunidad c, que corresponde al polipéptido hidrofóbico de 16-17 kD, el cual se encuentra con 6 copias por holoenzima, constituyendo el canal de transporte de H^+ , inhibible por DCCD. Otras subunidades son el polipéptido hidrofílico 36-40 kD (d) y 100 kD (a), con una estequiometría de a_6d . En levadura, el complejo V_o tiene tres proteínas adicionales de 17 kD (subunidad c') y 23 kD (subunidad c'') con cuatro y cinco regiones transmembranarias, respectivamente (Hirata y col. 1997). Estas nuevas subunidades identificadas juegan un papel de translocación de H^+ , no habiéndose identificado aún ninguna homología con dichas subunidades en plantas (Sze y col. 1999).

Existen controversias acerca del papel de la subunidad 100 kD, ya que, aunque esta subunidad es parte de la mayoría de las V-ATPasas, no se ha detectado en las V-ATPasas purificadas de varias plantas (Ward y Sze 1992). La mutagénesis *Vph1p* (homólogo de la subunidad de 100 kD en levadura) ha sugerido un papel en el ensamblaje de la V-ATPasa y en la translocación de protones (Leng y col. 1998). Por otra parte, se ha indicado que la bafilomicina se unía a la subunidad de 100 kDa (Zhang y col. 1994). Sin embargo, la bomba purificada de avena, que es carente de la subunidad de 100 kDa, es activa y sensible a bafilomicina A_1 , sugiriendo que el inhibidor se une a la subunidad de 16 kD, más que a la de 100 kD (Li y Sze 1999). Estos autores, han indicado que el

papel primario de esta subunidad en avena es su participación en el ensamblaje del complejo V_0 y su destino celular más que en la actividad de la bomba (**Fig. 10**).

El modelo de síntesis y ensamblaje de la V-ATPasa esta basado en resultados mayoritariamente obtenidos en levadura y parcialmente en plantas (**Fig. 10, Sze y col. 1999, Li y Sze 1999**). Los sectores V_0 y V_1 se sintetizan independientemente. Mientras el ensamblaje del complejo V_1 se lleva a cabo en el citosol, las proteínas de membrana como la subunidad de 16 y 100 kDa, parecen insertarse dentro la membrana de RE, requiriéndose todas las subunidades de V_0 para la estabilidad del mismo. Tanto la síntesis, translocación y plegado, como la asociación del complejo V_0 y probablemente de la V-ATPasa completa, dependen de algunas proteínas de RE y chaperonas como la calnexina (CNX) y BiP que facilitan la asociación del complejo periférico a las subunidades del sector V_0 . Una vez ensamblada, la maquinaria de ensamblaje y la subunidad de 100 kD se disocian y la V-ATPasa pasa del RE hasta su destino final en el aparato de Golgi y en la vacuola.

La información que se tiene sobre la regulación de las V-ATPasas es aún escasa y fragmentada. La V-ATPasa es un complejo formado por al menos 10 subunidades localizadas en compartimentos celulares funcionalmente distintos. Además, se conoce que algunas de las subunidades del enzima son codificadas por multiples genes (**Tablas 4 y 5**), las cuales pueden o no ser expresadas coordinada y específicamente, en función del desarrollo y/o factores ambientales. Ello hace que su regulación a nivel transcripcional, traduccional y metabólico deba ser extraordinariamente compleja. Este enzima opera normalmente lejos de su equilibrio termodinámico, básicamente debido a su desacoplamiento intrínseco (hidrólisis de ATP sin la translocación del complemento potencial total de H^+), el cual puede ser susceptible de regulación cinética y/o génica por factores endógenos y ambientales (**Davies y col. 1994**).

La regulación cinética o postraduccional de la actividad de la bomba ha implicado a diferentes mecanismos, todavía poco conocidos desde el punto de vista molecular. Entre éstos cabe destacar: a) determinados inhibidores (**Zhang y col. 1992**); b) la disociación y ensamblaje reversible del sector V_1 *in vivo* (**Ward y col. 1992, Kane 1995**); c) una razón H^+/ATP variable, la cual parece depender

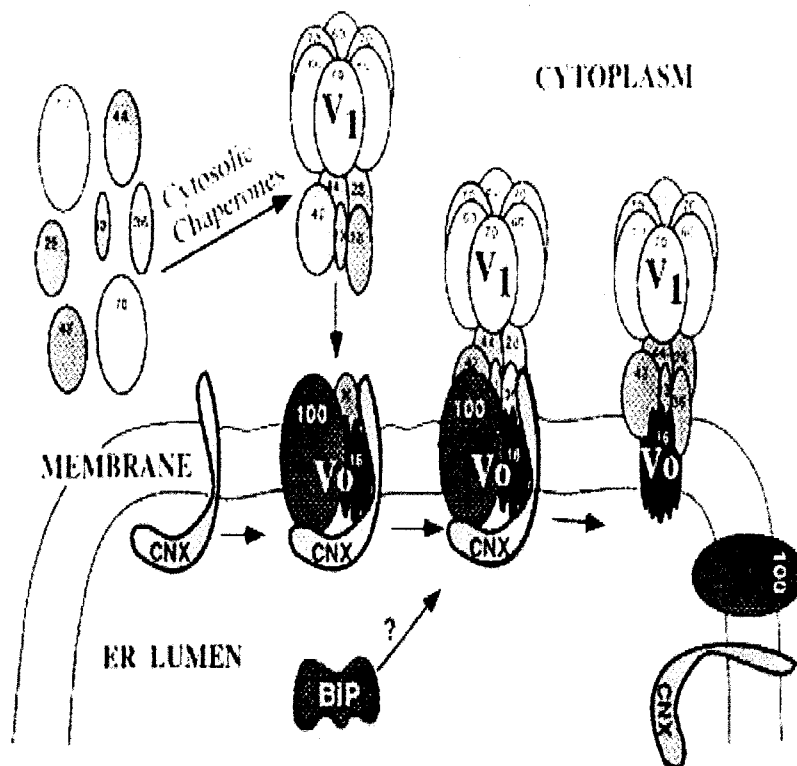


Figura 10. Modelo hipotético de la síntesis y ensamblaje de la V-ATPasa en el RE. La Calcinexina (CNX), BiP y otras chaperonas moleculares del RE, facilitan el plegamiento y ensamblaje del subcomplejo Vo en el RE. Después, la maquinaria de ensamblaje se disocia, y también la subunidad de 100 kD, antes de ser enviada a su destino. Tomado de Li y Sze (1999).

estrictamente del pH citosólico y vacuolar, de manera que a mayor gradiente de pH entre el citosol y la vacuola, menor sería dicha razón, sugiriéndose que esta variabilidad en la razón de acoplamiento podría deberse a la presencia de diferentes isoformas enzimáticas con diferentes razones de acoplamiento, aunque no es descartable que dicha variabilidad provenga de una simple isoforma (Davies y col. 1994, Muller y col. 1999); d) la actividad de la V-ATPasa podría regularse por la oxidación (inactivación) y reducción (activación) reversible de puentes disulfuro de residuos críticos de cisteína por proteínas reguladoras (Stevens y Forgac 1997), el cual explicaría el mecanismo de inhibición por nitrato (Dschida y Bowman 1995). Según este mecanismo, el nitrato, en presencia de ATP, actuaría como agente oxidante, más que como agente caotrópico, promoviendo la formación de puentes disulfuros en residuos de cisteína, los cuales pueden dar lugar a la disociación del complejo V_1 del sector integral V_o .

La actividad de la V-ATPasa se regula por diversos factores endógenos y ambientales. La presencia de familias multigénicas para algunas subunidades (Tabla 5), parece sugerir que algunos genes son constitutivos y otros pueden estar bajo control de mecanismos específicos de células, tejidos y orgánulos. Este es el caso de los 4 isogenes para la subunidad c de *Arabidopsis* (Perera y col. 1995) y 2 para la de algodón (Hasenfratz y col. 1995). Así mismo, la expresión de los sectores V_o y V_1 parece estar regulada coordinadamente por factores ambientales como la luz (Viereck y col. 1996) o la salinidad (Löw y col. 1996), factor, este último, que estudiaremos con mayor detalle en relación a la V-ATPasa.

Un factor considerado clave en la tolerancia a la salinidad ambiental es el control de las concentraciones intracelulares de iones y su acumulación en vacuola (Niu y col. 1995, Serrano 1996). Esta idea ha provenido fundamentalmente de los estudios llevados a cabo en plantas de comportamiento halófito, que acumulan grandes cantidades de NaCl en las vacuolas, mediada por la actividad antiporte Na^+/H^+ y energizada por el funcionamiento de las dos bombas primarias de H^+ del tonoplasto: la V-ATPasa y la V-PPasa (Rausch y col. 1996, Barkla y Pantoja 1996). Debido a ello, se han llevado a cabo estudios detallados sobre la regulación de la expresión génica y de la actividad de la V-ATPasa, como un posible factor determinante de tolerancia. En *Mesembryanthemum crystallinum*, *Beta vulgaris*

Tabla 5. ADNc y clones genómicos e isoformas de las distintas subunidades de la H⁺-ATPasa vacuolar identificadas en plantas superiores. (r.n.p.=resultados no publicados).

Subunidad	Isoformas	Especie	Referencias
A	3	<i>Daucus carota</i>	Gogarten y col (1992)
	2	<i>Gossypium hirsutum</i>	Wilkins (1993)
		<i>Beta vulgaris</i>	Lehr y col. (1999)
		<i>Vigna radiata</i>	Chiu y col. (1995)
		<i>Brassica napus</i>	Orr y col. (1995)
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	Magnotta y Gogarten (1997)
		<i>Hordeum vulgare</i>	FM DuPont (r.n.p.)
		<i>Zea mays</i>	A Fraichard (r.n.p.)
		<i>Nicotiana tabacum</i>	Narasimhan y col. (1991)
		<i>Messembryanthemum</i>	Löw y col. (1996)
B	4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	T Wilkins (r.n.p.)
	2	<i>Hordeum vulgare</i>	Berkelman y col. (1994)
	3	<i>Gossypium hirsutum</i>	Wan y Wilkins (1994)
E		<i>Hordeum vulgare</i>	Dietz y col. (1995)
F		<i>Messembryanthemum</i>	T. Rausch (r.n.p.)
G	2	<i>Nicotiana tabacum</i>	Rouquié y col. (1998)
c	2	<i>Beta vulgaris</i>	Lehr y col. (1999)
	2	<i>Vigna radiata</i>	Hung y col. (1998)
	4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Perera y col. (1995)
	2	<i>Gossypium hirsutum</i>	Hasenfrantz y col. (1995)
	2	<i>Nicotiana tabacum</i>	M. Kirsch (r.n.p)
		<i>Avena sativa</i>	Lai y col. (1991)
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	Cooley y col. (1999)
		<i>Messembryanthemum</i>	Tsiantis y col. (1996)
		<i>Oryza sativa</i>	C. Xiao (r.n.p)
		<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Bartholomew y col. (1996)
		<i>Daucus carota</i>	Löw y Rausch (1996)
	<i>Clusia minor</i>	Löw y Rausch (r.n.p.)	

Daucus carota, los tratamientos salinos incrementaron los niveles de ARNm que codifican a las subunidades A y c (Rausch y col. 1996). Del mismo modo, en raíces y hojas jóvenes de *M. crystallinum*, los niveles de transcrito de las subunidades c, A y B incrementaron coordinadamente por efecto de la sal, mientras que en hojas expandidas solo se indujo el ARNm de la subunidad c (Löw y col. 1996), sugiriéndose que en este tejido existe un mecanismo de regulación transcripcional diferente para cada una de estas subunidades (Tsiantis y col. 1996). Así mismo, se pudo comprobar que el ácido abscísico mimetizaba el efecto de la sal en dicha transcripción, lo que parece implicar a esta hormona en la transducción de la señal durante la adaptación al estrés salino (Tsiantis y col. 1996). Estos resultados sugieren que la expresión de la subunidad c determina el nivel del sector Vo formado y así el gen(es) puede ser objeto de regulación por numerosos factores endógenos y ambientales (Sze y col. 1999).

La actividad V-ATPasa se ha estudiado también en otras especies glicófitas, aunque en algunos casos se han obtenido resultados contradictorios, posiblemente debido a las condiciones experimentales y orígenes vegetales utilizados. No obstante, parece ser un fenómeno general el incremento de la actividad y síntesis del enzima por los tratamientos salinos, habiéndose observado, en células adaptadas de tabaco, que la actividad transportadora de H⁺ y fosfohidrolítica incrementaba 3 y 4 veces, respectivamente, cuando dichas actividades se expresaban por unidad antigénica de subunidad A (Reuveni y col. 1990), y 2 veces en raíces de cebada (Matsumoto y Chung 1988). También, la actividad transportadora de H⁺ se incrementó de 1 a 3 veces, sin cambio en la actividad ATPasa en raíces de cebada (DuPont 1992) y suspensiones celulares de zanahoria (Löw y col. 1996), ambas tratadas con 100 mM NaCl, así como en raíces de girasol tratadas con 75 y 150 mM NaCl (Ballesteros y col. 1996). Para explicar estos hechos, DuPont (1992) postuló que el estrés salino podía incrementar la razón de acoplamiento entre el transporte de H⁺ y la hidrólisis de ATP, lo que implicaría la síntesis de isoformas de ATPasa específicas frente al estrés. A este respecto, para Rausch y col. (1996), una regulación postranscripcional de la V-ATPasa por estrés salino sería de mayor relevancia que la transcripcional, sobre todo, a la luz de los datos sobre la inactivación reversible por oxidación de la V-

ATPasa (Stevens y Forgac 1997, Müller y col. 1999) o la regulación vía fosforilación y/o lípidos específicos de membrana (Martiny-Baron y col. 1992, Yamanishi y Kasamo 1994, Burgos y Donaire 1996).

En general, estos resultados apoyan la idea de que las plantas se adaptan a condiciones de alta salinidad debido, en parte, a un incremento de la expresión de esta bomba de protones de las vacuolas ubicada a nivel de la membrana vacuolar.

V-H⁺-PPasa

Ya en 1985 se puso de manifiesto la existencia de una segunda bomba de H⁺ en el tonoplasto de células vegetales que utilizaba PPi como sustrato (Chanson y col. 1985, Rea y Poole 1985). Posteriormente, otras investigaciones han demostrado que las V-PPasas (E.C.3.6.1.1) son enzimas ubicuos, presentes en plantas superiores, algas, musgos y bacterias fotosintéticas (Maeshima y col. 1994). Estos enzimas pertenecen a una nueva categoría de translocasas de iones, las cuales se diferencian de las demás H⁺-fosfohidrolasas (Tabla 2), por su secuencia, composición de las subunidades, especificidad de sustrato y sensibilidad a inhibidores (Sarafian y col. 1992, Rea y col. 1992b, Rea y Poole 1993, Zhen y col. 1997).

Este enzima se halla abundantemente localizado en las membranas vacuolares de plantas (Vicente y Vale 1991, Oberbeck y col. 1994), habiendo sido solubilizado, separado físicamente de la V-ATPasa por filtración en gel (Rea y Poole 1986, Wang y col. 1986, Chanson y Pilet 1989) y reconstituido funcionalmente en liposomas (Perotti y col. 1994, Sato y col. 1994, Nakamura y col. 1997). En la Tabla 2, se muestran las características bioquímicas más relevantes del enzima H⁺-PPasa en relación a las demás H⁺-fosfohidrolasas: tiene un pH óptimo entre 7.0 y 8.5, insensible a vanadato, nitrato, y azida u oligomicina, e inhibible por fluoruro, así como por 1.1 difosfonato y sus análogos, como imidodifosfato, metilenedifosfonato y aminomeliten-difosfonato, siendo este último un potente inhibidor de la PPasa vacuolar de plantas superiores con una Ki de 1.8 μM (Wang y col. 1986, Chanson y Pilet 1988, Pugliarello y col. 1991, Hoffma-Thoma y Willenbrick 1993, Zhen y col. 1994, Zhen y col. 1997, Gordon-Weeks y col. 1999). La actividad enzimática depende estrictamente de cationes,

principalmente K^+ , y en menor medida NH_4^+ , se inhibe por Na^+ y Li^+ , que probablemente compiten con el K^+ por el lugar de unión, no siendo afectada por los aniones (Pugliarello y col. 1991, Gordon-Weeks y col. 1997, Terrier y col. 1998). Presenta un requerimiento estricto de Mg^{2+} para su actividad, con constantes de ligamiento a alta y a baja afinidad para el ion libre oscilando entre 23-41 μM y 0.25-0.46 mM, respectivamente, siendo el dimagnesio pirofosfato (Mg_2PPi) el sustrato activo, con valores de K_m entre 2.5-5 μM . (Baykov y col. 1993, Gordon-Weeks y col. 1996) y una estequiometria de un H^+ por PPi hidrolizado (Rea y Poole 1993, Zhen y col. 1997). Concentraciones micromolares de Ca^{2+} inhiben al enzima (Maeshima 1991, Suzuki y col. 1999), siendo menos sensible a DCCD, DES y DIDS que las H^+ -ATPasas (Wang y col. 1986, Chanson y Pilet 1988, Hoffmann-Thoma y Willenbrink 1993, Suzuki y col. 1999).

La subunidad de unión al sustrato es un polipéptido de entre 64-81 kD, según el origen vegetal (Rea y col. 1992a), no estando claro el tamaño de la unidad funcional (monómero, dímero o tetrámero), con el centro catalítico orientado hacia el citosol, capaz de llevar a cabo ambas funciones catalíticas de hidrólisis de PPi y transporte de H^+ (Kim y col. 1994b, Perotti y col. 1994).

El análisis de las secuencias de varios ADNc que codifican para la V-PPasa de plantas superiores reveló una alta homología en la secuencia de aminoácidos (94-85%) (Sakakibara y col. 1996). El ADNc de *Arabidopsis* codifica a un polipéptido de 770 aminoácidos con un peso molecular calculado de 80.8 kD (Sarafian y col. 1992). Esta discrepancia entre el peso molecular estimado utilizando electroforesis en SDS (64.5 a 67 kD) y el deducido de la secuencia (80.8 kD), es una característica común en proteínas de membrana, que pueden moverse anómalamente en los geles de poliacrilamida en SDS (Chanson 1993, Nakanishi y Maeshima 1998). El análisis hidropático sugiere que este polipéptido es extremadamente hidrofóbico, con 13-16 dominios transmembranarios y varios dominios hidrofílicos que probablemente participan en la unión de cationes (Mg^{2+} , Ca^{2+} y K^+) y aniones (PPi^{4-} , $MgPPi^{2-}$, Mg_2PPi) (Fig. 11, Sarafian y col. 1992, Tanaka y col 1993, Kim y col 1994a, Sakakibara y col. 1996, Zhen y col. 1997).

Aunque la PPasa es codificada por un simple gen en *Arabidopsis* (Sarafian y col. 1992), y en *Hordeum vulgare* (Tanaka y col. 1993) y *Vigna radiata* (Nakanishi y Maeshima 1998), la presencia de 2 isoformas (BVP1 y BVP2) en *Beta vulgaris* (Kim y col. 1994a), 3 en *Nicotiana tabacum* (TVP5, TVP9 y TVP31) (Lerchl y col. 1995), 2 en *Oryza sativa*, (OVP1 y OVP2) (Sakakibara y col. 1996), sugiere la existencia de múltiples isoformas que pueden expresarse específicamente en función del orgánulo, tejido, estadio de desarrollo y factores ambientales, o bien que dan lugar a un enzima con características catalíticas y/o reguladoras diferentes en función de los factores antes mencionados (Kim y col. 1994a, Lerchl y col. 1995, Sakakibara y col. 1996, Zhen y col 1997).

El mecanismo de acción de la V-PPasa es aún poco conocido. Se han llevado a cabo estudios de mutagénesis dirigida con el enzima de *Arabidopsis thaliana*, basados en la sustitución singular de los residuos conservados (aspartato y glutamato), revelándose la importancia de la función de estos aminoácidos en la hidrólisis del PPi, translocación de protones y inhibición por DCCD (Zhen y Rea 1995, Zhen y col. 1997). Se han identificado tres clases funcionales de mutantes, de acuerdo con el modelo de 15 dominios transmembranarios (Fig. 11): clase I, mutantes que exhibieron hidrólisis de PPi, translocación de H⁺ y sensibilidad a DCCD similar al del tipo salvaje, mostrando que el Glu 119, 229, 667 y 751 no son esenciales ni en la hidrólisis ni en la translocación de H⁺; clase II, en los mutantes obtenidos, se desacopla la translocación de protones de la hidrólisis de PPi, mientras se mantiene la inhibición al DCCD, revelándose la importancia de Glu 427 en el acoplamiento eficiente del transporte de H⁺ a la hidrólisis de PPi; clase III, mutantes con anulación casi completa de la hidrólisis del PPi y del transporte de H⁺, con una actividad residual notablemente menos sensible al DCCD, revelándose el papel de Glu 305 y Asp 504 en la catálisis y en la unión al DCCD.

La combinación de los estudios bioquímicos y mutacionales demostraron la importancia de la cisteína 634, conservada en las secuencias de especies vegetales conocidas y de orientación citosólica, en la inactivación de la V-PPasa por alcalinización provocada por NEM. Dichos estudios indicaron que la Cis 634 no

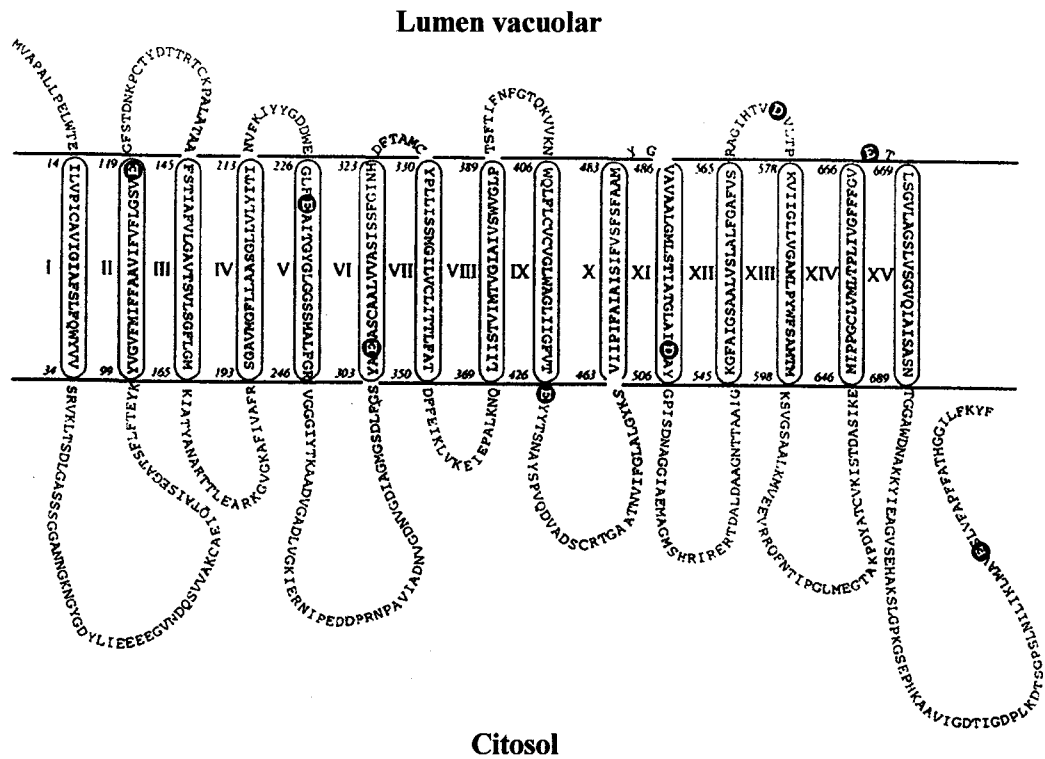


Figura 11. Modelo topológico de la secuencia de aminoácidos de la H^+ -PPasa de tonoplasto de *Arabidopsis thaliana*. I-XV representan los dominios hidrofóbicos transmembranarios. Los residuos conservados de aspartato y glutamato están resaltados sobre fondo negro. Tomado de Zhen y col.(1997).

UNIVERSIDAD DE GRANADA
22 MAYO 2000
COMISION DE DOCTORADO

participa en la catálisis y el efecto inhibitor de NEM se debe más bien al cambio conformacional en el sitio de unión del substrato (Kim y col. 1995, Barkla y Pantoja 1996). Recientemente, Gordon-Weeks y col. (1996) han investigado el efecto protector del Mg^{2+} en la sensibilidad de la H^+ -PPasa de judía a NEM y han propuesto que los residuos Glu y Asp del bucle citoplasmático conteniendo la Cis 634, están implicados en la unión del Mg^{2+} al enzima.

La comparación entre las H^+ -PPasas vacuolares y las PPasas solubles sugiere que la configuración de (E/D)(X)₇KXE es el sitio catalítico putativo de la PPasa (Rea y col. 1992, Kim y col. 1994b, Nakanishi y Maeshima 1998, Baltscheffsky y col. 1999). Este motivo está conservado en 11 H^+ -PPasas de seis especies de plantas, y la reacción con un anticuerpo dirigido a este motivo en *Vigna radiata* ocasionó una inhibición notable de las actividades de hidrólisis de PPi y el transporte de H^+ dependiente de PPi (Takasu y col. 1997).

En cuanto al mecanismo de regulación del enzima, el hecho de que este enzima sea regulable por concentraciones micromolares de Ca^{2+} y citoquininas (Maeshima 1991, Kasai y col. 1993a, 1993b), estimulable por componentes lipídicos activadores de proteína kinasas, es decir, sometido a regulación por fosforilación (Bille y col. 1992), y por mecanismos transcripcionales, presentando varias isoformas específicas del tejido (Kim y col. 1994a, Hörtensteiner y col. 1994), hacen a esta un enzima candidata a una regulación rápida por mecanismos de transducción de señales ambientales.

Es un hecho bien establecido que la H^+ -PPasa de tonoplasto funciona como una bomba electrogénica de H^+ , que transporta H^+ del citosol al lumen vacuolar, generando el gradiente electroquímico de H^+ necesario para el transporte acoplado de iones y solutos a través del tonoplasto, contribuyendo así al desarrollo y mantenimiento de la presión osmótica y presión de turgor, esenciales para la absorción de agua por las células y para el crecimiento celular, respectivamente (Figs. 4 y 8, Rea y Sanders 1987, Rea y Poole 1993, Chanson 1993, Barkla y Pantoja 1996). En cotiledones de calabaza, la PPasa parece actuar como bomba mayoritaria durante la germinación y/o el primer estadio de desarrollo (Susuki y

Kasamo 1993). En el hipocotilo, **Nakanishi y Maeshima (1998)** encontraron que los niveles de transcripción y de proteínas de la V-PPasa en zonas maduras fueron menores que en la región de elongación.

Esta bomba de iones transporta H^+ en la misma dirección que la H^+ -ATPasa de tonoplasto, compartiendo las mismas funciones fisiológicas, y planteando el problema del porqué de la necesidad de dos bombas de H^+ acidificando el mismo compartimento celular (**Rea y Poole 1993, Chanson 1993**). Una respuesta a esta pregunta podría provenir de los requerimientos casi absolutos de K^+ que tiene el enzima para su actividad (p.e. **Rea y Poole 1986**) y de los datos fisiológicos en relación al efecto de este catión (**Davies y col. 1992**). Se ha comprobado que la H^+ -PPasa de tonoplasto, además de H^+ , puede transportar K^+ hacia la vacuola, proponiendo a este enzima como el primer sistema de transporte activo primario de K^+ identificado en vegetales (**Davies y col. 1992, Leigh y col 1994, Obermeyer y col. 1996**). Sin embargo, esta hipótesis ha sido puesta en duda por **Sato y col. (1994)**, quienes tras utilizar PPasa altamente purificada de calabaza, demostraron que el transporte de $^{42}K^+$ era independiente de la translocación de H^+ por el enzima, atribuyendo dicho transporte a una difusión pasiva. Asimismo, **Ros y col. (1995)** en membranas vacuolares de *Vitis vinifera*, utilizando sondas fluorescentes para H^+ , K^+ y medida del potencial de membrana, revelaron la ausencia de un transporte de K^+ asociado directamente a la PPasa. Ello indicaba que la estimulación del enzima por K^+ podría reflejar algún requerimiento estructural para este catión, el cual es la especie iónica mayoritaria en el ambiente natural del enzima.

Una explicación a la existencia de esta segunda bomba de H^+ , es el ahorro de energía que representa la utilización de la energía libre del PPi, que, además de ser un subproducto de las rutas biosintéticas mayoritarias, asegura el reciclado del fosfato (**Rea y Poole 1993, Zhen y col. 1997**). De acuerdo con esta hipótesis, estos autores sugirieron que el enzima podría favorecer la fisiología de las plantas bajo condiciones de estrés por anoxia o baja temperatura, donde los niveles citoplasmáticos de ATP disminuyen drásticamente, y cuyos efectos pueden amplificarse aún más debido a la inactivación temporal de la V-ATPasa causada por la disociación del enzima inducida por frío (**Ward y col. 1992**). A este respecto, se

ha encontrado que el contenido de proteína y/o la actividad enzimática específica de la V-PPasa incrementaron bajo anoxia y frío (Carystinos y col. 1995, Darley y col. 1995, Davies y col. 1997), alta temperatura (Terrier y col. 1998), en condiciones de deficiencia de elementos minerales (Kasai y col. 1998) y de estrés salino (Ballesteros y col. 1996). Teniendo en cuenta que los niveles citoplasmáticos de PPi parecen ser constantes, incluso cuando las plantas se someten a estrés, y los niveles de Mg^{2+} aumentan también en estas condiciones (Rea y Poole 1993 y sus referencias), el enzima PPasa podría conferir una doble ventaja. Por una parte, economizar el consumo de ATP en situación de estrés, donde su contenido celular disminuye, y por otra parte como mecanismo de seguridad para el mantenimiento del gradiente electroquímico de H^+ de la membrana vacuolar para el óptimo funcionamiento celular y la estabilización del pH citosólico en las células vegetales bajo dichas condiciones (Darley y col. 1995, Sakakibara y col. 1999).

En el caso del estrés salino, el mantenimiento del gradiente electroquímico de H^+ por la PPasa, podría ser clave para el transporte activo de Na^+ hacia el interior de la vacuola mediante el antiporte Na^+/H^+ , reduciendo así los niveles de Na^+ en el citoplasma celular (Blumwald y Poole 1985). En relación al efecto de la salinidad sobre la H^+ -PPasa se ha detectado una inhibición *in vivo* e *in vitro* de la actividad en raíces de *Vigna radiata* (Nakamura y col. 1992), *Mesembryanthemum crystallinum* (Bremberger y Lüttge 1992) y raíces de cebada (Matsumoto y Chung 1988), mientras que dicha actividad se incrementó en células de zanahoria (Colombo y Cerana 1993) y raíces de girasol (Ballesteros y col. 1996), así como en células adaptadas al NaCl de *Acer pseudoplatanus* (Zingarelli y col. 1994). A nivel génico, el estrés salino parece incrementar la transcripción de la PPasa en protoplastos de tabaco, aunque este efecto se atribuyó a un mayor contenido vacuolar, más que a un efecto específico del NaCl (Hörtensteiner y col. 1994). No obstante, el hecho que la sobreexpresión de la H^+ -PPasa vacuolar (AVP1) de *Arabidopsis thaliana* confiera tolerancia a la salinidad a mutantes de levadura *enal* (defectivos en el sistema de extrusión de Na^+) sensibles a la sal, siempre que expresen un canal funcional de Cl^- y antiporte Na^+/H^+ , parece indicar que esta bomba primaria (y la V-ATPasa) vacuolar actúa en concierto con dichos

transportadores secundarios para secuestrar iones en este compartimento (Gaxiola y col. 1999).

Transportadores secundarios implicados en el flujo de Na⁺ y Cl⁻

El control de la acumulación de Cl⁻ y Na⁺ en las vacuolas de plantas halófitas y glicófitas tolerantes a la sal, constituye uno de los mecanismos principales de tolerancia, al poder evitar la toxicidad iónica y utilizar estos iones para el ajuste osmótico. El transporte activo secundario de iones a nivel vacuolar, es energizado por la acción de una H⁺-ATPasa y de una H⁺-PPasa, capaces de generar el gradiente electroquímico de H⁺, cuyo flujo hacia el citoplasma se acopla a la entrada o salida de cationes (actividad antiporte o simporte, respectivamente), al tiempo que el potencial eléctrico creado conduce la entrada de aniones a la vacuola (canal o uniporte) (Figs. 4 y 8).

En relación al transporte de Na⁺ a la vacuola, las primeras evidencias de la existencia de un intercambio Na⁺/H⁺ en vacuolas intactas de remolacha se obtuvieron, al observar que el Na⁺ añadido al medio de reacción que contenía dichas vacuolas, no inhibía la actividad ATPasa de tonoplasto, aunque sí la formación del gradiente de pH (Niemietz y Willenbrick 1985). En el mismo sentido, Blumwald y Poole (1985) observaron que el Na⁺ provocaba la disipación del gradiente protónico preformado, medido con sondas fluorescentes de pH, en vesículas de tonoplasto aisladas de raíces de remolacha. Estos autores propusieron que la disipación se debía a un intercambio electroneutro Na⁺/H⁺ llevado a cabo por una proteína antiportadora inducible por Na⁺, cuya actividad mostraba cinéticas de saturación de Michaelis-Menten para la concentración de Na⁺ extravacuolar, con valores de Km aparente de 7.5 mM. Dicha proteína era específica y competitivamente inhibida por amilorido, inhibidor competitivo del antiporte Na⁺/H⁺ en membranas de células animales (Kinsella y Aronson 1981), y sus análogos, 5-(N-metil-N-isobutil)-amilorido (MIA) y 5-(N-etil-N-isopropil)-amilorido (EIPA) y 5-(N, N-hexametilene) amilorido

(HMA) (Blumwald y col. 1987b). Posteriormente, Blumwald y Poole (1987) demostraron también la existencia de actividad antiportadora en células de *Beta vulgaris*, inducible específicamente por Na^+ , y postularon su posible relación con la tolerancia de las plantas a la salinidad. Asimismo, Staal y col. (1991) encontraron una clara relación entre el antiporte Na^+/H^+ y la resistencia de *Plantago* a la salinidad, en dos especies con sensibilidad diferencial a dicho estrés. Mediante técnicas de resonancia magnética nuclear se ha demostrado que la actividad antiporte Na^+/H^+ parece funcionar *in vivo*, en vacuolas de células de *Catharanthus roseus* (Guern y col. 1989), de raíces de cebada (Fan y col. 1989, Martínez y Läuchli 1993) y de maíz (Spickett y col. 1993). Otros autores han demostrado dicha actividad antiportadora mediante la medida del flujo de $^{22}\text{Na}^+$ dependiente del gradiente de H^+ (Barkla y col. 1990).

En glicófitas, la actividad antiporte Na^+/H^+ se ha identificado en vesículas aisladas de tonoplasto de remolacha (Blumwald y Poole 1985), cebada (Garbarino y Dupont 1988), algodón (Hassidim y col. 1990), *Plantago* (Staal y col. 1991) girasol (Ballesteros y col. 1997) y arroz (Fukuda y col. 1998), así como en vacuolas aisladas de remolacha (Niemietz y Willenbrink 1985, Blumwald y col. 1987b) y de *Chatharantus roseus* (Guern y col. 1989). En plantas halófitas, se ha puesto de manifiesto en vesículas de tonoplasto de *Atriplex* (Matoh y col. 1989, Hassidim y col. 1990) y en especies halófitas de *Plantago* (Staal y col. 1991) y *M. crystallinum* (Barkla y col. 1995).

En *Saccaromyces cerevisiae*, se ha identificado el gen NHX1, homólogo a los genes NHE (antiporte Na^+/H^+) de mamíferos, cuyo producto media el secuestro de iones Na^+ dentro del compartimento prevacuolar (Nass y col. 1997, Nass y Rao 1998). Recientemente, se han clonado genes homólogos a NHX1 en *Arabidopsis* (AtNHX1) (Gaxiola y col. 1999, Apse y col. 1999, Quintero y col. 2000), y *Oryza sativa* (OsNHX1) (Fukuda y col. 1999), que codifican proteínas de 58 y 59 kD, respectivamente, aunque la de *Arabidopsis* presentó, en geles de poliacrilamida-SDS, un peso molecular aparente de 47 kD (Apse y col. 1999). En función de estos

resultados, son cuestionables aquellos otros que adscribían a una proteína de 170 kD de tonoplasto de remolacha una funcionalidad antiportadora (Barkla y col. 1990, Barkla y Blumwald 1991).

Como se ha indicado, el intercambio Na^+/H^+ sigue una cinética de Michaelis-Menten para la concentración de Na^+ con valores de K_m variables según la especie vegetal: 14 mM en vesículas microsomales de hojas de *Atriplex gmelini* (Matoh y col. 1989), 9 mM en vesículas de tonoplasto de raíz de *Hordeum vulgare* (Garbarino y Dupont 1988), 7.5 mM en tonoplasto de tejidos de almacén de *Beta vulgaris* (Blumwald y Poole 1985), 2.4 mM en raíces de *Plantago maritima* (Staal y col. 1991), 8 mM en raíces de girasol (Ballesteros y col. 1997) y 10 mM en raíces de *Oryza sativa* (Fukuda y col. 1998). El antiporte muestra una alta selectividad para el Na^+ comparada con K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Li^+ y colina (Garbarino y Dupont 1988, Staal y col. 1991), presentando una estequiometría de 1 Na^+ transportado por 1 H^+ cotransportado (Blumwald y Poole 1985).

El intercambio Na^+/H^+ es inhibible por amilorido en vesículas de tonoplasto de *Beta vulgaris* (Blumwald y col. 1987b), girasol (Ballesteros y col. 1997) y *Oryza sativa* (Fukuda y col. 1998), mientras que en vesículas de tonoplasto de raíces de *Hordeum vulgare* (Garbarino y Dupont 1988), membranas microsomales de hojas de *Atriplex gmelini* (Matoh y col. 1989) y vesículas de tonoplasto de raíces de *Plantago maritima* (Staal y col. 1991), no ejerció efecto alguno.

El mecanismo de regulación de la actividad antiportadora es controvertido. A partir de los datos cinéticos obtenidos, se ha sugerido que dicha actividad era inducida *de novo* por el estrés salino en células de remolacha (Blumwald y Poole 1987) y en raíces de cebada (Dupont 1992). Garbarino y Dupont (1989) detectaron una inducción rápida de la actividad antiporte de tonoplasto de raíces de cebada, en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas, lo que indicaba una posible regulación postraduccional por activación de proteínas de antiporte preexistentes. Ballesteros y col. (1997) llegaron a similares conclusiones para el

enzima de raíces de girasol. En plantas halófitas como *Atriplex* o *Mesembryanthemum*, dicha actividad parece ser constitutiva y regulada por un incremento en el contenido de la proteína antiportadora (Hassidim y col. 1990, Barla y col. 1995). A nivel génico, la expresión de AtNHX1 y OsNHX1 incrementó por estrés salino en raíces y parte aérea (Gaxiola y col. 1999, Fukuda y col. 1999), mientras que Apse y col. (1999) no detectaron incremento de la transcripción de AtNHX1 en presencia de sal o ABA exógeno.

El papel fundamental del antiporte Na^+/H^+ de tonoplasto es conducir la acumulación de Na^+ en vacuolas en condiciones de salinidad (Blumwald y col. 1987a). Ello unido a una dificultad de salida de este catión en vacuolas de plantas estresadas, conforma un mecanismo eficiente de secuestro de Na^+ en dicho compartimento celular (Maathius y Prins 1990). La relevancia de dicho mecanismo en la tolerancia a la salinidad ha quedado reflejado de forma inequívoca, tras la identificación y el clonaje del gen que codifica la proteína antiportadora Na^+/H^+ en plantas superiores. La sobreexpresión de AtNHX1 en una cepa de levadura mutante en su gen *nhx1*, suprimió el fenotipo sensible a la sal, lo que sugería que los productos de plantas y levaduras eran funcionalmente similares (Gaxiola y col. 1999) Asimismo, en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban AtNHX1, el crecimiento de las mismas no se veía afectado por concentraciones de hasta 200 mM NaCl.

Un aspecto importante de la compartimentación vacuolar es el transporte de Cl^- , que se requiere para conseguir el balance eléctrico durante el bombeo de protones por la ATPasa vacuolar (Wada y col 1992). Además, la compartimentación vacuolar de Cl^- es una adaptación esencial en la tolerancia al NaCl (Niu y col. 1995). El movimiento de Cl^- desde el citosol a la vacuola se consigue a través de canales energizados por las bombas de H^+ del tonoplasto. Se ha propuesto que los canales de tipo vacuolar lentos (SV) explicarían todas las conductancias iónicas a una concentración citosólica elevada ($>1\mu\text{M}$) de Ca^{2+} (Plant y col. 1994) y, alternativamente, un antiporte H^+/Cl^- (Rea y Sanders

1987). Las células de levadura contienen un solo canal de Cl⁻ codificado por el gen *GEF1*. La mayoría de las proteínas que componen el canal de Cl⁻ en levaduras se localizan en pequeñas vesículas derivados de las vesículas de Golgi. Estos pequeños compartimentos vacuolares pueden ser más importantes en la tolerancia a la sal que la vacuola central. El mutante *gef1* en levadura pudo complementarse por la expresión de los genes que codifican a canales de Cl⁻ (*CLC-c* y *CLC-d*) de *Arabidopsis thaliana* (Gaxiola y col. 1998). No está claro si, en plantas, estos canales de Cl⁻ están localizados en la membrana plasmática, membrana vacuolar o en ambas. La membrana plasmática de las células guarda contiene un canal de aniones muy activo, que lleva a cabo la extrusión del cloruro y malato durante el cierre de estomas (Hedrich, 1994), sin embargo, la base molecular de este canal es todavía desconocida (Serrano y col. 1999).

B.3. Sistema coordinado de transducción de la señal de estrés salino: papel del Ca²⁺ y del pH citoplasmático

En el apartado A.4 se ha mencionado el papel relevante del Ca²⁺ en su doble función como estabilizador de las membranas y como segundo mensajero en la percepción de la señal de estrés salino y en la regulación de la respuesta adaptativa a la salinidad tales como el mantenimiento del equilibrio osmótico y de la homeostasia iónica. En los últimos años ha emergido un modelo hipotético de percepción de dicha señal, de su transducción y la regulación de distintos efectores que modulan la homeostasia de Na⁺ y K⁺, basado en las evidencias obtenidas en plantas y, sobre todo, en levaduras (Fig. 12, Bressan y col. 1998, Serrano y col. 1999).

Según este modelo, el estrés salino se percibe por un sensor para el cambio de turgor y de la concentración de Na⁺, todavía desconocido en plantas, pero que en levaduras parecen implicar a proteínas de membrana como una histidina quinasa (*SLN1*) y *SHO* (proteína SH₃) (Hohmann 1997). Como consecuencia de ello se inicia una ruta de transducción de señales dependiente de Ca²⁺. En plantas, se ha observado que el estrés salino inducía un incremento en la concentración de Ca²⁺ citosólico en maíz y *Arabidopsis* (Lynch y col. 1989, Knight y col. 1997),

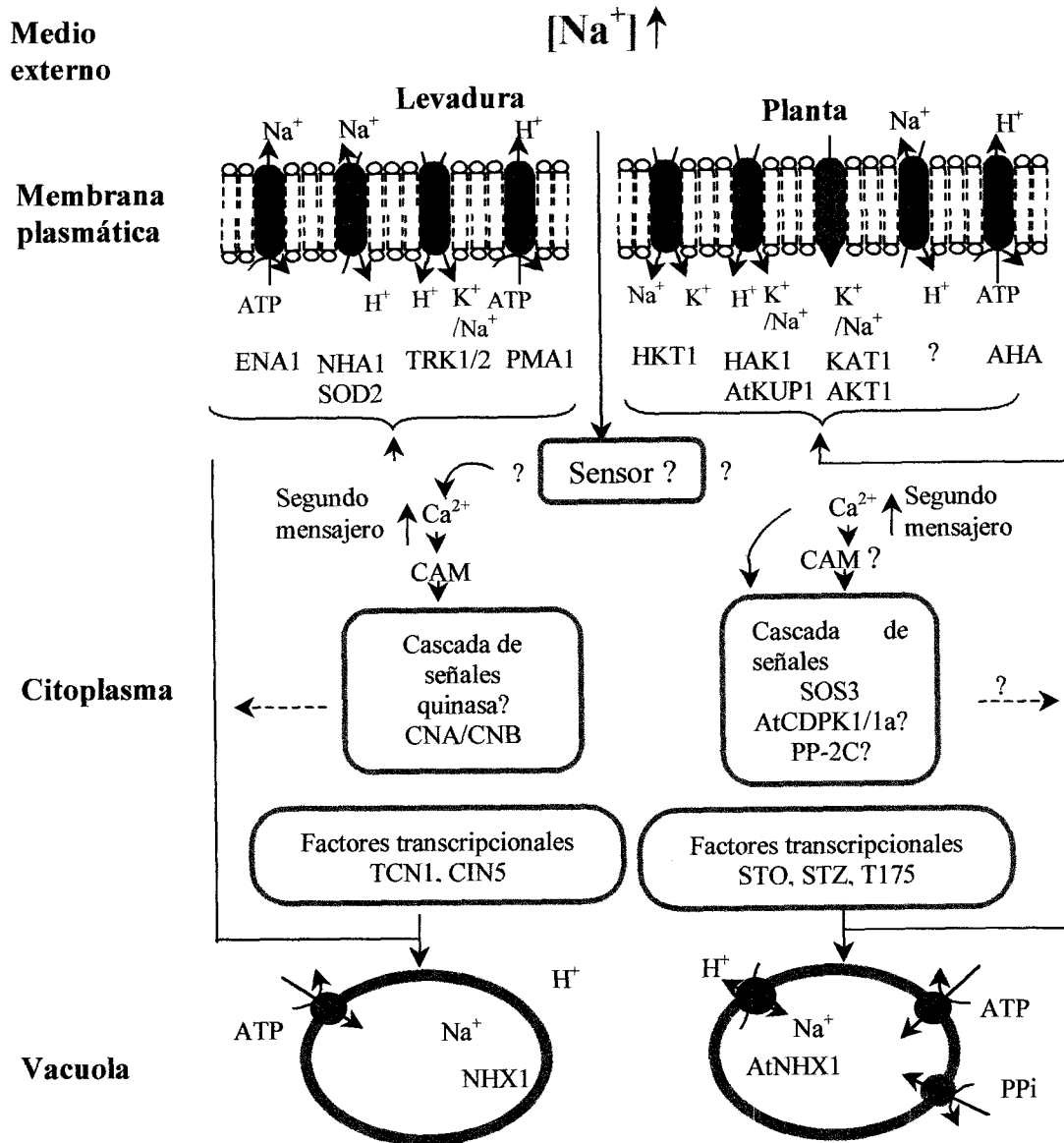


Figura 12. Modelo de percepción de señales, transducción y regulación de efectores que modulan la homeostasia de Na^+ basado en evidencias obtenidas en plantas y levaduras. Explicación en el texto. Abreviaturas: AtCDPK1/1a, proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} de *Arabidopsis thaliana*; CAM, calmodulina; CNA/B, subunidad A y B de la calcineurina (fosfatasa de tipo 2B, PP-2B); PP-2C, fosfatasa de tipo 2C; SOS3, proteína homóloga a la calcineurina. Tomado de Bressan y col. (1998).

probablemente mediado por productos de hidrólisis de los fosfoinosítidos de la membrana plasmática (Cho y col. 1993, Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 1997, Pical y col. 1999). Estas rutas de transducción dependiente de Ca^{2+} , al menos en levadura, implicaría a una cascada de fosforilación de proteínas gobernada por la MAP-quinasa (ruta HOG), activada por cambios osmóticos (Marquez y Serrano 1996, Munnik y col. 1999), y otras mediada por desfosforilación a través de una proteína fosfatasa de tipo 2B dependiente de Ca^{2+} y calmodulina, la calcineurina, la cual parece jugar un papel central en la regulación de la homeostasia del Na^+ y K^+ cuando crecen en condiciones salinas (Mendoza y col. 1994, 1996). Por un lado, induce la expresión de los genes ENA1/PMR2A que codifican a un Na^+ -ATPasa de plasmalema, responsable del sistema de extrusión de Na^+ , y de forma coordinada, se produce una reducción en el influjo de Na^+ mediado por una modulación de los sistemas de absorción de K^+ (TRK1 y 2), consistente en el incremento de la afinidad para el K^+ , de la que resulta una mayor selectividad K^+/Na^+ . Este efecto activador de la calcineurina por Ca^{2+} parece estar mediado por diferentes factores de transcripción (Serrano y col. 1999).

En plantas, se ha identificado un mutante *sos3* de *Arabidopsis* que presenta un fenotipo de hipersensibilidad al NaCl, que se suprime por la adición de cantidades milimolares de Ca^{2+} . El hecho de que en este mutante, el producto del gen *sos3*, presentara una secuencia homóloga a la subunidad B de la calcineurina parece apuntar a una conservación de este mecanismo en plantas y hongos. Esta idea viene refrendada por el hecho de que plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresaban una forma activada de calcineurina de levadura exhibían una mayor tolerancia a la salinidad (Pardo y col. 1998).

Como sugieren Serrano y col. (1999), una profundización en la investigación sobre esta red de interacciones entre proteínas reguladoras (sensores de membranas, proteínas quinasas, proteínas fosfatasas, factores de transcripción) y transportadores iónicos, traerá consigo un conocimiento exhaustivo de este sistema coordinado de transducción de la señal de estrés salino, susceptible de manipulación, y que sin duda tendrá repercusiones biotecnológicas de gran impacto en Agricultura Sostenible (apartado A.3).

Este intenso flujo de iones a través del citoplasma, energizado por las diferentes bombas de H^+ localizadas en el plasmalema y tonoplasto, puede tener una gran transcendencia en la regulación del pH citoplasmático bajo condiciones salinas. En plantas, el valor de pH citoplasmático se mantiene entre 7.2 y 7.4, mientras que el vacuolar es aproximadamente 5.0 (Gout y col. 1992). Las perturbaciones de pH citoplasmático en plantas superiores se asocian al metabolismo celular, al transporte iónico y a la respuesta a diversos factores ambientales (anaerobiosis, transiciones luz-oscuridad, temperatura y pH externo). Su regulación es clave para la actividad de los enzimas implicados en el metabolismo celular, sugiriéndose que el pH citosólico podría actuar como segundo mensajero celular (Kurkdjian y Guern 1989).

A pesar de que el pH citoplasmático puede verse afectado por múltiples factores, éste se mantiene próximo a la neutralidad, presentando únicamente pequeñas variaciones en circunstancias fisiológicas muy especiales. En la regulación intervienen los sistema *pH-Stat* bioquímico y bioenergético.

Los enzimas implicados en el transporte de H^+ a través de las membranas juegan un papel clave en el segundo sistema, muy especialmente el enzima H^+ -ATPasa de plasmalema de las células vegetales, al ser el sistema más eficiente en el bombeo de H^+ hacia el medio exterior (Serrano 1985, Serrano 1989, Palmgren 1998). El pH óptimo de esta H^+ -ATPasa se sitúa alrededor de 6.5, valor inferior al pH fisiológico celular, de manera que cuando los H^+ se acumulan en el citoplasma, se induce la extrusión de los H^+ al exterior celular, por la estimulación de la actividad H^+ -ATPasa, lo que provoca la hiperpolarización del plasmalema; por el contrario, la alcalinización del citoplasma, inhibe el enzima induciendo la despolarización de la membrana. Así, además de contribuir a la regulación del pH del citoplasma, este enzima es también un sensor de la concentración de H^+ en este compartimento celular, lo que confiere a la H^+ -ATPasa de plasmalema un importante papel en los procesos de transducción de señales relacionados con la respuesta a numerosos factores externos (Michelet y Boutry 1995, Palmgren 1998).

Por otra parte, el sistema *pH-Stat* bioquímico constituye un mecanismo de control del pH citoplasmático a través de la producción y consumo de ácidos orgánicos (Raven y Smith 1979, Fig. 13). Numerosas evidencias experimentales han apoyado la importancia del balance entre la producción y el consumo de malato en la regulación del pH citoplasmático en plantas (Sakano y col. 1998, Edwards y col. 1998). Tratamientos que alcalinizan el citoplasma estimulan la síntesis de malato en las células vegetales (Beffagna y Romani 1994), mientras que la acidificación del citoplasma conlleva una disminución del contenido de malato, acompañado de una recuperación de la caída inicial del pH en células de *Catharanthus roseus* (Sakano y col. 1998). Un exceso en la absorción de cationes puede ser equilibrado mediante la síntesis de ácidos orgánicos en el citoplasma, principalmente ácido málico, habiéndose comprobado una acumulación de malato en numerosas especies vegetales, especialmente en las plantas capaces de cambiar su metabolismo C₃ a CAM, cuando crecen en medios salinos (Bohnert y col. 1995).




Figura 13. Reacciones implicadas en el *pH-stat* bioquímico.

La formación de malato libera 2 H⁺ por molécula de ácido málico sintetizada (Kurkdjian y Guern 1989). La síntesis de este ácido en el citoplasma celular involucra a los enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa y malato deshidrogenasa (Fig. 13), presentes en bacterias, algas y plantas superiores, donde juegan un papel fundamental en la fotosíntesis, en el reciclaje de los metabolitos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, en la regeneración de poder reductor (NADPH) y en la captación del CO₂ procedente de la respiración (Golombek y col. 1999). El enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC

4.1.1.31) es citosólico y cataliza la β -carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato a oxalacetato en presencia de HCO_3^- y Mg^{2+} , siendo activado por valores de pH entre 6.8-8.0, lo que explica que pueda contribuir a la regulación de pH citoplasmático (Kurkdjian y Guern, 1989, Vidal y Chollet 1997). Por el contrario, el enzima málico (NADP Oxalacetato-descarboxilasa, EC 1.1.1.40), implicado en el consumo de malato en el citoplasma, es una deshidrogenasa que, además de oxidar el ácido málico, lo descarboxila dando lugar a la formación de piruvato, CO_2 y NADPH. La reacción requiere Mg^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} , y un pH óptimo entre 6.4 y 7.3, pero muy sensible a pequeños cambios de pH, de forma que valores de pH citoplasmático superiores a 7.0 inhiben claramente su actividad (Edwards y col. 1998), jugando un papel importante en el metabolismo de plantas CAM y C_4 , al permitir la formación de una reserva de la glicolisis en la producción de energía (Cushman y Bohnert 1997).

En este sentido, se ha observado que la salinidad provoca cambios en el pH del citoplasma en células de *Dunaliella* (Kartz y col. 1992), y cebada (Katsuhara y col. 1997). El efecto de la salinidad sobre estos enzimas se ha estudiado principalmente en plantas CAM como *Mesembryanthemum crystallinum*, donde de ha observado que el NaCl induce la transcripción de *ppc1*, miembro de la familia de genes que codifican el enzima PEPC que interviene en el metabolismo CAM, así como el NADP-enzima málico (Bohnert y col. 1996).



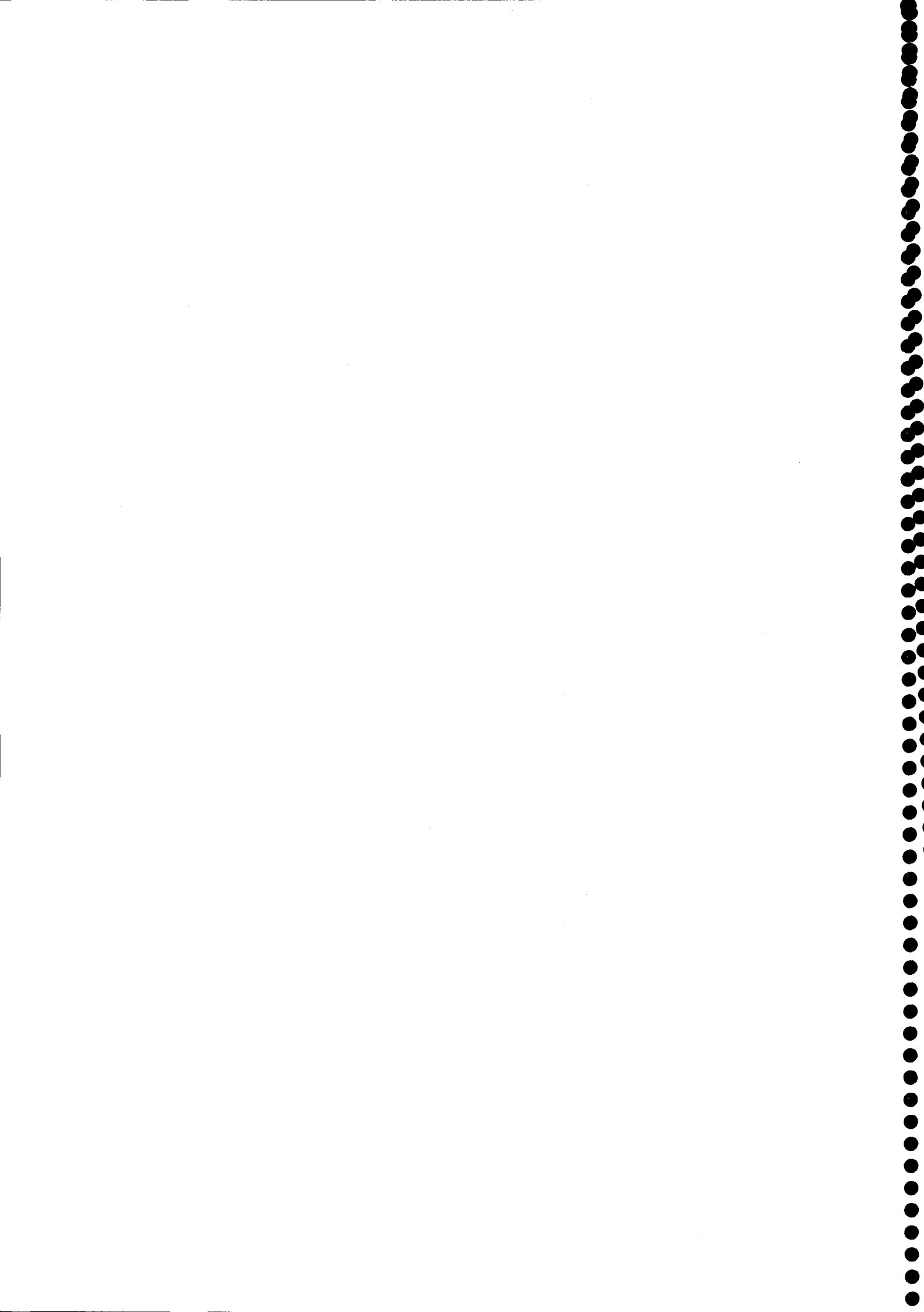
III. Plan de trabajo


El planteamiento y justificación de objetivos y los antecedentes científicos expuestos nos han llevado a establecer el siguiente Plan de Trabajo:

- 1. Estudio comparativo de la tolerancia a la salinidad en especies cultivada y silvestre de tomate: indicadores fisiológicos de tolerancia a nivel de raíz y parte aérea.**

- 2. Funcionalidad de las bombas primarias y secundarias de plasmalema de raíces y parte aérea en respuesta al estrés salino.**
 - a. Aislamiento y caracterización del plasmalema.
 - b. Cambios inducidos por el estrés salino en la actividad y contenido del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema de plasmalema.
 - c. Determinación y caracterización de la actividad antiportadora Na^+/H^+ a nivel de plasmalema de raíces.

- 3. Funcionalidad de las bombas primarias y secundarias de tonoplasto de raíces y parte aérea en respuesta al estrés salino.**
 - a. Aislamiento y caracterización de tonoplasto.
 - b. Cambios inducidos por el estrés salino en la actividad, contenido y expresión génica de los enzimas H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa de tonoplasto. Identificación y clonaje de ADNc correspondientes a la subunidad A de la V-ATPasa y a la PPasa.
 - c. Determinación y caracterización de la actividad antiportadora Na^+/H^+ a nivel de tonoplasto.





IV. Material y métodos

A. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se han utilizado semillas de tomate de una variedad cultivada (*Lycopersicon esculentum* L. Mill., cv, Pera) y de una especie silvestre (*Lycopersicon pimpinellifolium*, Mill., accesión PE-2), colectadas en la Estación Experimental La Mayora, CSIC, Málaga.

Las semillas se desinfectaron superficialmente con 50 % de lejía comercial (20 g l⁻¹ de cloro activo) durante 7 minutos y se lavaron con agua destilada durante otros 20 minutos. La germinación tuvo lugar a 28 °C durante 6 días en oscuridad en rollos de papel de filtro, verticalmente dispuestos en bandejas de plástico, con una solución aireada de 0.5 mM CaCl₂. Las plántulas se pasaron a la luz mantenidas en solución de Hoagland 1/10 (Tabla 6) (Hoagland y Arnon 1950), con constante aireación.

Tabla.6. Solución nutritiva de Hoagland y Arnon (1950).

Macronutrientes	[mM]
KH ₂ PO ₄	1
KNO ₃	5
Ca(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2
	[μM]
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	46.20
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9.10
ZnSO ₄ ·5H ₂ O	0.76
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.32
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.02
C ₁₀ H ₁₂ FeN ₂ NaO ₄ ·3H ₂ O	4.48

Por medio de una esponja se insertaron plántulas de tamaño uniforme a través de una tapa de PVC negra agujereada (50 plantas), dispuestas sobre un barreño de plástico negro, conteniendo 7 litros de solución nutritiva de Hoagland, pH 6.0, aireada y diluida 4 veces que fue remplazada semanalmente, manteniéndose a un pH entre 5.8-6.5, por ajuste periódico con H₂SO₄. Las plantas crecieron en invernadero, con un valor medio de irradiación luminosa de 890 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoperiodo 10-15 horas, entre Septiembre y Mayo, y mantenidas a una temperatura y humedad relativa de 27/15 °C y 40/95 %, día/noche, respectivamente.

Tras 4 semanas de crecimiento en estas condiciones, las plantas se trataron durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl (con una razón NaCl: CaCl₂ de 6.5:1 mM) en adiciones crecientes de 20, 30, 35 y 45 mM de sal durante los primeros 4 días, para evitar un estrés por choque osmótico.

B. DETERMINACION DE PARAMETROS FISIOLOGICOS

B.1. Crecimiento y contenido hídrico

Se determinó el peso fresco y seco de hojas jóvenes, hojas adultas, tallos y raíces. Se cortaron estos tejidos, lavándose rápidamente con tres pases de agua desionizada y secándose por centrifugación manual con secadora de verduras entre papeles de filtro. Para obtener el peso fresco, los tejidos se pesaron inmediatamente en balanza de precisión, determinándose posteriormente el peso seco, tras secado en estufa a 70 °C durante 48 horas. El contenido hídrico, expresado como porcentaje, se calculó según la fórmula:

$$\% \text{ CH} = (\text{PF} - \text{PS}) / \text{PF} \times 100$$

B.2. Determinación de osmóticos orgánicos

B.2.1. Azúcares solubles totales

El contenido de azúcares solubles totales se determinó por el método de la antrona (**Fales 1951**), utilizando como muestra el material hidrosoluble contenido en la fase metanólica-acuosa obtenida tras la extracción de lípidos totales de cada tejido (apartado IV.C.1.1.). Una alícuota de cada extracto se adicionó a 5 ml de reactivo de antrona (0,2 g de antrona disuelta en una mezcla de ácido sulfúrico-agua 5:1, v/v), previamente depositado en tubos de vidrio, calidad pirex, con tapón de rosca. Los contenidos se mezclaron por inversión, calentándose a 100 °C durante 10 minutos. Tras enfriar los tubos en hielo, se determinó el contenido de azúcares midiendo la absorbancia a 620 nm (espectrofotómetro Shimadzu, mod. 160), frente a una curva patrón de 0, 10, 20, 40, 80, y 160 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de glucosa. Los resultados se expresaron como miligramos de azúcares solubles totales por gramo de peso fresco o seco de muestra.

B.2.2. Prolina

El contenido en prolina se determinó por el método de **Bates y col (1973)**, modificado por **Magné y Larher (1992)**. A una alícuota de 250 μl de muestra problema, adecuadamente diluida, obtenida de la fase metanólica-acuosa resultante de la extracción de lípidos totales (apartado IV.C.1.1.), se añadió 1 ml de ninhidrina (0.5 g de ninhidrina en 30 ml de ácido acético glacial y 20 ml de agua destilada), manteniéndose durante una hora en baño María a 100 °C. Tras paralizar la reacción por enfriamiento en hielo, se añadieron 2 ml de tolueno para la extracción del cromóforo, agitándose vigorosamente durante 20 segundos. Una vez formadas las fases, se midió la absorbancia a 520 nm (espectrofotómetro Shimadzu, mod.160) en el extracto de tolueno, que contiene el complejo ninhidrina-prolina, frente a una curva patrón de 0, 10, 20 y 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de prolina. Los resultados se expresaron como μg de prolina por gramo de peso fresco o seco.

B.3. Determinación del contenido mineral

El análisis de Na^+ , K^+ , y Ca^{2+} se llevó a cabo a partir del mineralizado obtenido por destrucción del material orgánico con H_2SO_4 y H_2O_2 (Wolf 1982). Las muestras (hoja joven, hoja adulta, tallo y raíz) se lavaron por 4 pases sucesivos de agua destilada. La mineralización tuvo lugar calentando el material vegetal, previamente pulverizado y desecado a $70\text{ }^\circ\text{C}$, con H_2SO_4 concentrado a $120\text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 horas. Al final de esta fase, y tras enfriar la muestra, se adicionó H_2O_2 al 30 % (v/v) y se volvió a calentar de nuevo. Este ciclo de calentamiento y enfriamiento se repitió, tantas veces como fue necesario, hasta la total digestión de la muestra. Finalmente, el mineralizado se calentó a $150\text{ }^\circ\text{C}$, durante 15 minutos, para eliminar los restos de H_2O_2 y se llevó a volumen final conocido.

El contenido de Na^+ y K^+ se determinó por espectrofotometría de llama, utilizando una curva patrón obtenida a partir de soluciones concentradas de molaridad conocida de NaCl y KCl que contenían H_2SO_4 en cantidades equivalentes al mineralizado. El contenido de Ca^{2+} se determinó por espectrofotometría de absorción atómica, diluyendo el mineralizado con una solución de lantano al 3% (v/v), para impedir que el Ca^{2+} forme compuestos difícilmente atomizables en la llama que pudieran ocasionar errores en la medida (Pinta 1973). Los valores de Ca^{2+} se obtuvieron por extrapolación de los resultados frente a una curva patrón obtenida a partir de una solución madre de CaCO_3 , que contenía lantano y H_2SO_4 en cantidades equivalentes al mineralizado. El contenido en cloro se analizó por valoración potenciométrica de una suspensión de la muestra por medio de una solución valorada de nitrato de plata. (AFNOR 85619, 1985).

C. DETERMINACION DE COMPONENTES BIOQUIMICOS

C.1. Análisis de lípidos

C.1.1. Extracción de lípidos totales

La extracción de lípidos totales de raíces y hojas, previamente congeladas en N₂ líquido y almacenados a -70 °C, se llevó a cabo por el método de **Kates (1972)**, modificado por **Norberg y Liljenberg (1991)**. Un gramo de tejido congelado y fragmentado en pequeños trozos, se introdujo en isopropanol hirviente (1g/5 ml) y se mantuvo en ebullición durante 4 minutos para inactivar lipasas y fosfolipasas (**Douce 1964**). La mezcla se homogeneizó durante 1 minuto con Sorvall Omnimixer, añadiéndose a continuación por dos veces 3.5 ml de cloroformo:isopropanol (1:1, v/v), y finalmente 4 ml de cloroformo, repitiéndose la homogeneización con cada nueva adición. El homogenado se filtró a través de papel Whatman 1 en embudo Buchner sobre kitasato, lavándose sucesivamente el residuo con 1 ml, por gramo de peso fresco, de cloroformo:isopropanol (1:1, v/v) y 1 ml de cloroformo. El filtrado se concentró a vacío en Rotavapor a 30 °C, y al residuo lipídico semiseco resultante se le adicionaron 3 x 2 ml de cloroformo:metanol (2:1, v/v).

Para eliminar los contaminantes no lipídicos sobre el extracto lipídico disuelto se añadió 1 ml de agua salada (1 % -p/v- NaCl), y tras centrifugación a máxima velocidad en centrifuga de mesa Martin Christ (4 000 g), aparecieron dos fases, la superior acuosa de metanol-agua, la cual se almacenó a -70 °C, para la determinación posterior de prolina y azúcares totales, y la inferior clorofórmica, conteniendo los lípidos disueltos, que se recogió y a la que se adicionó 200 µl de benceno para eliminar trazas de agua, evaporándose por centrifugación a vacío en *speed vacuum* (B. Braün-Biotech SA, mod. Christ Alpha RUC). El residuo de lípidos totales obtenido se llevó a 1.2 ml de benceno:etanol (4:1, v/v), conservándose a -70 °C, hasta su uso posterior, en viales herméticamente cerrados en atmósfera de N₂ o argón sin alteración importante (**Vorbeck y Martinetti 1965**).

C.1.2. Separación de diferentes categorías lipídicas

Las diferentes categorías lipídicas se separaron por cromatografía en capa fina a partir del extracto de lípidos totales. Una vez activada la placa de gel sílice

(Silicagel G, Merck, Alemania, 0.5 mm de espesor) durante 30 minutos a 110 °C, se depositó en el origen de la misma una alícuota del extracto de lípidos totales disueltos en cloroformo, bajo corriente de nitrógeno.

Para el desarrollo de las muestras de hoja joven y hoja adulta, se utilizó la mezcla de disolventes usado por **Gadner (1968)**, modificado por **Grenier y col. (1973)**, que permite la separación satisfactoria de fosfolípidos, galactolípidos y triglicéridos. La separación se inició con un primer desarrollo durante 25 minutos hasta la mitad de la placa, con la mezcla de acetona:ácido acético:agua (100:15:1; v/v/v). Una vez secada la placa bajo corriente de N₂, la placa se sometió a un segundo desarrollo en pentano:eter etílico (75:25; v/v) hasta alcanzar el disolvente el final de la misma (55 minutos, aproximadamente).

La separación de lípidos de la raíz se llevó a cabo en un solo desarrollo durante 80 minutos en una mezcla de cloroformo:acetona:metanol:ácido acético:agua (50:20:10:5; v/v/v/v) (**Lepage 1967**). Las diferentes bandas de lípidos se revelaron por breve exposición a vapores de yodo o pulverizando la placa con Rodamina 6G, siendo visualizadas tras exposición con luz ultravioleta. Finalmente, la identificación de cada lípido, se llevó a cabo, cocromatografiando en la misma placa diferentes patrones lipídicos (Sigma Química, España). Los contenidos de fosfolípidos totales, lípidos neutros y glucolípidos, expresados en $\mu\text{moles g}^{-1}$ peso seco, se calcularon asumiendo que los porcentajes de ácidos grasos en estos lípidos constituyen el 70, 95 y 65 % del total, respectivamente (**Dubacq 1973**).

C.1.3. Análisis de ácidos grasos de lípidos totales y de diferentes categorías lipídicas

La determinación de ácidos grasos por cromatografía gaseosa requiere las reacciones previas de saponificación, para liberar los ácidos grasos de las moléculas de acil-lípidos, y de metilación, para obtener sus derivados metilados. Estos procesos se llevaron a cabo por el método de **Metcalfe y col. (1966)**, modificado por **Lechevallier (1966)**.

En el análisis de ácidos grasos de lípidos totales de hojas y raíces, la reacción de saponificación se llevó a cabo utilizando NaOH al 2 % en metanol, en tubo cerrado a 85 °C durante 25 minutos y, posteriormente, sus ácidos grasos se metilaron con trifluoruro de boro al 14 % en metanol a 85 °C durante 20 minutos.

Para el caso de los lípidos separados por capa fina, las bandas de sílice rascadas de la placa correspondientes a diferentes categorías lipídicas, se metilaron directamente, sin previa saponificación, con 3 ml de 14 % trifluoruro de boro en metanol, incubándose a 80 °C durante 30 minutos. Ambas reacciones tuvieron lugar al mismo tiempo, al actuar la sílice como catalizador de la reacción de saponificación. Los ésteres metílicos obtenidos se extrajeron de la fase metanólica por adición de 6 ml de n-pentano y 1 ml de agua destilada, estableciéndose dos fases por centrifugación a 2 000 g. La fase superior pentánica, conteniendo los derivados metílicos de los ácidos grasos, se recogió y se evaporó por centrifugación a vacío en *speed vacuum* y el residuo se disolvió con volúmenes reducidos de cloroformo (~ 100 µl) para su análisis posterior.

La separación, cuantificación e identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos se realizó por cromatografía en fase gaseosa, a una temperatura constante de 145 °C, en columna semicapilar de vidrio 30 m x 0.75 mm (Supelco SP-2330), utilizando como patrón interno el éster metílico del ácido heptadecanoico, no presente en muestras vegetales.

C.2. Análisis de enzimas del sistema de *pH-stat* bioquímico.

C.2.1. Actividades PEP carboxilasa y enzima málico

Un gramo de peso fresco de tejido, previamente congelado y almacenado a -70 °C, se pulverizó en mortero con N₂ líquido. Tras la adición de 10 ml de medio de homogenización, conteniendo 100 mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 0.5 % (p/v) BSA, 0.5 % (p/v) PVP-40, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT y 2 mM PMSF, el homogenado resultante se filtró a través de una capa de entretela, y el extracto obtenido se centrifugó a 10 000 g durante 15 minutos (centrífuga Sorvall, rotor SS-34), utilizándose el sobrenadante resultante (entre 50 a 300 µg de proteína),

para ensayar a 25 °C las actividades PEP carboxilasa y NADP-enzima málico, mediante el cambio de absorbancia a 340 nm del NADH y NADP, respectivamente, utilizando un coeficiente de extinción molar de $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La actividad PEP carboxilasa se determinó por el método de **Kluge y Osmond (1972)** en 1 ml de medio de reacción conteniendo 50 mM Hepes-NaOH, pH 8.0, 5 mM MgCl_2 , 2 mM NaHCO_3 , 3 UI NAD-malato deshidrogenasa y 0.12 mM NADH y 2 mM PEP. La actividad del enzima málico se efectuó por el método de **Granien-Dardart y Queiroz (1974)**, en un medio de reacción conteniendo 50 mM Hepes-NaOH, pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 0.25 mM NADP, iniciándose la reacción con 3 mM malato.

C.3. Actividades enzimáticas asociadas a membranas intracelulares

C.3.1. Obtención de microsomas

La **figura 14** muestra el proceso seguido en el aislamiento de fracciones de membranas, el cual se llevó a cabo a 4 °C. Entre 50-100 g de peso fresco de tejido y lavaron con agua desionizada, secándose por centrifugación manual entre papeles de filtro con secadora de verduras. Los diferentes tejidos se trocearon y se homogeneizaron en Sorvall Omnimixer con un medio de homogenización (1:2, peso fresco/volumen) tamponado a pH 8.0 con ácido sulfúrico, conteniendo 25 mM BTP, 0.2 % (p/v) BSA, 250 mM manitol, 2 mM MgCl_2 , 2 mM de EGTA-BTP, pH 7.5, 10 % (v/v) glicerol, 2.5 % (p/v) PVP-40, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, y 5 mM de metabisulfito sódico. El homogenado se filtró a través de 6 capas de gasa, y el extracto obtenido se centrifugó a 12 000 g durante 15 minutos, (centrífuga Sorvall, rotor SS34). El sobrenadante se centrifugó durante 45 minutos a 100 000 g (centrífuga Beckman, rotor 60Ti). En los experimentos iniciales de caracterización de las fracciones de membrana, la mitad del sedimento obtenido se resuspendió en 2 ml de tampón de partición, para el aislamiento del plasmalema por partición de fases, y que contenía 330 mM sacarosa, 5 mM fosfato potásico, pH 7.8, y 0.1 mM PMSF. La otra mitad se resuspendió en 2-4 ml de tampón de resuspensión, para aislamiento de tonoplasto,

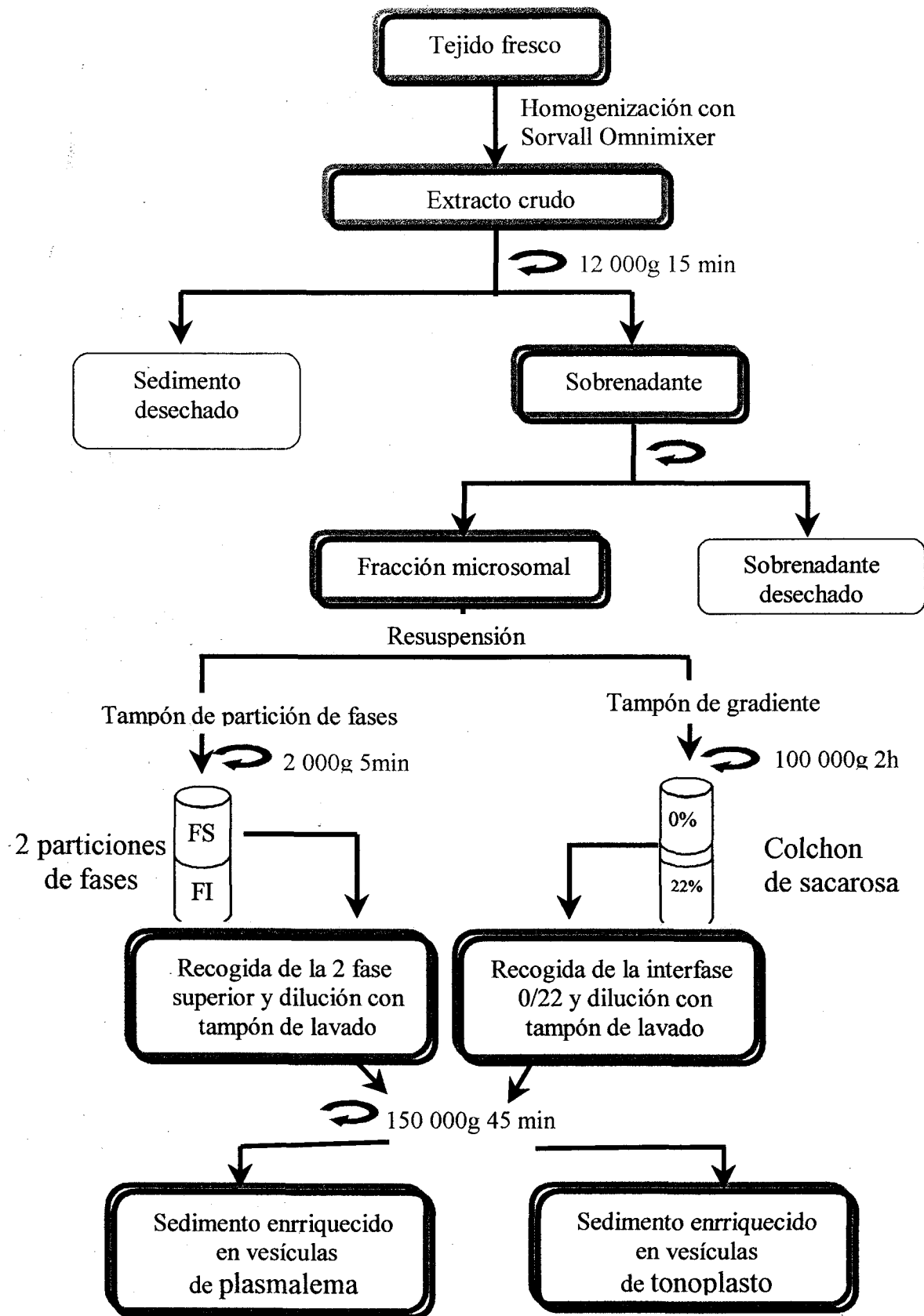


Figura 14. Aislamiento de fracciones enriquecidas en plasmalema y tonoplasto de tejidos de tomate.

y que contenía, 250 mM manitol 10 % (v/v) glicerol, 2 mM BTP-MES, pH 7.5, 1 mM de EGTA-BTP, pH 7.5, 2 mM DTT, y 0.1 mM PMSF. En experimentos posteriores, la preparación microsomal se utilizó bien para el aislamiento de vesículas de tonoplasto o para las de plasmalema. Estas preparaciones microsomales se usaron inmediatamente o se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -70 °C, para su uso posterior.

C.3.2. Purificación de vesículas de plasmalema

La purificación de plasmalema se llevó a cabo por el método de partición de fases en sistemas de dos polímeros acuosos de PEG y dextrano, utilizando los protocolos descritos por **Wilson y col. (1994)** para hojas y tallos, y por **Buckhout y col. 1988** para raíz.

Dos particiones conteniendo 20 g de fase fueron suficientes para purificar las vesículas de plasmalema de raíz, hojas y tallos. Para la raíz, los tubos de partición contenían 6.4 % (p/p) Dextrano T500 (Pharmacia), 6.4 % (p/p) PEG 3350 (Sigma Química), 2 mM KCl, 330 mM sacarosa, 5 mM tampón fosfato potásico, pH 7.8. Para la hoja y tallo, el medio de partición de membranas contuvo los mismos componentes, pero a diferentes concentraciones: 6.2 % de Dextrano, 6.2 % de PEG y 2.25 mM KCl. Tras la adición al primer tubo de partición de 2 ml de membranas microsomales resuspendidas en tampón de partición, las fases se mezclaron vigorosamente por 40 inversiones del tubo y se separaron por centrifugación a 2 000 g durante 5 minutos en rotor basculante (centrífuga de mesa, Martin Christ). La fase superior de PEG resultante se añadió a nueva fase inferior de dextrano del segundo tubo de partición, procediéndose de la misma manera. La nueva fase superior obtenida, conteniendo las vesículas de membrana enriquecidas en plasmalema, se diluyó con tampón de lavado que contenía 250 mM manitol, 2 mM BTP-MES, pH 7.5, 1 mM EGTA-BTP pH 7.5, 2 mM DTT y 0.1 mM PMSF, sedimentándose por centrifugación a 150 000 g durante 45 minutos (centrífuga Beckman, rotor 60Ti). El sedimento enriquecido en plasmalema se resuspendió en tampón de resuspensión que contenía 50 µg ml⁻¹ de quimostatina, añadiéndose 0.2 % (p/v) BSA, una vez tomadas las alícuotas

para la determinación de su contenido proteico. Las membranas se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron en alícuotas de 20 µl a -70 °C para su uso posterior.

C.3.3. Purificación de vesículas de tonoplasto

Unos 4 ml de membranas microsomales en tampón de resuspensión se depositaron sobre un gradiente discontinuo de sacarosa formado por dos capas de 9 ml de 22 y 34 % (p/p) sacarosa preparadas en tampón de gradiente, que contenía 250 mM manitol, 2 mM BTP-MES, pH 8.0, 1 mM EGTA-BTP, pH 8.0, 0.1 mM PMSF y 2 mM DTT, y se centrifugó a 97 000 g durante 2 horas en rotor basculante SW28 (centrífuga Beckman).

Las fracciones de membrana de las interfases 0/22 y 22/34 del gradiente se recogieron con una jeringa de cristal, pinchando lateralmente el tubo de centrifuga (tipo Ultraclear, Beckman) y se diluyeron 10 veces en tampón de lavado, sedimentándose por centrifugación en rotor 60 Ti a 150 000 g durante 45 minutos. Los sedimentos obtenidos se resuspendieron en tampón de resuspensión y, se les añadió 0.2 % (p/v) BSA, una vez tomadas muestras para la determinación de proteínas, almacenándose en alícuotas a -70 °C, tras congelarlas en N₂ líquido.

En experimentos posteriores de aislamiento de tonoplasto, se modificó el protocolo de purificación. Para ello se llevó a cabo una primera centrifugación a 10 000 g durante 20 minutos y los microsomas, obtenidos a 100 000 g durante 45 minutos, se resuspendieron en un volumen de 2 ml de tampón de gradiente, que se depositaron en un tubo de centrifuga de policarbonato, y se cargó por debajo un colchón de 15 ml de 22 % (p/p) sacarosa en tampón de gradiente, centrifugándose a 97 000 g durante 2 horas en rotor basculante SW 28. La interfase de 0/22 enriquecida en vesículas de tonoplasto se recogió directamente del tubo con una jeringa, y tras su dilución en tampón de lavado, se sedimentó a 150 000g durante 45 minutos en rotor 60 Ti. El sedimento obtenido se resuspendió en tampón de resuspensión con 0.2 % (p/v) BSA añadido posteriormente a la toma de muestras para determinación de proteínas, almacenándose en alícuotas a - 70 °C, tras su congelación en N₂ líquido.

C.3.4. Determinación de proteínas

Las proteínas de membranas se cuantificaron por el método de **Bradford (1976)**, modificado por **Gogstad y Krutnes (1982)**, consistente en la adición de 0.1 % (v/v) Triton X-100, para solubilizar las proteínas, empleándose el reactivo de color concentrado de Bio-Rad, diluido 4 veces, y BSA como patrón.

C.3.5. Actividades fosfohidrolasas

La determinación de las actividades fosfohidrolíticas a nivel de las membranas aisladas se basó en la medida de Pi liberado en la hidrólisis del sustrato (ATP, PPi, UDP, etc.) (**Ames 1966**). La reacción se inició con la adición de una alícuota de la suspensión de membranas (8 µg de proteínas microsomales ó 4 µg de las fracciones enriquecidas en plasmalema y tonoplasto) a 500 µl de medio de reacción. Tras 30-45 minutos de incubación a 26 °C, la reacción se paralizó con el reactivo de Ames (10 % ácido ascórbico-0.42 % (NH₄)Mo₇O₂₄ en 1 N H₂SO₄, 1/5, v/v), suplementado con 0.75% (p/v) SDS. Las correspondientes actividades enzimáticas se determinaron espectrofotométricamente a 820 nm (espectrofotómetro Shimadzu, mod.160), frente a una curva patrón de KH₂PO₄ expresándose la actividad específica en µmol Pi mg⁻¹ proteína h⁻¹.

C.3.5.1. Actividad ATPasa

En la **Tabla 7** se muestran los medios de reacción diferenciales utilizados para la determinación de las actividades ATPásicas asociadas a plasmalema, tonoplasto o membranas mitocondrial.

La orientación de las vesículas, natural o invertida, derivada del proceso de extracción, se calculó mediante el análisis de la latencia de las actividades ATPásicas, utilizando como agente permeabilizante de las membranas el detergente Brij 58 a las concentraciones indicadas en la **Tabla 7**. La actividad latente se define como la diferencia entre las actividades medidas en presencia y

ausencia de Brij 58, y la latencia de las vesículas, como la actividad latente expresada en porcentaje de actividad ATPasa en presencia de Brij 58:

$$\% \text{ Latencia} = \frac{\text{Actividad (+Brij)} - \text{Actividad (- Brij)} \times 100}{\text{Actividad (+Brij)}}$$

Las actividades específicas medidas en presencia y ausencia de detergente, se definieron, asimismo, como la actividad específica total y basal respectivamente.

Tabla 7. Medios de reacción específicos para la determinación de las actividades fosfohidrolíticas correspondientes a las actividades H⁺-ATPasa de plasmalema, tonoplasto y mitocondria. No se incluyen los inhibidores específicos para cada ATPasa (ver texto).

	Plasmalema	Tonoplasto	Mitocondria
pH	6.5	7.5	8.0
BTP-MES (mM)	25	25	25
Na ₂ MoO ₄ (μM)	100	100	100
ATP-BTP/MgSO ₄ (mM)	3	1.5	3
Brij 58 (μg ml ⁻¹)	100	10	10
NaN ₃ (mM)	2	2	-
KNO ₃ (mM)	100	-	-
KCl (mM)	100	-	100

-Actividad ATPasa de plasmalema: definida como la actividad enzimática sensible a vanadato e insensible a nitrato, azida y molibdato (Galtier y col. 1988), se determinó como la diferencia de actividad en presencia y ausencia de 250 μM Na₃VO₄ en el medio específico de reacción.

$$\Delta \text{ Va-ATPasa} = \text{Actividad (+NO}_3^- + \text{N}_3^- + \text{Mo)} - \text{Actividad (+NO}_3^- + \text{N}_3^- + \text{Mo} + \text{VO}_4^{3-})$$

-Actividad ATPasa de tonoplasto: definida como la ATPasa sensible a bafilomicina o nitrato, e insensible a azida u oligomicina y molibdato (O'Neill y col. 1983) (White 1994), se calculó como la diferencia de actividad en presencia y en ausencia de 2 nM de bafilomicina ó 100 mM KNO₃ en el medio específico de reacción.

$$\Delta\text{Baf-ATPasa} = \text{Actividad (-Baf)} - \text{Actividad (+Baf)}$$

$$\Delta\text{NO}_3^- \text{-ATPasa} = \text{Actividad (+N}_3^- + \text{KCl)} - \text{Actividad (+N}_3^- + \text{KNO}_3)$$

-Actividad ATPasa de mitocondria: definida como la actividad ATPasa sensible a azida u oligomicina (Galtier y col. 1988), se determinó como la diferencia de actividad en presencia o ausencia de 2 mM NaN₃ ó 10 µg ml⁻¹ oligomicina en el medio específico de reacción.

$$\Delta\text{N}_3 \text{-ATPasa} = \text{Actividad (-N}_3) - \text{Actividad (+N}_3)$$

C.3.5.2. Actividad PPasa de tonoplasto

Se define como la actividad PPasa estimulada por K⁺ (Wang y col. 1986). Para su determinación, las membranas se incubaron en un medio que contenía 25 mM BTP-MES, pH 7.5, 100 µM Na₂MoO₄, 2 mM NaN₃, 1 mM MgSO₄, 0.3 mM PPI, 10 µg ml⁻¹ Brij y 250 µM VO₄³⁻ ± 100 mM KNO₃, definiéndose como la diferencia de actividad en presencia y ausencia de 100 mM KNO₃.

C.3.5.3. Actividad UDPasa latente

La actividad UDPasa latente, utilizada como un marcador del aparato de Golgi (Green 1983), se ensayó en un medio de reacción conteniendo 30 mM BTP-MES, pH 6.5, 3 mM MnCl₂, 3 mM UDP, definiéndose como la diferencia de actividad en presencia y ausencia de 0.1 % de Triton X-100.

C.3.6. Actividad NADH cit c reductasa insensible a antimicina A

Esta actividad enzimática, determinada por el método de **Hodges y Leonard (1974)**, permite cuantificar la contaminación por RE en las fracciones de membrana correspondientes a plasmalema y tonoplasto. Para su medida, se adicionaron 30 μg de proteínas de membrana a un medio de reacción conteniendo 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.5, 1.66 mM KCN, 30 μM citocromo c oxidasa y 1 μM antimicina A. La reacción se inició con la adición al medio de 100 μM NADH, midiéndose el incremento de absorbancia a 550 nm, debido a la reducción del citocromo c exógeno. La utilización de un coeficiente de extinción molar de 18.5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ permite expresar la actividad enzimática en $\mu\text{moles de citocromo c reducido mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$.

C.3.7. Determinación del transporte de H^+ en vesículas de membranas

C.3.7.1. Fundamento de la medida

La detección de la actividad translocadora de H^+ asociada a la actividad fosfohidrolítica de las vesículas, permitió caracterizar, de una forma mas completa, los enzimas transportadores de H^+ en función del tratamiento salino.

La determinación se basa en la medida de la velocidad inicial de extinción de fluorescencia de una sonda de pH, al unirse a los H^+ en el interior de las vesículas (**Bennett y Spanswick 1983**). En este trabajo se ha hecho fundamentalmente uso del ACMA, al ser esta sonda más sensible a pequeños cambios intravesiculares de pH (**Burgos y Donaire 1996, Rottenberg y Moreno-Sánchez 1993**), aunque también se ha utilizado la naranja de acridina y quinacrina.

La extinción de la emisión de fluorescencia de las diferentes sondas, se midió usando un espectrofluorímetro Shimadzu, modelo RF 540, provisto de sistema de agitación magnética y termostatación, en el que se fijaron las siguientes condiciones: para el ACMA, λ_{exc} 415 nm, λ_{em} 485 nm (longitudes de onda a las cuales se obtuvieron las fluorescencias máximas de emisión y

excitación, en los espectros respectivos, llevados a cabo con la sonda disuelta en DMSO), y sendas rendijas de 10 nm. Para la naranja de acridina, una λ_{exc} 495, con una rendija de 2 nm y λ_{em} 520 nm, con una rendija de 5 nm. Para la quinacrina, una λ_{exc} 423 nm y λ_{em} 500 nm, con 10 nm para ambas rendijas.

En función del registro gráfico obtenido (Figura X), se calcularon los parámetros que definieron la actividad bombeadora de H^+ en las vesículas de membrana (**Bennett y Spanswick 1983**):

- Velocidad inicial de extinción (VQi): indica la pendiente de la curva. Es la resultante del cociente entre la emisión inicial F_0 (100 %, en unidades arbitrarias) y el tiempo (t_i) necesario para que dicha emisión se extinga por completo, a la velocidad inicial que marca dicha pendiente. VQi es expresado como $\% Q \text{ min}^{-1}$.

$$VQi = F_0/t_i$$

- Velocidad específica de extinción (VQs): velocidad inicial expresada por mg de proteína ($\% Q \text{ min}^{-1} \text{ mg Prot}^{-1}$).

$$VQs = VQi \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$$

- Extinción máxima (Qmax): indica el gradiente de pH establecido. Es la proporción de emisión extinguida (F) respecto a la emisión inicial (F_0), expresada en %.

$$Qmax = F/F_0 \times 100$$

C.3.7.2. Transporte de H^+ dependiente de ATP

La actividad transportadora de H^+ asociada a los enzimas H^+ -ATPasa de plasmalema y H^+ -ATPasa de tonoplasto, se definió como la fracción del transporte de H^+ inhibible por 250 μM vanadato y por 20 nM de bafilomicina en DMSO, respectivamente.

Las vesículas de membranas (15-50 μg proteína) se preincubaron durante 15 minutos a 26 °C en 1 ml de medio de reacción conteniendo 10 mM BTP-MES,

pH 6.5 (plasmalema) ó 7.5 (tonoplasto), 100 mM KCl, 1 μ M ACMA, 3 μ M quinacrina ó 5 μ M naranja de acridina, 1.5-3 mM ATP-BTP, 250 mM manitol, iniciándose la reacción por adición de 1.5-3 mM MgSO₄.

C.3.7.3. Transporte de H⁺ dependiente de PPI.

La actividad transportadora de H⁺ asociada al enzima H⁺-PPasa de tonoplasto estimulada por 100 mM KNO₃, se definió como la fracción del transporte de H⁺ inhibible por 100 μ M IMPD. Dicha actividad fue nula en ausencia de KNO₃. (Figura x)

Las vesículas (15-50 μ g proteína) se preincubaron durante 15 minutos a 26 °C en 1 ml de medio de reacción conteniendo 10 mM BTP-MES, pH 8, 100 mM KNO₃, 1 μ M ACMA, 250 mM manitol, 1 mM MgSO₄, iniciándose la reacción por adición de 0.3 mM PPI-BTP.

C.3.8. Medida de la actividad antiportadora Na⁺/H⁺

La detección del intercambio Na⁺/H⁺ en las vesículas aisladas se llevó a cabo midiendo la disipación por Na⁺ del gradiente de H⁺ previamente creado por la acción del enzima H⁺-ATPasa de tonoplasto o de plasmalema, utilizando la naranja de acridina o ACMA como sondas fluorescentes (**Blumwald y col. 1987**).

La emisión de fluorescencia de las sondas naranja de acridina, disuelta en agua, o ACMA, disuelta en DMSO, se cuantificó en un espectrofluorímetro Shimadzu, modelo RF 540, en las condiciones indicadas en el apartado (IV.C.3.7.1.). La formación del gradiente de pH se llevó a cabo incubando 50 μ g de proteínas de membranas de tonoplasto en un medio conteniendo 250 mM manitol, 10 mM BTP-MES, pH 8.0, 1.5 mM ATP-BTP, pH 8.0, 100 mM TMA-Cl, 5 μ M de naranja de acridina ó 1 μ M ACMA, 0.25 μ M valinomicina, 50 mM K-IDA, pH 8.0, iniciándose la reacción por adición de 1.5 mM MgSO₄ (**Figura 15 trazo a**). En estas condiciones, el enzima H⁺-ATPasa de tonoplasto o de plasmalema, en presencia de Mg-ATP, Cl⁻ y K⁺, provocó la extinción gradual de la fluorescencia de la sonda, lo que indicaba la formación de un gradiente de pH

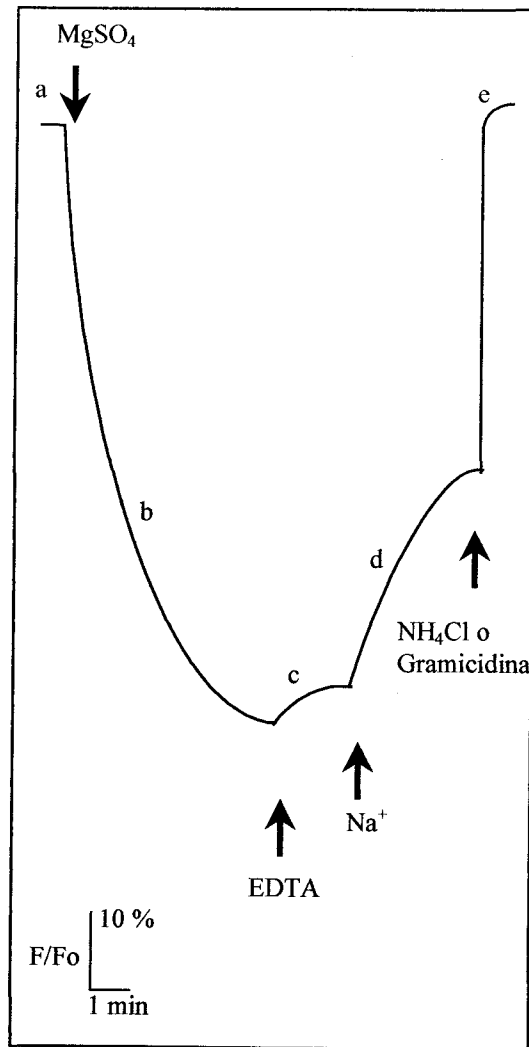


Figura15. Registro representativo obtenido por espectrofluorimetría para la determinación de la actividad antiporte Na^+/H^+ , mostrando la extinción de fluorescencia de la sonda fluorescente por la acción de la H^+ -ATPasa de tonoplasto, y la posterior recuperación de la misma, tras la adición de Na^+ al medio de reacción (trazo d). El resto de las letras indican diferentes adiciones de componentes y son detalladas en el texto.

(interior ácido). (Figura 15, trazo b). Una vez establecido el gradiente de pH, la actividad H⁺-ATPasa se paralizó, retirando el magnesio del medio, mediante la adición de 3 mM EDTA-Tris, pH 8.0, dando lugar a una pequeña recuperación de la fluorescencia de la sonda, debido a la salida de H⁺ de las vesículas por permeabilidad pasiva (Figura 15, trazo c). A continuación, la adición de Na⁺ en forma de sulfato sódico o NaIDA, provocó la recuperación de la fluorescencia a consecuencia de acumulación activa de Na⁺ asociada a un eflujo pasivo de H⁺, catalizado por el antiporte Na⁺/H⁺ (Figura 15, trazo d). Finalmente, para la recuperación del valor inicial de fluorescencia, el gradiente se disipó por la adición de 1 μM del protonóforo gramicidina (Figura 15, trazo e).

Para la cuantificación de la actividad antiporte Na⁺/H⁺ se trazó la tangente a la curva en los primeros segundos tras la adición de EDTA o sal, y se calculó la velocidad inicial de recuperación de la emisión de fluorescencia, como el resultado del cociente entre la fluorescencia recuperada por unidad de tiempo y dividido por la extinción máxima (expresada como % Q) medido una vez añadido el Na⁺, por adición de 2 μM de gramicidina, lo que permite corregir la variabilidad de la extinción máxima de las diferentes muestras. La actividad antiporte Na⁺/H⁺ se expresó como la diferencia entre la disipación del gradiente de protones por sodio y la permeabilidad pasiva de la membrana a los mismos.

C.3.9. Análisis electroforético e inmunoensayos

La inmunodetección de los enzimas H⁺-ATPasa de plasmalema y tonoplasto y H⁺-PPasa de tonoplasto con anticuerpos específicos se llevó a cabo según el siguiente protocolo experimental:

- Solubilización de las proteínas de membranas.
- Separación electroforética de dichas proteínas en geles de poliacrilamida con SDS.
- Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa para la inmunodetección de las proteínas con anticuerpos específicos.

C.3.9.1. Preparación de la muestra. Solubilización

Entre 60-90 μg de proteínas de microsomas, plasmalema o tonoplasto resuspendidas en tampón de conservación (apartado IV.C.3.1), se diluyeron con 1 ml del mismo tampón sin BSA, pero con 1 mM PMSF, sedimentándose en ultracentrífuga de mesa (Beckman TL-100) a 150 000 g durante 30 minutos. El sedimento obtenido se solubilizó con tampón de Laemmli conteniendo 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10 % (v/v) glicerol, 2 % (p/v) SDS, 2 % (v/v) mercaptoetanol y 0.05 % (p/v) azul de bromofenol (Laemmli 1970), suplementado con 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ quimostatina y 4 mM PMSF, como antiproteásicos. Las muestras se incubaron 20 minutos a 37 °C, para evitar agregación de polipéptidos de alto peso molecular (Gallagher y Leonard 1987) y se centrifugaron 10 minutos a 12 000 g (centrífuga Microspin 12S, Sorvall) para eliminar el material insoluble.

Los patrones de peso molecular de rango 14.4-97 kD ó 42.7-200 kD (Bio-Rad SDS-Standars), se diluyeron adecuadamente en tampón de Laemmli, y se incubaron 5 minutos a 95 °C, eliminándose el material insoluble por centrifugación.

C.3.9.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Se utilizó el equipo de Bio-Rad, Modelo Mini-ProteanTM para geles de 8 x 7 cm y 1 mm de espesor (5 cm de gel de resolución y 2 cm de empaquetamiento). Los geles se formaron según el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970). El gel de resolución se preparó utilizando 10 % (p/v) de acrilamida, con 2.67 % de entrecruzamiento (bisacrilamida), 375 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.1 % (p/v) SDS, 0.05 % (p/v) persulfato amónico y 0.05 % (v/v) TEMED. El gel de empaquetamiento contuvo un 4 % (p/v) acrilamida/bis, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 % (p/v) SDS, 0.075 % (p/v) persulfato amónico y 0.015 % (v/v) TEMED.

En cada pocillo se cargaron 20 μl de proteínas solubilizadas en tampón de Laemmli de cada una de las muestras y de los patrones de peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo en tampón de electrodo constituido por 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1 % SDS a 15 °C, y a voltaje constante de 200 V, de acuerdo

con el manual de instrucciones del fabricante (Bio-Rad) y se detuvo una vez que el frente de azul de bromofenol llegó a un cm del borde inferior del gel. Uno de los geles, se tiñó con Coomassie, para análisis del perfil proteico, y el otro, réplica exacta del anterior, se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa para proceder al inmunoensayo con anticuerpos específicos.

C.3.9.3. Tinción y secado de los geles

Para el revelado de las diferentes bandas de proteínas en los geles se utilizó la tinción de Coomassie. Los geles se fijaron y tiñeron directamente con 0.25 % (p/v) Coomassie Brilliant Blue R en metanol:ácido acético:agua (40:10:50, v/v/v), durante 1-2 horas en agitación, y se destiñeron durante 3-5 horas con metanol-ácido acético:agua (40:10:50, v/v/v).

Los geles teñidos se incubaron sucesivamente en 30 % (v/v) metanol, y posteriormente, en 3 % (v/v) glicerol, ambos durante 30 minutos a 4 °C y agitación, secándose al vacío, entre papeles de acetato de celulosa, a 80 °C durante dos horas, en un secador de geles (Bio-Rad, mod. 583 gel Dryer).

C.3.9.4. Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (*Western Blotting*)

Finalizado el desarrollo electroforético, las proteínas se electrotransfirieron de los geles a membranas de nitrocelulosa (0.45 µm de tamaño de poro, Bio-Rad), siguiendo esencialmente el método de Towbin y col. (1979), descrito en los manuales de instrucción de los sistemas de transferencia (Bio-Rad).

Los geles a transferir, membranas de nitrocelulosa, papeles de filtro, y demás componentes del *sandwich* de transferencia, se incubaron en el tampón de transferencia constituido por 0.01 M CAPS, pH 11.0 y 10 % (v/v) metanol. La electrotransferencia se llevó a cabo en el sistema Mini Trans-Blot™ de Bio-Rad, termostatzado con su unidad de enfriamiento, a voltaje constante de 100 V, durante 2 horas.

Finalizada la transferencia, y tras un breve lavado con agua destilada, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron reversiblemente con Ponceau S (0.1 % (p/v) en 1 % (v/v) ácido acético), para visualizar y señalar los patrones de peso molecular. Las membranas, lavadas con agua destilada para eliminar el colorante, se procesaron inmediatamente para inmunoensayo. Para evaluar la eficacia de la transferencia, el gel electrotransferido se tiñó con Coomassie.

C.3.9.5. Inmunodetección de la H⁺-ATPasa de plasmalema y de la H⁺-ATPasa y H⁺-PPasa de tonoplasto.

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas electroforéticamente, se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente con medio TBSL, conteniendo 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl y 0.2 % (p/v) leche en polvo desnatada, para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana de nitrocelulosa.

La detección de proteína antigénica correspondiente a los enzimas ATPasa de la membrana plasmática y ATPasa y PPasa del tonoplasto, se llevó a cabo incubando durante 12-15 horas en agitación a 4 °C, con anticuerpos policlonales de conejo obtenidos frente a los siguientes polipéptidos:

- Las subunidades de 58 kD (B) y 72 kD (A) de la ATPasa de tonoplasto de remolacha, ambas a una dilución de 1:600 en TBSL. Los anticuerpos, obtenidos según describen **Dupont y col. (1988)**, fueron un regalo del Dr. Alan Bennett, Universidad de California, Davis, USA.
- PPasa de *Vigna radiata*, a una dilución 1:200 en TBSL. Los anticuerpos, obtenidos según describe **Maeshima (1992)**, fueron un regalo del Dr. Masayoshi Maeshima, Universidad de Nagoya, Japón.
- Proteína de fusión expresada en *E. coli*, conteniendo el extremo carboxilo terminal (aminoácidos, 851-949) de la ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis thaliana*, a una dilución de 1:700 en TBSL. Los anticuerpos, obtenidos según describen **Parets-Soler y col. (1990)**, fueron un regalo del Dr. Ramón Serrano, Universidad Politécnica de Valencia.

Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos, cada vez con TBSL, para eliminar tanto exceso de anticuerpo no fijado como el fijado de forma inespecífica.

Para revelar las bandas correspondientes al anticuerpo primario fijado a la proteína, las membranas se incubaron durante 3 horas con anticuerpo secundario, constituido por anticuerpos de cabra contra Inmunoglobina G de conejo, ligada a la fosfatasa alcalina (Promega), diluida 1:5000 en TBSL. Tras un doble lavado con TBSL, para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, y un lavado rápido con el tampón de la fosfatasa alcalina (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, el revelado de la reacción de la fosfatasa alcalina se llevó a cabo añadiendo los sustratos cromogénicos BCIP (33 µg ml⁻¹) y NBT (16.5 µg ml⁻¹) en el tampón correspondiente, desarrollándose el color a la oscuridad y a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por lavados con agua destilada, y la membrana se secó y registró con la ayuda de un *Gel Printer* (Gelstation, TDI).

Las cantidades relativas de proteína antigénica de las membranas de nitrocelulosa se determinaron por densitometría mediante la absorbancia a 535 nm de la luz reflejada tras el barrido del centro de la banda con un rayo de luz de 0.2 x 1 mm (densitómetro Shimadzu mod. CS-9000).

D. DETERMINACION DE LA EXPRESION DE PROTEINAS DE TONOPLASTO

Los niveles de expresión de los genes que codifican para las proteínas que se mencionan a continuación, se determinaron previo aislamiento del ARN total de raíces, tallos y hojas de plantas controles y tratadas con sal de las dos especies de tomate sometidas a estudio, e hibridación en *Northern-blot*, utilizando las siguientes sondas homólogas de ADNc:

- Fragmento de ADNc de 0.55 kb, correspondiente la pirofosfatasa vacuolar de tomate, obtenido por RT-PCR y clonado por extremos cohesivos en el plásmido pGEM-T (obtenido en este trabajo, apartado IV.D.2.).
- Fragmento de ADNc de 0.77 kb, correspondiente a la subunidad A (70 kD) de la V-H⁺-ATPasa vacuolar de tomate, obtenido por PCR a partir de una

genoteca de pelos radiculares de raíces de tomate, construida en el vector fagémido λ ZAP II (Stratagene) (Bucher y col. 1997), y posteriormente clonado en el sitio EcoRV del plásmido pSTBlue-1 (obtenido en este trabajo, apartado IV.D.3.).

- Fragmento de ADNc de 0.5 kb que codifica al ARN ribosómico 18S de raíces de tomate, clonado en el plásmido pCRII (N. Ferrol, resultados no publicados), regalo de la Dra. Nuria Ferrol (EEZ, CSIC, Granada), y que fue usado como control de expresión y carga.

D.1. Extracción de ARN total de los tejidos de tomate

La extracción de ARN total de tejidos de tomate de hoja joven, hoja adulta, tallo y raíz, previamente congelados en N₂ líquido y almacenado a - 70 °C, se llevó a cabo por el método de Logemann y col. (1987).

Los tejidos se homogeneizaron en mortero de porcelana con con N₂ líquido hasta la obtención de un polvo fino. El pulverizado de la muestra obtenido se pasó a un tubo Rohrer de 13 ml y se le añadió 0.5 ml de tampón de extracción por gramo de peso fresco, conteniendo 8 M hidrocloreuro de guanidina, 20 mM MES, pH 7.0, 20 mM EDTA, 50 mM β -mercaptoetanol y 0.5 ml por gramo de peso fresco de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), agitándose vigorosamente durante 15 minutos. El homogenado resultante se centrifugó a 15 000 g durante 15 minutos (centrifuga Sorvall, rotor SS-34) y la fase superior acuosa se transfirió a un nuevo tubo Rohrer, al cual se le añadió 700 μ l de etanol absoluto por gramo de peso fresco en presencia de 200 μ l 1 M ácido acético, para la precipitación selectiva de ARN total, incubándose durante 1 hora a -20 °C. La mezcla se centrifugó en rotor SS34 durante 15 minutos a 15 000 g, y el sedimento obtenido se lavó 2 veces con 1 ml 3 M acetato potásico, pH 5.2, para disolver los polisacáridos contaminantes, centrifugándose a continuación durante 10 minutos a 15 000 g. Tras la eliminación del sobrenadante, el sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 70 % en agua-DEPC mediante agitación durante 5 minutos, centrifugándose a 15 000 g. El sedimento conteniendo el ARN total se secó por centrifugación a vacío en *speed vacuum*, para eliminar la traza de etanol, y se

disolvió finalmente en un volumen reducido de agua-DEPC por calentamiento a 56 °C, y almacenándose a -70 °C hasta su uso posterior.

La cuantificación y determinación del grado de pureza del ARN se realizó mediante el registro del espectro de absorbancia entre 230 y 320 nm (espectrofotómetro Shimadzu, mod. UV 160) en una alícuota de la preparación final diluida 100 veces, teniendo en cuenta que la $A_{260}=1$ corresponde a una concentración de 40 µg ARN total por ml. Todas las preparaciones de ARN tuvieron una razón A_{260}/A_{280} superior a 1.8 y A_{260}/A_{230} superior a 2.0, indicando mínima contaminación por proteínas y polisacáridos, respectivamente.

D.2. Obtención de un fragmento de ADNc correspondiente a la V-PPasa de tomate por RT-PCR

D.2.1. Transcripción inversa del ARN

La primera hebra de ADNc se sintetizó a partir del ARN total extraído de hojas, tallos y raíces de tomate, utilizando como cebador el oligonucleótido (dT)₂₃ anclado (en la que la presencia de un residuo de G, C o A asegura su ligamiento muy al comienzo de la cola de poli-A de cada ARNm presente en el ARN total) y el enzima transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis de ave (AMV-RT) (Sigma).

Previo a la reacción de RT, se incubó durante 10 minutos a 80 °C, 1 µg de ARN total, previamente desnaturalizado a 90 °C durante 5 minutos, en presencia de 0.5 mM de cada uno de los dNTPs y 3.5 µM oligo (dT)₂₃. Tras un breve enfriamiento en hielo, se añadió tampón 1 x de AMV-RT (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 40 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 1 mM DTT), 0.25 U µl⁻¹ inhibidor de RNasas y 0.5 U µl⁻¹ AMV-RT, en un volumen total de 20 µl. La reacción se llevó a cabo primeramente a 25 °C durante 15 minutos y después a 42 °C durante otros 50 minutos, deteniéndose por calentamiento a 95 °C durante 10 minutos.

D.2.2. Amplificación por PCR

La población de primeras hebras de ADNc obtenida por transcripción inversa se usó como molde para la amplificación por PCR de un fragmento de 0.55 kb que codifica a la V-PPasa vacuolar, usando como cebadores dos oligonucleótidos sintéticos degenerados diseñados a partir de regiones conservadas de PPasas de plantas superiores y de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (J. R. Pérez Castiñeira, M. Losada y A. Serrano, **resultados no publicados**), regalo del Dr. Aurelio Serrano (IBVF, CSIC, Sevilla).

El medio de reacción de PCR (50 μ l) incluía 2 μ l de la reacción de transcripción inversa, tampón de PCR 1x (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.05 % -p/v- gelatina), 200 μ M de cada uno de los dNTPs, 1 μ M de cebadores específicos y 2.5 U de Taq ADN polimerasa. El protocolo de amplificación consistió en 5 minutos a 95 °C (una vez), 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 42 °C, 1 minuto a 72 °C (35 ciclos), y 7 minutos 72 °C (una vez). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer, modelo 2400.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 0.7 % con TBE 0.5 x (45 mM Tris, pH 7.6, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA) conteniendo 0.5 μ g ml⁻¹ de bromuro de etidio. Las bandas del tamaño esperado se cortaron y se aislaron del gel exprimiendo las piezas de agarosa, previamente congeladas a - 20 °C, en una jeringa estéril. El ADNc eluído se extrajo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) se precipitó mediante la adición de 2.5 volúmenes de EtOH y 0.1 volúmenes de 3 M NaAc, pH5.2 (Sambrook y col. 1989).

D.2.3. Clonaje del producto de PCR

El fragmento de ADN de 0.55 kb purificado se ligó al vector plasmídico pGEM[®]-T por extremos cohesivos de Adenina, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega). Brevemente, 15 ng de fragmente purificado se mezcló con 0.5 µl de vector pGEM[®]-T (25 ng), 1 µl de tampón T4 ADN ligasa y 0.5 µl de T4 ADN ligasa (1 U µl⁻¹), transcurriendo la reacción durante 3 horas a 14 °C.

Los productos de la ligación se utilizaron para transformar células de *E. Coli* JM109 altamente competentes incluidas en el *kit* de clonaje (genotipo: recA1, EndA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_{k12}⁻m_{k12}⁺), relA1, supE44, Δ(lac -proAB), [F', tra D36, proA⁺B⁺, lac^qZΔM15]). Para ello, 10 µl de la reacción de ligación se mezcló con 100 µl de células competentes JM109, manteniéndose en hielo durante 30 minutos. Tras un choque térmico de 42 °C durante 2 minutos y 1 minuto adicional en hielo, se añadieron 200 µl de medio LB (1 % -p/v- triptona, 0.5 % -p/v- extracto de levadura, 1 % -p/v- NaCl y 1.5 % -p/v- bacterio agar), incubándose en agitación durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, las células se extendieron en placas Petri con medio LB conteniendo 50 µg ml⁻¹ ampicilina, para la selección de colonias con células transformantes, y se incubaron durante 16 horas a 37 °C.

Previo al aislamiento del ADN plasmídico, la presencia del inserto apropiado en diferentes colonias se escrutó por PCR directa de las mismas, picando con un palillo de madera estéril 15 a 20 colonias independientes y poniéndolas en un tubo con 50 µl de agua estéril (haciéndose replicas de cada colonia tomada tocando con el palillo una placa fresca previa a su transferencia al tubo). Tras el calentamiento de los tubos a 100 °C, para lisar las células y desnaturalizar las DNAsas, el extracto se centrifugó a 12 000g durante 1 minuto, utilizándose 10 µl de sobrenadante como molde para la reacción de PCR (50 µl) que contenía 200 µM de la mezcla de dNTPs, tampón 1 x PCR, 2.5 U de Taq ADN polimerasa y 0.2 µM de cebadores universales (complementarios a las secuencias que flanquean el sitio de multiclonaje de los plásmidos derivados de la

serie M13, p1, cebador inverso M13, 16-mer, 5'-AACAGCTATGACCATG-3', p2, cebador M13, 17-mer, 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'). El protocolo de amplificación consistió en 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C y 2 minutos a 72 °C, con una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Las colonias positivas en cuanto a la presencia de inserto del tamaño esperado se seleccionaron para el aislamiento de ADN plasmídico en formato *miniprep* (apartado IV.D.4.).

D.3. Obtención de un fragmento de ADNc correspondiente a la subunidad A de la V-ATPasa de tomate a partir de una genoteca de ADNc de pelos radiculares de tomate

D.3.1. Extracción de ADN de fago.

Para la clonación del gen que codifica a la subunidad A (70 kD) de la V-ATPasa vacuolar de tomate, se ha usado una genoteca de ADNc de pelos radiculares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Moneymaker) construida en el sitio Eco RI del vector fagémido λ ZAP II (Stratagene) (Bucher y col. 1997), con una titulación de 10^8 pfu ml⁻¹.

En placas Petri de 135 mm, entre 1 a 2×10^5 halos de lisis establecidos con la cepa bacteriana de *E. coli* XL1-Blue MRF['] en *top-agar* (0.6 % agarosa) sobre medio LB, se eluyeron con TM (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 10 mM MgSO₄) y el ADN se extrajo siguiendo protocolos habituales de Biología Molecular (Sambrook y col. 1989). Brevemente, el fago eluído en TM se trató con 10 μ g ml⁻¹ DNasa y RNasa durante 30 minutos a 37 °C. Tras 10 minutos en hielo, se mezcló con un volumen de (NH₄)₂SO₄ saturado frío y se mantuvo 20 minutos más en hielo. Después de centrifugar a 20 000 g durante 15 minutos a 4 °C, las partículas de fago sedimentadas se resuspendieron en 4 ml de tampón de fago λ (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄ y 0.1 mg ml⁻¹ gelatina) a los que se añadieron 25 μ l de RNasa y 12.5 μ l de DNasa 10 mg ml⁻¹, incubándose a 68 °C durante 20 minutos para romper la cubierta proteica del fago. El ADN se extrajo una vez con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo, y el ADN en la fase acuosa se precipitó con 3.5 ml 7.5 M

acetato amónico y 8 ml de propanol por incubación a -20 °C durante 30 minutos. Finalmente tras centrifugar a 14 000g durante 10 minutos, el sedimento se lavó 2 veces con 70 % etanol y el ADN se resuspendió en un pequeño volumen de 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA.

D.3.2. Escrutinio de la genoteca de ADNc por PCR

El ADN de fago se usó como molde para la amplificación por PCR de un fragmento de ADNc de 0.77 Kb correspondiente a la subunidad A (catalítica) de la V-ATPasa vacuolar de tomate usando como cebadores, dos oligonucleótidos sintéticos degenerados (Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos y secuenciación, Instituto de Parasitología y Biomedicina, López Neyra, CSIC, Granada) (sentido, tom2A, 17-mer, 5'-GT(GTC)CT(CT)ATGGA(CT)TT(CT)CC-3'); antisentido, tom5A, 17 mer, 5'-AT(GA)TT(GA)CGCATCATCCA-3'), diseñados a partir de regiones conservadas (258 aminoácidos) correspondientes a las bases 866-1.639 de la región codificante de los genes de algodón (Willkins, 1993), zanahoria (Zimniak y col. 1988), tabaco (Hörtensteiner y col. 1994) y *Mesembryanthemum crystallinum* (Low y col. 1996) (Fig X).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 25 µl, que incluía además de ADN de fago, tampón de PCR 1x (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.05 % -p/v- gelatina), 200 µM de la mezcla de dNTPs, 1 µM de cebadores tom2A y tom5A y 2.5 U de Taq ADN polimerasa. El protocolo de amplificación consistió en 5 minutos a 94 °C (una vez), 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 53 °C, 2.5 minutos a 72 °C (35 ciclos) y 7 minutos a 72 °C (una vez).

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1 % con TBE 0.5x conteniendo 0.5 µg ml⁻¹ de bromuro de etidio. Las bandas del tamaño esperado (0.77 kb) se purificaron por extracción del gel de agarosa con el *kit Concert™ Gel Extraction System* (Gibco BRL)

D.3.3. Clonaje del producto de PCR

El fragmento de ADNc de 0.77 Kb purificado se subclonó en el vector plasmídico pSTBlue-1 por extremos romos en el sitio Eco RV, utilizando el *Introductory pSTBlue-1 Perfectly Blunt Cloning kit* (Novagen). En un primer paso, tuvo lugar una reacción de conversión de los extremos del producto de PCR en romos fosforilados, tomando 20 ng (1 µl) del mismo y 1 µl de mezcla de conversión de los extremos en un volumen de reacción de 10 µl. La reacción se incubó durante 15 minutos a 22 °C y se paró por calentamiento a 75 °C durante 5 minutos. Tras enfriar en hielo, la reacción de ligación al vector pSTBlue-1 tuvo lugar añadiendo a los 10 µl de la reacción de conversión, 1 µl (50 ng) de vector romo y 1 µl de T4 ADN ligasa (4U), transcurriendo la reacción a 22 °C durante 15 minutos.

Los productos de ligación se utilizaron para transformar la cepa de *E. coli*, *Nova-Blue SinglesTM Competent Cell* (genotipo: EndA1, hsdR17, (r_{k12}⁻m_{k12}⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F' proA⁺B⁺lac^qZΔM15::Tn10 (Tc^R)]), incluida en el *kit* de clonaje. Un µl de la reacción de ligación se adicionó a 50 µl de células competentes recién descongeladas en hielo. Tras 5 minutos en hielo, las células sufrieron un choque térmico de 42 °C durante 30 segundos, y entonces 2 minutos más en hielo, tras lo cual se añadió 250 µl de medio SOC (2 % -p/v- triptona, 0.5 % -p/v- extracto de levadura, 0.05 % -p/v- NaCl, 2.5 mM KCl y 20 mM de glucosa) y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Finalmente, las células se extendieron en placas de Petri con medio LB (apartado IV.D.2.3.) con 50 µg ml⁻¹ de ampicilina y 15 µg ml⁻¹ de tetraciclina, conteniendo además 60 µg ml⁻¹ de X-gal y de IPTG para el escrutinio de colonias blancas y azules, y crecieron durante 16 horas a 37 °C.

Previo al aislamiento de ADN plasmídico, la presencia del inserto apropiado en diferentes colonias se escrutó por PCR directa de las mismas (apartado IV.D.2.3.).

D.4. Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala

El aislamiento de ADN plasmídico en formato *miniprep*, grado secuenciación, se llevó a cabo utilizando métodos moleculares habituales

(Sambrook y col. 1989). De cada placa Petri, se picaron varias colonias independientes, utilizando un palillo de madera estéril, que se incubaron independientemente en tubos de ensayo que contenían 3 ml de medio LB con ampicilina, durante 16 h a 37 °C, y 200 r.p.m. de agitación. En un tubo eppendorff se depositaron alícuotas de 1.5 ml de medio de cultivo de cada tubo, recogién dose las células por sedimentación a máxima velocidad durante 10 minutos en centrífuga de mesa. A cada tubo se adicionó 0.2 ml de medio STET, conteniendo 10 % (p/v) de sacarosa, 50 mM EDTA-Tris, pH 8.0, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, y 10 % Triton X-100, incubándose durante 10 minutos con agitación, hasta la disolución de los grumos. La digestión de la pared celular tuvo lugar por adición de 1 μ l 5 % (p/v) lisozima e incubación a 95 °C durante 2 minutos, centrifugándose a máxima velocidad durante 10 minutos. Los desechos y la matriz de carbohidratos se retiraron de cada tubo con un palillo estéril de madera e inmediatamente se añadieron 2 μ l 1 % (p/v) RNasa, incubándose a 68 °C durante 10 minutos, con objeto de degradar el contenido de ARN. El ADN plasmídico se precipitó con 10 μ l de una solución de 5 % (p/v) CTAB, y 0.5 M NaCl y posterior centrifugación a máxima velocidad durante 5 minutos en centrífuga de mesa.

El sedimento resultante se resuspendió en 300 μ l 1.2 M NaCl, tras lo cual se añadió 750 μ l 90 % etanol, centrifugándose de nuevo a máxima velocidad durante 2 minutos. Tras un lavado con 700 μ l 70 % etanol, el sedimento se secó a 37 °C durante 10 minutos y se resuspendió finalmente en un volumen (20 μ l) de H₂O estéril o en TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA-Tris, pH 8.0). La concentración de ADN plasmídico se determinó en una alícuota diluida 100 veces a A₂₆₀ nm, teniendo en cuenta que 1 DO₂₆₀ equivale aproximadamente a 50 μ g ml⁻¹ o bien por comparación de la intensidad de la banda, corrida en un gel de agarosa con 0.5 μ g ml⁻¹ bromuro de etidio frente a un patrón de concentración y tamaño molecular Eco RI- Hind III del fago λ (DNA Marker III, Boehringer).

La presencia del inserto apropiado en los plásmidos utilizados se comprobó por PCR usando ADN plasmídico como molde y cebadores universales sentido y antisentido (apartado IV.D 2.3) o, alternativamente, mediante digestión con

enzimas de restricción (Boehringer) cuyos sitios flaquean el sitio de inserción (según las instrucciones dados por el fabricante para cada enzima en particular).

D.5. Secuenciación del ADN

La identificación positiva de los clones parciales correspondientes a la V-PPasa y subunidad A de la V-ATPasa vacuolar de tomate se hizo mediante secuenciación en un secuenciador automático de fluorescencia (ABI 373 XL Stretch, utilizando el *Kit* de secuenciación *ABI PRISM By DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* de PE Appleid Biosystems) llevado a cabo por el Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos y Secuenciación, Instituto de Parasitología y Biomedicina, López Neyra, CSIC, Granada. Las muestras se prepararon para su envío al servicio de secuenciación en un volumen final de 6 μ l de agua miliQ, conteniendo 500 ng de ADN plamídico o 30-90 ng de fragmento de PCR purificado y 3-2 picomoles de cebador universal específico, respectivamente, sentido o antisentido, para la secuenciación en sentidos.

El análisis informático de las secuencias de ADN obtenidos se llevó a cabo utilizando programas de uso libre en Internet (DNA Strider, Edit View, Chroma, Oligo), y las búsquedas de homologías se hizo por comparación de genes recuperados de bases de datos, principalmente, GenBank, EMBL, DDBJ y PDB, utilizando los programas FASTA (Pearson, Lipman 1988), BLAST (Altschul y col. 1997) y los alineamientos de múltiples secuencias con el programa Clustal W (Thompson y col. 1994), todos ellos disponibles en Internet o en programas integrados como Omiga o (TDI) PCGene (Intelligenetics, Mountain View CA).

D.6. Análisis de la expresión génica por hibridación Northern

D.6.1. Marcaje de las sondas de ADNc con 32 P-dCTP por cebamiento al azar

Las sondas de ADNc correspondientes a la subunidad A de la V-ATPasa, V-PPasa y 18S ribosómica de tomate, se marcaron con 5 μ l de α - 32 P dCTP (3000 Ci mmol^{-1}) durante 10 minutos a 37 °C por el método de cebamiento al azar (*random priming*) (Sambrook y col. 1989), utilizando el *kit rediprimeTMII*

(Amersham Pharmacia Biotech), según las instrucciones del fabricante. Como ADN molde para la reacción (25 ng en 45 µl de TE) con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I se utilizó, en el caso de la sub A de la V-ATPasa de tomate, el fragmento de 0.77 kb obtenido por PCR a partir de una genoteca de pelos radiculares de tomate construido en el vector λ ZAP II (Stratagene), y para la V-PPasa se utilizó el fragmento de PCR obtenido con cebadores universales p1 y p2 (apartado IV.D.2.3.) a partir del inserto de 0.55 kb clonado en pGEM-T. Por último, para el ADNc ribosómico 18S, se utilizó un fragmento de 0.5 kb liberado del plásmido pCRII con Eco RI. Previamente, todos los fragmentos mencionados se purificaron por extracción del gel de agarosa con el *kit Concert™ Gel Extraction System* (Gibco BRL), y se desnaturalizaron por calentamiento a 100 °C durante 5 minutos.

Los fragmentos marcados con ^{32}P se purificaron por centrifugación en *Mini Quick Spin™ columns* (Boehringer) que contenía Sephadex G-50, en tampón STE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

D.6.2. Separación del ARN en geles desnaturalizantes de formaldehído

Se ha seguido el protocolo descrito por Sambrook y col. (1989) con modificaciones. Muestras de RNA total (10 µg) se disolvieron en 35 µl de tampón de muestra conteniendo 6.0 % (v/v) de formaldehído, 1 x tampón MAE (20 mM MOPS, pH 7.0, 8 mM acetato sódico, 1 mM EDTA), 5 % (v/v) glicerol, 50 % (v/v) formamida desionizada, 0.04 % azul de bromofenol y 0.5 % µg ml⁻¹ bromuro de etidio, incubándose 10 minutos a 65 °C. Tras enfriar las muestras en hielo, se cargaron en un gel de agarosa al 1.25 % (p/v) en 1 x MAE, conteniendo formaldehído al 1 %, y se corrió a 7.5 V cm⁻¹, durante 2 horas, en tampón 1 x MAE.

Después de la electroforesis, el gel se lavó con agua-DEPC, entonces 2 x 20 minutos en 2 x SSC (0.3 M NaCl, 30 mM citrato sódico, pH 7.0) para eliminar el formaldehído, tras lo cual el RNA se visualizó en el gel por iluminación UV,

(fotografiándose en un *gel Printer*) para comprobar que se cargaron en el gel cantidades idénticas de ARN, y eventualmente su degradación.

D.6.3. Transferencia del ARN a filtros de membranas de nylon cargados positivamente (*Northern blot*)

El ARN se transfirió a membranas de nylon (HybondTM N⁺, 0.2 μm de poro, Amersham, Life Science) por capilaridad, para hibridación *Northern* (Sambrook y col. 1989) en 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M citrato sódico, pH 7.0), durante 12-16 horas. El sistema de transferencia se formó de abajo a arriba, y sobre un soporte de cristal, con los siguientes componentes: un trozo de papel Wathman 3 MM que comunicaba por ambos extremos en el líquido de transferencia, el gel, la membrana de nylon, un trozo de papel Wathman 3 MM (todos ellos cortados al mismo tamaño que el gel y previamente mojados en 2 x SSC), y una pila de unos 5-7 cm de servilletas de papel también cortadas al mismo tamaño del gel. Encima de todo, se colocó una placa de vidrio con un peso de 500-800 g. Finalizada la transferencia, la membrana se lavó con 2 x SSC y el ARN se fijó covalentemente a la misma en un horno de vacío a 120 °C durante 20 minutos entre piezas de papel Wathman 3 MM.

D.6.4. Condiciones de hibridación

Para la V-ATPasa se ha seguido el protocolo descrito por Thomas (1983), con modificaciones. Las membranas se prehibridaron durante 2 horas a 42 °C con 0.2 ml cm^{-2} de medio de prehibridación que contenía 50 % de formamida desionizada, 5 x SSPE (0.9 M NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 , 5 mM EDTA), 1 x solución de Denhardt, (0.02 % PVP-380, 0.02 % p/v BSA y 0.02 % p/v Ficoll), 0.2 % SDS y 0.2 mg ml^{-1} de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, en un horno de hibridación (Stuart Scientific, UK). Posteriormente, las membranas se hibridaron a 42 °C durante 12-16 horas con nueva solución de prehibridación, a la que se añadió la sonda previamente marcada (apartado IV.D.6.1.) y desnaturalizada por calentamiento a 95 °C durante

10 minutos y enfriamiento súbito en hielo. Tras el lavado del filtro con 2 x SSC, 0.5 % SDS durante 20 minutos a temperatura ambiente, las membranas sufrieron un lavado con 1 x SSC, 0.1 % SDS a 65 °C, durante 20 minutos y un lavado final de 30 minutos con 0.2 x SSC, 0.1 % SDS a 65 °C. Para la V-PPasa, la hibridación se llevó a cabo por el método del PSE (Church y Gilbert 1984), consistente en la prehibridación a 65 °C con 0.3 ml cm⁻² con medio PSE que contenía 7 % SDS, 0.3 M fosfato sódico, pH 7.2 y 1 mM EDTA. Posteriormente, las membranas se hibridaron a 65 °C durante 10-16 horas con 30 µl cm⁻² de medio PSE con sonda marcada. En este caso, los lavados (0.5 ml cm⁻²) tuvieron lugar a 65 °C con dos veces 4 x SSC, 0.1 % SDS, durante 15 minutos y una vez con 0.4 x SSC, 0.1 % SDS otros 15 minutos. Para relativizar las cantidades de ARNm con independencia de la cantidad cargada en el gel, las membranas se resondearon con ADNr 18S de tomate, marcado por el método anterior después de eliminar las sondas radioactivas de la primera hibridación por ebullición de las membranas en 0.1 % SDS.

D.6.5. Autoradiografía

Cada membrana se envolvió con papel transparente de plástico y se introdujo en un casete de autorradiografía conteniendo una película HyperfilmTM y una pantalla intensificadora (Dupont), exponiéndose 1-5 días a -70 °C.

Para el revelado de la película se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Revelado durante 0-1 minutos a 25 °C con revelador y regenerador G150 (AGFA)
- Fijación durante 10 minutos con fijador radiográfico G350 (AGFA)
- lavado final durante unos minutos con agua del grifo
- Secado de la película al aire.

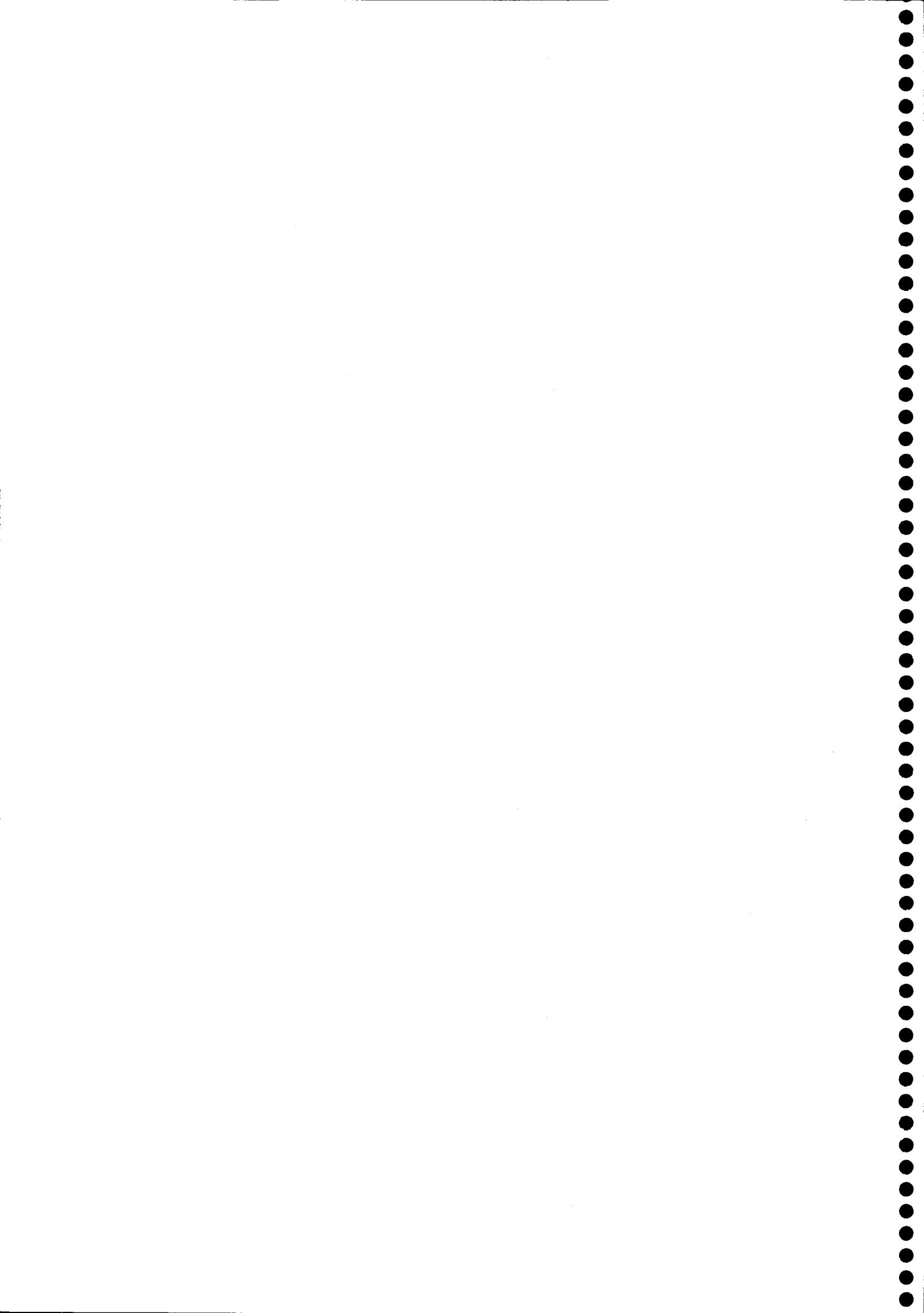
D.6.6. Cuantificación de los niveles de expresión génica

Los niveles de expresión génica se cuantificaron midiendo para cada muestra, la intensidad de la banda relativizado respecto a la intensidad de

hibridación del gen constitutivo 18S ribosomal de tomate, mediante el programa NIH image 1.6.



V. Resultados



ESTUDIOS PRELIMINARES

La Definición del modelo experimental: elección del material vegetal y condiciones de cultivo.

La mejora de la tolerancia de las plantas a la salinidad no puede avanzar sin un conocimiento adecuado de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de resistencia. En este sentido el objetivo de este trabajo ha sido la determinación del papel que juegan los sistemas de transporte membranario de iones en los mecanismos de tolerancia de tomate al estrés salino, dicho estudio requería con fines comparativos, la utilización de una misma especie de *Lycopersicon* con tolerancia diferencial a dicho estrés.

Dentro de las variedades de tomate disponible se seleccionaron las variedades *L. esculentum* var Pera y *L. pimpinellifolium* (PE-47), esta última según Cuartero y col. (1992) tiene un importante grado de tolerancia a la sal pero carece del vigor comercial de la cultivada *L. esculentum*, por lo tanto la introducción de la tolerancia de *L. pimpinellifolium* a *L. esculentum* es uno de los objetivos adoptados por los programas futuros de mejora de las plantas de tomate a la salinidad.

Se llevó a cabo un estudio preliminar para la determinación de una concentración salina que, afectando lo menos posible el crecimiento, pueda provocar cambios significativamente diferenciales de los parámetros bioquímicos en estudio. Para ello se ha realizado un seguimiento de crecimiento de las plantas de las dos variedades con distintas concentraciones salinas.

El análisis de los parámetros de crecimiento de las plantas de tomate, expresado como peso fresco y seco, mostró que el tratamiento durante 8 días con 150 mM de NaCl provocó una importante inhibición de crecimiento de las plantas de las dos variedades, con indicios de senescencia, al tiempo que la acentuada inhibición de crecimiento con 200 mM NaCl impidió que las plantas puedan sobrevivir hasta el día de la cosecha, nos llevó a elegir la concentración de 130 mM como tratamiento salino idóneo.

B. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD EN LAS VARIETADES DE TOMATE

B.1. Parámetros fisiológicos

B.1.1. Crecimiento

Para este estudio se utilizaron hojas jóvenes, hojas maduras, tallos y raíces. Las hojas jóvenes se definieron como hojas no completamente desarrolladas y localizadas entre dos a tres nudos del ápice de la planta. Las maduras fueron aquellas hojas totalmente desarrolladas, no senescentes.

El crecimiento, expresado como peso fresco y seco de diferentes tejidos de *L. esculentum* y *L. pimpinellifolium*, en función de concentraciones salinas, se muestra en las Tablas 8 y 9.

En ausencia de la salinidad *L. pimpinellifolium* presentó un mayor peso fresco y seco de la raíz y un menor crecimiento de la parte aérea. La reducción de peso fresco y seco de tallo incrementó proporcionalmente a la concentración salina con mayor significación en la variedad cultivada. A 130 mM, la reducción de pesos seco de la raíz y hoja adulta de *L. esculentum* en un 77 % y 82 % respectivamente frente al control y la no inhibición de estos en *L. pimpinellifolium*, incrementó la diferencia entre especies. Estrés severo de 150 mM de NaCl causó inhibición generalizada de todos los tejidos de ambas variedades.

Contenido hídrico

Contenido hídrico no se alteró por el tratamiento salino en las dos variedades estudiadas. Esto representó aproximadamente el 86, 90, 94 y 95 % en hoja joven, hoja adulta, tallo y raíz respectivamente (Tabla 10).

Contenido de prolina y azúcares totales

Las figuras 16 y 17 muestran los contenidos de prolina de las dos variedades de tomate, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. La concentración de prolina aumentó fuertemente en todos los tejidos estudiados de ambas variedades, siendo mayor dicho

Tabla 8. Crecimiento, expresado como gramos de peso fresco por planta, de diferentes tejidos de dos especies de tomate, *L. esculentum* var. Pera (Le) y *L. pimpinellifolium* (Lp), tratadas durante 8 días con diferentes concentraciones de NaCl. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con los parámetros determinados en triplicado. Valores entre paréntesis representan el porcentaje de peso fresco respecto al control. Letras iguales dentro de cada fila representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.

Tejido	Le (NaCl, mM)				Lp (NaCl, mM)			
	0	120	130	150	0	120	130	150
Hoja joven	0.32 b (100)	0.34 b (106)	0.28 ab (87)	0.22 a (68)	0.35 b (100)	0.36 b (103)	0.33 b (94)	0.27 ab (77)
Hoja adulta	2.84 c (100)	2.57 bc (90)	2.4 b (84)	1.46 a (51)	2.36 b (100)	2.15 b (91)	2.20 b (93)	1.54 a (65)
Tallo	7.40 d (100)	5.92 c (80)	5.36 c (72)	4.90 b (66)	5.29 c (100)	4.65 bc (88)	4.31 b (81)	3.45 a (65)
Raíz	1.28 b (100)	1.28 b (100)	0.96 a (75)	0.87 a (68)	2.19 d (100)	2.03 d (93)	2.08 d (95)	1.75 c (80)
Total	11.84 c (100)	10.11 b (85)	9.00 b (76)	7.45 a (63)	10.19 b (100)	9.19 b (90)	8.92 b (87)	7.01 a (69)

Tabla 9. Crecimiento, expresado como miligramos de peso seco por planta, de diferentes tejidos de dos especies de tomate, *L. esculentum* var. Pera (Le) y *L. pimpinellifolium* (Lp), tratadas durante 8 días con diferentes concentraciones de NaCl. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con los parámetros determinados en triplicado. Valores entre paréntesis representan el porcentaje de peso seco respecto al control. Letras iguales dentro de cada fila representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.

Tejido	Le (NaCl, mM)				Lp (NaCl, mM)			
	0	120	130	150	0	120	130	150
Hoja joven	48 b (100)	48 b (100)	39 b (81)	31 a (65)	50 b (100)	46 b (92)	42 b (84)	34 a (68)
Hoja adulta	278 c (100)	257 c (92)	228 b (82)	160 a (58)	222 b (100)	212 b (96)	211 b (95)	169 a (76)
Tallo	377 c (100)	349 bc (93)	337 b (89)	254 b (67)	333 b (100)	325 b (98)	306 b (92)	259 a (78)
Raíz	56 b (100)	57 b (102)	43 a (77)	39 a (70)	92 d (100)	91 d (99)	89 d (97)	79 c (86)
Total	759 c (100)	711 b (94)	647 b (85)	484 a (64)	697 b (100)	674 b (97)	648 b (93)	541 a (78)

Tabla 10. Contenido hídrico de diferentes tejidos de dos especies de tomate, *L. esculentum* var Pera (Le) y *L. pimpinellifolium* (Lp), tratadas durante 8 días con diferentes concentraciones de NaCl. Los resultados, expresados en porcentaje, son la media de tres experimentos independientes con los parámetros determinados en triplicado. Letras iguales dentro de cada fila representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p= 95 \%$.

Tejido	Le (NaCl, mM)				Lp (NaCl, mM)			
	0	120	130	150	0	120	130	150
Hoja joven	85.0 ^a	85.8 ^a	86.1 ^a	85.9 ^a	85.7 ^a	87.2 ^a	87.3 ^a	87.4 ^a
Hoja adulta	90.2 ^a	90.0 ^a	90.5 ^a	89.0 ^a	90.5 ^a	90.1 ^a	90.4 ^a	89.0 ^a
Tallo	94.9 ^a	94.1 ^a	93.7 ^a	94.8 ^a	93.7 ^a	93.0 ^a	92.9 ^a	92.5 ^a
Raíz	95.6 ^a	95.2 ^a	95.5 ^a	95.5 ^a	95.8 ^a	95.5 ^a	95.7 ^a	95.5 ^a

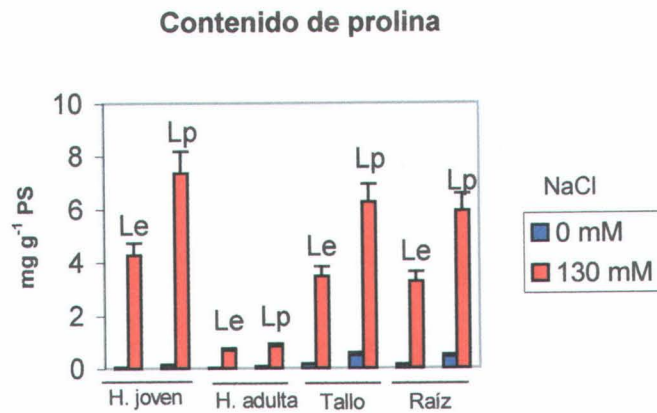


Figura 16. Contenido de prolina, expresado en mg g^{-1} PS, de diferentes tejidos de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium*, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Los resultados son la media (\pm SD) de tres experimentos independientes con parámetros determinados por triplicado.

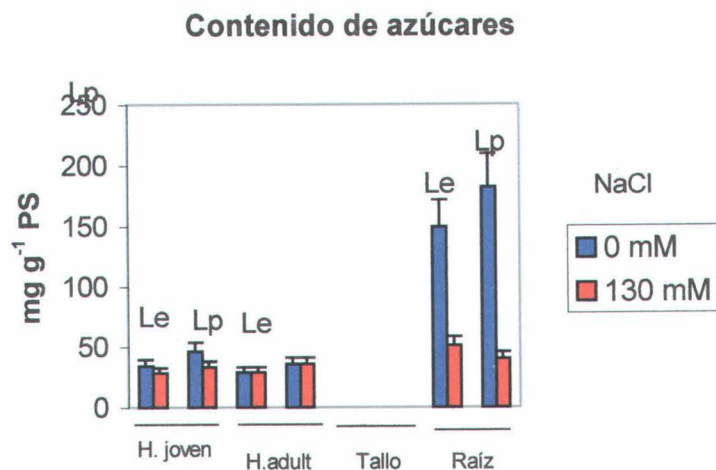


Figura 17. Contenido de azúcares, expresado en mg g^{-1} PS, de diferentes tejidos de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium*, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Los resultados son la media (\pm SD) de tres experimentos independientes con parámetros determinados por triplicado.

Tabla 11. Razón Na^+/K^+ en diferentes tejidos de especies de tomate, *L. esculentum* var. Pera (Le) y *L. pimpinellifolium* (Lp), tratadas durante 8 días con 130 mM NaCl. Los datos son la media de tres experimentos independientes. Letras iguales dentro de cada fila representan valores homogéneos según el análisis de varianza de Duncan, $p=95\%$.

Tejido	Le (NaCl, mM)		Lp (NaCl, mM)	
	0	130	0	130
Hoja joven	0.016 a	0.180 b	0.016 a	0.460 c
Hoja adulta	0.013 a	0.420 b	0.010 a	0.620 c
Tallo	0.052 a	0.660 b	0.015 a	0.590 b
Raíz	0.052 a	1.100 c	0.180 a	0.610 b
Planta entera	0.040 a	0.640 b	0.050 a	0.580 b



Aislamiento y caracterización de membranas

Los sedimentos microsomales de 10 000-100 000g de diferentes tejidos de tomate *L. esculentum* y *L. pimpinellifolium* tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl, las cuales contenían la mayoría de membranas subcelulares, principalmente vesículas de plasmalema, tonoplasto, aparte de Golgi, mitocondria y retículo endoplasmático, se fraccionaron o bien por el sistema de partición de fases las membranas de plasmalema o se cargaron en un gradiente para aislar membranas enriquecidas en vesículas de tonoplasto. Estas membranas una vez purificadas se caracterizaron con enzimas marcadores. Así la actividad ATPasa inhibida por vanadato (ΔV_a), en presencia de nitrato, azida y molibdato, se asoció a la membrana plasmática (Sze y col 1985, Galtier y col. 1988), mientras que la fracción sensible a azida (ΔN_3) se correlacionó con la fracción de membrana mitocondrial (O'Neill y col. 1983, Sze 1985). Como marcadores de tonoplasto se utilizaron la actividad ATPasa inhibida por nitrato (ΔNO_3), bafilomicina A_1 y PPasa estimulada por K^+ (ΔK^+) (Chanson 1990, White 1994). Puesto que la actividad ATPasa mitocondrial suele mostrar un importante grado de inhibición por nitrato, la actividad ΔNO_3 -ATPasa asociada a tonoplasto se ensayó en presencia de azida (O'Neill y col. 1983). Las actividades UDPasa estimulada por detergente (latente) y la NADH cit c reductasa insensible a antimicina A, fueron marcadores de las membranas de Golgi (Green 1983) y retículo endoplasmático (Hodges y Leonard 1974), respectivamente.

Caracterización de la fracción de membranas purificadas por partición de fases

Las tablas 12 y 13 muestran la distribución de marcadores enzimáticos de los distintos tipos de membranas en el sedimento microsomal de hojas y raíces de tomate *L. esculentum* y *L. pimpinellifolium*, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl, y de plasmalema obtenido tras la purificación del mismo por el sistema de partición de fases. La actividad ΔV_a -ATPasa total fue de 3 a 4 veces mayor en las membranas purificadas en dichos tejidos respecto a la fracción microsomal, mientras que

Tabla 12. Análisis de actividades enzimáticas marcadoras de la fracción de membrana aislada de la fase superior de PEG enriquecida en plasmalema (PM), obtenida por partición de fases en PEG/Dextrano a partir de microsomas (M) de *hojas* de plantas no tratadas de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium*. Las actividades específicas, expresadas en $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$, son media de tres experimentos independientes, con las actividades ensayadas por triplicado, siendo la DE menor del 10 % de la media. Valores entre paréntesis son porcentajes de los marcadores en la fase superior respecto a los obtenidos en microsomas. ^aActividades determinadas en presencia de 0.1 mg ml^{-1} LPC; ^bactividad determinada en presencia de 0.1 % Triton X-100; n.d. = no detectado.

Enzimas	<i>L. esculentum</i>		<i>L. pimpinellifolium</i>	
	M	PM	M	PM
$\Delta\text{Va-ATPasa}^{\text{a}}$	5.4	21.0 (388)	4.1	21.0 (512)
$\Delta\text{Baf-ATPasa}^{\text{a}}$	1.4	0.4 (28)	1.3	0.4 (31)
$\Delta\text{NO}_3^- \text{-ATPasa}^{\text{a}}$	1.9	1.0 (52)	1.9	n.d. (0)
$\Delta\text{N}_3 \text{-ATPasa}^{\text{a}}$	2.0	0.8 (40)	1.3	1.0 (77)
$\Delta\text{PPasa}^{\text{a}}$	4.8	2.2 (45)	2.7	1.7 (63)
UDPasa latente ^b	4.9	0.2 (4)	2.0	0.5 (25)
NADH cit c reductasa	6.0	1.0 (17)	5.5	0.8 (14)
Proteínas (mg)	53.0	2.9 (5.5)	50.0	3.1 (6.2)

Tabla 13. Análisis de actividades enzimáticas marcadoras de la fracción de membrana aislada de la fase superior de PEG enriquecida en plasmalema (PM), obtenida por partición de fases en PEG/Dextrano a partir de microsomas (M) de *raíces* de plantas no tratadas de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium*. Las actividades específicas, expresadas en $\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína h^{-1} , son media de tres experimentos independientes, con las actividades ensayadas por triplicado, siendo la DE menor del 10 % de la media. Valores entre paréntesis son porcentajes de los marcadores en la fase superior respecto a los obtenidos en microsomas. ^aActividades determinadas en presencia de 0.1 mg ml^{-1} LPC; ^bactividad determinada en presencia de 0.1 % Triton X-100; n.d. = no detectado.

Enzimas	<i>L. esculentum</i>		<i>L. pimpinellifolium</i>	
	M	PM	M	PM
$\Delta\text{Va-ATPasa}^{\text{a}}$	12.5	47.0 (376)	13.0	35.0 (269)
$\Delta\text{Baf-ATPasa}^{\text{a}}$	1.3	n.d. (0)	2.0	n.d. (0)
$\Delta\text{NO}_3^- \text{-ATPasa}^{\text{a}}$	2.8	n.d. (0)	2.6	0.5 (20)
$\Delta\text{N}_3 \text{-ATPasa}^{\text{a}}$	1.9	0.6 (31)	1.1	0.7 (60)
$\Delta\text{PPasa}^{\text{a}}$	7.8	0.6 (7)	6.0	1.0 (17)
UDPasa latente ^b	5.4	0.2 (4)	5.5	0.3 (5)
NADH cit c reductasa	8.3	1.2 (14)	10.3	1.8 (17)
Proteínas (mg)	15.0	1.2 (8.0)	16.0	1.3 (8.1)

disminuyeron notablemente las actividades enzimáticas asociadas a otros tipos de membranas. El rendimiento en vesícula de plasmalema fue del 5.5 % en las hojas y del 8 % en la raíz.

El grado de pureza de las vesículas de plasmalema purificadas por partición de fases, a partir de homogenado de raíces hojas jóvenes y hojas adultas de las variedades *L. esculentum* y *L. pimpinellifolium*, tratadas con 0 y 130 mM NaCl, se evaluó también con respecto a su actividad fosfohidrolítica total (en presencia LPC) o actividad transportadora de H^+ dependiente de ATP (en ausencia de LPC), mediante el uso de inhibidores específicos de los distintos tipos de membranas presentes en la preparación plasmalema. (Tabla R14, R15 y R16).

La actividad ATPasa global, presentaba una fuerte inhibición por vanadato (aproximadamente 100 %) en todos los tejidos estudiados, el molibdato, bafilomicina y azida, inhibidores de fosfatasa ácida, tonoplasto y mitocondria respectivamente, no presentaron efecto, mientras que lo unido a inhibición por nitrato indicaba una pequeña contaminación con membranas que no sean el tonoplasto. El transporte de H^+ se inhibió en un 60 y 50 % por vanadato en raíces y hojas respectivamente, la fuerte estimulación por nitrato de dicha actividad comparativamente con el ion cloro se atribuye a una mejor disipación del potencial positivo al interior de las vesículas generado por la H^+ -ATPasa, mientras que la inhibición del 30 % por azida indicaba una pequeña contaminación con mitocondria. Basándose sobre el efecto de inhibidores, la preparación de vesículas de membranas utilizada en este estudio es altamente enriquecida en plasmalema, con escasas contaminaciones de mitocondria. El tratamiento salino no afectó sustancialmente el efecto de los inhibidores, indicando que la fracción purificada de membrana plasmática de plantas tratadas es comparable con el control correspondiente.

La **Tabla 17** muestra el efecto de inhibidores específicos sobre las actividades ATPasica y transportadora de H^+ del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema de raíces de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium* en presencia de Brij 58. La sensibilidad de estas actividades a inhibidores fue similar que resultados mostrados en la **Tabla 16**, excepto la falta de estimulación del transporte por nitrato en presencia del detergente. Estos resultados indican que el Cl^- permite la formación de un mejor pH transmembranario a nivel de las vesículas tratadas con Brij 58 que el ion NO_3^- .

Tabla 14. Efecto de inhibidores específicos sobre las actividades ATPasa y transportadora de H^+ dependiente de ATP, correspondiente a la H^+ -ATPasa de plasmalema de *hojas jóvenes* de *L. esculentum* var. Pera (Le) y *L. pimpinellifolium* (Lp), tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las actividades control ATPásica ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína h^{-1} , entre paréntesis) y transportadora de H^+ (VQs en % Q mg^{-1} proteína min^{-1} , entre paréntesis) se ensayaron en un medio que contenía 25 mM BTP-MES, pH 6.5, 3 mM MgSO_4 , 3 mM ATP-BTP y 100 mM KCl, en presencia de 0.1 mg ml^{-1} LPC (sólo la actividad ATPásica). Los resultados, expresados en porcentaje de actividad específica respecto a la del control, son representativos de uno de dos experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado.

Inhibidores	Le (NaCl, mM)		Lp (NaCl, mM)	
	0	130	0	130
<u>ATPasa (+LPC)</u>				
Control	100 (20.2)	100 (19.5)	100 (18.3)	100 (18.0)
Na_3VO_4 (250 μM)	2	3	4	3
KNO_3 (100 mM)	82	80	78	88
Bafilomicina (20 nM)	96	99	97	100
NaN_3 (2 mM)	97	98	99	96
Na_2MoO_4 (100 μM)	92	94	94	100
<u>Transporte de H^+ (-LPC)</u>				
Control	100 (140)	100 (121)	100 (146)	100 (135)
Na_3VO_4 (250 μM)	52	53	52	56
KNO_3 (100 mM)	197	220	128	136
Bafilomicina (2 nM)	97	99	102	105
NaN_3 (2 mM)	73	77	76	75
Na_2MoO_4 (100 μM)	97	98	96	98

Tabla 15. Efecto de inhibidores específicos sobre las actividades ATPasa y transportadora de H^+ dependiente de ATP, correspondiente a la H^+ -ATPasa de plasmalema de *hojas adultas* de *L. esculentum* var. Pera (Le) y *L. pimpinellifolium* (Lp), tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las actividades control ATPásica ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína h^{-1} , entre paréntesis) y transportadora de H^+ (VQs en % Q mg^{-1} proteína min^{-1} , entre paréntesis) se ensayaron en un medio que contenía 25 mM BTP-MES, pH 6.5, 3 mM MgSO_4 , 3 mM ATP-BTP y 100 mM KCl, en presencia de 0.1 mg ml^{-1} LPC (sólo la actividad ATPásica). Los resultados, expresados en porcentaje de actividad específica respecto a la del control, son representativos de uno de dos experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado.

Inhibidores	Le (NaCl, mM)		Lp (NaCl, mM)	
	0	130	0	130
<u>ATPasa (+LPC)</u>				
Control	100 (30.1)	100 (29.5)	100 (27.3)	100 (26.5)
Na_3VO_4 (250 μM)	2	1	4	1
KNO_3 (100 mM)	95	90	90	95
Bafilomicina (20 nM)	97	91	99	98
NaN_3 (2 mM)	98	100	96	99
Na_2MoO_4 (100 μM)	96	96	94	100
<u>Transporte de H^+ (-LPC)</u>				
Control	100 (160)	100 (169)	100 (96)	100 (105)
Na_3VO_4 (250 μM)	46	50	47	49
KNO_3 (100 mM)	181	193	128	114
Bafilomicina (20 nM)	105	102	99	101
NaN_3 (2 mM)	73	77	76	75
Na_2MoO_4 (100 μM)	100	98	100	99

Tabla 16. Efecto de inhibidores específicos sobre las actividades ATPasa y transportadora de H^+ dependiente de ATP, correspondiente a la H^+ -ATPasa de plasmalema de *raíces* de *L. esculentum* var. Pera (Le) y *L. pimpinellifolium* (Lp), tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las actividades control ATPásica ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína h^{-1} , entre paréntesis) y transportadora de H^+ (VQs en % $Q \text{ mg}^{-1}$ proteína min^{-1} , entre paréntesis) se ensayaron en un medio que contenía 25 mM BTP-MES, pH 6.5, 3 mM MgSO_4 , 3 mM ATP-BTP y 100 mM KCl, en presencia de 0.1 mg ml^{-1} LPC (sólo la actividad ATPásica). Los resultados, expresados en porcentaje de actividad específica respecto a la del control, son representativos de uno de dos experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado.

Inhibidores	Le (NaCl, mM)		Lp (NaCl, mM)	
	0	130	0	130
<u>ATPasa (+LPC)</u>				
Control	100 (51.4)	100 (39.3)	100 (40.2)	100 (25.6)
Na_3VO_4 (250 μM)	1	2	4	3
KNO_3 (100 mM)	89	83	76	76
Bafilomicina (20 nM)	100	95	96	98
NaN_3 (2 mM)	99	97	96	96
Na_2MoO_4 (100 μM)	92	90	99	98
<u>Transporte de H^+ (-LPC)</u>				
Control	100 (450)	100 (470)	100 (513)	100 (535)
Na_3VO_4 (250 μM)	44	37	42	43
KNO_3 (100 mM)	157	128	166	144
Bafilomicina (20 nM)	104	106	109	97
NaN_3 (2 mM)	76	79	85	81
Na_2MoO_4 (100 μM)	99	97	98	97

Tabla 17. Efecto de inhibidores específicos sobre las actividades ATPasa y transportadora de H^+ dependiente de ATP, correspondiente a la H^+ -ATPasa de plasmalema de **raíces** de dos especies de tomate, *L. esculentum* var. Pera (Le) y *L. pimpinellifolium* (Lp), tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las actividades control ATPasa ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína h^{-1} , entre paréntesis) y transportadora de H^+ (VQs en % Q mg^{-1} proteína min^{-1} , entre paréntesis) se ensayaron en un medio que contenía 25 mM BTP-MES, pH 6.5, 3 mM MgSO_4 , 3 mM ATP-BTP y 100 mM KCl en presencia de 0.1 mg ml^{-1} (actividad ATPasa) o 0.2 mg ml^{-1} (actividad transportadora de H^+) **Brij 58**. Los resultados, expresados en porcentaje de actividad específica respecto al control, son representativos de uno de dos experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado.

Inhibidores	Le (NaCl, mM)		Lp (NaCl, mM)	
	0	130	0	130
<u>ATPasa + Brij</u>				
Control	100 (47.3)	100 (33.2)	100 (33.4)	100 (19.6)
Na_3VO_4 (250 μM)	5.5	4.5	5.5	1.7
KNO_3 (100 mM)	84	73	85	86
NaN_3 (2 mM)	102	96	104	98
Bafilomicina (20 nM)	98	96	104	99.7
Na_2MoO_4 (100 μM)	99	95	104	93
<u>Transporte de H^+ + Brij</u>				
Control	100 (6859)	100 (6502)	100 (8700)	100 (9051)
Na_3VO_4 (250 μM)	40	32	41	45
KNO_3 (100 mM)	78	76	69	58
NaN_3 (2 mM)	95	98	100	99
Bafilomicina (20 nM)	75	77	76	80
Na_2MoO_4 (100 μM)	100	99	98	97

El transporte de H^+ dependiente de ATP de plasmalema purificado de hojas jóvenes y hojas adultas es mayor en *L. esculentum*, sin embargo en la raíz el transporte es mayor en *L. pimpinellifolium*.

Latencia de las vesículas

Durante el proceso de homogeneización, las vesículas de plasmalema se orientan mayoritariamente de forma natural (cara citoplasmática orientada hacia la cara citoplasmática) "right side-out" (Palmgren 1990), la posterior purificación de la membrana plasmática por el sistema de partición de fases resulta un enriquecimiento en vesículas de orientación normal. Puesto que impermeabilidad de las vesículas de membranas a los sustratos hidrofílicos hace que la accesibilidad de éstos al centro activo de enzimas dispuestas vectorialmente en la membrana, depende de la orientación de las mismas. Así la determinación de la actividad total de los enzimas marcadores asociados a membranas requiere el uso de detergentes Brij 58 o LPC que permiten revelar la actividad enzimática latente.

Para comprobar el efecto de estos detergentes sobre la actividad del enzima marcador de plasmalema, se determinaron, en función de la concentración de Brij 58 y LPC, la actividad fosfohidrolítica ATPasa de vesículas de plasmalema purificados de raíces de tomate *L. esculentum* var Pera (figura 19). Los resultados indicaron que la estimulación de dicha actividad en presencia de LPC es mayor que la estimulación en presencia Brij 58 y que $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de estos detergentes en el medio de reacción es la concentración óptima por la que el enzima mostró un máximo de actividad. Por lo tanto $0.1 \text{ mg}.\text{ml}^{-1}$ se utilizó como concentración habitual en los ensayos para determinar la actividad específica total y la latencia de las vesículas. Así la actividad latente se define como la diferencia entre las actividades en presencia y ausencia de detergente, siendo la latencia de las vesículas la actividad latente expresada en porcentaje de la actividad en presencia de detergente.

Para el estudio de transporte de protones a nivel de membranas de plasmalema, se hizo también necesario el uso de Brij 58 que, a determinadas concentraciones, induce la inversión de las vesículas sin afectar a la permeabilidad de las mismas (Johansson y col. 1995). Tras ensayar el transporte de H^+ dependiente de ATP en

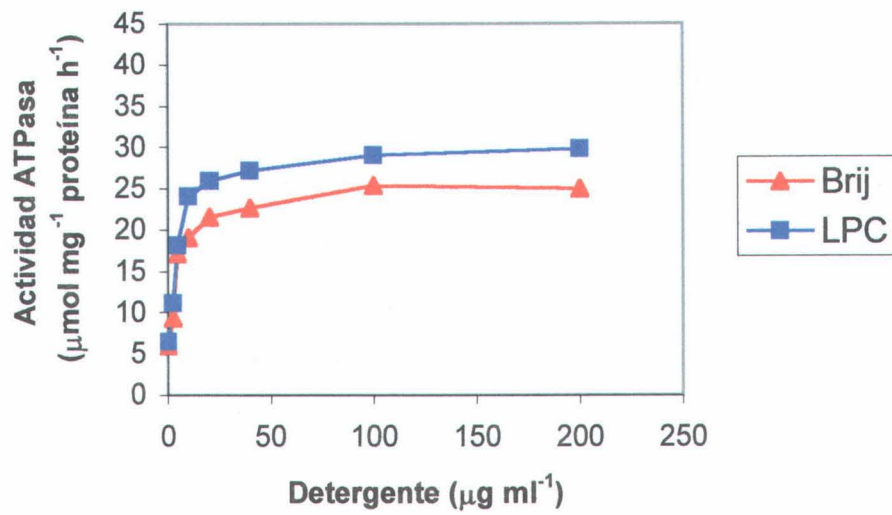


Figura 19. Efecto de la concentración de LPC o Brij 58 en el medio de reacción sobre la actividad ATPasa de plasmalema de raíces de tomate *L. esculentum* var. Pera no tratadas con NaCl.

presencia Brij 58, pudo observarse que dicho detergente incrementaba fuertemente la velocidad inicial de extinción de fluorescencia así como el porcentaje de extinción máxima y que 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Brij 58 es concentración óptima que permite la máxima actividad transportadora de H^+ , sugiriendo la obtención del 100 % de vesículas de plasmalema invertidas (**figuras 20**)

La caracterización de transporte de H^+ en las membranas de plasmalema, demostró que el ATP fue capaz de generar un gradiente de pH, disipable por la adición de ionóforos de H^+ del tipo de NH_4Cl o gramicidina (**figura 21**). Dicho transporte fue estimulado por NO_3^- y en menor medida por Cl^- , indicativo que ambos iones son altamente permeantes capaces de estimular la formación del gradiente de pH a través de las vesículas de plasmalema. Inhibido por vanadato y en menor medida por azida, no afectándose por molibdato o bafilomicina y fuertemente estimulado por Brij 58. Estos datos, nos llevaron a considerar que transporte de H^+ dependiente de ATP inhibible a vanadato y insensible a azida y molibdato, se asoció al enzima H^+ -ATPasa de plasmalema.

El efecto del tratamiento salino sobre la actividad fosfohidrolásica de plasmalema de raíces, presencia de Brij 58 o LPC, de hojas jóvenes y hojas adultas de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium* se resume en la **Figura 22**.

El estrés salino redujo la actividad específica ATPasa de plasmalema de raíces de ambas especies entre 50-60 %, no afectándose significativamente dicha actividad a nivel de hojas jóvenes o adultas.

En **Tabla 18** representa el efecto de los aniones permeantes NO_3^- y Cl^- sobre la actividad ATPasa y transportadora de protones en presencia de Brij 58 en función de las variedades, tejidos y tratamiento salino. Si el Brij 58 incremento 2-3 veces la actividad fosfohidrolítica, la estimulación por este del transporte de protones dependiente de ATP fue del orden de 6 hasta 8 veces mayor en todos los tejidos control y tratados. Además tanto la actividad ATPasa como el transporte de protones presentaron una actividad mayor en presencia de NO_3^- que en presencia del Cl^- en

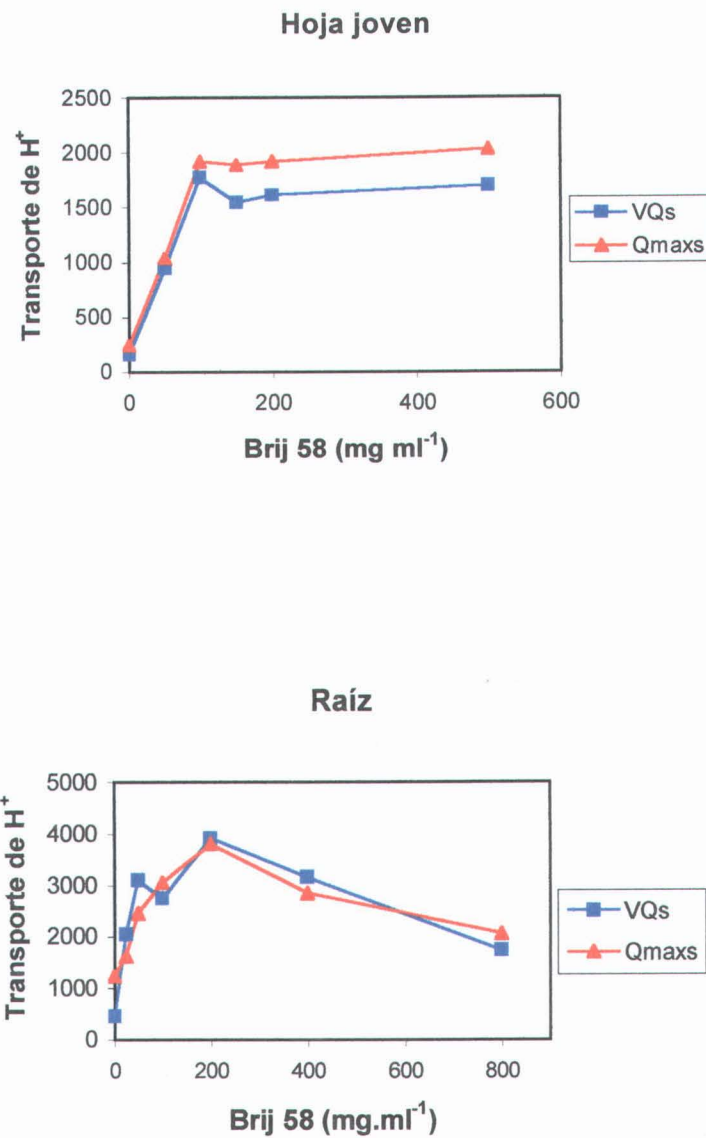


Figura 20. Efecto del Brij 58 sobre el transporte de H^+ dependiente de ATP en vesículas de plasmalema de hojas y raíces de tomate *L. esculentum* var. Pera, tratadas con 130 mM NaCl. Los resultados son expresados como la velocidad inicial de extinción de fluorescencia del ACMA (VQs, en % $Q \text{ min}^{-1} \text{ proteína mg}^{-1}$) o como porcentaje de la extinción máxima (Qmaxs, en % $Q \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$).

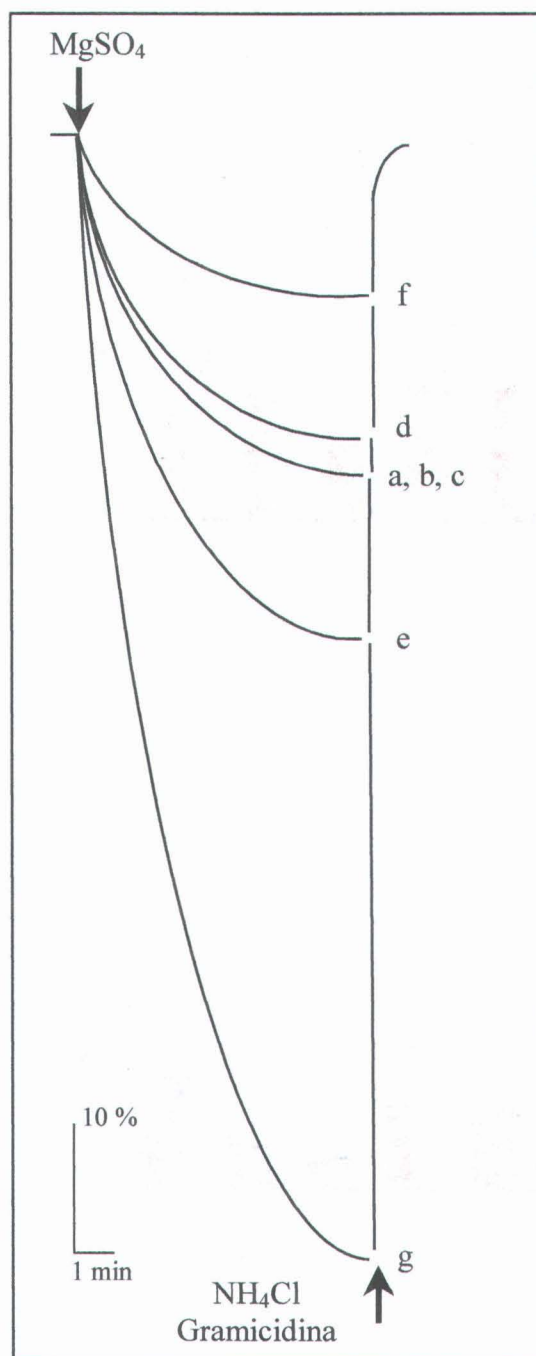


Figura 21. Actividad transportadora de H^+ dependiente de ATP, medida como extinción de la fluorescencia del ACMA, en vesículas de plasmalema de raíces de tomate *L. pimpinellifolium* no tratadas. Las reacciones se iniciaron por adición de 3 mM $MgSO_4$ al medio normal de reacción (apartado IV.C.3.7), que contenía 100 mM KCl (a), 100 μM Molibdato (b), 20 nM Bafilomicina (c), 2 mM Azida (d), 100 mM Nitrato (e), 250 μM Vanadato (f) y 0.2 mg.ml⁻¹ Brij 58 (g). La fluorescencia se restauró tras la adición de 10 mM NH_4Cl o 2 μM de gramicidina D, una vez que la fluorescencia alcanzaba el estado estacionario.

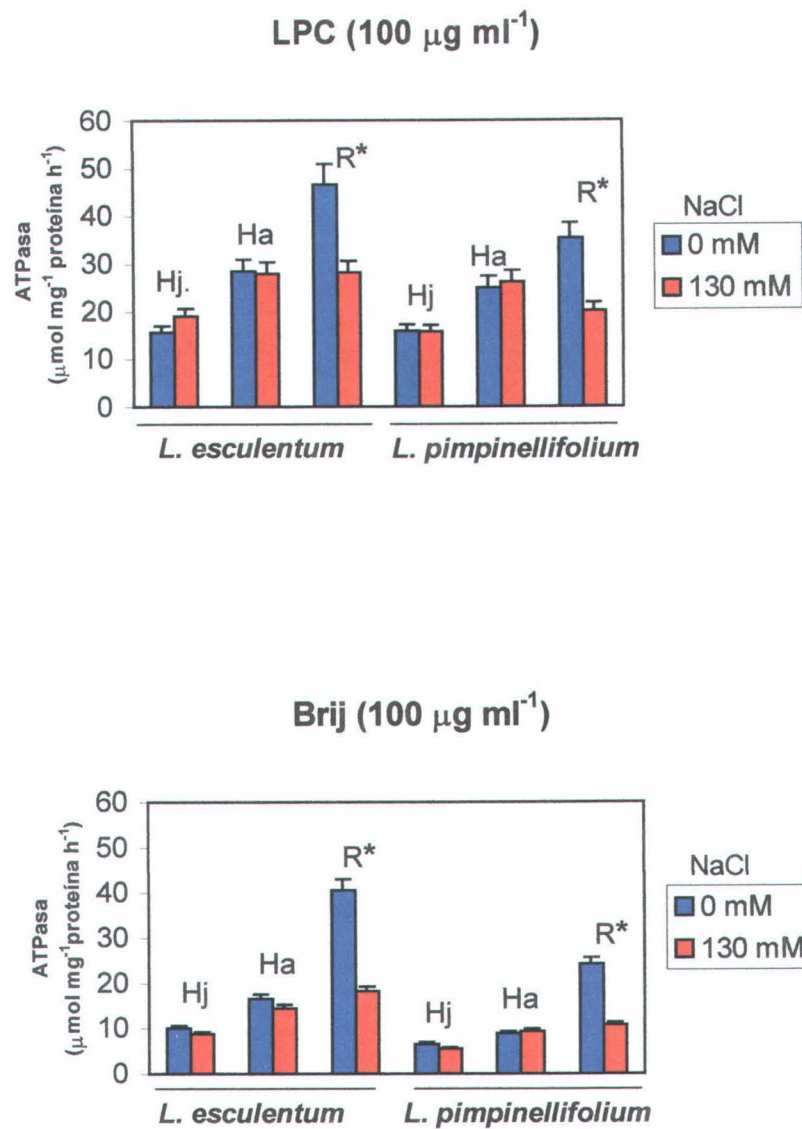


Figura 22. Actividad ATPasa en presencia de 0.1 mg ml^{-1} LPC o Brij 58 en plasmalema de diferentes tejidos de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium*, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Los datos, expresados en $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína h}^{-1}$, son la media de cuatro experimentos independientes (+ DE). *Significativo a $P < 0.05$, $n = 4$, Test de Duncan.

condiciones de ausencia de detergente indicando una mayor permeabilidad de la membrana al NO_3^- en estas condiciones. Sin embargo en la raíz, el transporte de H^+ dependiente de ATP en presencia del Brij 58 se estimuló fuertemente por el Cl^- . Esta diferencia en la velocidad de transporte de protones refleja la permeabilidad relativa de la membrana plasmática de raíces a estos aniones en presencia de y en ausencia de Brij.

Como se ha indicado anteriormente, el tratamiento salino redujo la actividad específica total fosfohidrolítica del enzima H^+ -ATPasa de plasmalema de raíces de *L. esculentum* y *L. pimpinellifolium*, sin que se produzca cambios en la actividad transportadora de H^+ (Tabla 18), resultándose un incremento de la relación H^+ transportado por ATP hidrolizado en ambas especie (Tabla 19). Mientras, la razón H^+ /ATP de plasmalema purificado de hojas jóvenes y adultas de las dos especies cultivada y silvestre no sufrió cambios importantes puesto que los valores de transporte y de hidrólisis de ATP fueron similares en función de dicho tratamiento.

Es importante resaltar que en presencia de Brij, la razón H^+ /ATP fue superior sobre todo en hojas adultas y raíces control y tratados.

La latencia de las vesículas en presencia de LPC o Brij 58 no experimentó cambios importantes en función del tratamiento salino en los tejidos estudiados (Figura 23), así las diferencias observadas en la razón H^+ /ATP de las raíces no fueron debidas a cambios en la orientación de las vesículas.

La cuantificación de la cantidad de H^+ -ATPasa de la fracción microsomal y de plasmalema purificado por partición de fases de raíces de tomate *L. esculentum* y *L. pimpinellifolium*, se llevó a cabo mediante experimentos de *western Blot* utilizando anticuerpos policlonales desarrollados frente al dominio C-terminal de la H^+ -ATPasa de *Arabidopsis thaliana*. Dichos anticuerpos revelaron que las cantidades relativas de proteínas antigénicas correspondientes a la subunidad de 100 kDa de vesículas de plasmalema purificadas son 2 veces mayor que las de microsomas en las dos especies. El tratamiento salino con 130 mM NaCl redujo la intensidad de la banda de plasmalema en ambas especies comparativamente con los controles. La inhibición se estimó en un 40 % por el estudio densitométrico (Figura 24).

Tabla 18. Actividades ATPasa y transporte de H^+ dependiente de ATP, medidas en presencia de aniones permeantes, NO_3^- o Cl^- , y de 0.1 mg ml^{-1} (actividad ATPasa) o 0.2 mg ml^{-1} (transporte de H^+) Brij 58, correspondiente al enzima H^+ -ATPasa de diferentes tejidos de *L. esculentum* var. Pera (Le) y *L. pimpinellifolium* (Lp), tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$ (ATPasa) y $\% Q \text{ mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ (transporte de H^+), son media de dos experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado. Letras iguales en la misma fila representan valores homogéneos, según el análisis multifactorial de Duncan, $P = 95 \%$. Números entre paréntesis indican actividad ATPasa y transporte de H^+ dependiente de ATP en ausencia de detergente Brij 58. N.D. = no determinado.

Tejido	Anion permeante	Le (mM, NaCl)		Lp (mM, NaCl)		
		0	130	0	130	
<i>ATPasa + Brij</i>						
Hoja joven	NO_3^-	9.9 ^b (2.2)	8.7 ^b (1.8)	6.5 ^{ab} (1.3)	5.5 ^a (1.2)	
	Cl^-	6.6 ^b (N.D.)	8.0 ^b (N.D.)	4.7 ^a (N.D.)	4.3 ^a (N.D.)	
Hoja adulta	NO_3^-	16.6 ^b (4.7)	14.5 ^b (5.6)	8.8 ^a (4.6)	9.3 ^a (4.9)	
	Cl^-	15.1 ^b (N.D.)	13.7 ^b (N.D.)	6.1 ^a (N.D.)	5.4 ^a (N.D.)	
Raíz	NO_3^-	40.6 ^d (12.3)	18.2 ^b (5.2)	24.2 ^c (7.9)	10.7 ^a (4.6)	
	Cl^-	38.9 ^d (N.D.)	16.6 ^b (N.D.)	24.6 ^c (N.D.)	9.3 ^a (N.D.)	
<i>Transporte de H^+ + Brij</i>						
Hoja joven	NO_3^-	1807 ^b (283)	1900 ^b (288)	780 ^a (195)	717 ^a (187)	
	Cl^-	1441 ^b (143)	1573 ^b (124)	429 ^a (141)	524 ^a (139)	
Hoja adulta	NO_3^-	2567 ^b (285)	2445 ^b (319)	1078 ^a (127)	1031 ^a (125)	
	Cl^-	1254 ^b (157)	1294 ^b (165)	640 ^a (99)	747 ^a (109)	
Raíz	NO_3^-	5204 ^a (721)	4874 ^a (610)	5934 ^a (861)	5136 ^a (765)	
	Cl^-	6702 ^a (457)	6382 ^a (474)	8645 ^b (517)	8937 ^b (530)	

Tabla 19. Razón entre la velocidad inicial de transporte de H^+ y actividad ATPasa medidas con nitrato, en presencia y en ausencia de Brij 58, correspondiente al enzima H^+ -ATPasa de plasmalema de diferentes tejidos de *L. esculentum* var. Pera (Le) y *L. pimpinellifolium* (Lp), tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl, calculada a partir de los datos contenidos en la **Tabla R7**. Letras iguales en la misma fila representan valores homogéneos, según el análisis multifactorial de Duncan, $P = 95\%$.

Actividad	Le (NaCl, mM)		Lp (NaCl, mM)	
	0	130	0	130
Hoja joven				
-Brij	128a	144 a	150 a	155 a
+Brij	182 b	218 b	120 a	130 a
Hoja adulta				
-Brij	60 b	57 b	27 a	25 a
+Brij	154 b	168 b	122 a	115 a
Raíz				
-Brij	54 a	108 b	178 c	239 d
+Brij	128 a	264 b	245 bc	480 d

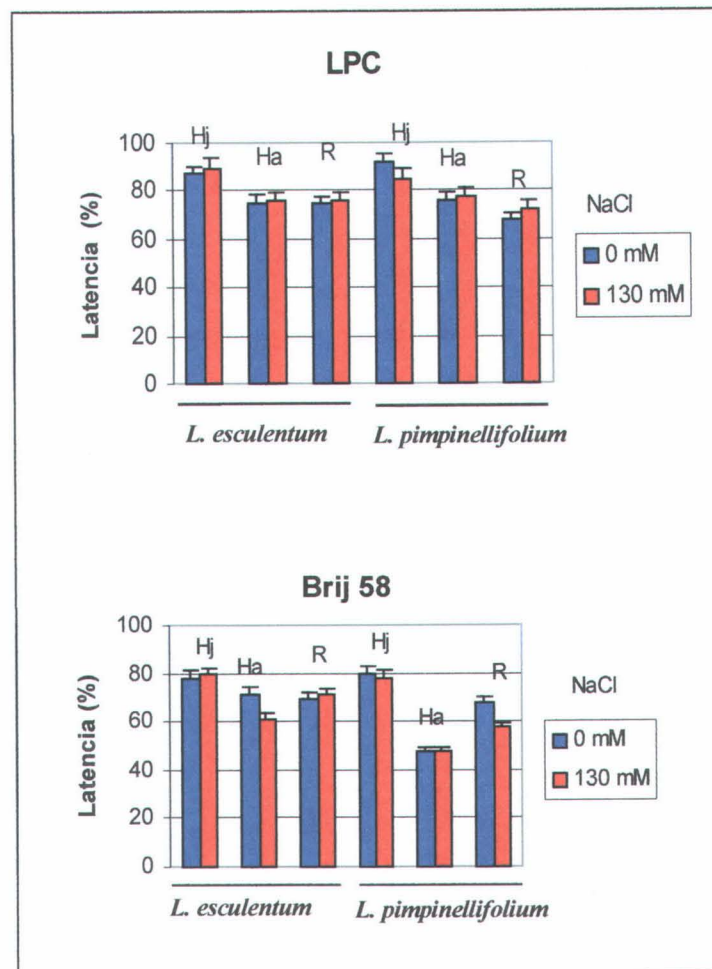


Figura 23. Efecto de 0.1 mg ml^{-1} LPC y Brij sobre la latencia de la actividad ATPasa de plasmalema de hojas jóvenes (Hj), hojas adultas (Ha) y raíces (R) de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium*, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Los datos, expresados en %, son la media de cuatro experimentos independientes (+DE).

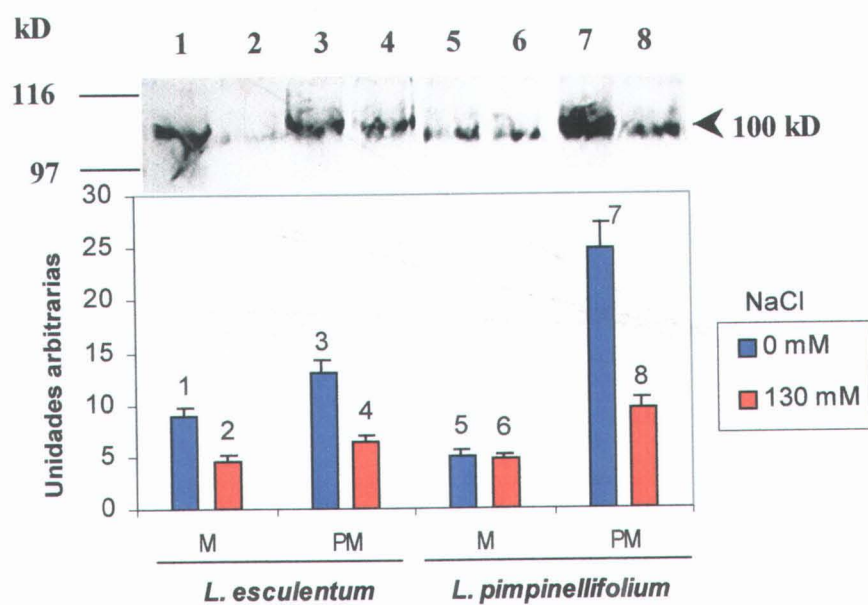


Figura 24. Western blots de las proteínas solubilizadas de la fracción microsomal (M) y plasmalema (PM) purificado por partición de fases de raíces de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium*, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl, y análisis densitométrico de las distintas bandas inmunoreveladas con anticuerpos específicos contra la H^+ -ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis*. Los resultados, expresados en unidades arbitrarias (+ DE) son la media de dos blots, con dos lecturas cada uno. La flecha indica el peso molecular aproximado de la banda.

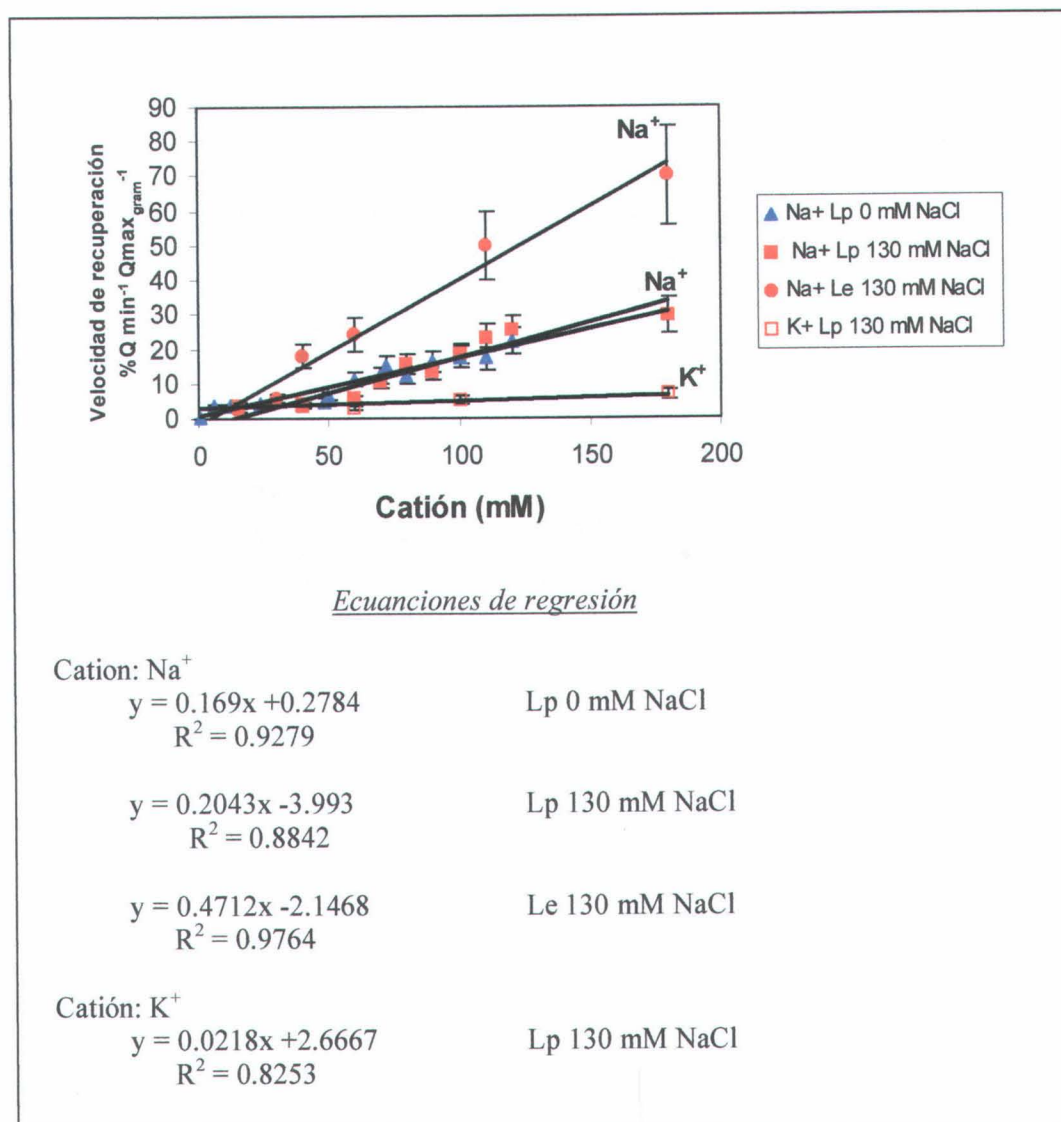


Figura 25. Velocidad inicial de recuperación de la fluorescencia, en función de la concentración de Na⁺ o K⁺ en el medio de ensayo de la actividad de intercambio catión/H⁺ en vesículas de plasmalema aisladas de raíces de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium*, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM. Las líneas se ajustaron con un mayor coeficiente de regresión a una recta. Cada punto es la media de dos experimentos independientes.

Tabla 20. Análisis de actividades enzimáticas marcadoras, determinadas en presencia de 0.01 mg ml^{-1} Brij 58, en las fracciones de membrana aisladas de las interfases de un gradiente discontinuo de sacarosa, a partir de microsomas (M) de *raíces* de *L. esculentum* var. Pera, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las actividades específicas, expresadas en $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$, son media de dos experimentos independientes, con las actividades ensayadas por triplicado, siendo la DE menor del 10 % de la media. Valores entre paréntesis son porcentajes de los marcadores en cada interfase respecto a los obtenidos en microsomas.

Enzimas	Tratamiento (mM, NaCl)	Fracción del gradiente				
		M	0/22		22/30	
$\Delta\text{Va-ATPasa}$	0	13.0	5.7	(44)	11.2	(86)
	130	9.4	6.4	(68)	10.8	(115)
$\Delta\text{NO}_3^- \text{-ATPasa}$	0	1.4	5.6	(400)	3.0	(214)
	130	1.1	6.0	(545)	3.1	(281)
$\Delta\text{Baf-ATPasa}$	0	1.3	6.2	(469)	2.9	(223)
	130	1.4	6.7	(478)	2.8	(200)
$\Delta\text{K}^+ \text{-PPasa}$	0	1.1	5.2	(472)	2.2	(200)
	130	1.2	5.0	(416)	3.0	(250)
NADH cit c reductasa	0	2.8	2.3	(82)	2.6	(91)
	130	4.4	3.0	(68)	3.0	(69)
UDPasa latente	0	3.6	2.9	(80)	3.2	(89)
	130	3.9	3.0	(79)	3.5	(92)
Proteínas (mg)	0	10	0.21	2.1	0.52	5.5
	130	10	0.30	3.0	0.88	8.8

UNIVERSIDAD DE GRANADA

22 MAYO 2000

COMISION DE DOCTORADO

Funcionamiento de las bombas primarias y secundarias de tonoplasto en respuesta al estrés salino

Para la separación del tonoplasto se ha utilizado inicialmente un gradiente discontinuo de sacarosa de dos bandas 22 y 30 % de sacarosa para determinar la interfase coincidiendo con la zona de mayor distribución de enzimas marcadores de tonoplasto. Para ello la pureza de la preparación de tonoplasto aislado por gradiente de sacarosa se determinó por la medida de actividades fosfohidrolíticas en presencia de inhibidores y efectores (Sze y col 1992).

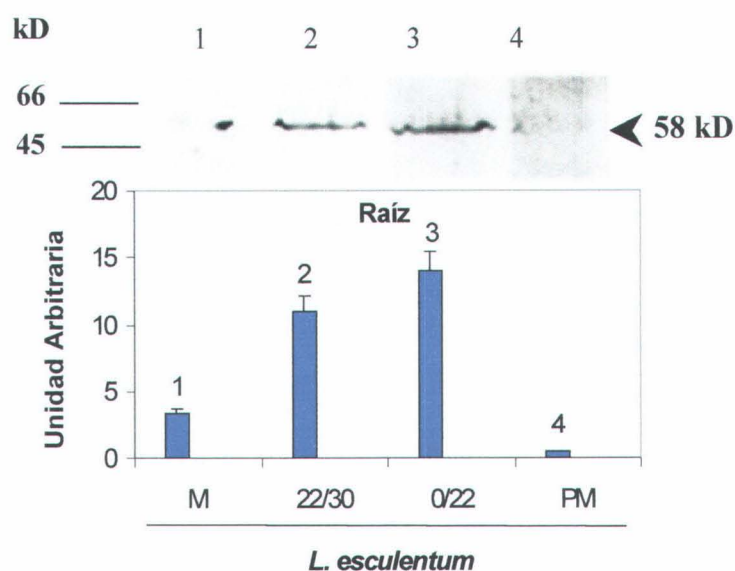
Las actividades enzimáticas, expresadas como actividad total de interfases 0/22 y 22/30 obtenidas por gradiente de sacarosa, partiendo de la fracción microsomal resultante de sedimentación a 100.000 g de raíces de tomate *L. esculentum* (Tabla 20) y *L. pimpinellifolium* (Tabla 21), pudo comprobar que la fracción de membrana enriquecida en tonoplasto se separó mayoritariamente en la interfase 0/22, demostrado por el incremento de 3 hasta 4 veces de las actividades enzimáticas específicas ΔNO_3^- -ATPasa, ΔBaf -ATPasa y ΔK^+ -PPasa, mientras que se redujo la contaminación por plasmalema, Golgi y retículo. El rendimiento en proteínas fue mayor en planta tratadas aproximadamente del 3 % frente al 2 % de plantas controles

El grado de pureza las fracciones de membranas obtenidas por el gradiente de sacarosa, se llevó a cabo también mediante el uso de anticuerpos policlonales específicos correspondiente al enzima V-ATPasa de tonoplasto presentes en las interfases 0/22 y 22/30 y en comparación con las membranas microsomales y plasmalema purificado por partición de fases (apartado). Previamente, las proteínas de membranas de raíces de *L. esculentum* y se separaron por electroforesis en SDS, en geles de poliacrilamida. Después de transferir los geles a membranas de nitrocelulosa, el inmunoensayo con el anticuerpo frente a la subunidad de 58 kD de la H^+ -ATPasa de tonoplasto de remolacha (Fig 26), revelo una banda de aproximadamente 58 kD significativamente mayor en las fracciones 22/30 y 0/22.

Tabla 21. Análisis de actividades enzimáticas marcadoras determinadas, en presencia de 0.01 mg ml^{-1} de Brij 58, en las fracciones de membranas aisladas de las interfases de un gradiente discontinuo de sacarosa, a partir de microsomas (M) de raíces de *L. pimpinellifolium*, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las actividades específicas, expresadas en $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$, son media de dos experimentos independientes, con las actividades ensayadas por triplicado, siendo la DE menor del 10 % de la media. Valores entre paréntesis son porcentajes de los marcadores en cada interfase respecto a los obtenidos en microsomas.

Enzimas	Tratamiento (mM, NaCl)	Fracción de gradiente			
		M	0/22	22/30	
$\Delta\text{Va-ATPasa}$	0	12.8	6.7 (52)	12.8 (100)	
	130	8.7	6.2 (71)	12.2 (140)	
$\Delta\text{NO}_3^- \text{-ATPasa}$	0	2.1	5.4 (257)	3.9 (185)	
	130	2.3	6.4 (278)	4.0 (173)	
$\Delta\text{Baf-ATPasa}$	0	1.8	5.4 (300)	4.0 (222)	
	130	1.6	5.5 (343)	4.1 (256)	
$\Delta\text{K}^+ \text{-PPasa}$	0	1.9	5.4 (284)	3.1 (163)	
	130	2.4	5.6 (233)	3.2 (133)	
NADH cit c reductasa	0	4.6	3.7 (80)	4.0 (87)	
	130	5.0	3.8 (76)	4.2 (84)	
UDPasa latente	0	3.8	3.0 (79)	3.4 (89)	
	130	3.6	3.5 (77)	3.2 (89)	
Proteínas (mg)	0	10	0.21 (2.1)	0.59 5.9	
	130	10	0.31 (3.1)	0.83 8.3	

a)



b)



Figura 26. Western blots de las proteínas solubilizadas de la fracción microsomal (M), y fracciones de membranas obtenidas de las interfases 22/30 y 0/22 de un gradiente discontinuo de sacarosa, así como de plasmalema (PM) obtenido por partición de fases de raíces *L. esculentum* var. Pera, no tratada. (a) Análisis densitométrico de las distintas bandas inmunoreveladas con anticuerpos específicos contra la sub B (58 kD) de la H⁺-ATPasa de remolacha. Los resultados, expresados en unidades arbitrarias (+DE) son la media de dos blots, con dos lecturas cada uno. (b) Resondeo de (a) con anticuerpos específicos contra la H⁺-ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis thaliana* (100 kD).

El resonado de dichas bandas con anticuerpos contra la 100 kD de ATPasa de plasmalema mostró una notable contaminación en la fracción 22/30 que la fracción 0/22. Estos resultados son indicativos de un mejor enriquecimiento en proteínas de origen tonoplastidial en la fracción 0/22 de sacarosa.

A partir de la información generada por la separación descrita en el gradiente discontinuo de sacarosa, se optó por utilizar directamente un colchón de sacarosa formado por una capa de 22 %, para aislar rutinariamente el tonoplasto partiendo del homogenado de 100.000g.

El efecto de la concentración de Brij 58 sobre las vesículas enriquecidas en tonoplasto, se determinó, en función de la concentración de detergente, las actividades ΔKNO_3^- y $\Delta\text{Baf-ATPasa}$ **Fig 27**. Dichas actividades presentaron un máximo incremento con 0.01 mg.ml^{-1} Brij 58, por lo que se utilizó habitualmente en el medio de ensayo para determinar la actividad específica total y la latencia de las vesículas.

La falta de especificidad del nitrato como inhibidor de V-ATPasa **Sze 1985** junto con su interferencia con las sondas de pH (**pope y Leigh 1988**), llevó a la problemática de la utilización de nitrato como marcador de tonoplasto. Sin embargo la bafilomicina inhibe completamente la actividad ATPasa de tonoplasto sin afectar la actividad PPasa tonoplasto (**Milner y col 1995**). Es altamente selectivo y actúa a bajas concentraciones, se usa sin iones acompañantes, no afecta la fluorescencia de quinacrina o bases de acridina. El reconocimiento de bafilomicina como inhibidor específico de H^+ -ATPasa de tonoplasto da una buena alternativa como marcador de membranas de tonoplasto

De toda manera la actividad V-PPasa y la actividad ATPasa sensible a Bafilomicina es más definida como marcadores enzimáticos de tonoplasto que la actividad ATPasa sensible a Nitrato.

La bafilomicina es un inhibidor potente de la actividad V-ATPasa de tonoplasto el hidrolisis de ATP se inhibe completamente con concentraciones del orden de pmol (**Fig 28**). Sin embargo parece ser que el hidrolisis de ATP es menos sensible a la inhibición por bafilomicina que el transporte de protones pendiente de ATP (**Bowman y col 1988; Ikeda y col 1991; Okazaki y col 1992**)

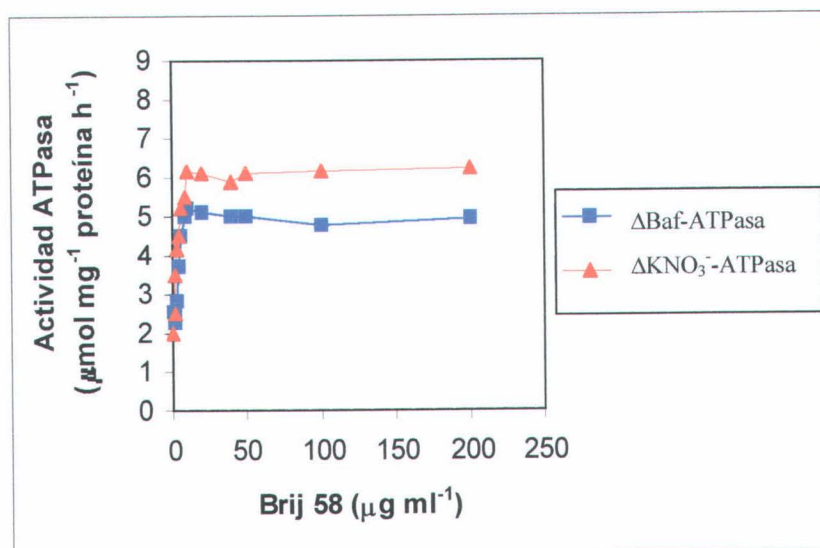


Figura 27. Efecto de la concentración de Brij 58 en el medio de reacción sobre las actividades ΔKNO_3^- y $\Delta\text{Baf-ATPasa}$ de la interfase 0/22 del colchon de sacarosa, enriquecida en tonoplasto, obtenidas a partir de microsomas de raíces de plantas de tomate *L. pimpinellifolium* no tratadas con NaCl.

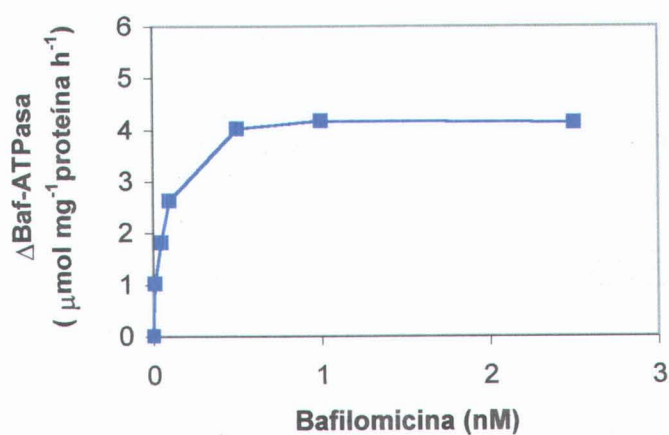


Figura 28. Efecto de la concentración de Bafilomicina A1 sobre la actividad Δ Baf-ATPasa de la interfase 0/22 del colchón de sacarosa en tonoplasto de raíces de *L. pimpinellifolium* no tratadas con NaCl.

Tabla R22. Efecto de inhibidores específicos sobre las actividades ATPasa y transportadora de H^+ dependiente de ATP, correspondiente a la H^+ -ATPasa de tonoplasto de *raíces* de *L. esculentum* var. Pera (*Le*) y *L. pimpinellifolium* (*Lp*), tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las actividades control ATPasa ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína h^{-1} , entre paréntesis) y transportadora de H^+ (VQs en % Q mg^{-1} proteína min^{-1} , entre paréntesis) se ensayaron en un medio que contenía 25 mM BTP-MES pH 7.5, 1.5 mM MgSO_4 , 1.5 mM ATP-BTP y 100 mM KCl en presencia de 0.01 mg ml^{-1} Brij 58 (solo la actividad ATPasa). Los resultados, expresados en porcentaje de actividad específica respecto a la del control, son representativos de uno de dos experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado. N.D. = no determinado.

Inhibidores	Le (NaCl, mM)		Lp (NaCl, mM)	
	0	130	0	130
<u>ATPasa (+ Brij)</u>				
Control	100 (12.2)	100 (12.1)	100 (10.6)	100 (9.5)
Na_3VO_4 (250 μM)	40	50	54	58
KNO_3 (100 mM)	47	49	46	48
Bafilomicina (20 nM)	51	53	52	53
NaN_3 (2 mM)	93	89	85	90
Na_2MoO_4 (100 μM)	107	91	103	100
<u>Transporte de H^+ (- Brij)</u>				
Control	100 (1632)	100 (1576)	100 (1688)	100 (1968)
Na_3VO_4 (250 μM)	80	83	86	82
KNO_3 (100 mM)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Bafilomicina (20 nM)	11	14	20	17
NaN_3 (2 mM)	75	77	74	79
Na_2MoO_4 (100 μM)	96	99	98	95

Tabla 23. Actividad fosfohidrolásica y transportadora de H^+ dependiente de ATP y PPi de los enzimas $\Delta Baf-H^+-ATPasa$ y $\Delta K^+-H^+-PPasa$, así como la razón entre la velocidad inicial de transporte de H^+ y actividad fosfohidrolásica basal, de vesículas enriquecidas en tonoplasto de raíces de *L. esculentum* var. Pera (Le) y *L. pimpinellifolium* (Lp), tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las actividades específicas totales (en presencia de Brij 58) y basales (en ausencia de detergente) se expresaron en $\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína h^{-1} y la actividad transportadora de H^+ (VQs) en $\% Q \text{ mg}^{-1}$ proteína min^{-1} . Letras iguales en cada fila representan grupos homogéneos según el análisis de la varianza de Duncan, $P = 95 \%$, $n = 3$.

Enzimas	Le (NaCl, mM)		Lp (NaCl, mM)	
	0	130	0	130
<u>$H^+-ATPasa (\Delta Baf)$</u>				
A. Basal	2.04 a	2.27 a	2.52 a	2.83 a
A. Total	5.63 a	5.77 a	5.44 a	5.55 a
VQs	1632 a	1576 a	1688 a	1968 a
H/ATP	800 a	628 a	672 a	696 a
Latencia (%)	63 a	57 a	54 a	49 a
<u>$H^+-PPasa (\Delta K^+)$</u>				
A. Basal	2.24 a	2.36 a	2.32 a	2.79 a
A. Total	5.28 a	4.61 a	5.40 a	5.60 a
VQs	449 a	749 b	2872 c	4272 d
H/ATP	187 a	317 b	1238 c	1531 d
Latencia (%)	57 a	49 a	57 a	50 a

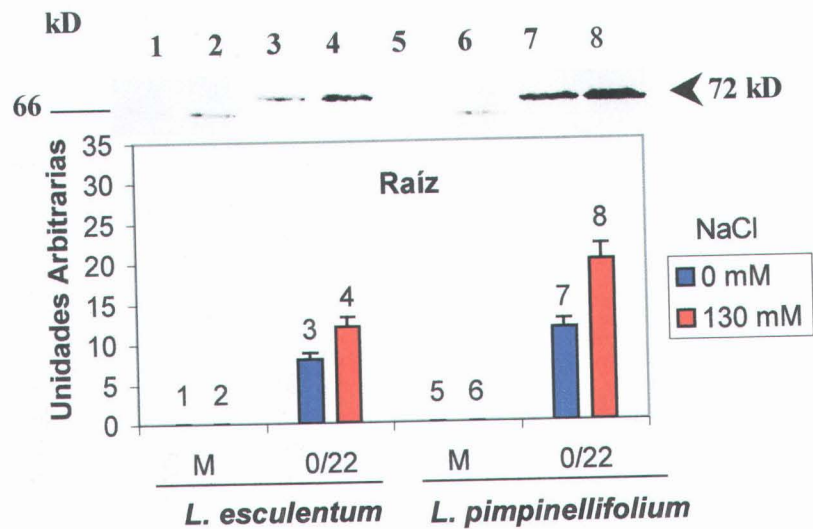
La inmunodetección con anticuerpos policlonales frente a la subunidad de 58kD de la H⁺-ATPasa de remolacha ((a) fig. 29), puso de manifiesto una única banda de aproximadamente 58 kD en todas las fracciones estudiadas, cuya intensidad incrementaba en la fracción 0/22 enriquecida en tonoplasto. El tratamiento salino incremento fuertemente la cantidad de la proteína antigenica en la fracción 0/22 de raíces de *L. pimpinellifolium*. El incremento de la intensidad de la banda se estimó por el análisis densitométrico en un 36 % frente al control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de esta proteína por efecto de la concentración salina en raíces de *L. esculentum*.

El resonado de la membrana de nitrocelulosa con anticuerpos generados contra la H⁺-ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis thaliana* ((b) Fig. 29) no mostró ninguna banda de 100 kD, ello es indicativo que la fracción 0/22 del gradiente de sacarosa contenía fundamentalmente vesículas de tonoplasto.

El inmunoensayo con anticuerpos policlonales frente a la subunidad de 72 kD (sub A) de la H⁺-ATPasa de remolacha, mostró una banda de 72 kD ((a) Fig. 30). El análisis densitométrico del inmunoblot reveló un fuerte enriquecimiento de esta H⁺-ATPasa en la fracción 0/22 del gradiente, indicativo de que aquella contenía fundamentalmente membranas de tonoplasto. El tratamiento salino incrementó la cantidad de la proteína antigénica de la fracción 0/22, siendo dicho incremento 2 veces mayor en las raíces de *L. pimpinellifolium*.

El resonado de la membrana de nitrocelulosa con anticuerpos generados contra la H⁺-ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis thaliana* ((b) Fig. 30) no detectó ninguna banda clara de 100 kD, ello indica la ausencia de contaminación por membranas de plasmalema en la fracción 0/22 de raíces controles y tratadas de las dos especies estudiadas.

a)



b)

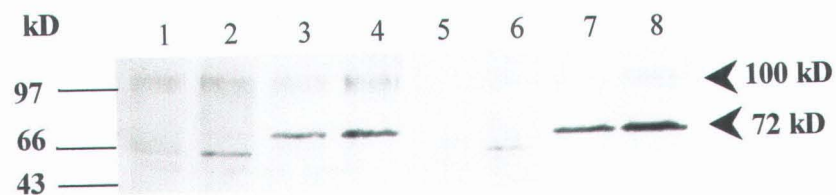
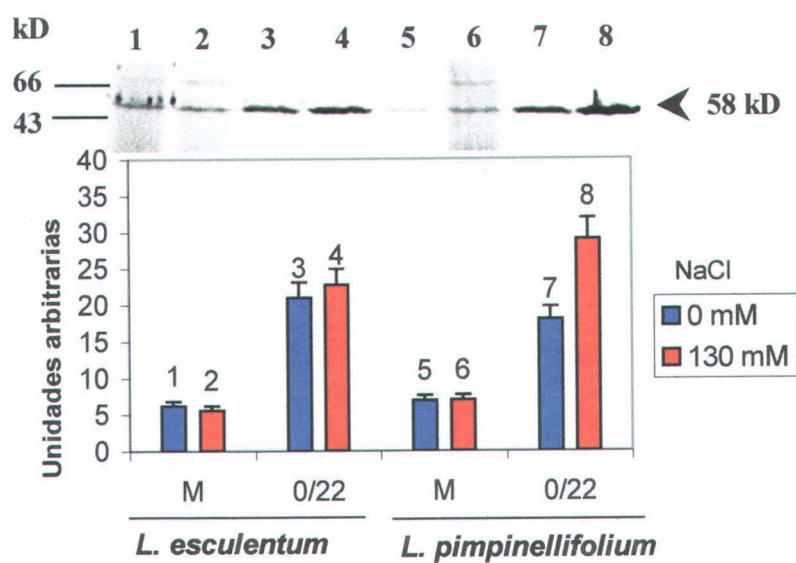


Figura 29. Western blots de las proteínas solubilizadas de la fracción microsomal (M) e interfase 0/22 del colchón de sacarosa, enriquecida en tonoplasto de raíces de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium* tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. (a) Análisis densitométrico de las distintas bandas inmunoreveladas con anticuerpos específicos contra la sub A (72 kD) de la V-H⁺-ATPasa de remolacha. Los resultados, expresados en unidades arbitrarias (+ DE) son la media de dos blots, con dos lecturas cada uno. (b) Resondeo de (a) con anticuerpos específicos contra la H⁺-ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis thaliana* (100 kD).

a)



b)



Figura 30. Western blots de las proteínas solubilizadas de la fracción microsomal (M) e interfase 0/22 del colchón de sacarosa, enriquecida en tonoplasto de raíces de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium*, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. (a) Análisis densitométrico de las distintas bandas, inmunoreveladas con anticuerpos específicos contra la sub B (58 kD) de la V-H⁺-ATPasa de remolacha. Los resultados expresados en unidades arbitrarias (+ DE), son la media de dos blots, con dos lecturas cada uno. (b) Resondeo de (a) con anticuerpos contra la H⁺-ATPasa de *Arabidopsis thaliana* (100 kD).

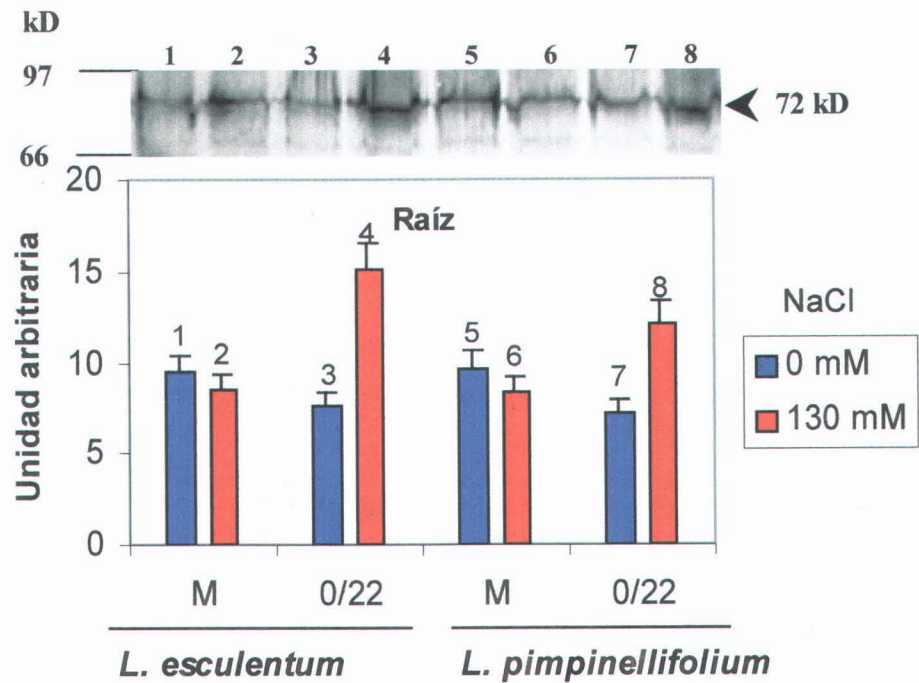


Figura 31. Western blots de las proteínas solubilizadas de la fracción microsomal (M) e interfase 0/22 del colchón de sacarosa, enriquecida en tonoplasto de raíces de tomate *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium* tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Inmumodetección con anticuerpos generados contra La H⁺-PPasa de tonoplasto de *Vigna radiata* y análisis densitométrico de las distintas bandas. Los resultados expresados en unidades arbitrarias (+ DE), son la media de dos blots, con dos lecturas cada uno.

Tabla 24. Efecto de inhibidores específicos sobre las actividades ATPasa y transportadora de H^+ dependiente de ATP, correspondiente a la H^+ -ATPasa de tonoplasto de *tallos* de *L. esculentum* var. Pera (*Le*) y *L.pimpinellifolium* (*Lp*), tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las actividades control ATPasa ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína h^{-1} , entre paréntesis) y transportadora de H^+ (VQs en % Q mg^{-1} proteína min^{-1} , entre paréntesis) se ensayaron en un medio que contenía 25 mM BTP-MES pH 7.5, 1.5 mM MgSO_4 , 1.5 mM ATP-BTP y 100 mM KCl en presencia de 0.01 mg ml^{-1} **Brij 58** (solo la actividad ATPasa). Los resultados, expresados en porcentaje de actividad específica respecto a la del control, son representativos de uno de dos experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado. N.D. = no determinado.

Inhibidores	Le (NaCl, mM)		Lp (NaCl, mM)	
	0	130	0	130
<u>ATPasa (+ Brij)</u>				
Control	100 (10.1)	100 (10.2)	100 (9.9)	100 (9.3)
Na_3VO_4 (250 μM)	60	69	65	67
KNO_3 (100 mM)	33	35	34	35
Bafilomicina (20 nM)	32	40	31	36
NaN_3 (2 mM)	95	90	92	93
Na_2MoO_4 (100 μM)	100	99	89	96
<u>Transporte de H^+ (- Brij)</u>				
Control	100 (3712)	100 (2752)	100 (3272)	100 (2720)
Na_3VO_4 (250 μM)	80	85	89	90
KNO_3 (100 mM)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Bafilomicina (20 nM)	4.2	4.9	10	10
NaN_3 (2 mM)	78	80	82	75
Na_2MoO_4 (100 μM)	95	96	93	98

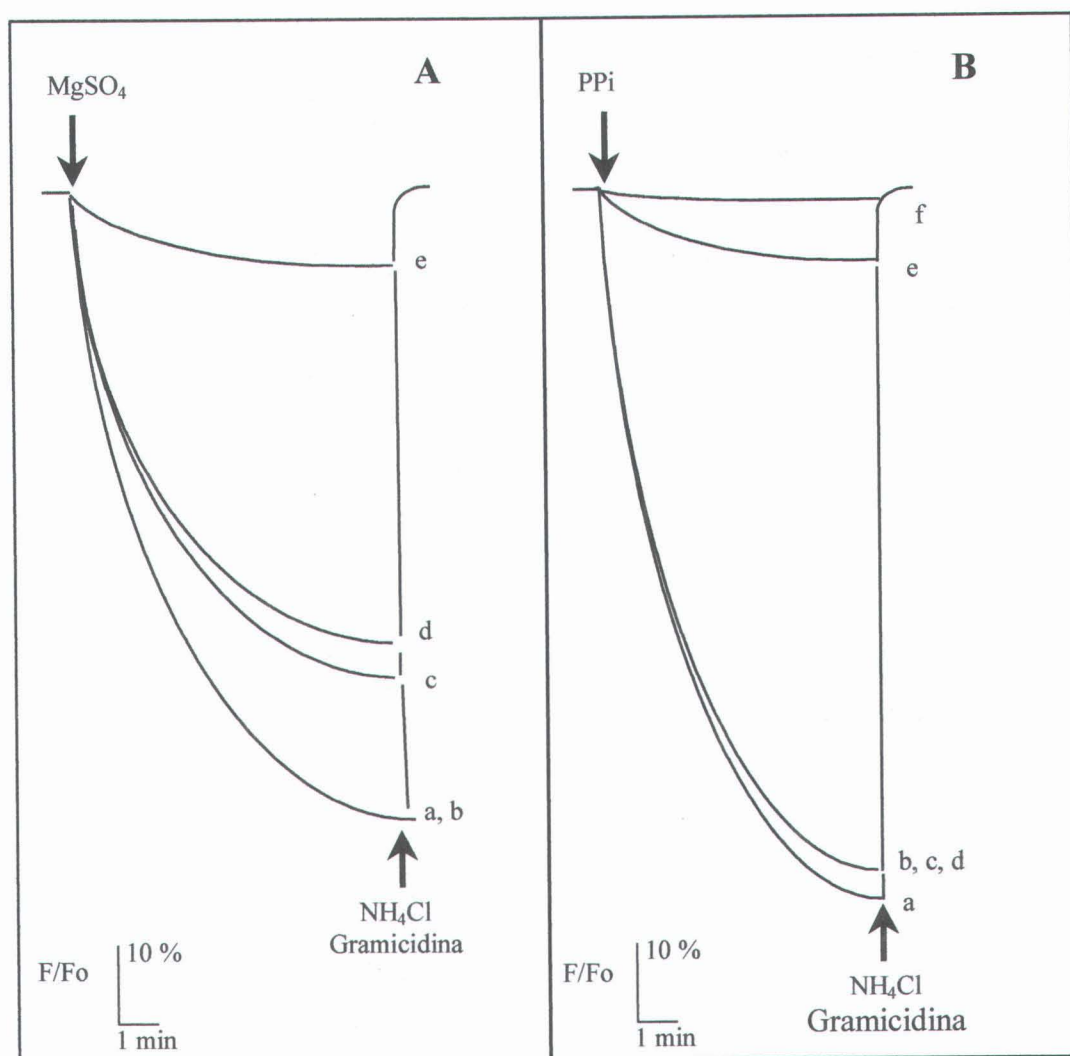


Figura 32. Actividad transportadora de H^+ dependiente de ATP (A) o PPi (B), medida como extinción de la fluorescencia del ACMA, en vesículas enriquecidas en tonoplasto obtenidas de tallo de tomate *L. pimpinellifolium* no tratadas. (A), Las reacciones se iniciaron por adición de 1.5 mM $MgSO_4$ al medio normal de reacción (apartado IV.C.3.7.2), que contenía 100 mM KCl (a), 100 μ M molibdato (b), 250 μ M vanadato (c), 2 mM azida (d), 20 nM baflomicina (e). (B), Las reacciones se iniciaron por adición de 0.6 mM PPi-BTP al medio de reacción (apartado IV.C.3.7.3), que contenía 100 mM KNO_3 (a) en presencia de 100 μ M de molibdato (b), 2 mM azida (c), 250 μ M vanadato (d), 10 mM IMPD (e) y en ausencia de KNO_3 (f). La fluorescencia se restauró por adición de 10 mM NH_4Cl o 2 μ M de gramicidina D una vez que la fluorescencia alcanzaba el estado estacionario.

Tabla 25. Actividad fosfohidrolásica y transportadora de H^+ dependiente de ATP y PPi de los enzimas $\Delta Baf-H^+-ATPasa$ y $\Delta K^+-H^+-PPasa$, así como la razón entre la velocidad inicial de transporte de H^+ y actividad fosfohidrolásica basal, en vesículas enriquecidas en tonoplasto de **tallos** de *L. esculentum* var. Pera (Le) y *L. pimpinellifolium* (Lp), tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las actividades específicas totales (en presencia de Brij 58) y basales (en ausencia de detergente) se expresaron en $\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína h^{-1} y la actividad transportadora de H^+ (VQs) en % $Q \text{ mg}^{-1}$ proteína min^{-1} . Letras iguales en cada fila representan grupos homogéneos según el análisis de la varianza de Duncan, $P = 95 \%$, $n = 3$.

Enzimas	<i>Le</i> (NaCl, mM)		<i>Lp</i> (NaCl, mM)	
	0	130	0	130
<u>H^+-ATPasa (ΔBaf)</u>				
A. Basal	2.7 a	2.12 a	1.43 a	1.24 a
A. Total	6.80 b	4.95 ab	5.44 ab	4.44 a
VQs	3423 ab	2901 a	3272 b	3376 b
H/ATP	1267 a	1312 a	2288 b	2722 b
Latencia (%)	63 a	57 a	74 b	72 b
<u>H^+-PPasa (ΔK^+)</u>				
A. Basal	1.62 ab	1.2 a	2.02 b	1.84 ab
A. Total	4.19 a	3.9 a	5.24 a	3.96 a
VQs	5329 c	2721 a	6088 d	3880 bc
H/ATP	3289 b	2277 a	3013 b	2108 a
Latencia (%)	61 a	51 a	61 a	53 a

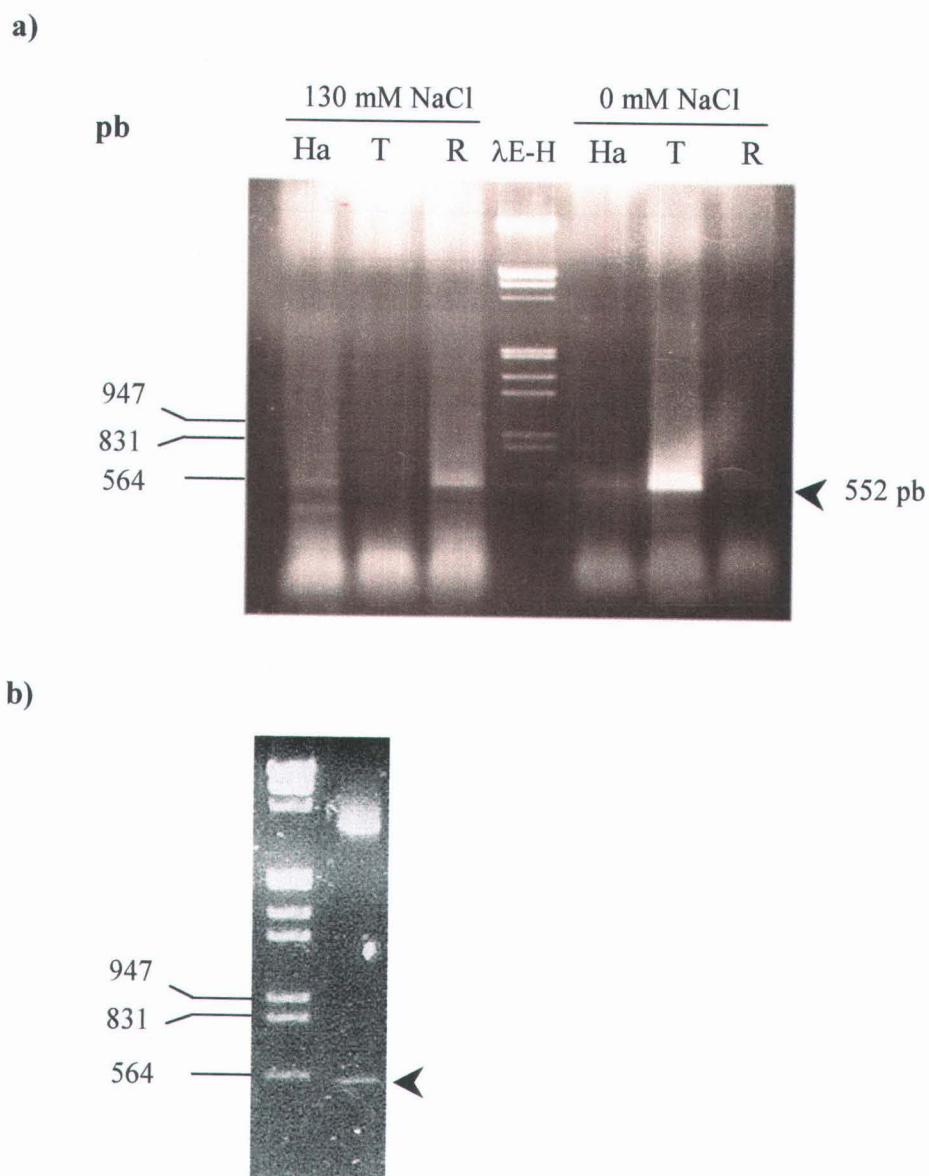


Figura 33. (a) Fragmento de 0.55 kb obtenido por RT-PCR con cebadores específicos para la región codificante de la V-PPasa, a partir de ARN total aislado de diferentes tejidos de hoja adulta (Ha), tallo (T) y raíz (R) de *L. pimpinellifolium*, tratados durante 8 días con 130 mM NaCl. λE-H=ADN del fago λ digerido con EcoRI-Hind III, como marcador de peso molecular (en pb). (b) Liberación del inserto clonado en pGEM-T de 462 pb por digestión con ApaI-PstI.

```

      10              30              50
      .             .             .
GCCCTCTTTGGGGCGTTTGTTCAGCCGGGCAGCAATTTCCACTGTAGATGTCTTGACTCCT
A L F G A F V S R A A I S T V D V L T P
      .             .             .
      70              90              110
AAAGTCTTTATTGGTCTGCTAGTCGGTGCAATGCTTCCTTATTGGTTCTCCGCCATGACA
K V F I G L L V G A M L P Y W F S A M T
      .             .             .
      130             150             170
ATGAAGAGTGTTGGAAGTGCTGCTCTTAAGATGGTTGAGGAAGTGCGTAGGCAATTCAAC
M K S V G S A A L K M V E E V R R Q F N
      .             .             .
      190             210             230
ACCATCCCTGGTCTCATGGAAGGAAGTCCCAAGCCTGACTATGCCACCTGTGTCAAGATC
T I P G L M E G T A K P D Y A T C V K I
      .             .             .
      250             270             290
TCCACAGATGCATCGATCAAGGAGATGATTCCACCTGGTGCCCTCGTCATGCTCACTCCA
S T D A S I K E M I P P G A L V M L T P
      .             .             .
      310             330             350
TTGATTGTTGGTATCTTGTGGCGTCGAAACACTTTCTGGTGTCTTGCAGGATCTCTC
L I V G I L F G V E T L S G V L A G S L
      .             .             .
      370             390             410
GTCTCTGGTGTACAGATTGCCATTTCTGCATCCAACACTGGCGGCGCCTGGGACAACGCA
V S G V Q I A I S A S N T G G A W D N A
      .             .             .
      430             450
CTGCGGGGGGATTTCGGAGATGGCGGCGCCTGGGACAATGC
L R G G F R R W R R L G Q C

```

Figura 33. Secuencia de nucleótidos del fragmento de 462 pb clonado en pGEM-T, y su secuencia deducida de aminoácidos. En azul, se muestra la secuencia de aminoácidos(140) que corresponde realmente a la V-PPasa de *L. pimpinellifolium* (420 pb), de acuerdo con el alineamiento múltiple de la Figura 35.

	c1		
Lp pp042	-----		
Bv Q42650	FSFAAMYGVAVAALGMLSTIATGLAIDAYGPISDN AGGIAEM AGMSHRIRERTDALDAAG	528	
Nt Q43796	FSFAAMYGIAVAALGMLSTIATGLAIDAYGPISDN AGGIAEM AGMSHRIRERTDALDAAG	308	
Vv AAF07174	-----KIRQRTDALDAAG	13	
Hv AVP3_HORVU	FSIAAMYGIAMAALGMLSTMATGLAIDAYGPISDN AGGIAEM AGMSHRIRERTDALDAAG	528	
At AVP3_ARATH	FSFAAMYGVAVAALGMLSTIATGLAIDAYGPISDN AGGIAEM AGMSHRIRERTDALDAAG	537	
Cm O82680	FTFAAMYGIAVAALGMLSTIATGLAIDAYGPISDN AGGIAEM AGMSHRIRERTDALDAAG	535	
Pa IPYR_PHAU	FTFAAMYGIAVAALGMLSTIATGLAIDAYGPISDN AGGIAEM AGMSHRIRERTDALDAAG	532	
Gh O48876	-----		
Os O48876	FSLAAMYGVAVAALGMLSTIATGLAIDAYGPISDN AGGIAEM AGMSHRIRERTDALDAAG	538	

	XII	XIII	
Lp pp042	-----ALFGAFVSRRAISTVDVLT	PKVFIGLLVGAMLPYWFSA	40
Bv Q42650	NTTAAIGKGFAGSAAALVSLALFGAFVSRRAISTVDVLT	PKVFIGLIVGAMLPYWFSA	588
Nt Q43796	NTTAAIGKGFAGSAAALVSLALFGAFVSRRAISTVDVLT	PKVFIGLIVGAMLPYWFSA	368
Vv AAF07174	NTTAAIGKGFAGSAAALVSLALFGAFVSRAGIETVDVLT	PKVFIGLIVGAMLPYWFSA	73
Hv AVP3_HORVU	NTTAAIGKGFAGSAAALVSLALFGAFVSRAGVAVDVLSP	PKVFIGLIVGAMLPYWFSA	588
At AVP3_ARATH	NTTAAIGKGFAGSAAALVSLALFGAFVSRAGIHTVDVLT	PKVFIGLIVGAMLPYWFSA	597
Cm O82680	NTTAAIGKGFAGSAAALVSLALFGAFVSRAGVTAVDVLT	PKVFIGLIVGAMLPYWFSA	595
Pa IPYR_PHAU	NTTAAIGKGFAGSAAALVSLALFGAFVSRASITVDVLT	PKVFIGLIVGAMLPYWFSA	592
Gh O48876	NTTAAIGKGFAGSAAALVSLALFGAFVSRRAITVDVLT	PKVFIGLIVGAMLPYWFSA	60
Os P93409	NTTAAIGKGFAGSAAALVSLALFGAFVSRRAISTVDVLT	PKVFIGLIVGAMLPYWFSA	598
	***** : . : ***** : ***** : ***** : ***** : *****		
	XIV		
Lp pp042	MKSVGSAALKMVEEVRQFN	TIPGLMEGTAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGALVMLTP	100
Bv 42650	MKSVGSAALKMVEEVRQFN	TIPGLMEGTAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGALVMLTP	648
Nt Q43796	MKSVGSAALKMVEEVRQFN	TIPGLMEGTAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGALVMLTP	428
Vv AAF07174	MKSVGSAALKMVEEVRQFN	TIPGLMEGTAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGALVMLTP	133
Hv AVP3_HORVU	MKSVGSAALKMVEEVRQFN	TIPGLMEGTAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGALVMLTP	648
At AVP3_ARATH	MKSVGSAALKMVEEVRQFN	TIPGLMEGTAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGALVMLTP	657
Cm O82680	MKSVGSAALKMVEEVRQFN	TIPGLMEGTAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGALVMLTP	655
Pa IPYR_PHAU	MKSVGSAALKMVEEVRQFN	TIPGLMEGTAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGALVMLTP	652
Gh O48876	MKSVGSAALKMVEEVRQFN	TIPGLMEGTAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGALVMLTP	120
Os P93409	MKSVGSAALKMVEEVRQFN	TIPGLMEGTAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGALVMLSP	658
	***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : *****		
	XV	c2	
Lp pp042	LIVGILFGVETLSGVL	LAGSLVSGVQIAIASASNTGGAWDNA-----	140
Bv Q42650	LIVGIFFGVETLSGVL	LAGSLVSGVQIAIASASNTGGAWDNAKKYIEAGASEHARSLGPKGS	708
Nt Q43796	LIVGILFGVETLSGVL	LAGSLVSGVQIAIASASNTGGAWDNAKKYIEAGVSEHARTLGPKGS	488
Vv AAF07174	LIAGTLFGVETLAGVL	LAGSLVSGVQVAIASASNTG-----	167
Hv AVP3_HORVU	LIVGTLFGVETLSGVL	LAGALVSGVQIAIASASNTGGAWDNAKKYIEAGNSEHARSLGPKGS	708
At AVP3_ARATH	LIVGFFFVETLSGVL	LAGSLVSGVQIAIASASNTGGAWDNAKKYIEAGVSEHAKSLGPKGS	717
Cm O82680	LIVGILFGVETLSGVL	LAGSLVSGVQIAIASASNTGGAWDNAKKYIEAGASKHARTLGPKGS	715
Pa IPYR_PHAU	LIVGILFGVETLSGVL	LAGSLVSGVQIAIASASNTG-AWDNAKKYIEAGASEHARSLGPKGS	711
Gh O48876	FIVGIFFGVETLSGVL	LAGSLVSGVQVAIASASNTGGAWDNAKKYIEAGASEHAKTLGPKGS	180
Os P93409	LIVGIFFGVETLSGL	LALVSGVQIAIASASNTGGAWDNAKKYIEAGASEHARTLGPKGS	718
	:: * : ***** : ***** : ***** : ***** : *****		

Figura 35. Comparación mediante alineamiento múltiple con ClustalW de la secuencia aminoacídica deducida del fragmento de ADNc de 420 pb de *L. pimpinellifolium* (Lp) (Lp pp042) con algunas secuencias conocidas en las bases de datos para la V-PPasa de *Beta vulgaris* (Bv), *Nicotiana tabacum* (Nt), *Vitis vinifera* (Vv), *Hordeum vulgare* (Hv), *Arabidopsis thaliana* (At), *Cucurbita moschata* (Cm), *Phaseolus aureus* (Pa), *Gossypium hirsutum* (Gh), y *Oryza sativa* (Os). Los residuos idénticos se indican con asterisco y los residuos similares se indican con ":". La secuencia aminoacídica de los cebadores utilizados, c1 y c2, se muestran en rojo. Los posibles dominios transmembranarios se muestran en azul, por similitud de las secuencias con la descrita en la Fig. 11.

Lp pp042	-----GCCCTCTTTGGGGCGTTTGTGAGCCGGGCAGCA	33
EST283648	ATTGGTTCTGCTGCACTTGTGTCTCTTGCCTCTTTGGGGCGTTTGTGAGCCGGGCAGCA	77
EST313712	ATTGGTTCTGCTGCACTTGTGTCTCTTGCCTCTTTGGGGCGTTTGTGAGCCGGGCAGCA	300
EST258264	ATTGGTTCTGCTGCACTTGTGTCTCTTGCCTCTTTGGGGCGTTTGTGAGCCGGGCAGCA	146

Lp pp042	ATTTCCACTGTAGATGTCTTGACTCCTAAAGTCTTTATTGGTCTGCTAGTCGGTGCAATG	93
EST283648	ATTTCCACTGTAGATGTCTTGACTCCTAAAGTCTTTATTGGTCTGCTAGTCGGTGCAATG	137
EST313712	ATTTCCACTGTAGATGTCTTGACTCCTAAAGTCTTTATTGGTCTGCTAGTCGGTGCAATG	360
EST258264	ATTTCCACTGTAGATGTCTTGACTCCTAAAGTCTTTATTGGTCTGCTAGTCGGTGCAATG	206

Lp pp042	CTTCCTTATTGGTTCTCCGCCATGACAATGAAGAGTGTGGAAGTGTCTCTTAAGATG	153
EST283648	CTTCCTTATTGGTTCTCCGCCATGACAATGAAGAGTGTGGAAGTGTCTCTTAAGATG	197
EST313712	CTTCCTTATTGGTTCTCCGCCATGACAATGAAGAGTGTGGAAGTGTCTCTTAAGATG	420
EST258264	CTTCCTTATTGGTTCTCCGCCATGACAATGAAGAGTGTGGAAGTGTCTCTTAAGATG	266

Lp pp042	GTTGAGGAAGTGCGTAGGCAATTCAACACCATCCCTGGTCTCATGGAAGGAACTGCCAAG	213
EST283648	GTTGAGGAAGTGCGTAGGCAATTCAACACCATCCCTGGTCTCATGGAAGGAACTGCCAAG	257
EST313712	GTTGAGGAAGTGCGTAGGCAATTCAACACCATCCCTGGTCTCATGGAAGGAACTGCCAAG	480
EST258264	GTTGAGGAAGTGCGTAGGCAATTCAACACCATCCCTGGTCTCATGGAAGGAACTGCCAAG	326

Lp pp042	CCTGACTATGCCACCTGTGTCAAGATCTCCACAGATGCATCGATCAAGGAGATGATTCCA	273
EST283648	CCTGACTATGCCACCTGTGTCAAGATCTCCACAGATGCATCGATCAAGGAGATGATTCCA	317
EST313712	CCTGACTATGCCACCTGTGTCAAGATCTCCACAGATGCATCGATCAAGGAGATGATTCCA	540
EST258264	CCTGACTATGCCACCTGTGTCAAGATCTCCACAGATGCATCGATCAAGGAGATGATTCCA	386

Lp pp042	CCTGGTGCCCTCGTCATGCTCACTCCATTGATTGTTGGTATCTTGTGGCGTCGAAACA	333
EST283648	CCTGGTGCCCTCGTCATGCTCACTCCATTGATTGTTGGTATCTTGTGGCGTCGAAACA	377
EST313712	CCTGGTGCCCTCGTCATGCTCACTCCATTGATTGTTGGTATCTTGTGGCGTCGAAACA	600
EST258264	CCTGGTGCCCTCGTCATGCTCACTCCATTGATTGTTGGTATCTTGTGGCGTCGAAACA	446

Lp pp042	CTTCTGGTGTCTTGCAGGATCTCTCGTCTCTGGTGTACAGATTGCCATTTCTGCATCC	393
EST283648	CTTCTGGTGTCTTGCAGGATCTCTCGTCTCTGGTGTACAGATTGCCATTTCTGCATCC	437
EST313712	-----	
EST258264	CTTCTGGTGTCTTGCAGGATCTCTCGTCTCTGGTGTACAGATTGCCATTTCTGCATCC	506

Lp pp042	AACACTGGCGGCCTGGGACAACGCA-----	420
EST283648	AACACTGGTGGTGCCTGGGACAACGCTAAGAAGTACATCGAGGCTGGAGCCTCAGAACAT	497
EST313712	-----	
EST258264	AACACTGGTGGTGCCTGGGACAACGCTAAGAAGTACATCGAGGCTGGAGCCTCAGAACAT	566

Figura 36. Alineamiento con ClustalW de la secuencia de nucleótidos de Lp pp042 correspondiente a la V-PPasa de *L. pimpinellifolium* con algunas secuencias EST obtenidas de *L. esculentum*, mostrando un 99.8 % de identidad en la secuencia solapante.

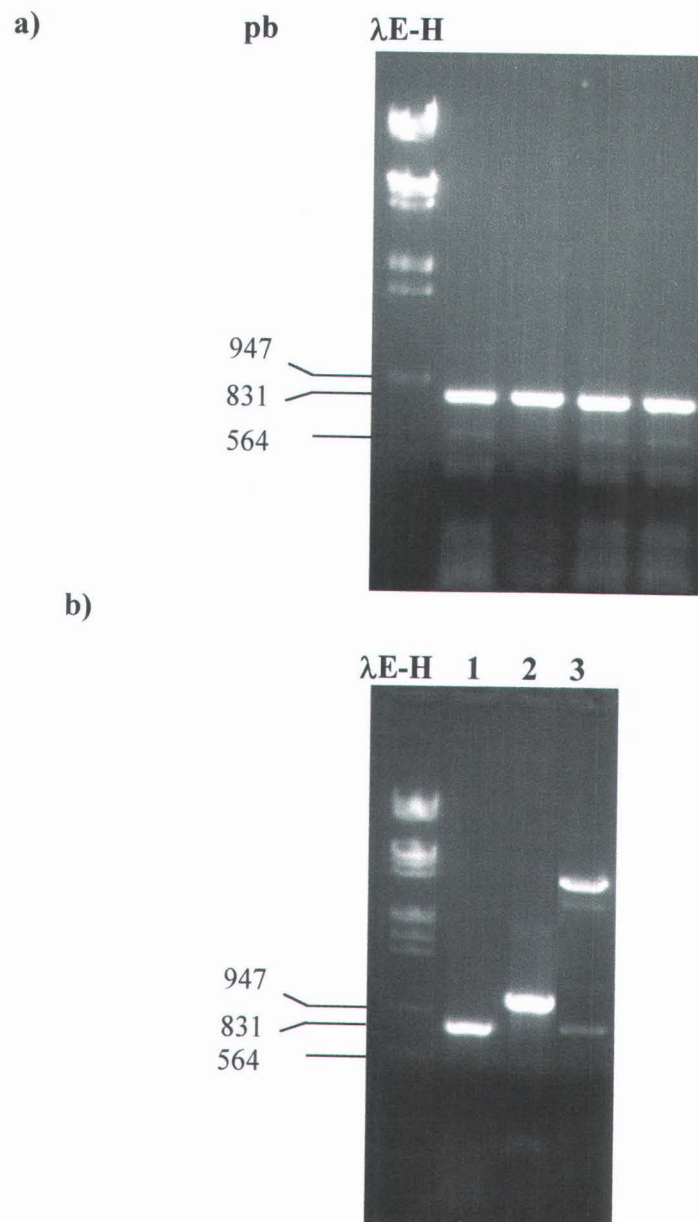


Figura 37. (a) Obtención por PCR de un fragmento de 777 pb correspondiente a la zona codificante de la subunidad A de la V-ATPasa a partir de un ADNc de una genoteca de pelos radiculares de *L. esculentum* construido en λZAPII, utilizando los cebadores específicos, tom 2A-5A (todos los carriles). (b) Carril 1, obtención del inserto clonado en pSTB1 con cebadores específicos tom 2A-5A. Carril 2, obtención del inserto con cebadores universales, p1 y p2. Carril 3, liberación del inserto por digestión con Eco RI. λE-H = ADN del fago λ digerido con EcoRI-HindIII, como marcador de peso molecular (en pb).


```

      10              30              50
      .
GTGCTTATGGATTCCCTCAATTGACAATGACATTGCCTGATGGGCGTGAAGAGTCTGTC
V L M D F P Q L T M T L P D G R E E S V
      70              90              110
      .
ATGAAACGTACTACACTAGTCGTAATACTTCAAACATGCCTGTGGCTGCTCGTGAGGCC
M K R T T L V A N T S N M P V A A R E A
      130             150             170
      .
TCAATCTATACAGGTATTACTATAGCAGAATACTTCAGAGACATGGGATACAATGTCAGT
S I Y T G I T I A E Y F R D M G Y N V S
      190             210             230
      .
ATGATGGCAGATTGCACCTCTCGCTGGGCCGAAGCTTTACGTGAAATCTCAGGTCGATTG
M M A D S T S R W A E A L R E I S G R L
      250             270             290
      .
GCAGAAATGCCTGCAGACAGTGGATATCCGCTTATTTGGCAGCACGTTTGGCATCTTTT
A E M P A D S G Y P A Y L A A R L A S F
      310             330             350
      .
TATGAGCGTCTGGTAAAGTTAAGTGTCTTGGTGGACCAGAGAGAACTGGTAGTGTGACA
Y E R A G K V K C L G G P E R T G S V T
      370             390             410
      .
ATTGTTGGTGCCTTTCTCCTCCAGGAGGAGATTTTTCAGATCCTGTAACATCTGCAACC
I V G A V S P P G G D F S D P V T S A T
      430             450             470
      .
CTTGGTATTGTTTCAGTCTTCTGGGGTCTGGATAAGAAATGGCTCAGAGGAAACACTTT
L G I V Q V F W G L D K K L A Q R K H F
      490             510             530
      .
CCCTCTGTAATTTGGCTTATTTCTTATTCAAATACTCAGGGGCACTCGAGTCCTTTTAT
P S V N W L I S Y S K Y S G A L E S F Y
      550             570             590
      .
GAGAAGTTTGATCCTGATTTTATTAACATAAGGACAAAAGCCCGTGAGGTGCTGCAGAGG
E K F D P D F I N I R T K A R E V L Q R
      610             630             650
      .
GAGGATGACCTAAATGAAATTGTTCAACTTGTCCGAAAGGATGCTCTGGCTGAAACAGAT
E D D L N E I V Q L V G K D A L A E T D
      670             690             710
      .
AAGATTACCTTGAAACTGCAAACTTTTAAGGGAGGACTACCTTGACACAAAATGCTTTT
K I T L E T A K L L R E D Y L A Q N A F
      730             750             770
      .
ACGCCATATGATAAGTTCTGCCCTTTCTACAAATCTGTTTGGATGATGCGCAACATA
T P Y D K F C P F Y K S V W M M R N I

```

Figura 38. Secuencia de nucleótidos del fragmento de 777 pb clonado en pSTB1, correspondiente a la subunidad A de la V-ATPasa de *L. esculentum* y su secuencia deducida de aminoácidos (259).

```

tom2A
VATA TOM -----VLMDFPQLTMTL 12
gi|1352830|Zm PSVLGGTCAIPGAFGCGKTVISQALSKYSNSEAVVYVGCGERGNEMAEVLMDFPQLTMTL 238
gi|3834305|At PSVLGGTCAIPGAFGCGKTVISQALSKYSNSDAVVYVGCGERGNEMAEVLMDFPQLTMTL 300
gi|3169287|Gh PSVLGGTCAIPGAFGCGKTVISQALSKYSNSDAVVYVGCGERGNEMAEVLMDFPQLTMTL 300
gi|2506211|Pa PSVLGGTCAIPGAFGCGKTVISQALSKYSNSDAVVYVGCGERGNEMAEVLMDFPQLTMTL 300
gi|2493123|Hv PSVLGGTCAIPGAFGCGKTVISQALSKYSNSDTVVYVGCGERGNEMAEVLMDFPQLTMTL 257
gi|2493122|Bn PSVLGGTCAIPGAFGCGKTVISQALSKYSNSDAVVYVGCGERGNEMAEVLMDFPQLTMTL 300
gi|2493121|Bv PSVLGGTCAIPGAFGCGKTVISQALSKYSNSDAVVYVGCGERGNEMAEVLMDFPQLTMTL 300
gi|849136|Vr PSVLGGTCAIPGAFGCGKTVISQALSKYSNSDAVVYVGCGERGNEMAEVLMDFPQLTMTL 300
gi|167560|Dc PSVLGGTCAIPGAFGCGKTVISQALSKYSNSDTVVYVGCGERGNEMAEVLMDFPQLTMTL 300
*****

```

```

VATA TOM PDGREESVMKRTTLVANTSNMPVAAREASIYTGITIAEYFRDMGYNVSMADSTRWAEA 72
gi|1352830|Zm PDGREESVMKRTTLVANTSNMPVAAREASIYTGITIAEYFRDMGYNVSMADSTRWAEA 298
gi|3834305|At PDGREESVMKRTTLVANTSNMPVAAREASIYTGITIAEYFRDMGYNVSMADSTRWAEA 360
gi|3169287|Gh PDGREESVMKRTTLVANTSNMPVAAREASIYTGITIAEYFRDMGYNVSMADSTRWAEA 360
gi|2506211|Pa PDGREESVMKRTTLVANTSNMPVAAREASIYTGITIAEYFRDMGYNVSMADSTRWAEA 360
gi|2493123|Hv PDGREESVMKRTTLVANTSNMPVAAREASIYTGITIAEYFRDMGYNVSMADSTRWAEA 317
gi|2493122|Bn PDGREESVMKRTTLVANTSNMPVAAREASIYTGITIAEYFRDMGYNVSMADSTRWAEA 360
gi|2493121|Bv PDGREESVMKRTTLVANTSNMPVAAREASIYTGITIAEYFRDMGYNVSMADSTRWAEA 360
gi|849136|Vr PDGREESVMKRTTLVANTSNMPVAAREASIYTGITIAEYFRDMGYNVSMADSTRWAEA 360
gi|167560|Dc PDGREESVMKRTTLVANTSNMPVAAREASIYTGITIAEYFRDMGYNVSMADSTRWAEA 360
*****

```

```

VATA TOM LREISGRLAEMPADSGYPAYLAARLASFYERAGKVKCLGGPERTGSVTIVGAVSPPGGDF 132
gi|1352830|Zm LREISGRLAEMPADSGYPAYLAARLASFYERAGKVKCLGSPDRNGSVTIVGAVSPPGGDF 358
gi|3834305|At LREISGRLAEMPADSGYPAYLAARLASFYERAGKVKCLGGPERTGSVTIVGAVSPPGGDF 420
gi|3169287|Gh LREISGRLAEMPADSGYPAYLAARLASFYERAGKVKCLGGPERTGSVTIVGAVSPPGGDF 420
gi|2506211|Pa LREISGRLAEMPADSGYPAYLAARLASFYERPGKVKCLGGPERTGSVTIVGAVSPPGGDF 420
gi|2493123|Hv LREISGRLAEMPADSGYPAYLASRLASFYERAGKVQCLGSPDRNGSVTIVGAVSPPGGDF 377
gi|2493122|Bn LREISGRLAEMPADSGYPAYLAARLASFYERAGKVKCLGGPERTGSVTIVGAVSPPGGDF 420
gi|2493121|Bv LREISGRLAEMPADSGYPAYLAARLASFYEAAGKVKCLGGPERTGSVTIVGAVSPPGGDF 420
gi|849136|Vr LREISGRLAEMPADSGYPAYLAARLASFYERPGKVKCLGGPERTGSVTIVGAVSPPGGDF 420
gi|167560|Dc LREISGRLAEMPADSGYPAYLAARLASFYERAGKVKCLGGPERTGSVTIVGAVSPPGGDF 420
*****

```

```

VATA TOM SDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPVSNWLISSKYSKALESFYEKFDPDFINIRT 192
gi|1352830|Zm SDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPVSNWLISSKYSKALESFYEKFDPDFIDIRT 418
gi|3834305|At SDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPVSNWLISSKYSTALESFYEKFDPDFINIRT 480
gi|3169287|Gh SDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPVSNWLISSKYSKALESFYEKFDPDFISIRT 480
gi|2506211|Pa SDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPVSNWLISSKYSTALESFYEQFDPDFINIRT 480
gi|2493123|Hv SDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPVSNWLISSKYSTALEGYEYKFDPDFIDMRT 437
gi|2493122|Bn SDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPVSNWLISSKYSTALESFYEKFDSDFDIRT 480
gi|2493121|Bv SDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPVSNWLISSKYSKALESFYEKFDSEFIDIRT 480
gi|849136|Vr SDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPVSNWLISSKYSTALESFYEQFDPDFINIRT 480
gi|167560|Dc SDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPVSNWLISSKYSTALESFYEKFDSDFDIRT 480
*****

```

(continua página siguiente)

(continua de página anterior)

```

VATA TOM          KAREVLQREDDLNEIVQLVGKDALAETDKITLETAKLLREDDYLAQNAFTPYDKFCPPFYKS 252
gi|1352830|Zm     KAREVLQREDDLNEIVQLVGKDALAESDKITLETAKLLREDDYLAQNAFTPYDKFCPPFYKS 478
gi|3834305|At     KAREVLQREDDLNEIVQLVGKDALAEGDKITLETAKLLREDDYLAQNAFTPYDKFCPPFYKS 540
gi|3169287|Gh     KAREVLQREDDLNEIVQLVGKDALAETDKITLETAKLLREDDYLAQNAFTPYDKFCPPFYKS 540
gi|2506211|Pa     KAREVLQREDDLNEIVQLVGKDALAEGDKITLETAKLLREDDYLAQNAFTPYDKFCPPFYKS 540
gi|2493123|Hv     KAREVLQREDDLNEIVQLVGKDALGESDKITLETAKLLREDDYLAQNAFTPYDKYCPFYKS 497
gi|2493122|Bn     KAREVLQREDDLNEIVQLVGKDALAEGDKITLETAKLLREDDYLAQNAFTPYDKFCPPFYKS 540
gi|2493121|Bv     KAREVLQREDDLNEIVQLVGKDALAETDKITLDTAKLLREDDYLAQNAFTAYDKFCPPFYKS 540
gi|849136|Vr      KAREVLQREDDLNEIVQLVGKDALAEGDKITLETAKLLREDDYLAQNAFTPYDKFCPPFYKS 540
gi|167560|Dc      KAREVLQREDDLNEIVQLVGKDALAETDKITLETAKLLREDDYLAQNAFTPYDKFCPPFYKS 540
*****
tom5A
VWMMRNI----- 259
gi|1352830|Zm     VWMMRNI IHFNLANQAVERAAGTDGHKITYSVIKHRLGDLFYRLVSQKFEDPAEGEAL 538
gi|3834305|At     VWMMRNI IHFYNLANQAVERAAGMDGQKITTYSLIKHRLGDLFYRLVSQKFEDPAEGEDTL 600
gi|3169287|Gh     VWMMRNI VHFNLANQAVEKAAGMDGQKITYSLIKHRLGDLFYRLVSQKFEDPAEGEAL 600
gi|2506211|Pa     VWMMRNI IHFYNLANQAVERGAGSDGQKITYSLIKHRVGDLYRLVSQKFEDPAEGEAL 600
gi|2493123|Hv     VWMMRNI IHFNQLANQAVERAANADGHKITYAVVKSRLGDLFYRLVSQKFEDPAEGEDVL 557
gi|2493122|Bn     VWMMRNI IHFYNLANQAVERGAGMDGQKISYSLIKHRLGDLFYRLVSQKFEDPAEGEDVL 600
gi|2493121|Bv     VWMMRNI IHFYNLANQAVERGAGSDGQKITYSLIKRLGDLFYRLVSQKFEDPAEGEDAL 600
gi|849136|Vr      VWMMRNI IHFYNLANQAVERGAGSDGQKITYSLIKHRVGDLYRLVSQKFEDPAEGEAL 600
gi|167560|Dc      VWMMRNI IHFYNLANQAVERGAGMDGQKISYTLIKHRLGDLFYRLVSQKFEDPAEGEDVL 600
*****

```

Figura 39. Comparación mediante alineamiento múltiple con ClustalW de la secuencia aminoacídica deducida del fragmento de ADNc de 777pb de *L. esculentum* (VATA TOM) con algunas secuencias conocidas en las bases de datos para la sub A de la V-ATPasa de *Zea mays* (Zm), *Arabidopsis thaliana* (At), *Gossypium hirsutum* (Gh), *Phaseolus aureus* (Pa), *Hordeum vulgare* (Hv), *Brassica napus* (Bn), *Beta vulgaris* (Bv), *Vigna radiata* (Vr), *Daucus carota* (Dc). Los residuos idénticos se indican con asteriscos y los residuos similares se indican con ":". La secuencia aminoacídica de los cebadores utilizados, tom2A y tom 5A se muestran en rojo.

```

VATA TOM -----GT 2
EST325418 TAATTCGGATACTGTCGTGTATGTTGGTTGTGGGGAACGAGGGAATGAAATGGCAGAGGT 180
**

VATA TOM GCTTATGGATTCCCTCAATTGACAATGACATTGCCTGATGGCGTGAAGAGTCTGTCAT 62
EST325418 AATTATGGATTCCCTCAATTGACAATGACATTGCCTGATGGCGTGAAGAGTCTGTCAT 240
*****

VATA TOM GAAACGTACTACACTAGTCGCTAATACTTCAAACATGCCTGTGGCTGCTCGTGAGGCCTC 122
EST325418 GAAACGTACTACACTAGTCGCTAATACTTCAAACATGCCTGTGGCTGCTCGTGAGGCCTC 300
*****

VATA TOM AATCTATACAGGTATTACTATAGCAGAATACTTCAGAGACATGGGATACAATGTCAGTAT 182
EST325418 AATCTATACAGGTATTACTATAGCAGAATACTTCAGAGACATGGGATACAATGTCAGTAT 360
*****

VATA TOM GATGGCAGATTTCGACCTCTCGCTGGGCCGAAGCTTTACGTGAAATCTCAGGTCGATTGGC 242
EST325418 GATGGCAGATTTCGACCTCTCGCTGGGCCGAAGCTTTACGTGAAATCTCAGGTCGATTGGC 420
*****

VATA TOM AGAAATGCCTGCAGACAGTGGATATCCTGCTTATTTGGCAGCACGTTTGGCATCTTTCTA 302
EST325418 AGAAATGCCTGCAGACAGTGGATATCCTGCTTATTTGGCAGCACGTTTGGCATCTTTCTA 480
*****

VATA TOM TGAGCGTGCTGGTAAAGTTAAGTGTCTTGGTGGACCAGAGAGAAGTGGTAGTGTGACAAT 362
EST325418 TGAGCGTGCTGGTAAAGTTAAGTGTCTTGGTGGACCAGAGAGAAGTGGTAGTGTGACAAT 540
*****

VATA TOM TGTTGGTGCCGTTTCTCCTCCAGGAGGAGATTTTTCAGATCCTGTAACATCTGCAACCCT 422
EST325418 TGTTGGTGCCGTTTCTCCTCCAGGAGGAGATTTTTCAGATCCTGTAACATCTGCAACCCT 570
*****

```

Figura 40. Alineamiento con *ClustalW* de la secuencia de nucleótidos de VATA TOM correspondiente a la V-ATPasa de *L. esculentum* con una secuencia EST obtenida de *L. esculentum*, mostrando un 99.8 % de identidad en la secuencia solapante.

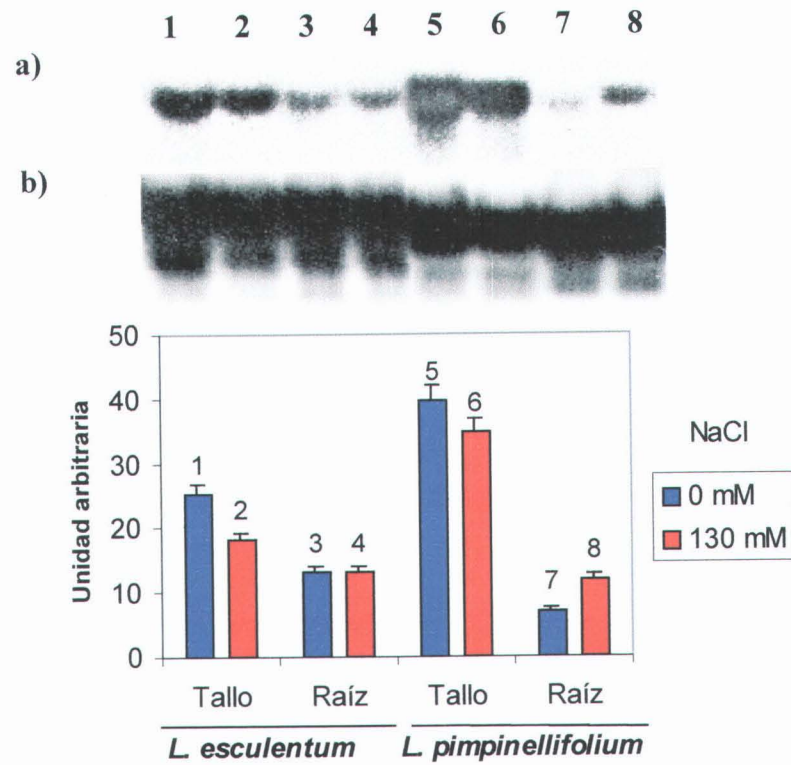


Figura. Análisis por Northern blot ($10\mu\text{g}$ de ARN total por carril) de los niveles de transcrito para la V-PPasa (apartado IV.D.2) en tejidos de tallo y raíces de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium*, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl, así como el análisis cuantitativo de intensidad de las distintas bandas (a), relativizadas mediante el resonado con sonda de ADNr 18S de tomate como control de carga (b).

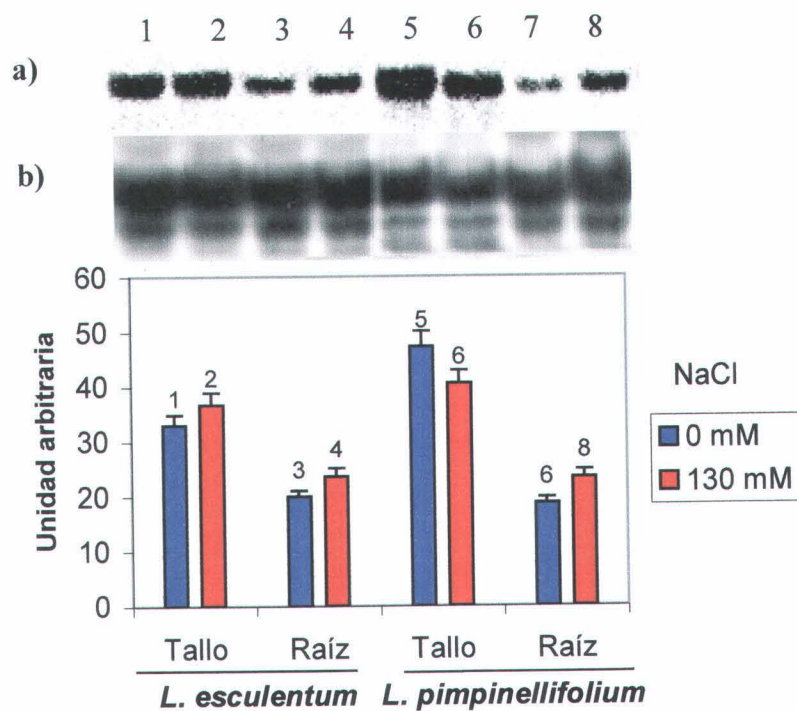


Figura 42. Análisis por Northern blot ($10\mu\text{g}$ de ARN total por carril) de los niveles de transcrito para la subunidad A de la V-ATPasa (apartado IV.D.3) en tejidos de tallo y raíces de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium* tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl, así como el análisis cuantitativo de la intensidad de las distintas bandas (a), relativizadas mediante el resonado con la sonda de ADNr 18S de tomate como control de carga (b).

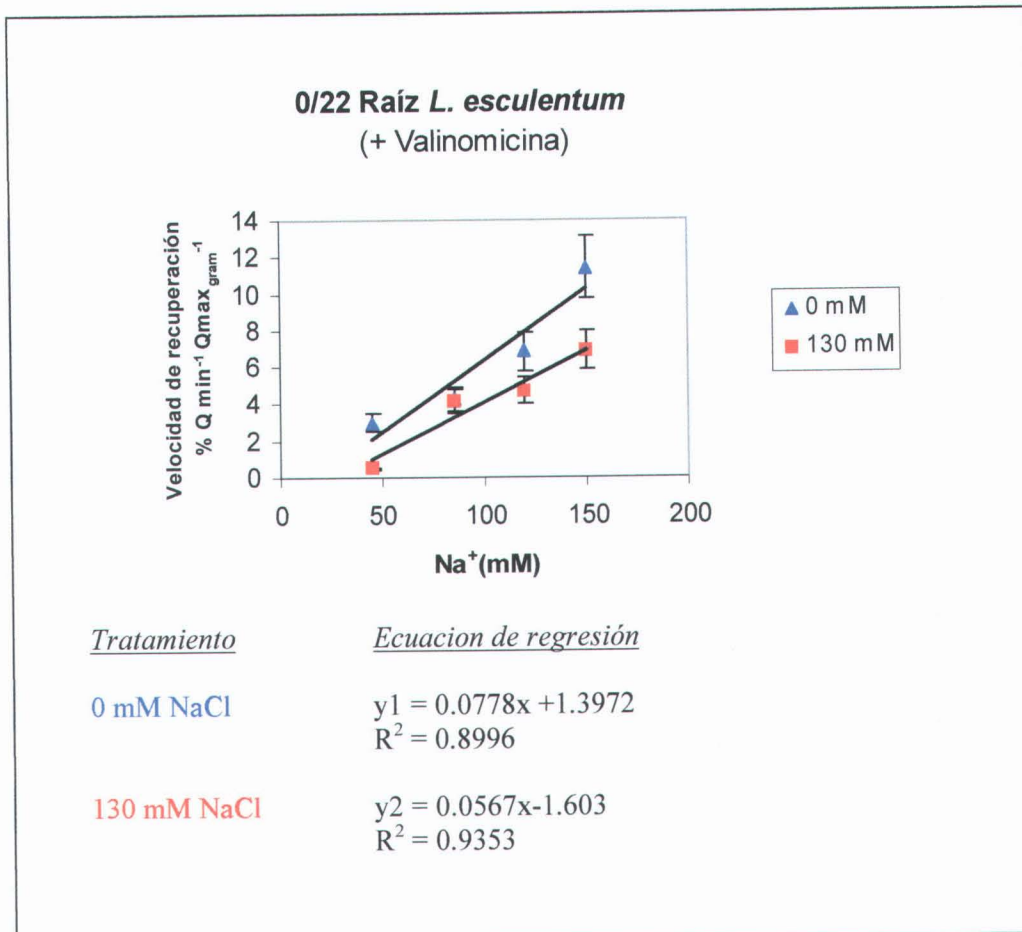


Figura 43. Velocidad inicial de recuperación de la fluorescencia, en función de la concentración de Na^+ en el medio de ensayo de la actividad antiportadora, en presencia de valinomicina, en vesículas de tonoplasto aisladas de raíces de *L. esculentum* var. Pera, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las líneas se trazaron de acuerdo con las funciones que daban un mejor ajuste. Los datos son la media de dos experimentos independientes (\pm DE).

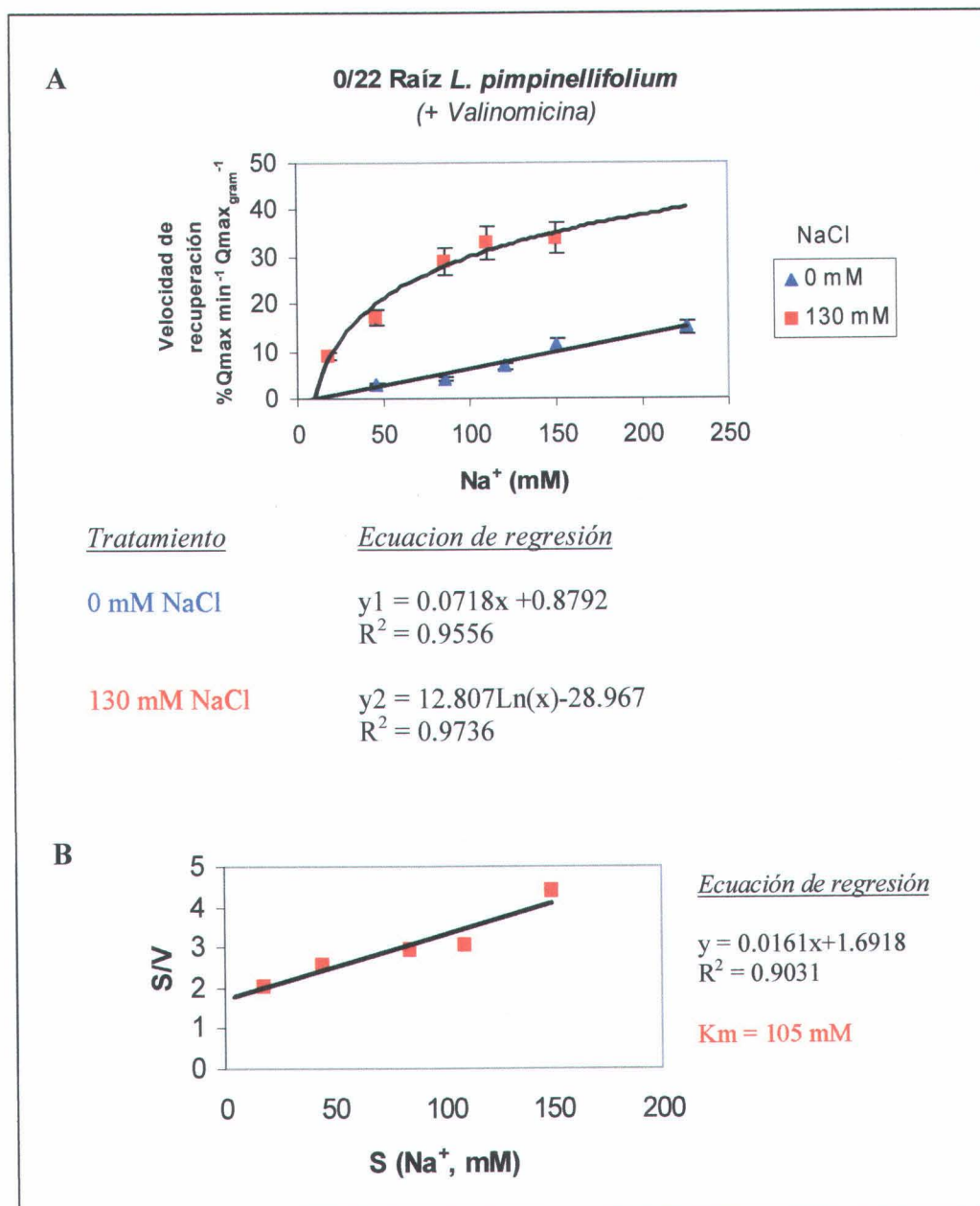


Figura 44. (A) Velocidad inicial de recuperación de la fluorescencia, en función de la concentración de Na⁺ en el medio de ensayo de la actividad antiportadora en presencia de valinomicina, en vesículas de tonoplasto aisladas de raíces de *L. pimpinellifolium* tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las líneas se trazaron de acuerdo con las funciones que daban un mejor ajuste. Los datos son la media de dos experimentos independientes (\pm DE). (B) Representación de Hanes-Wolf derivada de la cinética obtenida en (A).

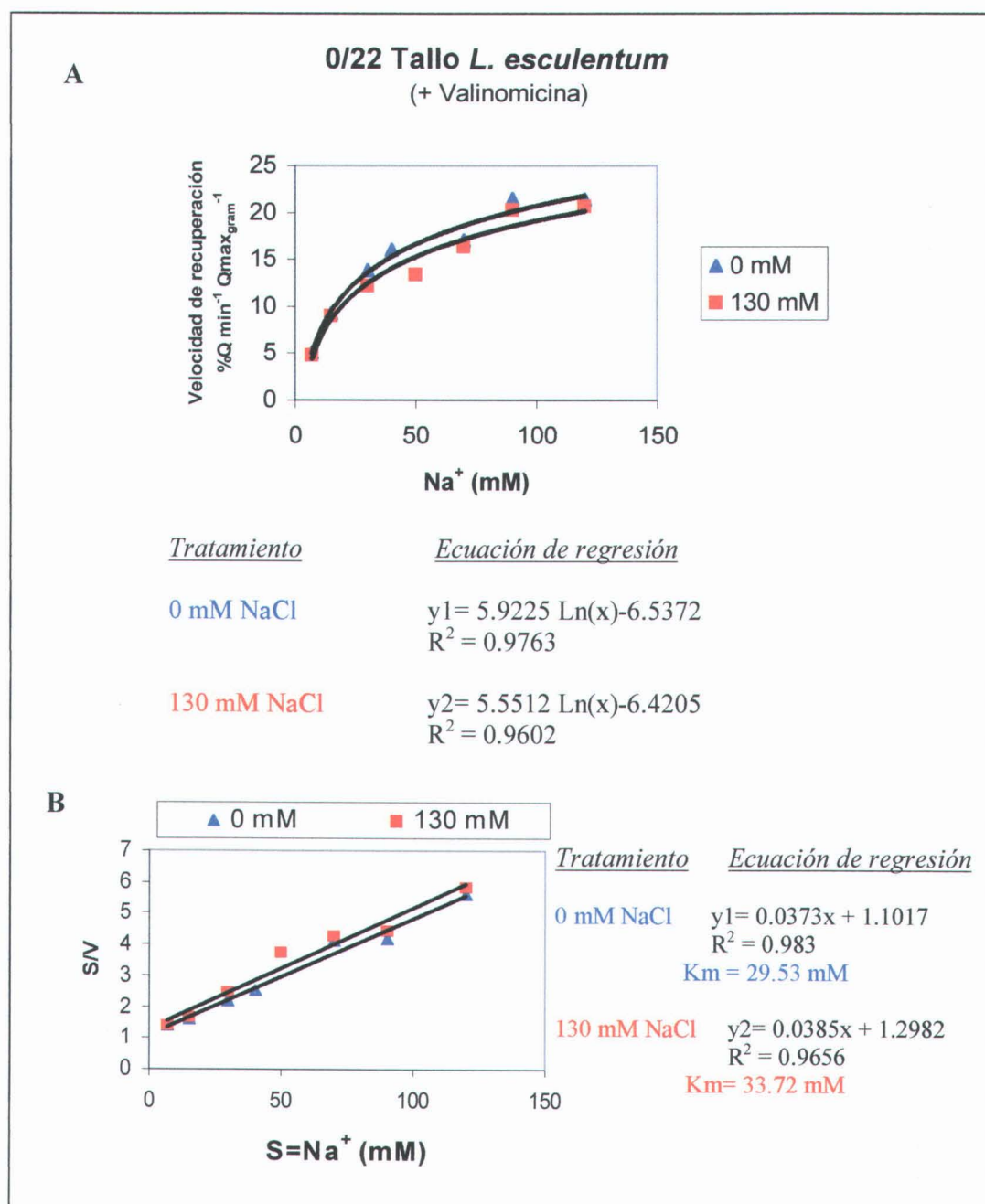


Figura 45. Velocidad inicial de recuperación de la fluorescencia en función de la concentración de Na^+ en el medio en el medio de ensayo de la actividad antiportadora en presencia de valinomicina, en vesículas de tonoplasto aislados de tallos de *L. esculentum* var. Pera, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las líneas se trazaron de acuerdo con las funciones que daban un mejor ajuste. Los datos son la media de dos experimentos independientes (\pm DE). (B) Representación de Hanes-Wolf derivadas de la cinética obtenida en (A).

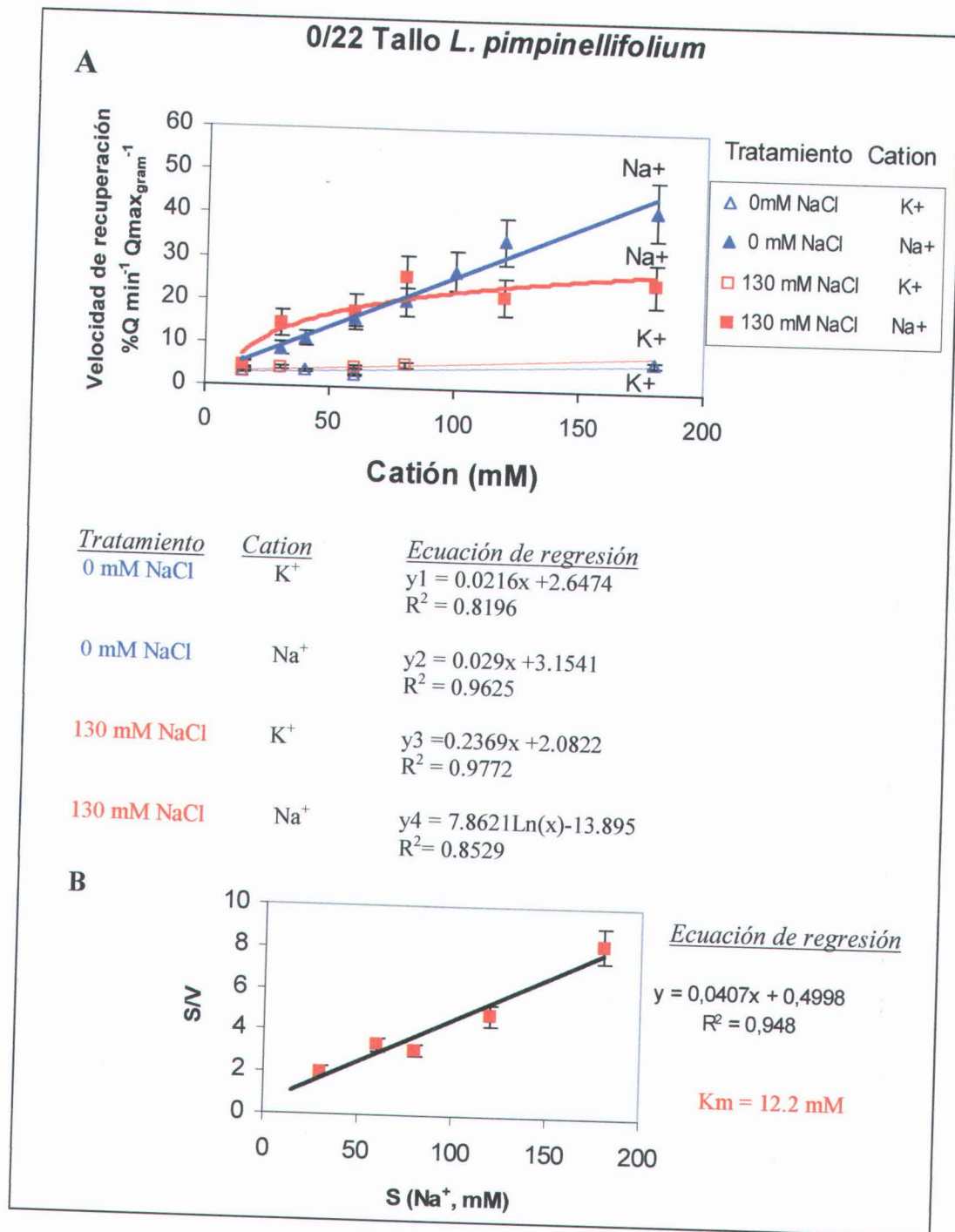


Figura 46. A) Velocidad inicial de recuperación de la fluorescencia, en función de la concentración de Na⁺ y K⁺ en el medio de ensayo de la actividad antiportadora en ausencia de valinomicina, en vesículas de tonoplasto aisladas de tallos de *L. pimpinellifolium* tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las líneas se trazaron de acuerdo con las funciones que daban un mejor ajuste. Los datos son la media de dos experimentos independientes (\pm DE). (B) Representación de Hanes-Wolf derivada de la cinética obtenida en (A).

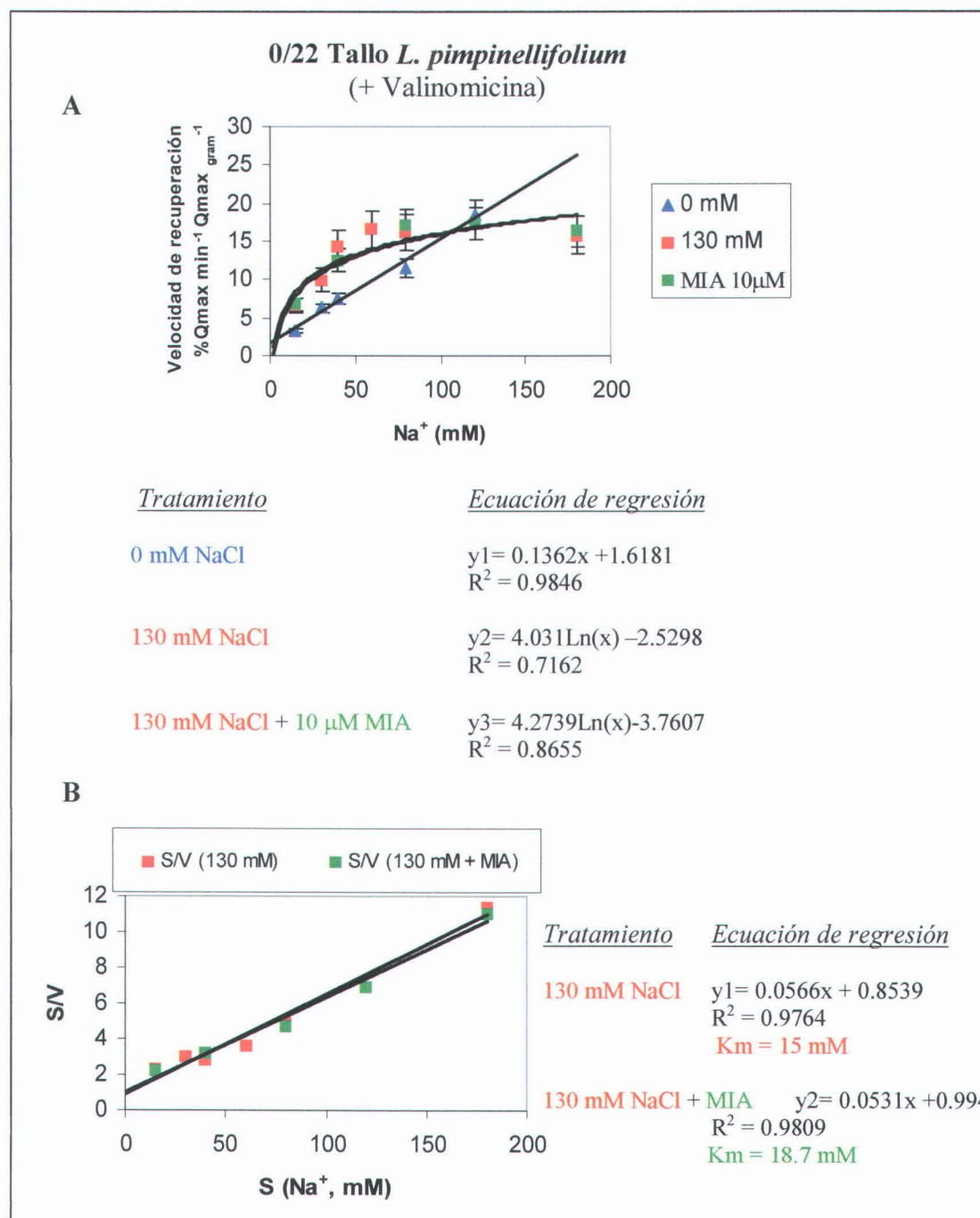


Figura 47. (A) Efecto de análogos de amilórido (MIA) sobre la velocidad inicial de recuperación de la fluorescencia, en función de la concentración de Na⁺ en el medio de ensayo de la actividad antiportadora en presencia de 0.25 μM valinomicina, en vesículas de tonoplasto aisladas de *tallos* de *L. pimpinellifolium* tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl. Las líneas se trazaron de acuerdo con las funciones que daban un mejor ajuste. Los datos son la media de dos experimentos independientes (± DE). (B) Representación de Hanes-Wolf derivada de la cinética obtenida en (A).


```

VATA TOM -----GT 2
EST325418 TAATTCGGATACTGTCGTGTATGTTGGTTGTGGGAACGAGGAATGAAATGGCAGAGGT 180
                                                **

VATA TOM GCTTATGGATTTCCCTCAATTGACAATGACATTGCCTGATGGGCGTGAAGAGTCTGTCAT 62
EST325418 AATTATGGATTTCCCTCAATTGACAATGACATTGCCTGATGGGCGTGAAGAGTCTGTCAT 240
*****

VATA TOM GAAACGTACTACACTAGTCGCTAATACTTCAAACATGCCTGTGGCTGCTCGTGAGGCCTC 122
EST325418 GAAACGTACTACACTAGTCGCTAATACTTCAAACATGCCTGTGGCTGCTCGTGAGGCCTC 300
*****

VATA TOM AATCTATACAGGTATTACTATAGCAGAATACTTCAGAGACATGGGATACAATGTCAGTAT 182
EST325418 AATCTATACAGGTATTACTATAGCAGAATACTTCAGAGACATGGGATACAATGTCAGTAT 360
*****

VATA TOM GATGGCAGATTCGACCTCTCGCTGGGCCGAAGCTTTACGTGAAATCTCAGGTCGATTGGC 242
EST325418 GATGGCAGATTCGACCTCTCGCTGGGCCGAAGCTTTACGTGAAATCTCAGGTCGATTGGC 420
*****

VATA TOM AGAAATGCCTGCAGACAGTGGATATCCTGCTTATTTGGCAGCACGTTTGGCATCTTTCTA 302
EST325418 AGAAATGCCTGCAGACAGTGGATATCCTGCTTATTTGGCAGCACGTTTGGCATCTTTCTA 480
*****

VATA TOM TGAGCGTGCTGGTAAAGTTAAGTGTCTTGGTGGACCAGAGAGAAGTGGTAGTGTGACAAT 362
EST325418 TGAGCGTGCTGGTAAAGTTAAGTGTCTTGGTGGACCAGAGAGAAGTGGTAGTGTGACAAT 540
*****

VATA TOM TGTGGTGCCGTTTCTCCTCCAGGAGGAGATTTTCAGATCCTGTAACATCTGCAACCCT 422
EST325418 TGTGGTGCCGTTTCTCCTCCAGGAGGAGATTTTCAGATCCTGTAACATCTGCAACCCT 570
*****

```

Figura 40. Alineamiento con ClustalW de la secuencia de nucleótidos de VATA TOM correspondiente a la V-ATPasa de *L. esculentum* con una secuencia EST obtenida de *L. esculentum*, mostrando un 99.8 % de identidad en la secuencia solapante.

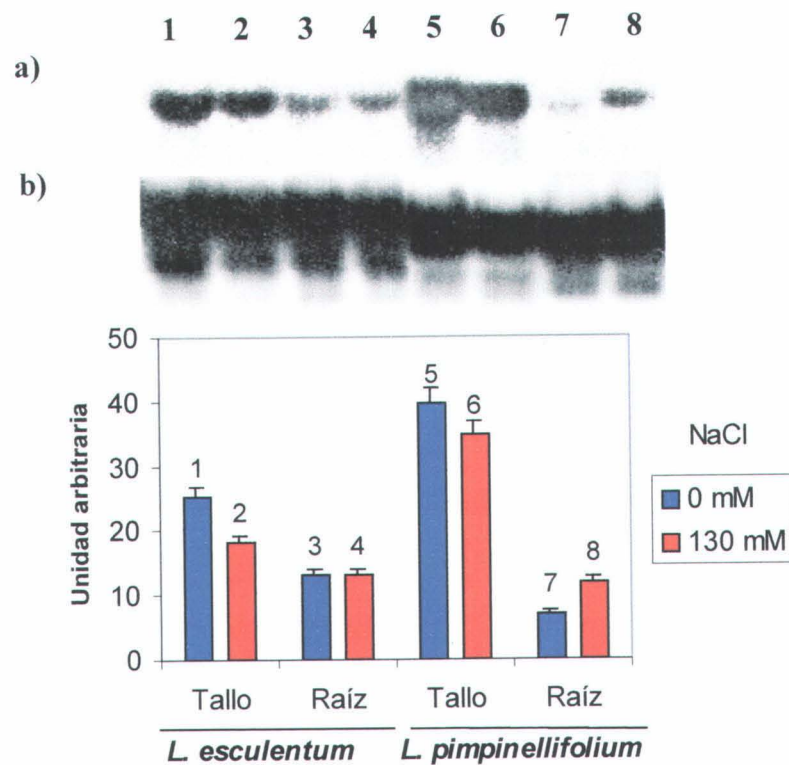


Figura. Análisis por Northern blot ($10\mu\text{g}$ de ARN total por carril) de los niveles de transcrito para la V-PPasa (apartado IV.D.2) en tejidos de tallo y raíces de *L. esculentum* var. Pera y *L. pimpinellifolium*, tratadas durante 8 días con 0 y 130 mM NaCl, así como el análisis cuantitativo de intensidad de las distintas bandas (a), relativizadas mediante el resonado con sonda de ADNr 18S de tomate como control de carga (b).



VI. Discusión

El incremento de la salinidad de los suelos en zonas externas del mundo está determinando la importancia creciente del estudio de los mecanismos de tolerancia a la salinidad, fundamental a la hora de generar cultivos con una mayor capacidad de adaptación a este tipo de estrés. Los estudios fisiológicos y bioquímicos han demostrado que, en la adaptación a la salinidad, las plantas emplean una compleja red de procesos integrados a nivel celular y organismo, basada en la regulación del transporte de iones y agua, su distribución a nivel de tejido y órgano, y en adecuado mantenimiento del turgor, mediante la compartimentación de iones y la síntesis de solutos osmocompatibles (**Greenway y Munns 1980, Cheeseman 1988, Nelson y col. 1999**).

En este sentido, el tomate es uno de los cultivos hortícolas con mayor importancia económica a nivel regional, nacional y mundial, presenta problemas de salinización creciente, debido a prácticas de riego inadecuadas y una alta velocidad de evaporación, por lo que la investigación de la mejora del tomate para la tolerancia a este factor abiótico, continúa representando un problema por resolver, debido entre otras razones al desconocimiento de las diferencias fisiológicas, bioquímicas y moleculares entre especies y variedades con diferente grado de tolerancia.

A falta de otros sistemas experimentales deseables como plantas mutantes o transformadas con genes sobreexpresados o inhibidos que impliquen a los factores objeto de estudio (**Gaxiola y col. 1992, Saneoka y col. 1995**), teniendo en cuenta que el programa de mejora de plantas de tomate esta basado sobre la introducción de rasgos halofíticos de plantas silvestres en especies cultivada (**Cuartero y col. 1992**), la utilización de variedades de una misma especie que difieren en el grado de tolerancia, con fines comparativos, pueden ayudar a evaluar la relevancia de aquellos sistemas de transporte en mecanismo de adaptación a al salinidad. Para ello, en nuestro estudio, se compara la especies cultivada *L. esculentum* var. Pera con la silvestre *L. pimpinellifolium*, esta última que constituye un mejor donador de la tolerancia a la sal, presentando casgos

de que las raíces de *L. pimpinellifolium* mantienen un alto contenido en K^+ , sugiere la existencia de una eficiente selectividad K^+/Na^+ en condiciones de salinidad. Resultados similares se encontraron en *L. esculentum* GC-72 (Alfocea y col. 1993), sin embargo la cultivada Pera carece de dicho sistema. El incremento de acumulo de K^+ y Na^+ en la raíz y la velocidad de extrusión al tallo, aportado por esta especie según indica (Guerrier. 1996), neutraliza el exceso de la carga negativa de Cl^- . La consecuencia de implicación de solutos inorgánicos en el ajuste osmótico permite un menor coste energético (Alarcon y col 1993) y un mejor almacenaje de iones a nivel de la vacuola (Cuartero y col 1992).

Por otra parte, distintas investigaciones han demostrado que el Ca^{2+} es un factor importante en la tolerancia de las plantas a la salinidad, al condicionar la permeabilidad de las membranas celulares al Na^+ (Bañuls y Primo-Millo 1992, Epstein 1998) y regula el transporte de K^+ en presencia de Na^+ (Liu y Zhu 1998). Los resultados de este trabajo han mostrados la capacidad de las dos especies en estudio de mantener constante la concentración de Ca^{2+} en condiciones salinas, lo cual representa una respuesta adaptativa de las plantas a esta concentración salina.

Otra respuesta adaptativa en la protección de organulos de citosol mediante el transporte de solutos orgánico desde la vacuola hacia el citoplasma (Mc Nutty.1985) y por acumulación de prolina. En este trabajo el estrés salino indujo un una mayor acumulación de prolina, sobre todo, en hojas jóvenes de la variedad cultivada respecto a *L. pimpinellifolium* permite de sugerir, como postularon Perez-Alfocea y col. 1993, Guerrier 1996, que la acumulación de prolina es secuencia del déficit inducido por el estrés salino. La disminución del contenido de azúcares

Plantas jóvenes de tomate tolerantes a la sal por dos vías 1- por eficiente control stomatal reduciendo la pérdida de agua al estress hídrico, 2 por acumulación de solutos (ajuste osmótico), mas tarde cuando el estress osmótico es moderado,el ajuste osmótico se lleva a cabo fundamentalmente por absorción de Cl^- y Na^+ , Sin embargo cuando el estress en severo el ajuste osmótico interviene el

halofíticos tanto en crecimiento autotrófico como *in vivo* (**Perez-Alfocea y col. 1993, Guerrier y Bougeais-Cherllon 1994**)

Desde esta perspectiva, a nivel celular, es bien conocido que los mecanismos que gobiernan el control de la absorción selectiva de iones y su acumulación en vacuolas, por lo que la caracterización y la identificación de estos procesos, son claves en la tolerancia a la salinidad (**Shannon y col. 1994, Niu y Col. 1995**). Las bombas primarias de H^+ localizadas en plasmalema y tonoplasto deben jugar un papel fundamental en la tolerancia al salino, ya que son determinantes del transporte de iones, solutos y agua a través de las membranas, y por tanto de las condiciones osmóticas, iónicas y nutricionales idóneas para el óptimo funcionamiento celular.

En un primer estadio de este trabajo, se han llevado a cabo experimentos encaminados a la definición del modelo experimental y a la evaluación de la idoneidad de las variedades de tomate y condiciones de cultivo adecuadas a nuestro estudio. Para ello, según **Bolarin y col. 1993**, cuando se utilizan diferentes métodos en la determinación de la tolerancia de las plantas a la salinidad, los resultados son comparables cuando el efecto de la sal se determinó en plantas maduras o el tiempo de aplicación del tratamiento es suficientemente largo para que la planta pudiera desarrollar los mecanismos de tolerancia a la sal. Por ello, fue necesario optimizar las condiciones de cultivo, tal como el tiempo de aplicación, la duración y la severidad de los tratamientos, concretándose en 130 mM durante 8 días de tratamiento, tras 3 semanas de cultivo en solución hidropónica. La capacidad de adaptación se encontró a niveles moderados de tratamiento, probablemente debido a los efectos negativos de altas concentraciones durante el periodo de crecimiento (**Cano y col. 1991**).

El efecto de la salinidad sobre las plantas se expresó como la reducción de peso fresco y seco de diferentes tejidos, por lo que el crecimiento vegetativo constituye un criterio de evaluación de tolerancia usualmente empleado en la comparación de diferentes variedades incluso las plantas de tomate (**Cruz y col**

1990). En función del efecto de NaCl sobre el crecimiento de la raíz y parte aérea, La variedad silvestre *L. pimpinellifloium* mostró una leve, pero significativamente mayor tolerancia que la variedad cultivada debido a su capacidad de crecimiento bajo condiciones salinas y de la presencia de un mecanismo de ajuste interno de concentración de NaCl. La inhibición de crecimiento de la variedad cultivada se acompaña con un contenido hídrico similar, así la causa de esta reducción de crecimiento no se debe al déficit hídrico. En cualquier caso, esta inhibición de crecimiento se interpreta como la necesidad que tiene la planta de utilizar los carbohidratos como aporte energético, para la regulación de la concentración de iones en células y tejidos, así como la síntesis de solutos orgánicos para el ajuste osmótico, protección de macromoléculas y el mantenimiento de la integridad de las membranas. En este sentido, numerosos estudios han demostrado que la acumulación de solutos orgánicos en los tejidos parece constituir una indicación de la capacidad de la planta para restituir el turgor causado por la disminución del potencial hídrico (Folwers y col. 1977, Greenway y Munns 1980). Las especies glicófitas acumulan mayoritariamente como solutos osmocompatibles, azúcares, alcoholes, prolina y glicina-betaina (Rhodes 1987), mientras que las hahófitas acumulan fundamentalmente iones inorgánicos para su ajuste osmótico (Flowers y col. 1977). En algunas glicófitas tolerantes, dicho ajuste es conseguido parcialmente por la compartimentación intracelular de Na^+ y Cl^- . Las plantas pueden establecer el ajuste osmótico tanto por absorción de iones a través de la raíz y su posterior acumulación en la parte aérea, la acumulación de Na^+ y Cl^- suele ser tóxica y puede ser una de las posibles causas de la inhibición de crecimiento bajo altas concentraciones salinas (Green way y Munns, 1980, yeo y flowers, 1986). En tallos de las dos variedades estudiadas, la acumulación de Na^+ y Cl^- se acompaña con una reducción de concentración de K^+ . A este respecto, en bien conocido que la absorción de grandes cantidades de iones Na^+ y Cl^- provoca una alteración en la absorción de K^+ .

En este trabajo el estrés salino indujo una mayor acumulación de prolina en términos absolutos, sobre todo, en hojas jóvenes de *L. esculentum*

Otro proceso clave en la tolerancia de las plantas a la salinidad es la regulación de la composición iónica citoplasmática (Rubio y col. 1995). El hecho

coste energético debido a la contribución de solutos orgánicos.(alto coste energético).

Esta observación relacionada con los cambios morfológicos causados por la salinidad en la especie domesticada.(Alarcón y col 1993)

El contenido de Na de la parte aérea de las dos variedades ensayadas incremento notablemente tras 8 días de cultivo en 130 mM NaCl, aunque más en tallos y raíces de ambas especies

Para abordar el papel que juegan las bombas primarias y secundarias de plasmalema y tonoplasto en los mecanismos de tolerancia al estrés salino en las dos variedades de tomate en estudio fue necesario la optimización de los protocolos de obtención de membranas enriquecidas. Para ello, se utilizo el sistema de partición de fases en dextrano y polietilenglicol descritos en (apartado) para la obtención de membranas altamente enriquecida plasmalema determinada por la fuerte inhibición por vanadato de la actividad H^+ -ATPasa (Figura), así como por inmunodetección con los anticuerpos frente a la ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis thaliana*.

El papel del enzima ATPasa de plasmalema en la tolerancia de las plantas a la salinidad ha sido investigado en varias especies glicófitas y halófitas, habiendose obtenido resultados dispares en función de la especie y condición experimental utilizada. En glicófitas la salinidad inhibió parcialmente la actividad ATPasa de plasmalema de cebada (Yamashita y col. 1994) y girasol (Ballesteros y col. 199), mientras que incrementó en células de *M. Crystallinum* (Vara-Estrella y col. 1999), no afectándose en células de zanahoria (Colombo y Cerena 1993).

La inhibición de la actividad ATPasa de plasmalema se acompañó con una disminución paralela de la proteína antigénica desarrollada frente la



VII. Conclusiones



VIII. Bibliografía

- Abad-Berjon M (1995)** Sustratos para el cultivo sin suelo. *En* El cultivo de tomate. Nuez F (eds) pp. 351-383 Mundi-Prensa.
- Abel GH (1969)** Inheritance of the capacity for chloride exclusion by soybean. *Crop Sci* 9: 697-699.
- AFNOR 85619, NFV05-116 (1985)** Fruits, legumes et produits dérivés. Détermination de la teneur en chlorures. Méthode potentiométrique.
- Allen GJ, Wyn Jones RG, Leigh RA (1995)** Sodium transport measured in plasma membrane vesicles isolated from wheat genotypes with differing K^+/Na^+ discrimination traits. *Plant Cell Environm* 18: 105-15.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997)** Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 22: 3389-3402.
- Ames NB (1966)** Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol* 8: 115-119.
- Amtmann A, Sanders D (1999)** Mechanisms of uptake Na^+ by plant cells. *Adv. Bot. Res* 29: 75-12.
- Anderson JA, Huprikar SS, Kochian LV, Lucas WJ, Gaber RF (1992)** Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3736-3740.
- Anónimo (2000)** El cultivo de tomate. <http://www.in/oapro.com/hortalizas/tomate.csp>
#2.1.2.humedad.
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999)** Salt tolerance conferred by overexpression of vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.
- Arrillaga I, Gil-Mascarell, Giobert C, Sales E, Montesinos C, Serrano R, Moreno V (1998)** Expression of the yeast *HAL2* gene in tomato increases the in vitro salt tolerance of transgenic progenie. *Plant Sci* 136: 219-226.
- Ashraf M (1994)** Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 13: 121-138.
- Auer M, Scarborough GA, Kühlbrandt W (1998)** Three-dimensional map of the plasma membrane H^+ -ATPase in the open conformation. *Nature* 392: 840-843.

- Axelsen KB, Palmgren MG (1998)** Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* 46: 84-101.
- Axelsen KB, Venema K, Jahn T, Baunsgaard L, Palmgren MG (1999)** Molecular dissection of the C-terminal regulatory domain of the plant plasma membrane H⁺-ATPase AHA2: Mapping of residues that when altered gives rise to an activated enzyme. *Biochemistry* 38: 7227-7234.
- Ayala F, O'Leary JW, Schumaker KS (1996)** Increased vacuolar and plasma membrane H⁺-ATPase activities in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *J Exp Bot* 47: 25-32.
- Ayers AO, Vazquez N, de la Rubia A, Blaso E, Samplon S (1960)** Saline and sodic soils of Spain. *Soil Science* 90: 133-138.
- Ballesteros E, Donaire JP, Belver A (1996)** Effects of salt stress on H⁺-ATPase and H⁺-PPase activities of tonoplast-enriched vesicles isolated from sunflower roots. *Physiol Plant* 97: 259-268.
- Ballesteros E, Blumwald E, Donaire JP, Belver A (1997)** Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. *Physiol Plant* 99: 328-334.
- Ballesteros E, Kerkeb B, Donaire JP, Belver A (1998)** Effects of salt stress on H⁺-ATPase activity of plasma membrane-enriched vesicles isolated from sunflower roots. *Plant Sci.* 134: 181-190.
- Baltscheffsky M, Schultz A, Baltshchfsky H (1999)** H⁺-proton-pumping inorganic pyrophosphatase: tightly membrane-bound family. *FEBS Lett* 452: 121-127.
- Bañuls J, Primo-Millo E (1992)** Effect of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of citrus plants. *Physiol Plant* 86: 115-123.
- Bañuls J, Ratajczak R, Lüttge (1994)** Solubilization and functional reconstitution of the tonoplast H⁺-ATPase from *Citrus* in liposomes. *J Plant Physiol* 144: 74-79.
- Barkla BJ, Charuk JHM, Cragoe EJJ, Blumwald E (1990)** Photolabeling of tonoplast from sugar beet cell suspensions by [³H]5-(N-methyl-N isobutyl)-amiloride, an inhibitor of vacuolar Na⁺/H⁺ antiport. *Plant Physiol* 93: 924-930.

- Barkla BJ, Blumwald E (1991)** Identification of a 170 kDa protein associated with the vacuolar Na⁺/H⁺ of *Beta vulgaris*. Proc Natl Acad Sci USA 88: 11177-11181.
- Barkla BJ, Zingarelli L, Blumwald E, Smith JAC (1995)** Tonoplast Na⁺/H⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Physiol 109: 549-556.
- Barkla BJ, Pantoja O (1996)** Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 159-184.
- Bartolomew DM, Rees DJG, Rambaut A, Smith JAC (1996)** Isolation and sequence analysis of a cDNA encoding the c subunit of a vacuolar-type H⁺-ATPase from the CAM plant *Kalanchoe doigre montiana*. Plant Mol Biol 31: 435-442.
- Bates LS, Waldrew RP, Teare ID (1973)** Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil 39: 205-207.
- Baunsgaard L, Venema K, Axelsen KB, Villalba JM, Welling A, Wolenweber B, Palmgren MG (1996)** Modified plant plasma membrane H⁺-ATPase with improved transport coupling efficiency identified by mutant selection in yeast. Plant J 10: 451-458.
- Baunsgaard L, Fuglsang AT, Jahn T, Korthout MA, de Boer AH, Palmgren MG (1998)** The 14-3-3 proteins associate with the plant plasma membrane H⁺-ATPase to generate a fusicoccin binding complex and a fusicoccin responsive system. Plant J 13: 661-671.
- Baykov AA, Bakuleva NP, Rea PA (1993)** Steady-state kinetics of substrate hydrolysis by vacuolar H⁺-pyrophosphatase: a simple three-state model. Eur J Biochem 217: 755-762.
- Beffagna N Y, Romani G (1994)** Suitability of *Arabidopsis* for studies on intracellular pH regulation: correlation between H⁺ pump activity, cytosolic pH and malate level in wild-type and in a mutant partially insensitive to fusicoccin. Plant Cell Environm 17: 681-690.
- Belda JE, Lasteres J (2000)** Reglamento de producción integrada de tomate bajo abrigo: Resumen de aspectos importantes, pp 1-7. En http://www.infoagro.com/pro_integrada/andalucia_tomate.asp.

- Belver A, Travis RL (1990)** Effect of NaCl and mannitol on plasma membrane proteins in corn roots. *Protoplasma* 155: 76-84.
- Bennett AB, Spanswick RM (1983)** Optical measurements of ΔpH and $\Delta\Psi$ in corn roots membranes vesicles. Kinetic analysis of Cl⁻ effects on a proton-translocating ATPase. *J Membr Biol* 71: 95-107.
- Berkelman T, Hontchens KA, Dupont FM (1994)** Two cDNA clones encoding isoforms of the B subunit of the vacuolar ATPase from barley roots. *Plant Physiol* 104: 287-288.
- Bille J, Weiser T, Bentrup FW (1992)** The lysolipid sphingosine modulates pyrophosphatase activity in tonoplast vesicles and isolated vacuoles from a heterotrophic cell suspension culture of *Chenopodium rubrum*. *Physiol Plant* 84: 250-254.
- Binzel ML (1995)** NaCl-induced accumulation of tonoplast and plasma membrane H⁺-ATPase message in tomato. *Plant Physiol* 94: 722-728.
- Blatt MR, Thield G (1994)** K⁺ channel of stomated guard cells: bimodal control of K⁺ inward-rectifier evoked by auxin. *Plant J* 5: 55-68.
- Blumwald E, Poole RJ (1985)** Na⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 78: 163-167.
- Blumwald E (1987)** Tonoplast vesicles as a tool in the study of ion transport at the plant vacuole. *Physiol Plant* 69: 731-734.
- Blumwald E, Poole RJ (1987)** Salt-tolerance in suspension cultures of sugar beet. Induction of Na⁺/H⁺ antiport activity at the tonoplast by growth in salt. *Plant Physiol* 83: 884-887.
- Blumwald E, Rea RA, Poole RJ (1987a)** Preparation of tonoplast vesicles: application to H⁺-coupled secondary transport in plant vacuoles. *Methods Enzymol* 148: 115-123.
- Blumwald E, Cragoe EJJ, Poole RJ (1987b)** Inhibition of Na⁺/H⁺ antiport activity in sugar beet tonoplast by analysis of amiloride. *Plant Physiol* 85: 30-33.
- Bohnert HJ, Jensen RG Nelson DE (1995)** Adaptation to environmental stresses. *Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Bohnert HJ, Jensen RG (1996)** Metabolic engineering of increased salt tolerance-The next step. *Aust J Plant Physiol* 23: 661-667.

- Boller T, Wiemken A (1986)** Dynamics of vacuolar compartmentation. *Annu Rev Plant Physiol* 37: 137-164.
- Bordas M, Montesinos C, Dabanza M, Salvador A, Roig LA, Serrano R Moreno V (1997)** Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to *Cucumis melo* L. cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance. *Transgenic Res.* 6: 41-50.
- Bouché-Pillon S, Fleurat-Lessard P, Fromont JC, Serrano R, Bonnemain JL (1994)** Immunolocalization of the plasma membrane H⁺-ATPase in minor veins of *Vicia faba* in relation to phloem loading. *Plant Physiol* 105: 691-697.
- Bourgeade P, Boyer N (1994)** Plasma membrane H⁺-ATPase activity in response to mechanical stimulation of *Bryonia dioica* internodes. *Plant Physiol Biochem* 32: 661-668.
- Boutry M, Michelet B and Goffeau, A (1989)** Molecular cloning of a family of plant genes encoding a proton homologous to plasma membrane H⁺-translocating ATPases. *Biochem Biophys Res Commun* 162: 567-574.
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brauer D, Tu SI, Hsu AF, Patterson D (1993)** Evidence for indirect coupling mechanism for the nitrate-sensitive proton pumping from corn root tonoplast membranes. *Physiol Plant* 89: 588-591.
- Braun Y, Hassidim M, Lerner H R Reinhold L (1986)** Studies on H⁺-translocating ATPase in plants of varying resistance to salinity. I. Salinity during growth modulates the proton pump in the halophyte *Atriplex nummularia*. *Plant Physiol* 81: 1050-1056.
- Bremberger C, Lüttge U (1992)** Dynamics of tonoplast proton pumps and other tonoplast proteins of *Mesembryanthemum crystallinum* L. during the induction of crassulacean acid metabolism. *Planta* 188: 575-580.
- Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1998)** Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends Plant Sci.* 3: 411-412
- Briskin DP (1990)** The plasma membrane H⁺-ATPase of higher plant cells: biochemistry and transport function. *Biochim Biophys Acta* 1019: 215-250.

- Briskin DP, Hansson JB (1992)** How does the plant plasma membrane H⁺-ATPase pump protons?. *J Exp Bot* 148: 269-289.
- Brown DJ, Dupont FMC (1989)** Lipid composition of plasma membranes and endomembranes prepared from root of barley (*Hordeum vulgare* L.). Effect of salt. *Plant Physiol* 90: 955-961.
- Bruggemann W, Janiesch P (1989)** Comparison of plasma membrane ATPase from salt treated and salt-free grown *Plantago maritima* L. *J Plant Physiol* 134: 20-25.
- Bucher M, Schroeder B, Willmitzer C, Reiesmeier JW (1997)** Two genes encoding extensin-like proteins are predominantly expressed in tomato root hair cells. *Plant Mol Biol* 35: 497-508.
- Buckhout TJ, Bell PF, Luster OG, Chaney RL (1988)** Ion-tress induced redox activity in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is localized on the plasma membrane. *Plant Physiol* 90: 151-156.
- Burgos PA, Donaire JP (1996)** H⁺-ATPase activities of tonoplast-enriched vesicles from non-treated and NaCl-treated jojoba roots. *Plant Sci* 118: 167-175.
- Bush DR (1993)** Proton-coupled sugar and aminoacid transporters in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44:513-542.
- Cachorro P, Ortiz A, Ros Barceló A, Cerdá A (1993)** Lignin deposition in vascular tissues of *Phaseolus vulgaris* roots in response to salt-stress and Ca²⁺ ions. *Phyton* 33: 33-40.
- Cano EA, Perez-Alfocea F, Moreno V, Bolarin MC (1996)** Responses to NaCl stress of cultivated and wild tomato species and their hybrids in callus cultures. *Plant Cell Reports* 15: 791-794.
- Cao Y, Ward JM, Kelly WB, Ichida AM, Gaber RF, Anderson JA, Uozumi N, Schroeder JI, Crawford NM (1995)** Multiple genes, tissue specificity, and expression-dependent modulation contribute to the functional diversity of potassium channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 109: 1093-1106.
- Carystinos GD, MacDonald HR, Monroy AF, Dhindsa RS, Poole RJ (1995)** Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. *Plant Physiol* 108: 641-649.

- Chanson A, Fichmann J, Spear D, Taiz L (1985)** Pyrophosphate-driven proton transport by microsomal membranes of corn coleoptiles. *Plant Physiol* 79: 159-164.
- Chanson A, Pilet PE (1988)** Characterization of the pyrophosphate-dependent proton transport in microsomal membranes from maize roots. *Physiol Plant* 74: 643-650.
- Chanson A, Pilet PE (1989)** Target molecular size and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the ATP-dependent and pyrophosphate-dependent proton pumps from maize root tonoplast. *Plant Physiol* 90: 934-938.
- Chanson A (1993)** Active transport of proton and calcium in higher plant cells. *Plant Physiol Biochem* 31: 943-955.
- Cheeseman JM (1988)** Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol* 87: 547-550.
- Chiu SJ, Hung SH, Liu LY, Pau RL (1995)** A cDNA clone encoding the A subunit of the vacuolar H⁺-ATPase from etiolated mung bean seedling. *Plant Physiol* 109: 1125-1130.
- Cho MH, Shears SB, Boss WF (1993)** Changes in phosphatidylinositol metabolism in response to hyperosmotic stress in *Daucus carota* L. cells grown in suspension culture. *Plant Physiol* 103: 637-647.
- Choukrallah R (1986)** The effect of calcium on *Lycopersicon esculentum* sensitivity to sodium chloride. Doctoral Thesis 131 pp University of Minnesota.
- Chrispeels MJ, Crawford NM, Schroeder JI (1999)** Proteins for transport of water and mineral nutrient across the membranes of plant cells. *Plant Cell* 11: 661-675.
- Chung HJ, Sehnke PC, Ferl R (1999)** The 14-3-3 proteins: cellular regularors of plant metabolism. *Trends Plant Sci* 4: 367-371.
- Church GM, Gilbert W (1984)** Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-1995.
- Clarkson DT (1993)** Roots and the delivery of solutes to the xylem. *Phil Trans R Soc Lond B* 341: 5-17.

- Cocucci MC, Marré E (1991)** Co-sedimentation of one form of plasma membrane proton-ATPase and of the fusicoccin receptor from radish microsomes. *Plant Sci* 73: 45-54.
- Colombo R, Cerana R (1993)** Enhanced activity of tonoplast pyrophosphatase in NaCl-grown cells of *Daucus carota*. *J Plant Physiol* 142: 226-229.
- Cooke DT, Burden RS (1990)** Lipid modulation of plasma membrane-bound ATPases. *Physiol Plant* 78: 153-159.
- Cooke DT, Burden RS, James CS, Seco T, Sierra B (1994)** Influence of sterols on plasma membrane proton-pumping ATPase activity and membrane fluidity in oat shoots. *Plant Physiol Biochem* 32: 769-773.
- Cooley MB, Jang H, Dhal P, Mella A, Dounie AB, Haigh AM, Bradford KJ (1999)** Vacuolar H⁺-ATPase is expressed in response to gibberellin during tomato seed germination. *Plant Physiol* 121: 1339-1347.
- Cowan DSC, Clarkson DT, Hall JL (1993)** A comparison between the ATPase and proton pumping activities of plasma membranes isolated from the stele and cortex of *Zea mays* roots. *J Exp Bot* 44: 983-989.
- Cramer GR, Läuchli A, Polito VS (1985)** Displacement of Ca²⁺ by Na⁺ from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt-stress. *Plant Physiol* 79: 207-211.
- Cramer GR, Epstein E, Lauchli A (1988)** Kinetics of root elongation of maize in response to short-term exposure to NaCl and elevated calcium concentration. *J Exp Bot* 39: 1513-1522.
- Cramer GR, Bowman DC (1991)** Short-term leaf elongation kinetics of maize in response to salinity are independent of the root. *Plant Physiol* 95: 965-967.
- Cuartero J, Yeo AR, Flowers TJ (1992)** Selection of donors for salt-tolerance in tomato using physiological traits. *New Phytol* 121: 63-69.
- Cuartero J, Fernandez-Muñoz R, Gonzales-Fernando JJ (1995)** Estreses abióticos. *En: El cultivo de tomate*. Nuez F (ed), pp.351-383. Mundi-Prensa.
- Cushman J C y Bohnert H J (1997)** Molecular genetics of crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol* 113: 667-676.

- Darley CP, Davies JM, Sanders D (1995)** Chill-induced changes in the activity and abundance of vacuolar proton-pumping pyrophosphatase from mung bean hypocotyls. *Plant Physiol* 109: 659-665.
- Davies WJ, Zhang J (1991)** Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 55-76.
- Davies JM, Poole R, Rea PA, Sanders D (1992)** Potassium transport into plant vacuoles energized by a proton-pumping inorganic pyrophosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11701-11705.
- Davies JM, Hunt I, Sanders D (1994)** Vacuolar H⁺ pumping ATPase variable transport coupling ratio controlled by pH. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8547-8541.
- Davies JM (1997)** Vacuolar energization: pumps, shunts and stress. *J Exp Bot* 48: 633-641.
- De Boer (1997)** Fusicoccin- a key to multiple 14-3-3 locks. *Trends in Plant Sci.* 2: 60-66.
- Dehan K, Tal K (1978)** Salt tolerance in the wild relatives of cultivated tomato: Responses of *Solanum pennellii* to high salinity. *Irrig Sci* 1: 71-76.
- Delauney AJ, Verma DPS (1993)** Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 4: 215-223.
- De Nisi P, Dell'Orto M, Pirovano L, Zocchi G (1999)** Calcium-dependent phosphorylation regulates the plasma-membrane H⁺-ATPase activity of maize (*Zea mays* L.) roots. *Planta* 209: 187-194.
- DeWitt ND, Harper JF, Sussman MR (1991)** Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. *Plant J* 1: 121-128.
- DeWitt ND, Sussman MR (1995)** Immuno-cytochemical localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) in phloem companion cells. *Plant Cell* 7: 2053-2057.
- DeWitt ND, Hong B, Sussman MR, Harper JF (1996)** Targeting of two *Arabidopsis* H⁺-ATPase isoforms to the plasma membrane. *Plant Physiol* 112: 833-844.

- Dietz KJ, Rudloff S, Ageorges A, Eckerskorn C, Fischer K, Arbinge B (1995)** Subunit E of the vacuolar H⁺-ATPase of *Hordeum vulgare* L: cDNA cloning, expression and immunological analysis. *Plant J* 8: 521-529.
- Douce R (1964)** Identification et dosage de quelques glicolipides dans des suches normales et tumorales de scrosonet cultivées in vitro. *C R Acad Sci Paris* 259: 3066-3068.
- Downton WJS (1984)** Salt tolerance of food crops: perpectives for improvement. *CRC Crit Rev Plant Sci* 1: 183-201.
- Drøbak B (1993)** Plant phosphoinositides and intracellular signaling. *Plant Physiol* 102: 705-709.
- Dschida WJA, Bowman BJ (1995)** The vacuolar ATPase: sulfite stabilization and the mechanism of nitrate inactivation. *J Biol Chem* 270: 1557-1563.
- Dubacq JP (1973)** Lipid composition of *Acetabularia mediterranea* (Lamour) variation during cap morphogenesis. *Protoplasma* 76: 373-385.
- Dupont FM, Tanaka CK, Hurkman WJ (1988)** Separation and immunological characterization of membrane fraction from barley roots. *Plant Physiol* 86: 717-724.
- Dupont FM (1992)** Salt-induced changes in ion transport: regulation of primary pumps and secondary transporters. *In* Transport and Receptor Proteins of Plant Membranes. Cooke DT, Clarkson DT, pp. 91-100. Plenum Press, New York.
- Edwards S, Nguyen BT, Do B, Roberts JKM (1998)** Contribution of malic enzyme, pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and krebs cycle to respiration and biosynthesis and to intracellular pH regulation during hypoxia in maize roots tips observed by nuclear magnetic resonance imaging and gas chromatography mass spectrometry. *Plant Physiol* 116: 1073-1081.
- Einspahr KJ, Peeler TC, Thompson GA Jr (1988)** Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism associated with the response of *Dunaliella salina* to hyperosmotic shock. *J Biol Chem* 263: 5775-5779.
- Elthon TE, Stewart CR (1981)** Submitochondrial location and electron characteristics of enzymes involved in proline oxidation. *Plant Physiol* 67: 780-784.
- Epstein E (1972)** Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. New York Wiley.

- Epstein E, Rains DW (1987) Advances in salt tolerance. *Plant Soil* 99: 17-29.
- Espinosa-Ruiz A, Bellés JM, Serrano R, Culiáñez-Macia FA (1999) *Arabidopsis thaliana* AtHAL3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. *Plant J* 20: 529-539.
- Ewing NN, Wimmers LE, Meyer DJ, Chetelat RT, Bennett AB (1990) Molecular cloning of tomato plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 94: 1874-1881.
- Ewing NN, Bennett AB (1994). Assessment of the number and expression of P-type H⁺-ATPase genes in tomato. *Plant Physiol* 106: 457-557.
- Fales F (1951) The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. *J Biol Chem* 193: 133-157.
- F.A.O (1995) Anuario de producción. pp.1-2. *En* <http://www.es/mapya.es/pags/info/tablas97/cap09/co9/co920836.htm>.
- Fan TWM, Higashi RM, Norlyn J, Epstein E (1989) In vivo ²³Na and ³¹P NMR measurements of a tonoplast Na⁺/H⁺ exchange process and its characteristics in two barley cultivars. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9856-9860.
- Ferrol N, Bennett AB (1996) A single gene may encode differentially localized Ca²⁺-ATPase in tomato. *Plant Cell* 8: 1159-1169.
- Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR (1977) The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 28:89-121.
- Flowers TJ, Yeo AR (1988) Ion relations of salt tolerance *In: Solute Transport in Plant Cells and Tissues*. Baker DA, Hall JL (eds), pp. 392-416. NewYork, Longman.
- Flowers TJ, Yeo AR (1995) Breeding for salinity resistance in crop plants-where next?. *Aust J Plant Physiol* 23: 661-667.
- Frias I, Caldeira MT, Pérez-Castiñeira JR, Navarro-Aviñó JP, Culiáñez-Maciá FA, Kuppinger O, Stransky H, Pagés M, Hager A, Serrano R (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* 8: 1533-1544.
- Fu HH, Luan (1998) AtKUP1: a dual-affinity K⁺ transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 63-73.

- Fuglsang AT, Visconti S, Drumm K, Jahn T, Stensballe A, Mattei B, Jensen ON, Aducci P, Palmgren MG (1999)** Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H⁺-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr(946)-Thr(947) and requires phosphorylation of Thr (947). *J Biol Chem* 274: 36774-36780.
- Fukuda A, Yazaki Y, Ishikawa T, Koike S, Tanaka Y (1998)** Na⁺/H⁺ antiport in tonoplast vesicles from rice roots. *Plant Cell Physiol* 39: 196-201.
- Fukuda A, Nakamura A, Tanaka Y (1999)** Molecular cloning and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochim Biophys Acta* 1446: 149-155.
- Gaber RF (1992)** Molecular genetics of yeast ion transport. *Int. Rev Cytol* 137: 299-353.
- Gadner HW (1968)** Preparative isolation of monogalactosyl and digalactosyl diglycerides by thin layer chromatography. *J Lipids Res* 9: 139-141.
- Gallagher RS, Leonard RT (1987)** Electrophoretic characterization of a detergent-treated plasma membrane fraction from corn roots. *Plant Physiol* 83: 265-271.
- Galtier N, Belver A, Gibrat R, Grouzis JP, Rigaud J, Grignon C (1988)** Preparation of corn root plasmalemma with low Mg-ATPase latency and high electrogenic H⁺ pumping. *Plant Physiol* 87: 491-497.
- Gao Z, Sagi M, Lips SH (1998)** Carbohydrate metabolism in leaves and assimilation partitioning in fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) as affected by salinity. *Plant Sci.* 135: 149-159.
- Garbarino J, Dupont F (1988)** NaCl induces a Na⁺/H⁺ antiport in tonoplast vesicles from barley roots. *Plant Physiol* 86: 231-236.
- Garbarino J, Dupont FM (1989)** Rapid induction of Na⁺/H⁺ exchange activity in barley root tonoplast. *Plant Physiol* 89:1-4.
- Gaxiola RA, Yaun DS, Klausner RD, Fink GR (1998)** The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4046-4050.
- Gassmann W, Rubio F, Schroeder JI (1996)** Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *Plant J* 10: 869-882.

- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR (1999)** The *Arabidopsis thaliana* transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 96: 1480-1485.
- Geigenberger P, Reimholz R, Geiger M, Merlo, Canale V, Stitt M (1997)** Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. Planta 201: 502-518.
- Getz HP, Klein M (1995)** The vacuolar ATPase of red beet storage tissue: electron microscopic demonstration of the "head-and-stalk" structure. Bot Acta 108: 14-23.
- Gil-Mascarell R, Lopez-Coronado JM, Bellés JM, Serrano R, Rodriguez PL (1999)** The *Arabidopsis* HAL2-line gene family includes a novel sodium-sensitive phosphatase. Plant J 17: 373-383.
- Gogarten JP, Starke T, Kibak H, Fishmann J, Taiz L (1992)** Evolution and isoforms of V-ATPase subunits. J Exp Biol 172: 137-147.
- Gogarten JP, Taiz L (1992)** Evolution of proton pumping ATPase: rooting the tree of life. Photosyn Res 33: 137-146.
- Gogstad OG, Krutsnes MG (1982)** Measurements of protein in cell suspension using the coomassie brilliant blue binding assay. Anal Biochem 126: 355-359.
- Golldack D, Kamasani UR, Quigley F, Bennett J, Bohnert HJ (1997)** Salt stress-dependent expression of HKT1-type high-affinity potassium transporter in rice. Plant Physiol 114: S 529.
- Golombek S, Heim U, Horstmann C, Wobus U, y Wever H (1999)** Phosphoenolpyruvate carboxylase in developing seeds of *Vicia faba* L: gene expression and metabolic regulation. Planta. 208: 66-72.
- Gordon-Weeks R, Steele SH, Leigh RA (1996)** The role of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates and activators of vacuolar H⁺-pumping inorganic pyrophosphatase. Plant Physiol 111: 195-202.
- Gordon-Weeks R, Koren'kov VD, Steele SH, Leigh RA (1997)** Tris is competitive inhibitor of K⁺ activation of vacuolar H⁺-pumping pyrophosphatase. Plant Physiol 144: 901-905.
- Gordon-Weeks R, Parmar S, Davies TGE, Leigh RA (1999)** Structural aspects of the effectiveness of biphosphonates as competitive inhibitors of the plant vacuolar proton-pumping pyrophosphatase. J Biochem.337: 373-377.

- Gorham J, Wyn Jones RG, Bristol A (1990)** Partial characterization of the traits for enhanced K^+ - Na^+ discrimination the D genome of wheat. *Planta* 180: 590-597.
- Gout E, Bligny, R, Douce R (1992)** Regulation of intracellular pH values in higher plants cells. Carbon 13 and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies. *J Biol Chem* 267: 13903-10909.
- Granien-Dardart J, Queiroz O (1974)** Malic enzyme in the leaves of *Bryophyllum daigremontianum*. *Phytochemistry* 13: 1695-1702.
- Green JR (1983)** The Golgi apparatus. *In* Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells. Hall JL, Moore AC (eds), pp. 55-81. Academic Press, London.
- Greenway H, Munns R (1980)** Mechanisms of salt-tolerance in non-halophytes. *Annu Rev Plant Physiol* 31: 149-190.
- Grenier G, Tremolières A, Therrien MP, Willemot L (1973)** Influence du froid sur la synthèse des acides gras dans les racines de deux variétés de Luzerne l'une très résistante et l'autre moins résistante au froid. *Physiol Vég* 11: 253-265.
- Gronwald JW, Suhayda CG, Tal M, Shannon MC (1990)** Reduction in plasma membrane ATPase activity of tomato roots by salt stress. *Plant Sci* 66: 145-153.
- Guern J, Mathieu Y, Kurkdjian A, Manigault P, Manigault J, Gillet B, Boloel C, Lallemand JI (1989)** Regulation of vacuolar pH of plant cells.II. A ^{31}P NMR study of the modification of vacuolar pH in isolated vacuoles induced by proton pumping and cation/ H^+ exchanges. *Plant Physiol* 89:27-36.
- Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H, Serrano R (1991)** Auxin-induced exocytosis and rapid synthesis of high-turnover pool of plasma-membrane H^+ -ATPase. *Planta* 185: 527-537.
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1998)** Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environm.* 21: 535-553.
- Harms K, Wöhner RV, Schulz B, Fromner WB (1994)** Isolation and characterization of P-type H^+ -ATPase genes from potato. *Plant Mol Biol* 26: 979-988.
- Haro R, Bañuelos MA, Quintero FJ, Rubio F, Rodríguez-Navarro A (1993)** Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiol Plant* 89: 868-874.

- Harper JF, Surowy TK, Sussman MR (1989)** Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton pump (H^+ -ATPase) of *Arabidopsis thaliana*. Proc Nat Acad Sci USA 86: 1324-1238.
- Harper JF, Manney L, DeWitt ND, Yoo MH, Sussman MR (1990)** The *Arabidopsis thaliana* plasma membrane H^+ -ATPase multigene family. J Biol Chem 265: 13601-13608.
- Harper JF, Manney L, Sussman MR (1994)** The plasma membrane H^+ -ATPase gene family in *Arabidopsis*: genomic sequence of AHA10 which is expressed primarily in developing seeds. Mol Gen Gen 244: 572-587.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Handa AL (1986)** Cellular mechanisms of salinity tolerance. Hort Science 21: 1317-1324.
- Hasenfratz MP, Tsou C-L, Wilkins TA (1995)** Expression of two related vacuolar H^+ -ATPase are associated with the endoplasmic reticulum and provacuoles of root tip cells. Plant Physiol 108: 1395-1404.
- Hassidim M, Braun Y, Lerner HR, Reinhold L (1986)** Studies on H^+ transporting ATPases in plants of varying resistance to salinity. II. K^+ strongly promotes development of membrane potential in vesicles from cotton roots. Plant Physiol 81: 1057-1061.
- Hassidim M, Braun Y, Lerner HR, Reinhold L (1990)** Na^+/H^+ and K^+/H^+ antiport in root membrane vesicles isolated from the halophyte *Atriplex* and the glycophyte cotton. Plant Physiol 94: 1795-1801.
- Hedrich R, Schroeder JI (1989)** The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plant cells. Plant Physiol 40: 539-569.
- Hedrich R (1994)** Voltage-dependent chloride channels in plant cells: identification, characterization, and regulation of a guard cell anion channel. Curr Top Membr 42: 1-33.
- Heinrichs EA (1988)** Global food production and plant stress. In Plant Stress-Insect Interactions. Heinrichs EA (ed), pp. 1-33. Wiley, New York.
- Hirata R, Graham LA, Takatsuki A, Stevens TH, Anraku Y (1997)** *VMA11* and *VMA16* encode second third proleolipid subunits of *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane H^+ -ATPase. J Biol Chem. 272: 4795-4803.

- Hirsch RE, Lewis BD, Spalding EP, Sussman MR (1998)** A role for AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* 280: 918-921.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950)** The water culture method for growing plants without soil. *Calif Agricult Exp Stat Circ* 347:1-39.
- Hodges TK, Leonard RT (1974)** Purification of plasma membrane adenosine phosphatase from plant roots. *Methods Enzymol* 32: 392-406.
- Hoffma B, Bentrup FW (1989)** Two proton pumps operate in parallel across the tonoplast of vacuoles isolated from suspension cells of *Chenopodium rubrum* L. *Bot Acta* 102: 297-301.
- Hoffma-Thoma G, Willenbrik J (1993)** Differential sensitivities towards inhibitors and SH-compounds of H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase associated with intact vacuoles from sweet sorghum (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) stem parenchyma. *J Plant Physiol* 141: 681-689.
- Hohmann S (1997)** Shaping up: the reponse of yeast to osmotic stress. *In* *Yeast Stress Responses*. Hohmann S, Mager WH (eds), pp. 101-145. Berlin: Springer.
- Hörtensteiner S, Martinoia E, Amshein N (1994)** Factors affecting the reformation of vacuoles in evacuated protoplasts and the expression of the two vacuolar proton pumps. *Planta* 192: 395-403.
- Houlné G, Boutry M (1994)** Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding a plasma membrane H⁺-ATPase whose expression is restricted to anther tissues. *Plant J* 5: 311-317.
- Hung SH, Lee DC, Pan RL (1998)** Isolation of cDNA, encoding V-type ATPase c subunits from etiolated mung bean seedlings. *Plant Physiol* 116: 1192-1197.
- Hurkman WJ (1992)** Effect of salt stress on plant gene expression: a review. *Plant Soil* 146: 145-151.
- Inzé D, Van Montagu M (1995)** Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotech* 6: 153-158.
- Iraki NM, Bressan RA, Hasegawa, Carpita NC (1989)** Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of growth-limited plant cells adapted to osmotic stress. *Plant Physiol* 91: 39-47.

- Ishitani M, Majumder AL, Bornhouser A, Michalowski CB, Jensen RG, Bohnert HJ (1996)** Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. *Plant J* 9: 537-848.
- Jahn T, Johansson F, Lüthen H, Volkman D, Larsson C (1996)** Reinvestigation of auxin and fusicoccin stimulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity. *Planta* 199: 359-365.
- Jahn T, Fuglsang AT, Olsson A, Bruntrup IM, Collinge DB, Volkman D, Sommarin M, Plamgren MG, Larsson C (1997)** The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell* 9: 1804-1814.
- Johansson F, Sommarin M, Larsson C (1993)** Fusicoccin activates the plasma membrane H⁺-ATPase by mechanism involving the C-terminal inhibitory domain. *Plant Cell* 5: 312-327.
- Jeschke WD (1984)** K⁺-Na⁺ exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance. *In* Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement. Staples RC, Toenniessen GH (ed), pp. 37-66. Wiley-Interscience. New York.
- Kane PM, Stevens TH (1992)** Subunit composition, biosynthesis, and assembly of yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J Bioenerg Biomembr.* 24: 383-393.
- Kane PM (1995)** Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase in vivo. *J Biol Chem* 270: 17025-17032.
- Kasamo K, Yamanishi H, Kapita F, Saji H (1991)** Reconstitution of tonoplast H⁺-ATPase from mung bean (*Vigna radiata* L.) hypocotyls in liposomes. *Plant Cell Physiol* 32: 643-651.
- Kasai M, Sasaki M, Yamamoto Y, Matsumoto H (1993a)** In vivo treatments that modulate PPI-dependent H⁺ transport activity of tonoplast-enriched membrane vesicles from barley roots. *Plant Cell Physiol* 34: 549-555.
- Kasai M, Sasaki M, Yamamoto Y, Maeshima M, Matsumoto H (1993b)** Effects of in vivo treatment with abscisic acid and/or cytokinin on activities of vacuolar H⁺ pumps of tonoplast-enriched membrane prepared from barley roots. *Plant Cell Physiol* 34: 1107-1115.

- Kasai M, Nakamura T, Kudo N, Sato H, Maeshima M, Sawada S (1998)** The activity of root vacuolar H⁺-pyrophosphatase in rye plants grown under condition deficient in mineral nutrient. *Plant Cell Physiol* 39: 890-894.
- Kates M (1972)** Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. *In* Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Work TS, Work E (eds) pp. 275-610. North-Holland/American Elsevier, Amsterdam.
- Katsuhara M, Yazaki Y, Sakano K, Kawasaki T (1997)** Intracellular pH and proton-transport in barley root cells under stress: in vivo ³¹P-NMR study. *Plant Cell Physiol* 38: 155-160.
- Katz A, Pick U, Avron M (1989)** Characterization and reconstitution of the Na⁺/H⁺ antiporter from the plasma membrane of the halotolerant alga *Dunaliella*. *Biochem Biophys Acta* 983:9-14.
- Katz A, Pick U, Avron M (1992)** Modulation of Na⁺/H⁺ antiporter activity by extreme pH and salt in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* 100:1224-1229.
- Katz A, Pick U, Avron M (1992)** Modulation of Na⁺/H⁺ antiporter activity by extreme pH and salt in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* 100:1224-1229.
- Kawata T, Yoshida S (1988)** Characterization of ATPases associated with various cellular membranes isolated from etiolated hypocotyls of *Vigna radiata* (L.) Wilczed. *Plant Cell Physiol* 29: 1399-1410.
- Kim Y, Kim EJ, Rea PA (1994a)** Isolation and characterization of cDNAs encoding the vacuolar H⁺pyrophosphatase of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 106:375-382.
- Kim EJ, Zhen RG, Rea PA (1994b)** Heterologous expression of plant vacuolar pyrophosphatase in yeast demonstrates sufficiencies of the substrate binding subunit for proton transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6128-6132.
- Kim EJ, Zhen RG, Rea PA (1995)** Site-directed mutagenesis of vacuolar H⁺-pyrophosphatase. Necessity of Cys⁶³⁴ for inhibition by maleimides but not catalysis. *J Biol Chem* 270: 2630-2635.
- Kinsella JL, Aronson PS (1981)** Amiloride inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger in renal microvilli membrane vesicles. *Am J Physiol* 241: 374-379.

- Kirsch M, An Z, Viereck R, Low R, Rausch T (1996)** Salt stress induces an increased expression of V-type H⁺-ATPase in mature sugar beet leaves. *Plant Mol Biol* 32: 543-547.
- Kishor PBK, Hong Z, Mao G-H, Hu C-AA, Verma DPS (1995)** Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol* 108: 1387-1394.
- Kiyosue T, Yoshilba Y, Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki K (1996)** A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 1323-1335.
- Kluge, Osmond CB (1972)** Studies of phosphoenolpyruvate carboxylase and other enzymes of Crassulacean acid metabolism of *Bryophyllum tubiflorum* and *Sedum pealtum*. *Z. Pflanzenphysiol* 66: 97-105.
- Knight H Trewavas AJ, Knight MR (1997)** Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* 12: 1067-1078.
- Koch KE (1996)** Carbohydrate-modulated gene expression plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 509-540.
- Kramer D (1984)** Cytological aspects of salt tolerance in higher plants. *In* Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement. Staples RC, Toenniessen GH (eds), pp. 3-16. Wiley-Interscience, New York.
- Kramer PJ (1988)** Changing concepts regarding plant water relations. *Plant Cell Environm* 11:565-568.
- Krysan PJ, Young JC, Tax F, Sussman MR (1996)** Identification of transferred DNA insertions within *Arabidopsis* genes involved in signal transduction and ion transport. *Proc Natl. Acad Sci USA* 93: 8145-8150.
- Kurkdjian A, Guern J (1989)** Intracellular pH: Measurement and importance in cell activity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 271-303.
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 222: 680-685.

- Lagarde D, Basset M, Lepetit M, Conejero G, Gaymard F, Astruc S, Grignon C (1996)** Tissue-specific expression of *Arabidopsis* AKT1 gene consistent with a role in K⁺ nutrition. *Plant J* 9: 195-203.
- Lai S, Watson JC, Hansen JN, Sze H (1991)** Molecular cloning and sequencing of cDNAs encoding the proteolipid subunit of the vacuolar H⁺-ATPase from a higher plant. *J Biol Chem* 266: 16078-16084.
- Lanfermeijer FC, Regenbreg B, Baunsgaard L, Villalba LM, Plamgren MG (1996)** Plant and fungal plasma membrane H⁺-ATPase -how alike are they with respects to regulation? *In Plasma Membrane Biology*. Moller IM, Brodelius P (eds), pp. 247-264. Clarendon Press, Oxford.
- Läuchli A (1984)** Salt exclusion: an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. *In Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement*. Staples RC, Toenniessen GH (eds), pp. 171-187. Wiley-Interscience, New York.
- Läuchli A (1990)** Calcium, salinity and the plasma membrane. *In Calcium in Plant Growth*. Leonard RT, Hepler PK (eds). pp 26-35. The American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD.
- Läuchli A, Epstein E (1990)** Plant responses to saline and sodic conditions. *In Agricultural Salinity Assessment and Management*. Tanji KK (ed), pp. 113-137. American Society of Civil Engineers, New York.
- Läuchli A, Colmer TD, Fan TWM, Higashi RM (1994)** Solute regulation by calcium in salt-stressed plants. *In Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants*. Cherry JH (ed), pp. 443-461. Springer-Verlag, Berlin.
- Lazof D, Läuchli A (1991)** The nutritional status of the apical meristem of *Lactuca sativa* as affected by NaCl salinization: an electron-probe microanalytic study. *Planta* 184: 334-342.
- Lechevallier D (1966)** Les lipides des lemnacées: analyse des acides gras des lipides des froudes de *Spirodela polyrrhiza*. *C R Acad Sci Paris* 263: 1489-1552.
- Lehr A, Kirsch M, Viereck R, Schiemann J, Rausch T (1999)** cDNA and genomic cloning of sugar beet V-type H⁺-ATPase subunit A and c isoforms: evidence for coordinate expression during plant development and coordinate induction in response to high salinity. *Plant Mol Biol* 39: 463-475.

- Leigh RA, Gordon-Weeks R, Steele SH, Koren'kov (1994) The H⁺-pumping pyrophosphatase of the vacuolar membrane of higher plants. *In* Membrane Transport in Plants and Fungi. Blatt MR, Leigh RA, Sanders D (eds), pp. 61-75. Company of biologists, Cambridge, UK.
- Leng XH, Manolson MF, Forgac M (1998) Function of COOH-terminal domain of Vph1 in activity and assembly of the yeast V-ATPase. *J Biol Chem* 273: 6717-6723.
- Lepage M (1967) Identification and composition of turnip root lipids. *Lipids* 2: 244-250.
- Lerchl J, König S, Zrenner R, Sonnewald U (1995) Molecular cloning, characterization and expression analysis of isoforms encoding tonoplast-bound proton-translocating of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 106: 375-382.
- Lerner HR, Amzallag GN (1994) The responses of plants to salinity. A working hypothesis *In: Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants*. Cherry JH (eds), pp. 463-476 Springer Verlag Berlin.
- Li X, Sze H (1999) A 100 kD polipeptide associates with Vo membrane sector but not with the active oat vacuolar H⁺-ATPase suggesting a role in assembly. *Plant J* 17: 19-30.
- Lino B, Baizabal-Aguirre VM, González de la Vara LE (1998) The plasma-membrane H⁺-ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Planta* 204: 352-359.
- Liu J, Zhu JK (1997) Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 114: 591-596.
- Logemann J, Shell J, Willmitzerm L (1987) Improved method of isolation of RNA from plant tissue. *Anal Biochem* 163: 16-20.
- Löw R, Rockel B, Kirsch M, Ratajczak R, Hortensteiner S, Martinoia E, Lüttge U, Rausch T (1996) Early salt stress effects on the differential expression of vacuolar H⁺-ATPase genes in roots and leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol* 110: 259-263.

- Löw R, Rausch T (1996) In suspension-cultured *Daucus carota* cells salt stress stimulates H⁺-transport but not ATP hydrolysis of the V-ATPase. J Exp Bot 47: 1725-1732.
- Lynch J, Läuchli A (1985) Salt stress disturbs the calcium nutrition of barley (*Hordeum vulgare* L). New Phytol 99: 345-354.
- Lynch J, Läuchli A (1988) Salinity affects intracellular Ca²⁺ in corn root protoplasts. Plant Physiol 87: 351-356.
- Lynch J, Polito VS, Läuchli A (1989) Salinity stress increases cytoplasmic Ca²⁺ activity in maize root protoplasts. Plant Physiol 90: 1271-1274.
- Maathius FJM, Prins HBA (1990) Patch-clamp studies on root cell vacuoles of a salt-tolerant and a salt-sensitive *Plantago* species. Plant Physiol 92: 23-28.
- Maathuis FJM, Ichida AM, Sanders D, Schroeder JI (1997) Roles of higher plant K⁺ channels. Plant Physiol 144: 1141-1149.
- Maeshima M (1991) H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles: inhibition by Ca²⁺, stabilization by Mg²⁺, and immunological comparison with other inorganic pyrophosphatases. Eur J Biochem 196: 11-17.
- Maeshima M (1992) Characterization of the major integral protein of vacuolar membrane. Plant Physiol 98: 1248-1254.
- Maeshima M, Mirura T, Sato T (1994) Distribution of vacuolar H⁺-Pyrophosphatase and a membrane integral protein in a variety of green plants. Plant Cell Physiol 35: 323-328.
- Magnotta S, Gogarten JP (1997) Characterization and isolation of a vacuolar type H⁺-ATPase subunit A cDNA from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 115: 1730-1735.
- Magné C, Larher F (1992) High sugar content of extracts interfases with colorimetric determination of aminoacids and free proline. Anal Biochem 200: 115-118.
- Marquez JA, Serrano R (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium extrusion gene PMR2 ENA1 during salt stress in yeast. FEBS Letters 382: 89-92.
- Marré E, Ballarin-Denti A (1985) The proton pumps of the plasmalemma and the tonoplast of higher plants. J Bioenerg Biomembr 17: 1-21.

- Martiny-Baron G, Scherer GFE (1989)** Phospholipid stimulated protein kinase in plants. *J Biol Chem* 264: 18052-18059.
- Martiny-Baron G, Manolson MF, Poole RJ, Hecker D, Scherer GFF (1992)** Proton transport and phosphorylation of tonoplast polypeptides from zucchini are stimulated by the phospholipid platelet-activating factor. *Plant Physiol* 96: 1635-1641.
- Martinez V, Laüchli A (1993)** Effects of Ca^{2+} on the salt-stress response of barley roots as observed by in-vivo ^{31}P -nuclear magnetic resonance and *in vitro* analysis. *Planta* 190: 519-524.
- Marty F (1999)** Plant vacuoles. *Plant Cell* 11: 587-599.
- Matoh T, Ishikawa T, Takahashi E (1989)** Collapse of ATP-induced pH gradient by sodium ions in microsomal membrane vesicles prepared from *Atriplex gmelini* leaves. Possibility of Na^+/H^+ antiport. *Plant Physiol* 89: 180-183.
- McCue KF, Hanson (1990)** Drought and salt tolerance: towards understanding application. *Trends Biotech* 8: 358-362.
- Meharg S (1993)** The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiol Plant* 88: 191-198.
- Memon AR, Chem A, Boss WF (1989)** Inositol phospholipids activate plasma membrane ATPase in plants. *Biochem Biophys Res Commun* 162: 1295-1301.
- Memon AR, Boss WF (1990)** Rapid light-induced changes in phosphoinositide kinases and H^+ -ATPases in plasma membrane of sunflower hypocotyls. *J Biol Chem* 265: 14187-14821.
- Mendoza I, Rubio F, Rodríguez-Navarro A, Pardo JM (1994)** The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269: 8972-8996.
- Mendoza I, Quintero FJ, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1996)** Activated calcineurin confers high tolerance to ion stress and alters the budding pattern and cell morphology of yeast cells. *J Biol Chem* 271: 23061-23067.
- Mennen H, Jacobey B, Marschener H (1990)** Is sodium proton antiport ubiquitous in plant?. *J Plant Physiol* 137: 180-183.
- Metcalf LD, Schmitz AA, Pelka JR (1966)** Rapid preparation of fatty acids esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 38: 514-515.

- Michelet B, Boutry M (1995)** The plasma membrane H⁺-ATPase. A highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol* 108: 1-6.
- Mitchell P (1976)** Vectorial chemistry and the molecular mechanism of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity. *Biochem Soc Trans* 4: 399-430.
- Morsomme P, Dambly S, Maudoux O, Boutry M (1998)** Single point mutations in various domains of a plant plasma membrane H⁺-ATPase expressed in *S. cerevisiae* increase H⁺-pumping and permit yeast growth at low pH. *EMBO J* 20: 5513-5526.
- Müller ML, Jensen M, Taiz L (1999)** The vacuolar H⁺-ATPase of lemon fruits is regulated by variable H⁺/ATP coupling and slip. *J Biol Chem* 274: 10706-10716.
- Munns R (1993)** Physiological processes limiting plants growth in saline soils-some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environm* 16: 15-24.
- Munnik T, Ligterink W, Meskiene I, Calderini O, Beyerly J, Musgrove A, Hirt H (1999)** Distinct osmo-sensing protein kinase pathway are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J* 20: 381-388.
- Murata T, Obi I, Yoshihashi M, Noguchi M, Kukutani T (1994)** Reduced permeability to K⁺ and Na⁺ ions of K⁺ channels in the plasma membrane tobacco cells suspension after adaptation to 50 mM NaCl. *Plant Cell Physiol* 35: 87-92.
- Murguía JR, Bellés JM, Serrano R (1995)** A salt-sensitive 3'(2'),5'-biphosphate nucleotidase involved in sulphate activation. *Science* 267: 232-234.
- Myers BA, Neales TF, Jones MB (1990)** The influence of salinity on growth, water relations and photosynthesis in *Diplachne fusca* (L.) P. Beauv. ex Roemer & Schultes. *Aust J Plant Physiol* 17: 675-691.
- Nakamura Y, Kasamo K, Shimosato N, Sakata M, Ohta E (1992)** Stimulation of the extrusion of protons and H⁺-ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact mung bean roots under high-NaCl stress and its relation to external levels of Ca²⁺ ions. *Plant Cell Physiol* 33: 139-149.
- Nakamura T, Liu Y, Hirata D, Namba H, Harada S, Hirokawa T, Miyakawa T (1993)** Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated FK 506-sensitive

regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J* 12: 4063-4071

Nakamura Y, Skakibara Y, Kobayashi H, Kasamo K (1997) Rapid reconstitution of tonoplast H⁺-translocating pyrophosphatase from cultured rice cells into liposomes. *Plant Cell Physiol* 38: 371-374.

Nakanishi M, Maeshima M (1998) Molecular cloning of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of mung bean. *Plant Physiol* 116: 589-597.

Nanjo T, Kobayashi M, Yoshiba Y, Sanada Y, Wada K, Tsukaya H, Kakubari Y, Yamagushi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 18: 185-193.

Narasimhan ML, Binzel ML, Perez-Prat E, Chen Z, Nelson DE, Singh NK, Bressan RA, Hasegawa PM (1991) NaCl regulation of tonoplast ATPase 70-kilodalton subunit mRNA in tobacco cells. *Plant Physiol* 97: 562-568.

Nass R, Cunningham KW, Rao R (1997) Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 272: 26145-26152.

Nass R, Rao R (1998) Novel localization of a Na⁺/H⁺ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implication for vacuolar biogenesis. *J Biol Chem* 273: 21054-21060.

Nelson N (1992) Structural conservation and functional diversity of V-ATPases. *J Bioenerg Biomembr* 24: 407-414.

Neumann PM, Van Volkenburgh E, Cleland RE (1988) Salinity stress inhibits bean leaf expansion by, reducing turgor, not wall extensibility. *Plant Physiol* 88: 233-237.

Niemietz G, Willenbrink J (1985) The function of tonoplast ATPase in intact vacuoles of red beet is governed by direct and indirect ion effect. *Planta* 166: 545-549.

Ninnemann O, Jauniaux JC, Frommer WB (1994) Identification of a high affinity NH₄⁺ transport from plants. *EMBO J* 13: 3464-3471.

- Niu X, Narasimhan ML, Szalman RA, Bressan RA, Hasegawa P M (1993a)** NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in glycophyte and a halophyte. *Plant Physiol* 103: 712-178.
- Niu X, Zhu JK, Narasimhan ML, Bressan RA, Hasegawa PM (1993b)** Plasma membrane H⁺-ATPase gene expression is regulated by NaCl in cells of halophyte *Atriplex nummularia* L. *Planta* 190: 433-438.
- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1995)** Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol* 109: 735-742.
- Noble CL, Rogers ME (1992)** Arguments for the use of physiological criteria for improvement the salt tolerance in crops. *Plant Soil* 146: 99-107.
- Norberg P, Liljenberg C (1991)** Lipids of plasma membranes prepared from oat root cells. Effect of induced water deficit tolerance. *Plant Physiol* 96: 1136-1141.
- Oberbeck K, Drucker M, Robinson DG (1994)** V-type ATPase and pyrophosphatase in endomembranes of maize roots. *J Exp Bot* 45: 235-244.
- Obermeyer G, Sommer A, Bentrup FW (1996)** Potassium and voltage dependence of inorganic pyrophosphatase of intact vacuoles from *chenopodium rubrum*. *Biochim Biophys Acta* 1294: 203-121.
- Oeking C, Hagemann (1999)** Association of 14-3-3 proteins with the C-terminal autoinhibitory domain of the plant plasma-membrane H⁺-ATPase generates a fusicoccin-binding complex. *Planta* 207: 480-482.
- Oishi K, Raynor RL, Chapp PA, Kuo JF 1988** Regulation of protein kinase C by lysophospholipids. Potential role in signal transduction. *J Biol Chem* 163: 6865-6871.
- Olmos E, Hellín E (1997)** Cytochemical localization of ATPase plasma membrane and acid phosphatase by cerium-based method in a salt adapted cell line of *Pisum sativum*. *Plant Sci* 120: 37-45.
- Olsson A, Svennelid F, Ek B, Sommarin M, Larsson C (1999)** A phosphothreonine residue at the C-terminal end of the plasma membrane H⁺-ATPase is protected by fusicoccin-induced 14-3-3 binding. *Plant Physiol* 118: 551-555.
- Ookura T, Wada M, Sakakibara J, Jeong KH, Maruta I, Kawamura J, Kasamo K (1994)** Identification and characterization of a family of genes for the

plasma membrane H⁺-ATPase of *Oryza sativa* L. Plant Cell Physiol 35: 1251-1256.

Oparka KJ, Turgeon R (1999) Sieve elements and companion cells: Traffic control centers of phloem. Plant Cell 11: 739-750.

O'Neill SO, Bennett AB, Spanswick RM (1983) Characterization of a NO₃⁻ sensitive H⁺-ATPase from corn roots. Plant Physiol 72: 837-846.

Orr W, White TC, Iu B, Robert L, Singh J (1995) Characterization of a low temperature-induced cDNA from winter *Brassica napus* encoding the 70 kDa subunit of the carrot vacuolar ATPase. Plant Mol Biol 28: 943-945.

Ortiz A, Martinez V, Cerdá A (1994) Effects of osmotic shock and calcium on growth and solute composition of *Phaseolus vulgaris* plants. Physiol Plant 91: 468-476.

Palmgren MG, Sommarin M (1989) Lysophosphatidylcholine stimulates ATP-dependent proton accumulation in isolated oat root plasma membrane vesicles. Plant Physiol 90: 1009-1014.

Palmgren MG, Askerlund P, Fredrikson K, Widell S, Sommarin M, Larsson C (1990a) Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles: Optimal conditions for formation and separation. Plant Physiol 92: 871-880.

Palmgren MG, Larsson C, Sommarin M (1990b) Proteolytic activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by removal of a terminal segment. J Biol Chem 165: 13423-13426.

Palmgren MG (1991) Regulation of plant plasma membrane H⁺-ATPase activity. Physiol Plant 83: 314-323.

Palmgren MG, Sommarin M, Serrano R, Larsson C (1991) Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. J Biol Chem 266: 20470-20475.

Palmgren MG, Christensen G (1993). Complementation in situ of yeast plasma membrane H⁺-ATPase gene *pma1* by an H⁺-ATPase gene from a heterologous species. FEBS Lett 317: 216-222.

Palmgren MG, Christensen G (1994) Functional comparisons of plant plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast. J Biol Chem 269: 3027-3333.

- Palmgren MG (1998)** Proton gradients and plant P-type ATPases. *J Exp Bot* 50: 883-893.
- Palmgren MG, Harper JF (1999)** Structure of plasma membrane H⁺-ATPase gene from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 164: 8557-8562.
- Palta JP (1990)** Stress interactions at the cellular and membrane levels. *HortScience* 25:1377-1381.
- Pardo JM, Serrano R (1989)** Structure of a plasma membrane H⁺-ATPase gene from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 164: 8557-8562.
- Pardo JM, Reddy MP, Yang S, Maggio A, Huh G-H, Matsumoto T, Coca MA, Paino-D'Urzo M, Koiwa H, Yun D-J, Watad AA, Bressan RA, Hasegawa PM (1998)** Stress signaling through Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9681-9686.
- Parets-Soler A, Pardo JM, Serrano R (1990)** Immunocytolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 93: 1654-1658.
- Pearson WR, Lipman DJ (1988)** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2444-2448.
- Perez-Alfocea F, Estain MT, Cano M, Bolarin MC (1993)** Reponse of tomato cultures to salinity. *Plant Soil* 250: 203-211.
- Perez-Alfocea F, Santa Cruz A, Guerrier G, Bolarin MC (1994)** NaCl stress induced organic solute changes on leaves and calli of *Lycopersicon esculentum*, *L. Pennellii* and their interspecific hybrid. *J Plant Physiol* 143: 106-111.
- Perez C, Michelet B, Ferrant V, Bogaerts P, Boutry M (1992)** Differential expression within a three-gene subfamily encoding a plasma membrane H⁺-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *J Biol Chem* 267: 1204-1211.
- Perera I, Li X, Sze H (1995)** Several genes encode nearly identical 16 kD proteolipids of the vacuolar H⁺-ATPase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 29: 227-244.
- Perez-Prat E, Narasimhan ML, Niu X, Botella MA, Bressan RA, Valpuesta V, Hasegawa PM, Binzel ML (1994)** Growth cycle stage-dependent NaCl induction of plasma membrane H⁺-ATPase mRNA accumulation in deadapted tobacco cells. *Plant Cell Environm* 17: 327-333.

- Perotti E, Savin D, Widmer F, Chanson A (1994) Purification and functional reconstitution of the tonoplast pyrophosphate-dependent proton pump from *Rubus hispidus* cell cultures. *Plant Sci* 103: 25-31.
- Petrusa LM, Winicov I (1997) Proline status in salt-tolerance and salt sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. *Plant Physiol Biochem* 35: 303-310.
- Pical C, Westergren T, Dove SK, Larsson C, Sommarin M (1999) Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacyl glycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* cells. *J Biol Chem* 174: 38232-38240.
- Pilon-Smith EAH, Ebskamp MJM, Paul ML, Jeuken MJW, Weisbeek PJ, Smeekens SCM (1995) Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* 107: 125-130.
- Pinta M (1973) Méthodes de reference pour la détermination des éléments Ca, Mg, Zn, Cu pour absorption atomique. *Oleaginaux* 28: 87-92.
- Pitman MG (1984) Transport across the root and shoot/root interactions. *In* Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement. Staples RC, Toenniessen GH (eds), pp. 93-123. Wiley-Interscience, New York.
- Plant PJ, Gelli A, Blumwald E (1994) Vacuolar chloride regulation of anion-selective tonoplast channel. *J Membr Biol* 140: 1-12.
- Poole RJ, Briskin DP, Kratzky Z, Johnstone RM (1984) Density gradient localization of plasma membrane and tonoplast from storage tissue of growing and dormant red beet. Characterization of proton transport and ATPase in tonoplast vesicles. *Plant Physiol* 74: 549-556.
- Poole RJ (1998) Solute transport *In* Plant Physiology 2nd edition, Taiz L, Zeiger E (eds), 791 pp. Sinauer Associates, Inc, Publishers. Sunderland, MA.
- Poovaiah BW, Reddy ASN (1993) Calcium and signal transduction in plants. *Crit Rev Plant Sci* 12: 185-211.
- Prior C, Potier S, Souciet J-L, Sychrova H (1996) Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na⁺/H⁺-antiporter of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 387: 89-93.

- Pugliarello MC, Rasi-Caldogno F, De Michelis MI, Olivari C (1991)** The tonoplast H^+ -pyrophosphatase of radish seedlings: biochemical characteristics. *Physiol Plant* 83: 339-345.
- Quintero FJ, Blatt MR, Pardo JM (2000)** A plant Na^+/H^+ antiporter involved in ion compartmentation. *J Biol. Chem* (en prensa).
- Rasi-Caldogno F, Pugliarello, MC, Olivari C, De Michelis ME (1993)** Controlled proteolysis mimics the effect of fusicoccin on the plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Physiol* 103: 391-398.
- Rausch T, Kirsch M, Löw R, Lehr A, Viereck R, Zhigang A (1996)** Salt stress responses of higher plants: the role of proton pumps and Na^+/H^+ antiporters. *J Plant Physiol* 148: 425-433.
- Raven JA, Smith FA (1979)** Intracellular pH and its regulation. *Annu Rev Plant Physiol* 30: 289-311.
- Rayle DL, Cleland RE (1992)** The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol* 29: 1271-1274.
- Rea PA, Poole RJ (1985)** Proton-translocating inorganic pyrophosphatase in red beet (*Beta vulgaris* L.) tonoplast vesicles. *Plant Physiol* 77: 46-52.
- Rea PA, Poole RJ (1986)** Chromatographic resolution of H^+ -translocating pyrophosphatase from H^+ -translocating ATPase of higher plant tonoplast. *Plant Physiol* 81: 126-129.
- Rea PA, Sanders D (1987)** Tonoplast energization: two H^+ pumps, one membrane. *Physiol Plant* 71: 131-141.
- Rea PA, Britten CJ, Sarafian V (1992a)** Common identity of substrate-binding subunit of vacuolar H^+ -translocating inorganic pyrophosphatase of higher plant cells. *Plant Physiol* 100: 723-732.
- Rea PA, Kim Y, Sarafian V, Poole RJ, Davies JM, Sanders D (1992b)** Vacuolar H^+ -translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends Biochem Sci* 17: 348-353.
- Rea PA, Poole RJ (1993)** Vacuolar H^+ -translocating pyrophosphatase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 157-80.
- Regenberg B, Villalba JM, Lanfermeijer FC, Palmgren MG (1995)** Carboxy-terminal deletion analysis of plant plasma membrane H^+ -ATPase: Yeast as a

- model system for solute transport across the plant plasma membrane. *Plant Cell* 7: 1655-1666.
- Rengel Z (1992)** The role of calcium in salt-toxicity. *Plant Cell Environm* 15: 625-632.
- Reuveni M, Bennett AB, Bressan RA, Hasegawa PM (1990)** Enhanced H^+ transport capacity and ATP hydrolysis activity of the tonoplast H^+ -ATPase after NaCl adaptation. *Plant Physiol* 94: 524-530.
- Robinson DG, Haschke H-P, Hinz G, Hoh B, Maeshima M, Marty F (1996)** Immunodetection of tonoplast polypeptides in plasma membrane of pea cotyledons. *Planta* 198: 95-103.
- Rodríguez-Navarro A, Quintero TJ, Garcíadeblás B (1994)** Na^+ -ATPases and Na^+/H^+ antiporters in fungi. *Biochim Biophys Acta* 1187: 203-205.
- Rodríguez-Rosales PM, Kerkeb L, Bueno P, Donaire JP (1999)** Changes induced by NaCl in lipid content and composition, lipoxygenase, plasma membrane H^+ -ATPase and antioxidant enzyme activities of tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill) Calli. *Plant Sci* 143: 143-150.
- Roldán M, Donaire JP, Pardo JM, Serrano R (1991)** Regulation of root plasma membrane H^+ -ATPase in sunflower seedlings. *Plant Sci* 79: 163-172.
- Ros R, Romieu C, Gibrat R, Grignon C (1995)** The plant inorganic pyrophosphatase does not transport K^+ in vacuole membrane vesicle labelled with fluorescence probes for H^+ , K^+ and membrane potential. *J Biol Chem* 270: 4368-4374.
- Rottenberg H, Moreno-Sanchez R (1993)** The proton pumping activity of the H^+ -ATPase: an improved fluorescence assay. *Biochem Biophys Acta* 1183: 161-170.
- Rouquié D, Tourraine-Roux L, Szponarski W, Rossignol M, Dumas P (1998)** Cloning of the V- H^+ -ATPase subunit G in plant: functional expression and subcellular localization. *FEBS Lett* 437: 287-292.
- Rubio F, Gassmann W, Schroeder JI (1995)** Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* 270: 1660-1663.

- Rubio F, Schwarz M, Gassmann W, Schroeder JI (1999)** Genetic selection of mutation in high affinity K^+ transporter HKT1 that define functions of a loop site for reduced Na^+ permeability and increased Na^+ tolerance. *J Biol Chem* 274: 6839-6847.
- Rush DW, Epstein E (1981)** Comparative studies on the sodium, potassium and chloride relations of a wild halophytic and domestic salt sensitive tomato species. *Plant Physiol* 68: 1308-1313.
- Sakakibara Y, Kobayashi H, Kasamo K (1996)** Isolation and characterization of cDNAs encoding vacuolar H^+ -pyrophosphatase isoforms from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* 61: 1029-1038.
- Sakakibara Y, Kasamo K, Kobayashi H, Kusakabe I, Kawasaki S (1999)** Identification of gene structure and promoter region of H^+ -translocating inorganic pyrophosphatase in rice (*Oryza sativa* L.). *Biochem Biophys Acta* 1444: 117-124.
- Sakano K, Kiyota S, Yazaki Y (1998)** Degradation of endogenous organic acids induced by Pi uptake in *Catharanthus roseus* cells: involvement of biochemical pH-Stat. *Plant Cell Physiol* 39: 615-619.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Samuels AL, Fernando M, Glass ADM (1992)** Immunofluorescent localization of plasma membrane H^+ -ATPase in barley roots and effects of K nutrition. *Plant Physiol* 99:1509-1514.
- Sanchez-Aguayo I, Gonzalez-Utor AL, Medina A (1991)** Cytochemical localization of ATPase activity in salt-treated and salt-free growth *Lycopersicon esculentum* roots. *Plant Physiol* 96: 153-158.
- Saneoka H, Nagaseka C, Hahn DT, Yang WJ, Premachanda GS, Joly RJ, Rhodes D (1995)** Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and containing maize lines. *Plant Physiol* 107: 631-638.
- Santa-Cruz A, Acosta M, Rus A, Bolarin MC (1999)** Short-term salt tolerance mechanism in differentially salt tolerant species. *Plant Physiol Biochem* 37: 65-71.
- Santa-Maria GE, Rubio F, Dubcovsky J, Rodriguez-Navarro A (1997)** The *HAK1* gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell* 9: 2281-2289.

- Sarafian V, Kim Y, Poole RJ, Rea PA (1992)** Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 89: 1775-1779.
- Sato MH, Kasahara M, Ishii N, Homareda H, Matsui H, Yoshida M (1994)** Purified vacuolar inorganic pyrophosphatase consisting of a 75-KDa polypeptide can pump H⁺ into reconstituted proteoliposomes. J Biol Chem 269: 725-6728.
- Schachtman DP, Schroeder JI (1994)** Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. Nature 370: 655-658.
- Schachtman DP, Kumar R, Schroeder JI, March EL (1997)** Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. Proc Natl Acad Sci USA 95: 11079-11084.
- Schachtman DP, Liu W (1999)** Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. Trends Plant Sci 7: 218-287.
- Scherer GFE, Hecker D, Muller J (1993)** Ca²⁺ ions and lysophospholipids activate phosphorylation of different proteins in plasma membrane and tonoplast. J Plant Physiol 142:425-431.
- Schroeder JI, Ward JM, Gassmann W (1994)** Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plant: biophysical implication for K⁺ uptake . Annu Rev Biophys Biomol Struct 32: 441-471.
- Serrano EE, Zeiger E, Hagiwara S (1988)** Red light stimulates an electrogenic proton pump in *Vicia* guard cell protoplast. Proc Nat Acad Sci USA 85: 436-440.
- Serrano R (1983)** In vivo glucose activation of yeast plasma membrane ATPase. FEBS Lett 156: 11-14.
- Serrano R (1984a)** Purification of the proton pumping ATPase from plant plasma membranes. Biochem Biophys Res Commun 121: 735-740.
- Serrano R (1984b)** Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. Curr Top Cell 23: 87-126.
- Serrano R (1985)** Plasma Membrane ATPase of Plants and Fungi. 174 pp. CRC Press. Boca Raton.

- Serrano R, Kielland-Brandt MC, Fink, GR (1986)** Yeast plasma membrane ATPase is essential of growth and has homology with (Na⁺+K⁺), -K⁺-and Ca²⁺-ATPase. *Nature* 319: 689-693.
- Serrano R, (1988a)** Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plant and fungi. *Biochim Biophys Acta* 947: 1-28.
- Serrano R (1988b)** H⁺-ATPase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: purification and reconstitution. *Methods Enzymol* 157: 533-544.
- Serrano R (1989)** Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 61-94.
- Serrano R (1990)** Plasma membrane ATPase. *In the Plant Plasma Membrane*. Larsson C, Møller IM (eds), pp. 127-153. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Serrano R (1993)** Structure function and regulation of plasma membrane H⁺-ATPase. *FEBS Lett* 325:108-111.
- Serrano R, Villalba JM (1993)** Bomba de protones de la membrana vegetal. *Investigacion y Ciencia (Enero)*, pp. 62-63.
- Serrano R, Gaxiola R (1994)** Microbial models and salt-stress tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 13: 121-138.
- Serrano R (1996)** Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol* 165: 1-52.
- Serrano R, Mulet JM, Rios G, Marquez JA, de Larrinoa IF, Leube MP, Mendizabal I, Pascual-Ahuir A, Proft M, Ros R, Montesinos C (1999)** A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J Exp Bot* 50: 1023-1036.
- Shannon MC (1984)** Breeding selection and the genetics of salt tolerance. *In Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement*. Staples RC, Toenniensen GH, (eds), pp. 301-321. Wiley- Interscience, New York.
- Shannon MC, Grieve CM, François LE (1994)** Whole-plant response to salinity. *In Plant Environment Interactions*. Wilkinson RF (ed), pp 199-244. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Sheaham JJ, Ribeiro-Neto L, Sussman MR (1993)** Cesium-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 3: 647-656.

- Shimazaki K, Kinoshita T, Nishimura M (1992) Involvement of calmodulin and calmodulin-dependent myosin light chain kinase in blue light-dependent H^+ pumping by guard cell protoplasts from *Vicia faba* L. *Plant Physiol* 99: 1416-1421.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* 115: 327-334.
- Skerrett M, Tyerman SD (1994) A channel that allows inwardly directed fluxes of anions in protoplast derived from wheat roots. *Planta* 192: 295-305.
- Smart LB, Vojdam F, Maeshima M, Wilkins TA (1998) Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated. *Plant Physiol* 166: 1539-1549.
- Smith FW, Ealing PM, Hawkesford MJ, Clarkson DT (1995) Plant members of sulfate transporters reveal functional subtypes. *Proc Nat Acad Sci USA* 92: 9373-9377.
- Snapp SS, Shennan C (1992) Effects of salinity on roots growth and death dynamics of tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *New Phytol* 121: 71-79.
- Spickett CM, Smirnoff N, Ratcliffe G (1993) An in vivo nuclear magnetic investigation of ion transport in maize (*Zea mays*) and *Spartina anglica* roots during exposure to high salt concentrations. *Plant Physiol* 102: 629-638.
- Staal M, Maathuis FJM, Elzenga TM, Oberbeek JHM, Prins HBA (1991) Na^+/H^+ antiport activity of the salt-tolerant *Plantago maritima* and the salt-sensitive *Plantago media*. *Physiol Plant* 82: 179-184.
- Starke T, Gogarten JP (1993) A conserved intron in the V-ATPase subunit genes of plants and algae. *FEBS Lett* 315: 252-258.
- Stevens TH, Forgac M (1997) Structure, function, and regulation of vacuolar H^+ -ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 799-808.
- Suhayda CG, Gianini JL, Briskin DP, Shannon MC (1990) Electrostatic changes in *Lycopersicon esculentum* root plasma membrane resulting from salt-stress. *Plant Physiol* 93: 471-478.
- Sussman M R (1994) Molecular analysis of proteins in plant plasma membrane. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 211-234.

- Suzuki K, Kasamo K (1993)** Effects of aging on the ATP and pyrophosphatase-dependent pumping of protons across the tonoplast isolated from pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiol* 34: 613-619.
- Suzuki Y, Kanayama Y, Shiratake K, Yamaki S (1999)** Vacuolar H⁺-pyrophosphatase purified from pear fruit. *Phytochemistry* 50: 535-539.
- Svannelid F, Olsson A, Piotrowski M, Rosenquist M, Ottman C, Larsson C, Oecking C, Sommarin M (1999)** Phosphorylation of Thr-948 at the C terminus of the plasma membrane H⁺-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell* 11: 2379-2392.
- Sze H, (1985)** H⁺-translocating ATPases: advances using membranes vesicles. *Annual Rev Plant Physiol* 36: 175-208.
- Sze H, Ward JM, Lai S, Perera I (1992)** Vacuolar-type H⁺-translocating ATPases in plant endomembranes: subunit organization and multigene families. *J Exp Biol* 172: 123-135.
- Sze H, Li X, Palmgren MG (1999)** Energization of plant cell membranes by H⁺ pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11: 677-689.
- Taiz L (1992)** The plant vacuole. *J Exp Biol* 172: 113-122.
- Takasu A, Nakanishi Y, Yamauchi T, Maeshima M (1997)** Analysis of the substrate binding site and carboxyl terminal region of vacuolar H⁺-pyrophosphatase of mung bean with peptide antibodies. *Biochem J* 122: 883-889.
- Tal M, (1984)** Physiological genetics of salt resistance in higher plants: studies on the level of the whole plant and isolated organs, tissues and cells. *In* Salinity Tolerance in Plants. Strategies for Crop Improvement. Staples RC, Toenniessen GH (eds), pp. 301-321. Wiley-Interscience, New York.
- Tanaka Y, Chiba K, Maeda M, Maeshima M (1993)** Molecular cloning of cDNA for vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase in *Hordeum vulgare*. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 1110-1114.
- Tarczynsky MC, Jensen RG, Bohner HJ (1993)** Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259: 508-510.
- Taylor CB (1996)** Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. *Plant Cell* 8: 1221-1224.

Terrier N, Deguilloux C, Sauvage FX, Martinoia E, Romieu C (1998) Proton pumps and anion transport in *Vitis vinifera*: The inorganic pyrophosphatase plays a predominant role in the energization of the tonoplast. *Plant Physiol Biochem* 36: 367-377.

Thiel G, Lynch J, Läuchli A (1988) Short term effects of salinity stress on the turgor and elongation of growing barley leaves. *J Plant Physiol* 132: 38-44.

Thomas PS (1983) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5201-5205.

Thompson JD, Higgins BG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22: 4673-4680.

Towbin H, Staehelin T, Gordon JC (1979) Electroforetic transfers of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.

Toroser D, Huber SC (1997) Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic-stress activation of sucrose-phosphate synthase in spinach leaves. *Plant Physiol* 114: 947-955.

Tsiantis MS, Bartholomew DM, Smith JAC (1996) Salt regulation of transcript levels of the c subunit of a leaf vacuolar H⁺-ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J* 9: 729-736.

Venema K, Palmgren MC (1995) Metabolic modulation of transport coupling ratio in yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 270: 19659-19667.

Vicente JAF, Vale MGP (1991) Differentiation between several types of phosphohydrolases in light microsomes of corn roots. *Plant Physiol* 96:1345-1353.

Vicente JAF, Vale MGP (1994) Proton transport by a fraction of endoplasmic reticulum and golgi membrane of corn roots: comparison with the plasma membrane and tonoplast H⁺ pumps. *Plant Sci* 96: 5-68.

Vidal J, y Chollet R (1997) Regulatory phosphorylation of C4 PEP carboxylase. *Trends Biochem. Sci.* 2: 230-237.

Viereck R, Kirsch M, Low R, Rausch T (1996) Down regulation of plant V-type H⁺-ATPase genes after light induced inhibition of growth. *FEBS Lett* 384: 285-288.

- Vorbeck ML, Martinetti GV (1965) Separation of glycosyl diglycerides from phosphatides using silicic acid column chromatography. *J Lip Res* 6: 3-6.
- Wada M, Makoto T, Kasamo K (1992) Nucleotide sequence of a complementary encoding plasma membrane H⁺-ATPase from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol* 99:794-795.
- Wan CY, Wilkins TA (1994) Isolation of multiple cDNAs encoding the vacuolar H⁺-ATPase subunit B from developing cotton (*Gossypium hirsutum* L.) ovules. *Plant Physiol* 106: 393-394.
- Wang Y, Leigh RA, Kaestner KH, Sze H (1986) Electrogenic H⁺-pumping pyrophosphatase in tonoplast vesicles of oat roots. *Plant Physiol* 81: 497-502.
- Wang TB, Gassmann W, Rubio F, Schroeder JI Glass ADM (1998) Rapid up-regulation of HKT1, a high affinity potassium transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium. *Plant Physiol* 118: 651-659.
- Ward JM, Reinders A, Hsu HT, Sze H (1992) Dissociation and reassembly of the vacuolar H⁺-ATPase from oat roots. *Plant Physiol* 99: 161-169.
- Ward JM, Sze H (1992) Proton transport activity of the purified vacuolar H⁺-ATPase from oat roots. *Plant Physiol* 99: 925-931.
- Warren M Smith JC, Apps DK (1992) Rapid purification and reconstitution of a plant vacuolar ATPase using Triton X-114: subunit complex and substrate kinetics of H⁺-ATPase from the tonoplast of *Kalanchoe daigremontiana*. *Biochim. Biophys Acta* 1106:117-125.
- Watad AEA, Pesci PA, Reinhold L, Lerner HR (1986) Proton fluxes as a response to external salinity in wild type and NaCl-adapted *Nicotiana* cell lines. *Plant Physiol* 81:454-459.
- Watad AE, Reuveni M, Bressan RA, Hasegawa PM (1991) Enhanced net K⁺ uptake capacity of NaCl-adapted cells. *Plant Physiol* 95: 1265-1269.
- White PJ (1994) Bafilomycin A1 is a non-competitive inhibitor of the tonoplast H⁺-ATPase of maize coleoptiles. *J Exp Bot.* 45: 1397-1402.
- Wilkins TA (1993) Vacuolar H⁺-ATPase 69-catalytic subunit cDNA from developing cotton (*Gossypium hirsutum*) ovules. *Plant Physiol* 102:679-680.

- Wilson C, Clark RA, Shearer GC (1994)** Effect of salinity on the plasma membrane ATPase from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves. *Plant Sci* 103: 1-9.
- Wilson C, Shannon MC (1995)** Salt-induced Na^+/H^+ antiport in root plasma membrane of a glycophytic and halophytic species of tomato. *Plant Sci* 107: 147-157.
- Wolf B (1982)** A comparative system of leaf analysis and its use for diagnostic of crop nutrient status. *Commun. Soil Sci Plant Anal* 13: 1035-1059.
- Wolf O, Jeschke WD, Haitung W (1990)** Long distance transport of abscisic acid in NaCl-treated intact plants of *Lupinus albus*. *J Exp Bot* 41: 593-600.
- Wu J, Seliskar DMC (1998)** Salinity adaptation of plasma membrane H^+ -ATPase in the salt march plant *Spartina patens*: ATP hydrolysis and enzyme kinetics. *J Exp Bot* 49: 1005-1013.
- Xing T, Higgins VJ, Blumwald E (1996)** Regulation of plant defense response to fungal pathogens: two types of protein kinase in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Cell* 8: 555-564.
- Yamanishi H, Kasamo K (1994)** Effects of cerebroside and cholesterol on the reconstitution of tonoplast H^+ -ATPase purified from mung bean (*Vigna radiata* L) hypocotyls in liposomes. *Plant Cell Physiol* 35: 655-663.
- Yeo A (1998)** Molecular biology of salt in the context of whole-plant physiology. *J Exp Bot* 49: 915-929.
- Zhang J, Myers M, Forgac M (1992)** Characterization of the V_o domain of the coated vesicles (H^+)-ATPase. *J Biol Chem* 267: 9773-9778.
- Zhang J, Feng Y, Forgac M (1994)** Proton conduction and bafilomycin binding by the V_o domain of the coated vesicles V-ATPase. *J Biol Chem* 269: 23518-23523.
- Zhen RG, Baykov AA, Bakuleva NP, Rea PA (1994)** Aminomethylene-diphosphonate: a potent type-specific inhibitor of both plant and phototrophic bacterial H^+ -pyrophosphatases. *Plant Physiol* 104: 153-159.
- Zhen RG, Rea PA (1995)** Directed mutagenesis of vacuolar H^+ -PPase discloses potential coupling and DCCD-binding sites. *Plant Physiol* 104: 153-159.

Zhen RG, Kim E, Rea PA (1997) The molecular and biochemical basis of pyrophosphate-energized ion translocation at the vacuolar membrane. *Adv Bot Res* 27: 297-337.

Zhong H, Läuchli A (1993) Changes of cell wall composition and polymer size in primary roots of cotton seedlings under high salinity. *J. Exp Bot* 44: 773-778.

Zimmerman S, Thomine S, Guern J, Barbier-Brygoo H (1994) An anion current at the plasma membrane of tobacco protoplast shows ATP-dependent voltage regulation and is modulated by auxin. *Plant J* 6: 707-716.

Zingarelli L, Anzani P, Lado PC (1994) Enhanced K^+ -stimulated pyrophosphatase activity in NaCl-adapted cells of *Acer pseudoplatanus*. *Physiol Plant* 91: 510-516.

Zimniack L, Dittrich R, Gogarten JP, Kibak B, Taiz L (1988) The cDNA sequence of the 69-kDa subunit of the carrot vacuolar H^+ -ATPase: homology to the beta-chain of FoF1-ATPases. *J Biol Chem* 263: 9102-9112.



IX. Abreviaturas

A ₂₆₀	absorbancia a 260 nm
ACMA	9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina
ADN	ácido adenosindesoxiribonucleotido
ADNr	ADN ribosómico
AMV-RT	transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis de ave
ARN	adenosinribonucleotid
ARNm	ARN mensajero
ATP	adenosintrifosfato
ATPasa	adenosintrifosfatasa
Baf	bafilomicina A ₁
BCIP	5-bromo,4-cloro 3-indolildifosfato
Brij 58	polioxietileno 20 cetil eter
BSA	albumina bovina
BTP	1,3-bis [tris(hidroximetil)-metilamino]-propano
CAPS	ácido (3-[ciclohexilamino]-1-propanesulfónico
Ci	Curio
CH	contenido hídrico
CTAB	cetil hexadeciltrimetil amonium bromuro.
DCCD	N,N'-diciclohexilcarbodiimida.
DEPC	dietil pirocarbonato
DMSO	dimetilsulfoxido
DNasa	desoxiribonucleasa
dNTPs	desoxinucleotidos trifosfato
dT	desoxitimina
DO ₂₆₀	unidad de absorbancia a 260 nm
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
EGTA	ácido etilen glicol-bis (β-aminoetileter) N,N,N',N'-tetraacético
EtOH	etanol
Hepes	ácido hidroxietilpiperazina etanosulfónico
IMDP	imidodifosfato
IPTG	isopropil β-D-thiogalactosido

kb	kilobases
kD	kilodalton
K-IDA	iminodiacetato potásico
MES	ácido 2 N-morfolin-etanosulfónico
Mo	molibdato
MOPS	ácido (3-[N-Morfolino]-1-propanesulfónico
NADH	nicotinamin adenin dinucleotido
NADP	nicotinamin adenin dinucleotido fosfato
NaAc	acetato sódico
NaIDA	iminodiacetato sódico
NBT	azul de nitrotetrazolium
NEM	N-etil-meleimida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PEP	fosfoenolpiruvato
PF	peso fresco.
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
poli-A	polinucleotido de adenina
PVP-40	polivinilpirrolidona de 40 000 dalton
PVP-380	polivinilpirrolidona de 380 000 dalton
p/p	peso/peso.
PPasa	pirofosfatasa.
Pi	fosfato inorgánico
PPi	pirofosfato.
PS	peso seco
p/v	peso/volumen.
Qmax	extinción máxima de la fluorescencia
RE	retículo endoplásmico
RNasa	ribonucleasa
RT-PCR	transcriptasa inversa y reacción en cadena de polimerasa
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamida
TMA-Cl	cloruro de tetrametilamonio

Tris	tris (hidroximetil) aminometano
Va	vanadato
VQs	velocidad específica de extinción de la fluorescencia.
v/v	volumen/volumen
UDP	uridin 5'-difosfato
UDPasa	uridin 5'-difosfatasa
U	unidades
UI	unidad internacional de actividad
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
λ_{exc}	longitud de onda de excitación
λ_{em}	longitud de onda de emisión



Biblioteca Universitaria de Granada



01053002