

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

T
14
1121

TESIS DOCTORAL

Enzimas H^+ -ATPasa, H^+ -PPasa y antiporte
 Na^+/H^+ en plasmalema y tonoplasto de raices de
girasol: efecto del estrés salino

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	619673494
Nº Copia	121221121

Emilia Ballesteros Consuegra

1995

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS DOCTORAL

Enzimas H^+ -ATPasa, H^+ -PPasa y antiporte Na^+/H^+ en plasmalema y tonoplasto de raíces de girasol: efecto del estrés salino

Emilia Ballesteros Consuegra

1995

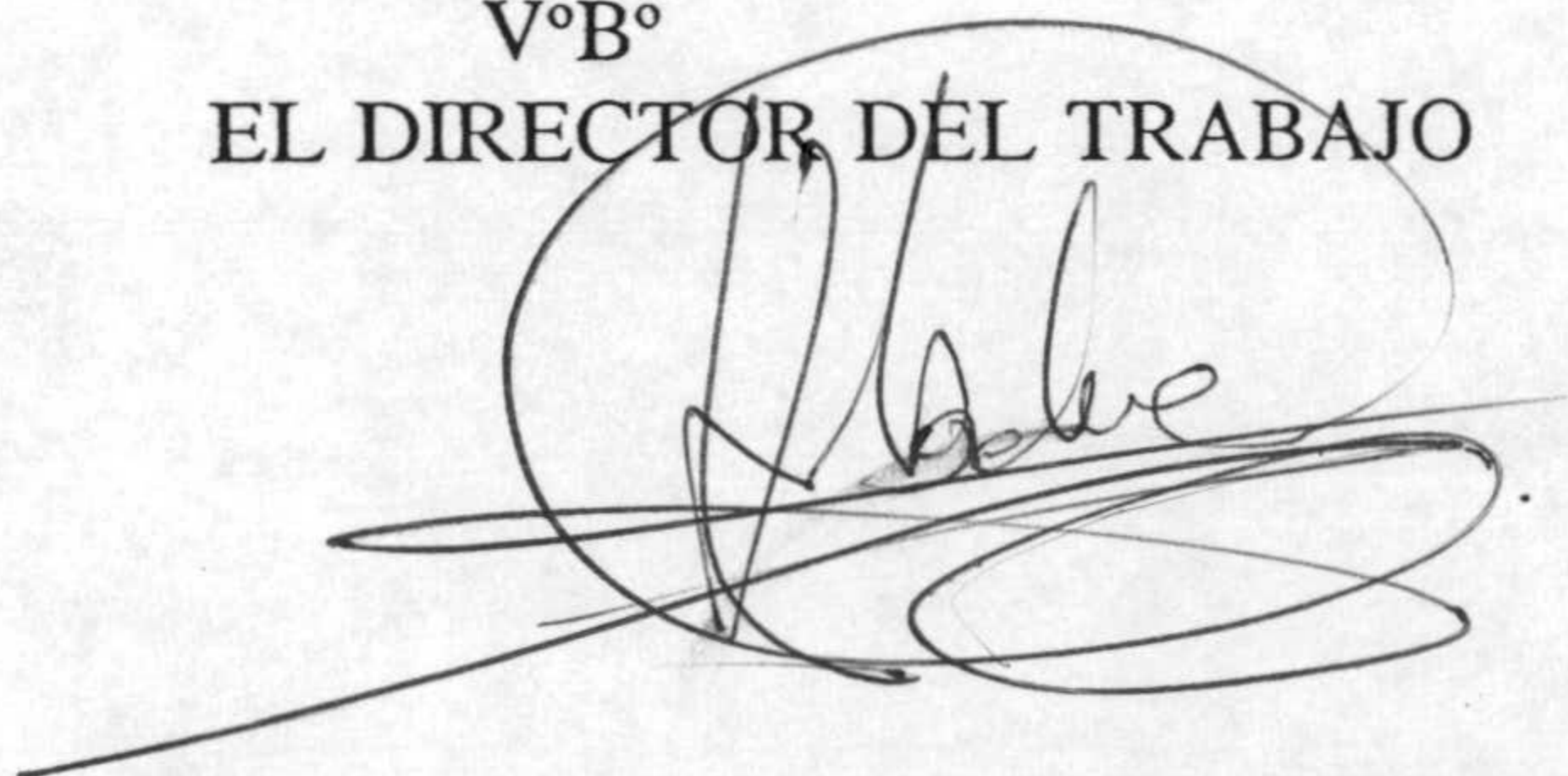
ENZIMAS H^+ -ATPASA, H^+ -PPASA Y ANTIPOORTE Na^+/H^+ EN
PLASMALEMA Y TONOPLASTO DE RAICES DE GIRASOL: EFECTO DEL
ESTRES SALINO

Memoria que presenta la licenciada en Ciencias
Biológicas Emilia Ballesteros Consuegra para optar
al grado de Doctora



Fdo. Emilia Ballesteros Consuegra

V°B°
EL DIRECTOR DEL TRABAJO



Fdo. Andrés Belver Cano
Doctor en Ciencias Biológicas
Colaborador científico del C.S.I.C.

Prov. T-15/91

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 26-05-95 ...
ENTRADA NUM. ... 1214 ...

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

UNIVERSIDAD DE GRANADA
16 MAYO 1995
COMISION DE DOCTORADO

ABREVIATURAS

- ACMA: 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina.
- ATPasa: adenosintrifosfatasa.
- BCIP: 5-bromo,4-cloro 3-indolilfosfato.
- BHT: hidroxitolueno butilado.
- Brij 58: polioxietileno 20 cetil eter.
- BSA: albúmina bovina.
- BTP: 1,3-bis [tris(hydroximetil)-metilamina]-propano.
- DCCD: N,N'-díciclohexilcarbodiimida.
- DES: dietilstilbestrol.
- DIDS: ácido 4,4'-diisotiocianato-estilbeno-2,2'-disulfónico.
- DPH: 1,6-difenil-1,3,5,-hexatrieno.
- DTT: ditiotreitól.
- EDTA: ácido etilendiamino tetracético.
- EGTA: ácido etilen glicol-bis (β -aminoetileter) N,N,N',N'-tetraacético.
- Mes: ácido 2 N-morfolin-etanolsulfónico.
- NBT: azul de nitrotetrazolium.
- PF: peso fresco.
- Pi: fosfato inorgánico.
- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
- P/P: peso/peso.
- PPase: pirofosfatasa.
- PPi: pirofosfato.
- PS: peso seco.
- PVPP: polivinilpolipirrolidona.
- P/V: peso/volumen.
- RE: retículo endoplásmico.
- TEMED: N,N,N',N'-tetremetiletildiamida.
- TMA-DPH: 1-(4-trimetilaminofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno.

TMA-Cl: cloruro de tetrametilamonio.

Tris: tris (hidroximetil) aminometano.

UVAS: sustancias que absorben en el ultravioleta (UV-absorbing substances).

Va: vanadato.

VQs: velocidad específica de extinción de la fluorescencia.

V/V: volumen/volumen.

INDICE

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	1
II. ANTECEDENTES CIENTIFICOS.....	6
A. SALINIDAD COMO FACTOR AMBIENTAL DE ESTRES.....	8
A.1. Descripción del problema.....	8
A.2. Suceptibilidad de las plantas a la salinidad.....	8
A.3. Abordaje desde una perspectiva biológica.....	9
B. EFECTO DE LA SALINIDAD EN PLANTAS.....	11
C. MECANISMOS DE TOLERANCIA A LA SALINIDAD.....	11
D. ESTRUCTURAS CELULARES RESPONSABLES DE LA RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A LA SALINIDAD. MEMBRANAS CELULARES.....	16
D.1. Sistemas bioquímicos responsables del transporte iónico a través de las membranas.....	19
D.1.1. Transporte activo por bombas iónicas en plantas.....	19
D.1.1.1. H ⁺ -ATPasas.....	21
D.1.1.1.1. F-ATPasas.....	21
D.1.1.1.2. P-ATPasas: H ⁺ -ATPasa de plasmalema.....	22
D.1.1.1.3. V-ATPasas: H ⁺ -ATPasa de tonoplasto.....	26
D.1.1.2. H ⁺ -PPasas: H ⁺ -PPasa de tonoplasto.....	30
D.1.2. Transporte facilitado pasivo.....	35
D.1.2.1. Antiporte Na ⁺ /H ⁺	35

III. PLAN DE TRABAJO.....	38
IV. MATERIAL Y METODOS.....	42
A. MATERIAL VEGETAL.....	44
A.1 Sistema y condiciones de cultivo.....	44
B. DETERMINACION DE PARAMETROS FISIOLÓGICOS.....	45
B.1. Crecimiento.....	45
B.2. Contenido hídrico.....	46
B.3. Test de integridad de la membrana.....	46
B.3.1. Preparación de la muestra.....	47
B.3.2. Velocidad de pérdida de UVAS.....	47
B.4. Determinación de osmóticos orgánicos.....	48
B.4.1. Azúcares totales.....	48
B.4.2. Prolina.....	49
B.5. Actividad fotosintética <i>in vivo</i> . Fluorescencia modulada.....	50
B.5.1. Curva de inducción de la fluorescencia de la clorofila.....	50
B.5.2. Parámetros indicadores de estrés.....	53
B.5.3. Condiciones de medida.....	54
B.6. Determinación del contenido mineral.....	55
C. DETERMINACION DE PARAMETROS BIOQUÍMICOS.....	56
C.1. Aislamiento de vesículas de membrana enriquecidas en plasmalema y tonoplasto de raíces.....	56
C.1.1. Obtención de microsomas.....	56
C.1.2. Gradiente continuo de sacarosa.....	58
C.1.3. Gradiente discontinuo de sacarosa.....	58
C.2. Determinación de proteínas.....	60

Indice

C.3. Actividades enzimáticas asociadas a membranas.....	61
C.3.1. Actividades fosfohidrolasas.....	61
C.3.1.1. ATPasa.....	61
C.3.1.2. PPasa.....	62
C.3.1.3. IDPasa.....	64
C.3.2. Actividad NADH citocromo c reductasa insensible a antimicina A.....	64
C.4. Determinación del transporte de H⁺ en vesículas de membranas.....	64
C.4.1. Fundamento de la medida.....	64
C.4.2. Transporte de H ⁺ dependiente de ATP.....	66
C.4.3. Transporte de H ⁺ dependiente de PPI.....	66
C.5. Antiporte Na⁺/H⁺ en vesículas de tonoplasto.....	68
C.5.1. Aislamiento de tonoplasto.....	68
C.5.1.1. Obtención de microsomas.....	68
C.5.1.2. Gradiente discontinuo de sacarosa.....	68
C.5.2. Medida de la actividad antiporte Na ⁺ /H ⁺	70
C.6. Análisis de lípidos de tonoplasto y plasmalema.....	71
C.6.1. Extracción de lípidos totales	71
C.6.2. Separación de diferentes categorías lipídicas.....	73
C.6.3. Análisis de ácidos grasos de fosfolípidos.....	73
C.7. Análisis electroforético e Inmunoensayos.....	74
C.7.1. Preparación de la muestra. Solubilización.....	75
C.7.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	75
C.7.3. Tinción y secado de los geles.....	76
C.7.3.1. Tinción con plata.....	76
C.7.3.2. Tinción con Coomassie.....	78
C.7.3.3. Secado de los geles.....	79

C.7.4. Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (<i>Western Blotting</i>).....	79
C.7.5. Inmunorrevelado de los enzimas H ⁺ -ATPasa de plasmalema y, H ⁺ -ATPasa y H ⁺ -PPasa de tonoplasto....	80
C.8. Determinación del grado de fluidez de las membranas.....	81

V. RESULTADOS.....	84
A. ESTUDIOS PRELIMINARES.....	86
A.1. Definición del modelo experimental: elección del material vegetal y condiciones de cultivo.....	86
B. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD EN LAS VARIEDADES DE GIRASOL OBJETO DE ESTUDIO.....	87
B.1. Parámetros fisiológicos.....	90
B.1.1. Crecimiento.....	90
B.1.2. Contenido hídrico.....	90
B.1.3. Test de integridad de la membrana.....	91
B.1.4. Contenido de prolina y azúcares totales en los tejidos.....	99
B.1.5. Actividad fotosintética.....	99
B.1.6. Contenido de iones Na ⁺ , K ⁺ y Ca ²⁺ en los tejidos.....	102
B.2. Parámetros bioquímicos.....	102
B.2.1. Enzimas de membrana translocadores de H ⁺	102
B.2.1.1. Aislamiento y caracterización de membranas microsomales.....	103
B.2.1.2. Actividades H ⁺ -ATPasa y H ⁺ -PPasa.....	108
B.2.1.3. Cantidades relativas de proteína antigénica.....	109
B.2.2. Determinación del grado de fluidez de las membranas....	111
C. EFECTO DEL NaCl A NIVEL DE PLASMALEMA Y TONOPLASTO EN LA VARIEDAD ALHAMA.....	120
C.1. Aislamiento de membranas.....	120
C.1.1. Gradiente continuo de sacarosa.....	121
C.1.1.1. Análisis de enzimas marcadores.....	121

Indice

C.1.2. Gradiente discontinuo de sacarosa.....	125
C.1.2.1. Análisis de enzimas marcadores.....	125
C.1.2.2. Caracterización inmunológica de las fracciones del gradiente.....	129
C.1.2.3. Caracterización de las fracciones del gradiente con inhibidores específicos de fosfohidrolasas...137	
C.2. Enzimas H⁺-ATPasa de plasmalema y H⁺-ATPasa y H⁺-PPasa de tonoplasto: caracterización de la actividad fosfohidrolítica.....	139
C.2.1. Efecto del detergente.....	139
C.2.2. Efecto de inhibidores específicos.....	140
C.2.3. Especificidad de sustrato.....	140
C.2.4. Efecto de los cationes divalentes.....	144
C.2.5. Efecto de los iones monovalentes.....	145
C.2.5.1. Estimulación de la actividad PPasa por K ⁺	147
C.2.5.2. Inhibición de la actividad ΔK ⁺ -PPasa por Na ⁺	147
C.2.6. Efecto del pH.....	150
C.2.7. Características cinéticas.....	150
C.2.7.1. ΔVa-ATPasa.....	157
C.2.7.2. ΔNO ₃ -ATPasa.....	157
C.2.7.3. ΔK ⁺ -PPasa.....	157
C.3. Transporte de H⁺ dependiente de ATP y PPi asociado a los enzimas H⁺-ATPasa de plasmalema y H⁺-ATPasa y H⁺-PPasa de tonoplasto.....	158
C.4. Efecto del NaCl sobre el contenido y composición en ácidos grasos de fosfolípidos totales.....	163
C.5. Antiporte Na⁺/H⁺ de tonoplasto.....	165
C.5.1. Aislamiento de tonoplasto.....	165

C.5.1.1. Análisis de enzimas marcadores.....	165
C.5.1.2. Caracterización de las fracciones del gradiente con inhibidores específicos de fosfohidrolasas...167	
C.5.2. Antiporte Na ⁺ /H ⁺ en función de los tratamientos salinos.	167
VI. DISCUSION.....	176
VII. CONCLUSIONES.....	180
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	182

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

La salinidad de los suelos constituye uno de los factores ambientales que más negativamente incide en la producción agrícola, limitando, además, el uso potencial de nuevas áreas de cultivo. Las áreas afectadas suelen ser zonas áridas y semiáridas que contienen una alta concentración de sales o que presentan una progresiva acumulación de las mismas, debido a prácticas inadecuadas de riego con aguas de baja calidad, sobre todo en zonas costeras, y a la alta velocidad de evaporación. Este problema es todavía más preocupante, por cuanto las previsiones a corto y medio plazo sobre el cambio climático del planeta amenazan con un aumento de la sequía y desertificación en vastas zonas del mundo y, especialmente, en el área mediterránea.

Para atacar dicho problema, se han venido desarrollando dos estrategias principales. La primera, económicamente muy costosa, incluye la manipulación tecnológica del ambiente del suelo. Una segunda, que interesa a nuestro ámbito de actuación, está basada en la manipulación biológica de las plantas a través de la identificación y selección de genotipos tolerantes y la incorporación de los rasgos que confieren tolerancia a plantas económicamente importantes, generalmente por cruzamiento convencional, o más recientemente, por ingeniería genética.

En este sentido, aunque la obtención de variedades más tolerantes puede avanzar utilizando criterios agronómicos de selección, no cabe duda que una mayor eficacia de los procesos de mejora depende de la adopción de nuevos criterios derivados de un mejor conocimiento de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y génicos, responsables de la tolerancia de las plantas a la salinidad. Es por tanto, en este contexto, donde se enmarca la investigación que se propone en este trabajo de Tesis Doctoral.

El efecto negativo de altas concentraciones de sal sobre el crecimiento de las plantas es debido primariamente a una combinación de efectos osmóticos, toxicidad iónica y desequilibrios nutricionales causados por la interferencia con

Introducción y objetivos

la absorción y transporte de nutrientes minerales. Frente a ello, las plantas que toleran ambientes salinos han desarrollado básicamente dos tipos de estrategias: la glicofítica, basada predominantemente en la exclusión de iones de la parte aérea o dirigida al medio, en combinación con la síntesis de solutos orgánicos para su ajuste osmótico; y la halofítica, basada en la alta velocidad de absorción y transporte de iones, cuya acumulación en determinados tejidos y su compartimentación subcelular evita la toxicidad iónica, al tiempo que contribuye significativamente al ajuste osmótico.

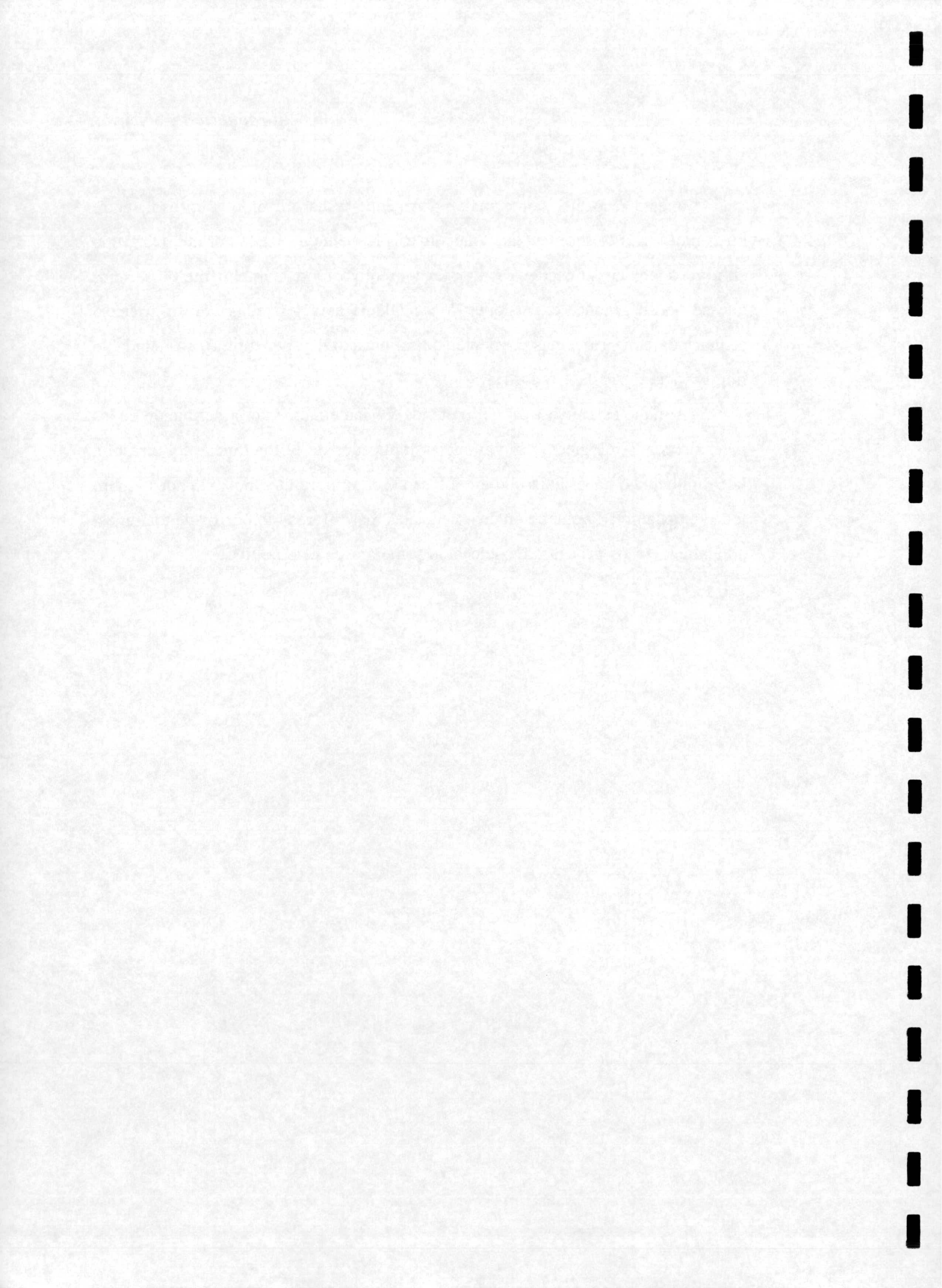
En ambos casos, la concentración de iones en el citoplasma debe mantenerse baja para la óptima operatividad de los procesos celulares, de forma que la regulación de estos flujos iónicos constituye un mecanismo fisiológico global, resultante de la integración de muchos procesos fisiológicos que operan a nivel celular, tisular y del organismo entero, todos ellos bajo control génico. Como determinantes de la capacidad de regular el transporte y la acumulación de iones (Na^+ y Cl^-), las bombas primarias de H^+ , ubicadas a nivel del plasmalema y tonoplasto, deben jugar un papel importante en dicha tolerancia, al proveer la energía necesaria para el mantenimiento de las condiciones osmóticas, iónicas y nutricionales, idóneas para el óptimo funcionamiento celular.

De ahí, que el objetivo primario de este trabajo haya sido el estudio de los sistemas de transporte ubicados en plasmalema y tonoplasto, específicamente los enzimas H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa y su regulación por NaCl , así como la evaluación de la operatividad del transportador secundario Na^+/H^+ en tonoplasto de raíces, como uno de los mecanismos contrastados de tolerancia al estrés salino. Si bien, estos aspectos han sido abordados con cierta profundidad, los resultados obtenidos han indicado una gran disparidad de respuestas en función de la especie, tejido, intensidad y duración del estrés. Por ello, ante la falta de plantas mutantes o transgénicas utilizables como sistemas modelo para el estudio de estos transportadores, se ha hecho necesario la utilización, con fines comparativos, de variedades de una misma especie con una tolerancia diferencial

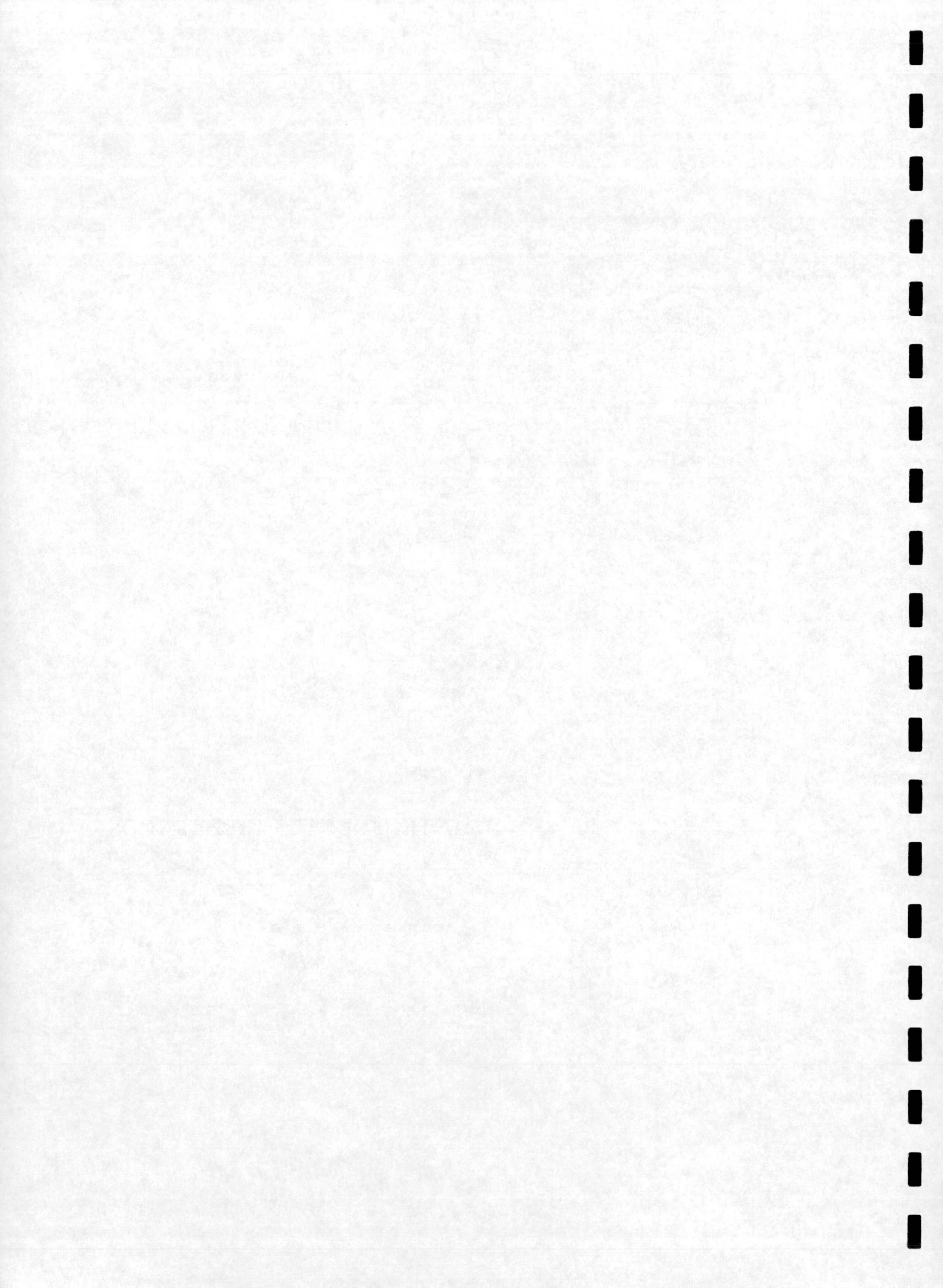
al estrés por NaCl.

A este respecto, como material vegetal, se ha utilizado el girasol, entre otros motivos, por ser una planta modelo ampliamente utilizada por nuestro grupo en investigaciones precedentes; por ser un cultivo fundamentalmente de secano, que se da en grandes extensiones de Andalucía caracterizadas por su aridez o semiaridez con problemas crecientes de salinización; y por último, su indudable importancia agrícola e industrial.

Aunque esta investigación pretende fundamentalmente la definición de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos implicados en la tolerancia del girasol a la salinidad, no cabe duda que en ella se abren importantes posibilidades, sobre todo, en cuanto a la obtención de potenciales marcadores biológicos de tolerancia aplicables en los procesos de selección y mejora de este cultivo.



II. ANTECEDENTES CIENTIFICOS



A. SALINIDAD COMO FACTOR AMBIENTAL DE ESTRES

A.1. Descripción del problema

El 40% de la superficie mundial corresponde a regiones áridas y semiáridas caracterizadas por suelos secos, sometidos a temperaturas extremas y, donde las altas velocidades de evaporación concentran su contenido en sales, dando lugar al fenómeno de salinización. En España, estos suelos representan el 71% de la superficie total, de los cuales el 39% son terrenos semiáridos y el 32% áridos localizándose la mayor parte de éstas en zonas extensas de Andalucía. Actualmente, las previsiones sobre el cambio climático global del planeta indican un progresivo aumento de este tipo de suelos.

Esta escasez de terrenos adecuados, supone que una gran parte de los cultivos agrícolas, se localizan en regiones áridas y semiáridas, donde el problema se va agravando aún más a consecuencia de la práctica inadecuada de riego agrícola con aguas de baja calidad por escasez de lluvia, sobre todo en zonas costeras, donde la sobreexplotación de los acuíferos está produciendo la progresiva salinización de los mismos, por intrusión de agua de mar. Ello unido a la escasa lixiviación de las sales del suelo ocasiona graves problemas económicos y ecológicos al limitar fuertemente la producción agrícola, debido a la alta sensibilidad de la mayoría de los cultivos a la salinidad y, concretamente, cada año, muchas hectáreas de regadío en tierras improductivas (Heinrichs, 1988).

A.2. Suceptibilidad de las plantas a la salinidad

La salinidad de los suelos está mayoritariamente determinada por NaCl, aunque puede tener cantidades considerables de otras sales como Na₂SO₄, CaSO₄, MgCl₂ y Na₂CO₃ (Epstein y Rains, 1987). El crecimiento de las plantas se afecta

Antecedentes científicos

negativamente cuando la concentración de estas sales alcanza una concentración 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 ión (Shannon 1984). En función de las concentraciones umbrales que son capaces de soportar sin sufrir daños aparentes, las plantas pueden clasificarse en los siguientes grupos (Greenway y Munns 1980):

HALOFITAS	400 mM NaCl	<i>Suaeda marítima</i> , <i>Atriplex nummularia</i>
	> 200 "	<i>Atriplex hastata</i> , <i>Spartina townsendii</i>
HALOFITAS Y GLICOFITAS		
Tolerantes	200 "	<i>Festuca rubra</i> , <i>Gossypium</i> , <i>Hordeum</i>
Intermedias	> 100 "	<i>Lycopersicon</i>
Sensibles	< 100 "	<i>Phaseolus</i> , <i>Glycine</i>
GLICOFITAS		
muy sensibles	< 50 "	Cítricos, Aguacates, Frutales de hueso

El girasol, como planta moderadamente tolerante estaría enclavada en un grupo de sensibilidad intermedia (Ojeda y col 1992). Además de esta variación interespecífica, puede haber una variación inytraespecífica con la existencia de variedades que presentan una tolerancia diferencial a la salinidad (Tal 1984, Shannon 1984), abarcando un amplio rango de sensibilidad.

A.3. Abordaje desde una perspectiva biológica

En base a la amplia variación genotípica existente en relación a la tolerancia salina, una aproximación importante a la solución de este problema ha constituido el establecimiento de programas de mejora vegetal basados en la identificación y selección de genotipos mas tolerantes y su utilización como donadores de rasgos que confieren tolerancia para la obtención de plantas más

resistentes y productivas (Epstein y Rains 1987, Noble y Rogers 1992). En este empeño, los mejoradores han venido concentrando tradicionalmente sus esfuerzos en el uso de criterios de selección agronómicos, tales como rendimiento de cosecha o supervivencia, obteniendo un éxito limitado debido a la complejidad biológica de los procesos integrados en estas características. Más recientemente, el uso de criterios de selección basados en procesos fisiológicos concretos relacionados con la tolerancia (mecanismos de exclusión de sales, compartimentación, etc.) ha llevado a significativos progresos en los programas de mejora (Noble y Rogers 1992, Cuartero y col. 1992). Sin embargo, la falta de un conocimiento profundo y exhaustivo de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y génicos, que confieren tolerancia y la escasez de marcadores biológicos potencialmente útiles para los sistemas de selección derivados de ellos ha limitado la aplicación de toda esta información a la mejora de plantas.

No obstante, algunos resultados recientes, muy prometedores han puesto de manifiesto que la mutación, sobreexpresión o transformación de plantas implicando a genes concretos afectaban o mejoraban la tolerancia a la salinidad (Saneoka y col. 1995, Gaxiola y col. 1992, Tarszczinsky y col. 1993). Ello ha hecho concebir esperanzas en que una profundización de 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 mejora de variedades más tolerantes.

No cabe duda, que para llevar a cabo este formidable desafío, se requiere el esfuerzo combinado de fisiólogos, bioquímicos, biotecnólogos y mejoradores, cuya cooperación hará y está siendo posible, el aumento de productividad (y calidad) en áreas de cultivo afectadas por salinidad.

Antecedentes científicos

B. EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE LAS PLANTAS

El efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas se debe a la combinación de tres efectos (Gorham y co. 1985): a) el estrés hídrico causado por el potencial hídrico más negativo del medio de la raíz (presión osmótica elevada), b) toxicidad iónica específica asociada normalmente con una excesiva absorción de sodio y/o cloro, c) el desequilibrio nutricional iónico cuando el exceso de sodio o cloro conduce a una menor absorción de K^+ , nitrato o fosfato, o a una alteración de la distribución de uno o varios de estos iones. Estos efectos 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 y de determinadas actividades enzimáticas, disminución de la fotosíntesis, inducción de deficiencias iónicas.

Diferentes revisiones bibliográficas han recopilado multitud de manifestaciones fisiológicas, bioquímicas y moleculares en plantas cultivadas bajo condiciones salinas (Flowers y col. 1977, Greenway y Munns 1980, Levitt 1980, Yeo y col. 1983, Shannon 1984, Tal 1985, Munns y Termaat 1985, Hasegawa y col. 1986, Cheeseman 1988, Hurkman 1992, Shannon y col. 1994).

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.

C. MECANISMOS DE TOLERANCIA A LA SALINIDAD

Ante condiciones adversas, específicamente la salinidad, las plantas pueden desarrollar dos tipos de estrategias. En un tipo de respuesta, las plantas desarrollan funciones y estructuras que protegen de las condiciones adversas al evitar que éstas lleguen, o lleguen muy atenuadas, a la mayoría de las células. En

otro tipo de respuestas, las células adaptan sus funciones para que puedan operar en estas condiciones adversas, es decir, las plantas las toleran. Con frecuencia en las plantas se dan simultáneamente estos dos tipos de respuestas o mecanismos de adaptación: evitación y tolerancia.

La tolerancia parece ser el mecanismo de adaptación más primitivo y menos eficaz ya que implica un estado de equilibrio de la planta con el medio externo adverso que permite estrictamente la supervivencia sin presentar metabolismo, crecimiento y desarrollo normal hasta que el estrés desaparece. En el caso de la evitación, la planta mantiene su estado normal de desequilibrio con el medio ambiente externo y puede sobrevivir, crecer y desarrollarse normalmente en condiciones de estrés.

Resistencia al efecto tóxico específico del NaCl

Los enzimas responsables del metabolismo celular son altamente sensibles a la salinidad y, por ello, las células no suelen tolerar altas concentraciones de sal en el citoplasma, salvo raras excepciones. Así, los mecanismos de evitación del efecto tóxico de la sal sobre el funcionamiento celular son esenciales en la resistencia al estrés salino. Estos son:

- Exclusión de sales. Ha sido ampliamente descrito que la resistencia a la salinidad depende del mantenimiento de la impermeabilidad de la membrana plasmática de la célula a la sal. La permeabilidad normal de ésta a los iones depende del balance entre cationes monovalente (K^+ , Na^+) y divalentes (Ca^{2+}). Cuando este balance se rompe por concentraciones demasiado altas de cationes monovalentes, la permeabilidad de la membrana incrementa con el consiguiente daño celular. Las plantas que excluyen la sal poseen una baja permeabilidad a la misma incluso en presencia de altas concentraciones. Las células exclusoras pueden así, mantener el balance iónico normal en condiciones de salinidad quizás por una alta y preferencial absorción de Ca^{2+} por la membrana plasmática.

Antecedentes científicos

En glicófitas, la sal es excluida de la parte aérea de la planta acumulándola preferencialmente en la raíz o en la base de los tallos. Su acumulación en raíz se debe probablemente a una alta selectividad iónica en el proceso de transporte via simplasto hacia el xilema, acumulándose en células corticales, endodérmicas y del parénquima xilemático. La acumulación en la base de los tallos se debe a procesos de reabsorción de Na^+ en estas zonas, desde las vacuolas del xilema a las del parénquima xilemático. En este segundo caso, la reabsorción se llevó a cabo por células específicas, formadas a partir de procesos de diferenciación celular inducidos por estrés salino, llamadas células de transferencia, que acumulan Na^+ , probablemente en intercambio con K^+ .

- Extrusión, excreción de sales. La extrusión consiste en evitación de una alta concentración de sales en el citoplasma celular mediante su transporte hacia la vacuola o medio externo. Esto requiere membranas altamente especializadas (plasmalema y tonoplasto) con bombas iónicas específicas capaces de excretar rápidamente el exceso de sal por procesos de transporte activo. Es uno de los principales mecanismos de evitación y conlleva consumo de energía. Se ha observado, que una de las adaptaciones a la salinidad de plantas glicófitas tolerantes, consiste en el aumento de la superficie de la membrana plasmática de determinadas células, apareciendo gran cantidad de invaginaciones con numerosas mitocondrias, incrementándose así, la superficie destinada a procesos de exclusión de iones dependientes de energía, en dicha membrana. Quizás, el más elaborado mecanismo de adaptación a la salinidad de plantas halófitas consiste en la formación de estructuras acumuladoras de sal (glándulas de la sal, bladders, micropelos) de superficies epidérmicas de hojas y tallos. En estos casos la sal se elimina por secreción o bien desechando las estructuras que la contienen sustituyéndolas por otras con baja concentración de sal.

Las especies halófitas poseen mecanismos más eficaces de extrusión de sal. Generalmente, acumulan menos sal en sus tejidos que las especies glicofitas cuando se las someten a condiciones de salinidad.

- Dilución de las sales. Plantas glicófitas y halófitas resistentes al estrés salino evitan el incremento de sales en los tejidos mediante un rápido crecimiento y la subsiguiente absorción de agua. En este proceso corrobora el cierre estomático, observado en plantas sometidas a salinidad.

Las plantas, fundamentalmente halofíticas, presentan también otro mecanismo de dilución. En condiciones naturales, su contenido de sales incrementa gradualmente con la edad y eventualmente, alcanza niveles tóxicos. Estas plantas lo evitan por un aumento de su succulencia, es decir, las células aumentan su contenido hídrico ampliando de volumen y así, disminuyen la concentración de sal de la vacuola. Este mecanismo depende de paredes celulares delgadas, plástica y extensibles que permitan la expansión celular continua.

Resistencia al estrés osmótico causado por la salinidad

Ya que la membrana celular es permeable al agua, la principal consecuencia de la salinidad es el estrés hídrico por la pérdida de turgor celular y la posterior paralización del crecimiento, en caso de estrés severo. La resistencia, en este caso, es por evitación o tolerancia a la deshidratación.

La tolerancia de la planta a la deshidratación permite la supervivencia en condiciones de bajo turgor. En este caso, la planta no crece y usa la energía metabólica celular para adaptarse a estas condiciones adversas.

La evitación de la deshidratación, por otro lado, permite la rehidratación de la célula, manteniendo o retornando su turgor y crecimiento. Esto es posible solo como un resultado de un incremento del contenido de solutos de la célula que debe ser suficiente para bajar su potencial osmótico a valores inferiores a los del medio externo. Este proceso -el mantenimiento del turgor celular mediante un aumento suficiente de solutos osmóticos, para compensar el estrés osmótico celular- se llama OSMOREGULACION o ajuste osmótico.

Antecedentes científicos

Todas las plantas resistentes a la salinidad poseen este mecanismo de adaptación por evitación de la deshidratación, la cual es la base de la resistencia al estrés osmótico secundario inducido por la salinidad.

La osmoregulación, cuando las plantas se exponen a la sal, se debe a: 1) absorción activa de sales y, 2) síntesis de solutos orgánicos.

1) Acumulación de iones: En la mayoría de las plantas, la osmoregulación en respuesta al estrés salino severo se lleva a cabo parcialmente por la acumulación de iones (K^+ , Na^+ , Cl^- ,...) provenientes del medio externo, en vacuolas. Esta acumulación se debe a transportadores de iones dependientes de energía, localizados en plasmalema y tonoplasto.

2) Síntesis y acumulación de solutos orgánicos: El citoplasma celular de células de plantas sometidas a la salinidad, se deshidrataría por la bajada en la vacuola y medio externo del potencial osmótico; para prevenirlo, la célula incrementa el contenido de solutos orgánicos osmóticos no tóxicos en su citoplasma, cuyos niveles vuelven a valores normales cuando las condiciones estresantes desaparecen .

Ya que en las células maduras la vacuola representa entre un 75 y 90% del volumen total, la concentración de osmolitos en el citoplasma podrá ser solo entre un cuarto y una décima parte de la de los iones inorgánicos acumulados en la vacuola. Este porcentaje incrementa en la parte aérea de plantas glicófitas estresadas, ya que los solutos orgánicos son los componentes mayoritarios de ajuste osmótico puesto que la mayoría de la sal es retenida en raíces y base de los tallos.

Los solutos orgánicos se acumulan a altas concentraciones con poco efecto en el metabolismo celular, incluyendo una gran variedad de formas de polialcoholes, glicerol, manitol, sacarosa, prolina y betaina.

La prolina es uno de los aminoácidos mas importantes para el ajuste osmótico. En algunas plantas estresada se han observado que la prolina representa entre un 30 y 70% del contenido total de aminoácidos, cuya concentración en el

citoplasma celular está directamente relacionada con la de Na y Cl en la vacuola.

No todos los solutos orgánicos sintetizados en respuesta al estrés salino actúan como osmótico citoplasmático. Se ha demostrado la función del ácido oxálico en el mantenimiento del balance iónico al precipitar iones alcalinos absorbidos en exceso, evitando la toxicidad iónica en plantas.

Resistencia a la deficiencia de nutrientes

Una de las causas que provocan la reducción del crecimiento de las plantas cuando son estresadas por salinidad es la deficiencia en la absorción de determinados nutrientes. La toma por las raíces de grandes cantidades de sodio puede crear dificultades para la absorción de otros elementos como potasio y fósforo. Se ha observado que las plantas estresadas por NaCl presentan una sintomatología semejante a la causada por la deficiencia de estos dos compuestos. El síntoma más característico y que coincide con lo observado con plantas estresadas por NaCl, es la coloración verde oscura o azulada de las hojas.

Una forma que presentan las plantas para evitar la deficiencia de nutrientes que se encuentran en el suelo en bajas concentraciones, es la presencia de un doble sistema de transporte, uno que es más efectivo con iones presentes a concentraciones elevadas y otro que presenta una eficiencia máxima con iones presentes en concentraciones bajas.

D. ESTRUCTURAS CELULARES RESPONSABLES DE LA RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A LA SALINIDAD. MEMBRANAS CELULARES

Anteriormente se ha expuesto los efectos y mecanismos de resistencia de las plantas a la salinidad. Todos estos mecanismos dependen de las membranas celulares, específicamente plasmalema y tonoplasto, y concretamente, de dos de

Antecedentes científicos

sus propiedades que son la permeabilidad a los iones y el bombeo de los mismos. Así, la toxicidad específica de un ion en la célula así como el desbalance nutricional causado por el mismo, se debe a su efecto tóxico directo sobre estas dos propiedades de las membranas celulares. Por otra parte, la evitación del estrés osmótico causado, requiere un muy eficaz tonoplasto, altamente especializado, capaz de excretar el exceso de sal protoplásmica a la vacuola por procesos de transporte activo. El tonoplasto debe de ser altamente impermeable a la sal, para prevenir su difusión al citoplasma.

La estructura celular mas importante en la respuesta de las plantas a la salinidad es la membrana. Toda célula tiene una membrana plasmática en contacto con el medio externo y, un sistema de estructuras membranas intracelulares, delimitando compartimentos y orgánulos, permitiendo un grado sin par de organización subcelular. Las membranas controlan la entrada de sustancias y, el pH y composición iónica del medio interno, para la óptima funcionalidad de los procesos biológicos allí localizados, por la presencia de sistemas de transporte selectivos para el movimiento de moléculas específicas. Además presentan otras proteínas estructurales con funciones muy importantes y variadas en el metabolismo celular.

Los componentes mayoritarios de las membranas biológicas son los lípidos y las proteínas y, en menor proporción, polisacáridos en forma de glucolípidos y glucoproteínas.

Los determinantes de su estructura son mayoritariamente los lípidos y, específicamente, los fosfolípidos, formados por una molécula de glicerol como componente básico con el que se esterifica un ácido fosfórico en el carbono alfa y dos ácidos grasos de cadena larga en los carbonos restantes. Esta composición determina una estructura con un extremo polar que corresponde al fosfato cargado y a las sustituciones sobre el mismo y, una cola no polar correspondiente a las cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas de los grupos acilo grasos, que le confiere naturaleza anfipática.

Antecedentes científicos

Las proteínas de la membrana se clasifican por su posibilidad de aislamiento a partir de fracciones de membrana. Las proteínas extrínsecas (o periféricas) e intrínsecas (o integrales). Las extrínsecas se aíslan fácilmente y son solubles en agua. Las intrínsecas requieren un tratamiento más drástico para ser aisladas, son generalmente lipoproteínas no solubles en agua. Las membranas plasmáticas pueden contener también una cantidad significativa de glúcidos en forma de glucoproteínas, orientadas hacia la parte exterior de la célula y, asociadas a procesos de reconocimiento. Las proteínas de la membrana pueden tener un papel catalítico, de transporte, estructural o de reconocimiento por lo que las membranas suelen tener un alto contenido proteico correlacionado con la complejidad y cantidad de funciones de la misma.

Las características estructurales básicas de todas las membranas derivan de las propiedades físico-químicas de los componentes lipídicos mayoritarios, los fosfolípidos. El conocimiento de la estructura de las membranas biológicas se basa en investigaciones físico-químicas, bioquímicas y de microscopía electrónica.

Las membranas biológicas, tanto si son las que rodean a la célula como las que incluyen un orgánulo celular, tienen una serie de componentes semejantes con una organización estructural general a todas ellas. Hay, por supuesto, diferencias importantes en los componentes lipídicos y proteicos específicos pero no en la integración de estos componentes, lo que conduce a un aspecto y propiedades generales en todas las membranas.

Se han propuesto varios modelos de estructura. El más aceptado es el propuesto por Nicholson GL y Singer JD en la década de los sesenta, llamado modelo del mosaico fluido, según la cual la estructura básica de la membrana es un ordenamiento en forma de hoja bimolecular de fosfolípidos y esteroides, con las porciones hidrofóbicas de las moléculas orientadas hacia el interior de la bicapa y los grupos polares hacia el exterior, y con proteínas en su superficie, incrustadas o atravesándola. Esta presenta un alto grado de fluidez permitiendo

Antecedentes científicos

la movilidad de sus componentes, sometidos a su vez a un continuo recambio. De este modo, las membranas celulares se encuentran en un estado constantemente cambiante, no solo con movimientos de lípidos y proteínas lateralmente sobre la membrana sino también con moléculas que entran y salen. En el mantenimiento de las características estructurales básicas están implicadas una serie de fuerzas entre las que se incluyen las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas.

D.1. Sistemas bioquímicos responsables del transporte iónico a través de las membranas

D.1.1. Transporte activo por bombas iónicas en plantas

Estas bombas son enzimas que utilizan la energía química del ATP o PPI para el transporte de un ión en contra de gradiente (transporte activo primario).

A diferencia de las membranas de origen animal, en que las bombas Na^+/K^+ parecen tener un papel predominante, los procesos de transporte activo primario a través de las membranas en plantas superiores se llevan a cabo por bombas de protones.

Los procesos de transporte activo primario en plantas superiores están fundamentalmente constituidos por sistemas de transporte electrogénico de H^+ (Poole, 1978; Spanswick, 1981). El transporte de H^+ controla el pH citoplasmático y proporciona la fuerza proton-motriz necesaria para el transporte de sustancias (transporte activo secundario), como iones (Na, Cl,...), reguladores del crecimiento, aminoácidos y azúcares, según predice la teoría quimiosmótica de Mitchell (Mitchell, 1976). Por estas dos propiedades, las bombas de protones desempeñan un papel clave en funciones como la regulación de la turgencia y volumen celular, homeostasis de la composición iónica intracelular, apertura y cierre de los estomas, carga y descarga de sacarosa en el floema, regulación del crecimiento en extensión de la célula y pared celular, mantenimiento del potencial

de membrana, etc. Debido a que estas funciones están claramente afectadas en plantas estresadas por la salinidad, está claro que el estrés salino debe ejercer efecto sobre estas enzimas bombeadoras de protones, ATPasas y PPasas, que usan ATP y PPi como fuente de energía para dicho transporte, respectivamente.

El descubrimiento de la existencia de bombeo electrogénico de protones en células vegetales se realizó estudiando "in vivo" el crecimiento de órganos inducido por auxina, transporte activo de diferentes sustancias y el desarrollo y mantenimiento de potenciales eléctricos en las membranas (Sze 1985, y refs).

Los primeros trabajos realizados en vesículas aisladas, demostraron la existencia de enzimas hidrolizantes de ATP en plasmalema (Hodges, 1976) y tonoplasto (Walker y Leigh, 1981). Se postularon dos posibles mecanismos implicados en el transporte de protones:

- El bombeo de protones dependiente de la hidrólisis de ATP, catalizado por ATPasas de plasmalema (Hodges 1973; Slayman, 1974; Poole 1978; Spanswick, 1981) y ATPasas y PPasas de tonoplasto (MacRobbie, 1979; Raven y col. 1979).

- El bombeo de protones es conducido por la oxidación de sustratos reducidos (p.e, NADH), por actividad de las cadena redox presentes en las membranas (Ivankina y Novak, 1980; Lin, 1982).

Desde 1980, una serie de estudios realizados en vesículas microsomales aisladas de plantas superiores han proporcionado evidencias directas de la existencia de bombas H^+ -ATPasas en plasmalema y tonoplasto y H^+ -ATPasas y H^+ -PPasas en tonoplasto, que generan un gradiente electroquímico de protones en dichas membranas (Hager, 1980; Bennett y spanswick, 1983; Churchill y Sze, 1983).

Antecedentes científicos

D.1.1.1. H⁺-ATPasas

A pesar de la multiplicidad funcional de las ATPasas, la estructura básica de estos enzimas ha estado bien conservada. En procariotas y eucariotas estas actividades han sido organizadas en tres tipos estructurales: las F-ATPasas de bacterias, mitocondrias y cloroplastos, las P-ATPasas de plasmalema y, V-ATPasas de vacuolas y sistemas endomembranarios.

D.1.1.1.1. F-ATPasas

Estan presentes en eubacterias, mitocondrias y cloroplastos.

Se caracterizan por no formar intermediario fosforilado, pH óptimo alcalino, y sensibilidad a azida, DCCD y, en el caso de las mitocondrias a oligomicina.

El complejo ATPasa consta de una porción hidrosoluble denominada F₁, que contiene los sitios de unión la sustrato y la capacidad de hidrolizar o sintetizar ATP, y una porción hidrofóbica F_o, componente integral de la membrana que contiene el canal conductor de protones. La F₁ consta de 5 subunidades diferentes (alfa, beta, gamma, delta y epsilon) con una estequiometría de las subunidades de alfa₃,beta₃,gamma,delta,epsilon y un peso molecular de 350,000-380,000. El centro activo del enzima se localiza en las subunidades alfa y beta. La subunidad gamma se considera que actua como una compuerta para la actividad translocadora de protones del complejo mientras que se ha propuesto que la subunidad delta sería necesaria para la fijación de F₁ a la membrana. La subunidad epsilon parece estar involucrada en la regulación de la actividad ATPasa. La porción F_o de la ATPasa consiste en tres o cuatro subunidades diferentes constituyendo el canal de transporte de protones a través de la membrana pudiendo tener pequeñas subunidades adicionales, como la subunidad conferidora de sensibilidad a la oligomicina en mitocondrias.

La función de esta enzima es la síntesis de ATP en cloroplastos y mitocondrias y, en el caso de las bacterias, esta enzima interviene también en los procesos de transporte de solutos hidrolizando ATP.

D.1.1.1.2. P-ATPasas: H⁺-ATPasa de plasmalema

Este enzima han sido purificados y caracterizados a nivel bioquímico, tanto en vesículas y proteoliposomas (Serrano 1985, Sze 1985) como en preparaciones purificadas del enzima solubilizado con detergente (Serrano 1984, Serrano 1988, y refs).

El gen que codifica para este enzima en diferentes orígenes vegetales, ha sido clonado y secuenciado. Por análisis de similitud en las secuencias aminoacídicas codificadas por estos genes se ha propuesto la estructura primaria y secundaria de este enzima, así como su mecanismo de acción (Pardo y Serrano 1989, Serrano 1990, y refs).

Estructura

Los resultados obtenidos del aislamiento y purificación de este enzima indican que está constituido por una sola unidad de aproximadamente 100 kDa que se organiza en la membrana como un dímero, según indican los estudios del comportamiento cinético del enzima, observaciones a microscopio electrónico y, determinación del tamaño del enzima "in situ" por técnicas de radiación-inactivación.

Según el análisis de hidrofobicidad de esta secuencia, la mayor parte de este polipéptido es hidrofóbico y, solo una pequeña parte es hidrofílica y está orientada hacia el citoplasma con muy pocos residuos hacia la superficie externa de la membrana.

La comparación de las secuencias aminoacídicas de este polipéptido de

Antecedentes científicos

plasmalema de diversos orígenes vegetales, pone de manifiesto la existencia de zonas altamente conservadas, situándose en las regiones hidrofílicas de la proteína y hacia la cara citoplasmática de la membrana constituyendo, probablemente, los centros activos del enzima. Las ATPasas parecen cruzar nueve veces la membrana; seis de estas regiones transmembrana podrían constituir el canal para el transporte de protones.

En base a estos resultados **Serrano (1989)** propone un modelo estructural del enzima representado en la Figura 2.

El dominio N-terminal es el mas variable en longitud y secuencia. No se conoce exactamente su función pero se sabe que es imprescindible para la actividad del enzima, pudiendo así tener gran importancia desde un punto de vista estructural.

El dominio fosfatasa que cataliza la hidrólisis del intermediario fosforilado, contiene los dos primeros sitios conservados del enzima.

El dominio de transducción al que se une el grupo fosfato del ATP dando lugar a la formación del intermediario fosforilado, contiene el segundo sitio conservado del enzima.

El dominio con actividad kinasa, sitio de unión del ATP y de su catálisis para la formación del intermediario fosforilado, actividades probablemente asociadas a cuatro zonas altamente conservadas.

El extremo C-terminal, también variable en longitud y secuencia. Se ha establecido recientemente que constituye un dominio autoinhibidor del enzima, ya que su eliminación activa el bombeo de protones a través de dicha membrana. Esta autoinhibición parece ser llevada a cabo por diferentes mecanismos: a través de moléculas efectoras, fosforilación, control a nivel genético o proteolisis parcial con liberación del un segmento terminal de 7 kDa (**Palmgren, 1991**).

Mecanismo de acción

En 1965, Skov propuso que podría existir un acoplamiento directo entre la hidrólisis de ATP y el transporte de protones, en el mecanismo de acción de las ATPasas. Según esta hipótesis, la reacción de transporte de protones estaría estrechamente asociada a la fosforilación y desfosforilación del enzima (Jorgensen y Andersen 1986). Serrano (1989) y Briskin (1990) propone un mecanismo de acción del enzima basado en esta hipótesis:

El enzima pasa por dos conformaciones diferentes, denominadas E_1 y E_2 , con diferentes propiedades catalíticas y de transporte de H^+ . La conformación E_1 presenta el dominio quinasa activo y alta afinidad por los protones, con el canal de transporte orientado hacia el citoplasma. La conformación E_2 con el dominio fosfatasa activo y baja afinidad hacia los protones, con el canal de transporte orientado hacia la cara externa de la membrana. El funcionamiento del enzima se basa en la alternancia consecutiva de estas dos conformaciones (Figura 3): el ATP se une al enzima, adoptando éste la conformación E_1 con alta afinidad para los protones; la captación de un protón por el enzima activa el dominio kinasa que hidroliza el ATP dando lugar a la formación del intermediario fosforilado, mediante la fosforilación del ácido aspártico del dominio de transducción; se produce la separación del ADP y el enzima adopta la conformación E_2 con baja afinidad por los protones, liberándose el protón en la cara externa de la membrana, induciéndose la forma activa de la fosfatasa y el movimiento del complejo fosforilado hacia ella, produciéndose la desfosforilación del enzima y el nuevo cambio conformacional a E_1 . En este proceso, el protón es captado por la conformación E_1 , atravesaría la membrana en el cambio conformacional a E_2 y, quedaría posteriormente libre en la cara externa de la membrana.

Antecedentes científicos

Características cinéticas

La actividad H⁺-ATPasa de plasmalema de diversos orígenes vegetales ha sido ampliamente caracterizada.

Esta actividad depende de cationes divalentes, siendo el Mg²⁺ el más efectivo en la activación del enzima; se estimula por cationes monovalentes, en la siguiente secuencia K⁺ > Rb⁺ > Na⁺ > Cs⁺ > Li⁺ (Sze, 1985; Gronwald, 1990); no se altera por los aniones, incluso el transporte asociado a este enzima se estimula por la presencia de aniones permeantes (Cl⁻, NO₃²⁻, Br⁻) probablemente por anulación del potencial eléctrico de la membrana (Vara y Serrano, 1982).

La actividad de este enzima exhibe una fuerte preferencia hacia el ATP, siendo otros nucleótidos, como GTP y ITP, hidrolizados en un porcentaje menor del 10%. La estimulación por cationes monovalentes es dependiente de ATP.

El sustrato fisiológico del enzima es el Mg-ATP. Esta actividad presenta cinéticas de Michaelis-Menten para la concentración de este sustrato con valores de Km, obtenidos a partir de la regresión lineal de dichas cinéticas, de aproximadamente 0.4-0.6 mM de Mg-ATP.

Este enzima se distingue por su sensibilidad a inhibidores:

Es altamente sensible a vanadato, con un 50% y 100% de inhibición con 2-10 μM y 50-100 μM de vanadato, respectivamente (Serrano, 1982; Kasamo, 1986). El vanadato es un inhibidor de fosfohidrolasas que forman intermediario fosforilado (Macara, 1980) y fosfatasas ácidas (Gallagher y Leonard, 1982).

Es sensible a DCCD, eritrosina B y en menor proporción a DES, bloqueantes de enzimas translocadores de protones.

Es insensible a oligomicina, azida (inhibidores específicos de las F-ATPasas), nitrato y bafilomicina (inhibidores específicos de las V-ATpasas).

D.1.1.1.3. V-ATPasas: H⁺-ATPasa de tonoplasto

Las V-ATPasas han sido aisladas, solubilizadas y purificadas en diversos orígenes vegetales. Su composición y estructura es bastante similar si bien presentan variaciones según la especie vegetal y, dentro de una misma especie, en función del tejido, compartimento celular y estadio de desarrollo del vegetal (Sze 1992).

Estructura

La enzima H⁺-ATPasa de tonoplasto presentan un peso molecular variable de 580 a 760 kDa y contienen aproximadamente 10 subunidades de pesos moleculares que oscilan entre 70 y 12 kDa (Sze 1992).

A microscopio electrónico, las V-ATPasas de plantas tienen una apariencia de bastón similar a las F-ATPasas. Sze (1992) propone un modelo estructural para la H⁺-ATPasa de tonoplasto de raíces oat, en base al análisis comparativo de las enzimas procedentes de diversos orígenes vegetales (Figura 4), según el cual este enzima presenta dos regiones estructurales: la región hidrofílica V₁ de 540 kDa de peso molecular, que constituye la parte periférica del enzima y contiene su actividad catalítica, formada por subunidades de 70, 60, 44, 42, 36 y 29 kDa; y una porción hidrofóbica V_o, anclada a la membrana, que constituye el canal para el transporte de protones y que está formada por una subunidad de 32 kDa y tres subunidades de 16, 13 y 12 kDa de peso molecular.

Las dos subunidades mayores parece ser que se codificadas por dos genes distintos, por duplicación de un mismo gen (Nelson y Taiz 1989). Ambos genes codifican para la región del unión al sustrato del enzima, indicando que ambas subunidades podrían contener el sitio catalítico del sustrato (Rea y col. 1987). La evidencia de que la subunidad mayor contiene al sitio catalítico para la hidrólisis de ATP se confirmó mediante el uso de los inhibidores de la ATPasa de

Antecedentes científicos

tonoplasto NBD-CL (Mondela y Taiz 1986, Randell y Sze 1986), y un derivado del ATP (Chon y col. 1992). Manolson y col. (1985) y Brauer y Tu (1994), especulan que si bien la subunidad de menor tamaño contiene el sitio catalítico del enzima, su función es básicamente reguladora.

Una subunidad de aproximadamente 42 kDa (Sze 1992) parece ser requerida para la estabilización del complejo ATPasa, sin intervenir en su actividad.

Una subunidad de aproximadamente 16 kDa (Sze 1992) es el componente mayoritario del complejo V_o y ha sido postulado su papel en el transporte de protones por el enzima (Kaestner y col. 1988, Rea y col. 1987). Se ha aislado el ADN circular que codifica para esta subunidad y determinado su secuencia aminoacídica. Estos resultados indican una molécula altamente hidrofóbica con cuatro dominios transmembrana (Lai y col. 1991). Existen alta similitud de la secuencia aminoacídica de esta subunidad y la subunidad de 8 kDa de la ATPasa de mitocondrias, formadora del canal para el transporte de protones de este enzima. Se ha propuesto que seis copias de esta subunidad de 16 kDa constituyen el canal para el transporte de protones de la H^+ -ATPasa de tonoplasto (Sze 1992).

Mecanismo de acción

No se conoce exactamente el mecanismo de acción de este enzima. El modelo estructural propuesto anteriormente encaja en un mecanismo de acción en el que exista un acoplamiento directo entre la actividad fosfohidrolítica y el transporte de protones del enzima. Sin embargo, hay evidencias que indican que no existe tal acoplamiento directo, ya que la hidrólisis de ATP y transporte de protones de la enzima H^+ -ATPasa de tonoplasto de raíces de maiz presentaron claras diferencias en su respuesta a varios tratamientos (Tu y col. 1987, 1988, 1990, 1992). Así, se ha propuesto un mecanismo de acoplamiento indirecto para

la actividad de dicho enzima. Según este mecanismo, la ATPasa estaría compuesta de tres dominios funcionales: un dominio que hidroliza ATP, otro que transporta los protones y un tercer dominio que acoplaría ambas reacciones.

Características cinéticas

La insensibilidad al vanadato de esta actividad enzimática (Dupont y col. 1985, Mandala y col. 1982, Walker y Leigh 1982) indica que no forma intermediario fosforilado durante la catálisis.

Esta ATPasa es relativamente insensible a los cationes (Mettler y col. 1982, Churchill 1983, O'Neill y col. 1983) y, sensible a los aniones (Sze 1985), siendo estimulada por Cl^- , Br^- e inhibida por nitrato (Hager y Hemle 1981, Dupont y col. 1982, Mandala y col. 1982, Churchill y Sze 1983, Poole y col. 1984). La estimulación por aniones, específicamente por Cl^- , es debida a un efecto directo del ión sobre el enzima. En general, los aniones estimulan el bombeo de protones y la catálisis de ATP en la secuencia: Cl^- , $\text{Br}^- > \text{I}^- > \text{HCO}_3^- > \text{SO}_4^{2-}$ (Stout y Cleland 1982, Bennett y Spanswick 1983a, Bennett y Spanswick 1983b, Randall y col. 1984).

El nitrato es un inhibidor relativamente específico de las ATPasas de tonoplasto afectando tanto a la formación del gradiente de pH como a la actividad ATPasa (Churchill y col. 1983, de Michaelis y col. 1983, O'Neill y col. 1983). Griffith y col. (1985) postulan que el efecto del nitrato podría ser debido a una competición con el ATP, ya que puede adoptar una estructura geométrica similar a la del grupo fosforil del ATP. Otra hipótesis indica que la disipación del potencial de membrana se produciría por la existencia en el tonoplasto de un simporteador $\text{NO}_3^{2-}/\text{H}^+$ (Blumwald y col. 1985 y 1987, Bowman y Slayman 1979). Así podría explicarse la estimulación del transporte de protones por nitrato en determinadas circunstancias (Lew y Spanswick 1985).

Dupont (1987) al igual que Churchill y Sze (1984) proporcionan otra

Antecedentes científicos

alternativa, según la cual el nitrato inhibiría la actividad del enzima por su unión a él en la caracç citoplasmática de la membrana, si bien mantienen que solamente se produciría inhibición cuando se alcanza una determinada concentración de nitrato en el interior de la vacuola. Churchill y Sze (1984) proponen que este enzima está activo o inactivo según esté unido a Cl^- o NO_3^{2-} , respectivamente.

El DIDS es otro inhibidor relativamente específico de la ATPasa de tonoplasto (Randall y Sze 1986, Schumaker y Sze 1985, Sze 1985, Wang y Sze 1985). La inhibición ha sido atribuida a su efecto sobre los lugares específicos de unión a aniones (Churchill y Sze 1984).

Este enzima es sensible a DCCD, Eritrosina B y DES, agentes bloqueantes del bombeo de protones. Se ha postulado que el DCCD se une a la subunidad de 16 kDa de la ATPasa de tonoplasto inhibiendo así el transporte de protones (Randall y Sze 1986, Wang y Sze 1985).

Entre varios nucleótidos, el ATP es el mas efectivo 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 PPI es un sustrato mas eficaz que el GTP (Churchill y Sze 1983, Dupont y col. 1982b).

Requiere cationes divalentes para su actividad. En presencia de KCl el Mg^{2+} es el mas efectivo y, en su ausencia es el Mn^{2+} , no conociendose exactamente a que se debe este efecto diferencial (Sern y Sharma 1994).

La afinidad (K_m) para el sustrato Mg-ATP, fue menor que la de la ATPasa de plasmalema (Sze 1984), teniendo un valor aproximado de 0.1-0.2 mM (Churchill y Sze 1983, O'Neill y col. 1983).

Los cationes monovalentes estimulan la actividad del enzima en el siguiente orden $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+$ (Sen y Sharma 1994).

Presenta una actividad máxima a pH alrededor de 8.0.

Isoformas

Se han aislado los cDNA que codifican para la subunidad de 60 kDa en oat y Arabidopsis (Lai y col. 1991, Sze y col. 1992) y para la subunidad de mayor tamaño (aproximadamente 60 kDa) en varios orígenes vegetales (Starke y col. 1991). Los resultados obtenidos indican que ambas subunidades son codificadas por múltiples genes, si bien no está claro que todos ellos se expresen en las plantas. Este hecho puede indicar que estos genes codifican para isoformas de la enzima tal y como ocurre para otras bombas de H^+ de plantas (P-ATPasa y V-PPasa).

D.1.1.2. H^+ -PPasas: H^+ -PPasa de tonoplasto

Actualmente, muchas actividades de PPasas han sido aisladas, caracterizadas y clasificadas. Las PPasas de procariotas y eucariotas se organizan en dos grupos. El primer grupo lo formarían las PPasas solubles, localizadas en bacterias, matriz mitocondrial y estroma cloroplastidial y, el segundo grupo, las PPasas asociadas a membrana localizadas en vacuolas, mitocondrias de mamíferos y *Rhodospirillum rubrum*. En este segundo caso, la reacción de hidrólisis de PPi está acoplada al transporte de H^+ a través de la membrana.

El primer descubrimiento de la existencia de este enzima en células vegetales fue en los años 70 cuando Karlsson demostró una actividad enzimática en membranas que hidrolizaba PPi y se estimulaba por K^+ . En 1981, Walker y Leigh caracterizaron una actividad de PPasa asociada a membrana y demostraron su dependencia funcional del Mg^{2+} . En 1983 y 1984, se observó acidificación intravesicular en membranas, dependiente de PPi (Bennett y col. 1984, Churchill y col. 1983), pero podría resultar de una actividad de ATPasa que hidrolizara PPi como sustrato. Posteriormente, en 1985 y 1986, se demostró la

Antecedentes científicos

existencia de una bomba de H⁺ en el tonoplasto de células de plantas, denominada V-PPasa, con independencia estructural y funcional de la V-ATPasa de esta misma membrana.

Tamaño molecular y funcional del enzima

La masa molecular del enzima determinada por técnicas de radiación-inactivación fue de 88 ± 8 kDa en *A. pseudoplatanus* (Fraichard y col. 1989) y de 91 kDa en *B. vulgaris* (Sarafian y col. 1992^b). Estos resultados coinciden con los determinados a partir de las secuencias de ADN que codifican para este enzima en *Arabidopsis* (AVP) (Sarafian y col. 1992b) y en Beta (BVP1 y BVP2) (Kim y col. 1994) que predijeron pesos moleculares de aproximadamente 80 kDa. Este polipéptido corresponde a la unidad funcional del enzima siendo capaz de hidrolizar PPi (Fraichard y col. 1992) y suficiente para el transporte de protones a través de la membrana (Kim y col. 1992, Rea y col. 1992).

Las técnicas de electroforesis en gel SDS-poliacrilamida indican que este enzima tiene una masa molecular de 73 kDa en Mung bean (Maeshima y Yoshida 1989), de 64.5-67 kDa en remolacha (Britten y col. 1989, Sarafian y Poole 1989), de 75 kDa en pumking (Sato y col. 1991) y de 66.8 en *A. thaliana* (Sarafian y col. 1992a).

Según Kim y col. (1994) el peso molecular mas exacto es el determinado por técnicas de radiación-inactivación y los valores menores obtenidos por electroforesis pueden ser debidos a una movilidad anómala de la proteína al asociarse al SDS de los geles.

Este polipéptido contiene el sitio de unión al sustrato (Maeshima 1989, Fraichard y col. 1992) y satisface la estructura mínima requerida para el transporte de protones dependiente de PPi, sin que sean necesarias unidades adicionales (Rea y col. 1992). Posteriormente, se aportaron evidencias experimentales directas de que esta unidad es no solo necesaria sino también

suficiente para el transporte de protones dependiente de PPi en membranas (Britten y col. 1992, Kim y col. 1994).

Hay controversia en cuanto a la unidad estructural de esta enzima. La H⁺-PPasa puede estar constituida en la membrana por una sola unidad, por varias unidades idénticas o, por esta unidad asociada a otras subunidades de menor tamaño (Chanson y Pilet 1989, Sato y col. 1991, Maeshima y col. 1990).

Estructura

A partir de los clones de cDNA que codifican para la unidad de unión al sustrato de este enzima, se determinó la secuencia aminoacídica de este polipéptido, de la que se propuso su estructura (Kim 1994).

Este polipéptido es altamente hidrofóbico, presentando de 13 a 16 regiones transmembrana y varios dominios hidrofílicos, que probablemente participen en la unión de cationes (Mg²⁺, Ca²⁺ y K⁺) y aniones (PPi⁴⁻, MgPPi²⁻, Mg₂PPi). Leigh y col. (1992) proponen que este enzima debe presentar al menos 5 sitios de unión, al Mg₂PPi como sustrato e inhibidor, al Mg²⁺ y K⁺ (activadores del enzima) y al Ca²⁺ (inhibidor específico). Sin embargo, no se han encontrado evidencias de tales sitios.

Isoformas

Se han encontrado, al menos, tres genes que codifican para esta actividad enzimática; uno en Arabidopsis (AVP) y dos en Beta (BVP1 y BVP2). Todos ellos presentan una gran homología en la secuencia de aminoácidos que codifican pero poca identidad en las secuencias 5' y 3' no codificantes.

Se conocen muchas isoformas de la V-ATPasa de plasmalema. Rea y Poole (1992) proponen la posible existencia de múltiples isoformas para la V-PPasa en base a la similaridad funcional entre ambas enzimas. Kim y col. (1994)

Antecedentes científicos

proponen que los genes BVP1 y BVP2 codifican para variantes, probablemente isoformas, de esta subunidad catalítica del enzima, en *Beta vulgaris*. Se necesitan mas investigaciones para conocer si los posibles múltiples genes de la V-PPasa dan enzimas con expresión única y específica en función de la célula, estadio de desarrollo y/o factores ambientales o, enzimas con características catalíticas y/o reguladoras diferentes en función del tejido, célula o organización subcelular.

Características bioquímicas

Esta enzima requiere estrictamente Mg_{2+} y PPI para su actividad (Rea y Sanders 1987).

Hay controversia acerca del sustrato fisiológico del enzima. Este problema estriba en los múltiples complejos metal-ión que el PPI es capaz de formar en soluciones acuosas. Así, en un medio de reacción conteniendo PPI, Mg^{2+} y K^+ , se pueden complejos $MgPPI$, Mg_2PPI , $KPPI$ así como varias formas protonadas de estos complejos. Los resultados del análisis cuantitativo han interpretado que el sustrato activo es el $MgPPI$, mientras que los resultados del análisis de la cinética del enzima implican al Mg_2PPI como el sustrato dominante. Recientemente, Leigh y col. (1992) apuntaban al Mg_2PPI como sustrato de la reacción catalítica del enzima y demuestran que este sustrato se encuentra en el citoplasma celular en cantidades suficientes para permitir altos porcentajes de actividad H^+ -PPasa.

La actividad de este enzima depende estrictamente cationes monovalentes (K^+ , NH_4^+ , Kb^+)(Chanson y col. 1985, Wang y col. 1985, Pugliarello 1991). Es insensible a aniones (NO_3^- , Br^- , Cl^- o SO_4^-)(Pugliarello, 1991).

No presentan inhibición por vanadato (indicando que no forma intermediario fosforilado), bafilomicina y azida, inhibidores específicos de las P-, V- y F-ATPasas, respectivamente.

La H^+ -PPasa se activa por Mg^{2+} y se inhibe específicamente por Ca^{2+} (Maeshima 1991), Na^+ y Li^+ (Pugin y col. 1988), F^- (Pugliarello 1991),

AMDP y derivados (Zhen y col. 1994), Mg_2PPi y PPi (Leigh y col. 1992).

Presenta actividad máxima a un pH entre 7.5 y 8.5 (Plugiarello 1991).

Esta actividad es relativamente insensible a DCCD (Maeshima y Yoshida 1989) y altamente sensible a DES (Fraichard 1993).

Papel fisiológico

La V-PPasa como bomba electrogénica de protones, interviene en la formación del gradiente electroquímico de protones de la membrana vacuolar, junto con la enzima V-ATPasa, utilizado como fuente de energía para un amplio rango de procesos, fundamentales en la fisiología de las plantas, como ha sido mencionado anteriormente.

Rea y Poole (1993) proponen que este enzima tiene un papel clave para el funcionamiento celular cuando las plantas se someten a condiciones ambientales adversas. En estas condiciones, p.e. en el caso de estrés por baja temperatura, se ha demostrado que los niveles citoplasmáticos de ATP, así como la relación ATP/ADP, disminuyen drásticamente, reduciéndose la actividad H^+ -ATPasa (Kasamo 1988) e incluso inactivándose en caso de estrés severo (Moriyama 1989). Los niveles citoplasmáticos de PPi tienen la característica de permanecer constantes incluso cuando las plantas se someten a estrés y, los niveles de Mg_2 parecen aumentar en estas condiciones, ambos constituyen el sustrato fisiológico de la enzima H^+ -PPasa. Por todo ello, la enzima H^+ -PPasa tiene una doble ventaja en estas condiciones. Por una parte, permite economizar en el consumo de ATP en estas situaciones donde su contenido celular disminuye y, por otra parte, mantiene el gradiente electroquímico de protones de la membrana vacuolar necesario para el óptimo funcionamiento celular (White y col. 1990). Específicamente, en el caso del estrés salino, el mantenimiento de este gradiente es clave, ya que es usado como fuente energética para el transporte activo de Na^+ , mediante la enzima antiporte Na^+/H^+ , hacia el interior de la

Antecedentes científicos

vacuola reduciendo sus niveles en el citoplasma celular a concentraciones que permitan el óptimo funcionamiento celular evitando así el efecto tóxico directo del ión (Blumwald y Poole 1985).

Los niveles citoplasmáticos de Pi modulan una gran cantidad de reacciones metabólicas celulares. No se ha demostrado la existencia de PPasas solubles en el citoplasma de células vegetales y, por tanto, el control del Pi en el citosol está probablemente regulado por la H⁺-PPasa de la membrana vacuolar. El Pi interviene en los procesos biosintéticos y degradativos de polisacáridos, polipéptidos y polinucleótidos y, por lo tanto, de carbohidratos, proteínas y DNA (Wang y col. 1986), determinando la alta importancia de esta actividad enzimática en el desarrollo óptimo de los procesos metabólicos celulares en plantas.

D.1.2. Transporte facilitado pasivo

Este transporte, también conocido como difusión facilitada, transloca solutos a través de las membranas celulares sin necesidad de energía metabólica y resulta de diferencias en la concentración y/o gradiente de potencial eléctrico en ambos lados de la membrana. Este transporte puede ser por un mecanismo "uniport" si es una sola molécula en una dirección, "antiport" si son dos diferentes sustancias en direcciones opuestas y simultáneamente y "simport" si son dos moléculas en la misma dirección simultáneamente.

D.1.2.1. Antiporte Na⁺/H⁺

Los primeros datos acerca del antiporte Na⁺/H⁺ se obtuvieron a principios de los años 80 cuando se observó un intercambio Na⁺/H⁺ electroneutro en membranas de células animales que se caracterizaba por su sensibilidad a la droga diurética Amilorido (Felin y col. 1984, Kinsella y Aronson 1981, Sabolic y Burckhard 1984). En 1985 y 1987, Blumwald y Poole lo descubrieron en

vesículas de tonoplasto de células de *Beta vulgaris*, sugiriéndose, por primera vez, la existencia de un sistema inducible de transporte de Na^+ en tonoplasto de células vegetales dependiente de un gradiente protónico generado por la actividad de bombas de H^+ dependientes de ATP y PPi que acidifican la vacuola (Johannes y Felle 1989, Staal y col. 1991). Posteriormente, esta actividad antiportadora Na^+/H^+ fue observada en vesículas de tonoplasto y vacuolas de otros orígenes vegetales (Gabarino y Dupont 1988 y 1989, Match y col. 1989, Hassidim y col. 1990, Katz y col. 1991, Staal y col. 1991, Popova y Balnokin 1992, Guern y col. 1986, Blumwald y col. 1987, Niemiets y Willerbrink 1985).

En 1991, Maathius y Prins mostraron evidencias de una clara relación entre esta actividad y la resistencia de las plantas a la salinidad mediante la comparación de dos especies de *Plantago* con sensibilidad diferencial a dicho estrés.

Características cinéticas

Este intercambio Na^+/H^+ en vesículas de tonoplasto sigue una cinética de Michaelis-Menten para la concentración de Na^+ , con valores de Km de aproximadamente 7.5 mM (Blumwad y Poole, 1985) y una alta selectividad para el sodio (Staal y col 1991) con una estequiometría de un sodio transportado por cada proton cotransportado (Martinoia y col. 1986).

Esta actividad es competitiva y específicamente inhibida por la droga diurética Amilorido, siendo la constante de inhibición de 100 μM tanto en vesículas de tonoplasto de células vegetales como en vesículas de membrana de células animales (Blumwald y Poole 1985 y 1987, Kinsella y Aronson 1981).

Antecedentes científicos

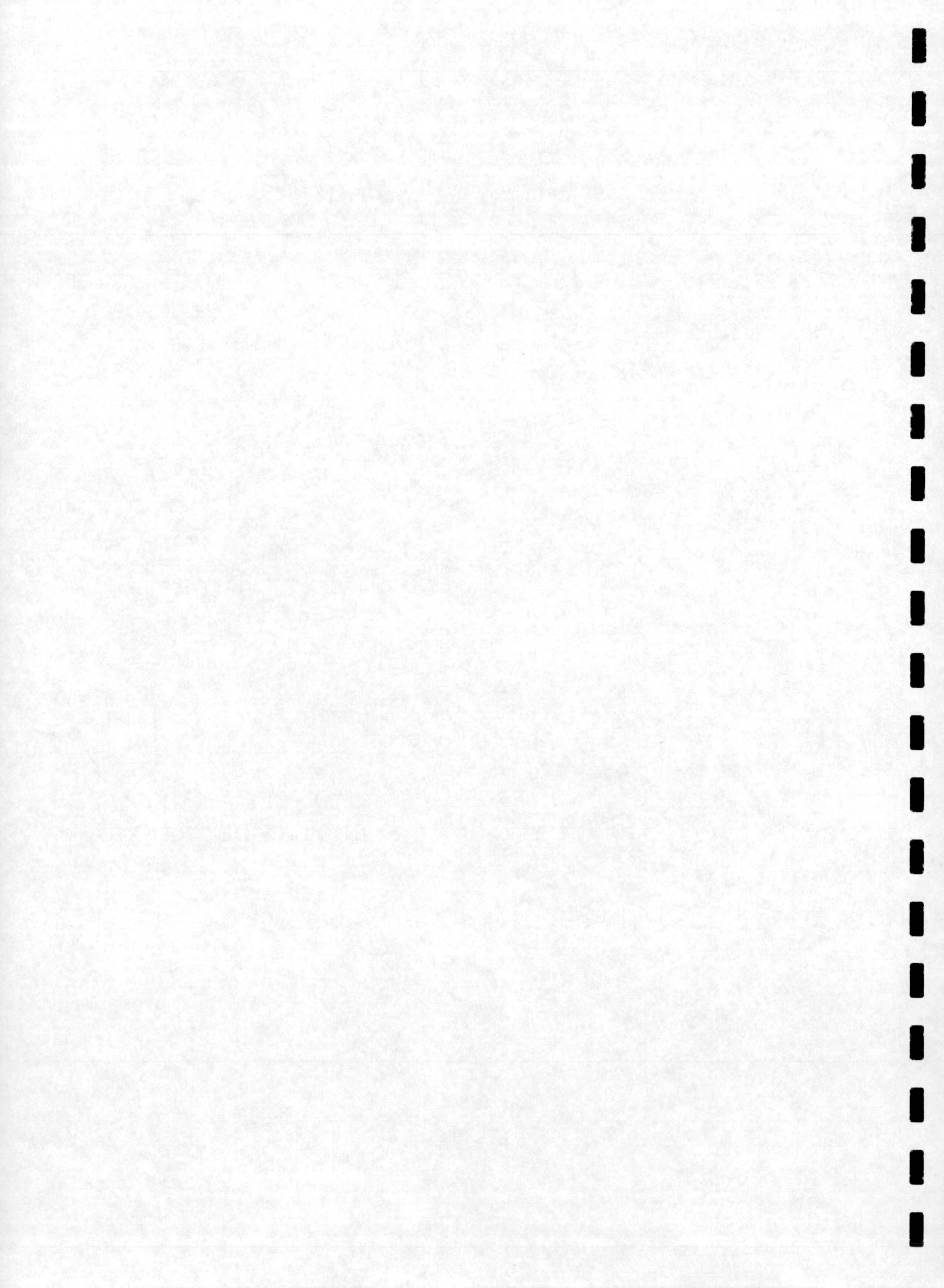
Estructura

Barkla y Blumwald (1991) mediante el uso de anticuerpos específicos, sugieren que la unidad transportadora es una molécula de 70 kDa de peso molecular. No se conocen unidades adicionales. Hasta el momento no se ha aislado esta proteína y no hay datos de su estructura.

Función fisiológica

El estrés salino induce graves problemas en el crecimiento de las plantas. Estas presentan grandes diferencias en sus estrategias para resistir a dicho estrés (Greenway y Munns 1980); sin embargo, tanto las halófitas como glicófitas tolerantes presentan un mecanismo común no sólo para solventar este problema sino también para utilizarlo en su propio beneficio: el secuestro de Na^+ y Cl^- en la vacuola para, por una parte, incrementar la osmolaridad de la célula y evitar el estrés osmótico y, por otra parte, impedir la acumulación de niveles tóxicos de Na^+ en el citoplasma celular (Staal y col. 1991). La acumulación de Na^+ en el tonoplasto se lleva a cabo por la proteína antiportadora Na^+/H^+ dependiente del gradiente de pH establecido entre el citoplasma y la vacuola y, generado por la actividad de bombas de H^+ dependientes de ATP y PPI. La actividad de estas bombas primarias de H^+ y del sistema antiporte Na^+/H^+ de tonoplasto, así como el cierre de los canales para el Na^+ observado en plantas estresadas, resulta en un eficiente secuestro de Na^+ en la vacuola (Maathuis y Prins 1990). Si bien el papel fundamental del antiporte Na^+/H^+ de tonoplasto es el transporte de Na^+ a la vacuola en condiciones de estrés por Na^+ , no se descarta su intervención en la homeostasis de pH citosólico, clave para la óptima funcionalidad celular.

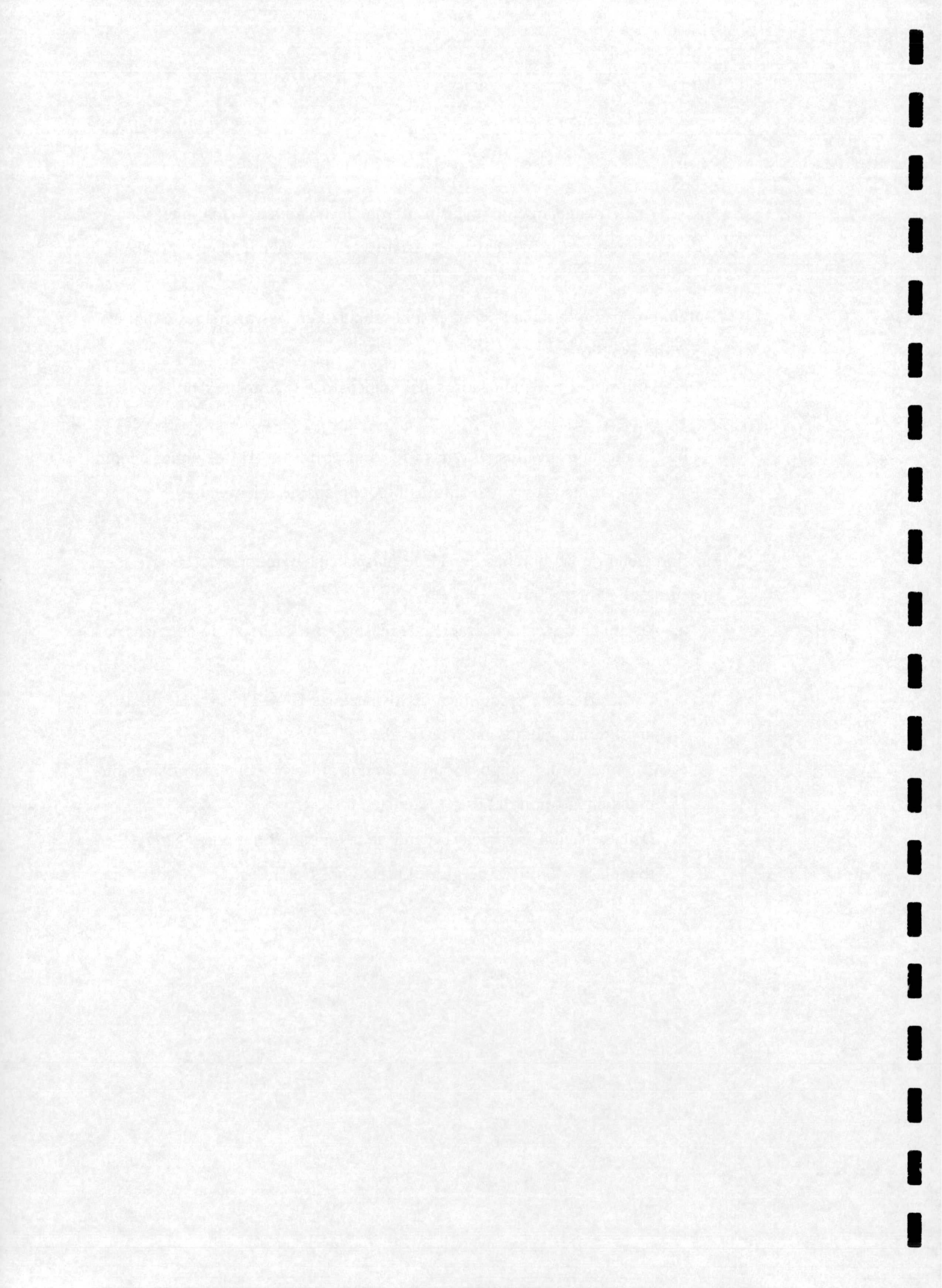
III. PLAN DE TRABAJO



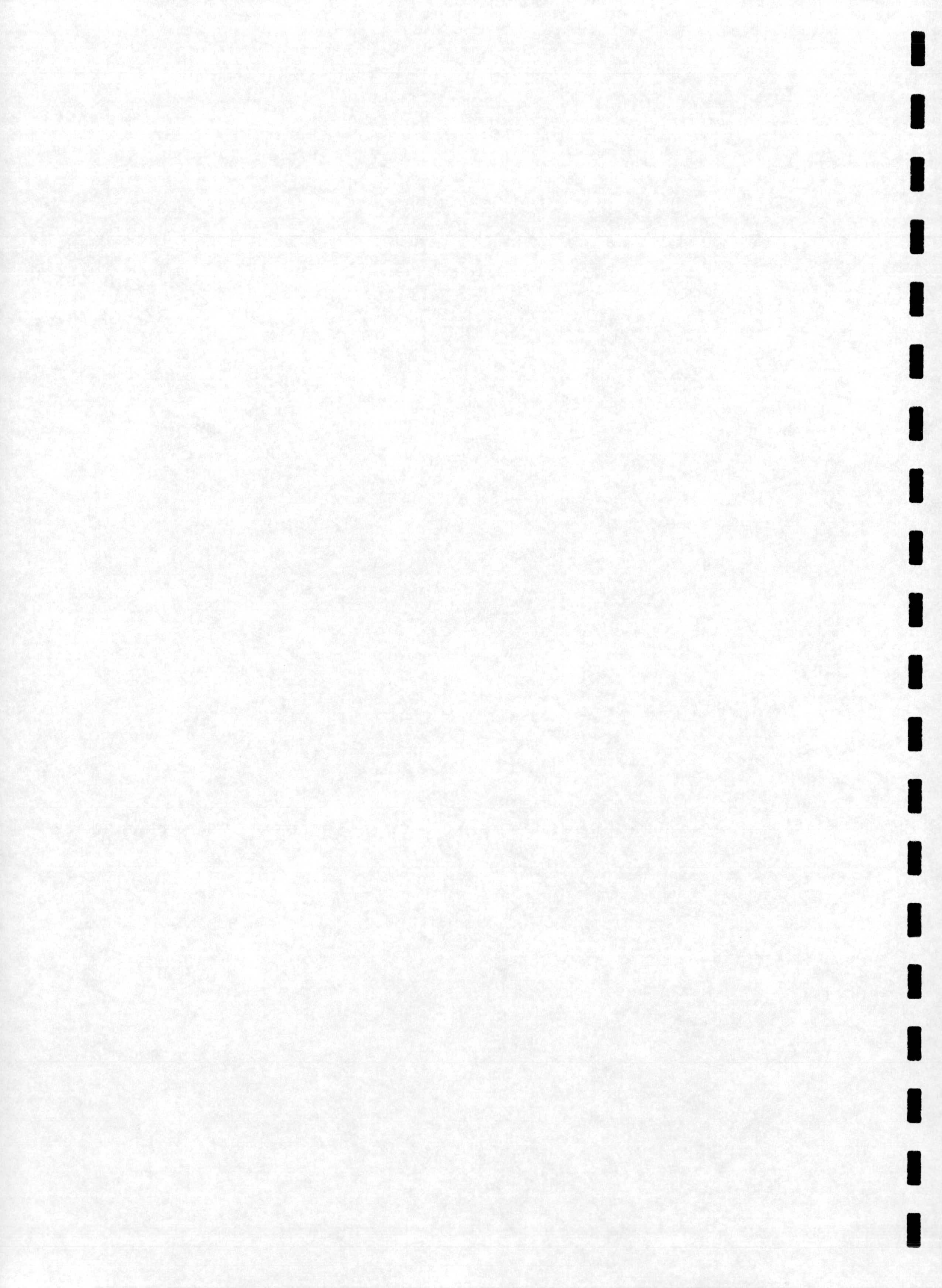
El planteamiento y justificación de objetivos y los antecedentes científicos expuestos nos han llevado a establecer el siguiente Plan de Trabajo:

1. Estudio comparativo de la tolerancia a la salinidad en las variedades de girasol objeto de estudio.
 - a.- Utilización de indicadores fisiológicos de tolerancia a nivel de raíz y parte aérea.
 - b.- Evaluación de los sistemas de transporte de H^+ de raíces como potenciales marcadores bioquímicos de tolerancia.

2. Funcionalidad de las bombas de H^+ de plasmalema y tonoplasto de raíces en respuesta al estrés salino.
 - a.- Aislamiento y caracterización de plasmalema y tonoplasto de raíces por gradiente de sacarosa.
 - b.- Caracterización bioquímica de los enzimas H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa a nivel de las membranas purificadas.
 - c.- Cambios en la composición de ácidos grasos y contenido de fosfolípidos en función del estrés salino.
 - d.- Determinación y caracterización de la actividad antiporte Na^+/H^+ en tonoplasto de raíces de girasol: efecto del NaCl.



IV. MATERIAL Y METODOS



A. MATERIAL VEGETAL

Se han utilizado semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) de las variedades Alhama y Montenuovo, suministradas gratuitamente por Semillas Pacífico S.A., Sevilla. Según criterios agronómicos, la variedad Alhama se caracterizó por su mayor tolerancia a suelos salinos que la variedad Montenuovo, al haberse obtenido, a partir de ella, incrementos del 30-40% en la producción de cosecha (comunicación personal, Semillas Pacífico S.A.).

A.1. Sistema y condiciones de cultivo

Las semillas, desinfectadas superficialmente con lejía comercial (20 g/l de cloro activo) durante 20 minutos y lavadas durante otros 30 minutos con agua de grifo, se germinaron en rollos de papel de filtro (50 semillas por rollo) verticalmente dispuestos en bateas de plástico, con una solución aireada de 0.2 mM CaCl₂ a 25°C durante 4 días en oscuridad.

Las plántulas de tamaño uniforme con una longitud de radícula de 4 cm aproximadamente, seleccionadas entre las más homogéneas de cada rollo, se insertaron en una capa de gasa soportada por una malla metálica de acero inoxidable dispuesta sobre una maceta de plástico, conteniendo 800 ml de una solución hidropónica aireada de pH 5.5, diluida 10 veces sobre la formulación original propuesta por Skok (1957) para los macronutrientes, y Hoagland y Arnon (1950), para los micronutrientes (Tabla 1). Las plántulas crecieron en cámara de cultivo con una iluminación de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (16 horas, luz y 8 horas, oscuridad) a 25°C y 60-65% de humedad relativa.

Tras 4 días en estas condiciones, se aplicaron distintas concentraciones de NaCl (0, 75 y 150 mM) sobre la solución nutritiva original diluida 4 veces, durante los días marcados en tabla y figuras, hasta un máximo de 2 semanas, y en las mismas condiciones anteriormente citadas de luz, humedad y temperatura.

Material y métodos

Las soluciones nutritivas con los tratamientos indicados se renovaron cada 3 días de cultivo.

Tabla 1. *Soluciones nutritivas de Skok (1957) para macronutrientes y, de Hoagland y Arnon (1950) para micronutrientes.*

Macronutrientes	[mM]
KH_2PO_4	2.5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	4.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5
Micronutrientes	$[\mu\text{M}]$
H_3BO_3	46.2
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	9.15
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.76
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.32
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FeN}_2\text{NaO}_8 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	4.48

B. DETERMINACION DE PARAMETROS FISIOLÓGICOS

B.1. Crecimiento

Se determinó el peso fresco y seco de las raíces y parte aérea de las plántulas. Para ello, se cortaron las raíces y partes aéreas, lavándose rápidamente con tres pases de agua desionizada y secándose por centrifugación manual con secadora de verduras entre papeles de filtro (40 revoluciones). Para obtener el peso fresco, los tejidos se pesaron inmediatamente en balanza de precisión, determinándose posteriormente el peso seco, tras su secado en estufa a 70°C durante 48 horas.

B.2. Contenido hídrico

Como parámetros hídricos se utilizaron: La razón peso fresco/peso seco de la parte aérea y raíz de las plántulas y el contenido hídrico relativo de los cotiledones (CHR).

El CHR constituye una medida aproximada del potencial hídrico del tejido (Baker, 1984), y representa el contenido hídrico del tejido en relación al que presenta el mismo en estado de máxima turgencia. Este parámetro se determinó por el método de Sobrado y Turner (1983), con algunas modificaciones. Para ello, se obtuvieron muestras de 20 discos de cotiledones de 6 mm de diametro con un sacabocados y se midieron sus pesos frescos (PF). El peso fresco de los cotiledones en estado de máxima turgencia (PT), se determinó incubando los discos durante 2 horas en placas Petri con agua destilada, y el peso seco (PS), tras su secado en estufa a 70°C durante 24 horas. El contenido hídrico relativo, expresado como porcentaje, se calculó según la fórmula:

$$\%CHR = \frac{PF-PS}{PT-PS} \times 100$$

B.3. Test de integridad de las membranas

La susceptibilidad de las membranas celulares del tejido al estrés salino se midió como la velocidad de pérdida de sustancias que absorben el ultravioleta (*UV-absorbing substances* -UVAS-) (Senaratna 1983), constituidas por sustancias orgánicas normalmente no permeantes a través de las membranas celulares, tales como nucleótidos, aminoácidos, azúcares, proteínas etc. (Redmann y col. 1986, Sulc y col. 1991).

Material y métodos

B.3.1. Preparación de las muestras

Para estudiar el efecto del estrés salino *in vivo* sobre la integridad de las membranas del tejido se siguió el protocolo descrito por Lafuente y col. (1991), con algunas modificaciones. Muestras de una raíz entera o de 10 discos de cotiledones expandidos de 6 mm de diametro obtenidas a partir de plántulas controles y tratadas con NaCl, se lavaron en tubos de plástico con 15 ml de agua destilada durante 15 min, para eliminar los componentes liberados por las células rotas. Posteriormente, las muestras se incubaron en 15 ml de agua destilada, a 26°C con agitación e iluminación constante de $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Para estudiar el efecto del estrés salino *in vitro* sobre la integridad de las membranas del tejido, se tomaron muestras de una raíz entera ó 20 discos de 6 mm de diametro de cotiledones expandidos de plántulas no tratadas, y se preincubaron en 15 ml de una solución conteniendo diferentes concentraciones de NaCl, durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron rapidamente con 3 pases de 15 ml de agua destilada y se incubaron en 15 ml de agua destilada, en las condiciones de luz y temperatura indicadas anteriormente.

B.3.2. Velocidad de pérdida de UVAS

La velocidad de pérdida de UVAS se determinó por el método de Redmann y col. (1986), midiendo la absorbancia a 280 nm (A_{280}) (espectofotómetro Shimadzu, mod. 160) en función del tiempo, a una alícuota de 1 ml extraída de la solución que contenía el tejido, y retornada tras su medida, a la solución original. Esta medida se relativizó frente al contenido total de UVAS de cada muestra, el cual se obtuvo rompiendo completamente la integridad de las membranas en un horno microondas durante 5 minutos, o mediante congelación del tejido a -70°C y posterior descongelación. Unicamente los datos relativos obtenidos por ambos procedimientos fueron similares, presentándose en este

trabajo, valores referidos al contenido total obtenido por calentamiento del tejido. Una vez enfriadas con agua del grifo, las muestras se incubaron, durante 15 minutos en agitación, determinándose la absorbancia a 280 nm (A'_{280}) a una alícuota de 1 ml.

La razón de pérdida relativa de UVAS (RLR) viene determinada por la fórmula:

$$RLR = \frac{A_{280}}{A'_{280}} \times 100$$

La velocidad de pérdida se expresó como la razón de pérdida relativa de UVAS por hora.

B.4. Determinación de osmóticos orgánicos

B.4.1. Azúcares totales

La extracción del material hidrosoluble de los tejidos se llevó a cabo por el método de Weimberg y col. (1981), según el cual, la incubación de tejido en una solución acuosa de tolueno, a muy baja proporción, provoca la formación de grandes poros en las membranas celulares del tejido, a través de los cuales se liberan al medio exterior los componentes hidrosolubles del citoplasma.

Para ello, se incubaron 2 gramos de tejido (raíz o parte aérea) en un Erlenmeyer conteniendo 50 ml de una solución acuosa de tolueno al 0.5% (v/v), durante 3 horas en agitación, a 25°C. Después de filtrar través de una fina malla metálica, con el fin de eliminar los restos de material vegetal, y a través de Whatman GF/A, para eliminar el material no hidrosoluble, el proceso se repitió otras dos veces con tiempos de incubación de 2 y 1 hora, respectivamente. Los extractos resultantes se llevaron a volúmenes de 10 ml, al tiempo que se eliminaba el tolueno, por evaporación en rotavapor a 40°C, conservándose a -20°C hasta su análisis.

Material y métodos

El contenido de azúcares totales del material hidrosoluble se determinó por el método de la antrona (Fales 1951). Una alícuota de cada extracto se adicionó a 5 ml de reactivo de antrona (2 g/l de antrona disuelta en una mezcla 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, 160 y 320 $\mu\text{g/ml}$ de glucosa. Los resultados se expresaron como miligramos de azúcares totales por gramo de peso fresco de la muestra.

B.4.2. Prolina

El contenido de prolina en las muestras problema se determinó por el método de Bates y col. (1973). Para ello, un gramo de tejido fresco (raíz o parte aérea) se homogenizó en mortero con 20 ml de ácido sulfosalicílico al 3% (p/v), utilizando arena de cuarzo como abrasivo. El homogenado se filtró a través de Whatman GF/A, y el filtrado resultante se almacenó a -20°C hasta su uso. La determinación de prolina se efectuó añadiendo a 1 ml de filtrado, 1 ml de reactivo de ninhidrina (25 g/l de ninhidrina en una solución de ácido acético glacial-ácido fosfórico 6M, 60/40, v/v) y 1 ml de ácido acético glacial, manteniéndose durante una hora en baño maría a 100°C. La reacción se paralizó por enfriamiento en hielo, y se añadió 2 ml de tolueno, agitándose vigorosamente durante 20 segundos. Establecidas las fases, se midió la absorbancia a 520 nm (espectrofotómetro Shimadzu, mod. 160) del extracto de tolueno, que contiene el complejo ninhidrina-prolina, frente a una curva patrón de 0, 10, 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de prolina. Los resultados se expresaron como μg de prolina por gramo de peso fresco.

B.5. Actividad fotosintética *in vivo*. Fluorescencia modulada

Sólo una parte de la energía luminosa absorbida por los pigmentos fotosintéticos de la hoja (clorofila y carotenoides) se utiliza en las reacciones de fotosíntesis, siendo el resto disipada en forma de calor o emitida como fluorescencia. Como es sabido, la emisión de fluorescencia es debida principalmente a la clorofila *a* del fotosistema II. Dicha emisión constituye un reflejo de la actividad del proceso global de fotosíntesis, en virtud de la conexión funcional del fotosistema II con otros componentes del aparato fotosintético (transporte electrónico, gradiente protónico y fotofosforilación y asimilación de CO₂) (Krause y Weiss 1988).

Puesto que cualquier situación de estrés ambiental afecta al aparato fotosintético y, especialmente, al fotosistema II, las técnicas de detección de las cinéticas de emisión de la fluorescencia de la clorofila *in vivo* se han utilizado, no sólo en el análisis del efecto de diferentes estreses ambientales sobre el aparato fotosintético (Schreiber y Bilger 1987, Lichtenthaler 1988), sino que también, algunos parámetros obtenidos de dichas cinéticas, se han revelado como buenos indicadores fisiológicos, para la evaluación de tolerancia de especies y variedades vegetales a estreses tales como alta y baja temperatura, fotoinhibición, sequía o salinidad (Schreiber y Bilger 1987, Ogreen 1990, Neuner y Larcher 1990, Krishnaraj y col. 1993).

B.5.1. Curva de inducción de la fluorescencia de la clorofila

La medida de la fluorescencia de la clorofila *in vivo* con los fluorímetros convencionales suele presentar una serie de limitaciones técnicas, tales como una importante reducción espectral de la luz actínica, dificultad de medir la fluorescencia inicial, F_0 , imposibilidad de analizar los diferentes tipos de extinción, y una difícil discriminación entre la fluorescencia y otro tipo de luz que

Material y métodos

llega al detector.

Para superar todos estos escollos, se ha desarrollado un fluorímetro de modulación de amplitud de pulso (PAM-*pulse amplitude modulation*-), que utiliza una luz modulada no fotosintética para medir la fluorescencia inicial (F_0), en conjunción con un sistema de fluorescencia que sólo recoge la emitida a la frecuencia y fase de luz modulada, permitiendo la medida de la misma en presencia de luz continua fotosintéticamente activa de cualquier longitud de onda (Schreiber y Bilger 1987).

La figura 1 muestra una cinética típica de inducción de la fluorescencia de una hoja intacta, determinada con un fluorímetro PAM, aplicando pulsos de luz actínica en presencia de luz continua de baja intensidad, y cuyos parámetros, de acuerdo con Schreiber y Bilger (1987), se describen a continuación .

Cuando una hoja se ilumina con una luz modulada débil, fotosintéticamente inactiva, después de un periodo de oscuridad de 15-30 minutos (centros de reacción del fotosistema II "abiertos", $-Q_A$ oxidados-), la fluorescencia emitida alcanzará un nivel inicial F_0 , que refleja la distribución de la energía inicial de los pigmentos antena al centro de reacción del fotosistema II. Si ahora se aplica un pulso saturante de luz modulada, se producirá un incremento rápido de la fluorescencia hasta un máximo (F_m). En la escala de milisegundos, esta subida rápida de la fluorescencia refleja situaciones de equilibrio entre las proporciones de reducción y oxidación de Q_A , llegando a un máximo, cuando todas las moléculas de Q_A son reducidas (centros de reacción "cerrados").

Si tras unos segundos de oscuridad, se ilumina ahora con luz actínica continua, fotosintéticamente activa, al tiempo que se aplica un pulso saturante, se generará la curva típica de inducción de la fluorescencia variable (F_v) (efecto Kautsky), la cual se compone de un incremento máximo de la fluorescencia [$(F_v)_m$], y una subsecuente disminución de la misma, debido al desarrollo de procesos de extinción de fluorescencia solapados, como son la extinción fotoquímica y no fotoquímica, relacionadas con la puesta en marcha de las

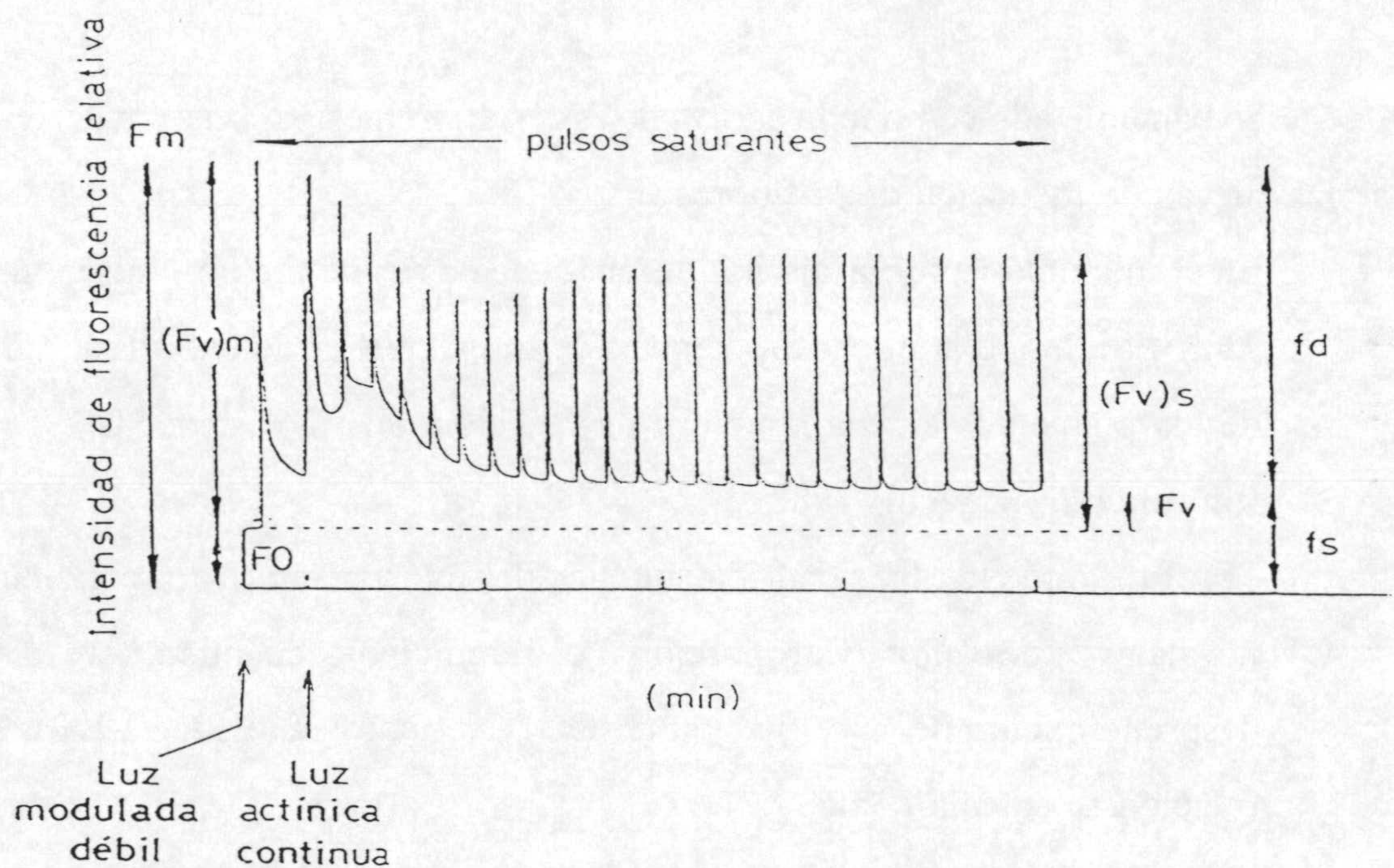


Figura 1. Cinética de inducción de la fluorescencia de hojas intactas determinada con un fluorímetro modulado PAM. F_0 , intensidad de fluorescencia de la muestra preadaptada a la oscuridad con un rayo débil de luz actínica; F_m , fluorescencia máxima obtenida con muestras preadaptadas a la oscuridad tras la aplicación de un pulso de luz saturante; $(F_v)_m$, fluorescencia variable máxima de las muestras preadaptadas a la oscuridad; F_v , fluorescencia variable durante la inducción a un tiempo dado; $(F_v)_s$, fluorescencia variable máxima durante la inducción a un tiempo dado observada tras la aplicación de un pulso de saturación; $f_d = (F_v)_m - F_v$; $f_s = F_0 + F_v$.

Material y métodos

reacciones fotosintéticas. La discriminación entre estos procesos de extinción es posible en un fluorímetro PAM merced a la aplicación de pulsos sucesivos de luz modulada saturante obteniéndose, subsiguientemente una serie de pulsos de fluorescencia variable saturante (F_v)s, hasta llegado un tiempo en que dicha fluorescencia no cambia (estado estacionario).

B.5.3. Parámetros indicadores de estrés

Se han utilizado como indicadores de estrés diferentes parámetros derivados de las curvas de inducción de la fluorescencia.

En el inicio de la curva, definido por la escala de tiempo de milisegundos:

- F_m/F_o : define la eficacia potencial de transferencia de energía luminosa de los pigmentos antena al centro de reacción del fotosistema II

(Shappendonk y col. 1988).

- F_v/F_m : mide la capacidad fotosintética del fotosistema II. En condiciones normales, este valor es proporcional al rendimiento cuántico del desprendimiento de O_2 y fijación de CO_2 (Neuner y Larcher 1990). Esta relación se calcula como

$$F_v/F_m = \frac{(F_v)_m}{(F_v)_m + F_o}$$

En la escala de tiempo en minutos, extendida desde la emisión máxima de fluorescencia y su disminución hasta el estado estacionario:

- Extinción fotoquímica (Q_q): se correlaciona con la cantidad de aceptor primario oxidado (Q_A) del fotosistema II (Schreiber y Bilger 1987), y se calcula por la fórmula:

$$Q_q = \frac{(F_v)_s - F_v}{(F_v)_s}$$

- Extinción no fotoquímica (Q_n): se relaciona con la formación del

gradiente de protones entre el estroma y el interior del tilacoide, así como el ciclo reductivo del carbono (Schreiber y Bilger 1987). Se calcula por la fórmula:

$$Q_n = \frac{(F_v)_m - (F_v)_s}{(F_v)_m}$$

En el estado estacionario:

- Rfd: índice de actividad fotosintética potencial, también llamado índice de vitalidad. (Haitz y Lichtenthaler 1988). Es calculado por la fórmula:

$$Rfd = \frac{F_d}{F_s} = \frac{(F_v)_m - F_v}{F_v + F_o}$$

B.5.4 Condiciones de medida

Se utilizó un fluorímetro de modulación de amplitud de pulso, PAM 101 y 103, (Waltz, Effeltrich, Alemania), provisto con lámparas Schott y fibra óptica. (Para descripción en detalle, ver Arellano, 1994).

La fluorescencia de la clorofila se midió a 22°C sobre una superficie circular de 1 cm de diámetro de cotiledones expandidos y recién cortados de plántulas de girasol, previamente adaptadas a la oscuridad durante 15-20 minutos. Todas las medidas se hicieron en las 3-4 horas de iluminación posteriores al periodo de 8 horas de oscuridad.

La señal de fluorescencia F_o se determinó usando un rayo de luz modulada de frecuencia 1.6 KHz e intensidad 10 mW/m². En la determinación de la fluorescencia máxima F_m , la frecuencia de la luz modulada cambió automáticamente a 100 KHz al aplicar un pulso de luz actínica saturante de 2,000 W/m². Después de la relajación de la señal, se aplicó una luz actínica continua de 30 W/m², y pulsos de luz saturante de 800 milisegundos cada 10 segundos, hasta alcanzar el estado estacionario (entre 10-15 minutos). Las curvas se

Material y métodos

registraron con un registrador potenciométrico y los índices se calcularon según los parámetros definidos en la Figura 1.

B.6. Determinación del contenido mineral

La determinación de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} se ha realizado a partir del mineralizado obtenido por destrucción del material orgánico con SO_4H_2 y H_2O_2 . Las muestras de tejido (parte aérea y raíz) se lavaron por 4 pases sucesivos de agua destilada. La mineralización se llevó a cabo calentando el material vegetal, previamente pulverizado y desecado a 70°C , con SO_4H_2 concentrado a 120°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°C , durante 15 minutos, para eliminar los restos de H_2O_2 y se llevó a un volumen final conocido.

El contenido en 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 SO_4H_2 en cantidades equivalentes al mineralizado.

El contenido en 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 SO_4H_2 en cantidades equivalentes al mineralizado.

C. DETERMINACION DE PARAMETROS BIOQUIMICOS

C.1. Aislamiento de vesículas de membrana enriquecidas en plasmalema y tonoplasto de raices

Se optimizó un protocolo de aislamiento de membrana con el fin de obtener una preparación de membranas de partida que contuviera la mayor parte de plasmalema y tonoplasto de la raíz de girasol. Para ello, se partió de una primera centrifugación muy suave, cuyo sobrenadante se utilizó, como fuente de membrana microsomal para ser cargado en un gradiente continuo de sacarosa, o directamente como tal, cargándolo en un gradiente discontinuo de sacarosa.

C.1.1. Obtención de microsomas

La Figura 2 muestra el proceso seguido en el aislamiento de fracciones de membrana, el cual se llevó a cabo a 4°C. Usualmente, se cortaron 12 g de raices de los diferentes tratamientos y se lavaron con agua desionizada, secándose por centrifugación manual con secadora de verduras entre papeles de filtro (40 revoluciones). Las raices se homogenizaron en mortero con 24 ml de medio de homogenización, conteniendo 25 mM Tris-MES, pH 8.0, 0.1% (p/v) BSA, 250 mM sacarosa, 2 mM MgSO₄, 2 mM EGTA-Tris, pH 8.0, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 5 mM metabisulfito potásico y 10% PVPP (p/p tejido). El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa y el extracto obtenido se centrifugó a 5,000g durante 5 minutos (centrífuga refrigerada Sorvall, rotor SS-34). El sobrenadante se centrifugó a 100,000g durante 45 minutos (centrífuga Beckman, rotor 60Ti) y, tanto el sedimento de 100,000g (fracción microsomal) como el de 5,000g se resuspendieron en un medio conteniendo 2 mM BTP-MES, pH 7.0, 250 mM sacarosa, 2 mM DTT y 1 mM PMSF, y utilizándose inmediatamente o almacenándose en alícuotas a -70°C, tras su congelación en N₂ líquido, para su

Material y métodos

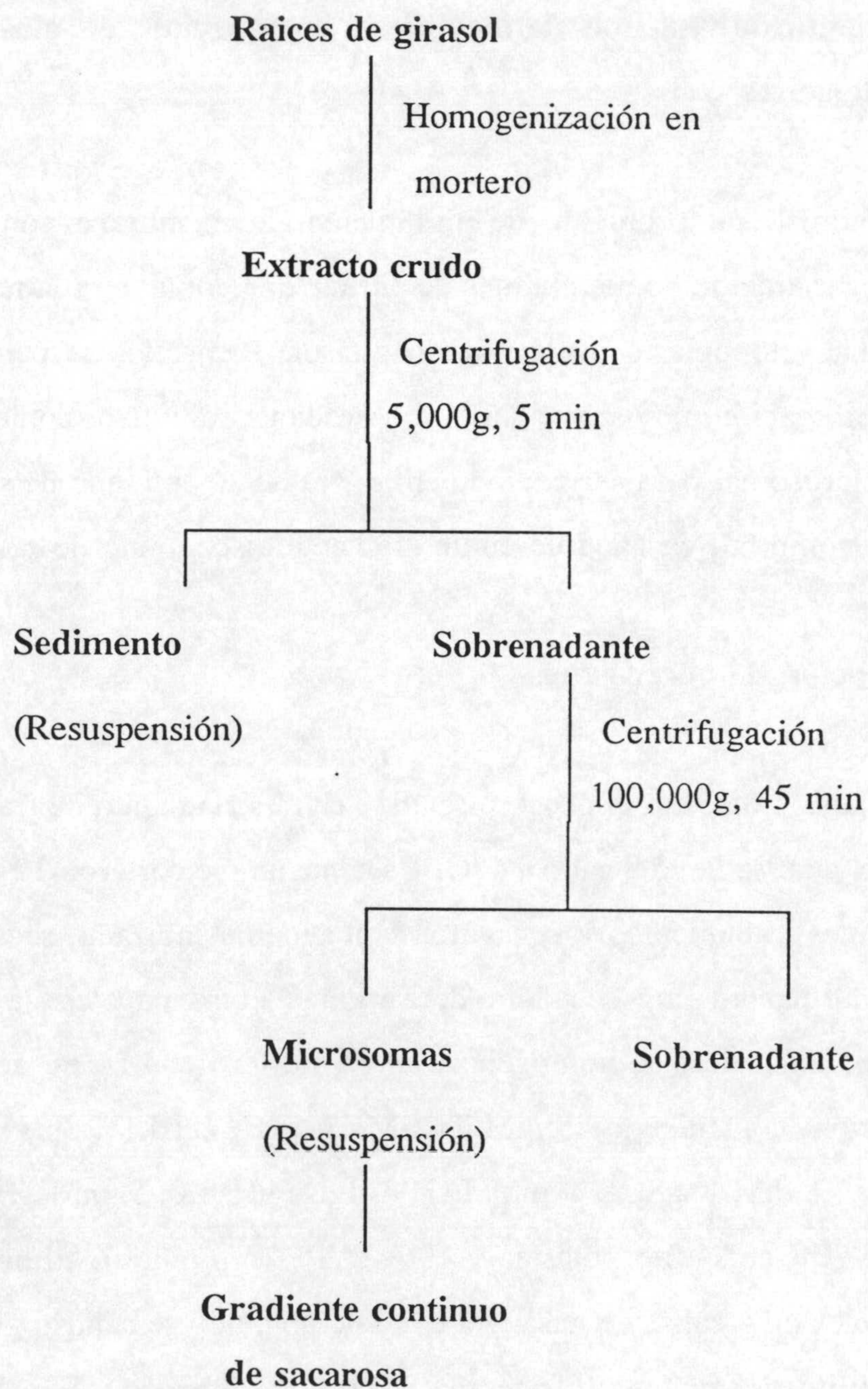


Figura 2. *Aislamiento de microsomas de raíces de girasol.*

uso posterior.

C.1.2. Gradiente continuo de sacarosa.

Entre 12-16 mg de proteína de la fracción microsomal en un volumen de 2 ml, se depositaron sobre 32 ml de un gradiente continuo de sacarosa del 15 al 45% (p/p), con un colchón de 5 ml de sacarosa al 55%, preparados en un medio conteniendo 2 mM BTP-MES, pH 7.0, 2 mM DTT, 1 mM MgSO₄ y 1 mM PMSF. El gradiente se centrifugó a 97,000g 2 horas, en rotor basculante SW28 (centrífuga Beckman) y, se fraccionó en alícuotas de 1.5 ml.

C.1.3. Gradiente discontinuo de sacarosa.

Se ha puesto a punto un protocolo basado en la metodología seguida por Chanson y col. (1984): una primera centrifugación a baja velocidad del homogenado problema, para obtener una preparación quasi-completa de fracciones subcelulares y la utilización del sobrenadante de esta primera centrifugación, como material de partida en la separación de las distintas membranas en el gradiente para minimizar la degradación de las membranas y la agregación de orgánulos (Chanson y col. 1984). El resto de las condiciones, incluyendo medio de homogenización y resuspensión, velocidades de centrifugación y composición del gradiente, fueron modificaciones originales introducidas por nosotros a dicho protocolo. En la Figura 3 se incluye un esquema de dicho protocolo. Todo el proceso se llevó a cabo a 4°C.

Usualmente, 10 g de raíces de cada tratamiento cortadas y lavadas, como se indicó en el apartado C.1.1., se homogenizaron en mortero con 20 ml de medio conteniendo 25 mM BTP-MES, pH 7.5, 0.5% (p/v) BSA, 250 mM sacarosa, 2 mM MgSO₄, 2 mM EGTA-Tris, pH 7.5, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 5 mM metabisulfito potásico, 500 µM BHT y 10% PVPP (p/p, tejido). El

Material y métodos

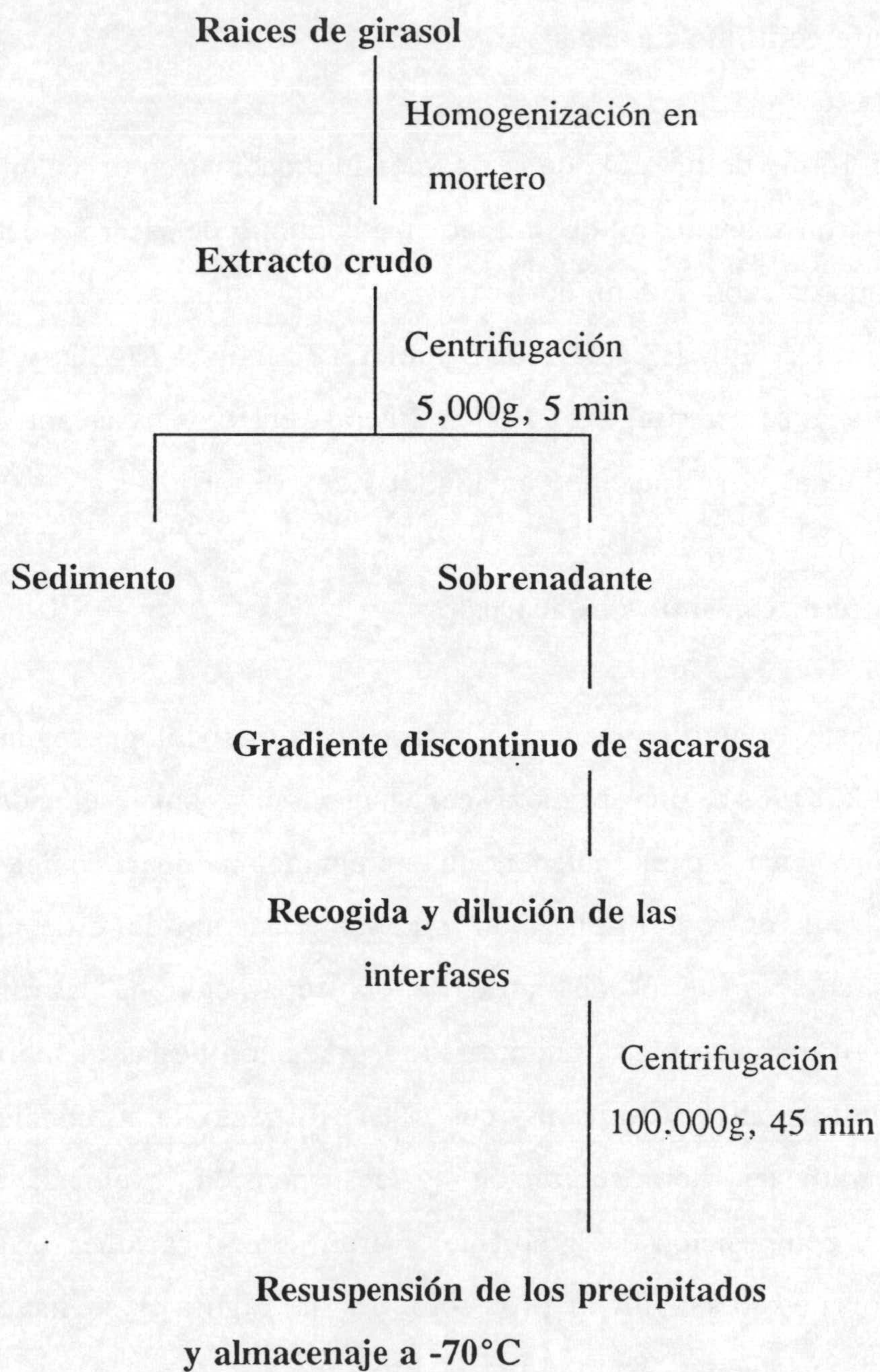


Figura 3. Aislamiento de fracciones de membranas enriquecidas en plasmalema y tonoplasto por gradiente discontinuo de sacarosa.

homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa y se centrifugó a 5,000g durante 5 minutos, (centrífuga refrigerada Sorvall, rotor SS-34). El sobrenadante obtenido se depositó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa de tres capas formadas por 6 ml del 15%, 7 ml del 32% y 4 ml del 43% (p/p) de sacarosa, preparadas en un medio conteniendo 25 mM BTP-MES, pH 7.5, 1 mM DTT y 100 μ M PMSF, y se centrifugó a 97,000g durante 2 horas en rotor basculante SW28 (centrífuga refrigerada Beckman).

Las fracciones de membrana de las interfases 15/32 y 32/43 del gradiente se recogieron con pipeta pasteur y se diluyeron 10 veces en un medio conteniendo 2 mM BTP-MES, pH 7.5, 250 mM sacarosa, 2 mM DTT y 100 μ M PMSF, sedimentándose por centrifugación a 100,000g durante 45 minutos. Los sedimentos obtenidos, así como la fracción que sedimentó en el gradiente (sedimento del 43%), se resuspendieron en un medio conteniendo 2 mM BTP-MES, pH 7.0, 250 mM sacarosa, 2 mM DTT, 10% (v/v) glicerol, 100 μ M PMSF y 500 μ M BHT, y, una vez determinadas sus concentraciones en proteínas, se les añadió 0.2% (p/v) BSA, almacenándose en alícuotas a -70 °C, tras su congelación en N₂ líquido.

C.2. Determinación de proteínas

La cuantificación de proteína se llevó a cabo 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 previamente las proteínas de membrana, empleándose el reactivo de color concentrado de BioRad diluido 5 veces, y albúmina bovina como patrón.

Material y métodos

C.3. Actividades enzimáticas asociadas a membranas

C.3.1. Actividades fosfohidrolasas

La determinación de las actividades fosfohidrolíticas a nivel de las membranas aisladas se basó en la medida del Pi liberado en la hidrólisis del sustrato (ATP, PPI, IDP, 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% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ en 1 N SO_4H_2 , 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 KH_2PO_4 , expresándose la actividad total en $\mu\text{mol Pi (g Peso Fresco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y la actividad específica en $\mu\text{mol Pi (mg proteína)}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

C.3.1.1 Actividad ATPasa.

En la tabla 2 se muestran los medios de reacción diferenciales para la determinación de las actividades ATPásicas asociadas a plasmalema, tonoplasto o membrana 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 10 $\mu\text{g/ml}$ Brij 58, disuelto en 1 mM BTP-MES, pH 7.0, 1 mM DTT y 50% etanol (Palmgren y col. 1990). 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:

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

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

- **Actividad ATPasa de plasmalema:** definida como la actividad enzimática sensible a vanadato e insensible a nitrato y azida (Galtier y col. 1988), se determinó como la diferencia de actividad en presencia y ausencia de 250 μM Na_3VO_4 en el medio específico de reacción.

$$\Delta Va-ATPasa = Actividad(+NO_3^- + N_3^-) - Actividad(+NO_3^- + N_3^- + VO_4^{3-})$$

- **Actividad ATPasa de tonoplasto:** definida como la ATPasa sensible a nitrato e insensible a azida y/o oligomicina (O'Neill y col. 1983), se calculó como la diferencia de actividad en presencia de 100 mM KCl ó 100 mM KNO_3 en el medio específico de reacción.

$$\Delta NO_3^- - ATPasa = Actividad(+N_3^- + KCl) - Actividad(+N_3^- + KNO_3)$$

- **Actividad ATPasa de mitocondria:** definida como la actividad ATPasa sensible a azida y oligomicina (Galtier y col. 1988), se determinó como la diferencia de actividad en presencia y ausencia de 2 mM NaN_3 ó 10 $\mu\text{g/ml}$ oligomicina en el medio específico de reacción.

$$\Delta N_3^- - ATPasa = Actividad(-N_3^-) - Actividad(+N_3^-)$$

C.3.1.2. 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 conteniendo 25 mM BTP-MES, pH 8.0, 100 μM Na_2MoO_4 , 2 mM NaN_3 , 1 mM MgSO_4 , 0.3 mM PPI, 10 $\mu\text{g/ml}$ Brij 58 y 250 μM VO_4^{3-} \pm 100 mM KNO_3 , definiéndose como la diferencia de actividad en presencia y ausencia de 100 mM KNO_3 .

Material y métodos

Tabla 2. Medios de reacción específicos para la determinación de las actividades ATPasa de plasmalema, tonoplasto y mitocondria.

	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/SO ₄ Mg (mM)	3	1	3
Brij 58 (μg/ml)	10	10	10
NaN ₃ (mM)	2	2	---
KNO ₃ (mM)	100	---	---
KCl (mM)	---	---	100
Oligomicina (μg/ml)	---	10	---

C.3.1.3. Actividad IDPasa latente.

La actividad IDPasa latente, utilizada como un marcador del aparato de Golgi (Green 1983), se ensayó en un medio de reacción conteniendo 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM Na₂MoO₄, 100 mM KCl, 3 mM IDP y 3 mM MgSO₄, definiéndose como la diferencia entre las actividades en presencia y en ausencia de 10 µg/ml Brij 58.

C.3.2. 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 retículo endoplásmico en las fracciones de membrana correspondientes a plasmalema y tonoplasto. Para su medida, se adicionaron 30 µg de proteína de membrana a un medio de reacción conteniendo 50 mM KH₂PO₄ pH 7.5, 1.66 mM KCN, 30 µM citocromo *c* oxidado 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 mM⁻¹ cm⁻¹ permite expresar la actividad enzimática en µmoles de citocromo *c* reducidos (mg proteína)⁻¹ h⁻¹.

C.4. Determinación del transporte de H⁺ en vesículas de membranas

C.4.1. 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, las enzimas transportadores de H⁺ en función de los tratamientos.

La determinación se basa en la medida de la velocidad inicial de extinción de la fluorescencia de una sonda de pH, al unirse a los H⁺ en el interior de las

Material y métodos

vesículas (Bennet y Spanwick 1983). Aunque originalmente se ha utilizado la quinacrina como sonda fluorescente, en este trabajo se ha hecho uso del ACMA, al ser esta sonda mas sensible a pequeños cambios intravesiculares de pH (Burgos 1993, Rottenberg y Moreno-Sanchez 1993).

La extinción de la emisión de fluorescencia del ACMA 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: rendija 10 nm, 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).

En función del registro gráfico obtenido (Figura 4), se calcularon los parámetros que definieron la actividad bombeadora de H^+ en las vesículas de membrana (Bennett y Spanwick 1983):

- Velocidad inicial de extinción (VQi): indica la pendiente inicial 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 $\%Q \text{ min}^{-1}$.

$$VQi = \frac{F_0}{t_i}$$

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

$$VQs = \frac{VQi}{Prot}$$

- Extinción máxima (Qmax): proporción de emisión extinguida (F) respecto a la emisión inicial (F_0), expresada en %.

$$Q_{max} = \frac{F}{FO}$$

C.4.2. 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 100 mM nitrato, respectivamente.

Las vesículas de membrana (50 μg de proteína) se preincubaron durante 10 minutos a 26°C en 1 ml de un medio de reacción conteniendo 50 mM BTP-MES, pH 6.5 (plasmalema) ó 7.5 (tonoplasto), 100 mM KBr, 1 μM ACMA, 5 mM ATP-BTP, 250 mM sacarosa y 2 mM NaN₃, iniciándose la reacción se inició por adición de 5 mM MgSO₄.

C.4.3. Transporte de H⁺ dependiente de PPI

La actividad transportadora de H⁺ asociada al enzima H⁺-PPasa de tonoplasto se definió como la fracción del transporte de H⁺ estimulada por 100 mM KNO₃. Dicha actividad fue nula en ausencia de KNO₃ (Figura 4, trazo e).

Las vesículas (50 μg de proteína) se preincubaron durante 10 minutos a 26°C en 1 ml de medio de reacción de 1 ml conteniendo 50 mM BTP-MES, pH 7.5, 100 mM KNO₃, 1 μM ACMA, 250 mM sacarosa, 3 mM MgSO₄, iniciándose la reacción por adición de 0.6 mM PPI.

Material y métodos

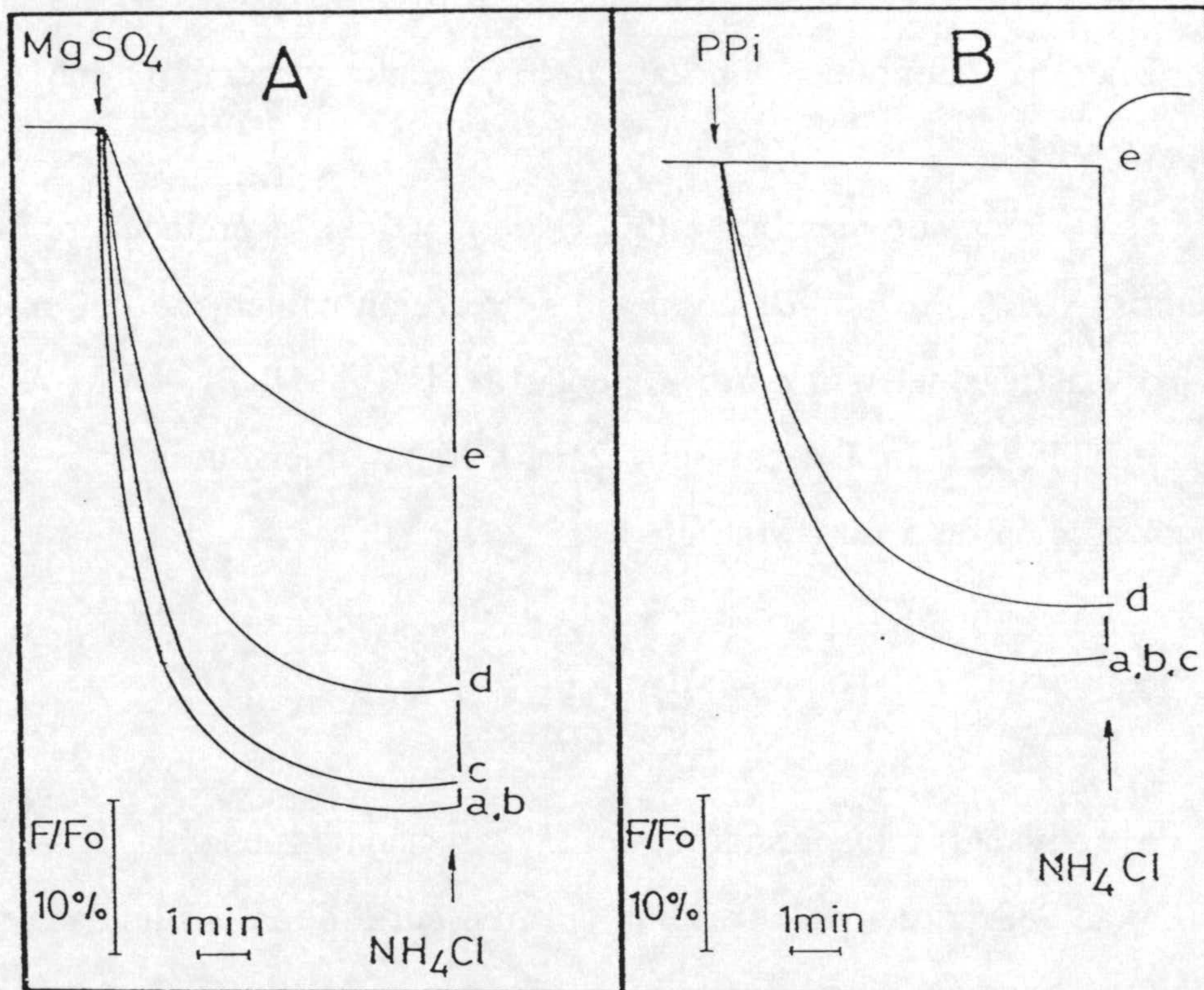


Figura 4. Esquema representativo de la extinción de la fluorescencia del ACMA, como consecuencia del transporte de H⁺ dependiente de ATP o PPI en vesículas de plasmalema o tonoplasto. Las letras indican el registro obtenido tras la incubación con diferentes compuestos, y que se ilustran en la figura 18.

C.5. Antiporte Na⁺/H⁺ en vesículas de tonoplasto

C.5.1. Aislamiento de tonoplasto

La determinación de la actividad antiporte Na⁺/H⁺ exigió la modificación y optimización de los métodos de obtención de membranas, que afectó a los métodos de aislamiento de microsomas, gradiente discontinuo de sacarosa (Figura 5), así como a la determinación del gradiente de H⁺ transmembranario. Para ello, se utilizó esencialmente la metodología descrita por **Blumwald y col. (1987)**.

C.5.1.1. Obtención de microsomas

Usualmente, 20 g de raíces aisladas de plántulas de girasol sometidas a diferentes tratamientos de NaCl, se homogenizaron en mortero con 200 ml de un medio de extracción conteniendo 30 mM Tris, 0.5% (p/v) BSA, 10% (v/v) glicerol, 250 μM dibucaina, 500 μM BHT, 1 mM PMSF, 5 mM EGTA, 5 mM MgSO₄, 250 mM manitol, 2 mM DTT, 26 mM metabisulfito potásico y 10% PVPP (p/p de tejido), ajustado a pH 8.0 con ácido sulfúrico. Todo el proceso se llevó a cabo a 4°C. El homogenado se filtró a través de 6 capas de gasa y se centrifugó a 10,000g durante 20 minutos en rotor SS-34 (centrífuga refrigerada Sorvall). El sobrenadante resultante se centrifugó a 80,000g durante 45 minutos en un rotor 60Ti (centrífuga Beckman), resuspendiéndose el sedimento en un medio de suspensión conteniendo 6 mM Tris-MES, pH 8.0, 10% (v/v) glicerol, 250 mM manitol, 1 mM Tris-EDTA, pH 8.0, 250 μM dibucaina, 400 μM BHT, 2 mM DTT y 0.1 mM PMSF, utilizándose inmediatamente.

C.5.1.2. Gradiente discontinuo de sacarosa

Las membranas microsomales resuspendidas (5 ml) se depositaron sobre un gradiente discontinuo de sacarosa constituido por tres capas de 15, 10 y 5 ml de sacarosa al 13, 28 y 43% (p/p), en un medio conteniendo 6 mM Tris-MES,

Material y métodos

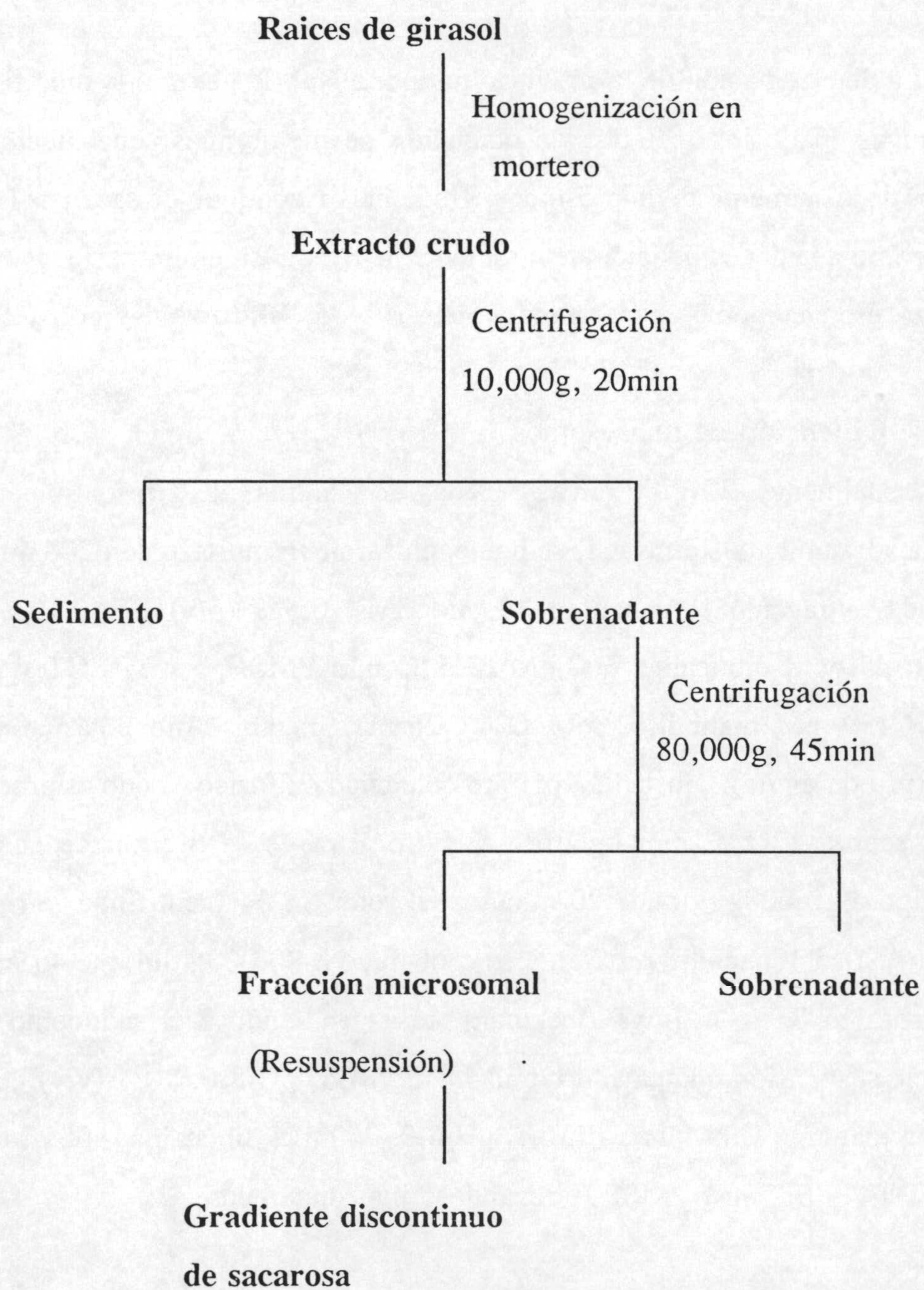


Figura 5. Aislamiento de una fracción de membrana enriquecida en tonoplasto de raíces de girasol, para la determinación de la actividad antiporte Na^+/H^+ en función el tratamiento salino.

pH 8.0, 10% (v/v) glicerol, 250 mM manitol, Tris-EDTA, pH 8.0, 250 μ M dibucaina, 400 μ M BHT y 2 mM DTT. Tras centrifugar a 80,000g durante 2 horas en un rotor basculante SW28 (centrífuga Beckman), las membranas de las interfases 0/13, 13/28 y 28/43 % de sacarosa se recogieron con pipeta pasteur y se diluyeron 10 veces con el medio anterior, sedimentándose por centrifugación a 80,000g durante 30 minutos, en rotor 60Ti (centrífuga Beckman). El sedimento obtenido se resuspendió en un volumen mínimo del mismo medio y se utilizó inmediatamente para la determinación de la actividad antiporte Na^+/H^+ .

C.5.2. Medida de la actividad antiporte 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, utilizándose la naranja de acridina como sonda fluorescente (Blumwald y col. 1987) (Figura 6).

La emisión de fluorescencia de la sonda disuelta en agua se cuantificó en un espectrofluorímetro Shimadzu, modelo RF 540, a una λ_{exc} 495 nm, con una rendija de 2 nm, y λ_{em} 540 nm, con una rendija de 5 nm.

La formación del gradiente de pH se llevó a cabo incubando 15 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 Tris-ATP, pH 8.0, 100 mM TMA-Cl, 2.5 mM glucosa y 5 μ M naranja de acridina, iniciándose la reacción por adición de 1.8 mM MgSO_4 (Figura 6, trazo *a*). En estas condiciones, el enzima H^+ -ATPasa de tonoplasto, en presencia de Mg-ATP y Cl^- , provocó la extinción gradual de la fluorescencia de la sonda, lo que indicaba la formación de un gradiente de pH (interior ácido) (Figura 6, trazo *b*). Una vez estabilizado el gradiente de pH, la actividad H^+ -ATPasa se paralizó, retirando ATP del medio, mediante la adición de 10 unidades/ml del enzima hexoquinasa, que cataliza la reacción $\text{glucosa} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glucosa-P} + \text{ADP}$, dando lugar a una recuperación de la emisión de

Material y métodos

fluorescencia de la sonda, debido a la salida de H^+ de las vesículas de membrana por permeabilidad pasiva (Figura 6, trazo *c*). A continuación, la adición de Na^+ , en forma de gluconato sódico, provocó la recuperación de fluorescencia a consecuencia de la acumulación activa de Na^+ asociada a un eflujo pasivo de H^+ , catalizado por el antiporte Na^+/H^+ (Figura 6, trazo *d*). Finalmente, para la recuperación del valor inicial de fluorescencia, el gradiente se disipó por la adición de 10 mM de NH_4Cl (Figura 6, trazo *e*).

Para la cuantificación de la actividad se trazaron las pendientes a las curvas en los primeros segundos tras la adición de hexoquinasa o sal, y se calcularon las velocidades iniciales de recuperación de la emisión de fluorescencia, como el resultado del cociente entre la fluorescencia recuperada y el tiempo requerido. 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.6. Analisis de lípidos de plasmalema y tonoplasto

C.6.1. Extracción de lípidos totales

La extracción de lípidos totales de fracciones de membranas enriquecidas en tonoplasto y plasmalema se llevó a cabo por el método de **Blight y Dyer (1959)**, modificado por **Burgos (1993)**. Un mg de proteína de membrana se adicionó a 2 ml de isopropanol hirviente contenido en un homogenizador de vidrio ("potter"), y se mantuvo en ebullición durante 2 minutos, para inactivar las fosfolipasas (**Douce 1964**). La mezcla se homogenizó con 6 subidas/bajadas de émbolo del "potter" y, a continuación, se añadieron sucesivamente 1.5 ml de isopropanol, 1.5 ml de cloroformo-isopropanol (1/1, v/v) y 1.5 ml de cloroformo, repitiéndose la homogenización en "potter" con cada nueva adición. El homogenizado se filtró a vacío a través de papel Whatman 1, en un embudo Buchner sobre

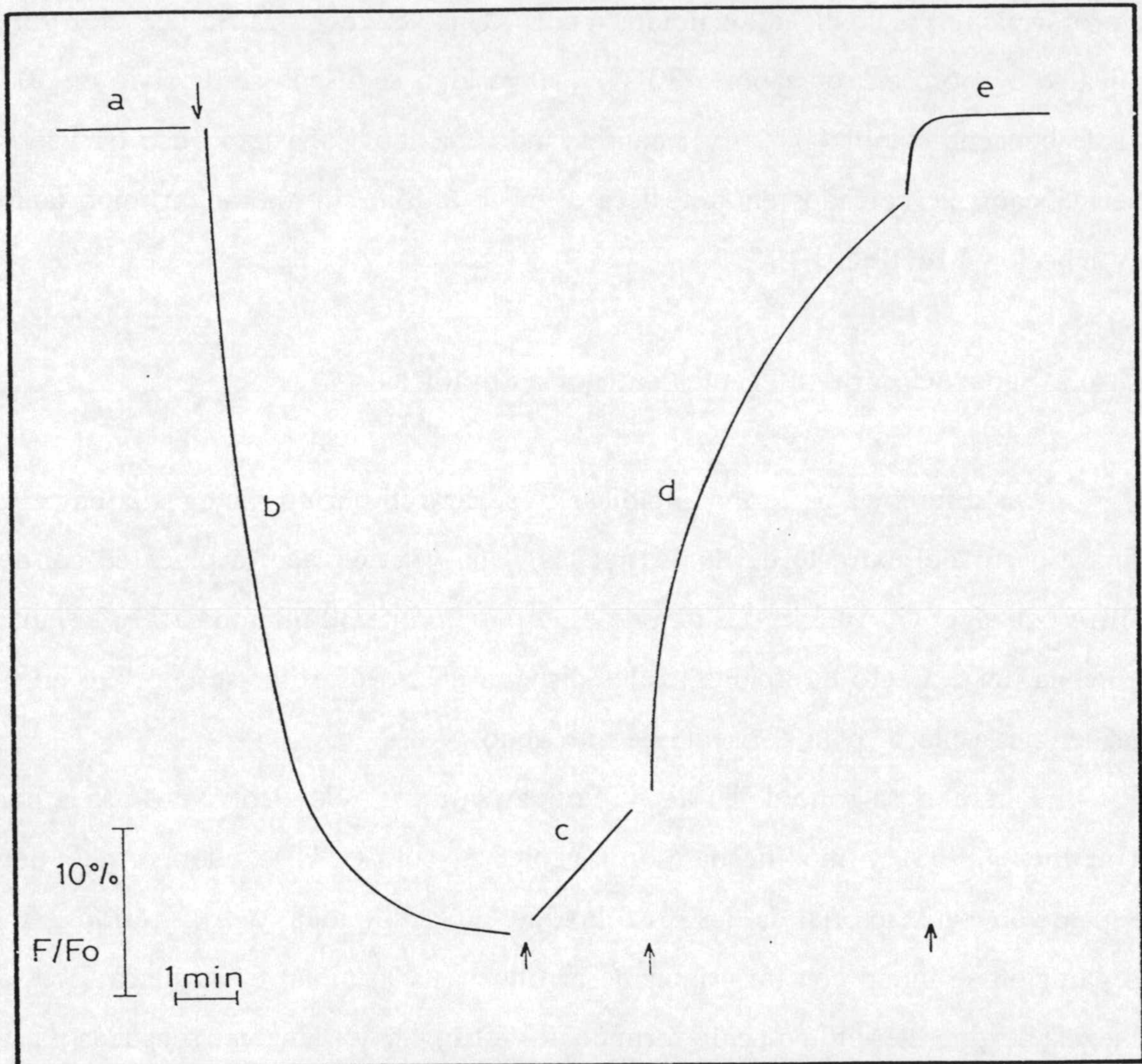


Figura 6. Registro representativo obtenido por espectrofluorimetría para la determinación del antiporte Na^+/H^+ , mostrando la extinción de fluorescencia de la naranja de acridina por la acción de la H^+ -ATPasa de ionoplasto, y la posterior recuperación de la misma, tras la adición de Na^+ al medio de reacción (trazo d). El resto de las letras indican diferentes adiciones de componentes y son detalladas en el texto.

Material y métodos

un kitasato, lavándose el filtró con 1.5 ml de cloroformo. Para eliminar contaminantes no lipídicos, al extracto clorofórmico se le añadió 0.75 ml de NaCl al 1% (p/v), apareciendo dos fases, una superior acuosa y una fase inferior clorofórmica, que contiene los lípidos totales. Una vez recogida, la fase clorofórmica se evaporó en rotavapor a 30°C, y el residuo semiseco se disolvió en 500 μ l de benceno-etanol (4/1, v/v), conservándose a -20°C hasta su uso en viales herméticamente cerrados en atmosfera de N₂ o argón, sin alteración importante (Vorbeck y Martinetti 1965).

C.6.2. 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 de sílice (silicagel G, Merck; 0.5 mm de espesor) durante 30 minutos a 110°C, una alícuota del extracto de lípidos totales disuelta en cloroformo, se depositó en el origen de la placa, bajo corriente de nitrógeno.

Para el desarrollo de la placa se utilizó la mezcla de disolventes usada por Gardner (1968) y modificada por Grenier y col. (1973), que permite una separación satisfactoria de los fosfolípidos, galactolípidos y triglicéridos. La separación se inició con un primer desarrollo hasta la mitad de la placa, con la mezcla hexano-eter etílico-ácido fórmico (20/80/1, v/v/v). Una vez secada la placa bajo corriente de N₂, la placa se sometió a un segundo desarrollo en cloroformo-metanol-agua (65/25/4; v/v/v), hasta alcanzar el disolvente el final de la placa (1 hora, aproximadamente). La placa se secó al aire y N₂ y, las diferentes bandas de lípidos se revelaron con vapores de yodo.

C.6.3. Análisis de ácidos grasos de fosfolípidos

El análisis de ácidos grasos de diferentes categorías lipídicas por

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

Para la saponificación y metilación de los fosfolípidos separados por capa fina, las bandas de sílice rascadas de la placa correspondientes a estas moléculas, se depositaron en tubos de rosca, y se añadieron 2.5 ml 14% trifluoruro de boro en MeOH, 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 2,000g. La fase superior pentánica, conteniendo los derivados metílicos de los ácidos grasos, se recogió y se evaporó en rotavapor y el residuo se disolvió con volúmenes reducidos de metanol ($\approx 100 \mu\text{l}$) para su análisis.

La separación, identificación y cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos se realizó por cromatografía en fase gaseosa, a 170°C, utilizando una columna semicapilar de vidrio (Supelco SP-2330) de 30 m utilizando como patrón interno el ester metílico del ácido heptadecanoico, no presente en la muestra problema.

C.7. 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

Material y métodos

de poliacrilamida con SDS.

- Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa para la inmunodetección de las proteínas con anticuerpos específicos.

C.7.1. Preparación de la muestra. Solubilización.

Entre 30-50 μg de proteínas de membranas microsomales o de las fracciones obtenidas del gradiente de sacarosa, se solubilizaron en tubos eppendorff 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, suplementado con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ quimostatina y 4 mM PMSF, como antiproteásicos. Las muestras se incubaron 30 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 rpm (centrífuga Microspin 12S, Sorvall) para eliminar el material insoluble.

Los patrones de peso molecular de rango 14.4-97 kDa ó 42.7-200 kDa (BioRad SDS-Standars), se diluyeron adecuadamente en tampón de Laemmli (1/100 para tinción con plata, y 1/20 para tinción con Coomassie y electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa), y se incubaron 5 minutos a 95°C, eliminándose el material insoluble por centrifugación.

C.7.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Se utilizaron dos equipos diferentes de electroforesis:

- Modelo Protean IITM de BioRad, para geles de 20x16 cm y 1 mm de espesor (15 cm de gel de resolución y 4 cm de gel de empaquetamiento).
- Modelo Mini-ProteanTM de BioRad para geles de 8x7 cm y 1 mm de espesor (5 cm de gel de resolución y 2 cm de gel de empaquetamiento).

Los geles se formaron según el sistema discontinuo descrito por Laemmli

(1970). El gel de resolución se preparó bien en gradiente de concentración o a concentración uniforme. Para los geles de concentración uniforme se utilizaron concentraciones del 7.5, 10 ó 12% (p/v) de acrilamida, con un 2.67% de entrecruzamiento (bisacrilamida)(Tabla 3). Los geles de gradiente de concentración contenían un gradiente de 6-15% (p/v) acrilamida/bisacrilamida, estabilizado por un gradiente de sacarosa del 0-15% (p/v) (Tabla 4).

Volumenes adecuados de proteínas solubilizadas de cada una de las muestras y los patrones de peso molecular conocido, disueltos en tampón de Laemmli (20-30 μ l), se cargaron en cada gel. En el sistema Protean, la electroforesis se llevó a cabo en un tampón de electrodo constituido por 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS a 15°C, a una corriente constante de 24 mA/gel, y posteriormente, a 36 mA/gel, cuando el frente penetró en el gel de resolución. En el sistema Miniprotean, la electroforesis se realizó en el mismo tampón de electrodo, a temperatura ambiente, y a voltaje constante de 200 V.

En ambos casos, el desarrollo electroforético 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 plata o Comassie, para el 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.7.3. Tinción y secado de los geles

Para el revelado de las diferentes bandas de proteínas en los geles se utilizó la tinción con plata y, en algunos casos, la tinción con Coomassie.

C.7.3.1. Tinción con plata

Se utilizó el procedimiento descrito por Blum y col (1987). Presenta la particularidad de incluir una breve incubación con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, previa a la impregnación con plata, y durante el proceso de reducción de ésta. Ello elimina

Material y métodos

Tabla 3. Composición de los geles en el sistema con gel de resolución de concentración uniforme de poliacrilamida.

	Gel de resolución	Gel de empaquetamiento
Tris-HCl pH 8.8	375 mM	-
Tris-HCl pH 6.8	-	125 mM
SDS (p/v)	0.1 %	0.1 %
Acrilamida/bis (30:0.8)	7.5/10/12 %	4 %
Persulfato amónico (p/v)	0.05 %	0.075 %
TEMED (v/v)	0.05 %	0.15 %

Tabla 4. Composición de los geles en el sistema de gel de resolución de gradiente de concentración de poliacrilamida.

	Gel de resolución		Gel de empaquetamiento
	Ligera	Pesada	
Tris-HCl pH 8.8	375 mM	375 mM	-
Tris-HCl pH 6.8	-	-	125 mM
SDS (p/v)	0.1 %	0.1 %	0.1 %
Acrilamida/bis (30:/0.8)	6 %	15 %	4.0 %
Sacarosa (p/v)	-	15 %	-
Persulfato amónico (p/v)	0.026 %	0.026 %	0.075 %
TEMED (v/v)	0.026 %	0.026 %	0.15 %

el exceso de plata en el gel, disminuyendo el fondo del mismo. El método consta de los siguientes pasos:

- Fijación durante, al menos, una hora en agitación con metanol-ácido acético-agua (50/12/38, v/v/v), incluyendo 0.5 ml/l 37% formaldehído, añadido inmediatamente antes.
- Dos lavados sucesivos de 20 minutos con 50% etanol y un tercero de 20 minutos con 30% etanol.
- Pretratamiento durante 1 minuto con 0.2 g/l (0.8 mM) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- Cuatro lavados sucesivos de 20 segundos con agua destilada.
- Impregnación durante 20 minutos, con 2 g/l AgNO_3 , conteniendo 0.75 ml/l de 37% formaldehído, añadido inmediatamente antes.
- Dos lavados sucesivos de 20 segundos con agua destilada.
- Revelado con 60 g/l Na_2CO_3 , 4 mg/l (16 μM) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 0.5 ml/l 37% formaldehído (añadido previo al uso), durante el tiempo suficiente para la aparición de bandas con máximo contraste.
- Dos lavados con agua destilada durante 20 segundos.
- Detención del revelado con metanol-ácido acético-agua (50/12/38, v/v/v), durante 10 minutos.
- Lavado, durante al menos 20 minutos, con 50% (v/v) metanol. Los geles se conservaron en este medio a 4°C no más de una semana, sin pérdida aparente de color o bien se sometieron a secado.

C.7.3.2. Tinción con 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).

Material y métodos

C.7.3.3. Secado de los geles

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 (BioRad mod. 583 gel Dryer).

C.7.4. Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (*Western Blotting*)

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

Los geles de transferencia, membranas de nitrocelulosa, papeles de filtro, y demás componentes del *sandwich* de transferencia, se incubaron en el tampón de transferencia constituido por 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol y 0.02% (p/v) SDS.

Para geles de 15x16 cm, la electrotransferencia se llevó a cabo en un sistema Trans-Blot™ de BioRad a 15°C y corriente constante de 135 mA, durante aproximadamente 13 horas, incrementándose a 300 mA, durante la última hora, para aumentar la eficacia de la transferencia de las proteínas. Para geles de 5x8 cm, se utilizó el sistema Mini Trans-Blot™ de Bio-Rad, termostatizado con su unidad de enfriamiento, a voltaje constante de 100 V, durante 90 minutos.

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 el inmunoensayo, o se almacenaron durante algunos días entre papeles de filtro a 4°C en la oscuridad.

Para evaluar la eficacia de la transferencia, el gel electrotransferido se tiñó

con plata o con Coomassie.

C.7.5. Inmunorrevelado 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 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:

- La subunidad de 58 kDa de la ATPasa de tonoplasto de remolacha, a una dilución de 1:1000 en TBSL. Los anticuerpos, obtenidos según describen Dupont y col. (1988), fueron un regalo del Dr. Alan Bennett, University of California, Davis, USA.

- PPasa de *Vigna radiata*, a una dilución de 1:375 en TBSL. Los anticuerpos, obtenidos según describe Maeshima (1992), fueron un regalo del Dr. Masayoshi Maeshima, Nagoya University, Japón.

- Proteína de fusión expresada en *E. coli* conteniendo el extremo carboxilo terminal (aminoácidos, 851-949) de la H⁺-ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis thaliana*, a una dilución de 1:1250 en TBSL. Los anticuerpos, obtenidos según describen Parets-Soler y col. (1990), fueron un regalo del Dr. Ramon 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 el exceso de anticuerpo no fijado como el fijado de forma

Material y métodos

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 Inmumoglobulina G de conejo, ligada a la fosfatasa alcalina (Promega), diluido 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) y NBT (16.5 µg/ml) 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 fotográficamente.

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).

C.8. Determinación del grado de fluidez de las membranas

La anisotropía de fluorescencia permite obtener información sobre las propiedades de fluidez de las membranas (Shinitzki y Barenhloz 1978). Cuando una luz polarizada es dirigida hacia un cromóforo cuyo momento dipolar de excitación está alineado con el vector eléctrico de la luz de excitación, el cromóforo absorbe preferencialmente esta luz. Puesto que los procesos de absorción son muchos más rápidos que las rotaciones moleculares, el uso de la luz polarizada crea una población de fluoróforos excitados con una orientación preferencial. Además, como la emisión de un fotón por el fluoróforo excitado requiere más tiempo que la absorción, el fluoróforo podrá reorientarse antes de que tenga lugar la emisión, definiéndose la polarización de fluorescencia resultante

como la anisotropía de fluorescencia en el estado estacionario:

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

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

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

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

$$\frac{r_o}{r} = 1 + \frac{KT_\tau}{\eta V}$$

K : constante de Boltzman

T : temperatura

τ : tiempo de vida del estado excitado

η : volumen de las especies que difunden

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

En nuestro caso, para determinar el grado de fluidez de las membranas,

Material y métodos

se han utilizado las sondas fluorescentes DPH y TMA-DPH. La primera es una sonda de naturaleza hidrofóbica con gran afinidad por las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos de los fosfolípidos, lo que permite obtener información sobre la movilidad de dichas cadenas. La segunda, además de la región hidrofóbica, posee un grupo hidrofílico (amonio cuaternario), que le permite anclarse en la unión de la cabeza polar hidrofílica de los fosfolípidos con la región hidrofóbica de los ácidos grasos, quedando la parte hidrofóbica de la sonda alineada con dichos ácidos grasos. Esta sonda, permite obtener información sobre la fluidez de la superficie de la membrana (Lenz 1989).

El marcaje de las vesículas de membrana con la sonda DPH y TMA-DPH se realizó según el método de Lynch y col. (1987), mediante la incubación de 50 μg de proteína de membrana en 1 ml de medio de ensayo conteniendo 50 mM NaHCO_3 , pH 7.0, y 6 μM DPH o TMA-DPH, en condiciones de oscuridad y agitación durante 20 minutos a 26°C. La fluorescencia se midió con un espectrofluorímetro (Shimadzu, modelo 540), provisto de dos polarizadores entre cada uno de los monocromadores y la muestra, así como de un sistema de agitación magnética y termostatación en el que se fijaron las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$, rendija = 10 nm y una $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$, rendija = 10 nm.

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

Los resultados se expresaron como anisotropía de fluorescencia en estado estacionario:

$$r_s = \frac{I_V - GI_H}{I_V + 2GI_H}$$

donde G es el factor de corrección de aparato, determinado por la medida de los componentes de la fluorescencia de las sondas con una luz de excitación polarizada horizontalmente (I_H/I_V). 83

V. RESULTADOS

UNIVERSIDAD DE GRANADA
16 MAYO 1995
COMISION DE DOCTORADO



V. RESULTADOS

A. ESTUDIOS PRELIMINARES

A.1. Definición del modelo experimental: elección del material vegetal y condiciones de cultivo

Objetivo básico de este trabajo es el estudio del papel que juegan los sistemas de transporte transmembranarios de iones en los mecanismos de tolerancia del girasol al estrés salino. A falta de otros sistemas deseables, como por ejemplo, el uso de plantas mutantes o transgénicas, dicho estudio requiere, con fines comparativos, la utilización de variedades de una misma especie con una tolerancia diferencial al estrés salino.

Por otra parte, puesto que la tolerancia al estrés salino depende del estadio ontogénico de la planta (Shannon 1984), se hizo necesario evaluar la tolerancia de las variedades de girasol en estadios vegetativos tempranos, usando diferentes parámetros fisiológicos y bioquímicos extensamente descritos en la literatura como indicadores de tolerancia. Asimismo, para la completa definición del sistema experimental, fue necesario optimizar la duración y severidad de los tratamientos, concretándonos en dos situaciones de estrés salino, a corto plazo de tiempo: un estrés moderado, que no afectara significativamente al crecimiento, al menos, de la variedad más tolerante y que provocara cambios significativos en algunos de los parámetros bioquímicos en estudio; y un estrés severo, que causara reducciones significativamente diferenciales del crecimiento en las variedades objeto de estudio.

Por todo ello, de los experimentos preliminares encaminados a evaluar la idoneidad a nuestro estudio de las variedades de girasol disponibles, se pudo concluir que de las siete variedades de girasol inicialmente utilizadas, se

Resultados

excluyeron cinco, por su crecimiento heterogéneo y escaso vigor, seleccionándose las variedades Alhama y Montenuovo (suministradas por Semillas Pacífico S.A.) por su adecuado crecimiento en cultivos hidropónicos y, sobre todo, por su rendimiento agronómico diferencial en respuesta a la sequía y a suelos salinos (comunicación personal, Semillas Pacífico S.A. Sevilla).

Del mismo modo, el análisis del crecimiento de las plántulas de girasol, expresado como peso fresco y seco, mostró que tres días de tratamiento con 0, 75 y 150 mM NaCl tras siete días de cultivo en solución nutritiva hidropónica, cumplía los requisitos mencionados anteriormente (Tablas 1 y 2).

B. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD EN LAS VARIEDADES DE GIRASOL OBJETO DE ESTUDIO

El hecho de que las dos variedades elegidas presentaran un rendimiento agronómico diferencial en respuesta al estrés hídrico y salino, no garantizaba esta cualidad en estadios tempranos de su desarrollo, por cuanto los mecanismos de tolerancia pueden deberse a uno o suma de varios niveles: ontogénico, estructural o anatómico, fisiológico y bioquímico (McCue y Hanson 1990). Los niveles que interesaban a este trabajo eran los dos últimos. Por ello, se hizo estrictamente necesaria la evaluación de la tolerancia a la salinidad utilizando diferentes marcadores fisiológicos, extensivamente descritos en la literatura como marcadores de tolerancia, en función de tiempos cortos de estrés. Asimismo, analizamos comparativamente, desde una perspectiva bioquímica, los sistemas de transporte de H^+ como marcadores bioquímicos potenciales de tolerancia a la salinidad.

Tabla 1. Crecimiento, expresado como gramos de peso fresco por 10 plantas, de parte aérea y raíz de plántulas de girasol en función del tiempo (días) y del tratamiento salino (0, 75 y 150 mM de NaCl). Los resultados son la media de tres experimentos independientes. Valores entre paréntesis representan el porcentaje de PF respecto al control. Letras iguales dentro de cada grupo, formado por tiempo de tratamiento y parte del vegetal, representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.

Días	Parte aérea		Raíz	
Tratamiento	Alhama	Montenuovo	Alhama	Montenuovo
0 d	2.4 _a	2.42 _a	1.30 _a	1.20 _a
3 d				
0 mM NaCl	5.58 (100) _a	5.77 (100) _a	2.46 (100) _a	2.50 (100) _a
75 "	5.40 (97) _a	5.65 (98) _a	2.51 (102) _a	2.42 (97) _a
150 "	4.23 (75) _b	4.02 (71) _b	1.48 (60) _b	1.25 (50) _c
6 d				
0 mM NaCl	10.00 (100) _a	10.60 (100) _a	4.95 (100) _a	4.80 (100) _a
75 "	8.00 (80) _b	8.20 (77) _b	4.83 (98) _a	4.15 (86) _a
150 "	5.50 (55) _c	4.50 (42) _c	2.52 (51) _b	1.77 (37) _c
12 d				
0 mM NaCl	21.60 (100) _a	22.20 (100) _a	10.50 (100) _a	11.55 (100) _a
75 "	15.48 (71) _b	13.30 (60) _c	7.80 (74) _b	6.72 (58) _c
150 "	7.50 (35) _d	5.00 (22) _e	3.63 (34) _d	2.04 (18) _e

Resultados

Tabla 2. Crecimiento, expresado como miligramos de peso seco por 10 plantas, de parte aérea y raíz de plántulas de girasol en función del tiempo (días) y del tratamiento salino (0, 75 y 150 mM de NaCl). Los resultados son la media de 3 experimentos independientes. Valores entre paréntesis representan el porcentaje de PS respecto al control. Letras iguales dentro de cada grupo, formado por tiempo de tratamiento y parte del vegetal, representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.

Días	Tratamiento	Parte aérea		Raíz	
		Alhama	Montenuovo	Alhama	Montenuovo
0 d		162 _a	159 _a	60 _a	50 _a
3 d					
	0 mM NaCl	328 (100) _a	343 (100) _a	105 (100) _a	104 (100) _a
	75 "	315 (96) _a	332 (97) _a	104 (99) _a	100 (96) _a
	150 "	282 (86) _b	285 (83) _b	78 (74) _b	62 (60) _c
6 d					
	0 mM NaCl	581 (100) _a	612 (100) _a	218 (100) _a	226 (100) _a
	75 "	509 (88) _b	532 (87) _b	198 (91) _a	179 (79) _a
	150 "	423 (73) _c	343 (56) _c	131 (60) _b	93 (41) _c
12 d					
	0 mM NaCl	1350 (100) _a	1360 (100) _a	488(100) _a	550(100) _a
	75 "	1082 (80) _b	911 (67) _c	337 (69) _b	292 (53) _c
	150 "	625 (46) _d	406 (30) _e	197 (40) _d	107 (19) _e

B.1. Parámetros fisiológicos

B.1.1. Crecimiento

El crecimiento, expresado como peso fresco y seco, de parte aérea y raíz de plántulas de girasol de las variedades Alhama y Montenuovo, en función de la duración y severidad de los tratamientos, se muestra en las Tablas 1 y 2. Los controles de ambas variedades presentaron un crecimiento similar, mientras que el tratamiento salino causó una reducción paulatina del crecimiento de la raíz y parte aérea, proporcionalmente a la severidad y duración del estrés, en función de la variedad. Así, después de 3 días con 150 mM de NaCl, los pesos frescos disminuyeron entre un 25 y 30% (parte aérea) y entre un 40 y 50% (raíz) respecto al control, no afectándose éstos por 75 mM de NaCl. Dicha inhibición fue significativamente mayor en raíces de Montenuovo que de Alhama. Sin embargo, a partir del sexto día y, sobre todo, después de 12 días de tratamiento, concentraciones de 75 mM de NaCl comenzaron a ser inhibitorias siendo dicha inhibición significativamente mayor en Montenuovo.

Estos datos parecen indicar que la variedad Alhama es algo más tolerante a la salinidad que la variedad Montenuovo.

B.1.2. Contenido hídrico

Una concentración de 150 mM de NaCl en el medio de cultivo provocó una disminución del contenido hídrico de la parte aérea de las plántulas al tercer día de tratamiento, mientras que 75 mM de NaCl sólo redujo sensiblemente dicho contenido después de 6 días de tratamiento (Tabla 4). Asimismo, el estrés por NaCl no alteró significativamente el contenido hídrico relativo de discos de cotiledones de plántulas de ambas variedades de girasol tratadas durante 3 días (Tabla 5).

Resultados

B.1.3. Test de integridad de la membrana

En la Figura 1 se muestran las cinéticas de pérdida de UVAS en función del tiempo de incubación de discos de cotiledones y de raíces de las dos variedades de girasol tratadas durante 3 días con diferentes concentraciones de NaCl. En este tipo de experimentos, el daño causado en la integridad de la membrana es más bien el reflejo final de un complejo proceso que representa la capacidad metabólica global de la planta para tolerar la sal, que la susceptibilidad *per se* de las membranas a dicho factor de estrés. Las velocidades de pérdida relativas de UVAS se calcularon como las tangentes a las curvas de pérdida en los primeros 75 minutos de incubación, a partir de la primera derivada de la función obtenida tras el ajuste de la curva por regresión no lineal (Tabla 6 y 7).

Los resultados indicaron que las membranas de discos de cotiledones de Montenuovo eran más susceptibles que las de Alhama al daño por ambas concentraciones de sal (Tabla 6). Sin embargo, en raíces el daño sólo fue mayor en la variedad Montenuovo a concentración de NaCl de 150 mM. Aunque estas medidas se relativizaron dividiendo por los contenidos totales de UVAS del tejido, las diferencias encontradas no fueron causadas por incrementos diferenciales exacerbados de dichos contenidos por efecto de los tratamientos (Tabla 6 y 7).

Cuando discos de cotiledones y raíces enteras de plantas controles se trataron *in vitro* durante 4 horas, con 0, 75 y 150 mM de NaCl, experimento que debe reflejar la sensibilidad potencial de la membrana *per se* al daño por NaCl, las velocidades de pérdida relativas de UVAS fueron comparativamente mayores que en los experimentos *in vivo*, no encontrándose diferencias significativas entre variedades (Figura 2, Tabla 8).

Tabla 4. Contenido hídrico, expresado como razón PF/PS de parte aérea de plántulas de girasol en función del tiempo (días) y del tratamiento con 0, 75 y 150 mM de NaCl. Letras iguales dentro de cada grupo, formado por tiempo de tratamiento, representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.

Días		Alhama	Montenuovo
Tratamiento			
0 d		15.0 _a	15.2 _a
3 d			
0 mM NaCl		17.0 _a	16.8 _a
75	"	17.1 _a	17.0 _a
150	"	15.0 _b	14.1 _b
6 d			
0 mM NaCl		17.2 _a	17.3 _a
75	"	15.7 _b	15.4 _b
150	"	13.0 _c	13.1 _c
12 d			
0 mM NaCl		16.0 _a	16.3 _a
75	"	14.3 _b	14.6 _b
150	"	12.0 _c	12.3 _c

Resultados

Tabla 5. *Contenido hídrico relativo (CHR) de discos de cotiledones de plántulas de girasol tratadas durante tres días con diferentes concentraciones de NaCl. Los resultados, expresados en porcentaje, son la media \pm DE de dos experimentos con tres repeticiones cada uno. Letras iguales representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.*

mM NaCl	Alhama	Montenuovo
0	87.9 \pm 1.0 _a	89.6 \pm 1.0 _a
75	85.3 \pm 1.5 _a	87.2 \pm 1.6 _a
150	85.9 \pm 1.2 _a	86.5 \pm 1.8 _a

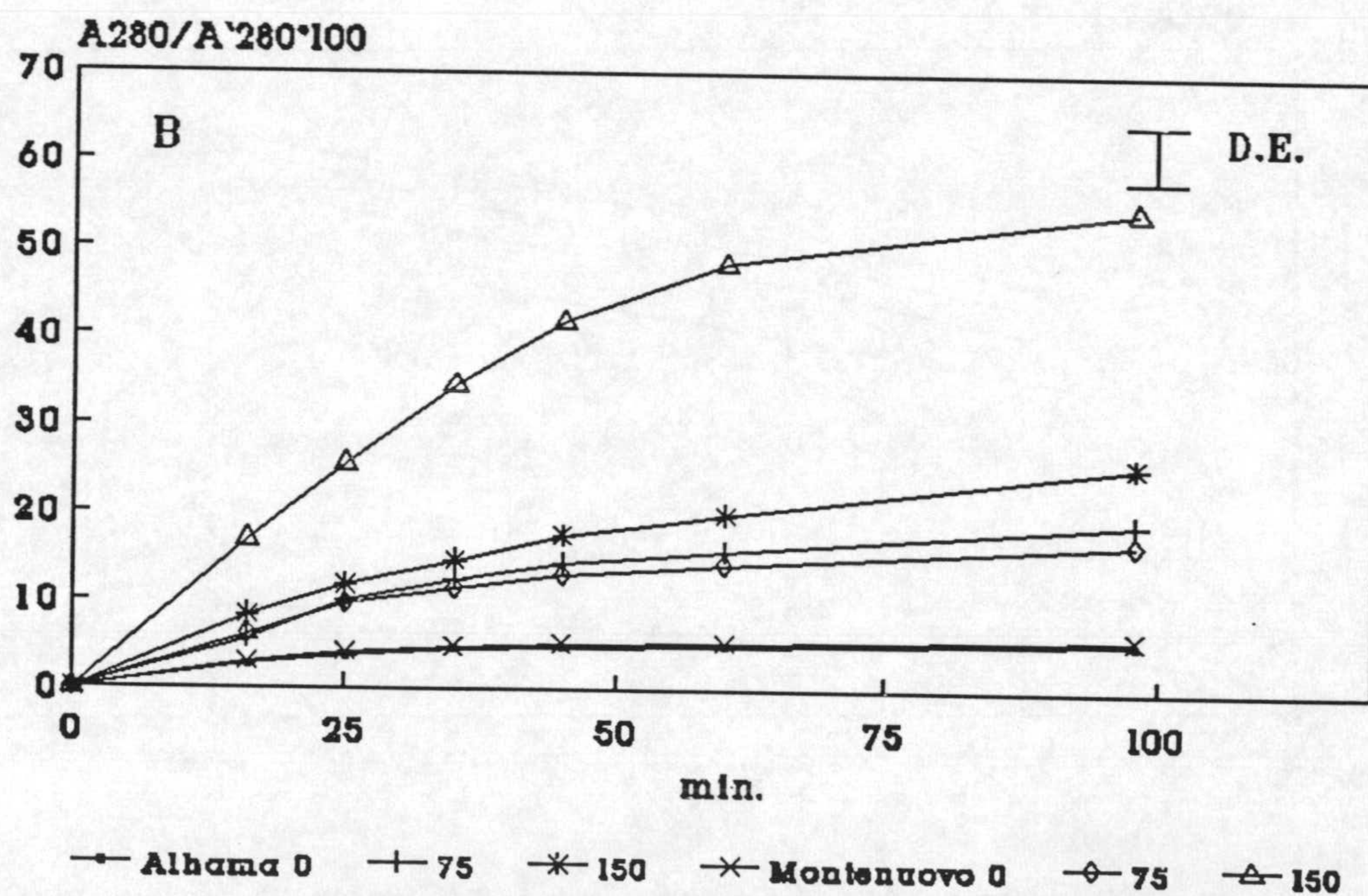
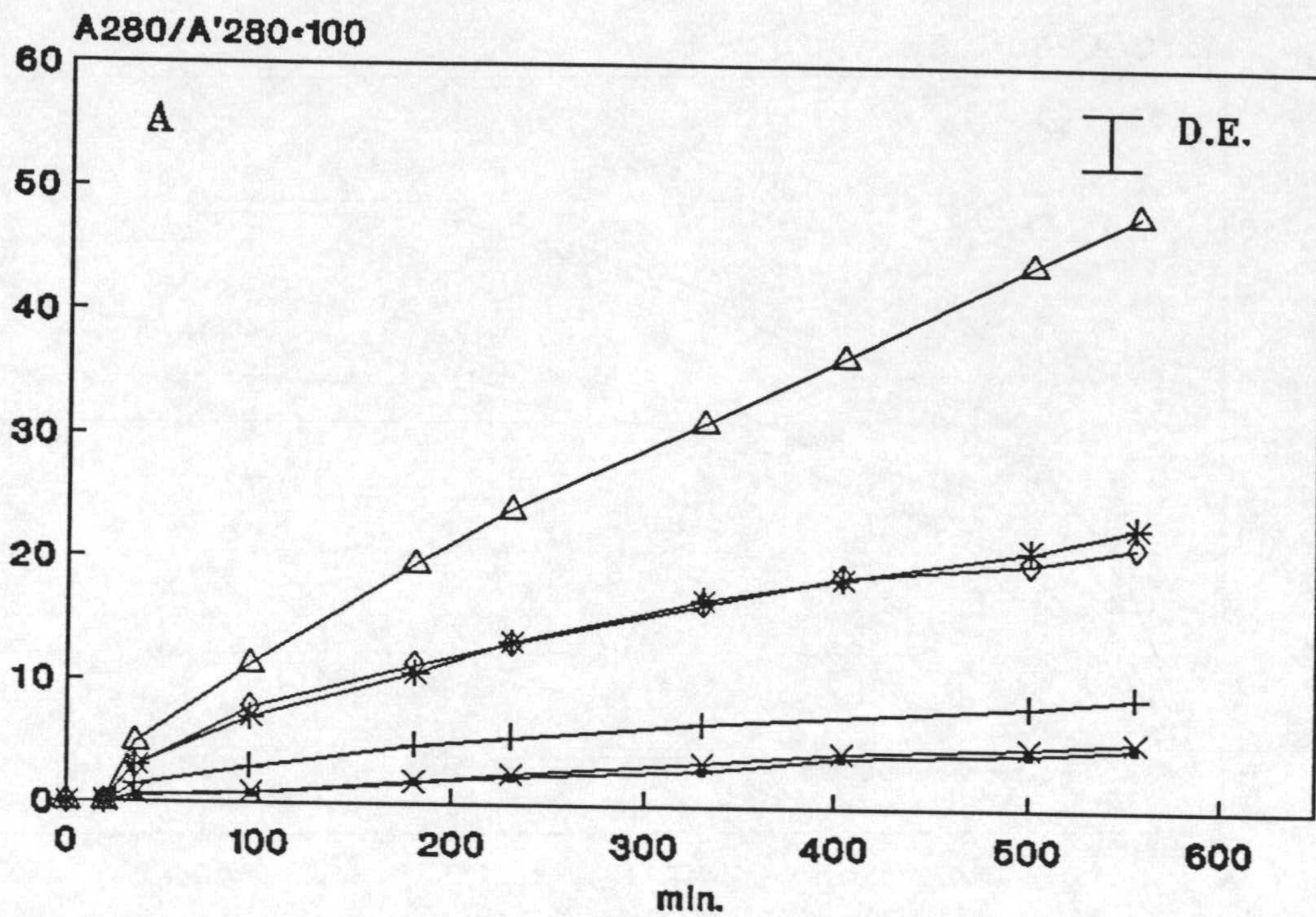


Figura 1. Cinética de pérdida relativa de UVAS, en función del tiempo de incubación de 10 discos de cotiledones (panel A), y raíces enteras (panel B) de plántulas de Alhama y Montenuovo tratadas durante 3 días con 0, 75 y 150 mM de NaCl. Los valores son la media de tres repeticiones de un experimento representativo de una serie de tres experimentos independientes.

Resultados

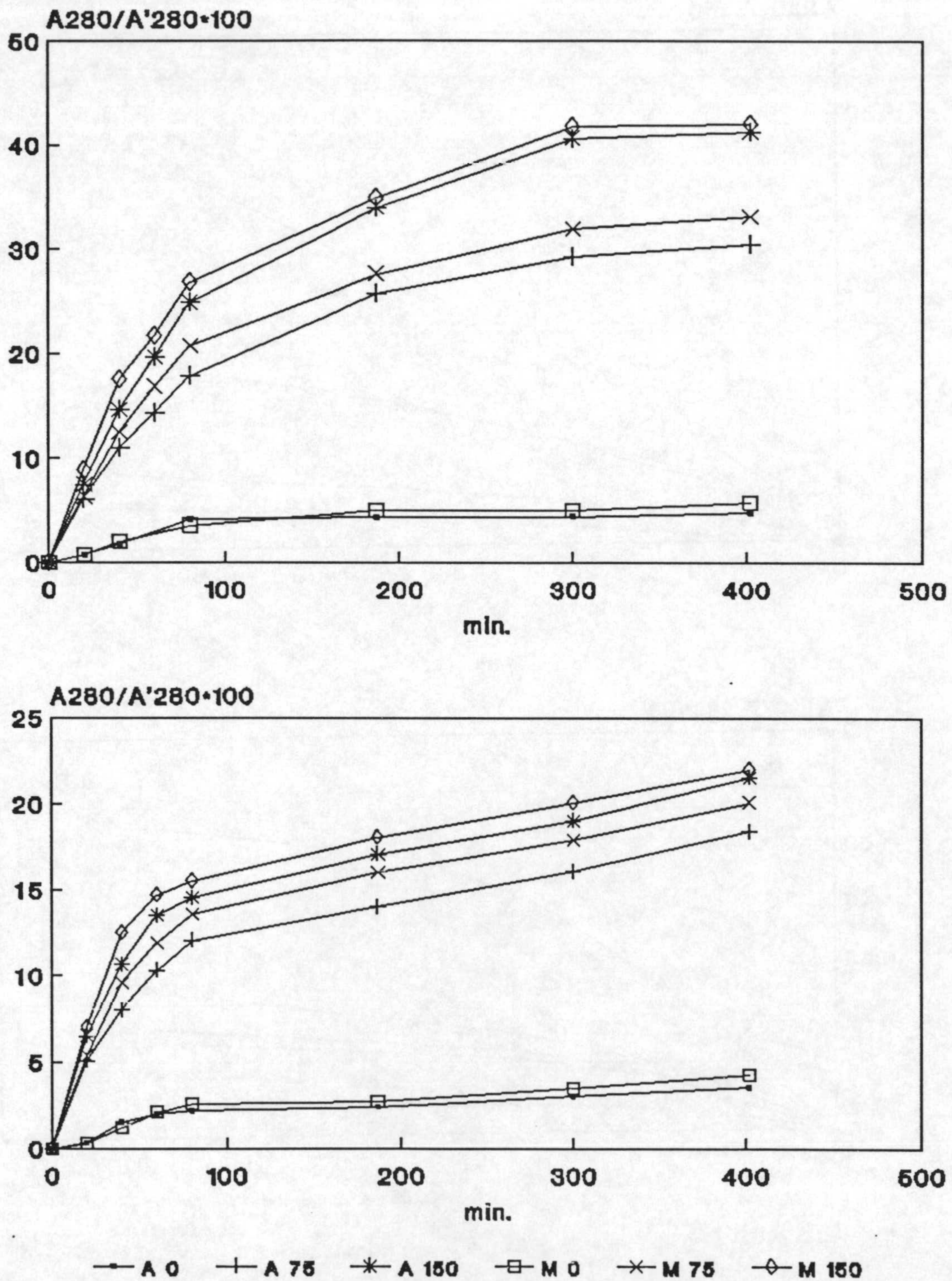


Figura 2. Cinética de pérdida relativa de UVAS, en función del tiempo de incubación de 10 discos de cotiledones (panel A), y raíces enteras (panel B) de plántulas de Alhama y Montenuovo tratadas in vitro durante 4 horas con 0, 75 y 150 mM de NaCl. Los datos son la media de tres repeticiones de un experimento representativo de una serie de tres experimentos independientes.

Tabla 6. Velocidad de pérdida relativa y contenidos totales de UVAS en discos de cotiledones de plántulas de girasol tratadas durante 3 días con 0, 75 y 150 mM NaCl. Los datos, referidos a 10 discos, son la media \pm D.E. de tres repeticiones representativas de uno de tres experimentos independientes. Letras iguales dentro de cada grupo representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.

Tratamiento NaCl (mM)	Alhama	Montenuovo
<hr/>		
$A_{280} A'_{280}^{-1} h^{-1} \cdot 100$		
0	$2.1 \pm 0.1_e$	$3.0 \pm 0.1_e$
75	$5.7 \pm 0.3_d$	$10.8 \pm 0.4_c$
150	$11.4 \pm 0.5_b$	$26.4 \pm 0.7_a$
<hr/>		
$A'_{280} \cdot 1000$		
0	$415 \pm 45_b$	$539 \pm 37_a$
75	$547 \pm 56_a$	$591 \pm 65_a$
150	$577 \pm 53_a$	$605 \pm 61_a$

Resultados

Tabla 7. Velocidad de pérdida relativa y contenido total de UVAS en raíz entera de plántulas de girasol tratadas durante 3 días con 0, 75 y 150 mM de NaCl. Los datos son la media \pm D.E. de tres repeticiones representativas de uno de dos experimentos independientes. Letras iguales dentro de cada grupo representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.

Tratamiento NaCl (mM)	Alhama	Montenuovo
<hr/>		
$A_{280} A'_{280}^{-1} h^{-1} \cdot 100$		
0	1.8 \pm 0.2 _d	1.9 \pm 0.1 _d
75	9.3 \pm 1.5 _c	7.2 \pm 1.0 _c
150	12.5 \pm 2.0 _b	33.2 \pm 4.0 _a
<hr/>		
$A'_{280} \cdot 1000$		
0	1526 \pm 155 _a	1278 \pm 130 _a
75	1427 \pm 115 _a	1370 \pm 140 _a
150	787 \pm 85 _b	650 \pm 77 _b

Tabla 8. Velocidad de pérdida relativa y contenido total de UVAS de discos de cotiledones o de raíz entera de plántulas de Alhama y Montenuovo control, previamente tratadas in vitro durante 4 horas con 0, 75 y 150 mM de NaCl. Los datos, relativos a 20 discos, son la media de 3 repeticiones representativas de uno de tres experimentos independientes. Letras iguales dentro de cada grupo representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.

Tratamiento NaCl (mM)	Cotiledones		Raíces	
	Alhama	Montenuovo	Alhama	Montenuovo
$A_{280} A'_{280}^{-1} h^{-1} \cdot 100$				
0	4.19 _c	4.22 _c	2.10 _c	2.10 _c
75	21.00 _b	25.17 _b	11.64 _b	12.72 _b
150	28.95 _a	34.50 _a	14.40 _a	14.56 _a
$A'_{280} \cdot 1000$				
0	350 _a	385 _a	1037 _a	963 _a
75	329 _a	359 _a	439 _c	405 _c
150	363 _a	380 _a	573 _b	586 _b

Resultados

B.1.4. Contenido de prolina y azúcares totales en los tejidos

La Tabla 9 muestra los contenidos de prolina de las dos variedades de girasol tratadas durante 3 días con diferentes concentraciones de NaCl. La concentración total de prolina, de la que la mayor parte correspondió a la parte aérea, aumentó fuertemente en función de las concentraciones de sal en el medio de cultivo, siendo dicho incremento significativamente mayor en la variedad Alhama.

Los tratamientos salinos incrementaron significativamente el contenido total de azúcares totales en Alhama, esencialmente en la parte aérea contrariamente, en la variedad Montenuovo el tratamiento salino indujo una disminución del contenido de azúcares totales a nivel de la raíz (Tabla 10).

B.1.5. Actividad fotosintética

La actividad fotosintética en cotiledones de las variedades Alhama y Montenuovo en función del estrés salino se llevó a cabo utilizando diversos parámetros derivados de las curvas de inducción de la fluorescencia de la clorofila incluidos en el apartado de Material y Métodos (Tabla 11).

Un estrés salino moderado (75 mM NaCl) no alteró significativamente la actividad del aparato fotosintético de los cotiledones en las dos variedades. Sin embargo, un estrés salino severo (150 mM NaCl) sí afectó claramente dicha actividad, obteniéndose una disminución de la capacidad fotosintética del fotosistema II (F_v/F_m) y de la eficiencia de la transferencia de energía entre los pigmentos antena y el centro de reacción del fotosistema II (F_m/F_o).

Respecto a las medidas de fluorescencia realizadas en el estado estacionario, concentraciones de 150 mM en el medio de cultivo afectaron la extinción fotoquímica y, sobre todo, la energética (Q_e), indicando una alteración en la formación del gradiente protónico en la membrana tilacoidal y en la fijación

Resultados

Tabla 9. Contenido de prolina en parte aérea y raíz de plántulas de girasol, Alhama (A) y Montenuovo (M), tratadas durante 3 días con diferentes concentraciones de NaCl. Los resultados, expresados en $\mu\text{g/g}$ PF, son la media de tres experimentos independientes. Los datos correspondientes al contenido total, parte aérea y raíz constituyen grupos independientes de análisis estadístico. Letras iguales dentro de cada grupo representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.

Tratamiento	Total		Parte aérea		Raíz	
	A	M	A	M	A	M
0	24.5 _e	15.1 _f	17.1 _e	9.7 _f	7.4 _d	5.4 _d
75	389.2 _c	238.3 _d	305.4 _c	178.2 _d	83.8 _b	60.1 _c
150	817.6 _a	613.7 _b	686.7 _a	535.2 _b	130.9 _a	78.5 _b

Tabla 10. Contenido de azúcares totales en parte aérea y raíz de plántulas de girasol, Alhama (A) y Montenuovo (M), tratadas durante 3 días con diferentes concentraciones de NaCl. Los datos, expresados en mg/g PF, son la media de tres experimentos independientes. Los datos correspondientes al contenido total, parte aérea y raíz constituyen grupos independientes de análisis estadístico. Letras iguales dentro de cada grupo representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.

Tratamiento	Total		Parte aérea		Raíz	
	A	M	A	M	A	M
0	9.2 _a	12.1 _{ab}	6.7 _a	8.5 _a	2.5 _b	3.6 _a
75	12.5 _b	10.2 _{ab}	10.2 _b	8.4 _a	2.3 _b	1.8 _b
150	12.3 _b	9.9 _{ab}	10.2 _b	8.0 _a	2.1 _b	1.9 _b

Resultados

Tabla 11. *Parámetros de actividad fotosintética derivada de las curvas de inducción de fluorescencia de la clorofila de cotiledones de plántulas de girasol tratadas durante tres días con 0, 75 y 150 mM de NaCl. Los datos son la media de tres experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno. Letras iguales en la misma fila representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, P = 95 %.*

Parámetros de fluorescencia	Alhama (mM NaCl)			Montenuovo (mM NaCl)		
	0	75	150	0	75	150
Fm/Fo	5.40 _a	5.20 _b	3.80 _c	5.90 _a	5.20 _b	4.20 _c
Fv/Fm	0.81 _a	0.81 _a	0.74 _b	0.83 _a	0.81 _a	0.76 _b
Rfd	3.67 _a	3.34 _a	1.95 _b	3.95 _a	3.19 _a	2.00 _b
Qe	0.45 _a	0.47 _a	0.26 _b	0.49 _a	0.43 _a	0.25 _b
Qq	0.94 _a	0.91 _a	0.86 _b	0.92 _a	0.90 _a	0.84 _b

de CO₂. Este daño en el aparato fotosintético se confirmó con la disminución del índice de vitalidad o índice de actividad fotosintética potencial (Rfd).

B.1.6. Contenido de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ en los tejidos

En la Tabla 12 se muestra el contenido de iones Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ en raíces y parte aéreas de las variedades Alhama y Montenuovo en función del tiempo y de los tratamientos con 0, 75 y 150 mM de NaCl. En ambas variedades, los tratamientos con NaCl incrementaron fuertemente el nivel de Na⁺ tanto en raíz como en parte aérea, disminuyendo los de K⁺ y Ca²⁺ sólo en la parte aérea, excepto que a los doce días este último ion disminuyó también en raíces. Comparativamente con la variedad Alhama, la variedad Montenuovo acumuló más Na⁺ en parte aérea que en raíz, a los tres días, y sobre todo, a los doce días de tratamiento. En ambas variedades, los contenidos de K⁺ y Ca²⁺ disminuyeron paralelamente por efecto del estrés salino.

Asimismo, la razón Na⁺/K⁺ fue superior en la parte aérea de Montenuovo que de Alhama, mientras que dicha razón fue mayor en raíces de Alhama (Tabla 13).

B.2. Parámetros bioquímicos

B.2.1. Enzimas de membrana translocadores de H⁺

La evaluación de la tolerancia al estrés salino en las dos variedades de girasol en estudio (Alhama y Montenuovo), ha indicado que, en estadíos tempranos de su desarrollo, la variedad Alhama presentaba una tolerancia sensiblemente mayor que Montenuovo, ya incipientemente a tiempos cortos de estrés. Avalan este hecho, un mayor crecimiento de las plántulas, una mayor

Resultados

estabilidad de las membranas y un patrón de acumulación de Na^+ basado en su compartimentación en raíces, evitando su translocación a la parte aérea.

Esta respuesta diferencial entre las dos variedades, apuntaba hacia mecanismos bioquímicos relacionados con la funcionalidad de las membranas. En este sentido, si las bombas de H^+ juegan un papel clave en la tolerancia diferencial de las plantas cultivadas al estrés salino, éstas proteínas enzimáticas deben mostrar asimismo un comportamiento diferencial en las dos variedades, en estadios en los cuales el crecimiento es todavía similar en ambas variedades en condiciones de estrés salino moderado y severo.

De acuerdo con esta hipótesis, el siguiente punto abordado en este trabajo fue el estudio comparativo, tanto a nivel de actividades enzimáticas como de contenido de proteínas antigénicas, de las H^+ -ATPasa de plasmalema y tonoplasto y H^+ -PPasa de tonoplasto, inicialmente en fracciones microsomales obtenidas a partir de raíces de plántulas de ambas variedades de girasol tratadas durante tres días con diferentes concentraciones de NaCl . Asimismo, se estudió el efecto de la salinidad sobre la fluidez de dichas membranas, con objeto de evaluar si los cambios en esta propiedad intrínseca de la membrana juegan algún papel diferencial en el mecanismo de respuesta al estrés salino.

B.2.1.1. Aislamiento y caracterización de membranas microsomales

Las Tablas 14 y 15 muestran la distribución de marcadores enzimáticos de los distintos tipos de membranas presentes en un sedimento microsomal obtenido, tras una centrifugación previa de 5,000g, de homogenados de raíces de las variedades Alhama y Montenuovo, tratadas durante tres días con 0, 75 y 150 mM de NaCl . Las fracciones microsomales presentaron fuertes actividades ATPásicas asociadas al plasmalema y, en menor medida, a mitocondrias, siendo bastante bajas las asociadas al tonoplasto. Asimismo, las actividades NADH cit c reductasa e IDPasa latente indican la presencia de una gran cantidad de membranas de RE

Tabla 12. Contenido de iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} en parte aérea y raíz de plántulas de girasol (Alhama y Montenuovo) tratadas durante tres y doce días con 0 y 150 mM de NaCl. Los datos, expresados en g/100g PS, son la media de tres experimentos independientes. El conjunto de valores correspondientes a cada ion y tiempo de tratamiento, constituyó un grupo independiente para el análisis estadístico. Letras iguales dentro de cada grupo representan valores homogéneos según análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.

Días (mM NaCl) tejido	Na^+		K^+		Ca^{2+}	
	A	M	A	M	A	M
3 d						
0 Parte aérea	0.42 _d	0.62 _c	3.56 _a	2.10 _b	0.78 _a	0.96 _a
Raíz	0.37 _d	0.42 _d	2.32 _b	1.67 _c	0.29 _c	0.17 _c
150 Parte aérea	3.34 _b	4.94 _a	1.20 _d	1.29 _d	0.52 _b	0.53 _b
Raíz	3.06 _b	3.07 _b	2.75 _b	2.14 _{bc}	0.21 _c	0.21 _c
12 d						
0 Parte aérea	0.30 _d	0.37 _d	3.68 _a	2.87 _a	0.90 _a	1.02 _a
Raíz	0.17 _e	0.47 _d	1.58 _c	1.65 _c	0.29 _c	0.28 _c
150 Parte aérea	4.80 _c	7.90 _a	2.21 _b	1.68 _c	0.44 _b	0.43 _b
Raíz	6.82 _b	4.43 _c	1.69 _c	1.95 _{bc}	0.11 _d	0.18 _d

Resultados

Tabla 13. Razón Na^+/K^+ en parte aérea y raíz de plántulas de girasol (Alhama y Montenuovo) tratadas durante tres y doce días con 0 y 150 mM de NaCl. Los datos son media de tres experimentos independientes. Letras iguales dentro de cada grupo, formado por tiempo de tratamiento, representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.

Días	Parte aérea		Raíz	
Tratamiento	A	M	A	M
3 d				
0 mM NaCl	0.12 _d	0.29 _d	0.16 _d	0.25 _d
150 "	2.78 _b	3.82 _a	1.11 _c	1.43 _c
12 d				
0 mM NaCl	0.08 _d	0.13 _d	0.10 _d	0.28 _c
150 "	2.17 _b	4.70 _a	4.03 _a	2.27 _b

Tabla 14. Distribución de actividades enzimáticas marcadoras de membranas en el sedimento microsomal de 100,000g, obtenido de raíces de girasol de la variedad Alhama, tratadas durante 3 días con diferentes concentraciones de NaCl. Las actividades enzimáticas, determinadas en presencia de detergente, se expresaron como actividad específica (A.E.) en $\mu\text{moles h}^{-1} (\text{mg Prot})^{-1}$, y como actividad total (A. Total) en $\mu\text{moles h}^{-1} (\text{g PF})^{-1}$. Resultados entre paréntesis representan el porcentaje de la actividad total en el sedimento de 100,000g con respecto a la suma de actividades en los sedimentos de 5,000g y 100,000g. Los valores son la media de un experimento representativo de tres experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado.

Actividad enzimática	[NaCl] mM		
	0	75	150
<u>$\Delta\text{Va-ATPasa}$</u>			
A.E.	17.35	13.75	9.06
A.Total	9.09 (98)	6.23 (89)	4.82 (90)
<u>$\Delta\text{NO}_3\text{-ATPasa}$</u>			
A.E.	1.62	2.30	2.20
A.Total	0.81 (94)	1.10 (93)	1.71 (94)
<u>$\Delta\text{K-PPasa}$</u>			
A.E.	2.15	3.50	3.60
A.Total	0.70 (92)	1.02 (90)	1.20 (94)
<u>$\Delta\text{N}_3\text{-ATPasa}$</u>			
A.E.	4.35	3.70	2.90
A.Total	2.29 (91)	1.70 (85)	1.36 (77)
<u>IDPasa Lat.</u>			
A.E.	2.33	6.84	7.33
A.Total	1.20 (87)	3.10 (88)	3.50 (91)
<u>NADH cit c red.</u>			
A.E.	7.76	9.32	13.34
A.Total	4.07 (82)	4.30 (80)	6.35 (84)

Resultados

Tabla 15. Distribución de actividades enzimáticas marcadoras de membranas en el sedimento microsomal de 100,000g, obtenido a partir de raíces de girasol de la variedad Montenuovo, tratadas durante 3 días con diferentes concentraciones de NaCl. Las actividades enzimáticas, determinadas en presencia de detergente, se expresaron como la actividad específica (A.E.) en $\mu\text{moles h}^{-1} (\text{mg Prot})^{-1}$, y como actividad total (A. Total) en $\mu\text{moles h}^{-1} (\text{g PF})^{-1}$. Resultados entre paréntesis representan el porcentaje de la actividad total en el sedimento de 100,000g con respecto a la suma de actividades en los sedimentos de 5,000g y 100,000g. Los valores son la media de un experimento representativo de tres experimentos independientes con actividades ensayadas por triplicado.

Actividad enzimática	[NaCl] mM		
	0	75	150
<u>$\Delta\text{Va-ATPasa}$</u>			
A.E.	19.15	14.92	10.03
A.Total	10.31 (95)	6.63 (91)	4.21 (92)
<u>$\Delta\text{NO}_3\text{-ATPasa}$</u>			
A.E.	1.50	2.00	2.10
A.Total	0.90 (96)	1.03 (92)	1.30 (95)
<u>$\Delta\text{K-PPasa}$</u>			
A.E.	2.32	3.36	3.73
A.Total	0.85 (90)	0.94 (89)	1.05 (93)
<u>$\Delta\text{N}_3\text{-ATPasa}$</u>			
A.E.	4.15	3.50	3.02
A.Total	2.13 (87)	1.93 (86)	1.55 (80)
<u>IDPasa Lat.</u>			
A.E.	2.40	5.93	6.50
A.Total	1.30 (85)	2.95 (88)	3.63 (90)
<u>NADH cit c red.</u>			
A.E.	8.32	10.05	12.2
A.Total	3.95 (83)	4.23 (81)	6.12 (84)

y Golgi.

Una primera centrifugación suave de 5,000g permitió obtener un sobrenadante de partida conteniendo las membranas de interés, al obtener fracciones donde se recuperaba entre un 90 y 95% de los enzimas marcadores de plasmalema y tonoplasto.

En ambas variedades, los tratamientos salinos afectaron de forma similar las actividades totales y específicas de enzimas marcadores de plasmalema, Golgi y RE y, en menor medida, a las de tonoplasto. Dicho efecto no pareció deberse a un cambio en el patrón de sedimentación de las membranas, ya que los porcentajes de recuperación de los enzimas marcadores en todos los tratamientos fueron similares.

B.2.1.2. Actividades H⁺-ATPasa y H⁺-PPasa

En la Tabla 16 se muestran las actividades fosfohidrolíticas y transportadoras de H⁺ correspondientes a los enzimas H⁺-ATPasa de plasmalema y tonoplasto y H⁺-PPasa de tonoplasto, determinadas en las fracciones microsomales aisladas de raíces de plántulas de girasol, variedades Alhama y Montenuovo, tratadas durante tres días con diferentes concentraciones de NaCl. La actividad específica total fosfohidrolítica del enzima H⁺-ATPasa de plasmalema (ΔV_a -ATPasa) sufrió una fuerte reducción por el NaCl proporcional al grado de salinización del medio de cultivo, mientras que el transporte de H⁺ asociado a este enzima no experimentó aparentemente ningún cambio (VQs).

El transporte de H⁺ dependiente de ATP y PPi de origen tonoplastidial, se estimuló fuertemente por 75 mM de NaCl y, en menor proporción, por 150 mM, al tiempo que se observaba un ligero incremento de la actividad fosfohidrolítica del enzima PPasa, sin cambios aparentes en la actividad ATPasa. Es importante resaltar que el incremento del transporte de H⁺ por el tratamiento salino no se debió a cambios en la latencia de las vesículas.

Como se deduce de los resultados presentados en la Tabla 16, la salinidad

Resultados

no provocó diferencias significativas sobre las actividades enzimáticas indicadas, en función de las variedades objeto de estudio.

B.2.1.3. Cantidades relativas de proteína antigénica

La identificación y cuantificación del contenido relativo de proteína antigénica correspondiente a los enzimas H⁺-ATPasa de plasmalema y H⁺-ATPasa y H⁺-PPasa de tonoplasto, en las fracciones microsomales aisladas en función de los tratamientos salinos, se llevó a cabo mediante el uso de anticuerpos policlonales específicos (apartado IV. C.7.5.). Previamente, las proteínas de microsomas de raíces de las variedades Alhama y Montenuovo se separaron por electroforesis en SDS, en geles de gradiente de concentración de acrilamida teñidos con plata, obteniéndose perfiles proteicos cuantitativa y cualitativamente idénticos (Figura 3). Tras el análisis densitométrico no se detectaron cambios cualitativos y cuantitativos importantes en los perfiles, por efecto de los tratamientos salinos, a excepción de una banda correspondiente a un polipéptido de 39 kDa, que incrementa significativamente con los tratamientos. El estrés salino no indujo la aparición de *nuovo*, ni la desaparición de ningún polipéptido.

Después de electrotransferir los geles a membranas de nitrocelulosa, el inmunoensayo con el anticuerpo frente a la H⁺-ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis* (Figura 4), reveló una banda, de aproximadamente 100 kDa. Asimismo, el inmunoensayo con el anticuerpo frente a la subunidad de 58 kDa de la H⁺-ATPasa de tonoplasto de remolacha (Figura 5a), también puso de manifiesto una única banda de aproximadamente 56 kDa de peso molecular. Por último, el anticuerpo frente a la H⁺-PPasa de *Vigna radiata* (Figura 5b) dió reacción cruzada con una banda de aproximadamente 63 kDa. En los tres casos, existía una concordancia con el peso molecular descrito para las subunidades de unión a los sustratos correspondientes en otros orígenes vegetales.

En ensayos preliminares, no se detectó ninguna banda correspondiente a estas proteínas enzimáticas ni a ningún otro polipéptido de microsomas, cuando

Tabla 16. Actividades (ΔVa) H^+ -ATPasa, (ΔNO_3) H^+ -ATPasa y (ΔK^+) H^+ -PPasa de vesículas microsomales de raíces de plántulas de girasol, var. Alhama (A) y Montenuovo (B), tratadas durante 3 días con 0, 75 y 150 mM de NaCl. La actividad fosfohidrolásica total (medida en presencia de detergente) y basal se expresaron en $\mu\text{mol h}^{-1} (\text{mg prot})^{-1}$; la velocidad inicial de transporte de H^+ (VQs) como $\%Q \text{ min}^{-1} (\text{mg prot})^{-1}$; y la latencia en $\%$. La razón H^+/ATP , se define como el cociente entre ATP hidrolizado (basal) y H^+ transportados (VQs). Los datos son la media de tres experimentos independientes, con tres repeticiones cada uno. Letras iguales dentro de cada fila representan grupos homogéneos, según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.

Enzimas	[NaCl] mM					
	0		75		150	
	A	M	A	M	A	M
<u>ΔVa-ATPasa</u>						
A. total	17.4 _a	19.1 _a	13.8 _b	14.9 _b	9.1 _c	10.0 _c
A. basal	9.1 _a	10.5 _a	6.7 _b	7.7 _b	4.8 _c	5.1 _c
VQs	62 _a	74 _a	87 _a	77 _a	90 _a	85 _a
H^+/ATP	6.8 _a	7.0 _a	13.0 _b	10.0 _b	18.8 _c	16.7 _c
Latencia	48 _a	45 _a	51 _a	48 _a	47 _a	49 _a
<u>ΔNO_3-ATPasa</u>						
A. total	1.6 _a	1.4 _a	2.3 _a	2.0 _a	2.2 _a	2.1 _a
A. basal	1.2 _a	1.0 _a	1.7 _a	1.5 _a	1.5 _a	1.4 _a
VQs	120 _c	95 _c	238 _a	198 _a	170 _b	165 _b
H^+/ATP	100 _b	95 _b	140 _a	132 _a	113 _b	118 _b
Latencia	25 _a	28 _a	26 _a	25 _a	32 _a	33 _a
<u>ΔK^+-PPasa</u>						
A. total	2.2 _b	2.3 _b	3.5 _a	3.3 _a	3.6 _a	3.7 _a
A. basal	1.6 _b	1.7 _b	2.8 _a	2.6 _a	3.0 _a	2.9 _a
VQs	15 _b	10 _b	159 _a	141 _a	140 _a	120 _a
H^+/ATP	9.4 _c	6.0 _c	56.8 _a	54.2 _a	46.7 _b	41.4 _b
Latencia	27 _a	26 _a	20 _a	21 _a	17 _a	22 _a

Resultados

las membranas de nitrocelulosa se inmunoensayaron con los respectivos sueros preinmunes.

El análisis densitométrico de las distintas bandas en las membranas de nitrocelulosa reveló que las cantidades relativas de proteína antigénica correspondiente a cada polipéptido eran bastante similares en ambas variedades, no observándose cambios aparentes en dichos contenidos por efecto de los tratamientos salinos (Tabla 17).

B.2.2. Determinación del grado de fluidez de las membranas

Los tratamientos con NaCl provocaron una disminución de los valores de anisotropía de fluorescencia de la sonda DPH en microsomas aislados de raíces de plántulas de girasol de las variedades Alhama y Montenuovo, lo que indicaba una clara fluidificación de las mismas (Tabla 18).

Sin embargo, utilizando la sonda catiónica TMA-DPH, la cual se ancla a la región hidrofílica constituida por las cabezas polares de los fosfolípidos, los valores de anisotropía sólo disminuyeron en los microsomas aislados de la variedad Alhama tratada con NaCl, lo que indicaba un mayor grado de fluidez superficial de las membranas de esta variedad tratada con NaCl respecto de Montenuovo (Tabla 18).

En resumen, del análisis comparativo de la tolerancia al NaCl en las dos variedades de girasol sometidas a estudio, utilizándolas en estadíos vegetativos tempranos y con tiempos cortos de estrés, se ha podido concluir que la variedad Alhama presentaba una tolerancia al estrés salino ligeramente superior que Montenuovo. Sin embargo, el análisis de los parámetros bioquímicos considerados han demostrado que no existe correlación aparente entre dicha tolerancia y la respuesta diferencial de las bombas primarias de H⁺ ubicadas en tonoplasto y plasmalema, en dichos estadíos, al responder estos sistemas similarmente frente

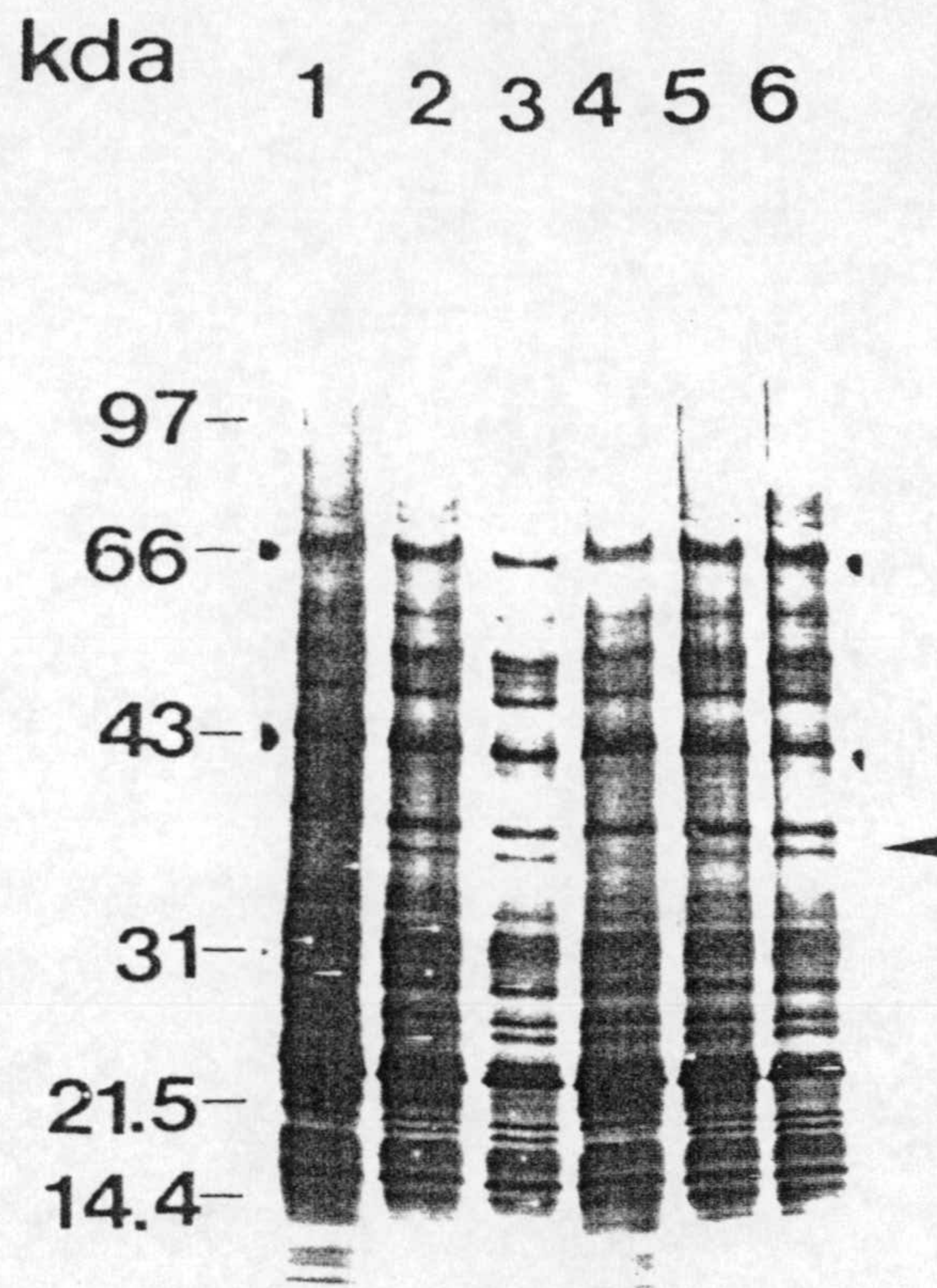
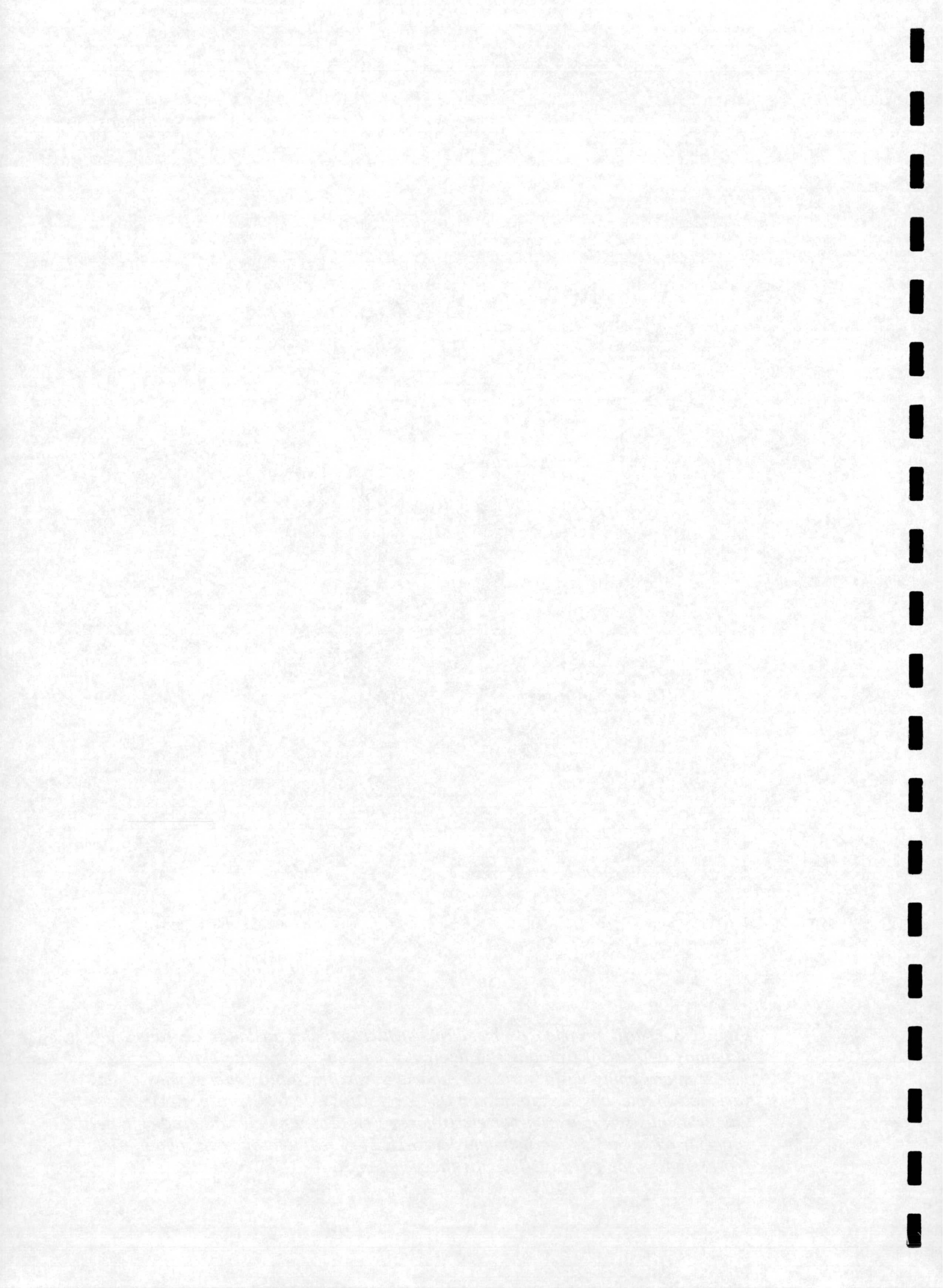


Figura 3. Perfil protéico de membranas microsomales aisladas de raices de plántulas de girasol tratadas con diferentes concentraciones de NaCl. Carriles 1,2,3: microsomas de la variedad Alhama y carriles 4,5,6: microsomas de la variedad Montenuovo, tratadas con 0, 75 y 150 mM de NaCl, respectivamente. Las proteínas se separaron por electroforesis en SDS, en geles de gradiente de concentración de poliacrilamida del 6-15%, y se tiñeron con plata. Gel representativo de dos experimentos independientes.



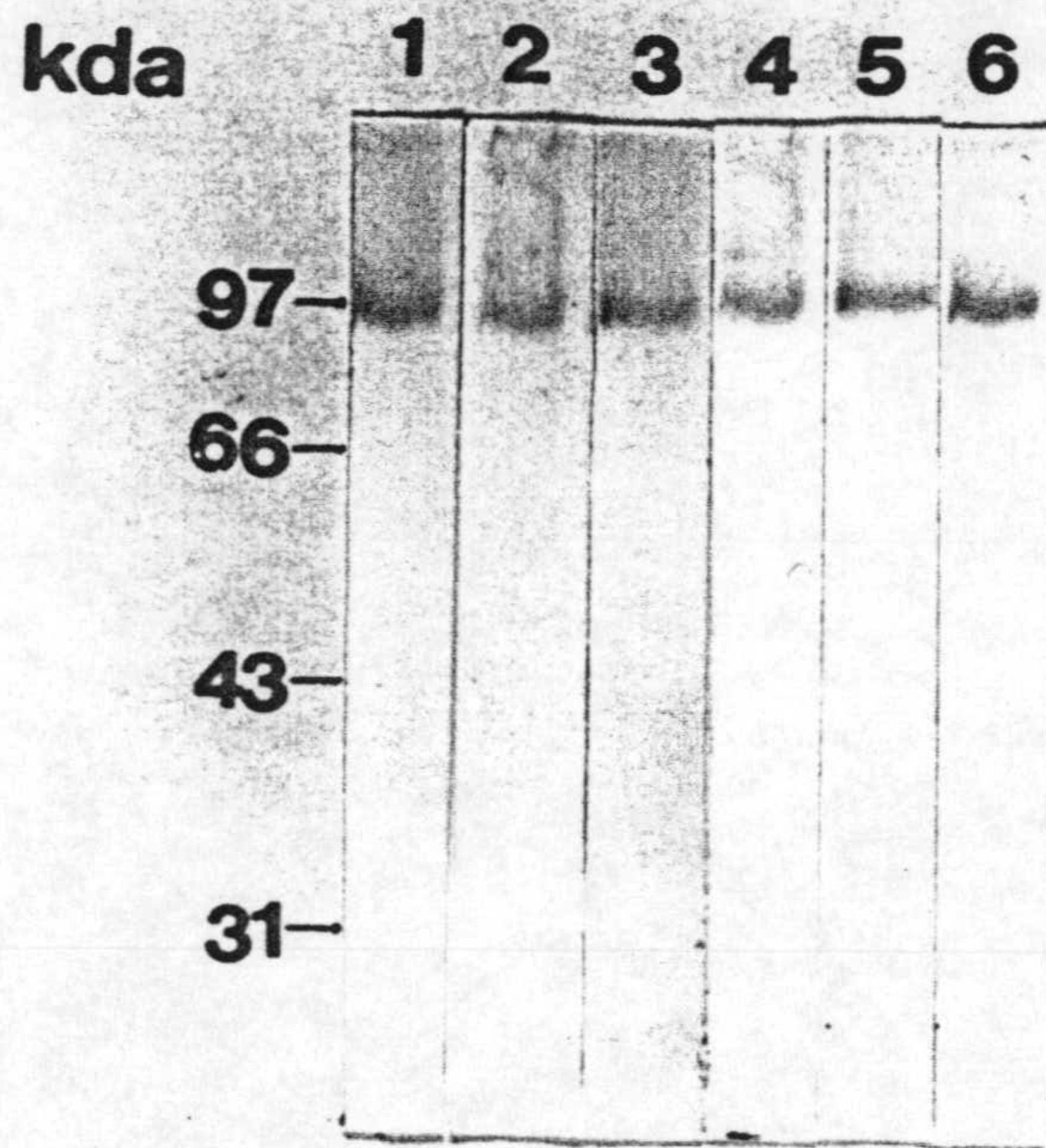
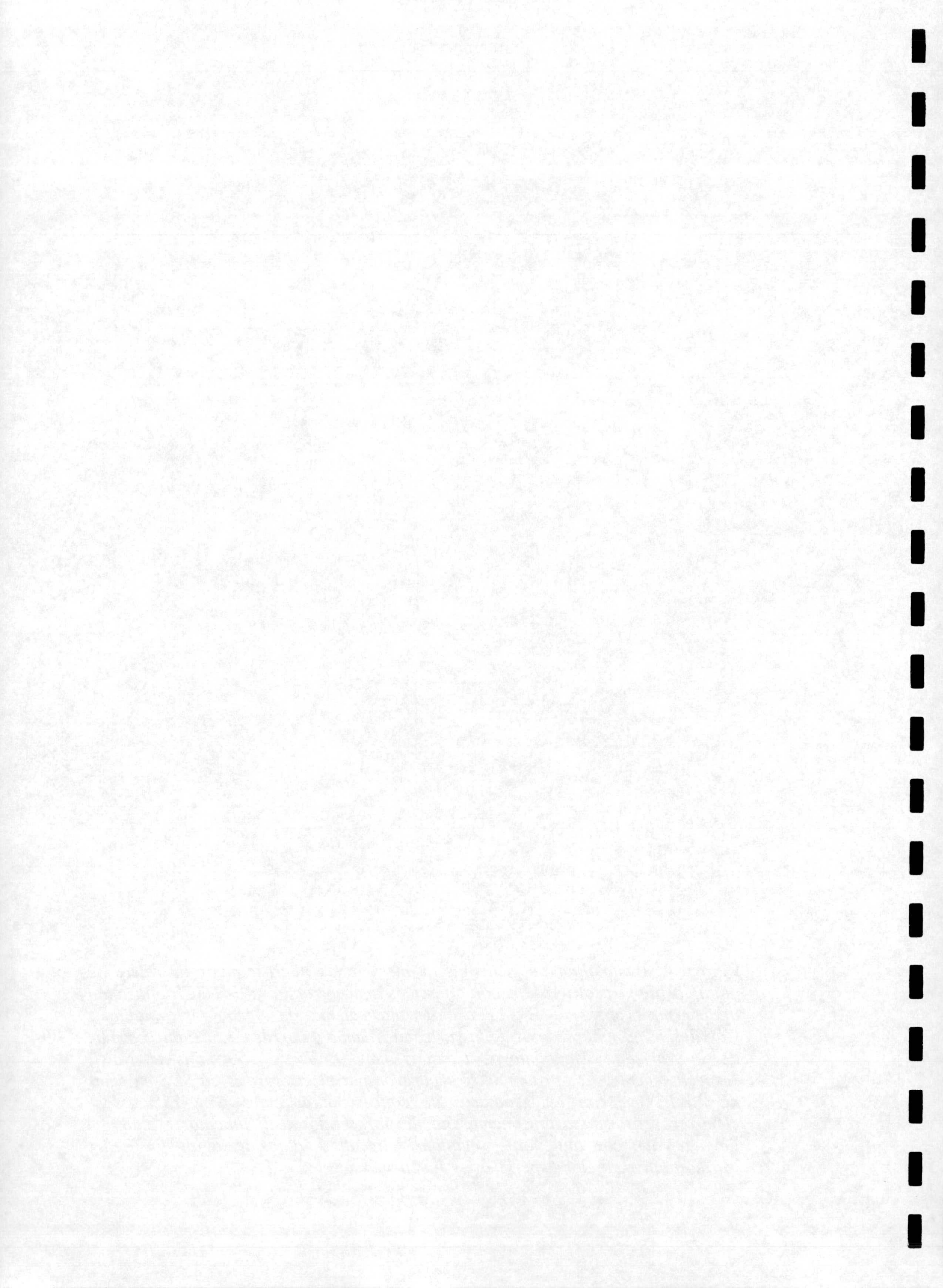


Figura 4. *Inmunoblot de proteínas de membranas microsomales de raíces de plántulas de girasol tratadas con diferentes concentraciones de NaCl, utilizando anticuerpos contra la H⁺-ATPasa de plasmalema de Arabidopsis thaliana. Carriles 1,2,3: microsomas de la variedad Alhama y carriles 4,5,6: microsomas de la variedad Montenuovo, tratadas con 0, 75 y 150 mM de NaCl, respectivamente. Las proteínas se separaron por electroforesis en SDS en geles de 15x16 cm con un gradiente de concentración entre 6 y 15%, y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. El inmunorrevelado se llevó a cabo con anticuerpo secundario ligado a la fosfatasa alcalina. Blot representativo de dos experimentos independientes.*



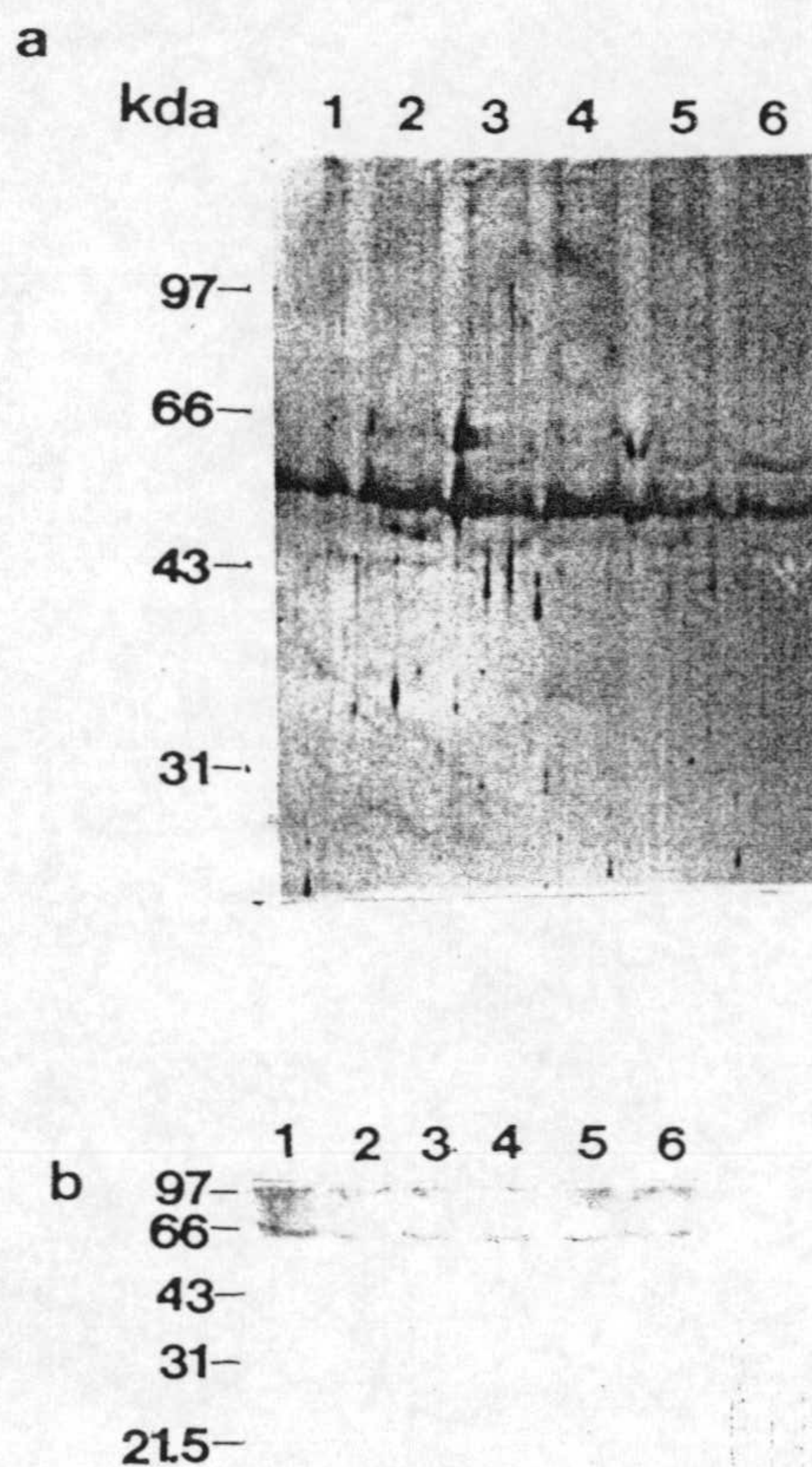


Figura 5. *Inmunoblot de proteínas de membranas microsomales de raíces de plántulas de girasol tratadas con diferentes concentraciones de NaCl, utilizando anticuerpos contra la subunidad de 58 kDa de la H⁺-ATPasa de tonoplasto de remolacha (a) y contra la H⁺-PPasa de *Vigna radiata* (b). Carriles 1,2,3: microsomas de la variedad Alhama y carriles 4,5,6: microsomas de la variedad Montenuovo, tratadas con 0, 75 y 150 mM de NaCl, respectivamente. Las proteínas se separaron por electroforesis en SDS en geles de 15x16 cm con un gradiente de concentración de entre 6 y 15% de poliacrilamida (a), o en geles de 5x7 cm con un 12% de poliacrilamida (b), y se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa. El inmunorrevelado se llevó a cabo con anticuerpo secundario ligado a la fosfatasa alcalina. Blots representativos de dos experimentos independientes.*

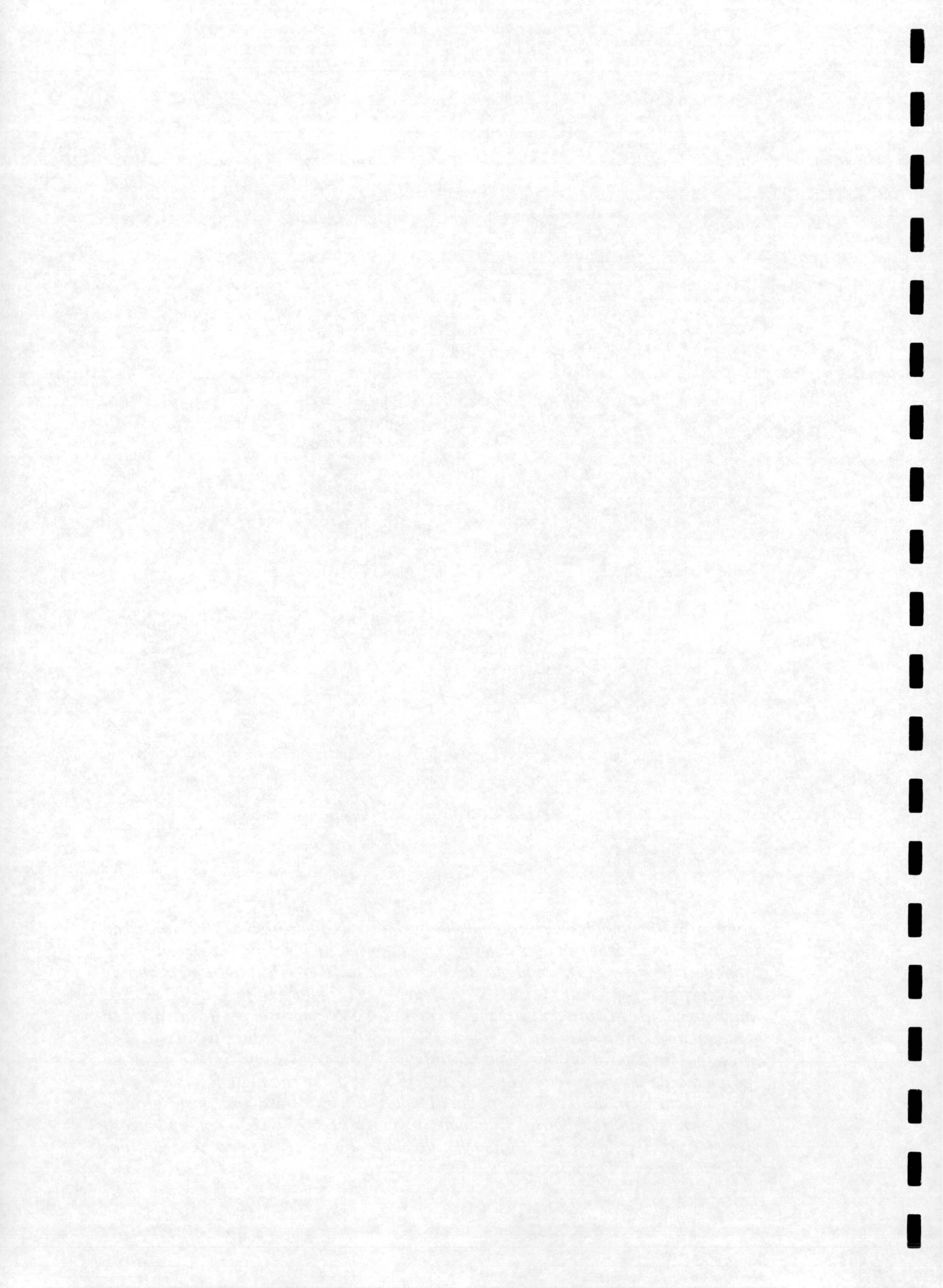


Tabla 17. Análisis densitométrico de las distintas bandas inmunorreveladas con anticuerpos específicos contra la ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis thaliana* (100 kDa), la subunidad de 58 kDa de la ATPasa de tonoplasto de remolacha (56 kDa), y la PPasa de *Vigna radiata* (63 kDa), en Western-blots de membranas de raíces de la variedad Alhama y Montenuovo tratadas durante tres días con 0, 75 y 150 mM de NaCl. Los resultados, expresados en unidades arbitrarias (\pm DE), son la media de dos blots, con dos lecturas cada una.

Polipéptido	(mM) NaCl			
	Variedad	0	75	150
<hr/>				
100 kDa				
Alhama		10,513 \pm 1,509	11,320 \pm 1,630	9,925 \pm 1,335
Montenuovo		11,304 \pm 1,730	12,010 \pm 1,800	10,125 \pm 1,250
<hr/>				
63 kDa				
Alhama		5,007 \pm 950	4,726 \pm 725	5,474 \pm 925
Montenuovo		4,215 \pm 605	3,985 \pm 463	4,650 \pm 720
<hr/>				
56 kDa				
Alhama		13,663 \pm 2,075	14,500 \pm 2,500	12,604 \pm 1,800
Montenuovo		14,307 \pm 2,230	13,200 \pm 2,100	13,950 \pm 1,700

Resultados

Tabla 18. Anisotropía de fluorescencia de las sondas DPH y TMA-DPH incorporadas a vesículas microsomales aisladas de raíces de plántulas de Alhama y Montenuovo tratadas durante 3 días con varias concentraciones de NaCl. Los resultados son la media (\pm DE) de 3 experimentos con tres repeticiones cada uno. El análisis estadístico se realizó independientemente para cada sonda fluorescente. Letras iguales dentro de cada grupo representan valores iguales según el análisis multifactorial de Duncan, $p = 95\%$.

Tratamiento	Alhama	Montenuovo
<hr/> Sonda DPH <hr/>		
0 mM NaCl	0.1572 \pm 0.001 _a	0.1565 \pm 0.001 _a
75 "	0.1465 \pm 0.002 _b	0.1454 \pm 0.001 _b
150 "	0.1439 \pm 0.003 _b	0.1452 \pm 0.002 _b
<hr/> Sonda TMA-DPH <hr/>		
0 mM NaCl	0.1949 \pm 0.002 _a	0.1712 \pm 0.001 _c
75 "	0.1797 \pm 0.001 _b	0.1709 \pm 0.001 _c
150 "	0.1780 \pm 0.002 _b	0.1707 \pm 0.001 _c

el estrés en ambas variedades.

Por tanto, el siguiente paso de este trabajo consistió en profundizar en el papel que juegan los sistemas de transporte de H^+ en los mecanismos adaptativos del girasol y su regulación por NaCl, utilizando fracciones purificadas de membranas enriquecidas en plasmalema y tonoplasto de la variedad Alhama (más tolerante), cultivada bajo concentraciones salinas moderadas (que apenas afectaban) y severas (que inhibían fuertemente) el crecimiento de la planta.

C. EFECTO DEL NaCl A NIVEL DE PLASMALEMA Y TONOPLASTO EN LA VARIEDAD ALHAMA

C.1. Aislamiento de membranas

Cuando se trata de la actividad fosfohidrolasa, la determinación y caracterización de cada tipo de ATPasa en una muestra compleja de membranas, como los microsomas, resulta fiable en base a la cuantificación del componente de la actividad sensible a inhibidores específicos. Sin embargo, la determinación de la actividad transportadora de H^+ asociada a estas enzimas, puede ser anormalmente estimada debido a posibles acciones contrapuestas de dichos inhibidores. Así, en la preparación de microsomas, podría superponerse el efecto inhibitor del nitrato sobre el transporte de H^+ en el tonoplasto, y el estimulador sobre dicho transporte en plasmalema, en base a su efecto disipador del gradiente eléctrico establecido en dichas vesículas (Sze 1985, Gianini y col. 1987).

Por tanto, para profundizar en el estudio del papel que juegan los enzimas translocadores de H^+ de plasmalema y tonoplasto en el mecanismo de adaptación del girasol (variedad Alhama) al estrés salino, fue necesario el aislamiento previo de fracciones enriquecidas en estas membranas y su caracterización posterior en función de los tratamientos.

Resultados

C.1.1. Gradiente continuo de sacarosa

Para la separación del plasmalema y tonoplasto se ha utilizado inicialmente un gradiente continuo de sacarosa, con objeto de determinar las densidades aparentes de flotación de los diversos componentes celulares, y para comprobar si el efecto *in vivo* del NaCl sobre los diferentes enzimas marcadores, ensayados en microsomas, se debían a un cambio en el patrón de sedimentación de las membranas.

Los sedimentos microsomales de 5,000-100,000g de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con 0 y 150 mM de NaCl, las cuales contenían la mayor parte de las membranas subcelulares (V. B.2.1.1), se fraccionaron en un gradiente continuo de sacarosa. En las Figuras 6 y 7 se muestra la distribución de diferentes enzimas marcadoras asociadas a cada fracción del gradiente. Dada la tediosidad de este tipo de experimentos, la caracterización de las membranas de raíces tratadas con 75 mM, no se llevó a cabo por este procedimiento, ya que esta concentración no alteró el crecimiento de las raíces en relación al control y, por tanto, no fue previsible un cambio en la estructura de la raíz, y por ende, en el patrón de sedimentación de sus membranas.

C.1.1.1. Análisis de enzimas marcadores

La actividad ATPasa inhibida por vanadato (ΔVa), en presencia de nitrato, azida y molibdato, se asoció a la membrana plasmática (Sze 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) y la PPasa estimulada por K^+ (ΔK^+) (Chanson 1990). 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 IDPasa estimulada por detergente

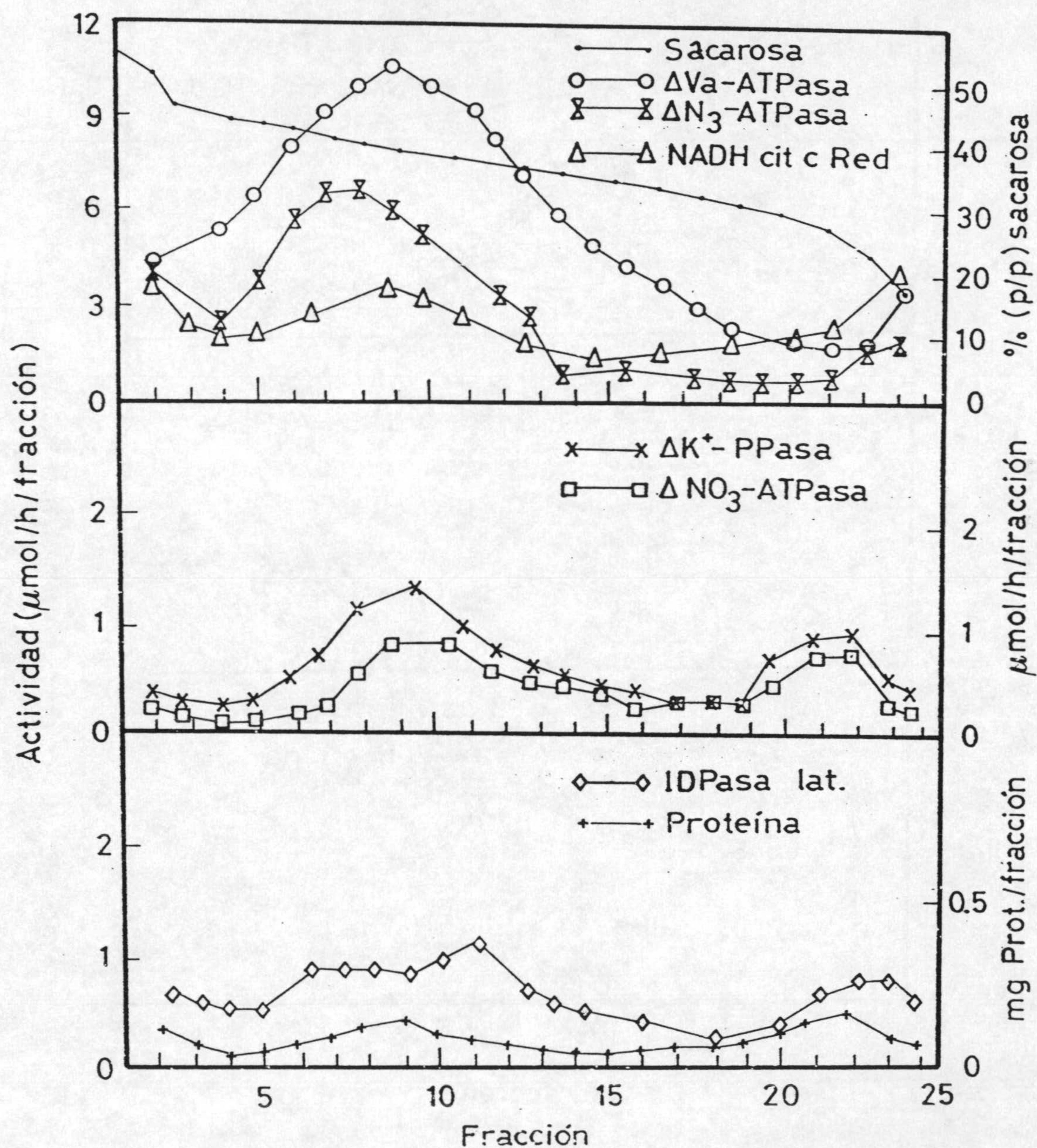


Figura 6. Distribución de enzimas marcadores en un gradiente continuo de sacarosa, a partir de un sedimento microsomal de 5,000-100,000g, obtenido de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) no tratadas con NaCl. Las actividades enzimáticas se ensayaron en presencia de detergente, excepto para la NADH cit c reductasa.

Resultados

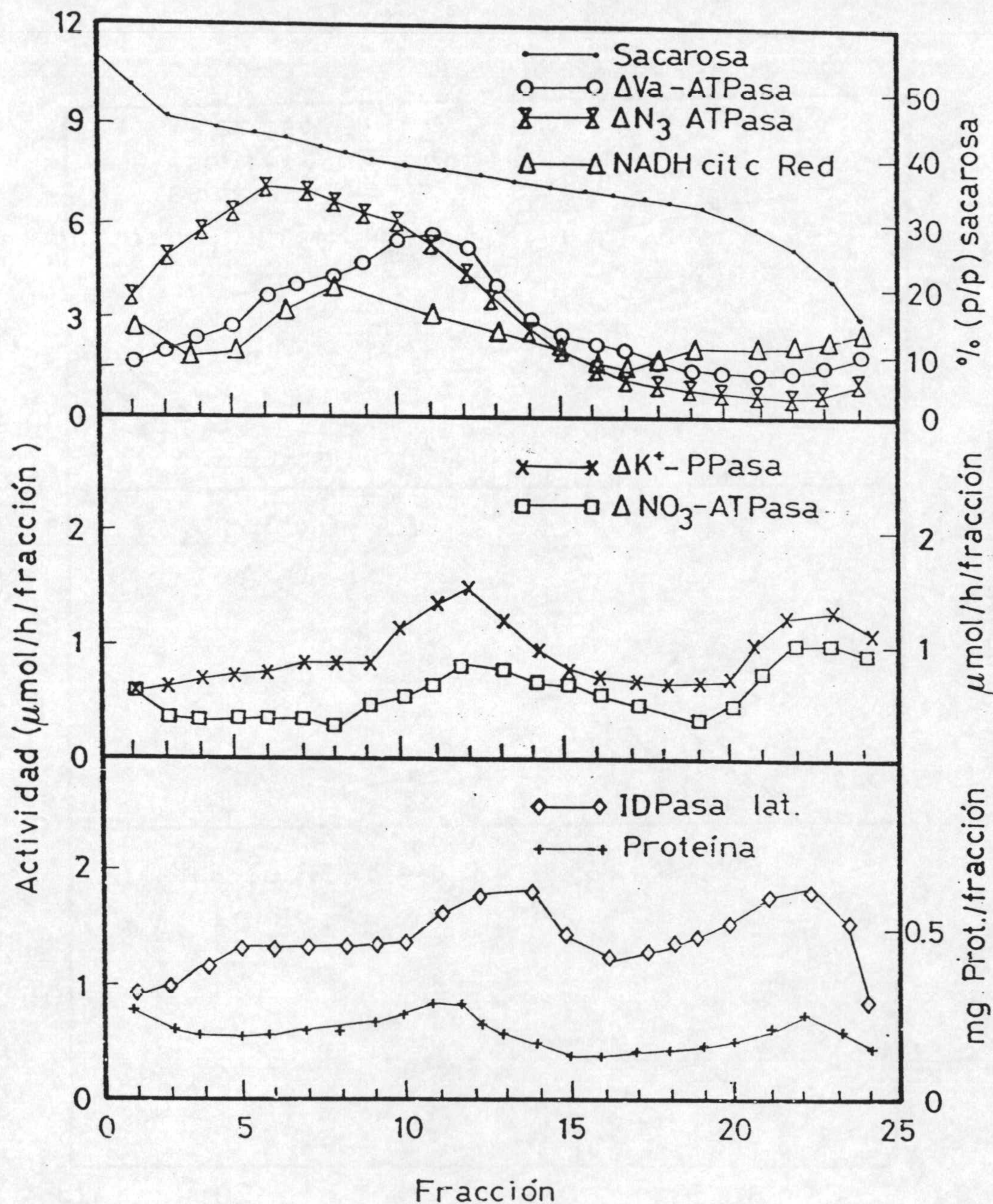


Figura 7. Distribución de enzimas marcadores en un gradiente continuo de sacarosa, a partir de un sedimento microsomal de 5,000-100,000g, obtenido de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con 150 mM de NaCl. Las actividades se ensayaron en presencia de detergente, excepto para la NADH cit c reductasa.

(latente) y la NADH cit c reductasa insensible a antimicina A, fueron marcadores de las membranas del Golgi (Green 1983) y retículo endoplásmico (Hodges y Leonard 1974), respectivamente.

La actividad ΔV_a -ATPasa se distribuyó ampliamente en el gradiente con un pico de máxima actividad entre 36-40% de sacarosa, correspondiente a una densidad de 1.15-1.17 g/ml, que está dentro del rango de densidad de equilibrio descrito para la membrana plasmática (Hall 1983).

Las actividades enzimáticas asociadas a tonoplasto, ΔNO_3 -ATPasa y ΔK^+ -PPasa, se distribuyeron en dos zonas diferenciadas del gradiente. La mayor actividad correspondió a una zona más densa, que comigra con la membrana plasmática y, la menor actividad, a una zona más ligera con picos de actividad entre 22-25% de sacarosa, que corresponde a una densidad de equilibrio entre 1.08-1.11 g/ml, y que está de acuerdo con la descrita para este tipo de membrana (Wagner 1983, Chanson 1990). El enzima marcador del Golgi, tuvo un pico de máxima actividad entre 32-36%, que corresponde a densidades típicas para esta membrana (1.12-1.15 g/ml) (Quail 1979), mostrando asimismo, un segundo pico de actividad en la zona mas ligera del gradiente. El enzima marcador de RE presentó la misma pauta, localizándose en una zona más densa, como corresponde a este tipo de vesículas, cuando el gradiente se hace en presencia de Mg^{2+} , así como en una zona más ligera, que corresponde a vesículas de RE sin ribosomas (Quail 1979).

En cuanto a la actividad ATPasa sensible a azida, marcador de mitocondrias, ésta se asoció a las regiones más densas del gradiente (> 1.17 g/ml), aunque con una importante actividad residual que alcanzó a zonas más ligeras del mismo.

Aunque el crecimiento de de las plántulas en medios de cultivo con 150 mM de NaCl, alteró las actividades de algunos de estos enzimas marcadores como es el caso de la ΔV_a -ATPasa, IDPasa latente, PPasa y NADH cit c reductasa (Figura 6 y 7), no afectó a su distribución en el gradiente. Ello indicaba

Resultados

que el estrés salino no inducía cambios en las densidades aparentes de las distintas membranas aisladas de la raíz.

C.1.2. Gradiente discontinuo de sacarosa

A partir de la información generada por la separación anteriormente descrita en el gradiente continuo de sacarosa, se optó por utilizar un gradiente discontinuo de sacarosa, para aislar rutinariamente tanto el plasmalema como el tonoplasto partiendo del mismo homogenado, bajo condiciones idénticas de aislamiento.

El gradiente estaba constituido por tres bandas del 15, 32 y 43% de sacarosa, cuyas interfases coincidían con las zonas de mayor distribución de los enzimas marcadores de tonoplasto y plasmalema en el gradiente continuo, respectivamente.

C.1.2.1. Análisis de enzimas marcadores

En la Tabla 19 se muestra la distribución de actividades enzimáticas, expresadas como actividad total por gramo de peso fresco, en las tres fracciones de membrana obtenidas tras el paso por gradiente discontinuo de sacarosa de los sobrenadantes de 5,000g derivados de homogenados de raíces tratadas con 0, 75 y 150 mM de NaCl. El sobrenadante de 5,000g se utilizó como material de partida del gradiente, en función de las bajas actividades $\Delta\text{NO}_3\text{-ATPasa}$ y $\Delta\text{K}^+\text{-PPasa}$ obtenidas. Ello minimiza el daño a las membranas y la agregación de orgánulos (Chanson y col. 1984).

Todas las actividades enzimáticas determinadas se localizaron mayoritariamente en la fracción 32/43 del gradiente, lo que corrobora los resultados previamente descritos utilizando gradiente continuo de sacarosa.

La fracción de membrana correspondiente a la interfase 15/32 contenía el 30-40% de las actividades totales $\Delta\text{NO}_3\text{-ATPasa}$ y $\Delta\text{K}^+\text{-PPasa}$, incluyendo

Tabla 19. Distribución de enzimas marcadores de diferentes fracciones de membranas obtenidas por gradiente discontinuo de sacarosa a partir de sobrenadantes de 5,000g de raíces de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con distintas concentraciones de NaCl. Los datos de actividad, expresados en $\mu\text{moles h}^{-1} (\text{g PF})^{-1}$, y de proteínas, en mg (g PF)^{-1} , son la media de 5 experimentos independientes \pm D.E. Los valores entre paréntesis representan el porcentaje de actividad de la fracción respecto a la suma de actividades de las fracciones.

Enzimas Fracción	[NaCl] mM		
	0	75	150
<u>$\Delta\text{Va-ATPasa}$</u>			
Fr 15/32	0.74 \pm 0.01 (10)	0.67 \pm 0.07 (16)	0.61 \pm 0.08 (18)
Fr 32/43	4.40 \pm 0.50 (59)	2.60 \pm 0.50 (61)	2.40 \pm 0.30 (69)
Fr sd 43	2.26 \pm 0.69 (30)	0.80 \pm 0.30 (19)	0.45 \pm 0.20 (13)
Total	7.40	4.24	3.46
<u>$\Delta\text{NO}_3\text{-ATPasa}$</u>			
Fr 15/32	0.27 \pm 0.03 (30)	0.28 \pm 0.04 (36)	0.32 \pm 0.08 (43)
Fr 32/43	0.40 \pm 0.01 (44)	0.41 \pm 0.17 (53)	0.35 \pm 0.10 (47)
Fr sd 43	0.23 \pm 0.20 (25)	0.09 \pm 0.03 (11)	0.08 \pm 0.05 (11)
Total	0.90	0.78	0.75
<u>$\Delta\text{N}_3\text{-ATPasa}$</u>			
Fr 15/32	0.03 \pm 0.05 (02)	0.07 \pm 0.01 (04)	0.13 \pm 0.04 (07)
Fr 32/43	0.29 \pm 0.10 (22)	0.84 \pm 0.20 (43)	0.92 \pm 0.36 (49)
Fr sd 43	1.00 \pm 0.10 (77)	1.05 \pm 0.20 (54)	0.84 \pm 0.04 (44)
Total	1.32	1.96	1.89
<u>$\Delta\text{K}^+\text{-PPasa}$</u>			
Fr 15/32	0.20 \pm 0.05 (34)	0.26 \pm 0.05 (35)	0.36 \pm 0.05 (38)
Fr 32/43	0.23 \pm 0.03 (39)	0.31 \pm 0.05 (42)	0.35 \pm 0.13 (37)
Fr sd 43	0.16 \pm 0.03 (28)	0.17 \pm 0.03 (23)	0.23 \pm 0.07 (24)
Total	0.59	0.74	0.94
<u>IDPasa Lat</u>			
Fr 15/32	0.18 \pm 0.10 (17)	0.79 \pm 0.30 (43)	1.42 \pm 0.20 (51)
Fr 32/43	0.56 \pm 0.20 (53)	0.81 \pm 0.30 (44)	1.05 \pm 0.10 (38)
Fr sd 43	0.32 \pm 0.10 (30)	0.25 \pm 0.07 (13)	0.31 \pm 0.03 (11)
Total	1.06	1.85	2.78
<u>NADH cit c red</u>			
Fr 15/32	0.16 \pm 0.05 (10)	0.22 \pm 0.06 (15)	0.52 \pm 0.13 (24)
Fr 32/43	0.88 \pm 0.18 (54)	0.89 \pm 0.20 (59)	1.20 \pm 0.28 (56)
Fr sd 43	0.60 \pm 0.12 (37)	0.40 \pm 0.10 (26)	0.41 \pm 0.12 (19)
Total	1.64	1.51	2.13
<u>Proteínas</u>			
Fr 15/32	0.06 \pm 0.01 (17)	0.07 \pm 0.01 (22)	0.09 \pm 0.01 (28)
Fr 32/43	0.15 \pm 0.05 (42)	0.15 \pm 0.05 (46)	0.13 \pm 0.02 (41)
Fr sd 43	0.15 \pm 0.02 (42)	0.10 \pm 0.02 (31)	0.10 \pm 0.02 (31)
Total	0.36	0.32	0.32

Resultados

asimismo una importante contaminación por otras membranas, según reflejan los niveles de actividades ΔV_a -ATPasa (10-20%), ΔN_3 -ATPasa (2-7%), NADH cit c reductasa (10-25%) y, sobre todo, IDPasa latente (20-50%).

La fracción de membrana situada en la interfase 32/43 incluía el 60-70% de la actividad total ΔV_a -ATPasa y niveles variables de actividades totales ΔNO_3 -ATPasa (40-50%), ΔN_3 -ATPasa (20-50%), NADH cit c reductasa (50-60%) e IDPasa latente (40-50%). En esta fracción, la actividad enzimática máxima, en términos absolutos, correspondió a la ΔV_a -ATPasa.

La fracción que sedimentaba en el fondo del tubo de gradiente (sd 43%), contenía la mayor parte de la actividad ATPasa mitocondrial, y una parte importante de aquellas actividades identificadas como marcadores de plasmalema y retículo endoplásmico.

En general, los tratamientos salinos indujeron algunos cambios significativos en la distribución de alguno de estos enzimas marcadores; concretamente, los enzimas ΔN_3 -ATPasa e IDPasa latente, presentaban una tendencia hacia fracciones más ligeras del gradiente.

En función de la expresión de las actividades enzimáticas como actividades específicas ($\mu\text{mol/h/mg}$ proteína), y de su comparación con la fracción microsomal resultante de sedimentar a 100,000g, el sobrenadante de 5,000g (Figura 8), pudo comprobarse que la interfase 15/32 se enriquecía en ΔNO_3 -ATPasa y ΔK^+ -PPasa, enzimas marcadores del tonoplasto, y la interfase 32/43, en ΔV_a -ATPasa, enzima marcador del plasmalema. Cuando estas fracciones eran aisladas de raíces tratadas con sal, las fracciones antes indicadas mostraban contaminaciones cruzadas por plasmalema y tonoplasto, respectivamente, por retículo endoplásmico y, sobre todo, Golgi.

En función de la concentración de NaCl en el medio de cultivo, las actividades ΔV_a -ATPasa e IDPasa latente disminuyeron fuertemente y, en alguna medida, incrementaron la actividad NADH cit c reductasa y la ΔK^+ -PPasa.

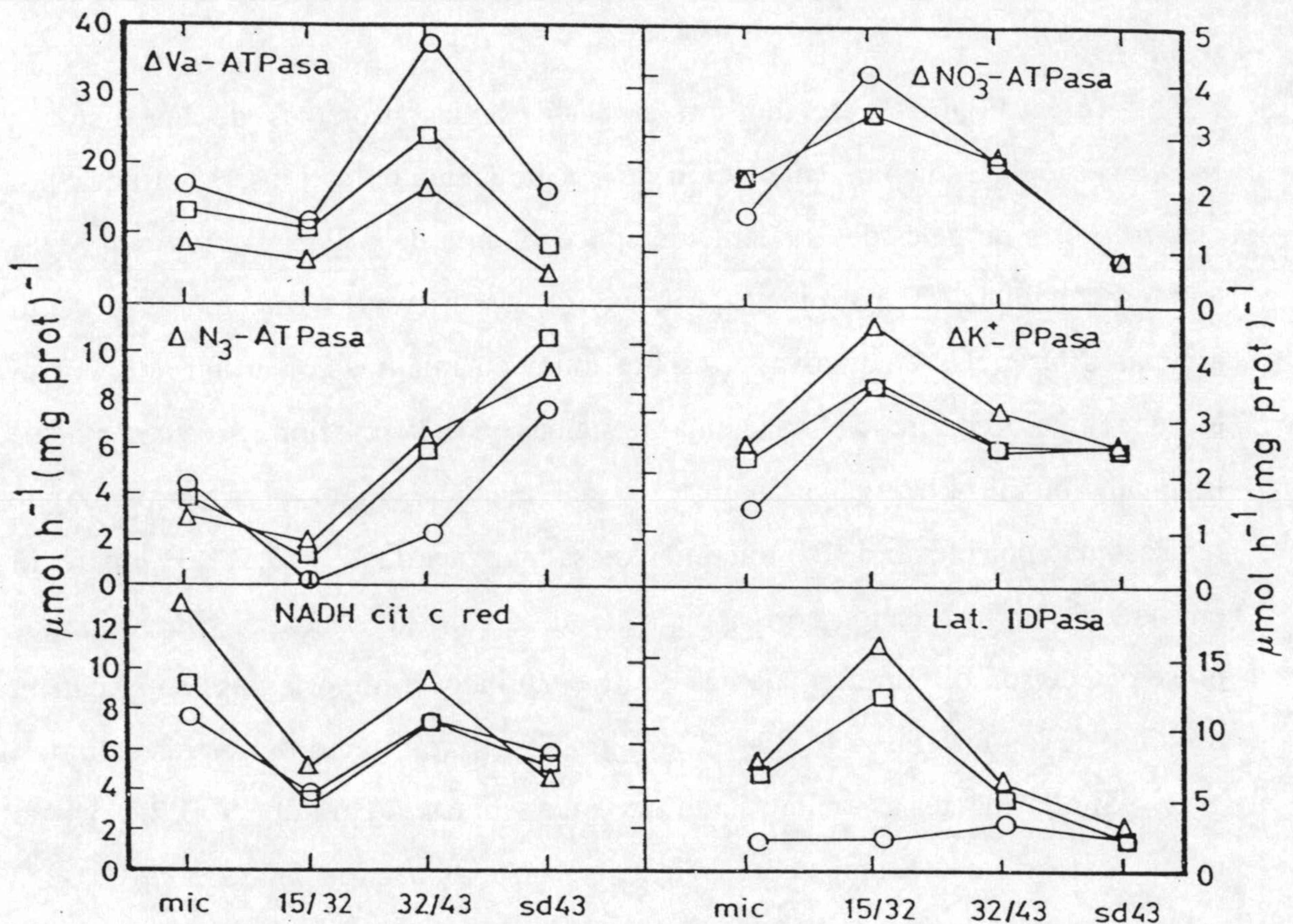


Figura 8. Actividades específicas (en presencia de detergente) de enzimas marcadores, correspondientes a la fracción microsomal y a las tres fracciones de membranas aisladas por gradiente discontinuo de sacarosa, a partir del sobrenadante de 5,000g obtenido de raíces de plántulas de la variedad Alhama tratadas durante tres días con 0, 75 y 150 mM de NaCl. Los datos son la media de 5 experimentos independientes.

Resultados

C.1.2.2. Caracterización inmunológica de las fracciones del gradiente

La identidad y grado de pureza de las preparaciones de membrana obtenidas por gradiente discontinuo en función de los tratamientos salinos, se analizaron mediante el análisis del perfil protéico y la determinación, con anticuerpos policlonales específicos, de las cantidades relativas de proteína antigénica de H⁺-ATPasa de plasmalema y, H⁺-ATPasa y H⁺-PPasa de tonoplasto.

En la Figura 9, se muestra el perfil de las proteínas de las distintas fracciones del gradiente, en función de los tratamientos salinos, separadas por electroforesis en geles de gradiente de concentración de poliacrilamida con SDS, teñidos con plata. El patrón de proteínas de las diferentes fracciones presentó algunas diferencias cualitativas y, sobre todo, cuantitativas, manifestado por el enriquecimiento diferencial de algunas proteínas en cada fracción. A este respecto, la banda de 39 kDa, cuya intensidad incrementaba en el perfil protéico de microsomas por efecto de los tratamientos salinos (apartado V.B.2.1.3), apareció enriquecida en la fracción correspondiente al sd 43% de sacarosa. Sin embargo, no se detectaron diferencias cualitativas ni cuantitativas importantes, en el patrón protéico de las interfases 15/32 y 32/43 gradiente, por efecto del estrés salino.

Similarmente a lo detectado en microsomas (apartado V.B.2.1.3), la inmunodetección con anticuerpos frente a la subunidad de 58 kDa de la H⁺-ATPasa y la subunidad de unión al sustrato de la H⁺-PPasa de tonoplasto, revelaron bandas de 56 y 63 kDa, respectivamente, en las fracciones 15/32 y 32/43 del gradiente (Figura 10). En ambos casos, el análisis densitométrico de los inmunoblots reveló que dichas bandas fueron significativamente mayores en la fracción 15/32 que en la 32/43, indicando un mayor enriquecimiento de proteínas del tonoplasto en la primera fracción (Tabla 20).

Como en microsomas, el inmunoensayo con anticuerpos policlonales frente a la H⁺-ATPasa de plasmalema, mostró una doble banda antigénica en la región de 100 kDa (Figura 11). El análisis densitométrico de estas bandas, tomadas como

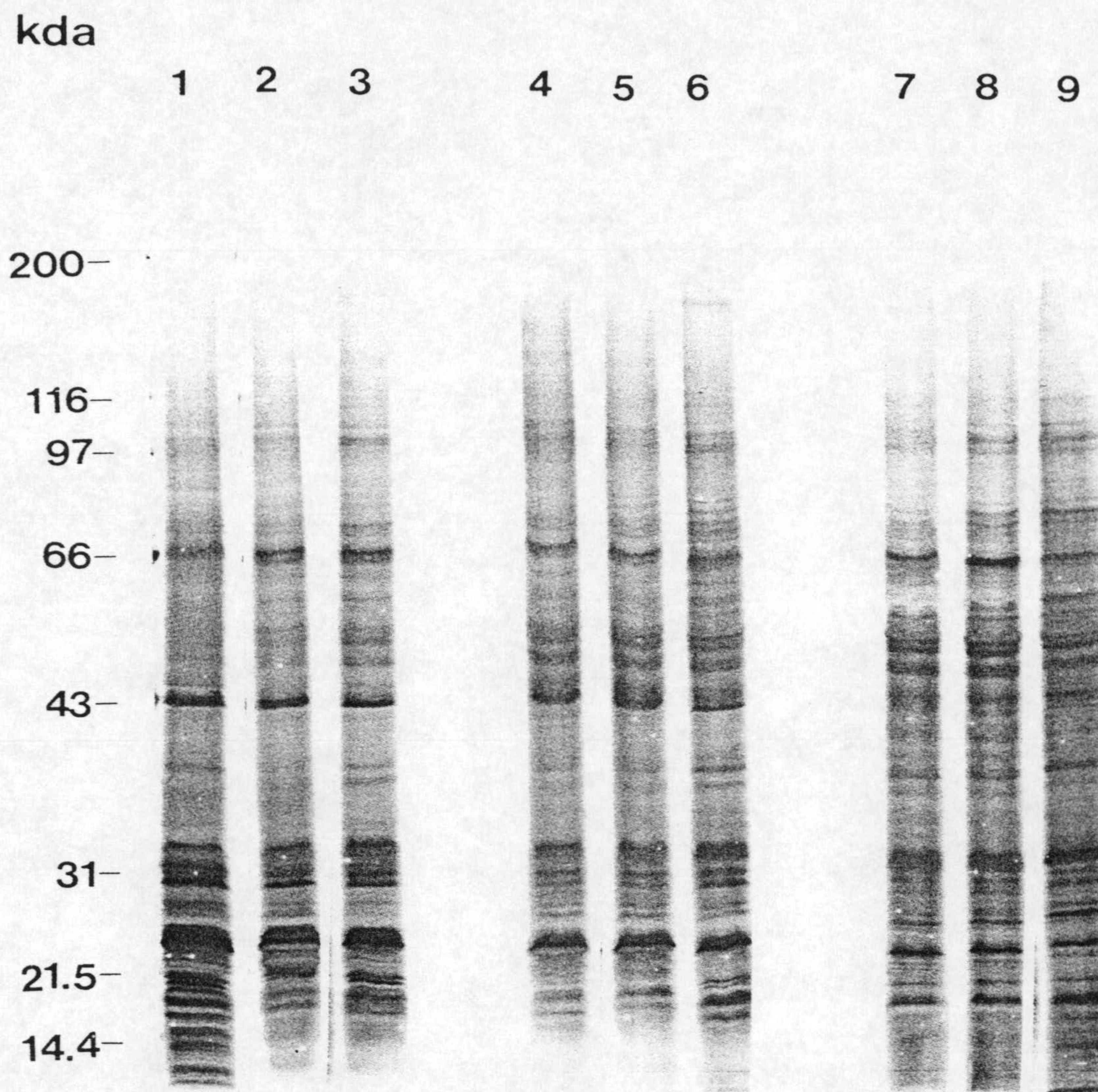
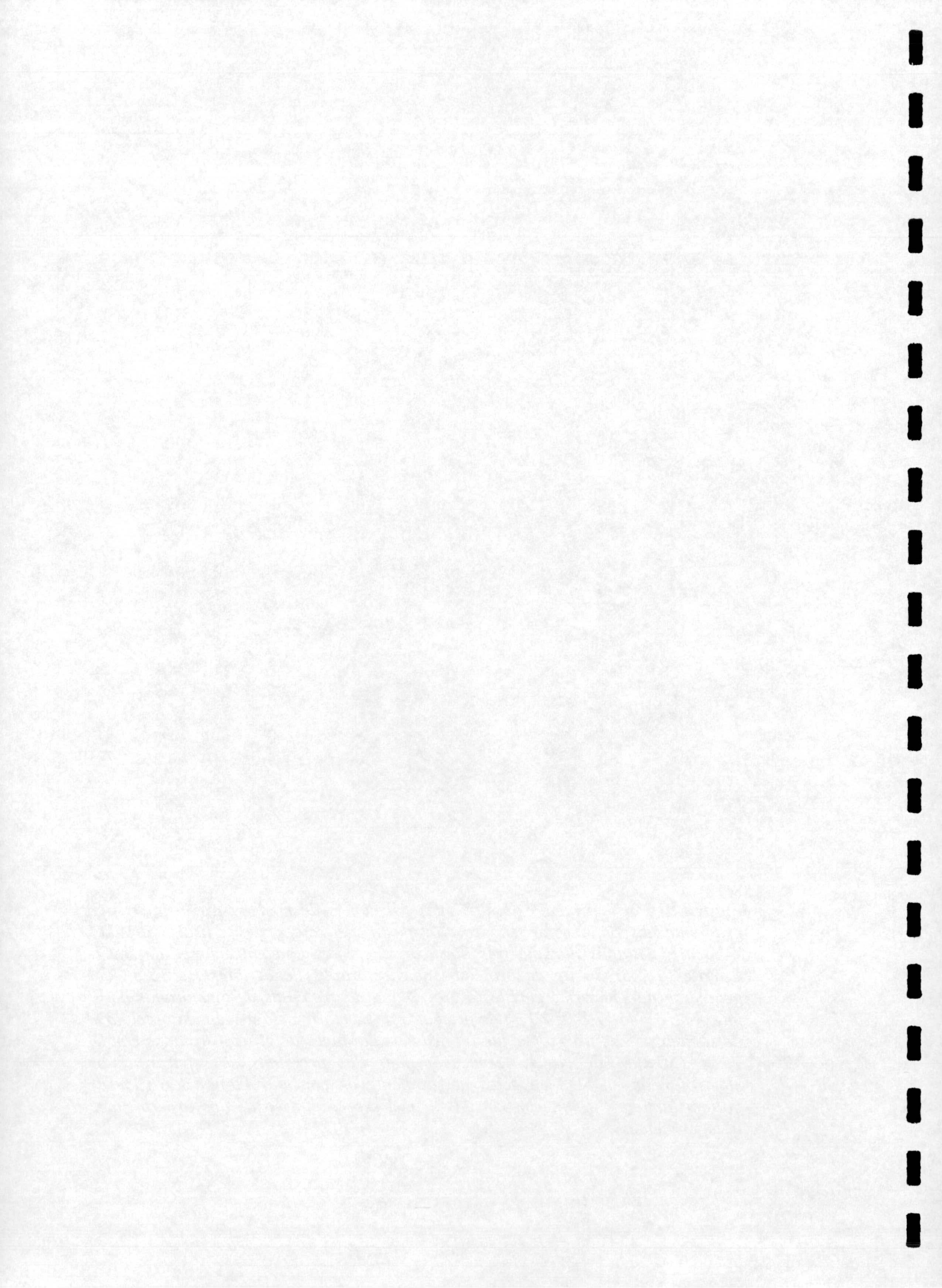


Figura 9. Perfil protéico de diferentes fracciones de membranas aisladas por gradiente discontinuo de sacarosa a partir de raices de girasol (variedad Alhama), tratadas durante tres días con diferentes concentraciones de NaCl. Carriles 1,2,3: 20 μ g de proteínas de membranas de la interfase 15/32 del gradiente de sacarosa; carriles 4,5,6: 20 μ g de proteínas de membranas de la interfase 32/43; 7,8,9: 20 μ g de proteínas de membranas del sedimento del 43% de sacarosa. Las fracciones fueron aisladas de raices de girasol tratadas con 0, 75 y 150 mM de NaCl, respectivamente. Las proteínas se separaron por electroforesis en SDS en geles de gradiente de concentración del 6-15% de poliacrilamida y se tiñeron con plata. Gel representativo de dos experimentos independientes.



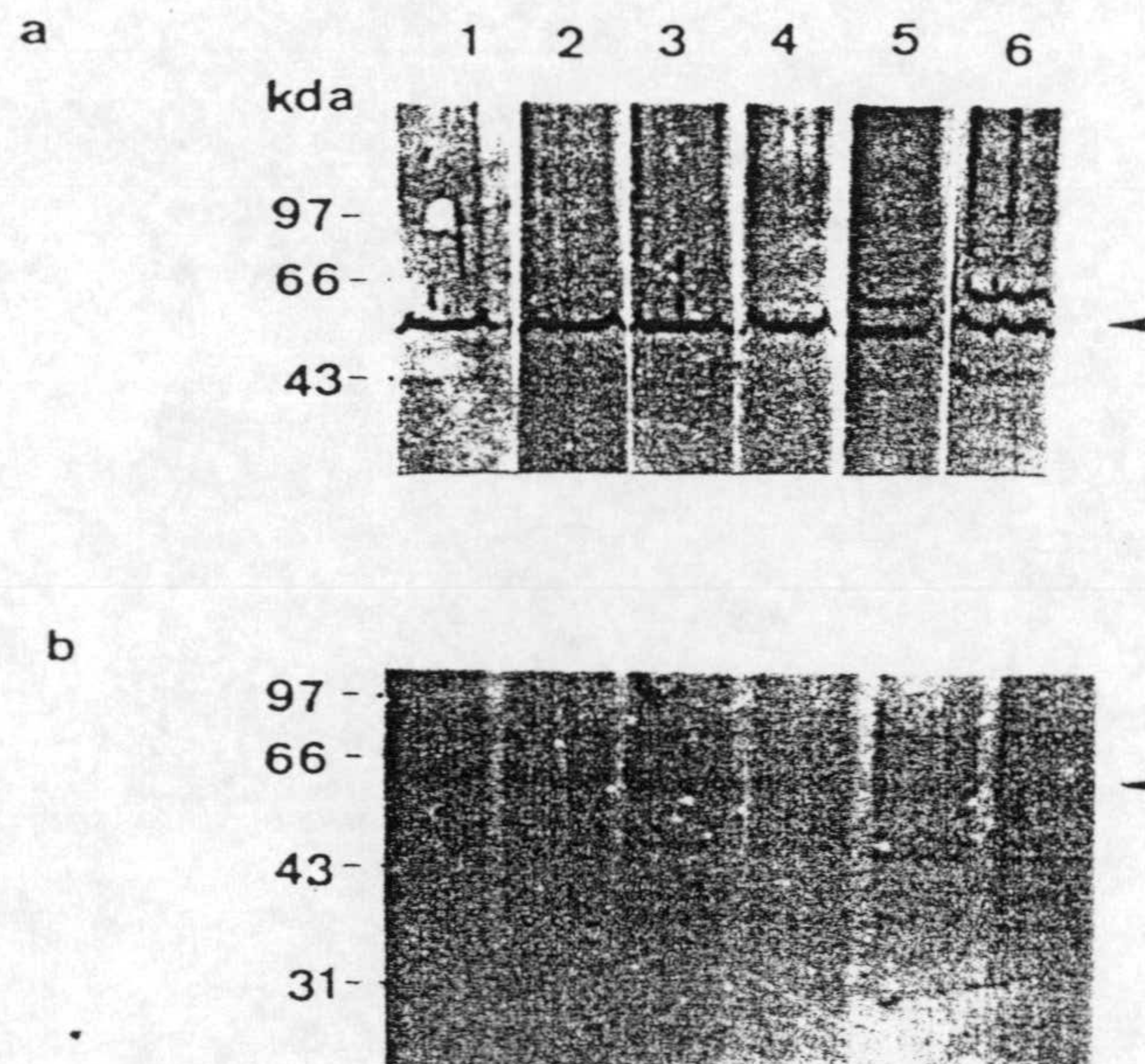
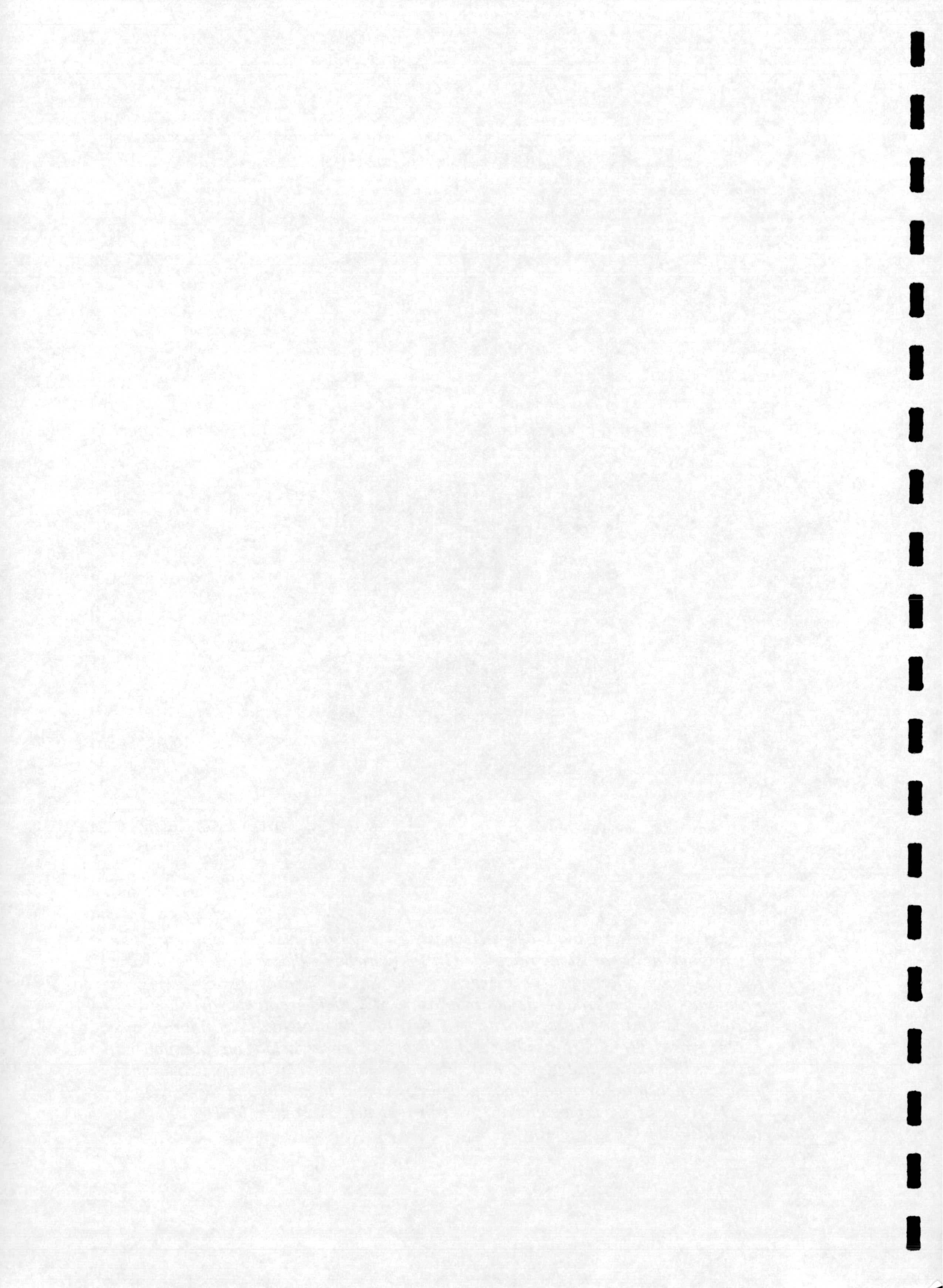


Figura 10. Western blots de fracciones de membrana aisladas por gradiente discontinuo de sacarosa de raices de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con diferentes concentraciones de NaCl. Carriles 1,2,3: 30 μ g de proteínas de membranas de la interfase 15/32 del gradiente de sacarosa, enriquecida en tonoplasto; carriles 4,5,6: 30 μ g de proteína de membranas de la interfase 32/43 del gradiente de sacarosa, enriquecida en plasmalema, aisladas de raices tratadas con 0, 75 y 150 mM de NaCl, respectivamente. Inmunodetección con anticuerpos generados contra la subunidad de 58 kDa de la H^+ -ATPasa de remolacha (a), y con anticuerpos contra la H^+ -PPasa de tonoplasto de *Vigna radiata* (b).



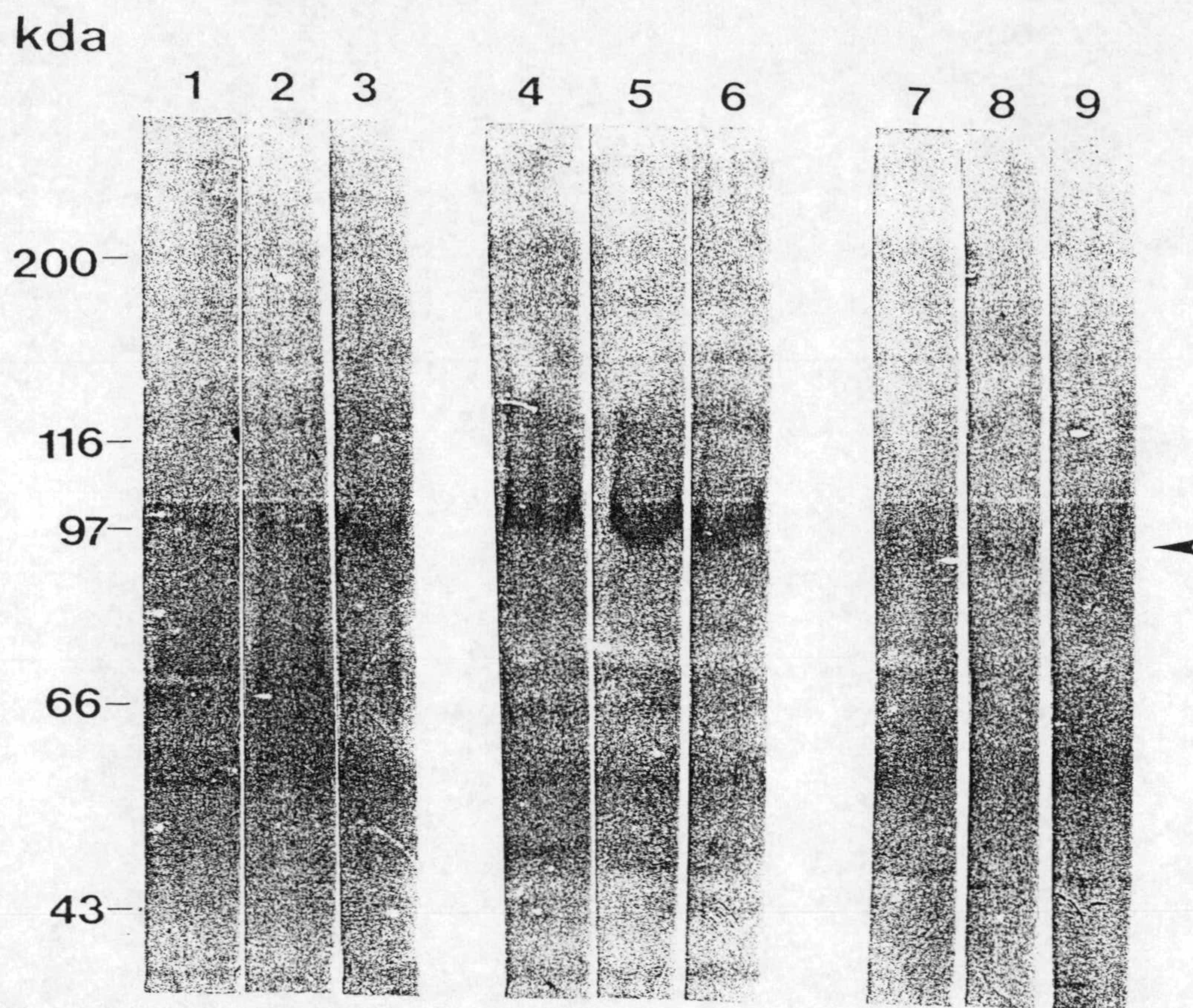


Figura 11. Western blots de fracciones de membrana aisladas por gradiente discontinuo de sacarosa de raices de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con diferentes concentraciones de NaCl. Carriles 1,2,3: 50 μ g de proteínas de membranas de la interfase 15/32, enriquecida en tonoplasto; carriles 4,5,6: 50 μ g de proteínas de membranas de la interfase 32/43 de gradiente de sacarosa, enriquecida en plasmalema; 7,8,9: 50 μ g de proteínas de membranas del sedimento del 43% de sacarosa, aisladas de raices tratadas con 0, 75 y 150 mM de NaCl, respectivamente. Inmunodetección con anticuerpos generados contra la H^+ -ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis thaliana*.

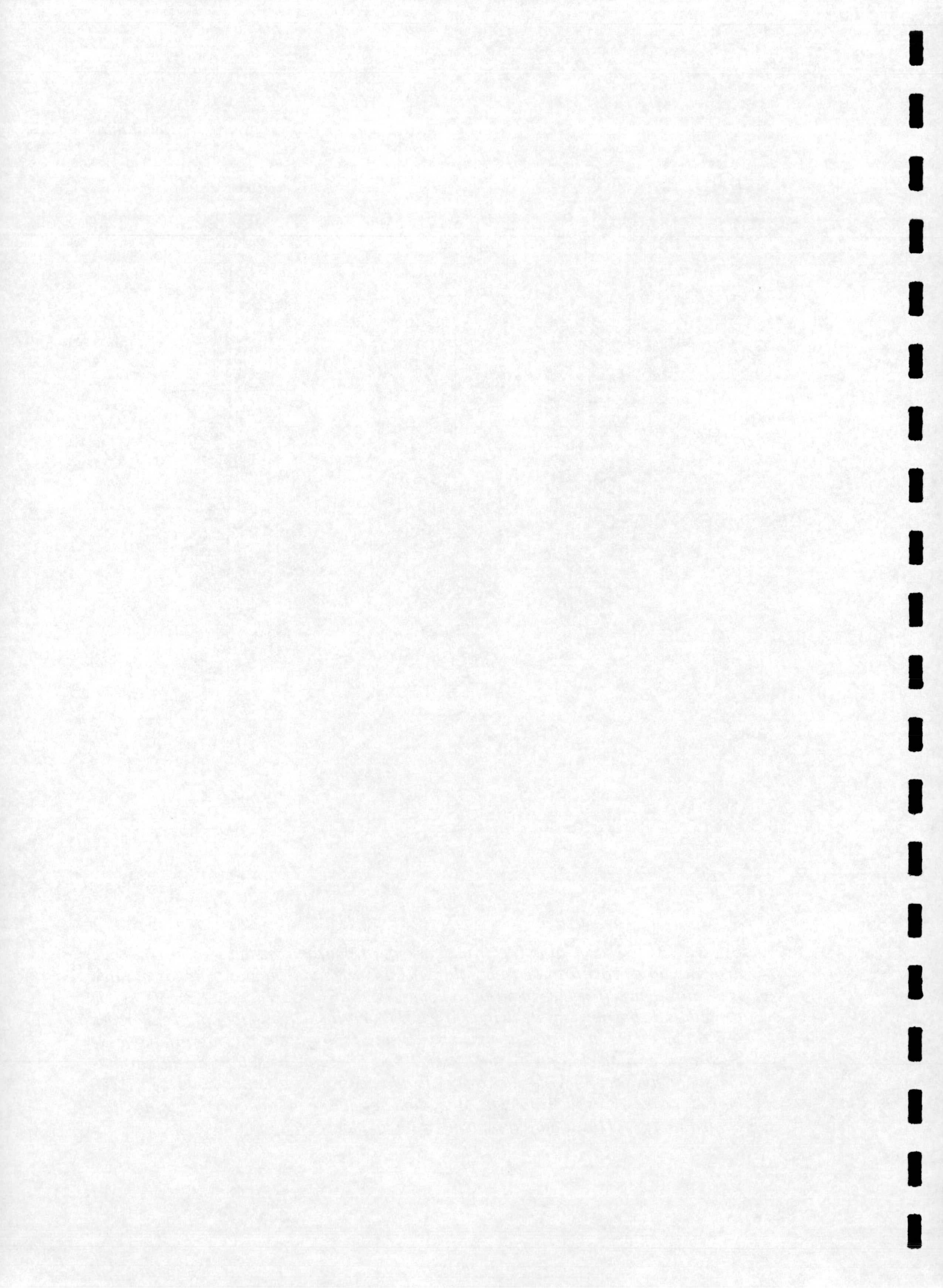


Tabla 20. Análisis densitométrico de las distintas bandas inmunorreveladas con anticuerpos específicos contra la H^+ -ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis thaliana* (100 kDa), la subunidad de 58 kDa de la ATPasa de tonoplasto de remolacha (56 kDa) y la PPasa de *Vigna radiata* (63 kDa) en western blots, de fracciones de membranas obtenidas por gradiente discontinuo de sacarosa a partir de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama), tratadas durante tres días con 0, 75 y 150 mM de NaCl. Los resultados expresados en unidades arbitrarias (\pm DE) son la media de dos blots, con dos lecturas cada uno. N.D.: no determinado.

Polipéptido fracción gradiente	(mM) NaCl		
	0	75	150
<hr/>			
100 kDa			
15/32	1126 \pm 120	1351 \pm 220	1023 \pm 106
32/43	8089 \pm 1205	7386 \pm 1023	7696 \pm 1150
sed 43	850 \pm 107	517 \pm 86	642 \pm 92
<hr/>			
63 kDa			
15/32	11016 \pm 2409	10881 \pm 2050	11478 \pm 2125
32/43	5000 \pm 1300	7060 \pm 1405	5203 \pm 1152
sed 43	N.D.	N.D.	N.D.
<hr/>			
56 kDa			
15/32	9568 \pm 1543	9866 \pm 1228	8897 \pm 1055
32/43	6640 \pm 1316	6450 \pm 1165	6699 \pm 1327
sed 43	N.D.	N.D.	N.D.

Resultados

una única banda, reveló un fuerte enriquecimiento de esta H⁺-ATPasa en la fracción 32/43 del gradiente, indicativo de que aquella contenía fundamentalmente membrana plasmática (Tabla 20). Los tratamientos salinos no alteraron aparentemente las cantidades relativas de proteína antigénica para los tres enzimas apuntados (Figuras 10 y 11, Tabla 20).

Las fracciones 15/32 y 32/43 del gradiente discontinuo de sacarosa, enriquecidas, como se ha indicado, en plasmalema y tonoplasto, respectivamente, se utilizaron rutinariamente para la caracterización de los enzimas H⁺-ATPasa de plasmalema y H⁺-ATPasa y H⁺-PPasa de tonoplasto, tanto en plantas controles como tratadas con NaCl.

C.1.2.3. Caracterización de las fracciones del gradiente con inhibidores específicos de fosfohidrolasas

Las fracciones de membrana de las interfases 15/32 y 32/43 del gradiente discontinuo de sacarosa, se caracterizaron con respecto a sus actividades fosfohidrolásicas, mediante el uso de inhibidores específicos, y en función de los tratamientos salinos (Tabla 21).

La actividad ATPasa global correspondiente a la interfase 15/32 se inhibió por nitrato en un 40-50% (inhibidor de V-ATPasas), lo que indicaba un enriquecimiento de membranas de tonoplasto en dicha fracción. La inhibición de esta actividad ATPásica en un 60-70% por vanadato (inhibidor de P-ATPasas), también era atribuida a una contaminación por plasmalema y, en alguna medida, por RE (Figura 6 y 7, Tabla 19). La inhibición de la actividad ATPasa en un 20% por azida y oligomicina definía la contaminación por fosfohidrolasas de mitocondrias. En esta misma fracción, la actividad PPasa global no se afectó por los inhibidores apuntados, excepto una leve inhibición por oligomicina.

En la fracción 32/43, la actividad ATPasa global presentaba una fuerte inhibición por vanadato (80%), lo que unido a una leve inhibición por nitrato, azida y oligomicina, indicaba un enriquecimiento de dicha fracción en plasmalema

Tabla 21. Efecto de inhibidores de fosfohidrolasas sobre las actividades específicas globales H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa (medidas en presencia de detergente) de las fracciones de membranas separadas por gradiente discontinuo de sacarosa en las interfases 15/32 y 32/43, a partir de homogenados de raíces de girasol (variedad Alhama) tratadas con diferentes concentraciones de NaCl. Los datos, expresados en porcentaje de actividad específica respecto al control, son representativos de uno de tres experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado. N.D.: no determinado.

	ATPasa			PPasa		
	[NaCl] mM			[NaCl] mM		
	0	75	150	0	75	150
<u>Fracción 15/32</u>						
Control ($\mu\text{mol/h/mg Prot}$)	13	11	9	3.0	2.9	3.2
Na_2MoO_4 (100 μM)	75	79	78	104	105	102
KNO_3 (100 mM)	52	57	59	96	94	102
Na_2VO_4 (250 μM)	27	34	33	106	98	96
NaN_3 (2 mM)	75	81	86	95	93	95
Oligom. (10 $\mu\text{g/ml}$)	71	76	83	90	89	95
<u>Fracción 32/43</u>						
Control ($\mu\text{mol/h/mg Prot}$)	38	30	25	N.D.	N.D.	N.D.
Na_2MoO_4 (100 μM)	99	91	91			
KNO_3 (100 mM)	93	92	95			
Na_2VO_4 (250 μM)	16	19	20			
NaN_3 (2 mM)	80	85	80			
Oligom. (10 $\mu\text{g/ml}$)	78	78	74			

Resultados

con escasas contaminaciones de tonoplasto y mitocondrias. Los tratamientos salinos no afectaron sustancialmente al efecto de los inhibidores.

En función de estos hechos, los enzimas H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa, específicamente asociadas al tonoplasto, se definieron, respectivamente, como actividades sensibles a nitrato y estimuladas por K^+ , determinadas en presencia de azida y/o oligomicina, molibdato, vanadato y oligomicina (O'Neill y col. 1983, Wang y col. 1986). Similarmente, el enzima H^+ -ATPasa, específicamente asociado a plasmalema, se definió como la actividad sensible a vanadato determinada en presencia de nitrato, azida y molibdato (Sze 1985, Galtier y col. 1988).

C.2. Enzimas H^+ -ATPasa de plasmalema y H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa de tonoplasto: caracterización de la actividad fosfohidrolítica

C.2.1. Efecto del detergente

La impermeabilidad de las vesículas de membrana a los sustratos hidrofílicos hace que la accesibilidad de éstos al centro activo de enzimas dispuestos vectorialmente en la membrana, dependa de la orientación de las mismas. La determinación de la actividad específica total de un enzima en poblaciones de vesículas de orientación invertida respecto a su disposición natural, exige la definición de la proporción de actividad latente (no accesible), mediante el uso de detergentes que permeabilicen las vesículas pero que no alteren la estructura y funcionalidad de los enzimas. A este respecto, el uso del detergente Brij 58 parece adecuado para los estudios de la latencia de los enzimas translocadores de H^+ (Palmgren y col. 1990). En el presente estudio, para comprobar el efecto de este detergente, se determinaron, en función de la concentración de Brij 58, las actividades H^+ -ATPasa de plasmalema y, H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa de tonoplasto en las fracciones del gradiente enriquecidas en

Resultados

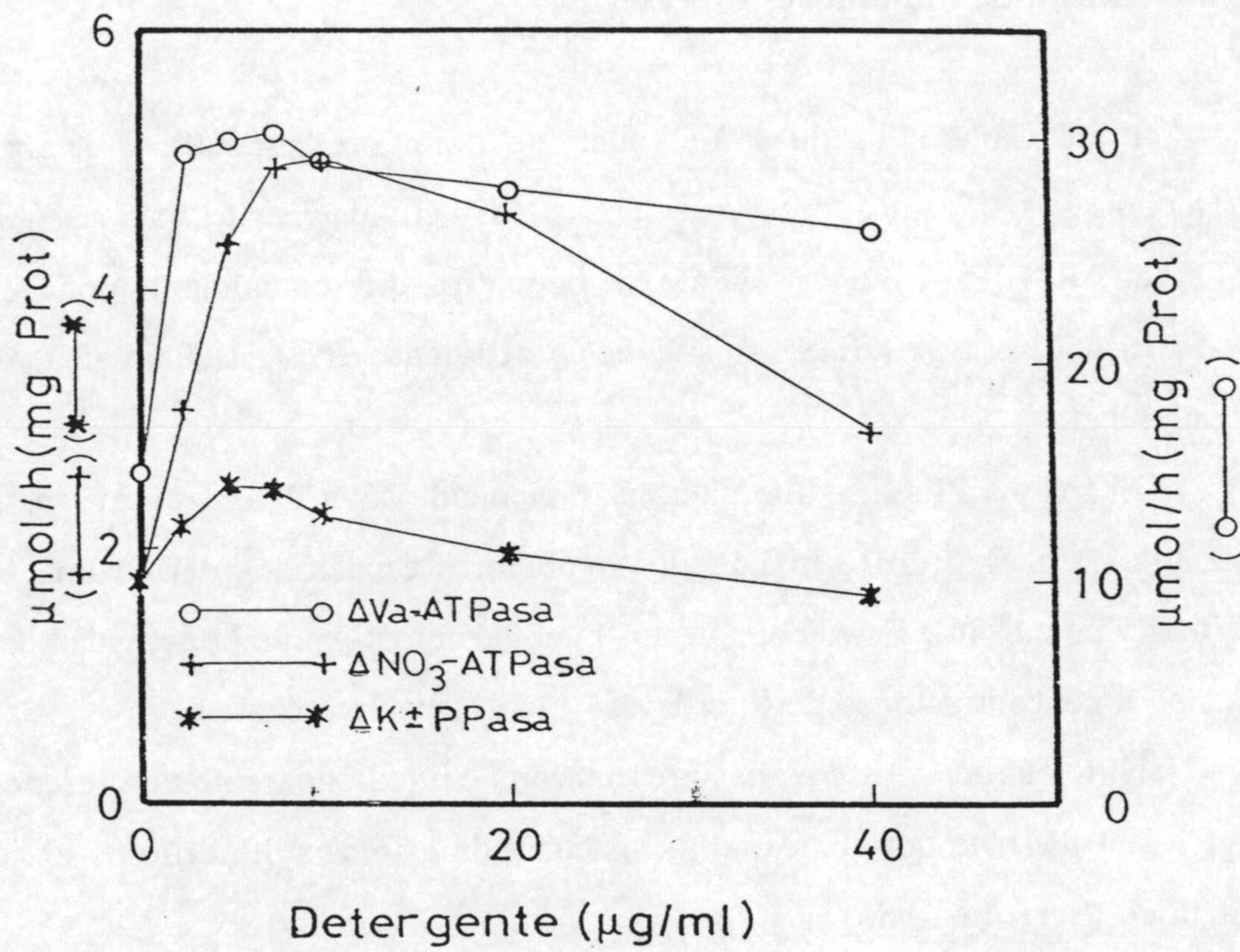


Figura 13. ^{completo} Efecto de las concentraciones de detergente Brij 58 en el medio de reacción sobre las actividades ΔVa -ATPasa de la fracción 32/43 y ΔNO_3 -ATPasa y ΔK^+ -PPasa de la fracción 15/32 del gradiente de raíces de plántulas de girasol no tratadas.

estas membranas (Figura 12). Los resultados indicaron que en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de Brij, los enzimas aludidos mostraron un máximo de actividad, obteniéndose un claro efecto inhibitor por encima de 20 $\mu\text{g/ml}$ de detergente en el medio de incubación. Por tanto, 10 $\mu\text{g/ml}$ de Brij 58, se utilizó como concentración habitual en los ensayos para determinar las actividades enzimáticas específicas totales y la latencia de las vesículas.

C.2.2. Efecto de inhibidores específicos

En la Tabla 22 se muestra el efecto de inhibidores específicos de enzimas de membranas translocadores de H^+ . Las tres actividades enzimáticas (ΔNO_3^- -ATPasa, ΔK^+ -PPasa y ΔVa -ATPasa) se inhibieron diferencialmente por DCCD, DES, Eritrosina B y DIDS, mostrando la actividad ΔNO_3^- -ATPasa una mayor sensibilidad.

El enzima PPasa se diferenció claramente de las ATPasas ensayadas en su sensibilidad al fluoruro e IMPD, dos inhibidores específicos del enzima PPasa (Wang y col. 1986). Estos compuestos inhibieron totalmente la actividad de este enzima a concentraciones de 5 mM y 64 μM , respectivamente.

Ninguno de estos enzimas presentaron actividad aparente en presencia de HgCl_2 (64 μM), lo que indicaba la existencia de grupos sulfhidrilo en el centro catalítico (Serrano 1985).

Los tratamientos salinos no condicionaron el efecto de los inhibidores ensayados sobre estos enzimas.

C.2.3. Especificidad de sustrato

La especificidad de sustrato de las actividades ΔVa -ATPasa (plasmalema) y, ΔNO_3^- -ATPasa y ΔK^+ -PPasa (tonoplasto) se muestra en la Tabla 23.

Para la actividad ΔNO_3^- -ATPasa de tonoplasto, el ATP fue el sustrato que

Tabla 22. Efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad específica total de los enzimas H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa de fracciones enriquecidas en tonoplasto y plasmalema, aisladas de raíces de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con diferentes concentraciones de NaCl. Los datos son representativos de uno de tres experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado; --: No detectado.

Inhibidor	ΔNO_3 -ATPasa			ΔK^+ -PPasa			ΔVa -ATPasa		
	[NaCl] mM								
	0	75	150	0	75	150	0	75	150
Control	3.0	2.6	2.5	2.3	2.7	3.2	34.0	16.3	11.6
($\mu\text{mol/h/mg Prot}$)									
% respecto al control									
DCCD ($64 \mu\text{M}$)	37	33	26	67	79	77	46	50	45
DES (")	60	65	53	74	80	73	73	73	68
DIDS (")	34	32	36	90	95	94	66	68	61
IMDP (")	41	44	43	--	--	--	94	90	82
HgCl ₂ (")	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Erit.B(")	9	9	10	31	23	29	22	21	10
FK (5 mM)	78	74	77	--	--	--	37	35	34

Resultados

Tabla 23. Especificidad de sustrato de los enzimas H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa de fracciones del gradiente discontinuo de sacarosa enriquecidas en tonoplasto y plasmalema obtenidas de homogenados de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con diferentes concentraciones de NaCl. Las actividades controles se ensayaron como indica el apartado IV.C.3.1.1., a 1 mM de sustrato para el enzima de tonoplasto y 3 mM para el enzima de plasmalema. Los datos, expresados como porcentaje de actividad en $\mu\text{mol/h/mg}$ respecto al control, son representativos de uno de tres experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado; ---: no detectado; N.D.:no determinado.

	ΔNO_3 -ATPasa			ΔK^+ -PPasa			ΔVa -ATPasa		
	[NaCl] mM								
	0	75	150	0	75	150	0	75	150
ATP ó PPI	2.97	2.60	2.50	4.40	4.60	5.73	36.2	19.0	15.5
% respecto al control									
ATP	100	100	100	--	--	--	100	100	100
PPI	N.D.	N.D.	N.D.	100	100	100	1	2	0
ADP	14	--	--	--	--	--	7	7	7
AMP	2	--	--	--	--	--	--	--	--
UTP	7	6	3	--	--	--	9	9	9
UDP	12	40	40	--	--	--	5	6	3
CTP	14	--	--	--	--	--	5	5	4
PNPP	4	--	--	--	--	--	1	1	2
ITP	26	14	12	--	--	--	32	29	27
IDP	19	25	73	--	--	--	5	8	23
GTP	15	19	24	--	--	--	38	37	45

efectivo. Un estrés salino severo incrementó la efectividad del UDP e IDP posiblemente debido a la contaminación por membranas Golgi, que aumentó fuertemente en dichas condiciones (Figura 7). Para la actividad ΔK^+ -PPasa únicamente fue efectivo el PPI, mientras que la ATPasa de plasmalema mostró una alta especificidad por el ATP y, en mucha menor proporción, por el GTP y ITP.

C.2.4. Efecto de los cationes divalentes

Las actividades ATPásicas de plasmalema y tonoplasto (ΔVa -ATPasa y ΔNO_3 -ATPasa) mostraron una alta dependencia por el Mg^{2+} , siendo total o parcialmente sustituido por Mn^{2+} , respectivamente (Tabla 24). El Ca^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} inhibieron totalmente la actividad de los tres enzimas; aunque en presencia de Zn^{2+} , la ΔVa -ATPasa presentó una mínima actividad.

La actividad ΔK^+ -PPasa de tonoplasto mostró una estricta dependencia por el Mg^{2+} , no presentando actividad en presencia de los cationes divalentes antes indicados.

C.2.5. Efecto de los iones monovalentes

El efecto de los iones monovalentes sobre las actividades fosfohidrolásicas de los enzimas translocadores de H^+ fue dependiente del tipo de ión utilizado (Tabla 25). En general, los aniones estimularon significativamente la actividad ΔNO_3 -ATPasa (medida como ΔNO_3 -BTP), mientras que los cationes no mostraron efecto alguno. Así, los aniones Cl^- , Br^- y SO_4^{2-} fueron igualmente estimulantes mientras que I^- y NO_2^- inhibieron parcialmente la actividad y el F^- suprimió completamente tanto, ésta como el resto de actividades enzimáticas. En general, la actividad ΔVa -ATPasa se vio afectada por los cationes, y apenas por los aniones, como se dedujo del efecto diferencial de la colina-Cl y K-IDA (anión

Resultados

Tabla 24. Efecto de los cationes divalentes sobre las actividades enzimáticas H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa de las fracciones del gradiente de sacarosa enriquecidas en tonoplasto y plasmalema, aisladas a partir de homogenados de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con diferentes concentraciones de NaCl. Los cationes divalentes se añadieron a una concentración de 1 mM para los enzimas del tonoplasto y de 3 mM para el enzima de plasmalema. Los datos, expresados como porcentajes de la actividad en μ moles/h/mg respecto a la del control, son representativos de uno de tres experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado; --: no detectado.

Cación	ΔNO_3 -ATPasa			ΔK^+ -PPasa			ΔVa -ATPasa		
	[NaCl] mM								
	0	75	150	0	75	150	0	75	150
Nada añadido	--	--	--	--	--	--	--	--	--
MgSO ₄	4.28	3.92	3.81	3.00	3.50	4.40	32.5	16.0	11.0
% respecto al control									
MnSO ₄	45	43	40	--	--	--	100	100	100
ZnSO ₄	--	--	--	--	--	--	15	7	2
SO ₄	--	--	--	--	--	--	--	--	--
CaSO ₄	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Tabla 25. Efecto de iones monovalentes sobre las actividades enzimáticas H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa de las fracciones del gradiente de sacarosa enriquecidas en tonoplasto y plasmalema, aisladas de homogenados de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con diferentes concentraciones de NaCl. Las actividades controles se expresaron según se indica en el apartado IV.C.3.1.1., excepto que en este caso se utilizó el BTP- NO_3 para determinar la actividad ΔNO_3 -ATPasa. Las sales monovalentes se añadieron a una concentración de 100 mM. Los datos, expresados como porcentajes de la actividad (μ moles/h/mg), respecto al control, son representativos de uno de tres experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado; --: no detectado.

Ión	ΔNO_3 -ATPasa			ΔK^+ -PPasa			ΔVa -ATPasa		
	[NaCl] mM								
	0	75	150	0	75	150	0	75	150
Control	3.35	2.20	3.00	0.30	0.27	0.28	29.3	12.4	9.61
% del control									
[Cationes]									
KCl	110	113	116	750	950	1105	104	106	118
NaCl	109	120	114	20	32	35	90	87	95
LiCl	105	104	107	--	--	--	88	78	92
NH_4Cl	107	105	104	500	630	750	100	95	119
Colina-Cl	105	107	110	50	50	40	83	81	92
[Aniones]									
KNO_3	--	--	--	800	1000	1200	90	90	96
KNO_2	99	100	104	640	935	1050	76	78	80
KF	--	--	--	--	--	--	--	--	--
KI	78	83	89	630	900	1000	102	105	115
K_2SO_4	111	117	113	790	1040	1200	106	107	114
KIDA	100	97	98	600	895	1020	104	104	110
KBr	110	118	116	725	975	1150	105	105	112

Resultados

orgánico). Tanto el K^+ como el NH_4^+ estimularon leve, pero significativamente la actividad, al tiempo que el Na^+ , Li^+ y la colina fueron, en este orden, menos efectivos.

La actividad PPasa fue altamente dependiente de la presencia de cationes monovalentes, ya que incrementó dramáticamente en presencia de K^+ , y en menor medida de NH_4^+ , no detectándose efecto significativo en presencia de aniones. Una concentración de 100 mM de Li^+ inhibió totalmente dicha actividad, mientras que la presencia de Na^+ o de colina no reemplazaron al K^+ . Los tratamientos salinos no modificaron el efecto de los iones monovalentes sobre las actividades enzimáticas indicadas.

C.2.5.1. Estimulación de la PPasa por K^+

La dependencia de la concentración de K^+ sobre la actividad H^+ -PPasa de tonoplasto, en función de los tratamientos salinos, se muestra en la Figura 13. La activación por K^+ exhibió una cinética de saturación de tipo michaeliano, cuyos parámetros cinéticos, K_m y V_{max} , se calcularon por análisis de regresión lineal, utilizando la representación de Hanes-Wolf (Tabla 26). Los valores de K_m (aproximadamente, 5 mM), no se afectaron por los tratamientos salinos *in vivo*, aunque el valor de V_{max} para el enzima aumentó leve, pero significativamente, en membranas de raíces tratadas con 150 mM de NaCl.

C.2.5.2. Inhibición de la ΔK^+ -PPasa por Na^+

El efecto del Na^+ *in vitro* sobre la actividad PPasa de tonoplasto se indica en la Tabla 27. La actividad se inhibió proporcionalmente a la concentración de NaCl en el medio de reacción y de forma similar en todos los tratamientos salinos. Así, una concentración de 100 mM de NaCl en el medio de ensayo inhibió alrededor de un 40% la actividad específica total, y un 80% a 200 mM.

Resultados

Tabla 26. *Parámetros cinéticos (K_M aparente para el K^+ y V_{max}) del enzima PPasa estimulada por K^+ de tonoplasto en función de la concentración de K^+ , obtenidos a partir de la cinética representada en la Figura 13. Los datos son la media de tres experimentos independientes. Letras iguales en cada columna representan grupos homogéneos según el Test de análisis de la varianza de Duncan, $p = 95\%$.*

NaCl (mM)	Ecuación de regresión	Coef. de correlación	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
0	$y=2.598+0.464x$	0.992	5.59 _a	2.15 _a
75	$y=1.414+0.272x$	0.986	5.16 _a	3.68 _a
150	$y=1.030+0.210x$	0.989	4.89 _a	4.76 _b

Tabla 27. *Efecto del NaCl en el medio de reacción sobre la actividad ΔK^+ -PPasa de membranas enriquecidas en tonoplasto aisladas de raíces de girasol tratadas durante 3 días con diferentes concentraciones de NaCl. Las actividades se ensayaron en presencia de 100 mM KNO_3 y 10 $\mu\text{g/ml}$ Brij 58. Los datos, expresados en $\mu\text{moles/h/mg}$ y en porcentaje de la actividad respecto a la del control sin NaCl añadido (en paréntesis), son representativos de uno de tres experimentos independientes con la actividades ensayadas por triplicado.*

[mM] NaCl en el medio de reacción	Tratamientos (mM NaCl)		
	0	75	150
0	2.48(100)	3.30(100)	3.70(100)
5	2.46 (99)	3.29(100)	3.63 (98)
50	2.43 (98)	2.67 (81)	3.26 (88)
100	1.59 (64)	1.91 (58)	2.33 (63)
150	0.77 (31)	1.18 (36)	1.44 (39)
200	0.40 (16)	0.63 (19)	0.85 (23)

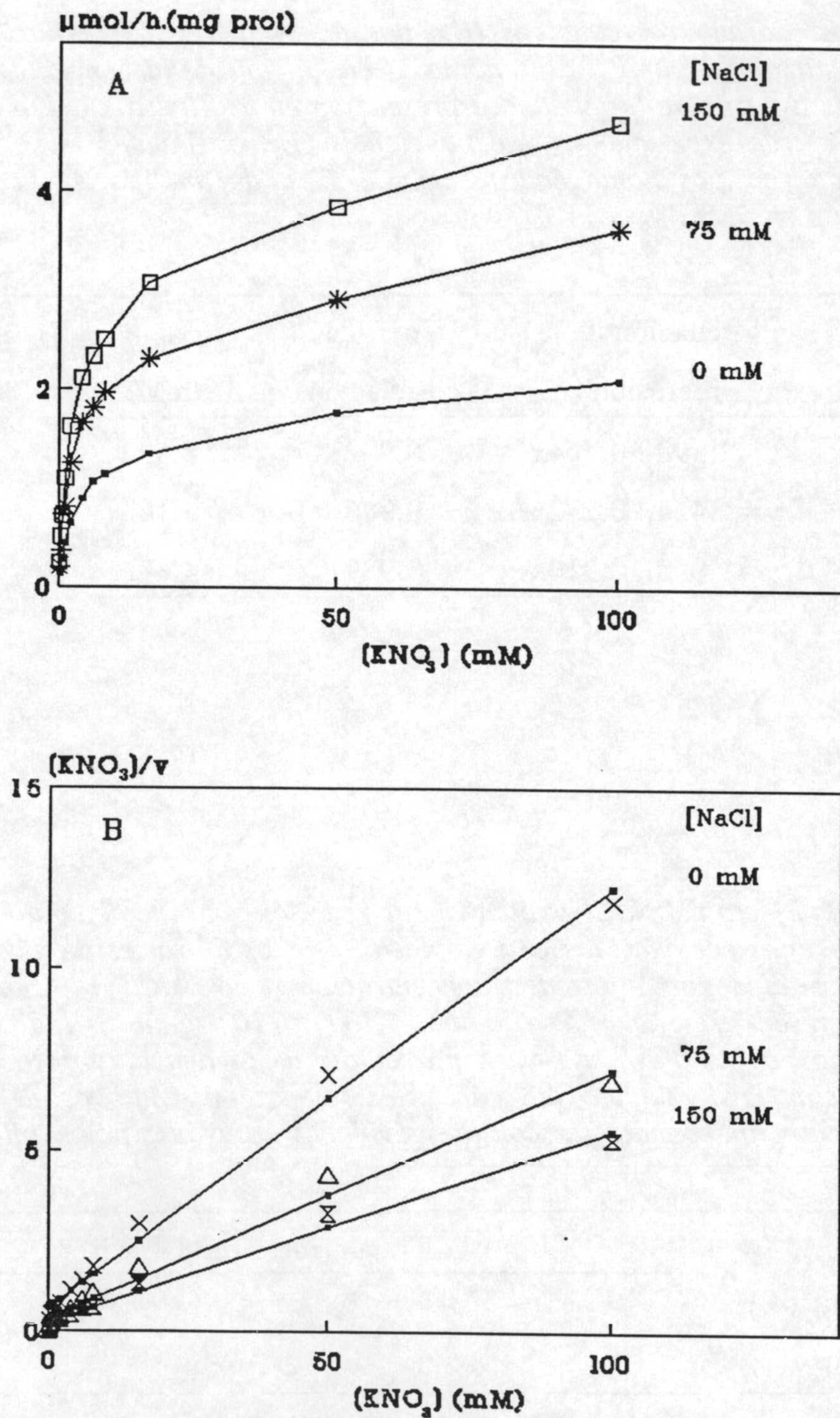


Figura 15. Cinética enzimática de la PPasa de tonoplasto estimulada por K^+ en función de la concentración de K^+ de fracciones de gradiente de sacarosa obtenidas a partir de homogenados de raíces de girasol (variedad Alhama) tratadas con 0, 75 y 150 mM de NaCl (A). Representación de Hanes-Wolf derivada de estas cinéticas cuyas rectas se ajustaron por regresión lineal (B). Los datos son representativos de 1 de 3 experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado.

C.2.6. Efecto del pH

El efecto del pH sobre las actividades específicas de los enzimas translocadores de H^+ en las fracciones de membranas enriquecidas en tonoplasto y plasmalema, se determinó tamponando los medios específicos de reacción de estos enzimas (valores de pH entre 4.5 y 11), utilizando la fracción de membranas 15/32 (actividades ΔNO_3^- -ATPasa y K^+ -PPasa) y la fracción 32/43 para las actividades ΔVa -ATPasa y ΔN_3 -ATPasa (Figura 14). Los enzimas presentaron su máxima actividad a los siguientes valores de pH:

	ΔVa -ATPasa	ΔNO_3^- -ATPasa	ΔK^+ -PPasa	ΔN_3 -ATPasa
pH	6.5	6.5-7.5	7.5-8.5	9.0-9.5

Los tratamientos salinos no modificaron la dependencia del pH del medio de reacción para las actividades enzimáticas.

C.2.7. Propiedades cinéticas

Se han determinado las características cinéticas de los enzimas ΔVa -ATPasa de la fracción de plasmalema y ΔNO_3^- -ATPasa y ΔK^+ -PPasa de la fracción de tonoplasto, obtenidas a partir de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas con 0, 75 y 150 mM de NaCl.

En general las actividades enzimáticas presentaron curvas de saturación de tipo michaeliano frente a la concentración de sustrato, excepto para la actividad ΔK^+ -PPasa, en función de la concentración de Mg^{2+} , a concentraciones de PPI prefijadas, que fue de tipo sigmoidal (Figuras 15,16, 17 y 18). Los parámetros cinéticos, constante de afinidad del enzima por el sustrato (K_m) y velocidad máxima (V_{max}), se determinaron por análisis de regresión lineal, utilizando la representación de Hanes-Wolf (Tabla 28). En esta representación,

Resultados

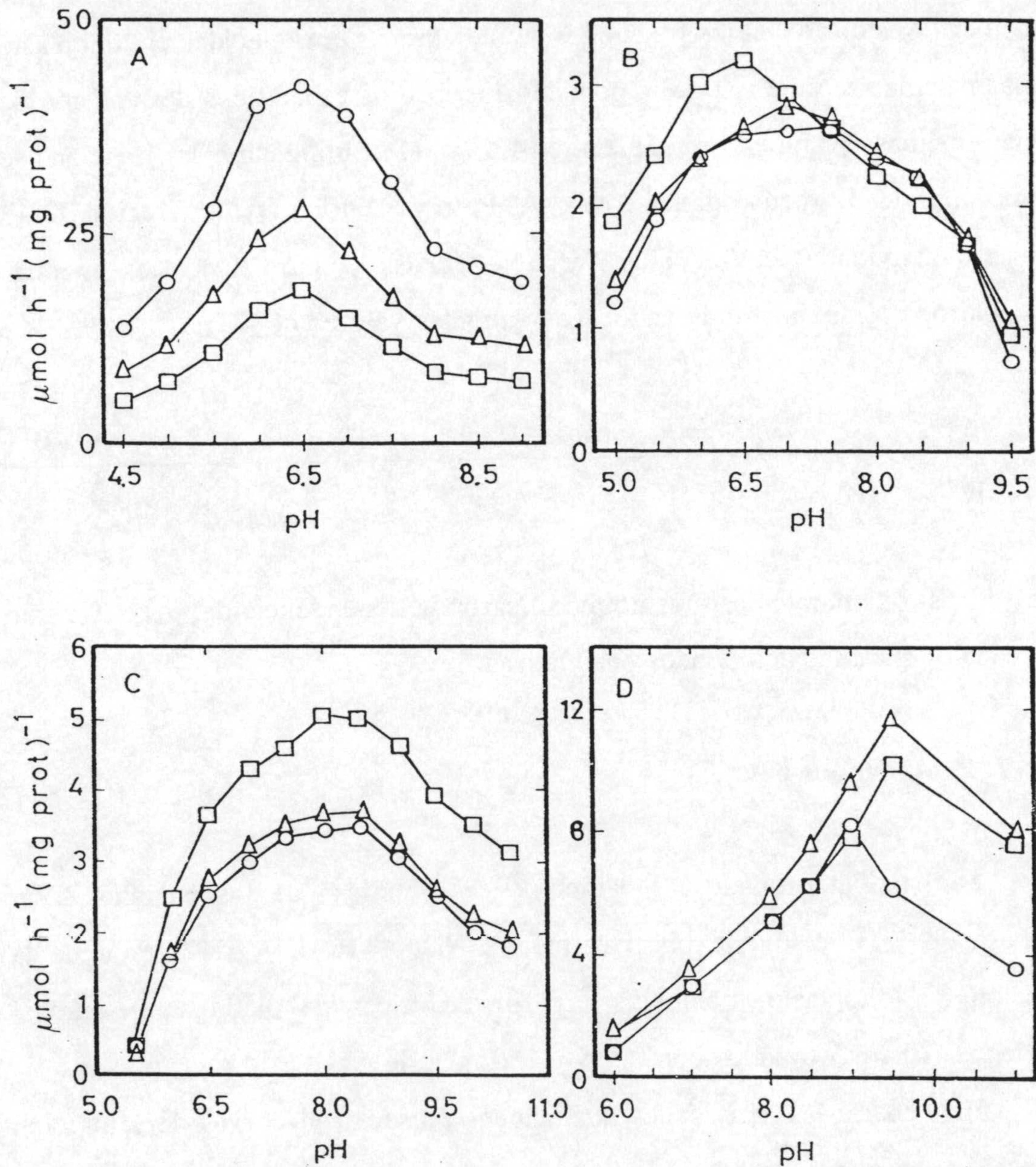


Figura 14. Efecto del pH sobre las actividades $\Delta\text{Va-ATPase}$ (A) y $\Delta\text{N}_3\text{-ATPase}$ (D) correspondiente a la fracción 32/43, enriquecida en plasmalema, y las actividades $\Delta\text{NO}_3\text{-ATPase}$ (B) y $\Delta\text{K}^+\text{-PPase}$ (C) a la fracción 15/32 enriquecida en tonoplasto, aisladas de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas con 0 (○-○), 75 (△-△) y 150 mM de NaCl (□-□). Los resultados son representativos de 1 de 2 experimentos independientes.

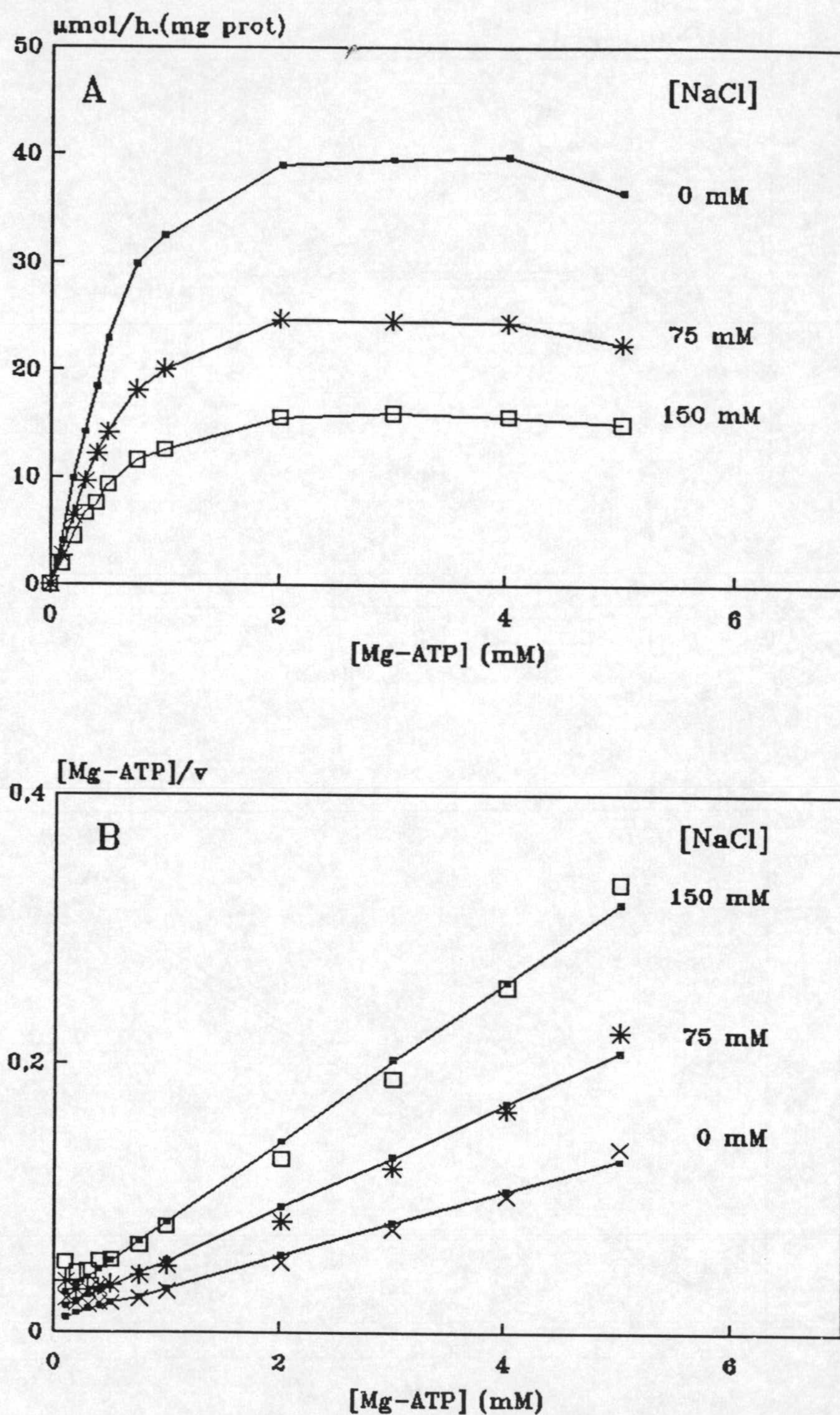


Figura 15. (A), Cinética de saturación por sustrato (Mg-ATP) del enzima $\Delta\text{Va-ATPasa}$ de plasmalema, aislado de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas con diferentes concentraciones de NaCl. (B), Representación de Hanes-Wolf derivada de estas cinéticas, cuyas rectas se ajustaron por regresión lineal. Los datos son representativos de 1 de 3 experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado.

Resultados

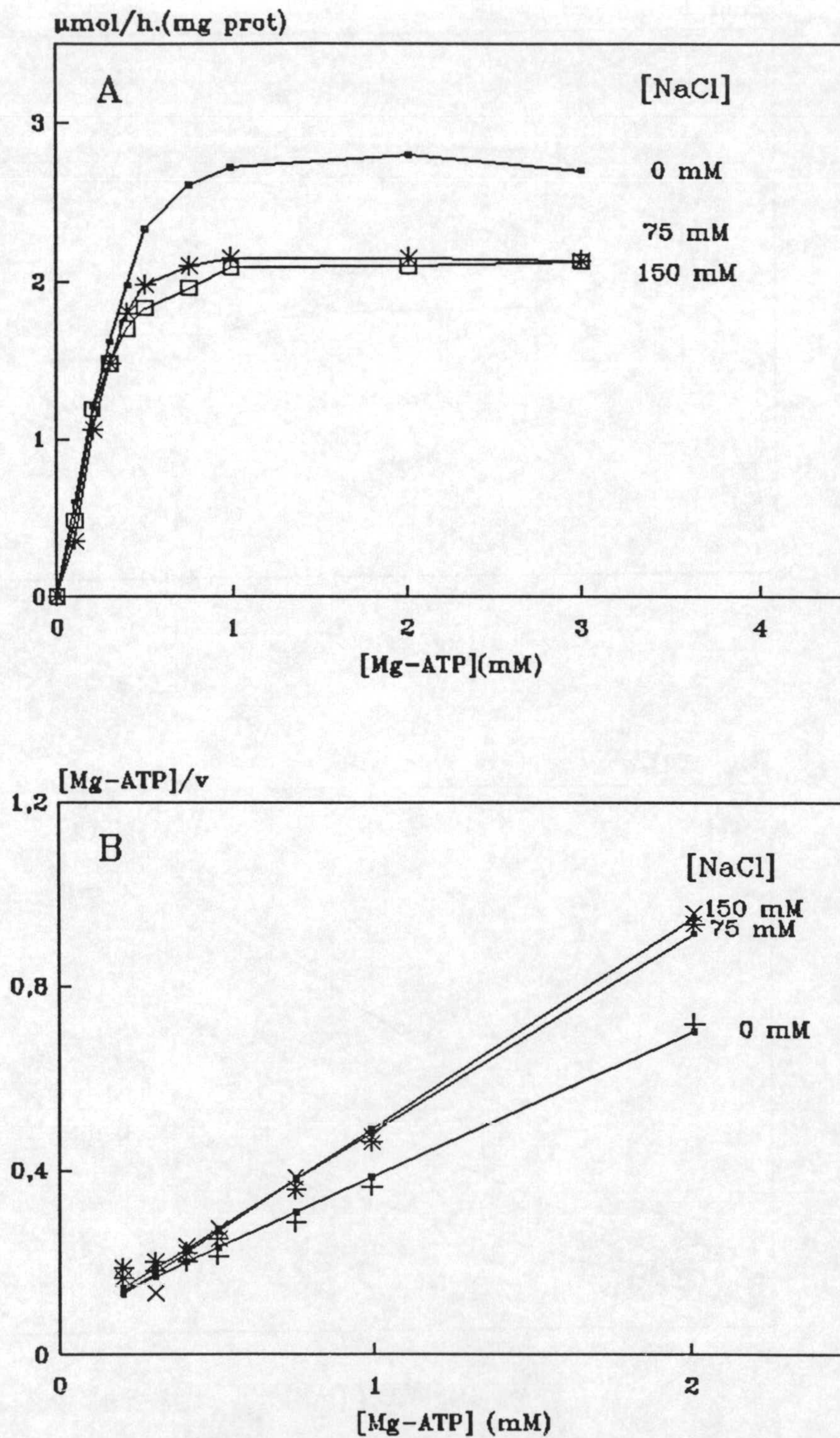


Figura 16. (A), Cinética de saturación por sustrato (Mg-ATP) del enzima $\Delta\text{NO}_3\text{-ATPasa}$ de tonoplasto, aislado de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas con diferentes concentraciones de NaCl. (B), Representación de Hanes-Wolf derivada de estas cinéticas, cuyas rectas se ajustaron por regresión lineal. Los datos son representativos de 1 de 3 experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado.

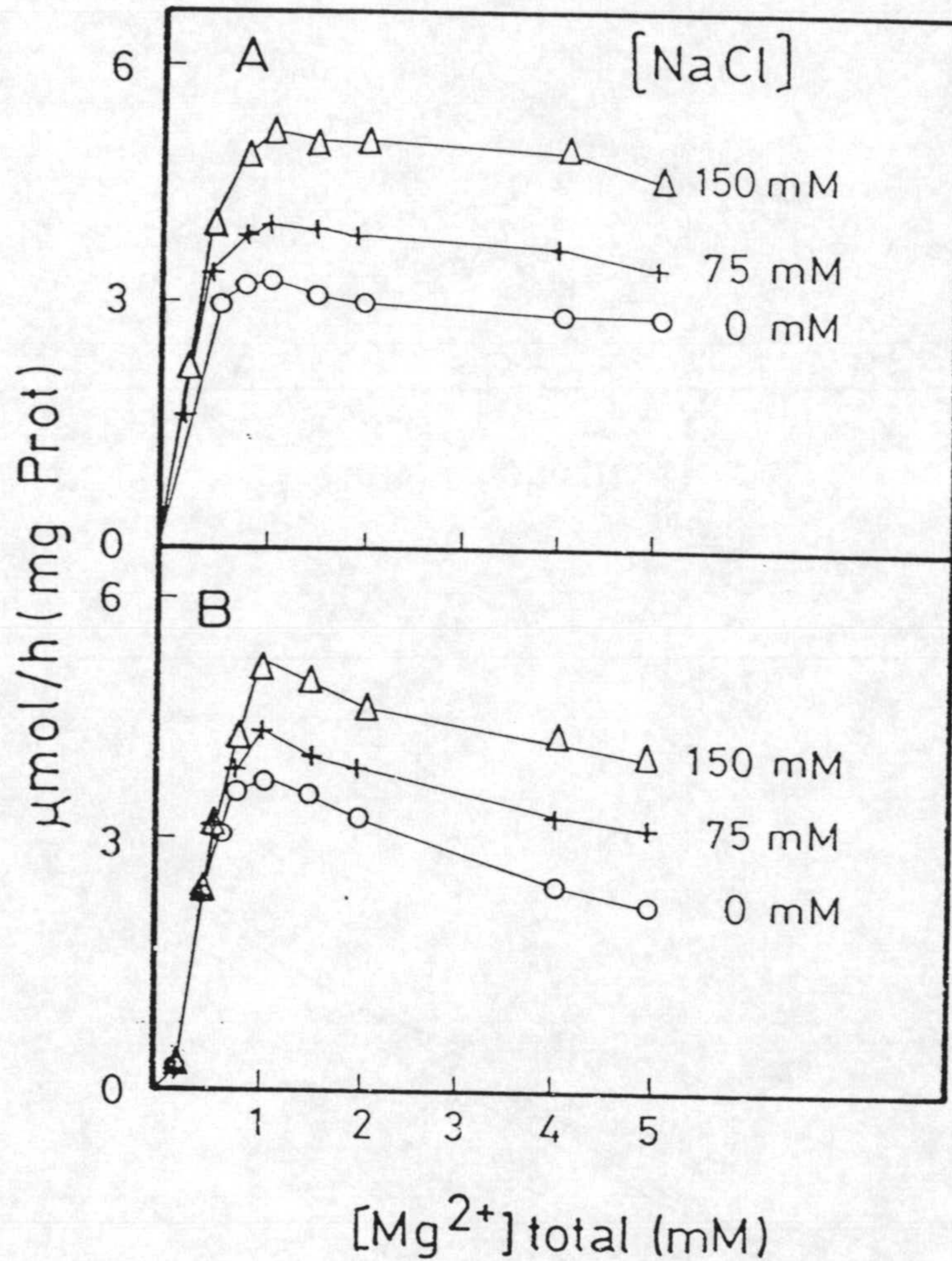


Figura 17. Cinética de saturación por sustrato del enzima ΔK^+ -PPasa en función de la concentración de Mg^{2+} total y a concentraciones prefijadas de PPI de 0.1 mM (panel A) y 0.5 mM (panel B), en tonoplasto aislado de raíces de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con diferentes concentraciones de NaCl. Los datos son representativos de 1 de 2 experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado.

Resultados

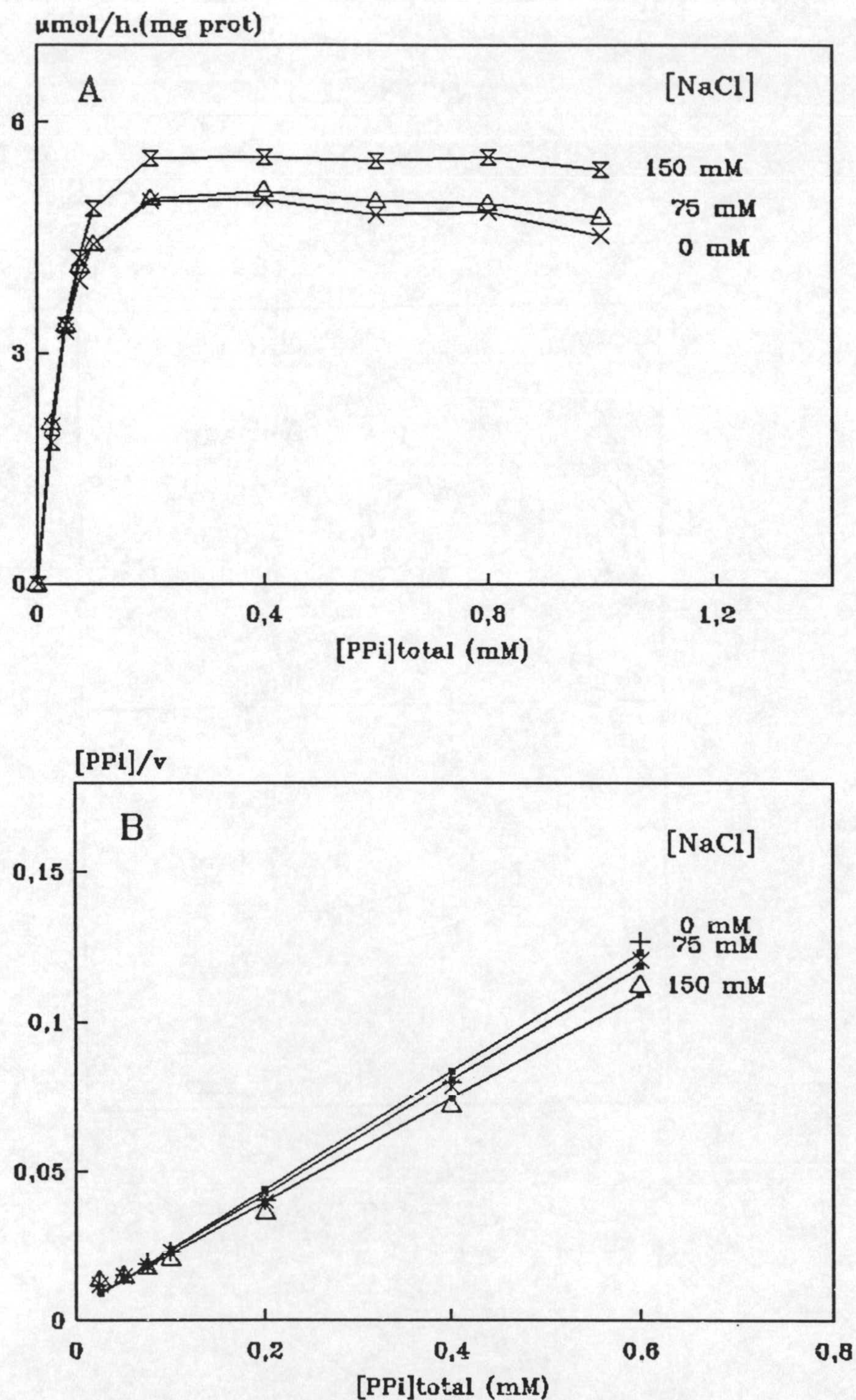


Figura 18. (A), Cinética de saturación por sustrato (PPI), a una concentración total de 1 mM de Mg^{2+} , del enzima ΔK^+ -PPasa de tonoplasto aislado de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas con diferentes concentraciones de NaCl. (B), Representación de Hanes-Wolf derivada de estas cinéticas, cuyas rectas se ajustaron por regresión lineal. Los datos son representativos de 1 de 3 experimentos independientes con las actividades ensayadas por triplicado.

Tabla 28. Valores cinéticos, K_m aparente para el Mg-ATP y para el PPI a concentración prefijada de 1 mM de Mg^{2+} , y V_{max} de las actividades ΔV_a -ATPasa, ΔNO_3 -ATPasa y ΔK^+ -PPasa, derivadas de las cinéticas de la Figura 15, 16 y 18. Los datos son la media de tres experimentos independientes. Letras iguales en cada grupo representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p=95\%$.

Tratamiento <i>in vivo</i> NaCl (mM)	Ecuación de regresión	Coef. de correlación	K_m [mM]	V_{max} ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
<u>ΔV_a-ATPasa</u>				
0	$y=0.009+0.023x$	0.993	0.39 _a	43.5 _a
75	$y=0.014+0.038x$	0.993	0.37 _a	20.3 _b
150	$y=0.023+0.058x$	0.996	0.39 _a	17.2 _c
<u>ΔNO_3-ATPasa</u>				
0	$y=0.077+0.309x$	0.990	0.22 _a	3.23 _a
75	$y=0.067+0.424x$	0.991	0.20 _a	2.50 _a
150	$y=0.042+0.451x$	0.992	0.21 _a	2.51 _a
<u>ΔK^+-PPasa</u>				
0	$y=0.003+0.199x$	0.995	0.020 _a	4.73 _a
75	$y=0.004+0.190x$	0.997	0.023 _a	5.00 _a
150	$y=0.005+0.173x$	0.994	0.025 _a	5.60 _b

Resultados

la V_{max} se calculó como el valor inverso de la pendiente de la recta, y la K_m como el valor de la intersección en el eje negativo de abscisas (Segel 1972).

C.2.7.1. ΔV_a -ATPasa

En todos los tratamientos salinos este enzima presentó una K_m para el Mg-ATP de 0.4 mM y una actividad máxima a partir de 2 mM (Tabla 28, Figura 15). El estrés salino provocó una disminución de la actividad máxima saturante (V_{max}), proporcional a la concentración de NaCl en el medio de cultivo.

C.2.7.2. ΔNO_3 -ATPasa

Este enzima de tonoplasto mostró una mayor afinidad por el sustrato Mg-ATP que el enzima de plasmalema, al presentar valores de K_m de 0.2 mM (Tabla 28) y actividad máxima a partir de 1 mM de Mg-ATP (Figura 16). Ninguno de estos parámetros se vió afectado por los tratamientos salinos.

C.2.7.3. ΔK^+ -PPasa

Trabajos previos han demostrado una gran complejidad de las cinéticas de la actividad PPasa de tonoplasto en función de las concentraciones de sustrato. Ello era debido a las interacciones entre el enzima, PPi y el Mg^{2+} , tanto libre como ligado, así como con el K^+ del medio (White y col. 1990, Leigh y col. 1992). De aquí que en nuestro trabajo determináramos en primer lugar la cinética enzimática del enzima ΔK^+ -PPasa en función de la concentración de Mg^{2+} en el medio de reacción, para dos concentraciones de PPi prefijadas. En estas condiciones, la actividad ΔK^+ -PPasa presentaba una cinética sigmoideal respecto a la concentración total de Mg^{2+} , a concentraciones de PPi altas (0.5 mM), mientras que a concentraciones de PPi bajas (0.1 mM), la cinética se aproximó a una cinética michaeliana (Figura 17). A ambas concentraciones de PPi, la concentración de Mg^{2+} que indujo la máxima actividad fue de 1 mM, disminuyendo progresivamente a concentraciones superiores, sobre todo, a altas

concentraciones de PPI. Por ello, se consideró 1 mM de Mg^{2+} la concentración óptima para el estudio de las cinéticas enzimáticas de este enzima en función de la concentración de PPI (Figura 18).

La actividad ΔK^+ -PPasa presentaba también una curva de saturación hiperbólica para la concentración de PPI, a concentración fija de 1 mM de Mg^{2+} , obteniéndose valores de K_m del orden de 20-25 μM , los cuales no se afectaron significativamente por los tratamientos salinos (Tabla 28). Sin embargo, la velocidad máxima aumentó leve, pero significativamente, en membranas de raíces cultivadas con 150 mM de NaCl.

C.3. Transporte de H^+ dependiente de ATP y PPI asociado a los enzimas H^+ -ATPasa de plasmalema y H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa de tonoplasto

La caracterización preliminar del transporte de H^+ en las vesículas de membrana enriquecidas en tonoplasto y plasmalema, demostró que tanto el ATP (en ambas membranas) como el PPI (en tonoplasto) fueron capaces de generar un gradiente de pH, disipable por la adición de ionóforos de H^+ del tipo del NH_4Cl o gramicidina (Figuras 19 y 20). En las fracciones enriquecidas en tonoplasto, el transporte de H^+ dependiente de ATP fue estimulado por Cl^- , inhibido fuertemente por NO_3^- y, en menor medida, por vanadato, mientras que la azida y el molibdato no mostraron apenas efecto (Figura 19A). Estos datos y los resultados previos de otros autores, nos llevaron a considerar que el transporte de H^+ dependiente de ATP sensible a nitrato en presencia de azida y vanadato, y estimulado por Cl^- , se asociaba al enzima H^+ -ATPasa de tonoplasto (O'Neill y col. 1983, Poole y col. 1984).

En esta misma fracción, el transporte dependiente de PPI era totalmente dependiente de K^+ , levemente inhibido por vanadato e insensible al molibdato y azida (Figura 19B). De aquí que la actividad transportadora de H^+ dependiente de PPI estimulable por K^+ se asociara al enzima H^+ -PPasa de tonoplasto (Wang

Resultados

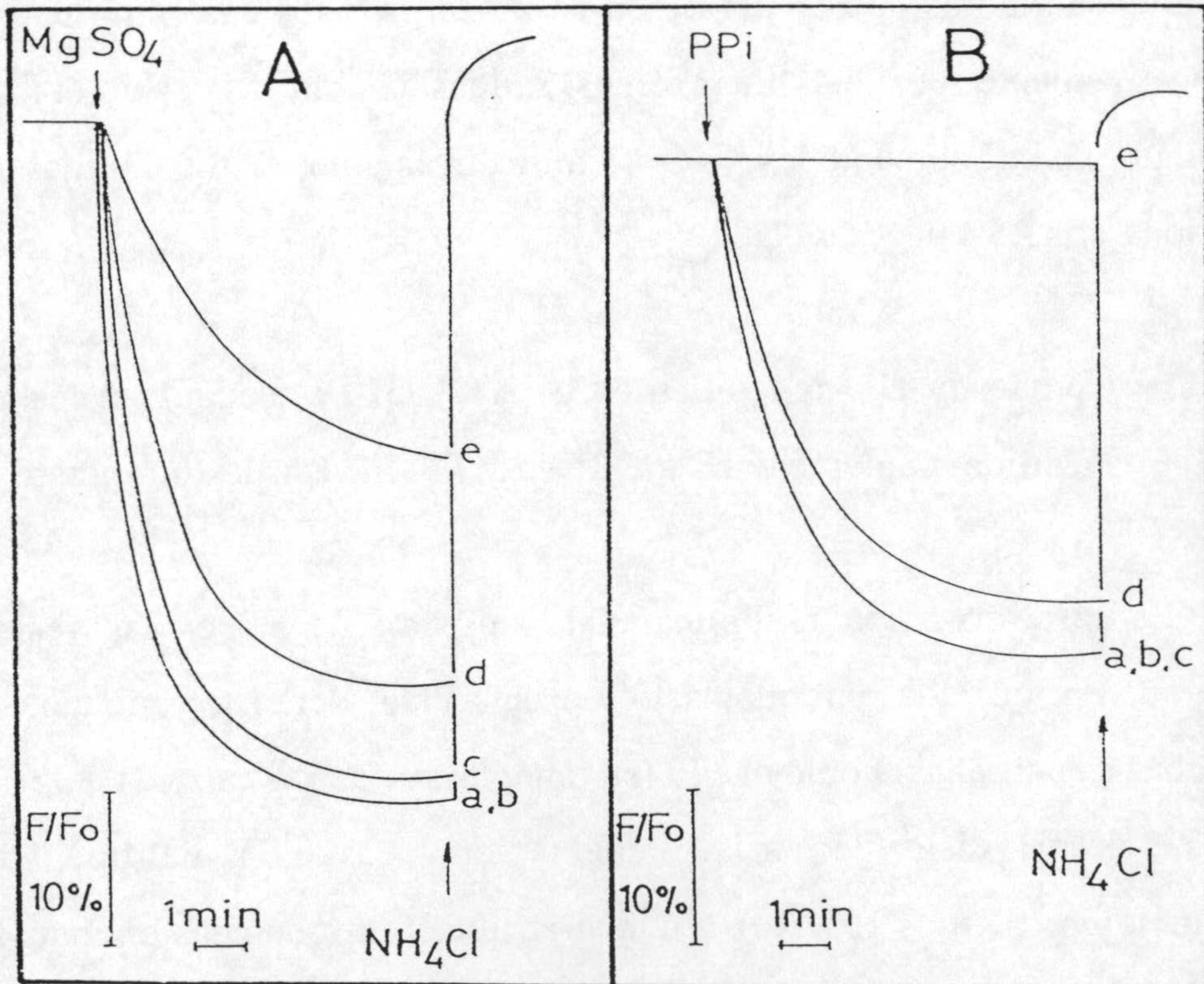


Figura 19. Actividad transportadora de H^+ dependiente de ATP (A) o PPI (B), medida como extinción de la fluorescencia del ACMA, de vesículas enriquecidas en tonoplasto obtenidas de raíces de girasol (variedad Alhama) tratadas con 150 mM de NaCl. (A), Las reacciones se iniciaron por adición de 3 mM $MgSO_4$ al medio normal de reacción (apartado IV.C.4.2.) conteniendo 100 mM KBr (a), en presencia de 100 μM molibdato (b), 2 mM azida (c), 250 μM vanadato (d) y 100 mM BTP- NO_3 (e). (B), Las reacciones se iniciaron por adición de 0.6 mM PPI-BTP al medio normal de reacción (apartado IV.C.4.3.), conteniendo 100 mM KNO_3 (a), en presencia de 100 μM molibdato (b), 2 mM azida (c), 250 μM vanadato (d) y en ausencia de KNO_3 . La fluorescencia se restauró tras la adición de 10 mM NH_4Cl ó 2 μM gramicidina D una vez que la fluorescencia alcanzaba el estado estacionario.

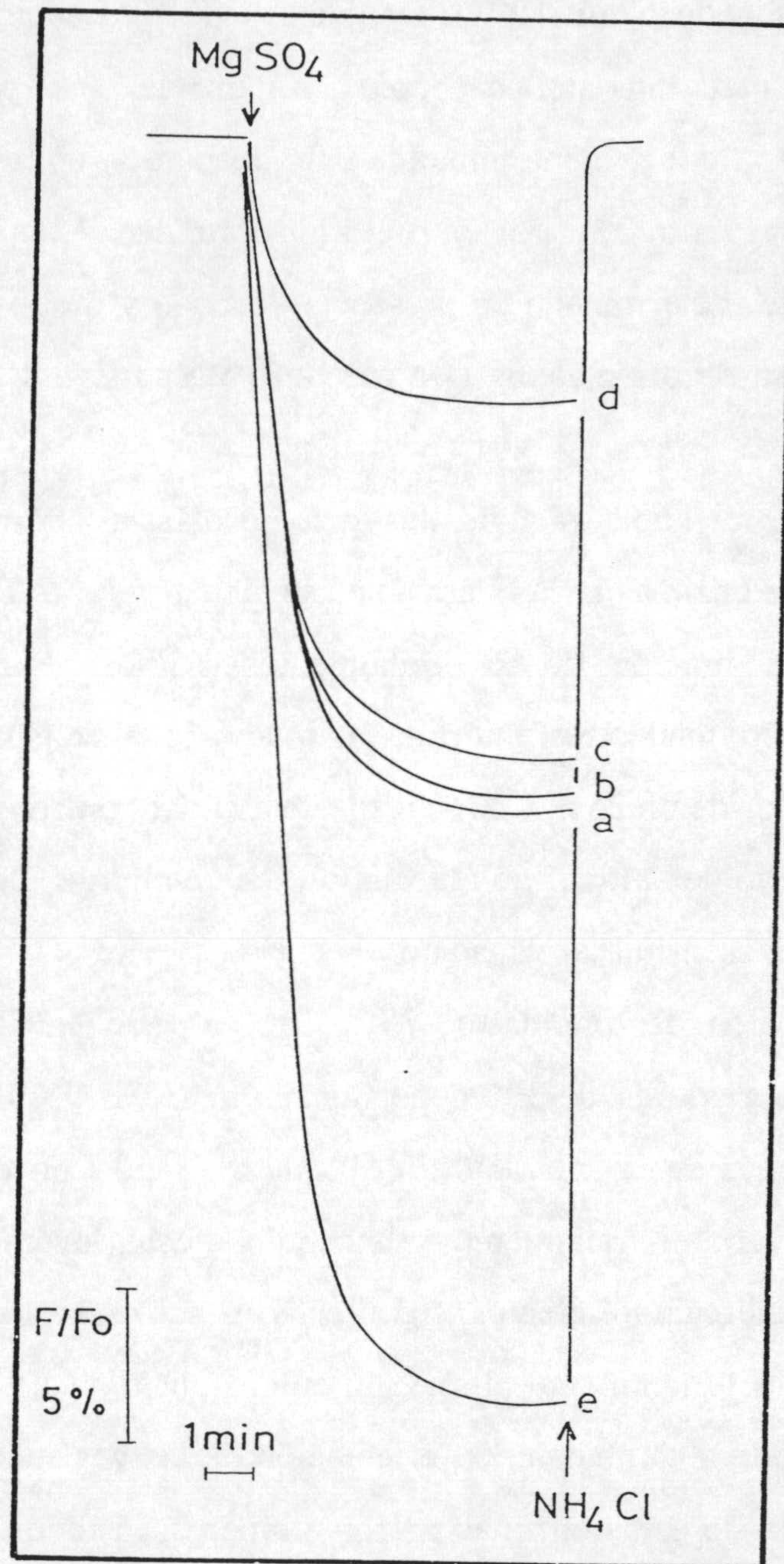


Figura 20. Actividad transportadora de H^+ dependiente de ATP, medida como extinción de la fluorescencia del ACMA, en vesículas enriquecidas en plasmalema de raíces de girasol (variedad Alhama) no tratadas. Las reacciones se iniciaron por adición de 3 mM $MgSO_4$ al medio normal de reacción (apartado IV.C.4.2.) conteniendo 100 mM KBr (a), 100 μM molibdato (b), 2 mM azida (c), 250 μM vanadato (d) y 100 mM BTP- NO_3 (e). La fluorescencia se restauró tras la adición de 10 mM NH_4Cl ó 2 μM gramicidina D, una vez que la fluorescencia alcanzaba el estado estacionario.

Resultados

y col. 1986, Pugliarello y col. 1991). De igual modo, la fracción enriquecida en plasmalema, presentaba una actividad transportadora de H^+ dependiente de ATP estimulable por NO_3^- , fuertemente inhibida por vanadato y, en menor medida, por molibdato y azida (Figura 20). Por ello, el transporte de H^+ dependiente de ATP sensible a vanadato, determinado en presencia de azida y molibdato, se asoció al enzima H^+ -ATPasa de plasmalema (De Michelis y Spanswick 1986, Gianini y col. 1987).

La Tabla 29 resume las actividades fosfohidrolásica y transportadora de H^+ dependientes de los enzimas H^+ ATPasa de plasmalema, y H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa de tonoplasto, en función de los tratamientos salinos. Para el enzima de plasmalema, las actividades fosfohidrolíticas total y basal sensible al vanadato se inhibieron alrededor de un 35% y 55% respecto a la del control por 75 y 150 mM de NaCl en el medio de cultivo, no afectándose, sin embargo, de forma aparente, el transporte de H^+ sensible al vanadato.

En la fracción de tonoplasto, 75 y 150 mM de NaCl estimularon las actividades transportadoras de H^+ dependientes de ATP y PPi, siendo mucho mayor el incremento de la actividad a 150 que a 75 mM en el caso de la H^+ -PPasa. Sin embargo, el tratamiento salino sólo afectó levemente la actividad pirofosfatasa, no ejerciendo efectos significativos sobre la hidrólisis de ATP sensible a nitrato. El incremento observado en el transporte de H^+ por efecto de la sal, no fue debido a cambios en la orientación de las vesículas, puesto que los valores de latencia de estos enzimas fueron similares en todos los tratamientos. Este hecho también venía avalado por los fuertes incrementos en la razón de H^+ transportados frente al sustrato hidrolizado.

Resultados

Tabla 29. Actividad fosfohidrolásica y transportadora de H^+ dependiente de ATP y PPi de los enzimas H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa, así como razón entre la velocidad inicial de transporte de H^+ y actividad basal fosfohidrolásica, en preparaciones de membranas enriquecidas en plasmalema y tonoplasto, aisladas de raíces de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con diferentes concentraciones de NaCl. Las actividades específicas totales (en presencia de detergente) y basales (en ausencia de detergente) se expresaron en $\mu\text{mol/h/mg}$; la velocidad inicial de transporte de H^+ (VQs) en $\%Q/\text{min/mg}$. Letras iguales en cada fila representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p = 95\%$, $n = 3$.

Enzimas	[NaCl] mM		
	0	75	150
<u>H^+-ATPasa plasmalema (ΔV_a)</u>			
Activ. Total	37.9 _a	24.9 _b	16.8 _c
Activ. Basal	24.3 _a	15.3 _b	10.9 _c
VQs	127.0 _a	160.0 _a	150.0 _a
Latencia (%)	36 _a	38 _a	35 _a
H^+ /ATP	5.2 _a	10.4 _b	11.9 _c
<u>H^+-ATPasa tonoplasto (ΔNO_3)</u>			
Activ. Total	4.2 _a	3.4 _a	3.5 _a
Activ. Basal	2.2 _a	1.9 _a	1.8 _a
VQs	173.0 _a	513.0 _b	453.0 _b
Latencia (%)	48 _a	44 _a	48 _a
H^+ /ATP	78.6 _a	270.0 _b	251.7 _b
<u>H^+-PPasa tonoplasto (ΔK^+)</u>			
Activ. Total	3.5 _a	3.8 _a	4.6 _b
Activ. Basal	2.4 _a	2.8 _a	3.4 _b
VQs	30.6 _a	103.0 _b	322.6 _c
Latencia (%)	31 _a	26 _a	26 _a
H^+ -PPi	12.8 _a	36.8 _b	94.9 _c

Resultados

C.4. Efecto del NaCl sobre el contenido y composición en ácidos grasos de fosfolípidos totales de las fracciones de plasmalema

Los fosfolípidos constituyen las categorías lipídicas mayoritarias de las membranas celulares de raíces de plantas superiores. En raíces de plántulas de girasol alcanzan el 60% del contenido total de lípidos (Belver 1986, Burgos 1993). En la Tabla 30 se muestra la composición y el contenido de los ácidos grasos de los fosfolípidos totales de las membranas enriquecidas en plasmalema y tonoplasto, aisladas de raíces de girasol (variedad Alhama), en función de los tratamientos salinos.

En comparación con las membranas aisladas de raíces controles, el contenido de ácidos grasos, expresado en nmoles/mg de proteína, aumentó fuertemente en la fracción de tonoplasto aislada de raíces tratadas con 75 mM y, en menor proporción, con 150 mM. Por el contrario, las fracciones enriquecidas en plasmalema aisladas de raíces tratadas con NaCl mostraron una menor cantidad de fosfolípidos que las membranas controles. En lo que respecta a la composición en ácidos grasos, expresada en moles %, ésta fue prácticamente idéntica en ambos tipos de membranas destacando la alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente el ácido linoléico, y saturados (palmítico). Los tratamientos salinos provocaron un aumento de la insaturación de los ácidos grasos en ambos tipos de membranas, debido a un mayor contenido de ácido linoléico, en detrimento del ácido palmítico, incrementándose fuertemente el índice de insaturación de los fosfolípidos.

Tabla 30. Composición y contenido en ácidos grasos de fosfolípidos totales de las fracciones de membranas enriquecidas en tonoplasto (interfase 15/32) y plasmalema (interfase 32/43) aisladas de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con 0, 75 y 150 mM de NaCl. Los resultados son la media de tres experimentos independientes. Letras iguales en la misma columna representan valores homogéneos según el análisis multifactorial de la varianza de Duncan, $p=95\%$. PI: suma de ácidos grasos insaturados. S: suma de ácidos grasos saturados.

Fracción membrana		Acidos grasos					
Tratamiento NaCl (mM)	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3		
	Composición (moles %)						PI/S
15/32							
0	45.9 _a	1.5 _a	2.5 _a	40.5 _a	9.6 _a		1.11 _b
75	35.6 _b	1.4 _a	3.3 _a	49.3 _a	10.4 _a		1.70 _a
150	32.9 _b	1.7 _a	3.3 _a	49.6 _a	12.5 _a		1.89 _a
32/43							
0	46.7 _a	1.4 _a	1.8 _a	40.5 _b	9.6 _a		1.08 _b
75	32.8 _b	1.1 _a	2.8 _a	52.3 _a	11.0 _a		1.95 _a
150	32.6 _b	0.9 _a	2.0 _a	51.1 _a	12.7 _a		1.98 _a
	Contenido (nmoles/mg proteína)						Total
15/32							
0	323 _a	10 _b	17 _b	285 _c	67 _b		703 _c
75	495 _a	20 _a	45 _a	685 _a	145 _a		1390 _a
150	380 _b	20 _a	38 _a	573 _b	145 _a		1150 _b
32/43							
0	655 _a	19 _a	25 _a	567 _a	135 _a		1401 _a
75	203 _b	7 _b	17 _b	324 _b	68 _b		619 _b
150	207 _b	6 _b	16 _b	324 _b	81 _b		634 _b

Resultados

C.5. Antiporte Na⁺/H⁺ de tonoplasto

C.5.1. Aislamiento de tonoplasto

Experimentos preliminares no descritos en este trabajo, llevados a cabo para detectar la actividad antiporte Na⁺/H⁺ en vesículas de membrana enriquecidas en tonoplasto aisladas por el procedimiento descrito en el apartado IV.C.1.3., resultaron fallidos. Ello era debido, principalmente, a la alta permeabilidad pasiva a los H⁺ mostrada por dichas vesículas, y a la contaminación relativamente alta por plasmalema y otras membranas, lo que podría dificultar la interpretación de los resultados, al arrojarse dudas acerca de la identidad y localización del antiporte Na⁺/H⁺. Por ello, fue necesario modificar los métodos de obtención de membranas enriquecidas en tonoplasto y la determinación de dicha actividad. Estos experimentos se llevaron a cabo en el Departamento de Botánica de la Universidad de Toronto, en Canada, merced a una estancia de tres meses de la Lda Emilia Ballesteros Consuegra titular de este trabajo de Tesis Doctoral, en estrecha colaboración con el Prof. Dr. Eduardo Blumwald, director de dicho departamento.

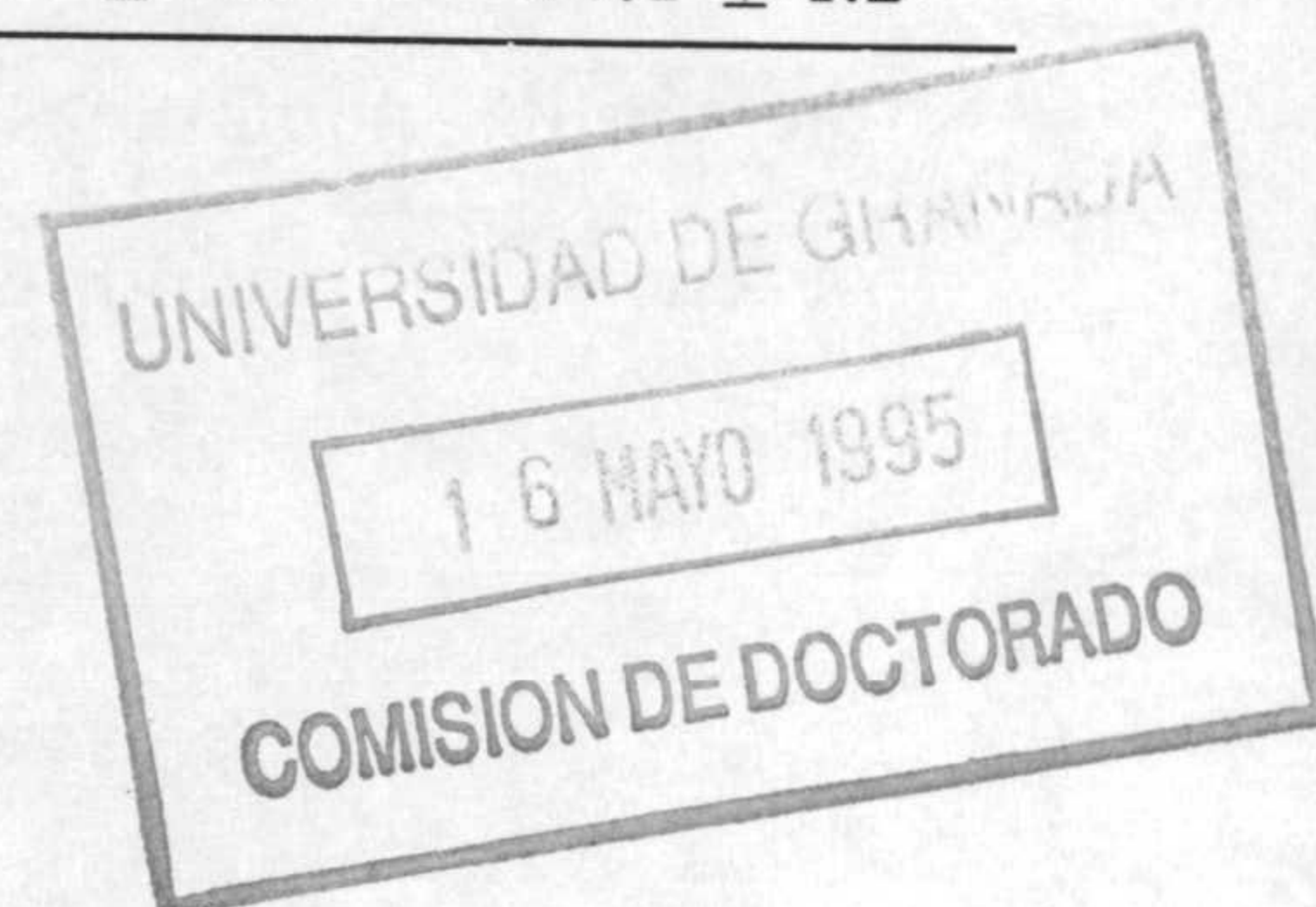
C.5.1.1. Análisis de enzimas marcadores

En la Tabla 31 se muestra la distribución de marcadores enzimáticos correspondientes a las diferentes membranas separadas en fracciones obtenidas por gradiente discontinuo de sacarosa, partiendo de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas con 0 y 150 mM de NaCl.

Los marcadores enzimáticos de membranas utilizados fueron los mismos ya descritos en el apartado V.C.1.1., únicamente, en el caso de las membranas del Golgi se utilizó la UDPasa latente (Belver y Travis, 1990), en lugar de la IDPasa latente, y para definir la fracción de tonoplasto, también se consideró la sensibilidad específica de esta membrana a bafilomicina A₁, un inhibidor no

Tabla 31. Distribución de actividades específicas totales (en presencia de detergente) de enzimas marcadores, a nivel de la fracción microsomal e interfases del gradiente continuo obtenidos a partir de honogenados de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con 0, 75 y 150 mM de NaCl. Los datos, expresados en $\mu\text{mol/h/mg}$ son la media (\pm DE) de dos experimentos independientes, con las actividades ensayadas por triplicado.

Enzimas	Fracción gradiente				
	Tratamiento (mM NaCl)	Microsomas	0/13	13/28	28/32
<u>$\Delta\text{Va-ATPasa}$</u>					
0		12.0 \pm 3.0	17.9 \pm 1.0	42.2 \pm 5.2	15.6 \pm 3.5
150		7.2 \pm 3.6	12.5 \pm 2.0	30.5 \pm 4.1	9.0 \pm 2.8
<u>$\Delta\text{NO}_3\text{-ATPasa}$</u>					
0		8.5 \pm 1.1	25.4 \pm 1.6	12.7 \pm 0.9	7.0 \pm 0.6
150		6.8 \pm 0.9	18.5 \pm 1.8	10.1 \pm 1.0	5.6 \pm 0.3
<u>$\Delta\text{Baf-ATPasa}$</u>					
0		7.9 \pm 1.0	20.2 \pm 1.5	11.5 \pm 0.8	4.6 \pm 1.2
150		6.2 \pm 0.9	18.0 \pm 1.7	7.5 \pm 0.6	2.8 \pm 0.7
<u>$\Delta\text{K}^+\text{-PPasa}$</u>					
0		5.6 \pm 1.0	19.2 \pm 2.2	8.3 \pm 1.0	3.9 \pm 0.8
150		6.2 \pm 1.5	25.6 \pm 2.8	9.4 \pm 1.2	3.8 \pm 0.5
<u>$\Delta\text{N}_3\text{-ATPasa}$</u>					
0		2.7 \pm 0.2	2.0 \pm 0.3	3.5 \pm 0.4	4.0 \pm 0.5
150		2.1 \pm 0.1	1.9 \pm 0.2	2.5 \pm 0.1	5.6 \pm 0.3
<u>UDPasa lat.</u>					
0		5.5 \pm 0.6	5.3 \pm 0.4	12.5 \pm 1.1	8.1 \pm 0.9
150		7.8 \pm 0.9	7.5 \pm 0.7	18.4 \pm 2.0	14.1 \pm 1.2



Resultados

competitivo de la misma (White, 1994).

La fracción de membrana enriquecida en tonoplasto se separó mayoritariamente en la interfase 0/13% del gradiente de sacarosa, como se demuestra por las actividades enzimáticas específicas (ΔK^+ -PPasa, ΔNO_3 -ATPasa y Δ Bafilomicina-ATPasa). Las fracciones correspondientes a la membrana plasmática y Golgi, identificadas por los enzimas ΔVa -ATPasa y UDPasa latente, respectivamente, se localizaron principalmente en la fracción 13/28% del gradiente de sacarosa. La distribución de estos enzimas marcadores en el gradiente, no se afectó por el tratamiento salino.

C.5.1.2. Caracterización de las fracciones del gradiente mediante con inhibidores específicos de fosfohidrolasas

El grado de pureza de las vesículas de tonoplasto separadas en la interfase 0/13% del gradiente discontinuo de sacarosa, se evaluó también mediante la utilización de inhibidores específicos de fosfohidrolasas (Tabla 32).

La actividad ATPasa global de la fracción 0/13% de sacarosa mostró de un 60 a un 70% de inhibición por nitrato, bafilomicina, así como nitrato en presencia de azida. Las inhibiciones por azida y vanadato fueron de un 10% y un 30%, respectivamente, mientras que con molibdato no se observó ningún efecto. Estos datos sugirieron la presencia mayoritaria, en esta fracción, del enzima ATPasa de tonoplasto, con pequeñas contaminaciones de fosfohidrolasas de otras membranas.

C.5.2. Antiporte Na^+/H^+ en función de los tratamientos salinos

Una vez obtenida a través del gradiente discontinuo de sacarosa una fracción de membranas enriquecida en vesículas de tonoplasto, se determinó la presencia del antiporte Na^+/H^+ en dicha fracción, tanto en las membranas controles como tratadas por NaCl. La detección del intercambio Na^+/H^+ en las

Tabla 32. Efecto de inhibidores específicos de fosfohidrolasas de la fracción microsomal e interfases del gradiente de sacarosa obtenidos a partir de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con 0 y 150 mM de NaCl. Los datos, expresados en porcentaje de inhibición de la actividad específica respecto de la del control, son representativos de 1 de 3 experimentos independientes, con las actividades ensayadas por triplicado.

Inhibidores	Microsomas		0/13		13/28		28/43	
	0	150	0	150	0	150	0	150
Control	10.7	13.9	24.4	34.1	63.6	42.2	16.9	12.4
(μmoles/h/mg prot)								
Na ₂ MoO ₄ (100 μM)	0	8	10	4	3	6	1	0
Na ₂ VO ₄ (250 μM)	39	44	28	28	57	60	48	35
KNO ₃ (100 mM)	42	41	63	63	37	24	32	22
NaN ₃ (2 mM)	10	11	7	11	7	6	11	23
Bafilomicina ()	28	26	61	63	19	13	8	28
KNO ₃ + NaN ₃	44	28	69	60	47	35	37	48

Resultados

vesículas problema de membrana requirió previamente la creación de un gradiente de pH, utilizándose, para ello, la actividad transportadora de H^+ asociada al enzima H^+ -ATPasa de tonoplasto, medida como extinción de fluorescencia de la sonda naranja de acridina (Figura 21).

Los datos correspondientes a la velocidad máxima inicial de extinción de la fluorescencia (VQs) y a la extinción máxima conseguida (Qmax) (Figura 21), indicaban que el transporte de H^+ asociado al enzima H^+ -ATPasa incrementó significativamente con los tratamientos salinos (Tabla 33). Ello corroboraba los resultados previamente obtenidos según se indica en el apartado V.C.3.

Una vez inhibida la actividad ATPásica por adición de hexoquinasa, y estimada la permeabilidad pasiva de las vesículas a los H^+ , se determinó la velocidad inicial de recuperación de la fluorescencia en función de la concentración de Na^+ añadido al medio de ensayo (Figuras 21 y 22A).

En las vesículas de tonoplasto aisladas de raíces de plántulas no tratadas, se observó una pequeña recuperación de la fluorescencia, que aumentaba levemente y de forma lineal con la concentración de Na^+ añadido al medio de reacción. Sin embargo, cuando las vesículas se aislaron de plántulas tratadas durante tres días con 75 y 150 mM de NaCl, las velocidades iniciales de recuperación de la fluorescencia tras la adición de diferentes concentraciones de Na^+ al medio de reacción, aumentaron de forma hiperbólica, con una cinética de saturación similar a la de Michaelis-Menten (Figura 22A). Los parámetros cinéticos de estas curvas se calcularon utilizando la representación de Hanes-Wolf (Figura 22B) y se muestran en la Tabla 34. Las vesículas aisladas de plántulas tratadas con 150 mM presentaron una alta afinidad de intercambio de Na^+ en relación a las de 75 mM, sin cambios importantes en la V_{max} .

En presencia de K^+ en el medio de ensayo, la recuperación de la fluorescencia tenía lugar de forma lineal a la concentración de K^+ , siendo similar en todos los tratamientos, lo que indicaba que el intercambio Na^+/H^+ en las vesículas de tonoplasto de las plántulas tratadas con NaCl era específicamente

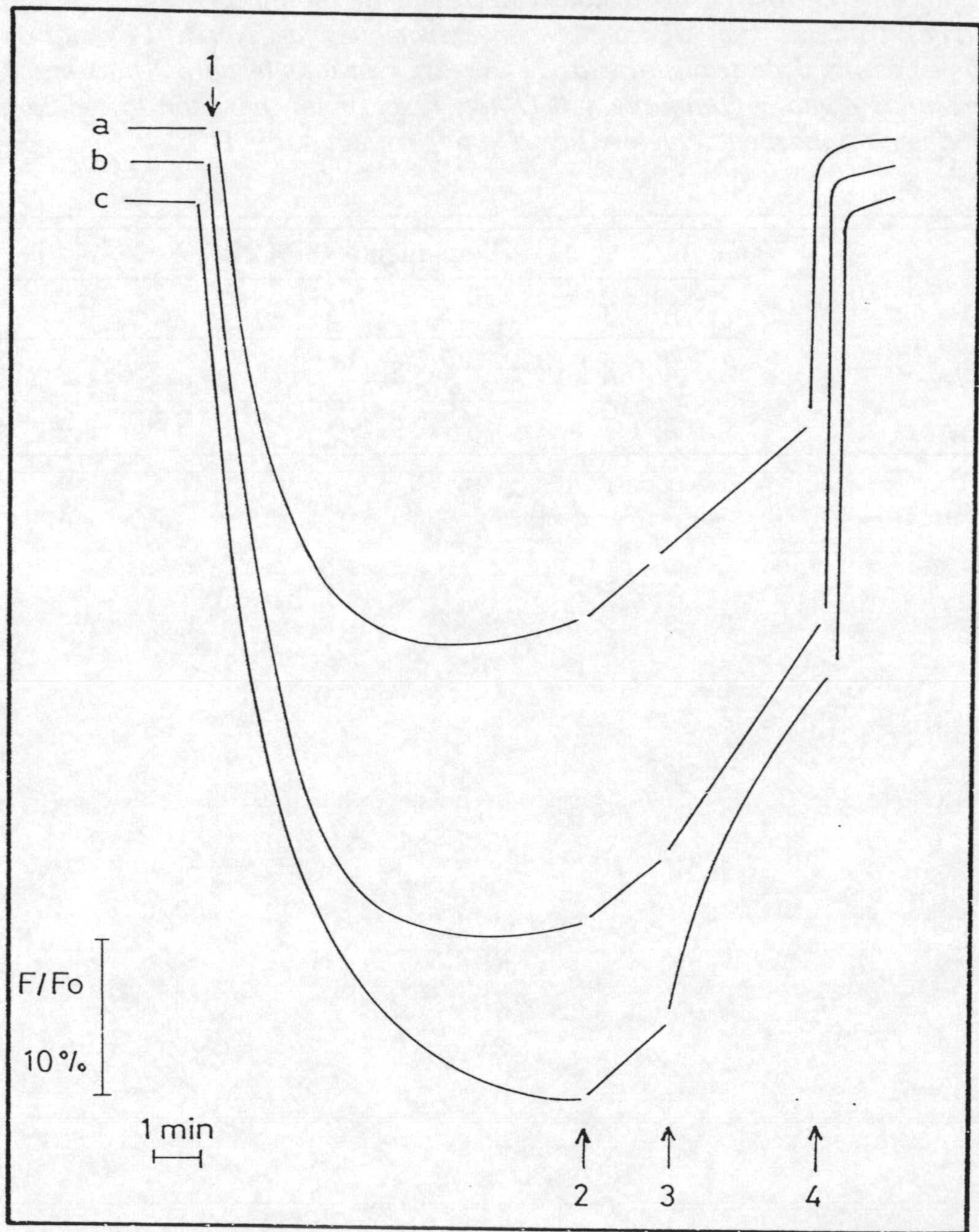


Figura 21. Disipación por Na^+ del gradiente de H^+ , medida como extinción de fluorescencia de la naranja de acridina, creado por la H^+ -ATPasa de tonoplasto en vesículas de tonoplasto aisladas de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas durante tres días con 0 (a), 75 (b) y 150 mM de NaCl (c). Las flechas indican adiciones de: 1, 1.8 mM MgSO_4 ; 2, 10 unidades/ml hexoquinasa; 3, 20 mM gluconato sódico; 4, 10 mM NH_4Cl .

Resultados

Tabla 33. *Actividad transportadora de H⁺ del enzima H⁺-ATPasa, medida como extinción de fluorescencia de la sonda naranja de acridina, de preparaciones enriquecidas en tonoplasto aisladas de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas con diferentes concentraciones de NaCl. Los datos de la velocidad inicial de transporte de H⁺ (VQs) y gradiente de pH máximo (Qmax) expresados como %Q/min/mg y %Q/mg, respectivamente, son la media de tres experimentos independientes ensayados por triplicado ± DE.*

	Tratamiento (mM NaCl)		
	0	75	150
VQs	440.8 ± 30	528.2 ± 60	681.8 ± 35
Qmax	591.7 ± 58	930.0 ± 76	1119.2 ± 102

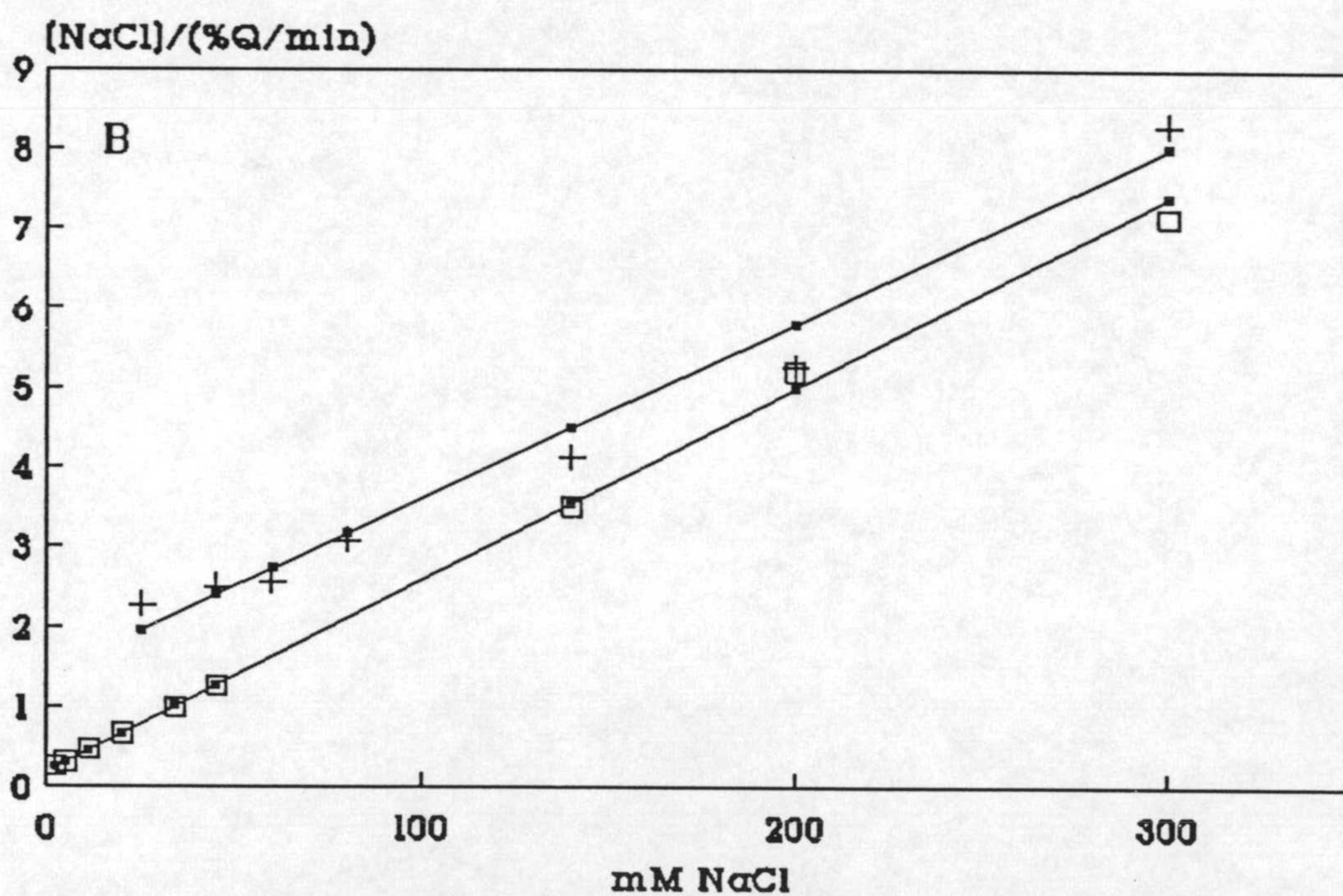
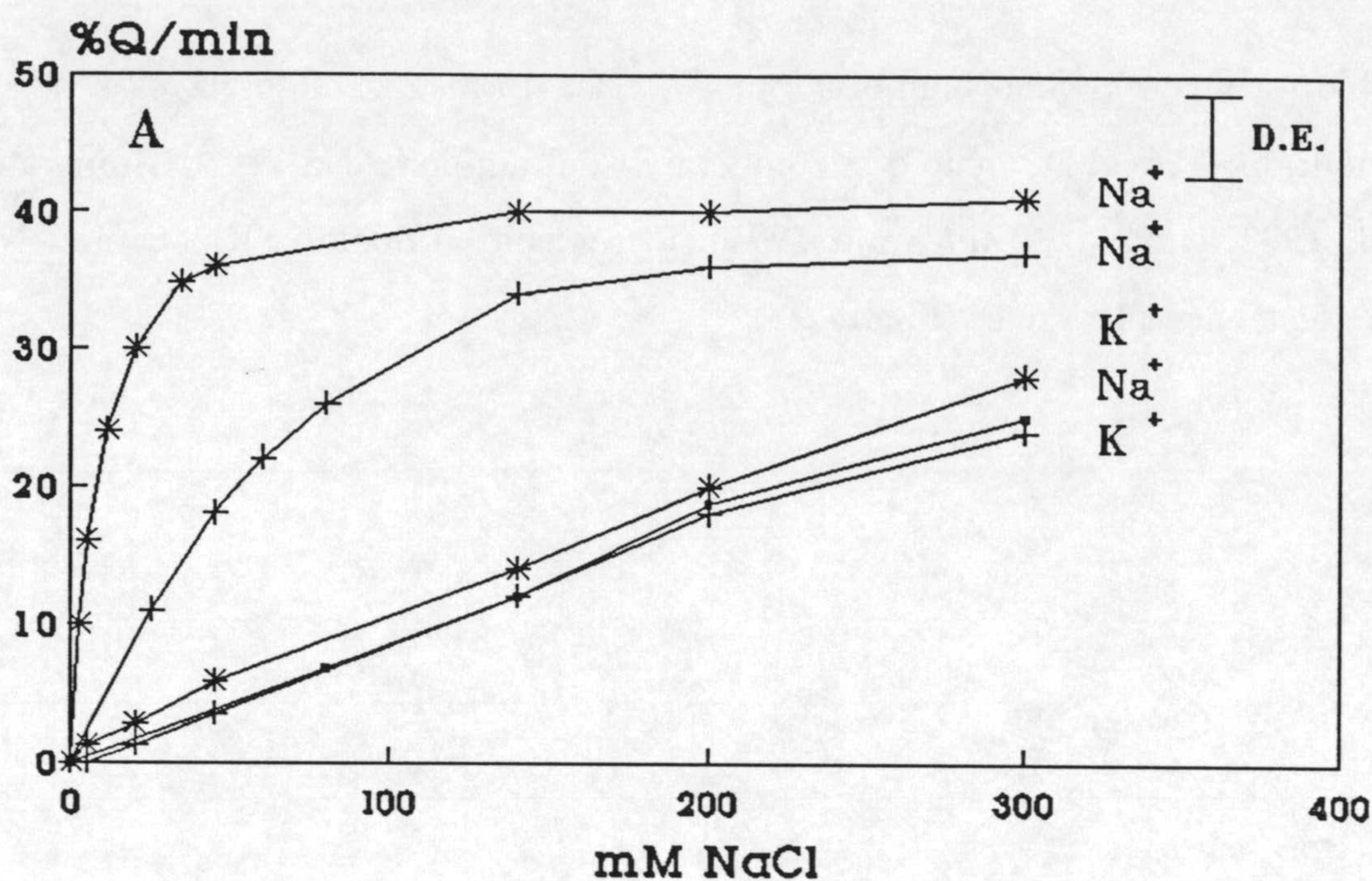


Figura 22.(A), Velocidad inicial de recuperación de la fluorescencia, en función de la concentración de Na^+ y K^+ en el medio de ensayo de la actividad antiportadora, en vesículas de tonoplasto aisladas de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas con 0 (---), 75 (+--+) y 150 (*-*) mM de NaCl. (B), Representación de Hanes-Wolf derivada de estas cinéticas, cuyas rectas se ajustaron por regresión lineal. Los datos son la media de 3 experimentos independientes \pm DE.

Resultados

debido a una actividad antiportadora Na^+/H^+ . En este sentido, la presencia de amilorido ($125 \mu\text{M}$), inhibidor competitivo del antiporte Na^+/H^+ (Blumwald y col. 1987, Barkla y Blumwald 1991), incrementó al doble la K_m para el Na^+ , no afectándose la V_{max} (Figura 23).

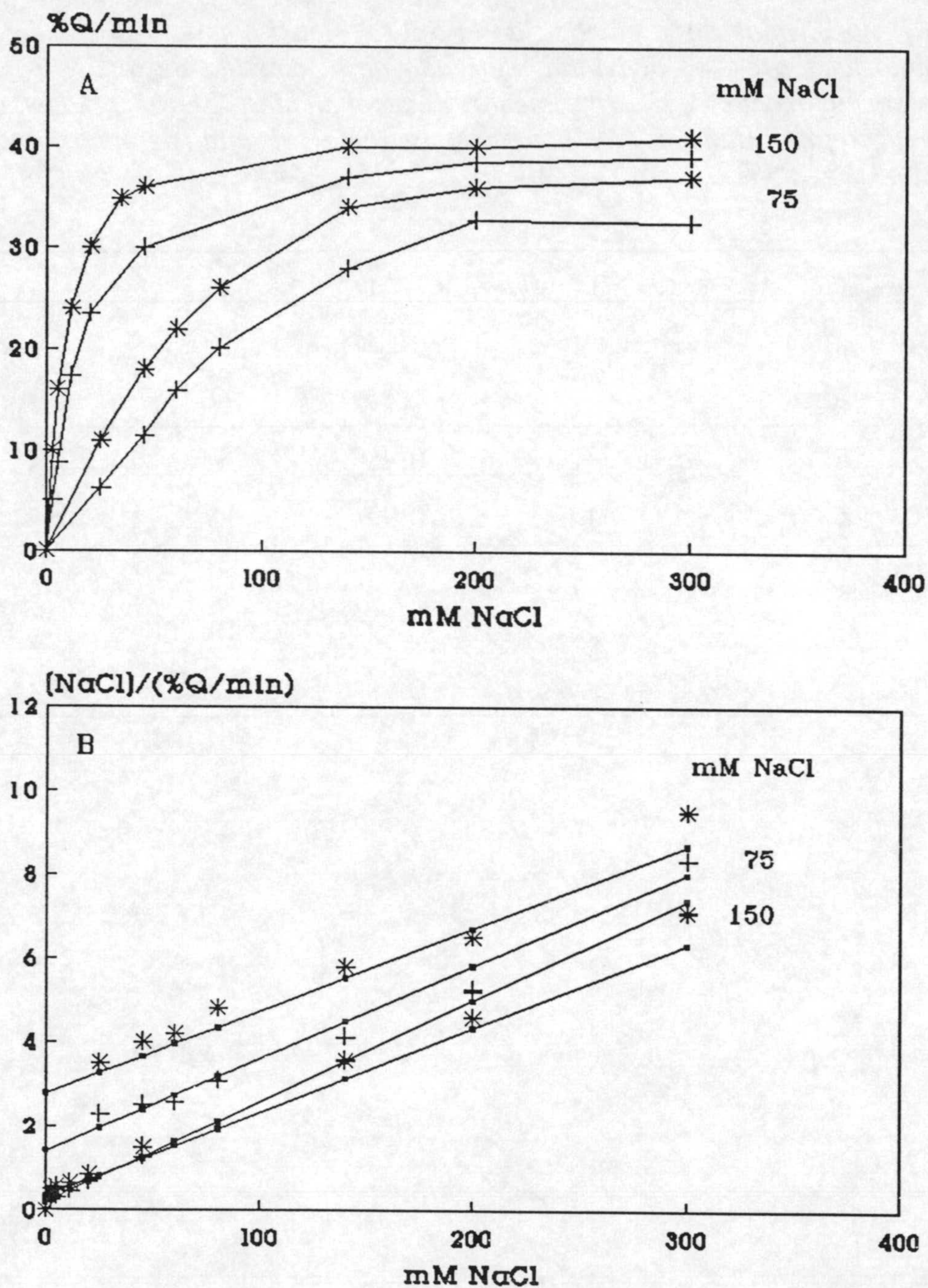


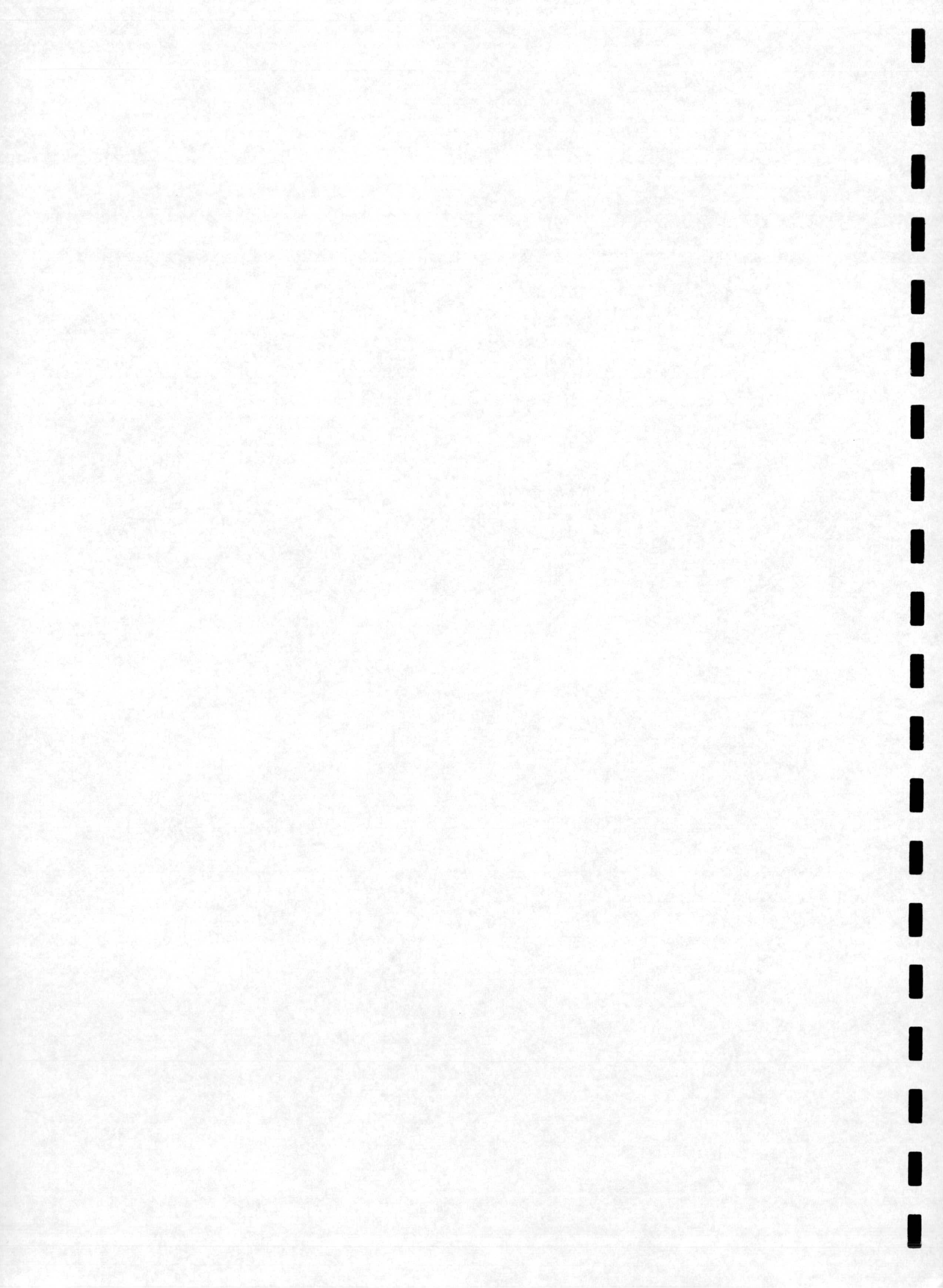
Figura 23. (A), Efecto del amilorido sobre la velocidad inicial de recuperación de la fluorescencia, en función de la concentración de Na^+ en el medio de ensayo de la actividad antiportadora, en vesículas de tonoplasto aisladas de raíces de plántulas de girasol (variedad Alhama) tratadas con 75 y 150 mM de NaCl; la actividad antiporte Na^+/H^+ fue determinada en presencia (+-+) y ausencia (*-*) amilorido. (B), Representación de Hanes-Wolf derivada de estas cinéticas, cuyas rectas se ajustaron por regresión lineal. Los datos son la media de 3 experimentos independientes.

Resultados

Tabla 34. Valores cinéticos, K_M aparente y V_{max} de la actividad antiporte Na^+/H^+ , derivados de la cinética de la figura 21 así como el efecto de $125 \mu M$ de amilorido sobre esta actividad, derivada de la cinética de la Figura 22. Los datos son la media de 3 experimentos independientes. Letras iguales en cada columna representan grupos homogéneos según el análisis multifactorial de Duncan, $p = 95\%$.

Tratamiento <i>in vivo</i> (mM) NaCl	Ecuación de regresión	Coef. de Correlación	K_M (mM)	V_{max} $\mu mol \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$
75	$y = 1.41 + 0.02x$	0.98	64.0 _b	45.4 _a
150	$y = 0.19 + 0.02x$	0.99	7.9 _d	41.7 _a
Amilorido				
75	$y = 2.77 + 0.02x$	0.92	140.0 _a	50.0 _a
150	$y = 0.33 + 0.02x$	0.99	13.5 _c	40.8 _a

VI. DISCUSSION



El objetivo de este trabajo era el efecto del estrés salino sobre los sistemas H^+ -ATPasa de plasmalema y tonoplasto y H^+ -PPasa y antiporte Na^+/H^+ de tonoplasto en plántulas de girasol sometidas a estrés salino moderado y severo, con el fin de profundizar en los mecanismos de tolerancia de las plantas a dicho estrés.

Para observar este efecto se requería previamente el aislamiento de fracciones de membranas enriquecidas en en plasmalema y tonoplasto y la caracterización de dichas actividades enzimáticas. Mediante el uso del gradiente continuo y discontinuo de sacarosa se obtuvo una fracción de membrana obtenida a partir de raíces de girasol, conteniendo las actividades H^+ -ATPasa y H^+ -PPasa de tonoplasto, reconocidas en base a sus bien estudiadas características bioquímicas tales como sensibilidad a inhibidores, efecto de iones, especificidad de sustrato y reacción cruzada con anticuerpos específicos.

La H^+ -ATPasa sensible a nitrato de raíces de girasol se estimulaba por aniones, no se afectaba por cationes y era inhibida por DCCD, DES, DIDS, eritrosina B y $HgCl_2$ (O'Neill y col. 1983, Poole y col. 1984, Blumwald 1987, Hoffman-thoma y Willenbrick 1993). La actividad PPasa estimulada por K^+ fue específicamente inhibida por IMPD y KF, y diferencialmente inhibida por DCCD, eritrodina B, DES y DIDS (Wang y col. 1986, Chanson y Pilet 1988, Hoffman-thoma y Willenbrick 1993). Aunque mas ácido que en otros orígenes vegetales, el óptimo de pH de la ATPasa de girasol fue similar al de raíces de trigo (O'Neill y col. 1983) y hipocotilos de *Vigna radiata* (Kawata y Yoshida 1988). Los valores de K_m aparente eran similares a los obtenidos para el enzima ATPasa de tonoplasto (O'Neill y col. 1984, Wang y col. 1986, Chanson y col. 1988, Pugliarello y col. 1991). Los valores de latencia de la ATPasa y PPasa no coincidieron, lo que podría ser debido a que ambos enzimas presentan una sensibilidad diferencial al detergente (Pugliarello y col. 1991, Zingarelli y col. 1994).

Los ensayos enzimáticos e inmunológicos demostraron que la ATPasa y

Discusión

PPasa de tonoplasto estaban también significativamente presentes en la fracción del gradiente discontinuo de sacarosa enriquecida en plasmalema (interfase 32/43) así como las membranas de RE y Golgi. A este respecto, la separación de membranas de raíces de girasol por gradiente continuo de sacarosa en la presencia de Mg^{2+} , mostró dos poblaciones de vesículas altamente enriquecidas en actividades ATPasa sensible a nitrato e insensible a azida y PPasa estimulada por K^+ , que coemigran a regiones más pesadas (plasmalema y RE) y ligeras (tonoplasto, RE y Golgi), respectivamente. Ha sido descrito que en presencia de Mg^{2+} , el tonoplasto se agrega con el RE localizándose así el zonas del gradiente de sacarosa de más densidad (Chanson 1990). Similarmente, las vesículas de tonoplasto de plántulas de rabano se equilibraron a altas densidades del gradiente de sacarosa, lo cual podría ser debido a las proteínas atrapadas en las vesículas de vacuolas durante la germinación y desarrollo de las raíces de las plántulas (Pugliarello y col. 1991). Además, el RE y Golgi obtenidos a partir de células jóvenes de raíces están adesionados al sistema vacuolar dificultando el aislamiento del tonoplasto (Sze y col. 1992).

Los estudios de los efectos del estrés salino en otros orígenes vegetales mostraron una estimulación de la actividad H^+ -ATPasa en raíces de centeno (Matsumoto y Chung 1988), células de tabaco (Reuveni y col. 1990), raíces de tomate (Sanchez-Aguayo y col. 1991) y raíces de *Vigna radiata* asociada a una inhibición de la actividad PPasa (Nakamura y col. 1992). En otros trabajos, la actividad PPasa incrementó en células de *Acer pseudoplatanus* (Zingarelli y col. 1994) y células de zanahoria creciendo en NaCl no afectándose la actividad ATPasa (Colombo y Cerana, 1993). Se ha sugerido que esta controversia podría ser debido a las condiciones materiales y experimentales utilizadas (Colombo y Cerana, 1993).

En este trabajo, la actividad transportadora de H^+ dependiente de ATP y PPi incrementó fuertemente por concentraciones de NaCl moderadas y severas, mientras que la actividad PPasa incrementó ligeramente a altas concentraciones

de NaCl y la actividad ATPasa no cambió. El incremento en las actividades bombeadoras de H⁺ de vesículas de tonoplasto no parece ser debido ni a un incremento en la síntesis de los enzimas, ya que las cantidades de proteína antigénica ATPasa y PPasa no se alteraron, ni a cambio en la latencia de las vesículas. De cualquier modo, las características y propiedades básicas de ambas enzimas no cambiaron aparentemente en tonoplasto de raíces de girasol creciendo bajo condiciones salinas.

No está claro como el NaCl aumentó las actividades bombeadoras de H⁺ sin incrementos proporcionales en las actividades fosfohidrolíticas. En el caso de la ATPasa, el transporte de H⁺ podría ser sobreestimado, ya que el nitrato inhibe el transporte mas fuertemente que la hidrólisis de ATP (Vicente y Vale 1994). En células de tabaco adaptadas al NaCl, Reuveni y col. (1990) mostraron un incremento de la actividad específica ATPasa con una reducción de la cantidad de la subunidad de 70 kDa de la ATPasa de tonoplasto, en comparación con células no adaptadas. La estimulación de la actividad H⁺-ATPasa en raíces de cebada fue inhibida por tratamientos *in vivo* con cicloheximida y actinomicina D (Matsumoto y Chung 1988). Se ha aportado evidencias de la existencia de numerosas isoformas de la V-ATPasa específicas de tejidos, orgánulos o estreses (Narasinham y col. 1991, Sze y col. 1992, Berkelman y col. 1994), así como isoformas de V-PPasa específicas de tejidos (Rea y Poole 1993, Kim y col. 1994). Es posible la inducción de isoformas mas activas de ambas enzimas por estrés salino. Alternativamente, ha sido descrita la regulación postraducciona de la ATPasa y PPasa por modulación lipídica o fosforilación (Bille y col. 1992, Martiny-Baron y col. 1992, Rea y Poole 1993).

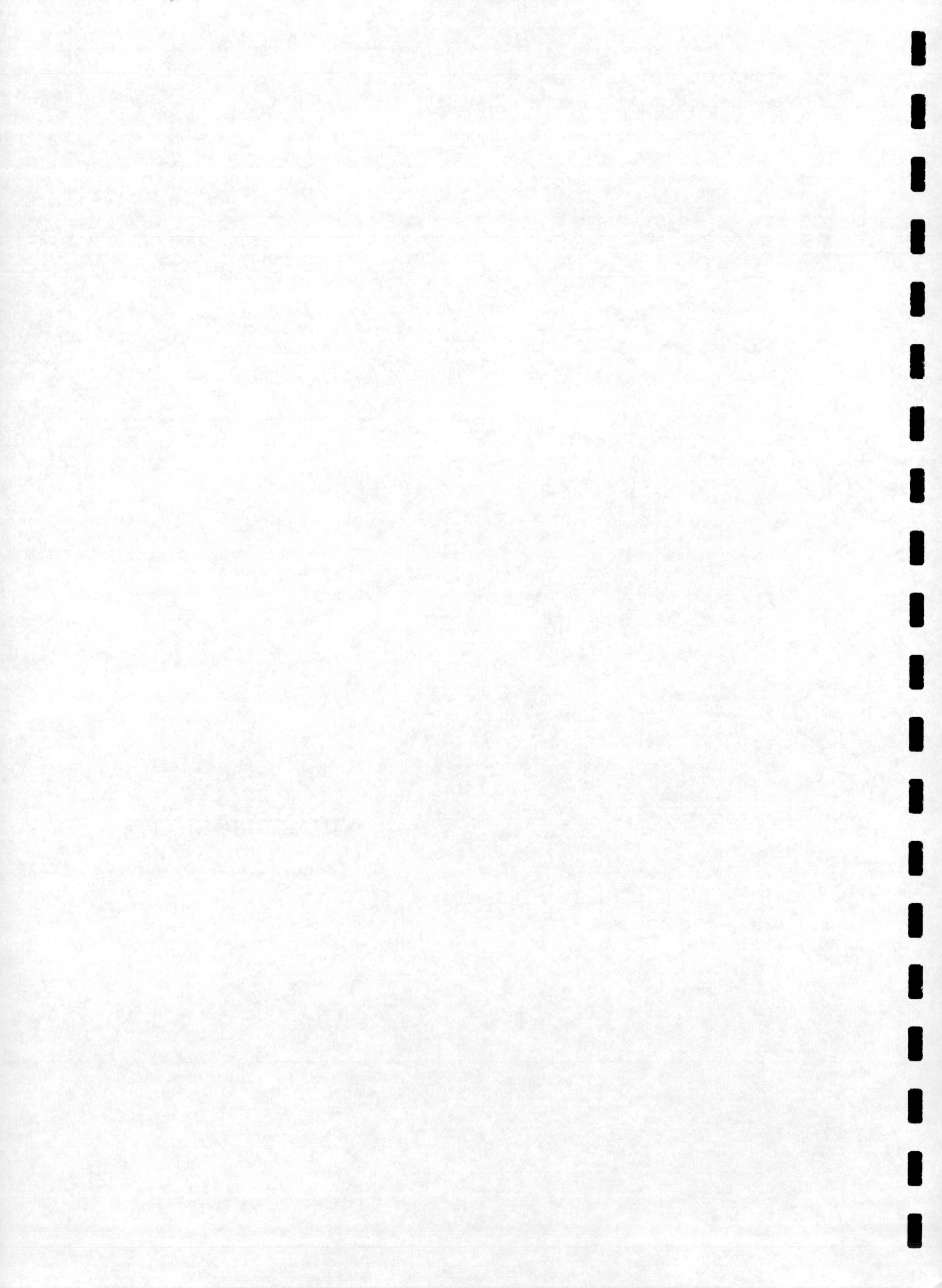
La importante contaminación de Golgi detectada en membranas enriquecidas en tonoplasto de raíces tratadas con NaCl, podría contribuir al incremento de la actividad transportadora de H⁺. Así, se han encontrado isoformas de la ATPasa con características similares a los enzimas V-ATPasa y V-PPasa en fracciones de golgi (Sze y col. 1992, Rea y Poole 1993). Sin

Discusión

embargo, en una fracción enriquecida en membranas de Golgi y RE de raíces de trigo, el molibdato inhibió la actividad PPasa en un 80% mientras que el nitrato no afectó la actividad ATPasa (Vicente y Vale 1991, 1994). En el presente trabajo, la actividad PPasa y transporte de H^+ dependiente de PPi no se afectaron por molibdato, y la actividad ATPasa sensible a nitrato fue medida en presencia de molibdato, azida, oligomicina y vanadato, lo que se considera ser de origen tonoplastidial (O'Neill y col. 1983, Poole y col. 1984). Sin embargo, la fuerte inhibición por vanadato de la actividad ATPasa podría ser explicada, en parte, al contenido de ATPasa sensible a vanadato de la membrana plasmática y/o a la importante contaminación por RE, ya que se ha atribuido a esta fracción actividad ATPasa sensible a vanadato (Kawata y Yoshida 1988). De cualquier modo, la actividad ATPasa sensible a vanadato podría ser también una fosfatasa no específica (Vicente y Vale 1991).

Un aumento en la actividad bombeadora de H^+ en tonoplasto es considerado como un mecanismo homeostático para tolerar el estrés salino ya que aporta la energía necesaria para la actividad de los sistemas antiporte de esta membrana requerida para el eficiente control de la concentración citoplasmática de Na^+ (Matsumoto y Chung 1988, Reuveni y col. 1990, Sanchez-Aguayo y col. 1991, Nakamura y col. 1992, Colombo y Cerana 1993). En este sentido, Haro y col. (1993) han sugerido que la acumulación de Na^+ en las vacuolas de células de raíces reduciría la transferencia de Na^+ desde la parte aérea de la planta a las raíces. Este podría ser el caso de las membranas de girasol tratadas con 75 mM de NaCl. Como las zonas apicales de la planta paran el crecimiento en condiciones de estrés salino, la respuesta homeostática puede ser menor y de menor eficacia.

VIII. BIBLIOGRAFIA



- Ames NB (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzimol* 8:115-118.
- Arellano JB (1994) Cobre y fotosistema II: análisis de su función y efecto tóxico. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 215 pp.
- Baker DA (1984) Water relations. *In Advanced Plant Physiology*. Wilkins MB (ed), pp 298-318. Pitman Press, Londres.
- 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.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39:205-207.
- Belver A, Donaire JP (1983) Partial purification of soluble lipoxygenase of sunflower cotyledons: action of boron on the enzyme and lipid constituents. *Z Pflanzenphysiol* 109:309-317.
- Belver A (1986) Cambios metabólicos y estructurales inducidos por el boro en raíces y cotiledones de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. 278pp.
- 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 membrane vesicles. Kinetic analysis of Cl⁻ effects on a proton-translocating ATPase. *J Membr Biol* 71:95-107.
- 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.
- Blight EG, Dyer WS (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Biophys* 37:911-917.

Bibliografía

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.

Blumwald E, Poole RE (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 RE (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 PA, Poole RJ (1987) Preparation of tonoplast vesicles: applications to H⁺-coupled secondary transport in plant vacuoles. *Methods Enzimol.* 148:115-123.

Blumwald E, Cragoe EJJ, Poole RJ (1987) Inhibition of Na⁺/H⁺ antiport activity in sugar beet tonoplast by analysis of amiloride. *Plant Physiol* 85:30-33.

Bowman ES, Siebers A, Altendorf K (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganism, animal cell and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7972-7976.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram 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 an indirect coupling mechanism for the nitrate-sensitive proton pumping from corn root tonoplast membranes. *Physiol Plant* 89:588-591.

Braun Y, Hassidim, Lerner HR, Reinhold L (1986) Studies on H⁺ translocating ATPases 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, Haschke HP, Luttge U (1988) Separation and purification of the tonoplast ATPase and pyrophosphatase from plants with constitutive and inducible *Crasulaceam acid* metabolism. *Planta* 175:465-470.
- Bruggeman W, Janiesch P (1987) Characterization of plasma membrane H⁺-ATPase from salt-tolerant and salt-sensitive *Plantago* species. *J Plant Physiol* 130:395-411.
- Bruggeman W, Janiesch P (1988) Properties of native and solubilized plasma membrane ATPase from the halophyte *Plantago crassifolia*, grown under saline and non-saline conditions. *Physiol Plant* 74:615-622.
- Bruggeman 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.
- Burgos PA (1993) Estudio comparativo del enzima H⁺-ATPasa, composición lipídica y fluidez en plasmalema y tonoplasto de raíces de girasol y jojoba. Efecto del NaCl. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. 155 pp.
- Chanson A (1990) Use of pyrophosphatase activity as a reliable tonoplast marker in maize roots. *Plant Sci* 71:149-207.
- Chanson A, McNaughton E, Taiz L (1984) Evidence for a KCl-stimulated Mg²⁺-ATPase on the Golgi of corn coleoptiles. *Plant Physiol* 76:498-507.
- Chanson A, Pilet PE (1987) Localization in sucrose gradients of the pyrophosphate-dependent proton transport of maize root membranes. *Plant Physiol* 84:1431-36.
- Chanson A, Pilet PE (1988). Characterization of the pyrophosphate-dependent proton transport in microsomal membranes from maize roots. *Physiol Plant* 74:643-650.

Bibliografía

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* 90:934-934.

Cheeseman JM (1988) Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol* 87:547-550.

Colombo R, Cerana R (1993) Enhanced activity of tonoplast pyrophosphatase in NaCl-grown cells of *Daucus carota*. *J Plant Physiol* 142:226-229.

Cuartero J, Yeo AR, Flowers TJ (1992) Selection of donors for salt-tolerance in tomato using physiological traits. *New Phytol* 121:63-69.

Davies JM, Rea PA, Sanders D (1991) Vacuolar proton pumping pyrophosphatase in *Beta vulgaris* shows vectorial activation by potassium. *FEBS Lett* 278:66-68.

De Michelis MI, Spanswick RM. (1986) H⁺-pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol* 81:542-547.

Douce R (1964) Identification et dosage de quelques glicerolipides dans des suches normales et tumorales de scorsonet cultivées in vitro. *C R Acad Sci Paris* 259:3066-3068.

Douglas TJ, Walker RR (1984) Phospholipids, free sterols and adenosine triphosphatase of plasma membrane-enriched preparations from roots of *Citrus* genotypes differing in chloride exclusion ability. *Physiol Plant* 62:51-58.

Dupont FM, Tanaka CK, Hurkman WJ (1988) Separation and immunological characterization of membrane fractions from barley roots. *Plant Physiol* 86:717-724.

Ewing NN, Wimmers LE, Meyer DJ, Chatelat RT, Bennett AB (1990) Molecular cloning of tomato plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 94:1874-1881.

- Fales F (1951) The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. *J Biol Chem* 193:133-157.
- Fan TWM, Higashi RM, Norlyn J, Epstein E (1989) In vivo ^{23}Na and ^{31}P 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, Belver A, Roldan M, Rodriguez-Rosales MP, Donaire JP (1993) Effects of boron on proton transport and membrane properties of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cell microsomes. *Plant Physiol* 103:763-769.
- 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 (1986). Water relations of plant under drought and salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* 13:75-91.
- Fraichard A, Magrin T, Trossat C, Pupin A (1993) Properties of the proton pumping pyrophosphatase in tonoplast vesicles of *Acer pseudoplatanus*. Functional molecular mass and polypeptide composition. *Plant Physiol Biochem* 31:349-359.
- Gadner HW (1988) Preparative isolation of monogalactosyl and digalactosyl diglycerides by thin layer chromatography. *J Lipids Res* 9:139-141.
- Gallagher SR, 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 activity after phase partitioning. *Plant Physiol* 87:491-497.
- Garbarino J, Dupont FM (1989) Rapid induction of Na^+/H^+ exchange activity in barley root tonoplast. *Plant Physiol* 89:1-4.

Bibliografía

- Giannini JL, Gildensoph LH, Briskin DP (1987).** Selective production of sealed plasma membrane vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) Storage tissue. Arch Biochem Biophys 259:621-630.
- Gogarten JP, Starke T, Kibak H, Fishmann J, Taiz L (1992)** Evolution and isoforms of V-ATPase subunits. J Exp Biol 172:137-147.
- Gogstad GO, Krutner MG (1982)** Measurements of protein in cell suspension using the coomassie brilliant blue dye binding assay. Anal Biochem 126:355-359.
- Green JR (1983)** The Golgi apparatus. In Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells. Hans JL, Moore AL (eds), pp 135-152. Academic Press, London.
- Greenway H, Munns R (1980)** Mechanisms of salt-tolerance in non-halophytes. Annu Rev Plant Physiol 31:149-190.
- Grenier G, Tremolieres A, Therrien MP, Willemot L (1973)** Influence du froid sur la synthese des acides gras dans les racines de deux varietés de luzerne, l'une très resistente et l'autre moins resistente au froid. Physiol Veg 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, Boloeil C, Lallemand JI (1989)** Regulation of vacuolar pH of plant cells.II. A ³¹P NMR study of the modification of vacuolar pH in isolated vacuoles induced by proton pumping and cation/H⁺ exchanges. Plant Physiol 89:27-36.
- Johannes E, Felle HH (1989)** The role of Mg²⁺ in proton transport by the tonoplast pyrophosphatase in *Riccia fluitans* vacuoles. Physiol Plant 77:326-33.
- Johansson F, Sommarin M, Larsson C (1993)** Fusicoccin activates the plasma membrane H⁺-ATPase by a mechanism involving the C-terminal inhibitory domain. Plant Cell 5:321-327.

- Haitz M, Lichtenthaler HK (1988) The measurements of Rfd-values as plant vitality indices with the portable field chlorophyll fluorescence and the PAM-fluorometer. *In* Application of Chlorophyll Fluorescence. Lichtenthaler HK (ed), pp 249-254. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Hall JL. (1983) Plasma membrane. *In* isolation of membrane and organelles from plant cells. Hall JL, Moore AC (eds), pp 55-81. Academic Press, London.
- Haro R, Bañuelos MA, Quintero FJ, Rubio F, Rodriguez-Navarro A (1993) Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiol Plant* 89:868-874.
- Harper JF, Manney L, Dewitt ND, Joo MH, Sussman MR (1990) The *Arabidopsis thaliana* plasma membrane H⁺-ATPase multigene family. Genomic sequence and expression of a third isoform. *J Biol Chem* 265:13601-13608.
- 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.
- 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 a plasma membrane adenosine phosphatase from plant roots. *Method Enzimol* 32:392-406.
- Hsu AF, Rodenbach S, Tu SI (1992) Effects of dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) treatment on coupled activities of vanadate-sensitive ATPase from plasma membrane of maize roots. *Physiol Plant* 85:17-22.

Bibliografía

- Hurkman WJ (1992) Effect of salt stress on plant gene expression: a review. *Plant Soil* 146:145-151.
- Kawata T, Yoshida S (1988) Characterization of ATPase associated with various cellular membranes related from etiolated hypocotils of *Vigna radiata* (L) Wilczek. *Plant Cell Physiol* 29:1399-1410.
- Krause H, Weis E (1988) The photosynthetic apparatus and chlorophyll fluorescence. An introduction. *In Applications of Chlorophyll Fluorescence*. Lichtenthaler HK (ed), pp 3-11. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Krishnaraj S, Mawson BT, Yeung EC, Thorpe TA (1993) Utilization of induction and quenching kinetics of chlorophyll a fluorescence for *Triticum aestivum* (vars. Kharchia-65 and Fielder). *Can J Bot* 71:87-92.
- Kuiper PJC (1985) Environmental changes and lipid metabolism of higher plants. *Physiol Plant* 64:118-122.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 222:680-685.
- Lafuente MT, Belver A, Guye MG, Saltveit Jr ME (1991) Effect of temperature conditioning on chilling injury of cucumber cotyledons. Possible role of abscisic acid and heat shock proteins. *Plant Physiol* 95:443-449.
- Lechevallier D (1966) Les lipides des lemnaées: analyse des acides gras des lipides des froudes de *Spirodela polyrrhiza*. *C R Acad Sci Paris* 263:1489-1852.
- Leigh RA, Pope AJ. (1987) Understanding tonoplast function: some emerging problems. *In Plant Vacuole: their Importance in Solute Compartmentation in Cells and Their Applications in Plant Biochechnology*. Marin B (ed).pp 101-110. Plenum Press, New York.pp.101-110.
- Leigh RA, Pope AJ, Jennings IR, Sanders D.(1992) Kinetics of the vacuolar H⁺-pyrophosphatase: the roles of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates, activators, and inhibitors. *Plant Physiol* 100:1698-1705.
- Lenz B (1989) Membrane fluidity as detected by diphenylhexatriene probes. *Chem Phys Lipids* 50:171-190.

- Lessani H, Marschner H (1978) Relation between salt tolerance and long-distance transport of sodium and chloride in rangus crop species. *Aust J Plant Physiol* 5:27-37.
- Lichtenthaler HK (1988) In vivo chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants. *In* Applications of Chlorophyll Fluorescence. Lichtenthaler HK (ed), pp 129-142. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Lynch DV, Lepock JR, Thompson JE (1987) Temperature induced changes in lipid fluidity alter the conformation of proteins in senescing plant membranes. *Plant Cell Physiol*. 28:787-797.
- Macri F, Vianello A (1990) Proton pumping pyrophosphatase in a high density fraction of radish microsomes. *Plant Cell Physiol* 31:261-266.
- McCue KF, Hanson AD (1990) Droughtit and salt tolerance towards understanding and application. *Trends Biotech* 8:358-362.
- 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 vaculoar membrane. *Plant Physiol* 98:1248-1254.
- Martiny-Baron G, Manolson MF, Poole RJ, Hecker D, Schere r GFF (1992) Proton transport and phosphorylation of tonoplast polypeptides from zucchini are stimulated by the phopholipid platelet-activating factor. *Plant Physiol* 96:1635-1641.
- Matsumoto H, Chung GC (1988) Increase in proton transport activity of tonoplast vesicles as an adaptative response of barley roots to NaCl stress. *Plant Cell Physiol* 29:1133-1140.
- 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.

Bibliografía

- Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR (1966) Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 38:514-515.
- 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.
- 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.
- Neuner G, Larcher W (1990) Determination of differences in chilling susceptibility of two soybean varieties by means of in vivo chlorophyll fluorescence. *J Agronomy Crop Sci* 164:73-80.
- Niu X, Narasimhan ML, Salzman RA, Bressan RA, Hasegawa PM (1993) NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. *Plant Physiol* 103:713-718.
- Niu X, Zhu JK, Narasimhan ML, Bressan RA, Hasegawa PM (1993) Plasma membrane H⁺-ATPase gene expression is regulated by NaCl in cells of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Planta* 190:433-438.
- Noble CL, Rogers ME (1992) Arguments for the use of physiological criteria for improvement the salt tolerance in crops. *Plant and Soil* 146:99-107.
- Ögren E (1990) Evaluation of chlorophyll fluorescence as a probe for drought stress in willow leaves. *Plant Physiol* 93:1280-1285.
- Olivari C, Pugliarello MC, Rasi-Caldogno F, De Michelis MI (1993) Characteristics and regulatory properties of the H⁺-ATPase in a plasma membrane fraction purified from *Arabidopsis thaliana*. *Bot Acta* 106:13-19.
- O'Neill SD, Bennett AB, Spanswick RM (1983) Characterization of a NO₃-sensitive H⁺-ATPase from corn roots. *Plant Physiol* 72:837-846.

- Palmgren MG, Sommarin M, Ulvskov P, Larsson C (1990)** Effect of detergents on the H⁺-ATPase activity of inside out and right-side out plant plasma membrane vesicles. *Biochem Biophys Acta* 1021:133-140.
- 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.
- Pardo JM, Serrano R (1989)** Structure of a plasma membrane H⁺-ATPase gene from the plant *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 264:8557-8562.
- Parets-Soler A, Pardo JM, Serrano R (1990)** Immunocytolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 93:1654-1658.
- Patti V, Curti G, Lado P (1992)** Characteristic of vanadate-sensitive ATPase activities migrating to different densities on a sucrose gradient in microsomes from *Acer pseudoplatanus* cells. *Plant Sci* 82:135-144.
- Perez-Alfocea F, Estañ MT, Caro M, Bolarin MC (1993)** Response of tomato cultivars to salinity. *Plant and Soil* 150:203-211.
- Perez-Alfocea F, Estañ MT, Caro M, Guerrier G (1993)** Osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennelli* under NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stresses. *Physiol Plant* 87:493-498.
- Pinta M (1973)** Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. Détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu pour absorption atomique. *Oleagineux* 28(2):87-92.
- 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.

Bibliografía

- 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.
- Pugin A, Montrichard, F (1988) Some effectors of vacuolar ATPase and pyrophosphatase of *Acer pseudoplatanus*. *Life Sci Adv Plant Physiol*.7: 97-100.
- Quail PH (1979) Plant cell fractionation. *Ann Rev Plant Physiol* 30:425-484.
- Rea PA, Poole RJ (1985) Proton-translocating inorganic pyrophosphatase in reed beet (*Beta vulgaris* L.) tonoplast vesicles. *Plant Physiol* 77:46-52.
- Rea PA, Britten CJ, Sarafian V (1992) Common identity of substrate-binding subunit of vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase of higher plant cells. *Plant Physiol* 100:723-732.
- Rea PA, Poole RJ (1993) Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44:157-80.
- Redmann RE, Haraldson J, Gusta LV (1986) Leakage of UV-absorbing substances as a measure of salt injury in leaf tissue of woody species. *Physiol Plant* 67:87-91.
- 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.
- Reuveni M (1993) Changes in vacuolar pH of carrot cells in suspension culture grown under saline conditions. *Biol Plant* 35:1-9.
- Roldán M, Donaire JP, Pardo JM, Serrano R (1991) Regulation of root plasma membrane H⁺-ATPase in sunflower seedlings. *Plant Sci* 79:163-172.
- Rottenberg H, Moreno-Sanchez R (1993) The proton pumping activity of the H⁺-ATPases: an improved fluorescence assay. *Biochem Biophys Acta* 1183:161-170.

- Sanchez-Aguayo I, Gonzalez-Utor AL, Medina A (1991) Cytochemical localization of ATPase activity in salt-treated and salt-free grown *Lycopersicon esculentum* roots. *Plant Physiol* 96:153-158.
- Sanchez-Aguayo I, Gonzalez-Utor AL (1992) Quantitative determination of changes induced by NaCl in vacuoles and cellular size of *Lycopersicon esculentum* root cells. *Plant Cell Environm* 15:867-870.
- Sarafian V, Kim Y, Poole RJ, Rea PA (1992a) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuole membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1775-1779.
- Sarafian V, Potier M, Poole RJ (1992b) Radiation-inactivation analysis of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺ pyrophosphatase from *Beta vulgaris*. *L Biochem J* 283, 493-394.
- Sarafian V, Kim Y, Poole RJ, Rea PA (1992c) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphatase from vacuole membranes of red beet. *Plant Physiol*. 91: 34-38.
- Schaller GE, Sussman MR (1988) Phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase of oat roots by a calcium-stimulated protein kinase. *Planta* 173:509-518.
- Schapendork A HCM, Dolsta O, Van Kooten O (1989) The use of chlorophyll fluorescence as a screening method for cold tolerance in maize. *Photosynth Res* 20:235-247.
- Schreiber U, Bilger W (1987) Rapid assessment of stress on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. *In* *Plants Response to Stress. Functional Analysis in Mediterranean Ecosystem*. NATO ASI Series vol G15. Tenhunen JD, Catarino FM, Lange OL, Oechel WC (eds). pp 27-53. Springer-Verlag, Berlin.
- Schubert S, and Läuchli A (1986) Na⁺ exclusion, H⁺ release, and growth of two different maize cultivars under NaCl salinity. *J Plant Physiol* 126:145-154.
- Seemann JR, Chritchley (1985) Effects of salt stress on the grown, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt sensitive species *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 164:151-162.

Bibliografía

- Segel IH (1972) Cálculos en Bioquímica. 426 pp. Ed Acribia. Zaragoza.
- Senaratna T, McKersie BD (1983) Dehydration injury in germinating Soybean (*Glycine max* L. Merr.) seeds. *Plant Physiol* 72:620-624.
- Serrano R (1985) Plasma Membrane ATPase of Plants and Fungi. 174 pp. CRC Press. Boca Raton.
- Serrano R (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:61-94.
- Shannon MC, Gronwald JW (1987) Effects of salinity on growth and accumulation of organic and inorganic ions in cultivated and wild tomato species. *J Amer Soc Hor Sci* 112:416-423.
- Shimtzki M, Barenholz V (1978) Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochem Biophys Acta* 515: 603-615.
- Skok J (1957) The substitution of complexing substances for boron in plant growth. *Plant Physiol* 32:308-315.
- Sobrado MA, Turner NC (1983) Influence of water deficits on the water relation characteristics and productivity of wild and cultivated sunflowers. *Aust J Plant Physiol* 10:195-203.
- 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, Overbeek 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.
- 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.
- Sulc RM, Albrecht KA, Duke SH (1991) Leakage on intracellular substances as an indicator of freezing injury in alfalfa. *Crop Sci* 31:430-435.

- Szabo-Nagy A, Beeerczi A (1989) Characterization of plasma membrane ATPase purified by phase partitioning from sunflower roots. *Biochem Physiol Pflanzen* 185:181-187.
- Sze H (1985) H⁺-translocating ATPase: advances using membrane vesicles. *Ann 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.
- Taiz L (1992) The plant vacuole *J Exp Biol* 172:113-122.
- Takehige K, Hager A (1988) Ion effects on the H⁺-translocating adenosine triphosphatase and pyrophosphatase associated with the tonoplast of 24 *Chara corallina*. *Plant Cell Physiol* 29:649-657.
- 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.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon JC (1979) Electrophoretic transfers of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354.
- Vera-Estrella R, Barkla BJ, Higgins VJ, Blumwald E 1994 Plant defense response to fungal pathogens. Activation of host-plasma membrane H⁺-ATPase by elicitors-induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiol* 104:209-215.
- Vicente JAF, Vale MGP (1991) Differentiation between several types of phosphohydrolases in light microsomes of corn roots. *Plant Physiol* 96:1345-1353.
- Vorbeck ML, Martinetti GV (1965) Separation of glycosyl diglycerides from phosphatides using silicic acid column chromatography. *J Lip Res* 6:3-6.

Bibliografía

Wagner G (1983) Higher plant vacuolar and tonoplasts. *In* Isolation of Membrane and Organelles from Plant Cell. Hall GL, Moore AL (eds), pp 83-118. Academic Pres. London.

Walker KE, Taiz L (1988) Characterization of the vacuolar proton pumps of the cortex, stele and tip of maize roots: effects of salinity. *Bot Acta* 101:182-186.

Wang Y, Leigh RA, Kaestner KH, Sze H (1986) Electrogenic H⁺-pumping pyrophosphatase in tonoplast vesicles of oat roots. *Plant Physiol* 81:497-502.

Weinberg R, Lerner HR, Polyakoff-Mayber A (1981) Kinetics of toluene-induced leakage of low molecular weight solutes from excised sorghum tissues. *Plant Physiol* 68:1433-1438.

White PJ (1994) Bafilomycin A1 is a non-competitive inhibitor of the tonoplast H⁺-ATPase of maize coleoptiles. *J Exp Bot.*45:1397-1402.

White PJ, Marshall J, Smith AC (1990) Substrate kinetics of the tonoplast H⁺ translocating inorganic pyrophosphatase and its activation by free Mg²⁺. *Plant Physiol* 93:1063-1070.

Wimmers LE, Ewing NN, Bennett AB (1992) Higher plant Ca²⁺-ATPase: primary structure and regulation of mRNA abundance by salt. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9205-9209.

Yamanishi H, Kasamo K (1993) Modulation of the activity of purified tonoplast H⁺-ATPase from mung bean (*Vigna radiata* L.) by various lipids. *Plant Cell Physiol* 34:411-419.

Yeo AR, Kramer D, Laüchli A (1977) Ion distribution in salt stressed mature *Zea mays* roots in relation to ultrastructure and retention of sodium. *J Exp Bot* 28:17-29.

Yeo AR (1983) Salinity resistance. Physiologies and prices. *Physiol Plant* 58:214-222.

Zhen RG, Baykov AA, Bakuleva NP, Rea PA (1994) Aminomethylenediphosphonate: a potent type-specific inhibitor of both plant and phototrophic bacterial H⁺-pyrophosphatases. *Plant Physiol* 104:153-159.