

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
Departamento de Biología y Producción de los vegetales

**ESTUDIO DE LOS FLUJOS NETOS SIMULTÁNEOS DE H⁺ Y K⁺ Y LA
ACTIVIDAD RREDOX EN RAÍCES AEROPÓNICAS ESTÉRILES DE
PLÁNTULAS DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.)**

Memoria presentada por D^a Inmaculada Garrido Carballo para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas.

Badajoz, Octubre 1997.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

1. Importancia del K^+ para las plantas: principales funciones del K^+ en el organismo vegetal
2. Disponibilidades de K^+ para la raíz en condiciones naturales
3. Absorción de K^+ por las raíces
 - 3.1. Cinética de absorción de iones K^+ por raíces enteras
 - 3.2. Transportadores de K^+ identificados en membranas de células vegetales mediante investigaciones a nivel molecular
 - 3.2.1. Resultados obtenidos tras la aplicación de técnicas electrofisiológicas de patch-clamp a membranas vegetales
 - 3.2.2. Incorporación de las técnicas de genética molecular e ingeniería genética a la identificación de transportadores de K^+ en membranas vegetales
 - 3.3. Relación entre el transporte de K^+ y el de H^+ : Energética del transporte de K^+
4. Efecto de distintos aditivos (efectores) sobre los flujos de H^+ y K^+
 - 4.1. Efectores que actúan sobre el transporte de K^+
 - 4.1.1. Valinomicina
 - 4.1.2. Ouabaina
 - 4.2. Efectores que actúan sobre los canales de H^+
 - 4.2.1. DCCD (Diciclohexilcarbodiimida)
 - 4.3. Efectores que actúan sobre la H^+ -ATPasa
 - 4.3.1. Oligomicina
 - 4.3.2. Vanadato
 - 4.4. Efectores que actúan sobre la cadena redox del plasmalema
 - 4.4.1. Donadores y aceptores de electrones de la cadena redox del plasmalema
 - 4.4.2. cis-Platino (II)
5. El uso de electrodos específicos en las medidas de flujos iónicos de H^+ y K^+
6. Superóxido Dismutasa (SOD)

OBJETIVOS

MATERIALES Y METODOS

1. Materiales
 - 1.1. Material vegetal

- 1.2. Reactivos utilizados
- 1.3. Aparatos
2. Métodos
 - 2.1. Calibraciones realizadas con electrodo selectivo de K^+
 - 2.1.1. Comprobación del buen funcionamiento del electrodo selectivo de K^+
 - 2.1.2. Comprobación de la carencia de histéresis del electrodo
 - 2.1.3. Curvas de calibración del electrodo de K^+ a diferentes pH, en Hepes 1 mM
 - 2.1.4. Curvas de calibración del electrodo de K^+ a diferentes pH, en Hepes 1 mM + $CaCl_2$ 1mM
 - 2.2. Interferencia entre los electrodos usados en las medidas
 - 2.3. Calibración de la capacidad tampón para H^+ y K^+ del medio de medida sin y con raíces
 - 2.3.1. Calibración de la capacidad tampón del medio base (Hepes 1 mM + $CaCl_2$ 1 mM)
 - 2.3.2. Calibración de la capacidad tampón del medio (Hepes 1 mM + $CaCl_2$ 1 mM) con raíces preincubadas en NaCN
 - 2.4. Medida simultánea de la cinética de eflujo neto de H^+ y de influjo neto de K^+ por raíces “in vivo”
 - 2.5. Medida simultánea de la cinética de flujos netos de H^+ y K^+ por raíces “in vivo”, en presencia de diferentes efectores (activadores e inhibidores)
 - 2.5.1. Preparación de los aditivos
 - 2.5.2. Adición de los efectores a la cámara de medida donde se realiza la cinética
 - 2.5.3. Calibración de la capacidad tampón para H^+ y K^+ del medio con raíces preincubadas en NaCN en presencia de los efectores
 - 2.5.4. Expresión de los resultados de inhibición o activación de los flujos iónicos en presencia de los diferentes efectores
 - 2.6. Controles o “Blancos” de la cinética de flujos iónicos, con raíces preincubadas en NaCN
 - 2.7. Medidas de la actividad redox de las raíces
 - 2.8. Medida de la actividad Superóxido Dismutasa (SOD) exógena de las raíces
 - 2.8.1. Técnica utilizada
 - 2.8.2. Estimación de la actividad SOD exógena
 - 2.8.3. Cálculo de la Actividad enzimática
 - 2.8.4. Medida de la Actividad SOD exógena en presencia de efectores

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Calibraciones realizadas con el electrodo selectivo de K^+
 - 1.1. Control del funcionamiento del electrodo
 - 1.2. Comprobación de la ausencia de histéresis en la respuesta del electrodo selectivo de K^+
 - 1.3. Curvas de calibración del electrodo de K^+ en los medios de medida utilizados en las experiencias
 - 1.3.1. Curvas de calibración del electrodo de K^+ en Hepes 1 mM
 - 1.3.2. Curvas de calibración del electrodo de K^+ en Hepes 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM
2. Capacidad tampón para H^+ y K^+ del medio sin y con raíces
 - 2.1. Capacidad tampón (β) del medio Hepes 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM. Comprobación de la existencia o no de interferencias entre electrodos
 - 2.1.1. Capacidad tampón del medio para H^+ (βH^+)
 - 2.1.2. Capacidad tampón del medio para el K^+ (βK^+)
 - 2.2. Efecto de las raíces sobre la capacidad tampón del medio. Comprobación de la existencia o no de interferencias entre electrodos
 - 2.2.1. Capacidad tampón para H^+ (βH^+) del medio con raíces
 - 2.2.2. Capacidad tampón para K^+ (βK^+) del medio con raíces
3. Estudio de la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+ por raíces estériles de girasol "in vivo"
 - 3.1. Cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+ en diferentes remesas de semillas (de 1991 a 1995)
 - 3.2. Controles realizados en el estudio de la cinética de flujos de H^+ y K^+ por las raíces
 - 3.2.1. Interferencia entre electrodos: Cinética de los flujos de H^+ y K^+ medidos por separado con la correspondiente pareja de electrodos en el medio
 - 3.2.2. Cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+ por raíces "envenenadas" por preincubación en NaCN
 - 3.2.3. Efecto de la adición de antibióticos al medio de medida sobre la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+ por las raíces
 - 3.2.4. Comparación entre la concentración de K^+ en el medio de medida con el electrodo específico de K^+ , y con fotometría de llama, a lo largo de la cinética de flujo de K^+
4. Estudio cinético de los flujos simultáneos de H^+ y K^+ con diferentes aportes de K^+ en el medio

- 4.1. Efecto de la concentración de K^+ sobre el eflujo neto de H^+
- 4.2. Efecto de la concentración de K^+ en el medio sobre el influjo neto de K^+
5. Estudio de la acción de algunos efectores sobre los flujos simultáneos de H^+ y K^+ por las raíces
 - 5.1. Efectores que actúan sobre el transporte de K^+
 - 5.1.1. Efecto de la Valinomicina sobre la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+
 - 5.1.2. Efecto de la Ouabaina sobre la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+
 - 5.2. Efectores que actúan sobre canales de H^+
 - 5.2.1. Efecto del DCCD (Diciclohexilcarbodiimida) sobre la cinética de flujos de H^+ y K^+
 - 5.2.1.1. Efecto de la adición de algunas concentraciones de DCCD sobre los flujos de H^+ y K^+ , simultáneamente
 - 5.2.1.2. Efecto de varias concentraciones de DCCD sobre el eflujo neto de H^+ : Curvas dosis-respuesta
 - 5.2.1.3. Efecto de varias concentraciones de DCCD sobre el influjo neto de K^+ : Curvas dosis-respuesta
 - 5.3. Efectores que actúan sobre la H^+ -ATPasa de plasmalema
 - 5.3.1. Efecto del Vanadato sobre la cinética de flujos de H^+ y K^+
 - 5.3.1.1. Efecto de la adición de algunas concentraciones de Vanadato sobre los flujos de H^+ y K^+ , simultáneamente
 - 5.3.1.2. Efecto de varias concentraciones de Vanadato sobre el eflujo neto de H^+ : Curvas dosis-respuesta
 - 5.3.1.3. Efecto de varias concentraciones de Vanadato sobre el influjo neto de K^+ : Curvas dosis-respuesta
 - 5.3.2. Efecto de la Oligomicina sobre la cinética de flujos de H^+ y K^+
 - 5.3.2.1. Efecto de la adición de algunas concentraciones de Oligomicina sobre los flujos de H^+ y K^+ , simultáneamente
 - 5.3.2.2. Efecto de varias concentraciones de Oligomicina sobre el eflujo neto de H^+ : Curvas dosis-respuesta
 - 5.3.2.3. Efecto de varias concentraciones de Oligomicina sobre el influjo neto de K^+ : Curvas dosis-respuesta
 - 5.4. Efectores que actúan sobre la cadena redox
 - 5.4.1. Donadores de electrones a la cadena redox
 - 5.4.1.1. Efecto de la adición de $300 \mu M$ de NADH exógeno sobre la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+
 - 5.4.1.2. Efecto de la adición de 0.60 mM de hexacianoferrato II (HCF-II) sobre la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+

5.4.2. Bloqueantes de la cadena redox: cis-Platino (II), cis-Pt (II)

5.4.2.1. Efecto de algunas concentraciones de cis-Pt (II) sobre los flujos de H^+ y K^+ , simultáneamente

5.4.2.2. Efecto de varias concentraciones de cis-Pt (II) sobre el eflujo neto de H^+ : Curvas dosis-respuesta

5.4.2.3. Efecto de varias concentraciones de cis-Pt (II) sobre el influjo neto de K^+ : Curvas dosis-respuesta

5.4.3. Aceptores de electrones de la(s) cadena(s) redox

5.4.3.1. Efecto de la adición de 0.66 mM de hexacianoferrato (III)(HCF-III) sobre los flujos iónicos simultáneos de H^+ y K^+

5.4.3.2. Efecto de la adición del cis-Pt (II) y HCF (III) sobre la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+

5.4.3.3. Efecto de la adición de 100 μ M de hexacloroiridato IV (HCl-IV) sobre el flujo de K^+

5.4.3.4. Efecto de la adición de 100 μ M de citocromo c sobre la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+

6. Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)

6.1. Medida de la actividad SOD de Horseradish (raíz de rábano, Hr-SOD) "in vitro"

6.1.1. Efecto de distintos aditivos sobre la actividad SOD de Horseradish

6.2. Medida de la actividad SOD de las raíces escindidas

6.2.1. Efecto de distintos aditivos sobre la actividad SOD de las raíces lavadas (actividad SOD exocelular insoluble)

6.2.1. Efecto de distintos aditivos sobre la actividad SOD del "Medio de lavado" (Actividad SOD endocelular y exocelular solubles)

7. Esquema final propuesto del funcionamiento de los transportadores de H^+ y K^+ del plasmalema de las células de las raíces y la actuación de los efectores usados

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

- A:** actividad enzimática.
- ABA:** ácido abscísico.
- AFR:** radicales libres de ascorbato.
- AIA:** ácido-indol-acético.
- ATP:** adenosín 5'-trifosfato.
- %AVK⁺:** actividad relativa de influjo de K⁺.
- %AVH⁺:** actividad relativa de eflujo de H⁺.
- βH⁺:** capacidad de retención de H⁺.
- βK⁺:** capacidad de retención de iones K⁺.
- CCCP:** carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona.
- cis-Pt (II):** cis-Platino (II) diamino-dicloruro.
- DCCD:** N,N'-diciclohexilcarbodiimida.
- DES:** dietilestilbestrol.
- ΔmV:** cambio de voltaje.
- ΔpH:** cambio de pH.
- EDTA:** ácido etilén-diamino-tetraacético.
- FC:** fusicoccina.
- HCF (II):** sal potásica de Hexacianoferrato II (nomenclatura antigua Ferrocianuro potásico).
- HCF (III):** sal potásica de Hexacianoferrato III (nomenclatura antigua Ferricianuro potásico).
- HCl (IV):** hexacloroiridato (IV)
- HEPES:** ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2-etanosulfónico.
- %I:** porcentaje de inhibición.
- KD:** kilodalton.
- NAD⁺:** β-nicotinamido adenín dinucleótido (forma oxidada)
- NADH:** β-nicotinamido adenín dinucleótido (forma reducida).
- NADPH:** β-nicotinamido adenín dinucleótido fosfato (forma reducida)
- NBT:** azul de nitrotetrazolio.
- PCMPs:** p-cloromercurifenilsulfonato.
- pmf:** fuerza protón-motriz.
- SHAM:** ácido salicilhidroxámico.
- SD:** desviación standard.
- SOD:** superoxido dismutasa.
- TEA:** tetraetil amonio.
- U:** unidad enzimática.
- VK⁺:** velocidad de influjo neto de K⁺.
- VH⁺:** velocidad de eflujo neto de H⁺.

INTRODUCCIÓN

1.- IMPORTANCIA DEL K^+ PARA LAS PLANTAS: PRINCIPALES FUNCIONES DEL K^+ EN EL ORGANISMO VEGETAL

Las plantas para su funcionamiento requieren, entre otros factores, un flujo continuo de iones inorgánicos desde el medio externo a las células de la raíz y de ésta al resto de la planta.

Debido a que las cantidades de nutrientes esenciales en el suelo son limitadas, las plantas han desarrollado varios mecanismos de absorción de iones para poder tener un funcionamiento adecuado. Los mecanismos de transporte de iones más intensa y extensamente estudiados son los de transporte de K^+ . La elección de este catión como el principal objeto de estudio del transporte iónico está fundamentada en el hecho de que es el macronutriente catiónico más abundante en las plantas superiores, requiriéndose para multitud de procesos vitales, tales como la nutrición mineral, el crecimiento, los movimientos, la homeostasis enzimática, la osmorregulación y el transporte de fotosintetizados, todos ellos indispensables para el normal crecimiento y desarrollo del organismo vegetal. Todas estas funciones van ligadas a acciones primarias a nivel celular, y por tanto están reguladas por la presencia de transportadores específicos para el K^+ en las membranas celulares, que controlan el flujo entre la célula, el apoplasto y el medio externo en el caso de la raíz. Haremos un breve resumen de dichas funciones a nivel celular:

1º) La primera y principal está relacionada con el hecho de que los iones K^+ son los cationes inorgánicos cuantitativamente más abundantes del citosol, por lo que el K^+ actúa como **contraión predominante** para contrarrestar el exceso de cargas negativas de las macromoléculas proteicas y de ácidos nucleicos, siendo por tanto el catión principal implicado en el mantenimiento del estado sol-gel más adecuado para la optimización del funcionamiento de dichas macromoléculas, y por ende de su regulación.

Las especiales características del ión K^+ , con una relación carga/masa relativamente pequeña (en comparación, por ejemplo, con el Na^+), debido a su gran radio iónico, hacen que la capa de solvatación sea pequeña ya que la tendencia a atraer capas ordenadas de moléculas de agua también lo es. Ello hace compatibles altas concentraciones del ión con el mantenimiento de la integridad conformacional de las macromoléculas de proteínas y ácidos nucleicos, a diferencia de otros cationes monovalentes, como el Na^+ , que a concentraciones comparables a las del K^+ en el citosol (80 a 120 mM, del mismo orden de magnitud que en células animales) desnaturaliza las proteínas.

2º) Su papel como principal contraión para los biopolímeros aniónicos, comentado en el punto anterior, ha llevado a la evolución de una serie de funciones subsidiarias y más especializadas para el K^+ en las células vegetales. Así, un gran número de **reacciones**

citoplasmáticas son activadas por los iones K^+ , destacando aquellas que son la clave de la desviación hacia el metabolismo intermediario (como, por ejemplo, la formación de piruvato a partir de fosfoenolpiruvato), así como varios estadios en la translación del mRNA (Wyn-Jones y Pollard, 1983).

3º) En las plantas no halofitas el K^+ contribuye sustancialmente al mantenimiento de un potencial osmótico suficientemente negativo en la vacuola, además de en el citosol, para que pueda mantenerse **la adecuada presión de turgencia en la vacuola** necesaria para conferir rigidez estructural a las células, y por tanto a los órganos no lignificados. Puesto que la vacuola tiene un volumen considerable, ella es el lugar con mayor cantidad de K^+ en valores absolutos, que pueden alcanzar hasta el 10% del peso seco total de una planta crecida en condiciones de K^+ suficiente.

4º) Asociada a la función anterior, gran cantidad de **movimientos de células y órganos** de la planta, provocados por cambios de turgencia de determinadas células, están asociados a flujos de K^+ altamente controlados. Así, los movimientos de apertura y cierre estomáticos son consecuencia de un influjo y eflujo de K^+ hacia/desde la vacuola de las células de guarda del estoma, estrechamente regulados por una gran variedad de factores ambientales y endógenos (MacRobbie, 1987; Raschke, 1975). Igualmente, los movimientos nictinásticos y tigonásticos de hojas y pétalos están causados por cambios de turgor debidos a flujos de K^+ hacia/desde las células motoras (Satter y Galston, 1981).

5º) Finalmente, el K^+ está implicado en **el transporte de fotosintetizados por el floema**. Así, aunque su función exacta no se conoce, se sabe que los vasos del floema contienen alta concentración de K^+ , y es necesario un aporte de K^+ al apoplasto en cantidades adecuadas para que se carguen eficazmente desde el mesófilo al extremo del floema en la fuente, y se descarguen en el sumidero.

2.- DISPONIBILIDADES DE K^+ PARA LA RAÍZ EN CONDICIONES NATURALES

Las plantas terrestres toman el K^+ de la solución del suelo, y son capaces de crecer adecuadamente en un valor de concentración de K^+ en el exterior de 104. Así, mediante cultivo hidropónico se ha demostrado que se pueden obtener plantas libres de síntomas de deficiencia en K^+ por cultivo en soluciones que contienen solamente 8 μM de concentración (aunque la cosecha se ve afectada). En el extremo contrario, el K^+ no es tóxico para la mayoría de las especies hasta que no excede concentraciones de 50- 100 μM .

El análisis de suelos muy diferentes revelan niveles de K^+ que van desde menos de 50 μM a más de 10 mM, estando los valores típicos más frecuentes entre 100 μM y 1 mM, incluso en suelos fertilizados (Asher y Ozanne, 1963; Barber, 1981).

Múltiples factores del suelo contribuyen a aumentar o disminuir la disponibilidad de K^+ de ese suelo, además de la riqueza en K^+ y la composición química de la roca madre. Especial mención merece el **efecto del pH**, que influye marcadamente en la liberación de K^+ a la solución del suelo, ya que los H^+ pueden reemplazar y así liberar K^+ de sus lugares de enlace y adsorción en los componentes del suelo, cargados negativamente, y ello explica la mayor disponibilidad del elemento en los suelos ácidos (Gassmann et al., 1993).

Además, en condiciones naturales de suelo se produce la aparición, en la zona inmediata a la superficie de la raíz, de una "**zona de deplección**" de iones, provocada por la motilidad restringida de éstos en la matriz del suelo, junto con la absorción de iones por la raíz. Ello hace que cuando la concentración de K^+ en la solución del suelo es, por ejemplo, de 0.5 a 1 mM, dependiendo de factores tales como el coeficiente de difusión, el tipo de suelo y la velocidad de absorción de K^+ por la raíz, exista una zona de deplección alrededor de ésta en que la concentración está disminuida en un 30-45% con respecto a la solución del suelo. Incluso en soluciones hidropónicas puede darse este fenómeno, como lo demuestran las medidas directas de la actividad iónica para el K^+ en la zona de los 15-20 μm inmediatas a la superficie de raíces crecidas en solución, donde una concentración de 50 mM de K^+ en la solución puede verse reducida a menos de la mitad sólo por la absorción de K^+ de las raíces (Newman et al., 1987).

En resumen, todos los factores fisiológicos y biológicos considerados hacen que, en condiciones de suelo, la concentración de K^+ disponible en las proximidades de la raíz esté en el orden de unos pocos cientos μM a 1 mM como máximo en la mayoría de los casos.

3.-ABSORCIÓN DE K^+ POR LAS RAÍCES

El paso de iones desde el medio externo hasta la raíz se realiza en una primera etapa a través del apoplasto (paredes celulares y espacios intercelulares); este paso se realiza de forma pasiva, y sólo se ve afectado por fenómenos físicos, como la retención de cationes en la difusión y el equilibrio de Donnan, impuesto por las superficies de los componentes de la pared celular, cargadas negativamente. A continuación tienen que atravesar el plasmalema de las células para pasar al simplasto, realizándose este paso por un transporte activo mediado por transportadores iónicos, que funcionan con gasto de energía metabólica aplicada directa o indirectamente, y que son responsables de que la distribución de dichos iones entre el interior celular y el apoplasto se aparte de la predicha por el equilibrio de potenciales electroquímicos (equilibrio de Nerst).

El estudio del transporte de K^+ por raíces se ha abordado con diferentes metodologías. En primer lugar, las experiencias con raíces enteras permitieron realizar estudios cinéticos de absorción por las raíces "in vivo", dando lugar a conclusiones que siguen siendo válidas en la actualidad, como después se ha comprobado con la aplicación de las modernas técnicas

de electrofisiología y biología molecular, ya que emergen y reflejan la actuación de transportadores en las membranas celulares de los tejidos absorbentes de la raíz .

Vamos a revisar los conocimientos obtenidos por estas diferentes metodologías.

3.1.- CINÉTICA DE ABSORCIÓN DE IONES K^+ POR RAÍCES ENTERAS

En el año 1969 Laties (1969) llegó a la conclusión de que la absorción de K^+ y otros iones por las células de las raíces de plantas superiores pudiera llevarse a cabo mediante sistemas de transporte que presentan cinética dual ó múltiple. El significado de esta generalización será examinado más adelante; sin embargo, es bueno tener en cuenta los elementos importantes que pertenecen a la planificación e interpretación de los experimentos de absorción de iones que han llevado a dicho descubrimiento. Así, para llegar a la anterior conclusión, los niveles de concentración salina del medio utilizado en los estudios de absorción de iones hubo de reducirse de 500 a 1000 veces respecto de los experimentos de absorción de iones que se habían realizado hasta entonces, que eran semejantes, o mayores, a las concentraciones típicamente usadas en las soluciones nutritivas comunes (de 1 a 50 mM), ampliándose el intervalo con experimentos a concentraciones de K^+ inferiores a 1 mM. Además, el tiempo de duración del experimento también hubo de tenerse en cuenta, al comprobarse que la cinética de absorción de iones cambia significativamente con el tiempo, incluso dentro de períodos experimentales de sólo varias horas de duración.

Cumpliendo estos requisitos, el primer artículo publicado sobre la cinética de absorción de cationes alcalinos por raíces de cebada se debe a Epstein y Hagen (1952), donde -midiendo la absorción de Rb^+ , análogo del K^+ - dan cuenta de dos descubrimientos significativos: En primer lugar, que alguno de estos cationes alcalinos (K^+ , Rb^+ y Cs^+) compiten entre sí en su absorción por las raíces; por el contrario, el Na^+ no interfiere con la absorción de Rb^+ siempre que la concentración externa de Rb^+ sea baja (por ejemplo, 1 mM), pero cuando es alta (>10 mM) el Na^+ se comporta también como inhibidor competitivo. Estos resultados fueron interpretados como prueba de la existencia de dos lugares diferentes involucrados en la absorción de K^+ : uno que actuaría a concentraciones de orden micromolar, y que parece ser más específico (ya que sólo Rb^+ y Cs^+ -elementos poco frecuentes en la naturaleza- compiten con el K^+ , pero no el Na^+), mientras que el otro actuaría a concentraciones de orden milimolar y aparentemente sería menos específico (ya que no discrimina entre K^+ y Na^+). En trabajos posteriores, Epstein et al. (1963) observaron que ambos lugares mostraban cinéticas saturables de Michaelis-Menten, y definieron las siguientes características cinéticas, atribuibles a cada uno de los componentes de este **sistema dual** involucrado en la absorción de K^+ por raíces cortadas de cebada de pocos días de germinación, en experimentos de corta duración:

Sistema I: Sistema, mecanismo o lugar de absorción de K^+ de **alta afinidad**; presenta

una K_m para el K^+ entre 10 y 40 μM y una velocidad máxima (V_{max}) de absorción de K^+ en ausencia de Na^+ de 12 $\mu moles/h. g$ peso fresco. La KI (la recíproca de la constante de afinidad) para el Na^+ es de 1.25 mM y la velocidad máxima para la absorción de K^+ en presencia de Na^+ es de 12 $\mu moles/h. g$ peso fresco, igual que sin Na^+ ; es decir, el Na^+ es un inhibidor competitivo muy pobre para la absorción de K^+ por este Sistema I. Además, su funcionamiento no se ve afectado por el anión acompañante y la presencia de iones Ca_2^+ es vital para el mantenimiento de la selectividad.

Sistema II: Sistema, mecanismo o lugar de absorción de K^+ de **baja afinidad**; tiene una K_m para el K^+ de alrededor de 17 mM y la KI para el Na^+ es 0.84 mM, con lo que favorece la absorción de Na^+ ; por tanto, la absorción de K^+ y Na^+ son fuertemente competitivas por este Sistema II. Además, la absorción de K^+ por el sistema II presenta una fuerte dependencia del anión acompañante, existiendo ocasionalmente datos que hablan de su inhibición por concentraciones de Ca^{2+} superiores a 1 mM (Epstein, 1973).

En las condiciones en que ambos sistemas cooperan (concentración externa de K^+ de orden milimolar), y a tiempos cortos (10 min.), la contribución de los Sistemas I y II a la absorción total de K^+ por las raíces es esencialmente la misma; esto es, la V_{max} de ambos Sistemas es aproximadamente igual, por tanto la absorción total será de 24 $\mu moles/h. g$ peso fresco. En resumen, bajo estas condiciones la afinidad del Sistema I por el K^+ es 700 veces la del Sistema II, y mientras el Sistema I favorece la absorción del K^+ sobre la de Na^+ en una relación de 50:1, el Sistema II favorece al Na^+ sobre el K^+ en una relación de 20:1.

Una vez establecida la existencia de un mecanismo dual para la absorción de K^+ por las raíces, se inició la discusión de si ambos sistemas operan en serie o en paralelo. Tal como hemos indicado más arriba, se consideró que la absorción total era la suma de la absorción llevada a cabo por el Sistema I más la llevada a cabo por el Sistema II, de forma que se suponía que ambos sistemas actuaban **en paralelo**: es decir, los iones penetrarían por diferentes lugares (Sistemas) de una membrana, aunque se dejaba sin definir si liberarían los iones dentro del mismo compartimento celular, o no. Por el contrario, comparando la absorción de Rb^+ por segmentos de raíz de maíz no vacuolados y vacuolados, Torii y Laties (1966) llegaron a la conclusión de que el Sistema I actuaría en la membrana plasmática y el Sistema II en el tonoplasto, por lo que ambos sistemas se encontrarían **en serie**, el I liberando iones al citoplasma y el II a la vacuola. Las razones en que apoyan su teoría, tomadas de las experiencias realizadas hasta ese momento, eran las siguientes:

a) Las concentraciones salinas de suelos fértiles están dentro del intervalo de actuación del Sistema I, como hemos discutido en el Apartado 2, y las raíces exhiben su máxima absorción a concentraciones por debajo de 0.1 mM; por tanto, parecía difícil concebir una presión evolutiva hacia el desarrollo de un sistema de absorción en la misma membrana, en paralelo, de afinidad casi tres órdenes de magnitud menor que la del Sistema I.

b) Los segmentos de ápices de raíz con células no vacuoladas mostraban una isoterma de

absorción simple que corresponde al Sistema I, mientras que los segmentos con células vacuoladas mostraban una isoterma de absorción múltiple que parece reflejar la operación de ambos Sistema I y II.

c) El transporte de iones hacia la estela de la raíz se caracteriza por tener una cinética y ser sensible a inhibidores que corresponden a la absorción por el Sistema I, mientras que la absorción total de la raíz muestra la cinética y sensibilidad a inhibidores que corresponden a ambos Sistemas.

d) Cuando las características de permeabilidad y transporte de un tejido cambian con el tiempo, es la membrana plasmática la que sufre los cambios y es la isoterma del Sistema I quien varía de acuerdo con estos cambios.

e) En taleolas de remolacha, cuando la permeabilidad de la membrana plasmática es marcadamente incrementada por tratamiento con polilisina, aparentemente la absorción por el Sistema I desaparece.

En las décadas posteriores a los trabajos pioneros de Epstein, varios autores se dedicaron a demostrar que la cinética dual de transporte de K^+ no tenía por qué ir necesariamente asociada con dos sistemas de transporte que fueran entidades moleculares discretas, diferentes, proponiéndose varias explicaciones alternativas. Así, ya en trabajos de Elzam et al. (1964) y Epstein (1966) se había observado que el Sistema II daba en algunos casos una cinética multifásica y que por tanto parecía ser un Sistema múltiple, pero es Nissen (1974) quien generaliza el concepto, proponiendo un **único mecanismo de absorción multifásico**, frente a la hipótesis ya discutida del mecanismo dual de Epstein et al. (1966) para la absorción de K^+ por raíces de cebada. Nissen muestra que los datos obtenidos hasta el momento se ajustan mejor (usando representaciones de doble recíproca o logarítmicas) a una única isoterma multifásica. Así, los estudios de Epstein (1966), ya descritos, sobre la inhibición competitiva por el Na^+ de la absorción de K^+ , que habían sido interpretados de acuerdo con un mecanismo dual de absorción, según Nissen no estarían correctamente interpretados, ya que los datos se ajustarían mejor a un mecanismo único multifásico de absorción de K^+ .

El modelo de Nissen tenía además la ventaja de acabar con la polémica de la localización de los Sistemas I y II para el transporte de K^+ en las membranas vegetales. Así, el modelo de Epstein (1966) de un Sistema dual formado por dos transportadores diferentes que actuarían en paralelo en el plasmalema, o el de Laties (1969) de los mismos Sistemas funcionando en serie, en el plasmalema y en el tonoplasto, se verían sustituidos en el modelo de Nissen por un único mecanismo multifásico, (un solo transportador complejo, que experimenta transiciones en respuesta a los cambios en la concentración externa de K^+), que se encontraría localizado en el plasmalema, y en el cual el Sistema de alta afinidad, que opera a concentraciones muy bajas, sólo sería la primera de estas transiciones; podría existir un mecanismo similar en el tonoplasto.

El modelo multifásico de Nissen recibió multitud de correcciones, críticas y

puntualizaciones, principalmente referidas al hecho de que otros factores, aparte de los propios transportadores, podrían ser responsables de alguna de las fases de la cinética multifásica de absorción de cationes observada. Se propusieron varias explicaciones alternativas:

a) Así, la absorción de iones K^+ de soluciones diluidas (semejantes a la solución del suelo en condiciones naturales) podría estar limitada por la difusión a través de la “capa límite” que rodearía las raíces, o por la difusión dentro de los mismos tejidos de la raíz.

b) Kochian y Lucas (1982) propusieron la hipótesis de que, a baja concentración externa de K^+ , existiría una fuerte limitación en la difusión de iones por parte de la epidermis, reduciéndose significativamente la disponibilidad de K^+ para su absorción a nivel de las células corticales. Esto coincide con la idea de Göring (1976) que había propuesto que la isoterma dual observada podría ser un artefacto de esa barrera de difusión, siendo la fase saturable de la absorción de K^+ , observada a bajas concentraciones del ión (Sistema I de Epstein), la manifestación del transporte dentro de las células epidérmicas, mientras que la absorción a altas concentraciones (Sistema II de Epstein) sería el resultado de la absorción por transportadores idénticos localizados en las células corticales de la raíz.

c) Dalton (1984), por su parte, creía que la pared celular constituye una región limitante cargada negativamente y que ésta podría ser la causa de que se observe un mecanismo pseudodual en la absorción de K^+ . Para él la entrada de K^+ al citoplasma de las células estaría mediada por un único sistema metabólico de carrier, operativo en todo el intervalo de concentraciones. Sin embargo, Kochian y Lucas (1983) encontraron la misma cinética de absorción de K^+ para protoplastos corticales de raíces de cebada que para segmentos de raíces, lo cual contradice la hipótesis de Dalton, ya que los protoplastos carecen de pared celular.

d) Se ha comprobado que existen diferencias en la absorción de Na^+ y K^+ a lo largo de la raíz, que se han interpretado como prueba de la existencia de transportadores diferentes en diferentes zonas de la misma. Nissen arguye que estas diferencias se deben a cambios en el comportamiento de los mismos transportadores por el hecho comprobado de que la composición lipídica de las membranas es diferente en células con distinto grado de madurez y diferenciación. Sin embargo, en la actualidad, por la técnica de patch-clamp se han encontrado pruebas de la existencia de hasta 10 canales transportadores de K^+ diferentes en la raíz de una misma especie (Vogelzang y Prins, 1994); esto es congruente con el descubrimiento y caracterización de H^+ -ATPasas molecularmente diferentes en el plasmalema de diferentes tejidos de la raíz de una misma especie.

e) Zsoldos et al. (1987) han comprobado que en raíces aeropónicas de trigo el influjo de K^+ es menor que en raíces hidropónicas y proponen que el transporte de K^+ en las raíces aeropónicas sería un proceso pasivo, mientras que en las hidropónicas existiría un componente activo. Es decir, que en la misma especie, según las condiciones de desarrollo de la raíz podrían expresarse transportadores de K^+ diferentes. Esto vendría apoyado por la

observación de que en raíces aeropónicas, al añadir al medio externo Ca^{2+} se produce una pequeña inhibición del transporte de K^+ , mientras que en raíces hidropónicas el Ca_2^+ provoca una estimulación de dicho transporte (como hemos indicado, la diferente respuesta al Ca^{2+} es una característica distintiva de los transportadores de K^+ de alta y baja afinidad: el Ca^{2+} es esencial para el correcto funcionamiento de los primeros, y ligeramente inhibidor para los segundos).

f) La contaminación microbiana se ha invocado también como causa de alguna de las fases de la cinética. Así, la absorción de fosfato (Barber, 1968) puede verse afectada marcadamente por las bacterias del medio; sin embargo, la cinética multifásica no parece ser causada por los microorganismos asociados a la raíz, ya que experimentos con raíces estériles de cebada (Barber, 1972); Cartwright (1972) muestra igualmente una isoterma multifásica para el fosfato, y además los efectos de las bacterias sobre la absorción de cationes alcalinos y cloro es normalmente insignificante. Resultados anteriores de nuestro laboratorio (Espinosa, 1991) han detectado una parada transitoria en la acidificación del medio asociada a la contaminación microbiana de las raíces, aunque no hemos comprobado si este efecto sobre los sistemas de extrusión de H^+ lleva o no asociado una inhibición igualmente transitoria de la absorción de K^+ , que pudiera asemejarse a la doble cinética. Sin embargo, como se demuestra en la parte experimental de esta Tesis Doctoral, las raíces estériles de girasol siguen presentando varias fases en su cinética de absorción de K^+ .

g) El clásico modelo de la célula vegetal con 3 compartimentos (pared, citoplasma y vacuola) podría verse modificado por la presencia de vesículas que establecerían una vía directa del plasmalema al tonoplasto, y constituirían un 4º compartimento cuya influencia en la cinética de transporte podría ser limitante y por tanto responsable de algunas de sus fases; sin embargo, la permanencia de dichas vesículas aún es discutida.

En su recopilación de los sistemas de absorción de K^+ basada en estudios cinéticos con raíces enteras, Jensen et al. (1987) resumen las modalidades más importantes propuestas hasta la fecha (**Tabla I**), incluyendo la modificación de Hodges (1973) que concluye que las cinéticas de influjo describirían una cooperatividad negativa. Este modelo predice la actuación de un único transportador multifásico, con muchas subunidades y con un número igual de lugares de unión al ión en cada subunidad, cuando se une un ión a una de las subunidades, esta unión induciría un cambio conformacional que afectaría a las características cinéticas de los lugares de unión de las otras subunidades.

MODELOS:	SIMPLE		DUAL		COOPERATIVO	MULTIFASICO
Referencias	Kochian y Lucas (1982, 83)	Dalton (1984)	Epstein et al. (1963)	Laties (1969)	Hodges (1973)	Nissen (1973)
Propiedades						
Isotermas de influjo:	continuas	continuas	continuas	continuas	continuas	discontinuas
n° de componentes:	dos	uno	dos	dos	uno	varios, no aditivos
A baja concentración (μM)	saturoable		saturoable	saturoable		
A alta concentración (mM)	lineal		saturoable	saturoable		
Tipo de cinética	saturoable tipo M. Menten	M. Menten	M. Menten	M. Menten	Cooperativa	cada componente M. Menten
n° y tipo de transportadores	dos	uno	dos (alta y baja afinidad)	dos (alta y baja afinidad)	uno con multi-subunidades	uno, sufre transición de fases de todo/nada
Localización	plasmalema	plasmalema	Ambos en plasmalema	uno en plasmalema	plasmalema	plasmalema

Tabla I: Modelos propuestos para la absorción de iones K^+ por las raíces de las plantas (traducido de Jensen et al., 1987).

Borstlap (1981), sin embargo, había criticado la interpretación multifásica de la absorción, argumentando que muchas de las citadas isotermas discontinuas de absorción podrían explicarse por modelos con uno o más términos de Michaelis-Menten más un término lineal. Indicaba que este término lineal había sido ignorado, y normalmente se consideraba como representante de difusión la pasiva; sin embargo, Kochian y Lucas (1982) estudiando la absorción de ^{86}Rb por segmentos de raíces de *Zea mays* demostraron que la absorción de K^+ se debía a la operación combinada de dos componentes, uno saturable y otro lineal. En su opinión, el componente saturable sería el equivalente al sistema I de Epstein y sería la consecuencia del transporte activo de K^+ del apoplasto al simplasto de la raíz, mientras que el componente lineal sería más complejo que una simple difusión facilitada.

En trabajos posteriores Nissen (1988, 1989) discute a su vez la interpretación de estos datos de Kochian y Lucas sobre la cinética de absorción de K^+ por raíces de cebada, que resuelven en componente saturable y lineal; según él, todos sus datos se resolverían mejor con un modelo de absorción multifásico, así que la existencia de un componente lineal en la absorción de K^+ o de otros solutos debería ser reconsiderada. Nissen propone que los solutos serían transportados por entidades moleculares "multi-estados", que tienen

propiedades de carriers a baja concentración externa de soluto y propiedades de canales a alta concentración.

Por su parte, Kochian y Lucas (1993) realizan una revisión sobre la naturaleza de los transportadores de K^+ , que se resume en los siguientes puntos fundamentales: Epstein et al. (1963) propusieron dos sistemas independientes transportadores de K^+ : SI, de alta afinidad y SII, de baja afinidad. Posteriormente se relacionó el sistema de alta afinidad con un proceso activo (Rodríguez-Navarro et al., 1986; Smith y Walker, 1989), mientras el de baja afinidad estaría mediado por canales (Kochian et al., 1985; Schroeder y Fang, 1991). Sin embargo, los recientes estudios de "patch-clamp" pueden ser interpretados como que el transporte de K^+ de alta afinidad estaría mediado también por canales de intrusión de K^+ ("inward-rectifying", K^+_{in}) (Hedrich y Schroeder, 1989). Con la caracterización y clonaje de genes de transportadores de K^+ (cDNA: KAT1 y AKT1, que consideraremos con más detalle en el apartado siguiente), se ha conseguido la expresión de canales de potasio K^+_{in} en oocitos de *Xenopus* y en levadura (Schachtman et al., 1992; Sentenac et al., 1992). Ello parecía llevar a la conclusión de que los canales de potasio estarían implicados en el transporte de K^+ en plantas superiores en todo el intervalo de concentración externa de K^+ en que éste tiene lugar (Sistemas de alta y baja afinidad). Sin embargo, Kochian y Lucas (1993) concluyen que, aunque los canales de potasio son sin duda fundamentales para el transporte de dicho ión, ellos no pueden mediar en el transporte activo o influjo de K^+ de alta afinidad. En efecto, la expresión del gen KAT1 en oocitos de *Xenopus* y en levadura no se traduce en las mismas propiedades ni en la misma cinética de transporte que el sistema de alta afinidad caracterizado por ellos previamente en raíces enteras de maíz.

En el mismo sentido, Gassmann et al. (1993) proponen que los canales K^+_{in} constituirían el principal componente del mecanismo de absorción de K^+ de baja afinidad, pero que también podrían funcionar como un sistema de reserva a concentración de K^+ intermedia, cuando el mecanismo de alta afinidad está disminuido. Estos canales serían proteínas transportadoras muy eficientes que, junto con la bomba de H^+ de la membrana plasmática, pueden adaptarse a las fluctuaciones de concentración de K^+ extracelular y al mismo tiempo contribuir al control del potencial de membrana.

Tras la intensa discusión, que hemos recopilado, mantenida durante las últimas dos décadas, parece que, de acuerdo con las pruebas de electrofisiología y biología molecular, que discutiremos con detalle en el siguiente apartado, la opinión actual se decanta en el sentido de aceptar que la cinética bifásica de absorción de K^+ por raíces enteras resulta de la operación de dos sistemas de transporte independientes, uno de alta y otro de baja afinidad por el K^+ . Esta conclusión se apoya en las distintas propiedades cinéticas, de selectividad, de dependencia de la concentración de K^+ en el medio y de farmacología. Así, por ejemplo, en este último punto, Kochian y Lucas (1982) y Kochian et al. (1985) describen en sus trabajos con raíces de maíz que los dos mecanismos pueden ser inhibidos selectivamente: la fase saturable, con K_m de orden micromolar, es altamente sensible a los

reactivos sulfidrilos, mientras que la segunda fase (en su caso lineal) es selectivamente suprimida en presencia del inhibidor tetraetilamonio (TEA), así como competitivamente por iones Cs^+ . La diferente respuesta a los iones Ca^{2+} , a que ya nos hemos referido, constituiría una prueba adicional (Epstein, 1973).

En resumen y como introducción al apartado siguiente, podríamos resumir la **idea actual** de los sistemas de transporte de K^+ en raíces, siguiendo el formato de la **Tabla I**:

MODELO ACTUAL						
Isotermas de influjo	n° de componentes	A baja (μM) $[\text{K}^+]$	A alta (mM) $[\text{K}^+]$	Tipo de cinética	Tipo de transportadores	Localización
continuas	dos	S I: saturable	S II: saturable. Excepcionalmente, lineal	Cada componente M. Menten	dos: S I: H^+ ó Na^+/K^+ carrier simporteador S II: canales de $\text{K}^+:\text{K}^+_{in}$ (IRC) K^+_{out} (ORC)	S I: plasmalema. S II: Plasmalema y tonoplasto

3.2.- TRANSPORTADORES DE K^+ IDENTIFICADOS EN MEMBRANAS DE CÉLULAS VEGETALES MEDIANTE INVESTIGACIONES A NIVEL MOLECULAR

Las descripciones cinéticas del transporte de K^+ por órganos intactos "in vivo", tratadas en apartados anteriores, siguen siendo obligado punto de referencia para conocer el control fisiológico del transporte de K^+ . Sin embargo, en la actualidad la introducción de técnicas electrofisiológicas y de biología molecular han hecho posible investigaciones que han ampliado nuestra capacidad de comprensión de la naturaleza molecular de los sistemas de transporte de membrana. Así, las técnicas de patch-clamp, que miden la corriente de canales individuales presentes en las membranas, son muy importantes para dar información complementaria, que no puede obtenerse mediante otros métodos, sobre los cambios conformacionales que implican estados funcionales en una sola de estas macromolécula; su estado abierto o cerrado y la transición entre ambos estados. Además, la ruptura de la célula u orgánulo y la sustitución del contenido celular por el del electrodo del patch permite manipular dicho contenido y estudiar el comportamiento de los canales. Sin embargo, cabe preguntarse sobre el significado fisiológico de los mismos "in vivo" (Blatt y Thiel, 1993). Igual puede decirse del aislamiento de la molécula y del gen que

codifica un transportador, su clonación y su expresión en células no vegetales, como levaduras, oocitos de *Xenopus* o el sistema de expresión bacilovirus-célula de insecto. Así pues, las medidas “in vivo” siguen siendo necesarias por ofrecer un aspecto complementario de las nuevas técnicas a nivel molecular: el control fisiológico integrado.

3.2.1.- Resultados obtenidos tras la aplicación de técnicas electrofisiológicas de patch-clamp a membranas vegetales

El patch-clamp es una técnica desarrollada por Neher y Sakmann (1976) y Hamill et al. (1981) para realizar registros eléctricos directos, procedentes de membranas biológicas. Esta técnica permite registrar el flujo neto de iones a través de las membranas enteras, o bien de “patches” o pinzamientos aislados de la membrana, donde pueden estudiarse con detalle las propiedades de las moléculas proteicas transmembranarias transportadoras existentes en dicha membrana.

La descripción de la técnica queda fuera de esta revisión. Sin embargo, hay que hacer incapié en que, en tejidos vegetales, esta técnica sólo puede aplicarse a protoplastos, para tener acceso directo a la membrana plasmática, y de ello deriva su principal limitación en este tipo de tejidos, ya que no considera el papel fisiológico que puede tener la pared celular en la regulación de la absorción iónica. Además, hay fuertes evidencias que sugieren que el comportamiento de un canal puede estar influenciado por interacciones con el citoesqueleto, el cual se ve fuertemente afectado en la obtención de pinzamientos excindidos de la membrana (Cantiello et al, 1991). Por otra parte, la pared se elimina mediante digestión de los tejidos con enzimas celulolíticas e hidrolíticas de los demás componentes de dicha pared (pectinas y hemicelulosas), y por alguna razón desconocida algunos tipos de enzimas dan mejores resultados que otros a la hora de formar un buen gigasello (Assmann, 1993). Ello es indicio de que ciertos componentes glucídicos de la pared, asociados como glucoproteínas a la membrana, quizás tengan un papel importante en el funcionamiento de dichas proteínas, y éste podría ser el caso de los canales iónicos. Además, en general la formación de buenos gigasellos es complicada y depende de otros factores, sobre todo del tipo de célula (existen muchos y buenos resultados con protoplastos de células de guarda estomáticas y de mesófilo foliar y pocos con protoplastos de raíz). Por esta razón, muchos de los estudios realizados con material vegetal se han hecho en membrana vacuolar más que en membrana plasmática (Hedrich et al., 1988), ya que con membrana vacuolar la formación de un buen gigasello (necesario para obtener registros con poco ruido y alta resolución) es más fácil, y además el tiempo que se tarda en conseguirlo es menor (unos segundos) que en la membrana plasmática, que puede ser de hasta media hora (Bush et al., 1988). Todo ello es indicativo de que quizás la digestión de la pared celular de las células de la raíz altera el funcionamiento de la membrana plasmática y sus canales iónicos. De hecho, en la actualidad los mejores resultados se han obtenido con una metodología que permite la obtención de protoplastos

con tiempos de digestión muy cortos (de minutos), que minimizan las posibles alteraciones provocadas por el ataque enzimático (Elzenga et al., 1991). Aún mejor es la ruptura con un micro-rayo laser de la pared, en un punto determinado de la célula, por donde se puede acceder a la membrana mientras el resto de la pared celular que da intacta, aunque esta técnica es muy reciente y sólo puede aplicarse a algunos materiales vegetales (Taylor y Brownlee, 1992; Hensiken et al., 1996).

A partir de la década de los 80, numerosos trabajos se han realizado aplicando la técnica de patch-clamp a protoplastos de diferentes células vegetales, especialmente procedentes de cultivos celulares de diverso origen, células de guarda estomáticas y otras células especializadas en movimientos basados en cambios de turgencia provocados por intercambio de iones K^+ (p. ej: células pulvinulares de plantas sensitivas) y células gigantes de algas (*Chara corallina*, *Mougeotia*). Sólo mucho más recientemente aparecen datos de protoplastos de células de raíz (de *Arabidopsis*, de maíz, etc.), como vamos a ver a continuación.

Schauf y Wilson (1987), utilizando esta técnica de patch-clamp, describieron por primera vez, en el plasmalema de protoplastos de cultivos celulares de *Asclepias tuberosa* dos tipos de canales iónicos activados por voltaje: canales de K^+ activados por despolarización de la membrana, y susceptibles de ser bloqueados por Cs^+ y tetraetilamonio (TEA), y canales de Cl^- activados por hiperpolarización y bloqueados por Zn^{2+} y por la fitohormona ABA.

Ketchum et al. (1989) con protoplastos de suspensiones celulares de maíz detectaron tres corrientes de K^+ , una independiente y otras dos dependientes del tiempo; la primera dependía de la concentración de K^+ extracelular, y de las otras dos una se activaba por hiperpolarización de la membrana (potenciales más negativos que -100 mV) y la otra por despolarización (potenciales más positivos que -60 mV). Su conclusión es que estas tres corrientes probablemente intervienen en la regulación de los flujos celulares de K^+ y del potencial de membrana.

Morán et al. (1987, 1988) describen canales de K^+ , utilizando técnicas de patch-clamp en configuración "whole cell" y de patches excindidos en el plasmalema de células pulvinulares relacionadas con el movimiento de las hojas de *Samanea saman*; estos canales se abren por despolarización de la membrana y se bloquean por TEA y por quinina. Los autores indican que la H^+ -ATPasa juega un importante papel en la regulación del potencial de membrana, y este potencial regula a su vez los canales de K^+ : cuando la bomba está activada (en la luz) ocurre una absorción de K^+ y cuando está inactivada (en la oscuridad) ocurre una salida de K^+ .

En el plasmalema de células de guarda de estomas de *Vicia faba* Schroeder et al. (1984) describen canales selectivos de K^+ activados por hiperpolarización y despolarización, que contribuyen respectivamente a la absorción y extrusión de K^+ que se observan durante los movimientos estomáticos. Homblé et al. (1987), Homblé (1987) estudiando las células gigantes de *Chara corallina*, identifican también dos tipos de canales de K^+ con distinta

dependencia del tiempo y del voltaje y ambos susceptibles al bloqueo por TEA.

En su revisión de 1990, Bentrup concluye que la técnica de "patch-clamp" revela canales de K^+ en las membranas de virtualmente de todas células vegetales que han sido examinadas, y que estos canales son similares a los de las membranas animales en cuanto a la conductancia de un solo canal, pero difieren en que el total de canales se activan mucho más lentamente e incluso pueden no inactivarse por completo. En estudios posteriores, Hedrich y Schroeder (1989) y Schroeder y Hedrich (1989) hacen una generalización de sus resultados sobre los canales de K^+ , indicando que tienen una gran importancia en el control del transporte de K^+ en plantas. Según estos autores, existirían dos tipos predominantes de canales de K^+ , que han sido caracterizados por ellos en células de guarda (Schroeder 1987, 1988; Schroeder et al. 1987) atendiendo a su sensibilidad al voltaje transmembranario: un tipo permitiría la salida de K^+ y el otro la absorción de K^+ , designándolos por primera vez como **canales IK^+_{out}** los primeros y **canales IK^+_{in}** los segundos. Como hemos indicado, ambos estarían fuertemente regulados por el potencial de membrana (canales dependientes del voltaje) mostrando las siguientes características:

a) Los **canales IK^+_{out}** se activarían por despolarización de la membrana cuando los valores del potencial son más positivos que -40 mV; a estos canales tendrían asignados los siguientes papeles fisiológicos: en primer lugar, serían la vía predominante de liberación de K^+ de las células de guarda, de las células motoras del Pulvinus de Samanea y de las del alga Chara corallina. Además, jugarían un papel importante en la repolarización de los potenciales de acción en células de algas y de plantas superiores, en aquellas células y tejidos en que se ha detectado el desarrollo de tales potenciales de acción. Por lo tanto, estos canales, junto con los responsables del transporte de Cl^- y Ca^{2+} , contribuirían a la excitabilidad de las células vegetales.

b) Los **canales IK^+_{in}** actuarían cuando la membrana está hiperpolarizada, con valores de potencial más negativos que -100 mV. Serían fundamentales para la apertura de los estomas, ya que son el camino predominante para la absorción de K^+ por las células de guarda. Canales de este tipo funcionarían probablemente en todas las células vegetales en general, y muy especialmente en las células de la raíz encargadas de la absorción del K^+ para la planta.

Los canales IK^+_{in} representan, por tanto, el primer mecanismo que se propone para la absorción de K^+ por las células vegetales; sin embargo, los canales iónicos son mecanismos de transporte pasivo, que en el caso de K^+ servirían para explicar el transporte de K^+ a concentraciones superiores a 1 mM (S II, de baja afinidad). Debería existir un mecanismo más activo, que explicara la absorción de K^+ a concentraciones menores de 1 mM (Sistema I de alta afinidad). Poole (1978) propuso, en base a cálculos teóricos termodinámicos, la existencia de una K^+ -ATPasa que cumpliría esta función. Sin embargo, aunque la K^+ -ATPasa ha sido clonada en *E. coli* (Hesse et al., 1984) no se han encontrado evidencias claras de que exista en plantas. Por su parte, Blatt (1991) es también

de la opinión de que, aunque los canales K^+_{in} se ven afectados por la concentración de K^+ extracelular cuando dicha concentración está por debajo de 1 mM, y además son activados por los H^+ del exterior celular, sin embargo no muestran características compatibles con el mecanismo de absorción de alta afinidad.

Farley-Grenot y Assmann (1991) han medido las corrientes de K^+ dependientes de voltaje y tiempo en protoplastos de células de guarda de judía, observando que cuando la membrana está hiperpolarizada (potencial más negativo de -100 mV) ocurre una rápida activación de la corriente de entrada de K^+ . Sin embargo, cuando la membrana se despolariza (potencial más positivo de -20 mV) lo que ocurre es una lenta activación de una pequeña corriente de salida de K^+ . En ausencia de K^+ no se detecta ninguna corriente.

Lew et al. (1990A) han estudiado el efecto de la luz roja sobre las células del alga *Mougeotia*, en una respuesta típicamente mediada por el fitocromo, observando que éste activa dos canales de K^+ , o bien uno solo que adoptaría dos estados distintos: uno que produce la entrada de K^+ y el otro la salida. Los mismos canales también se activan por el aumento de la concentración del Ca^{2+} citoplasmático provocada por el ionóforo A23187. Estos autores también describen (Lew et al., 1990B) la activación de un canal de K^+ en la membrana plasmática de las mismas células por el Ca^{2+} liberado de compartimentos intracelulares, tras la estimulación con luz roja.

En trabajos posteriores, Lew (1991A) estudia la regulación por sustrato de los canales de K^+ y Cl^- de la membrana plasmática de células de callo de *Arabidopsis*, observando que los canales de K^+ incrementaban su conductancia de forma lineal conforme aumentaba la concentración de KCl en la cara citoplasmática de la membrana, pero no ocurría lo mismo si era la concentración de KCl en la cara extracelular lo que aumentaba. Lew concluye que esto indicaría que el canal de K^+ está ocupado, y que ello se explicaría si este canal tuviera una arquitectura molecular de poro multi-ión. Los canales de Cl^- no se comportaban de la misma forma, sino que conforme aumentaba la concentración de KCl en la cara citoplasmática (hasta 300 mM) la conductancia del canal prácticamente no variaba; sin embargo, al aumentar la concentración por encima de 300 mM, la conductancia muestra una función cóncava con respecto a la concentración, lo cual sugiere que se trata de un tipo de regulación alostérica.

Colombo y Cerana (1991), usando el mismo material que Lew, demuestran la presencia de canales tiempo y voltaje dependientes en la membrana plasmática, que se abren por despolarización (más positivo de +20 mV) y por hiperpolarización (más negativo de -60 mV). Estos canales deben ser selectivos para el K^+ , puesto que se inhiben con TEA (bloqueante específico de canales de K^+) y no les afecta el Zn^{2+} (bloqueante de los canales aniónicos). El papel fisiológico de los canales de K^+ activados por hiperpolarización debe ser contribuir al mantenimiento de la homeostasis del citoplasma mediante difusión pasiva de K^+ bajo condiciones de hiperpolarización de la membrana plasmática debida a la actuación de bombas electrogénicas (ej: H^+ -ATPasa). Estos dos canales, más un tercero

que se encuentra en tonoplasto y se activa por hiperpolarización, son analizados en un trabajo posterior (Colombo y Cerana, 1993) con el mismo material vegetal, donde estudian el efecto de la temperatura sobre dichos canales, observando que aumentan su conductancia al pasar de 15 a 20°C.

Spalding et al. (1992), también con el mismo material vegetal que los investigadores anteriores, describen tres tipos de canales para K^+ , dos de estos canales son selectivos para K^+ y los denominan **PKC1** y **PKC2** y el tercero no es selectivo para K^+ , pudiendo transportar tanto K^+ como Na^+ y lo denominan **PCC1**.

Spalding y Goldsmith (1993) demuestran que la luz activa los canales de K^+ de *Arabidopsis*, y esta activación es debida a un factor producido en el cloroplasto por la iluminación, que los autores demuestran es el ATP, puesto que al añadir ATP comprueban que se produce la estimulación de estos canales.

3.2.2.- Incorporación de las técnicas de genética molecular e ingeniería genética a la identificación de transportadores de K^+ en membranas vegetales

Estas técnicas, de reciente aplicación a los transportadores de K^+ de células vegetales, consisten en la clonación de los genes que codifican dichos canales y su expresión en modelos celulares heterólogos para estudiar su comportamiento y regulación. Los primeros de estos trabajos son los de Anderson et al. (1992) y Sentenac et al. (1992), que han clonado genes de canales de intrusión de K^+ (K^+_{in}) de *Arabidopsis* (cDNA: KAT1 y AKT1). Los investigadores sugieren que estos canales contribuirían de manera importante a la absorción de K^+ impulsada por la bomba de H^+ que llevan a cabo las células vegetales, centrándose la discusión en la posibilidad de que estos canales o transportadores sean, o no, los responsables de la absorción de K^+ de baja afinidad (Sistema II), de alta afinidad (Sistema I) o de ambos sistemas de absorción de K^+ detectados en los estudios cinéticos discutidos anteriormente (Gassman et al., 1993; Kochian y Lucas, 1993). Así, experimentos en los que dichos genes se expresaban en células mutantes de levadura deficitarias en su absorción de K^+ (Sentenac et al., 1992) sugerían que las células así transformadas eran capaces de absorber K^+ en un medio con concentraciones bajas, del orden de aquellas en las que, según los estudios cinéticos, estaría operando el Sistema I, de alta afinidad por el K^+ . Igualmente, si se inyecta mRNA de KAT1 en oocitos de *Xenopus* (que carecen de transportadores de K^+) éstos expresan **canales de intrusión de K^+ (K^+_{in})**, adquiriendo la capacidad de absorber K^+ de un medio con concentración baja (Schachtman et al., 1992). Sin embargo, las características que muestran los canales de membranas vegetales expresados en membranas heterólogas (de origen distinto al natural), como levaduras y *Xenopus*, no tienen que coincidir necesariamente con las que muestran en las membranas originales, ya que la regulación de dichos canales puede ser diferente. Así, Kochian y Lucas (1993) han encontrado que los transportadores codificados en los genes KAT1, de raíz de *Arabidopsis*, y expresados en levaduras y *xenopus*, no muestran

las mismas propiedades cinéticas que el sistema de alta afinidad previamente caracterizado por ellos en raíces de maíz; ellos concluyen que este sistema no puede ser un canal como son los transcritos de *AKT1* y *KAT1*, sino un transportador activo, como una K^+ -ATPasa o un "carrier" cotransportador-simporteador, acoplado secundariamente al transporte de otro ión (por ejemplo los H^+), ya que los canales de K^+ (transportadores "pasivos") operan siempre "a favor" del gradiente electroquímico para el K^+ , y éstas no son las condiciones que imperan cuando la concentración externa de K^+ es menor de 0.5 mM, cuando opera el Sistema I.

Posteriormente, Schachtman y Schroeder (1994) han aislado de raíces jóvenes de trigo un cDNA (**HKT1**) que codifica una proteína de membrana encargada de la absorción de K^+ , que se ha asociado con el mecanismo de alta afinidad. En efecto, transformando células de cepas de levadura deficitarias en la absorción de K^+ , observan que, tras la expresión del gen *HKT1* se obtienen cinéticas saturables de absorción de Rb^+ , del tipo Michaelis-Menten. También, mediante su expresión y "voltaje-clamp" en oocitos de *Xenopus*, han caracterizado la selectividad de *HKT1*, observándose una alta selectividad para el K^+ . Mediante técnicas de hibridación "in situ" se ha comprobado que la expresión de *HKT1* está localizada principalmente en células corticales de la raíz, donde hay una alta actividad de absorción durante la nutrición de K^+ del suelo, y en la capa de células que rodea el tejido vascular en las hojas (aquí podría ser que el *HKT1* fuera esencial para transferir K^+ de los vasos a los tejidos de la hoja). Ambas localizaciones representan lugares principales en el transporte de K^+ . Los autores indican que, aunque el mecanismo biofísico de absorción de K^+ de alta afinidad en células de plantas superiores permanece aún desconocido, las características que hemos descrito para el transportador codificado en *HKT1* y expresado en sistemas heterólogos, en cuanto a afinidad, saturación y selectividad por el K^+ , parecen encajar con el sistema de alta afinidad de absorción de K^+ por las raíces, así que el *HKT1* es el mejor candidato, por el momento, al Sistema I de Epstein, aunque deberá demostrarse que su operación en células vegetales presenta las mismas propiedades que en los sistemas heterólogos antes de asignarle definitivamente dicha función en las raíces de plantas superiores. La naturaleza electrogénica del transporte de K^+ mediado por el *HKT1*, y la dependencia del pH de las corrientes asociadas a la expresión de *HKT1* en oocitos de *Xenopus*, indicaron que este transportador podría funcionar como un H^+ - K^+ simporteador (Schachtman y Schroeder, 1994). Sin embargo, investigaciones posteriores con células de levadura transformadas parecen sugerir un mecanismo de simporte asociado al Na^+ (K^+ - Na^+ simporteador de absorción), que al parecer interviene en los mecanismos de resistencia al estrés salino de estas células de levadura transformadas con el *HKT1* (Rubio et al., 1995, 1996; Gassmann et al., 1996).

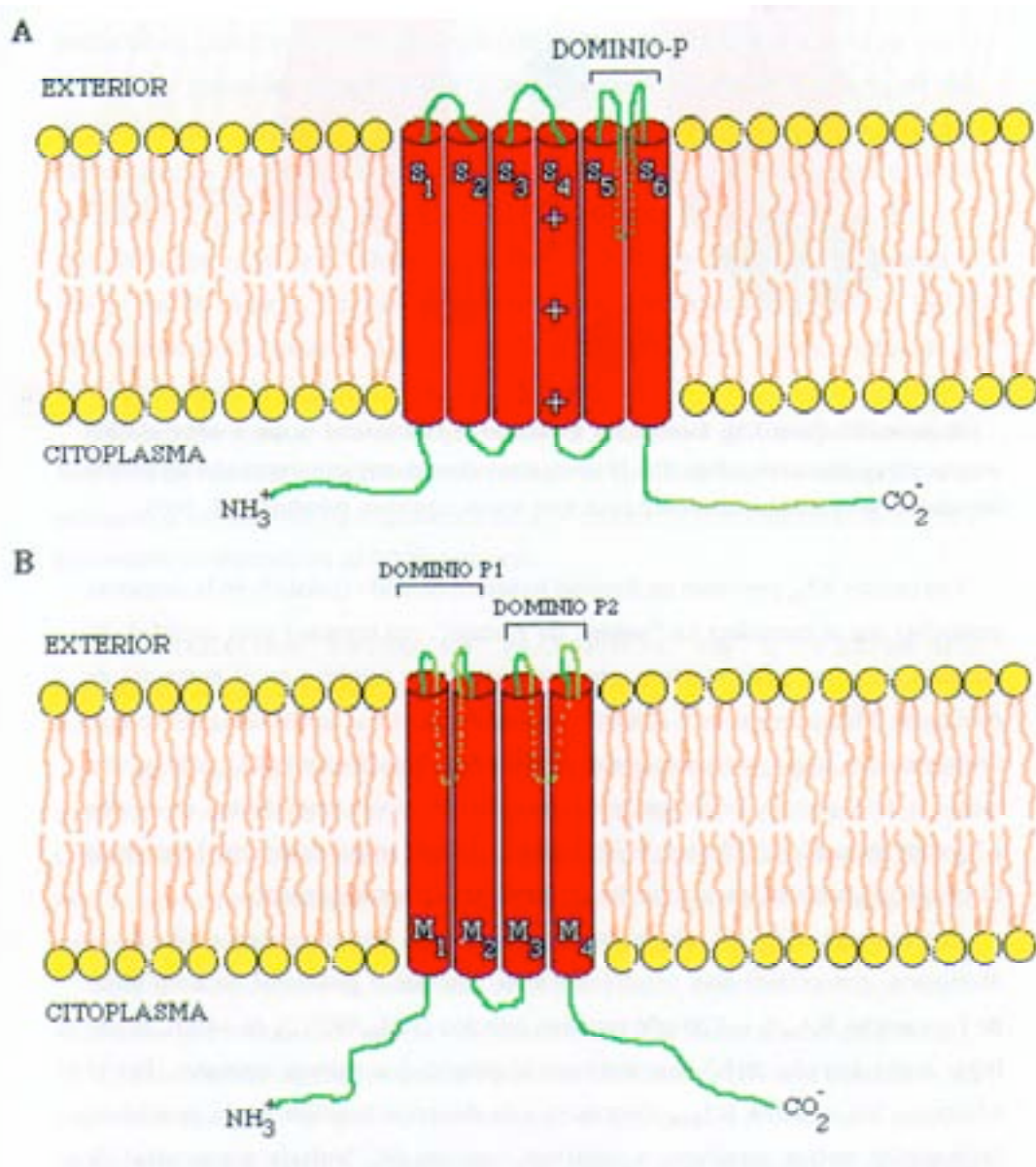
Genes de canales K^+_{in} , semejantes en estructura molecular y propiedades funcionales a los *AKT1* y *KAT1*, y manteniendo un alto grado de homología con ellos, han sido aislados de patata (**KST1**) y *Arabidopsis thaliana* (**AKT2/AKT3**) (Cao et al., 1995; Müller-Röber et

al., 1995; Ketchum y Slayman, 1996). En los mismos trabajos se pone de manifiesto que, al parecer, la expresión de estos **diferentes tipos de canales presentan una alta especificidad tisular**. Así, en *Arabidopsis*, KAT1 se expresa principalmente en las células de guarda de las hojas (Nakamura et al., 1995); el KST1 sería el equivalente al AKT1 en patata, siendo también expresado en células de guarda de la hoja. AKT1 se expresa en epidermis, cortex y endodermis de la raíz, y podría ser el canal implicado en la absorción de K^+ del suelo en condiciones de concentración de K^+ mayor a 0.5 mM (Sistema II de Epstein, de baja afinidad). AKT2 también se expresa en el tejido de la hoja, observándose una mayor cantidad de mRNA de éste que de KAT1.

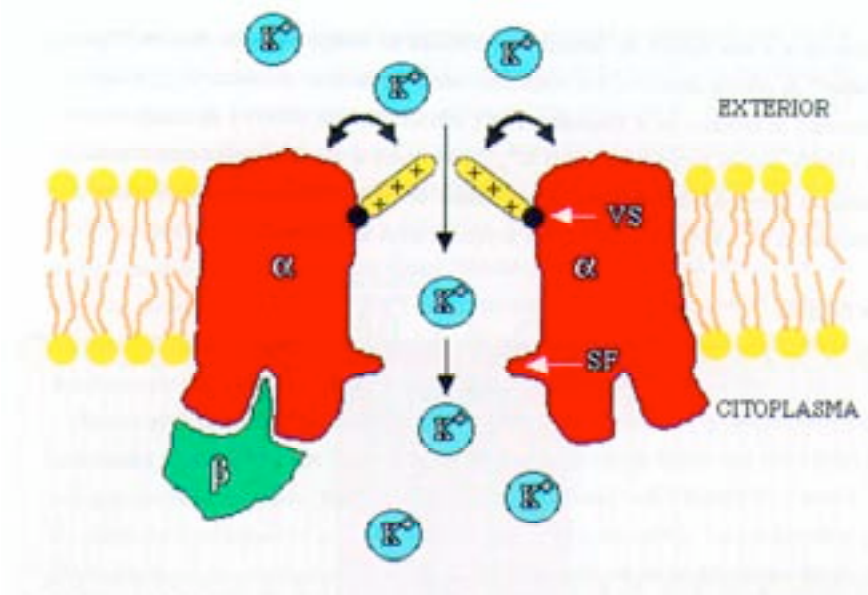
Por el momento sólo se ha clonado un gen de plantas superiores que codifica **un canal de extrusión de K^+ (K^+_{out}): KCO1** de *Arabidopsis* (Czempinski et al., 1997). Su localización está ligada a hojas y flores, aunque no se ha podido ver aún en qué tipo de células y tejidos de estos órganos es expresado; su principal característica es su fuerte dependencia de la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol, con lo que su actuación se asocia con las respuestas a estímulos, en los que están implicados el Ca^{2+} como segundo mensajero intracelular.

Se ha estudiado las **características moleculares y funcionales de los canales de K^+_{in} y K^+_{out}** (también llamados, respectivamente, **IRC** y **ORC**= "Inward/Outward rectifying K^+ channel") transcritos por los genes que hemos comentado, aislados de plantas superiores y expresados en diferentes sistemas heterólogos.

En cuanto a su **estructura molecular**, los canales K^+_{in} de plantas pertenecen, todos ellos, a una familia de canales dependientes de voltaje llamados canales "**tipo shaker**" de células animales, que sorprendentemente muestran actividad K^+_{out} , y cuya estructura se muestra en el **Esquema I (A)**, tomado de Blatt (1997) y de Maathuis et al. (1997); por su parte, los canales K^+_{out} pertenecen a una subfamilia enteramente nueva de proteínas de canal con dos dominios de poro ("**canales de doble poro**", Ketchum et al., 1995), cuya estructura se recoge en el **Esquema I (B)**.



Esquema I: Topología de los canales de K⁺ sensibles al voltaje y localizados en la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*. (A) Canal K_{in}⁺ "tipo Shaker" KAT1. El canal tiene 6 regiones; en la región S4 tiene un "sensor de voltaje". El dominio P "de poro" atraviesa el canal y determina su selectividad. (B) Canal K_{out}⁺ KCO1, "de doble poro". (Blatt, 1997; Maathuis et al., 1997).



Esquema II: Canal K⁺_{in} formado por tetrámeros de la subunidad α, que contiene el filtro selectivo (SF) y el sensor de voltaje (SV). El sensor abre o cierra el canal en respuesta a las alteraciones del voltaje de membrana. La subunidad β puede tener función reguladora. (Maathuis et al., 1997).

Los canales K⁺_{in} presentan un dominio transmembranario (señalado en la estructura como S4) que se considera un "**sensor de voltaje**", por contener gran cantidad de residuos cargados positivamente que reaccionan a los cambios en el potencial de membrana. Mutaciones en este dominio S4 pueden cambiar la dependencia del voltaje, de manera que, como se ha demostrado con canales "tipo Shaker" (K⁺_{out}) de células animales, éstos pueden convertirse, por cambio de unos pocos aminoácidos, en canales K⁺_{in} semejantes a los de plantas (Miller y Aldrich, 1996), lo que explicaría el alto grado de homología entre ambos, a pesar de que funcionan en sentido opuesto.

Los **canales K⁺_{in}** se abren cuando ocurre una **hiperpolarización** de la membrana (potenciales más negativos que el "**voltaje o potencial de activación de los canales K⁺_{in}**", ≈-120 mV para una relación [K⁺]_{in}/[K⁺]_{out} de ≈100), dando lugar a una entrada de K⁺ que restituye el potencial a valores normales. Por el contrario, los **canales K⁺_{out}** responden a la **despolarización** de la membrana (potenciales menos negativos, o positivos, respecto del "**voltaje o potencial de activación de los canales K⁺_{out}**", que sería de ≈-60 mV para las condiciones indicadas para los canales K⁺_{in}), dando lugar a una salida de K⁺ que repolariza de nuevo la membrana.

La **selectividad** de los canales de K⁺ varía entre los diferentes tipos que se han estudiado. Haciendo un análisis mutacional del canal K⁺_{in} KAT1 se ha comprobado que, como en el caso de los canales "shaker" de animales, el "**dominio-P**", que forma el poro determina la selectividad del canal y el bloqueo del mismo.

Los canales de K^+ también son verdaderos "sensores" **de la concentración de K^+** en el medio. Así, ésta puede afectar el funcionamiento de los canales modulando el potencial de membrana "umbral" al que comienza la apertura del canal (el ya citado "**voltaje o potencial de activación**"). Así, por ejemplo, los canales K^+_{in} de raíz de *Arabidopsis* sólo se abren mientras la $[K^+]$ en el medio es tal que el gradiente electroquímico para el K^+ actúa en el sentido de la entrada de K^+ a la célula; es decir, los canales K^+_{in} funcionan como una válvula sensora de la $[K^+]$ del medio, que sólo permite la absorción de K^+ (Maathuis y Sanders, 1995), y no responden siquiera al voltaje cuando dicha $[K^+]$ es extremadamente baja o nula (Maathuis y Sanders, 1997). Esta manera de funcionar es lógica, ya que si no fuera así, el K^+ citosólico saldría de las células cuando la solución externa fuera pobre en K^+ .

Finalmente, resaltar que se ha propuesto **la existencia de un tipo de canales sensibles al "stretch"** o grado de estiramiento de la membrana. No sabemos por el momento si son los mismos o distintos a los aquí citados, ni si el transporte de K^+ (in o out) estaría involucrado en su funcionamiento.

3.3.- RELACIÓN ENTRE EL TRANSPORTE DE K^+ Y EL DE H^+ : ENERGÉTICA DEL TRANSPORTE DE K^+

De acuerdo con la revisión de Poole (1978), la energía metabólica necesaria para los procesos de transporte de membrana podría proceder de mecanismos directos (acoplamiento del transporte con una reacción química tal como la hidrólisis de ATP) o bien tratarse de mecanismos indirectos (el transporte se acopla a otro transporte de sustancias cuya distribución crea un gradiente electroquímico en la membrana).

Respecto al transporte de membrana del K^+ en plantas superiores, en un principio se propuso que ocurría de forma activa, siendo el ATP la fuente de energía (Hodges, 1973), dependiendo directamente de la bomba de extrusión de H^+ . Esta conclusión no sólo estaba basada en las muchas observaciones de intercambio K^+/H^+ , sino también en los efectos de muchos tratamientos que afectan a la actividad de la bomba electrogénica y tenían un efecto paralelo en la absorción de K^+ ; entre estos tratamientos se encuentran: longitudes de ondas específicas, envejecimiento, pH, hormonas y Fusicoccina (FC).

Entre los trabajos que incluyen tratamientos con hormonas y FC se encuentran los de Haschke y Lüttge (1973), los cuales establecen una correlación entre la extrusión de H^+ y la absorción de K^+ , con una estequiometría cercana a la unidad, para segmentos de coleoptilos de avena tratados con AIA (ácido Indol Acético). La conclusión de estos autores está algo debilitada, ya que los cambios en el flujo iónico se observan sólo después de varias horas del tratamiento con la hormona.

Igualmente, Marré et al. (1974) también sostienen que existen evidencias convincentes que apoyan la hipótesis de que la extrusión de H^+ inducida por promotores del crecimiento

estaría acoplada a la absorción de K^+ , por las siguientes razones:

- a) El análisis de los efectos tempranos de los promotores del crecimiento sobre los flujos de K^+ , H^+ y otros iones.
- b) La comparación entre los efectos de activadores y/o inhibidores sobre la extrusión de H^+ y el influjo de K^+ .
- c) La demostración de que el movimiento de H^+ depende de las disponibilidades de K^+ .

Según estos autores, sus resultados con segmentos internodales de guisantes tratados con FC y AIA estarían de acuerdo con la hipótesis de que ambos tratamientos conducen a una extrusión de H^+ que depende, a su vez, de la absorción de K^+ .

La actividad paralela entre la bomba de H^+ y la absorción de K^+ parece más evidente cuando la concentración de K^+ es baja, (Poole 1978), mientras que a concentraciones altas la "difusión pasiva" de K^+ jugaría un importante papel (Pitman et al., 1975).

Sacchi y Cocucci (1992) comprueban que el óxido de deuterio ($2H_2O$) produce una inhibición de la extrusión de H^+ por segmentos subapicales de raíces de maíz, debido a un efecto directo sobre la H^+ -ATPasa del plasmalema (esto lo comprueban en preparaciones de membrana plasmática de alta pureza). Sin embargo, este $2H_2O$ solamente provoca inhibición de la absorción de K^+ cuando la concentración externa de K^+ es baja (0.05 mM); cuando la concentración externa es mayor (0.5 y 5 mM) el efecto de $2H_2O$ es leve o incluso nulo. Esto querría decir que a concentraciones altas de K^+ la absorción estaría mediada por el Sistema II de baja afinidad de Epstein, que permitiría una entrada pasiva de K^+ , mientras que a concentraciones bajas la absorción de K^+ ocurriría por el Sistema I de alta afinidad, que estaría íntimamente relacionado con la extrusión de H^+ , de manera que estos autores sugieren que existiría un acoplamiento directo de ambos transportes.

Sin embargo, Kochian et al. (1989) estudiando la absorción de K^+ por raíces de maíz con microelectrodos selectivos, observan que cuando la absorción de K^+ está ocurriendo a través del sistema de alta afinidad, a baja concentración externa de K^+ , no está acoplada ni directa ni indirectamente al transporte de H^+ ; ellos sugieren que la absorción de K^+ no se lleva a cabo por un sistema de simporte H^+-K^+ sino que podría ser mediado directamente por una K^+ -ATPasa. En efecto, en *Neurospora* se había descubierto una K^+ -ATPasa (Bowman y Slayman, 1977; Scarborough, 1977) probablemente localizada en el plasmalema y activada por Mg^{2+} y K^+ , con una pequeña sensibilidad a los inhibidores Ouabaina y Oligomicina y fuertemente inhibida por DCCD. De manera semejante, Pedersen y Carafoli (1987) habían descrito la existencia de una ATPasa transportadora de K^+ en *E. coli* y *S. faecalis*. Se postula que esta enzima también estaría presente en plantas superiores y que jugaría un papel en la absorción de K^+ . Las cinéticas multifásicas (Nissen, 1977) de la absorción de K^+ y de la actividad K^+ -ATPasa son muy similares (Leonard y Hodges, 1973). Sin embargo, el significado de esta observación no está claro, puesto que los aniones (Elzam et al., 1964; Nissen, 1971) y los azúcares (Linask y Laties, 1973) muestran un tipo de transporte similar y no se conoce ninguna actividad ATPásica

ligada a su transporte.

También existen hipótesis opuestas a la existencia de un intercambio acoplado K^+/H^+ . Así, por ejemplo, en células de callos que dependían para su crecimiento de AIA, Bentrup et al. (1968) no detectaban una estimulación de la absorción de K^+ . Igualmente, la estimulación por FC de la extrusión de H^+ y la consiguiente elongación celular en segmentos internodales de guisante, resultaba ser insensible a la adición de pequeñas concentraciones de K^+ y Na^+ (Marré et al., 1972) o incluso podía ir acompañada de un eflujo neto de K^+ , en lugar de influjo (Ballio et al., 1968). Además, los efectos de AIA y FC en la elongación celular (dependientes probablemente de la extrusión de H^+) se ven, normalmente, muy poco afectados por la presencia de K^+ en el medio de incubación (Speary y Thimann, 1949; Purves, 1966).

Salvo estas excepciones, la mayoría de los trabajos que estudian la relación entre la extrusión de H^+ y absorción de K^+ parecen estar de acuerdo en que existe un acoplamiento entre ambos transportes; sin embargo, el tipo de acoplamiento (directo o indirecto) ha sido motivo de intensa polémica.

Así, Poole (1974) postuló que el transporte de K^+ ocurriría por el mismo transportador responsable del transporte de H^+ . Sin embargo el trabajo de Bellando et al. (1979) demuestra que la absorción de K^+ es inhibida mientras que la extrusión de H^+ es estimulada por la presencia de cationes lipofílicos; así, sugieren que el acoplamiento entre los flujos de H^+ y K^+ podría ser eléctrico y no debido a su transporte por un sistema común.

El hecho de que el K^+ estimule la H^+ -ATPasa (Sze, 1985) se tomó, en un principio, como evidencia de que la misma enzima se encarga también del transporte de K^+ . Sin embargo, el K^+ estimula la bomba de H^+ en vesículas de membrana plasmática de diferentes tejidos en ausencia o presencia de Valinomicina (O'Neill y Spanswick, 1984A; Rasi-Caldogno et al., 1985; Vara y Serrano, 1982); este resultado sería causado por una o la combinación de las siguientes razones:

- a) Conforme los H^+ son bombeados al interior de las vesículas ("inside out"), el K^+ se mueve por difusión pasiva para equilibrar el potencial eléctrico, hacia fuera de las vesículas, por una vía difusora independiente de la H^+ -ATPasa, o bien por el ionóforo Valinomicina. Sin embargo, la estimulación inicial de la bomba de H^+ por K^+ , cuando el potencial de membrana está completamente disipado por NO_3^- (Rasi-Caldogno et al., 1985) es un fuerte argumento en contra de que ésta sea la principal posibilidad.
- b) El K^+ estimula directamente la H^+ -ATPasa, aunque puede no ser transportado por ella.
- c) La ATPasa cataliza el intercambio H^+/K^+ a través de la membrana de las vesículas (absorción de H^+ y extrusión de K^+ en vesículas "inside-out"). La Valinomicina podría facilitar el acceso del K^+ al espacio intravesicular de nuevo. La salida de K^+ ocurriría por canales asociados a la H^+ -ATPasa.

Brinskin (1986) propone que el acoplamiento entre el transporte de K^+ y H^+ puede ser

directo o indirecto. Directo: la misma bomba H^+ -ATPasa también transporta K^+ al interior; indirecto: el responsable es un transportador de K^+ separado de la ATPasa, aunque energizado por la actuación de ella. El mismo autor, posteriormente, atribuye la estimulación de la actividad de la ATPasa por el K^+ , al menos en parte, a que el catión estimula el turnover de la fosfoenzima (Briskin, 1988), siendo este efecto similar al observado en otras ATPasas (de animales), que además transportan el catión directamente; cabría suponer, por tanto, que la ATPasa de plantas también transportaría el K^+ directamente, aunque este argumento no es en absoluto concluyente.

Cheesman y Hanson (1979) proponen que existiría un control directo de la cinética de absorción de K^+ por la concentración del mismo en el medio, de manera que, conforme aumenta la concentración de K^+ hay un progresivo reemplazamiento de un antiporte activo H^+/K^+ con estequiometría variable, por un simporte activo de H^+ asociado a un uniporte pasivo de K^+ .

En una revisión de Marré (1979) sobre las posibilidades de la FC en estudios fisiológicos, propone un posible mecanismo de acción de esta toxina fúngica sobre la estimulación del intercambio K^+/H^+ : la FC actuaría sobre la H^+ ATPasa activando la extrusión de H^+ y así creando el ambiente adecuado (hiperpolarización de la membrana) para que se produzca la entrada de K^+ y otros iones. El acoplamiento entre el transporte de K^+ y H^+ sería, así, indirecto (a través del potencial eléctrico de la membrana).

Posteriormente, Thibaud et al. (1986) con raíces de maíz, miden la concentración de K^+ , el intercambio H^+/K^+ y el potencial de membrana bajo cinco condiciones diferentes: aire, hipoxia, con Vanadato, con FC y a pH 4. Las conclusiones obtenidas fueron las siguientes: En primer lugar, la regulación del potencial de membrana se lleva a cabo por la variación de la estequiometría del intercambio directo H^+/K^+ , como habían propuesto Cheesman y Hanson. (1979). Dicha estequiometría parece estar más controlada por la concentración de K^+ que por el potencial de membrana. Los canales de K^+ parecen estar cerrados cuando la bomba de H^+ no está energizada (hipoxia) o cuando la concentración de K^+ es superior a 25 mM. Cuando la bomba de H^+ está específicamente bloqueada por Vanadato, los canales de K^+ permanecen abiertos a altas concentraciones, siendo incapaces de energizar una entrada neta de K^+ , pero permitiendo los intercambios isotópicos.

En un trabajo posterior, Newman et al. (1987), con microelectrodos selectivos de iones, obtienen como conclusión que la entrada de K^+ ocurre vía un proceso fuertemente electrogénico; ellos proponen, por primera vez, que podría verse involucrado un sistema de simporte K^+-H^+ mas que un antiporte K^+/H^+ .

Por otra parte, los trabajos de Vara y Serrano (1982) y Serrano (1984, 1985, 1989) demuestran que, la ATPasa de plasmalema de diferentes plantas y hongos, purificada y reconstituida en proteolisosomas, es capaz de bombear H^+ en ausencia de K^+ . En consecuencia, el transporte de K^+ estaría catalizado, probablemente, por un sistema diferente, e impulsado por el potencial eléctrico de membrana generado por la bomba de

H⁺. Sin embargo, otros autores, como Nagao et al. (1987) observan un requerimiento absoluto de K⁺ para el bombeo de H⁺ de la ATPasa purificada del plasmalema de raíces de maíz. Esto podría significar que existirían ATPasas distintas, una que transporta H⁺ y otra H⁺-K⁺ (Grouzis et al., 1990).

Por su parte, Cooper et al. (1991) defienden que en fracciones de membrana de hipocotilos de colza, enriquecidas tanto en plasmalema como en tonoplasto, lo que ocurre es un antiporte específico K⁺/H⁺. Si se establece previamente un gradiente de pH a través de la membrana, al añadir K⁺ se disipa este gradiente sin que ocurra despolarización de la membrana, lo cual indica que se está realizando un intercambio electroneutro de dos cationes alcalinos. Este antiporte es altamente específico para el K⁺ (dos veces más que para el Na⁺). Un trabajo previo de Hassidim et al. (1990) sigue esta misma línea, aunque trabajan con una planta halofita (*Atriplex*), donde el antiporte Na⁺/H⁺ es mayor que el K⁺/H⁺, mientras que en una planta glicofita (algodón) el antiporte mayoritario es K⁺/H⁺.

Lew (1991B), estudiando el crecimiento de pelos absorbentes de raíz de *Arabidopsis*, observa que está directamente relacionado con el transporte de K⁺ a través de canales, demostrando por primera vez la existencia de los mismos por la aplicación de un bloqueante específico de estos canales: el tetraetilamonio (TEA), la aplicación de este compuesto provoca hiperpolarización de la membrana, lo que constituye una clara evidencia de que existen tales canales de K⁺, encargados de la absorción del ión hacia el interior de la célula. También indica que el papel primario en la elongación celular debe tenerlo la bomba de H⁺, generando el potencial de membrana necesario para impulsar la absorción de K⁺.

En su revisión sobre la H⁺-ATPasa de membrana plasmática, Briskin y Hanson (1992) ponen de manifiesto de nuevo que el K⁺ estimula la actividad hidrolítica del ATP por la H⁺-ATPasa, acelerando la liberación del Pi. En cuanto al transporte de K⁺, proponen tres posibilidades: a) Que sea transportado por la propia H⁺-ATPasa. b) Que el K⁺ pase al interior celular aprovechando el potencial de membrana creado por la H⁺-ATPasa, pero que no sea transportado por ella y c) Que el K⁺ sea transportado a través de un canal específico asociado íntimamente a la enzima.

Los estudios de "patch-clamp" con protoplastos de células de guarda (Assmann et al., 1985), donde la bomba de protones funciona en ausencia de K⁺, apoyan el acoplamiento indirecto entre el transporte de H⁺ y K⁺, defendido en los experimentos fisiológicos previos (Serrano, 1985). En el mismo sentido, Ketchum et al. (1989), como ya se ha descrito con anterioridad (Apartado 3.2.1 de este Capítulo) aplicando la técnica de patch-clamp en configuración "whole-cell", detectan la existencia de tres corrientes de K⁺ en protoplastos de células de maíz, ninguna de las cuales estaría generada por la H⁺-ATPasa.

Investigaciones con *Neurospora crassa* se toman como modelo del mecanismo de absorción de K⁺. Estos estudios se basan en la hipótesis de que los "carriers" K⁺-H⁺ (simportadores) dependientes de voltaje representan el principal mecanismo para la

absorción de K^+ hacia dentro de la célula (Blatt y Slayman, 1987; Rodríguez-Navarro et al., 1986). Se propone que el simporteador K^+-H^+ es un transportador activo, a través del cual el gradiente de pH generado por la bomba de protones conduce la absorción de K^+ ; es decir, vuelve un H^+ dentro de la célula conduciendo la entrada de un ión K^+ .

Los trabajos de biología molecular comentados en el apartado anterior han contribuido de manera importante a la clarificación del problema del acoplamiento y la aplicación de la energía metabólica al transporte de K^+ . Así, en los trabajos ya comentados de Schachtman y Schroeder (1994), se propone un modelo para el mecanismo de absorción de K^+ de alta afinidad, mediante la expresión en sistemas celulares heterólogos del gen HKT1 de raíces de trigo, que codificaría el transportador encargado de dicha absorción; los autores indican que aunque el mecanismo biofísico del transportador de K^+ de alta afinidad en plantas superiores aún es desconocido, ellos proponen que sería un cotransportador-simporteador de absorción H^+-K^+ , como el que se ha propuesto para *Neurospora*. Similares resultados obtienen Maathuis y Sanders (1994), mediante patch-clamp en configuración "whole-cell" de protoplastos de raíz de *Arabidopsis thaliana*, concluyendo que el mecanismo de alta afinidad de absorción de K^+ está energizado por el gradiente de H^+ de la membrana plasmática vía un mecanismo simporteador K^+-H^+ .

En cuanto al mecanismo de absorción de K^+ que opera a concentraciones altas, de orden mM (Sistema II de baja afinidad de Epstein), Assmann et al. (1985), con células de guarda de *Vicia faba* indican que en ellas opera una bomba activa, que extruye H^+ y provoca un gradiente eléctrico que favorece la entrada de K^+ a través de canales. También en la revisión de Serrano y Zeiger (1989) ponen de manifiesto que, en células de guarda, la luz azul y roja activan la bomba de H^+ , produciéndose entonces un movimiento de K^+ a través de canales selectivos (canales que son bloqueados por TEA). La bomba se activa tanto en presencia como en ausencia de K^+ , lo cual querría decir que dicha bomba no estaría obligada a funcionar como un antiporteador H^+/K^+ . El hecho de que la H^+ -ATPasa esté involucrada se corrobora adicionando Vanadato a la solución de la pipeta, que hace decrecer la estimulación producida por la luz roja.

Si embargo, otros experimentos de "patch-clamp" de Serrano (1989) demuestran que mutantes de H^+ -ATPasa de levadura presentan alteración en el canal de K^+ dependiente de voltaje. Esto indica que, en estas membranas, la molécula de H^+ -ATPasa está estrechamente asociada con el canal de K^+ y podría incluso contenerlo.

Por su parte, en su revisión sobre proteínas de membrana plasmática, Susman (1994) concluye que la actuación de la H^+ -ATPasa de plasmalema produce un potencial eléctrico (negativo en el interior) y un gradiente químico de H^+ (pH básico en el citoplasma: 7.1-7.5, y ácido en la pared celular: 5-6); esta proteína se encargaría sólo de bombear H^+ , mientras que el movimiento de iones K^+ ocurriría a través de otra proteína separada, acoplada indirectamente al potencial eléctrico y al gradiente de pH generado por la bomba, especialmente cuando opera el denominado Sistema I transportador de K^+ de alta afinidad,

a concentraciones bajas de K^+ en el medio (de orden μM) cuando el gradiente electroquímico de K^+ es insuficiente para que la absorción se lleve a cabo por canales, debiendo ocurrir a través de un "carrier" de K^+ que utiliza el gradiente de pH o por una bomba de K^+ directamente acoplada a la energía metabólica via ATP u otro componente altamente energético.

Finalmente, Bellando et al (1995) han estudiado la relación entre el transporte de H^+ y K^+ en hojas de *Elodea densa*, indicando que hay dos modos distintos de interacción y la transición de uno a otro modo puede ser inducida por un cambio en el estado de activación de la H^+ -ATPasa o por la activación de los sistemas transportadores de K^+ . Estos dos tipos de interacción serían el reflejo de dos condiciones fisiológicas distintas, definidas por los autores como "baja polarización de la membrana" y "alta polarización de la membrana". En el primer caso hay una baja extrusión de H^+ (baja activación de la H^+ -ATPasa) y baja absorción de K^+ , no existiendo acoplamiento entre ambos transportes. En el segundo caso, cuando la H^+ -ATPasa se activa (por factores tales como FC, luz o acidificación del citoplasma) aumenta la extrusión de H^+ , lo que provoca la hiperpolarización de la membrana, que abre canales K^+_{in} , permitiendo la entrada de K^+ , que a su vez provoca una despolarización parcial de la membrana que hace aumentar el eflujo de H^+ por la bomba; en estas condiciones la relación entre el eflujo de H^+ y el influjo de K^+ es cercana a la unidad.

El reciente descubrimiento de los canales K^+_{out} y los canales de "stretch", así como su existencia, o no, en las membranas de las células de la raíz, es un problema adicional, aún muy poco conocido, que complica aún más el panorama del transporte de K^+ por las raíces.

EN RESUMEN, de todos los datos comentados, en especial de los descubrimientos a nivel molecular de algunos transportadores de K^+ y su funcionamiento discutidos en el Apto 3.2.2., comienza a emerger una imagen acerca del **tipo y funcionamiento de los transportadores de K^+ en las raíces**, así como de la energización de los mismos, en relación con la absorción y transporte de este nutriente por dichas raíces:

Los **canales K^+_{in}** jugarían **dos funciones** principales, que se solapan:

a) Constituirían la vía o **Sistema II de baja afinidad** para la absorción de K^+ por las raíces, cuyo funcionamiento estaría impulsado por el potencial de membrana creado por la bomba primaria H^+ -ATPasa, (y/o la cadena redox) en la membrana de las células epidérmicas y del córtex de la raíz.

b) También contribuirían, paralelamente, al **control del potencial de membrana** a niveles convenientes, modulando la conductancia de la membrana y actuando como un **sensor del gradiente de K^+ suelo/células de la raíz**, de manera similar a como funciona un electrodo de K^+ . Naturalmente, esta función sin duda influiría en la absorción de otros nutrientes por otros transportadores (Schroeder et al., 1994).

Canales semejantes, con parecido funcionamiento, se han propuesto como responsables de

la **descarga del xilema** y su entrada al simplasto, en el plasmalema de las células del parénquima xilemático de tallos y hojas.

Sin embargo, la **absorción de K^+ por canales K^+_{in} sólo puede ocurrir cuando el gradiente electroquímico para el K^+ impulsa un flujo hacia dentro de las células**. Generalmente, el gradiente está en el sentido de la salida de K^+ de las células cuando la concentración de la solución externa cae por debajo de 0.5-0.2 mM, de acuerdo con la ecuación de Nerst para el K^+ . En estas circunstancias el transporte de K^+ no puede ocurrir a través de canales, que son "pasivos", y obedecen al gradiente electroquímico, sino por otro tipo de **transportadores "activos"**. Se ha propuesto la existencia de **cotransportadores-simporadores**, que acoplarían la entrada de K^+ a la de otro catión (K^+-H^+ o K^+-Na^+ , Rubio et al. 1995, 1996) cuyo gradiente favorable a la entrada sería aprovechado para absorber también K^+ . Este sería el **Sistema I, de alta afinidad** para el K^+ , detectado en las raíces cuando la concentración del medio es baja.

Los **simporadores de K^+ operarían en paralelo con los canales K^+_{in}** ; por lo tanto, mientras que estos transportadores activos están funcionando es imperativo que la conductancia de los canales se haga mínima, o el K^+ acumulado activamente podría salir de nuevo de las células. Como hemos discutido, los canales K^+_{in} se cierran en estas condiciones, como resultado de su capacidad para actuar como sensores de la concentración de K^+ externa. En cuanto a los canales de extrusión de K^+ , **canales K^+_{out}** , su actividad a baja concentración externa de K^+ no tiene por qué ser nula; sin embargo, al parecer en estas circunstancias la conductancia del estado abierto de estos canales está también drásticamente reducida (Maathuis y Sanders, 1997).

Sin embargo, **las principales funciones de los canales K^+_{out} parecen centrarse en la regulación del potencial de membrana**, para recuperar valores normales **tras una despolarización** (que con frecuencia va ligada a la respuesta a estímulos, como lo prueba la dependencia de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático, conocido segundo mensajero en muchas cadenas de transmisión de señales, del único canal K^+_{out} clonado hasta la fecha) o bien para evitar un exceso de despolarización de las membranas (que podría ocurrir por otras causas, como por ejemplo, la actuación de otros transportadores de solutos).

También se han propuesto canales K^+_{out} (CORK, NORK, de diferentes especificidad) para la **carga del xilema**, en el plasmalema de las células del parénquima xilemático de la raíz, donde liberarían iones del simplasto al xilema.

En cualquier caso, el estado actual de los conocimientos a nivel molecular del transporte de K^+ por las raíces es insuficiente para obviar la necesidad de estudios tendentes a caracterizar los complejos procesos de la absorción de K^+ por raíces enteras, "in vivo". En efecto, se han encontrado claras discrepancias en cinética y selectividad entre los resultados con tejido vegetal intacto y los datos moleculares, especialmente los que se refieren a la expresión de genes de transportadores en sistemas heterólogos. Esto no es sorprendente, ya que la regulación de los transportadores de K^+ por otros componentes de

la membrana (como cadena redox, receptores de hormonas y estímulos u otros transportadores, incluida la H^+ -ATPasa) se elimina en los sistemas reconstituidos, en que la proteína transportadora se incluye en membranas muy diferentes de las membranas vegetales originales. Ello sin contar con los cambios en la expresión genética o en la maduración de los transcritos que pudieran producirse en los sistemas heterólogos donde se expresan genes provenientes de plantas.

4- EFECTO DE DISTINTOS ADITIVOS (EFECTORES) SOBRE LOS FLUJOS DE H^+ Y K^+

4.1- EFECTORES QUE ACTÚAN SOBRE EL TRANSPORTE DE K^+

4.1.1.- Valinomicina

El antibiótico **Valinomicina promueve un flujo rápido de K^+** , haciendo que el potencial electroquímico para el catión alcance los valores de equilibrio previstos por el potencial de Nerst. Ello se debe a que la Valinomicina actúa como un ionóforo o canal artificial pasivo para el K^+ , como Reed (1979) demostró con células de callo, y otros investigadores en diferentes materiales vegetales, según veremos a continuación.

Los resultados que se obtienen, en general, cuando se aplica Valinomicina a vesículas aisladas de membranas de células vegetales, donde otros sistemas reguladores están eliminados y sólo operan los sistemas de transporte de la membrana, dependerán de las concentraciones de K^+ a un lado y otro de dicha membrana: si la concentración de K^+ externa es menor que la interna, la Valinomicina provocará un eflujo de K^+ , y si las concentraciones están al contrario se producirá un influjo de K^+ . Los flujos de K^+ provocados por la Valinomicina influyen, a su vez, sobre la actividad H^+ -ATPasa de la membrana, que tratará de compensar los cambios en el potencial de membrana debidos a los flujos de K^+ con cambios en el gradiente de pH. En el caso de vesículas de plasmalema, que suelen sellarse con la membrana invertida respecto a como ésta se halla en la célula intacta (vesículas "inside-out"=cara citoplasmática de la membrana hacia fuera), y siempre que la relación de concentraciones de K^+ dentro/fuera imponga un potencial de Nerst en el sentido de la salida de K^+ de las vesículas, la aplicación de Valinomicina provoca una activación de la H^+ -ATPasa que se manifiesta en una acidificación del interior vesicular (Poole, 1978). El efecto sobre la H^+ -ATPasa puede verse incrementado si simultáneamente se disipa el ΔpH creado por su actuación con un ionóforo de H^+ . Así ocurre tras la adición de Valinomicina junto con CCCP (ionóforo de H^+) a vesículas de membrana de células de callo de tabaco, estimulándose en un 70-80% la actividad Mg-ATPásica dependiente de KCl, en ausencia de un gradiente inicial de KCl o de pH (Reed, 1979). De manera semejante, en vesículas aisladas de membranas de distintos tejidos vegetales el CCCP o la

Valinomicina por sí solos no son tan efectivos en la estimulación de la actividad de la H⁺-ATPasa como los dos juntos o bien la nigericina (que promueve el intercambio H⁺/K⁺) o la gramicidina (que promueve el intercambio H⁺/catión) (Sze, 1980). Sin embargo, se observan diferencias en la respuesta a los ionóforos de los distintos materiales, que han de ser atribuidas a diferencias en permeabilidad de las vesículas, al distinto origen y quizás, a la existencia de transportadores diferentes en los distintos tejidos.

Por su parte, De Michelis y Spanswick (1986), con vesículas de membrana plasmática de raíces de maíz, también observan que la adición de Valinomicina (0.1 μM) estimula el bombeo de H⁺ y por tanto la acidificación intravesicular. Lo mismo ocurre con vesículas de membrana plasmática de raíces de cebada (Dupont et al., 1988), donde el bombeo de H⁺ por la H⁺-ATPasa aumenta al añadir Valinomicina 1 μM, acidificándose el interior vesicular; de manera congruente con lo anterior, también comprueban que el FCCP (ionóforo de H⁺) provoca el colapso del ΔpH creado por la actuación de la H⁺-ATPasa en la vesícula, pero que el efecto es fuertemente acelerado por la presencia simultánea de Valinomicina. Finalmente Palmgren (1990), en vesículas de membrana plasmática de raíces de avena, mide simultáneamente el bombeo de H⁺ y la hidrólisis del ATP (actividad ATPásica) comprobando que, al añadir 0.50 μg/ml de Valinomicina, la velocidad de bombeo de H⁺ casi se duplica, mientras que la actividad ATPásica no se ve afectada. Los autores concluyen que no siempre la velocidad de acumulación de H⁺ en el interior vesicular (acidificación) depende exclusivamente de la actuación, con gasto de ATP, de la H⁺-ATPasa, sino que también está relacionada con otros factores que impiden la formación de un potencial de membrana, tal como ocurre con el aumento de permeabilidad de la membrana a cationes provocada por el ionóforo.

Resultados similares a los de vesículas de plasmalema se obtienen con vesículas procedentes del tonoplasto. Así, según Dupont et al. (1988), en vesículas de tonoplasto la aplicación de Valinomicina produce un colapso parcial del gradiente de pH (provoca la extrusión de H⁺ de las vesículas). Como en el caso de las vesículas de plasmalema, el FCCP sólo actúa eficientemente si está presente la Valinomicina, lo que es interpretado por los autores como prueba de que la velocidad de transporte por la ATPasa del tonoplasto debe estar limitada por un potencial de membrana. Estos resultados sólo pueden ser compatibles con vesículas con la cara citoplasmática del tonoplasto hacia dentro.

Más claros son los resultados de Ward y Sze (1992) con H⁺-ATPasa purificada de tonoplasto de avena y reconstituida por incorporación a liposomas de fosfolípidos de membrana de E.coli, donde la Valinomicina estimula la H⁺-ATPasa, acidificando el interior de las vesículas, cuando la relación $[K^+]_{int}/[K^+]_{ext}=3$. Estos resultados son semejantes a los obtenidos con vesículas de plasmalema y son congruentes con una configuración de las vesículas de tonoplasto igual que las del plasmalema (cara citoplasmática fuera), y con la actualmente admitida localización de la H⁺-ATPasa del tonoplasto (extruye H⁺ hacia la vacuola). También detectan estos autores una lenta acidificación del interior vesicular sin

intervención de la H^+ -ATPasa (en ausencia de Mg^{2+} , que es esencial para su funcionamiento) cuando se ponen los proteoliposomas cargados con K^+ en medio exento del catión, lo que pone de manifiesto, como ocurría con vesículas de plasmalema, que la Valinomicina y el $\Delta[K^+]$ generan un potencial de membrana que promueve una filtración de H^+ hacia el interior vesicular de manera pasiva.

También se han hecho experiencias de aplicación de Valinomicina a cloroplastos. Así, Nishio y Whitmarsh (1991) estudian el efecto de distintos ionóforos, entre ellos la Valinomicina, sobre cloroplastos de espinaca intactos y lisados (vesículas de la membrana tilacoidal); en este material el ionóforo disipa el gradiente de potencial eléctrico, pero no el gradiente de pH, a través de la membrana tilacoidal. En congruencia, tiene poco efecto sobre la síntesis de ATP bajo luz constante, pero es un efectivo desacoplador durante un corto periodo tras la iluminación. Todo esto ocurre tanto en los cloroplastos intactos como en los lisados o vesículas tilacoidales, lo que se interpreta como prueba de la buena penetración del ionóforo.

En cuanto a los efectos de la Valinomicina sobre plántulas enteras, raíces o protoplastos, los resultados que vamos a comentar ponen de manifiesto que a veces son diferentes a los que se obtienen con vesículas de membrana, ya que otros procesos reguladores y secundarios se superponen al efecto sobre los transportadores de membrana.

Cuando se trabaja con tejidos o células aisladas, los resultados de la Valinomicina sobre los flujos de K^+ son todavía semejantes a los de vesículas. Así, en una de las primeras experiencias de este tipo Lin y Hanson (1976) aplican Valinomicina a tejido de raíz de maíz, concluyendo que la absorción de K^+ se está realizando activamente, o sea en contra del gradiente de concentración, ya que se observa una despolarización transitoria tras la aplicación del ionóforo. Kim et al. (1992) han realizado medidas de potencial de membrana de protoplastos de células del aparato pulvinular de *Samanea saman*, donde el transporte de K^+ juega un papel central en la regulación de los cambios de turgencia asociados a los movimientos de las foliolas. En estos protoplastos, la Valinomicina provoca una hiperpolarización de la membrana si la concentración externa es baja con respecto a la del citoplasma (<75 mM, mientras que los protoplastos se habían obtenido en un medio con 100 mM $[K^+]$), por el contrario, provoca una rápida despolarización si la concentración de K^+ del medio es alta ($[K^+]=200$ mM), lo que es congruente con los resultados de las vesículas. Sin embargo, estudiar los efectos sobre los cambios de pH y el funcionamiento de la H^+ -ATPasa en células enteras es mucho más equívoco, ya que el citoplasma posee mecanismos tamponadores que mantienen el pH constante, y además, en la membrana de la célula muchos otros transportadores contribuyen al potencial de membrana y afectan al funcionamiento de la H^+ -ATPasa.

Finalmente, si se trabaja con plántulas intactas, en que los fenómenos de transporte a larga distancia raíz-tallo retiran rápidamente el K^+ absorbido de los tejidos más externos de la raíz hacia su interior, hacia el xilema, los previsibles efectos de extrusión de K^+ por las

células provocados por la Valinomicina cuando la concentración externa es baja (<1 mM) pueden ser muy pequeños o incluso nulos, detectándose solamente una ligera estimulación de la absorción cuando el K^+ está presente en el medio a concentración externa alta (>10 mM), ya que el potencial de Nerst en este caso impone un influjo de K^+ (Klotz y Erdei, 1988).

4.1.2.- Ouabaina

La Ouabaina (Mac Robbie 1971) es un **inhibidor específico del intercambio K^+/Na^+** en células animales, afectando la absorción de K^+ y extrusión de Na^+ por estas células. En su clasificación de las ATPasas, Pedersen y Carafoli (1987) indican que dentro de las ATPasas tipo "P" se encuentra la Na^+/K^+ -ATPasa (de células animales), y que éste es el transportador inhibido específicamente por Ouabaina.

En plantas, sólo se ha descrito sensibilidad a la Ouabaina en halofitas y algas marinas. Así, en *Hydrodictyon africanum* (Raven, 1967A, 1967B), en *Nitella translucens* (Mac Robbie, 1962) y *Allium* (Brow et al., 1964), la Ouabaina inhibe el intercambio Na^+/K^+ en el orden de μM .

En plantas glicofitas se ha utilizado la Ouabaina para detectar sistemas de intercambio Na^+/K^+ semejantes a los de células animales y halofitas. Así, por analogía con los efectos en dichas células, la Ouabaina fue utilizada por Davis y Jaworski (1979) para proponer la existencia de una bomba de extrusión de Na^+ en raíces de maíz. En otros casos, la Ouabaina mostraba poco efecto sobre el intercambio K^+/Na^+ , como en raíces de cebada (Jeschke, 1970, 1979) o sobre la actividad ATPásica del plasmalema (Hodges, 1976). Otros investigadores demostraron que el sistema transportador de Na^+ y K^+ de diferentes tipos de raíces era completamente distinto a la Na^+/K^+ -ATPasa de tejido animal (Jeschke, 1970; Hodges, 1976; Ratner y Jacoby, 1976), lo que justificaba la poca sensibilidad a la Ouabaina.

Sin embargo, Cram (1968) estudió los efectos de la Ouabaina sobre los flujos de K^+ y Na^+ por discos de zanahorias, comprobando que no tenía ningún efecto sobre la entrada de K^+ pero ejercía una pronunciada inhibición sobre la salida de Na^+ ; esto parece indicar que en este material no existe una bomba de intercambio acoplado de K^+ y Na^+ como la que opera en algas (Mac Robbie, 1970), que es similar a la de células animales, pero que el transporte de Na^+ puede ser sensible al inhibidor.

Se realizaron muchos otros intentos para demostrar que en células vegetales existiría una bomba K^+/Na^+ , usando la Ouabaina como agente bloqueante (Raven, 1971). Finalmente, estas experiencias acabaron en fracaso, ya que, aunque se comprobaba que existían considerables evidencias de la existencia de ATPasas involucradas en el transporte de K^+ y Na^+ en plantas (Fisher et al., 1970; Kylin, 1973; Mac Robbie, 1970), el efecto de la Ouabaina sobre el transporte de K^+ era mínimo. Estos hechos llevaron a Higinbotham (1973) a proponer que la Ouabaina no afecta al transporte de las ATPasas de origen

vegetal porque éstas deben ser esencialmente diferentes a las animales. La primera de estas ATPasas de plantas superiores, la K^+ -ATPasa de plasmalema propuesta por Poole (1978), mostraría sólo una pequeña sensibilidad a la Ouabaina.

Más tarde, cuando se generalizó la idea de que las principales ATPasas de membranas vegetales responsables del transporte iónico en las mismas eran H^+ -ATPasas de extrusión, Sommarin et al. (1985) midieron la actividad de la H^+ -ATPasa de vesículas de plasmalema de raíces de avena y de trigo en presencia de 1 mM de Ouabaina, observando que su actividad no sufría ningún cambio y concluyendo que era insensible al inhibidor.

Finalmente, Gabbay-Azaria et al. (1994), estudiando la actividad H^+ -ATPásica de membrana plasmática de cianobacterias tolerantes a la sal, concluyen que está involucrada en la extrusión de Na^+ y por tanto en la resistencia al stress salino, pero que su actividad no se ve afectada por la Ouabaina.

Más recientemente, los trabajos ya comentados del equipo de Schroeder (Rubio et al., 1995) parecen demostrar que, en plantas glicofitas, el sistema transportador de intrusión de K^+ de alta afinidad es un carrier cotransportador de Na^+ y K^+ , al menos para concentraciones de Na^+ suficientes, y que modificaciones en la molécula de este transportador son cruciales en la resistencia a la salinidad de dichas plantas. Ello demostraría definitivamente que las glicofitas tienen un sistema de transporte de Na^+ y K^+ muy diferente al de las células animales y halofitas, y que no es una ATPasa, lo que explicaría la poca sensibilidad del transporte de Na^+ y K^+ a la Ouabaina.

De todas formas, los resultados contradictorios arriba descritos nos impulsaron a usar el inhibidor en nuestras experiencias, como forma de descartar la existencia en nuestras raíces de sistemas semejantes a los de células animales.

4.2.- EFECTORES QUE ACTÚAN SOBRE LOS CANALES DE H^+

4.2.1.- DCCD (Diciclohexilcarbodiimida)

El DCCD es un inhibidor lipofílico que actúa en general sobre las H^+ -ATPasas (Solioz, 1984; Sze, 1985). Su modo de acción consiste en bloquear el movimiento transmembranario de los H^+ catalizado por este enzima, ya que interacciona con grupos carboxilos localizados el "bolsillo" hidrofóbico del canal de H^+ . Por tanto, en la clasificación de ATPasas de Pedersen y Carafoli (1987) se incluye el DCCD como inhibidor de los tres tipos de H^+ -ATPasa: Tipo "P" (que se fosforila, característico del plasmalema de células vegetales), tipo "V" (vacuolar) y tipo "F" (con dos subunidades F0 y F1, característico de las mitocondrias animales y vegetales). En efecto, se ha demostrado que el DCCD inhibe la H^+ -ATPasa mitocondrial en diversos materiales vegetales, la H^+ -ATPasa del plasmalema de *Neurospora* (Sussman y Slayman, 1983), la H^+ -ATPasa purificada de plasmalema de raíces de tomate (Anthon y Spanswick, 1986), la H^+ -ATPasa de vesículas de membrana plasmática de raíces de cebada (Dupont et al., 1988) etc.

Igualmente inhibe la H^+ -ATPasa de tonoplasto de *Neurospora crassa* (Bowman y Bowman, 1982) y de raíz de remolacha roja (Briskin y Poole, 1984; Bennett et al., 1984; Olesky y Bennett, 1987). En raíces de avena, Schumaker y Sze (1985) estudiaron el sistema de transporte Ca^{2+}/H^+ localizado en el tonoplasto, comprobando que este sistema también es sensible al DCCD; posteriormente, Ward y Sze (1992) demostraron que, en este material, el DCCD inhibía en realidad el transporte de H^+ llevado a cabo por la H^+ -ATPasa del tonoplasto. Igualmente, en vesículas de tonoplasto aisladas de fruto de tomate la actividad ATPásica se inhibía fuertemente por DCCD (Oleski et al., 1987A, 1987B).

La inhibición producida por DCCD es irreversible, ya que es irreversible la unión del inhibidor con el lugar activo del canal de H^+ del enzima. Así, en cultivo de células de Asparagus, Bown y Crawford (1988) demuestran la completa anulación de la acidificación del medio adicionando 300 μ M de DCCD, de manera que la posterior adición de FC, que en condiciones normales activaría la extrusión de H^+ (Marré, 1979), no es capaz de reactivar el eflujo de H^+ .

Además de sobre las H^+ -ATPasas, se ha propuesto que el DCCD interacciona con diferentes componentes de la cadena redox de las mitocondrias, todos ellos involucrados en el movimiento de H^+ (Solioz, 1984).

De forma semejante, se ha propuesto que el DCCD también podría interaccionar con los componentes de la cadena redox del plasmalema. Así, Rubinstein y Stern (1986), con segmentos de raíz de *Zea mays*, demostraron que la acidificación del medio inducida por HCF (III) (que implica la actuación de dicha cadena) es inhibida por la adición de DCCD. Bown y Crawford (1988) obtuvieron resultados semejantes con células de *Asparagus* logrando la inhibición de la acidificación del medio con DCCD; si la concentración de inhibidor era baja, el HCF (III) reactivaba la acidificación, ya que activaba de nuevo el sistema redox, pero si se aumentaba la concentración de DCCD, se conseguía inhibir por completo e irreversiblemente la acidificación del medio a través de la cadena redox, de manera que una posterior adición de HCF (III) no reinstauraba la acidificación. Según sus conclusiones, estos resultados, demostrarían que el sistema encargado de la extrusión de H^+ relacionado con la cadena redox es independiente de la H^+ -ATPasa de la membrana; además, postulan que este sistema de extrusión de H^+ ligado a la cadena redox no sería capaz de estimular el intercambio K^+/H^+ .

Lin (1984) realizó experiencias con protoplastos de raíces de maíz, obteniendo como resultado que la adición de DCCD anulaba el efecto estimulador que produce el NADH sobre la extrusión de H^+ , pero no alteraba los niveles de actividad de la NADH oxidasa (transporte de e^-); así, esta inhibición la interpreta Lin como la prueba de que existiría un canal para los H^+ ligado a la cadena redox del plasmalema y sensible al DCCD.

Sin embargo, otros autores como Rubinstein y Stern (1986) proponen que al activarse la cadena se activaría la H^+ -ATPasa, de manera que no existirían dos sistemas con canales de H^+ diferentes, sino que todo el transporte de H^+ se realizaría por la H^+ -ATPasa. Alcántara

et al. (1991) apoyan esa conclusión, trabajando con raíces de pepino deficientes en hierro que presentan mayor actividad reductasa ligada a la cadena redox que las normales; ellos encontraron que dicha actividad provocaba la acidificación del medio y que el DCCD inhibía completamente esta acidificación, pero sólo inhibía parcialmente la actividad reductasa con lo que, aparentemente, actividad reductasa (ligada al transporte de electrones de la cadena redox) y extrusión de H^+ serían procesos independientes, no acoplados.

Sommarin et al. (1985), en preparaciones de membrana plasmática de trigo y avena, comprueban que el DCCD es un inhibidor de la H^+ -ATPasa del plasmalema e inhibe, incluso, cuando hay una activación extra por K^+ y por Mg^{2+} .

Finalmente, cianobacterias tolerantes a la sal presentan en su membrana plasmática una H^+ -ATPasa involucrada en la resistencia a la salinidad y que se inhibe por DCCD (Gabbay-Azaria et al., 1994).

Respecto al **efecto del DCCD sobre el transporte de K^+** , la fusicoccina (FC) promueve el intercambio H^+/K^+ (Marré, 1979) y el DCCD inhibe este efecto de la FC, inhibiendo tanto la extrusión de H^+ como la absorción de K^+ ; Marré et al. (1974) utilizan el DCCD como inhibidor de la actividad K^+ -ATPasa del plasmalema para demostrar que el transporte de H^+ está acoplado al de K^+ , ya que al añadir el inhibidor a segmentos internodales de guisante se bloquea completamente la extrusión de H^+ y la elongación celular tanto en presencia como en ausencia de FC ó ácido indol-ácético (AIA), que activan la extrusión de H^+ por las células en crecimiento. Lin (1984) y Gronwald y Leonard (1982) también midieron la absorción de K^+ por protoplastos de raíces de maíz y observan que el DCCD es un fuerte inhibidor del influjo de K^+ . Igualmente, Atkinson y Baker (1989) demostraron que el intercambio H^+/K^+ por cultivos de células de tabaco es inhibido por inhibidores de H^+ -ATPasa, entre otros DCCD.

Finalmente, Kim et al. (1992), estudiando los movimientos rítmicos sensibles a la luz de hojas de *Samanea saman*, que están directamente relacionados con los flujos de K^+ de sus células extensoras y flexoras del pulvinus de los folíolos, observan que al iluminar los protoplastos procedentes de dichas células ocurre una hiperpolarización de la membrana y este efecto se inhibe al adicionar DCCD o Vanadato. Sin embargo, al iluminar y además adicionar K^+ lo que ocurre es una despolarización de la membrana y este efecto no lo inhibe DCCD ni Vanadato. Ellos concluyen que esto quiere decir que la hiperpolarización inducida por la luz resulta de la activación de la H^+ -ATPasa, pero que esta hiperpolarización no es el único factor controlador de la apertura de los canales de K^+ .

En resumen, aparentemente el efecto del DCCD sobre la absorción de K^+ sería indirecto, a través de la inhibición que provoca sobre la H^+ -ATPasa.

4.3.- EFECTORES QUE ACTÚAN SOBRE LA H⁺-ATPasa

4.3.1.- Oligomicina

La Oligomicina es un antibiótico producido por algunos hongos del género *Streptomyces* que inhibe la ATP-sintasa mitocondrial por su unión a un componente de la subunidad F₀, lo que impide la correcta unión entre las subunidades F₀ y F₁ en el complejo F₀-F₁, bloqueando tanto la hidrólisis como la síntesis de ATP en la mitocondria, así como el transporte de H⁺ a través de dicha subunidad F₀ (Nicholls, 1987).

La Oligomicina, en general, inhibe sólo las H⁺-ATPasas tipo "F" descritas por Pedersen y Carafoli (1987). En plantas la H⁺-ATPasa afectada es la mitocondrial; sin embargo, si el material vegetal empleado incluye células enteras, como es el caso de las experiencias de Lin (1984) con protoplastos de raíces de maíz, la adición de 5 µg/ml de Oligomicina (concentración sólo un poco por encima de lo que es efectivo sobre mitocondrias aisladas) provoca la inhibición de la extrusión de H⁺, tanto si ésta se está llevando a cabo sólo por la H⁺-ATPasa como si interviene también la cadena redox, cuando presumiblemente ésta se activa por la adición de NADH. Estos resultados han sido interpretados como un efecto indirecto de la Oligomicina, que afectaría al sistema que aporta el sustrato energético necesario para el transporte (el ATP mitocondrial).

Sin embargo, elevadas concentraciones de inhibidor se demuestra que tienen un efecto directo sobre la H⁺-ATPasa purificada de plasmalema de levaduras (Villalobo et al., 1981)). En plantas, De Michelis et al. (1984) han observado que las actividades H⁺-ATPasa presentes en vesículas de plasmalema y tonoplasto de rábano son sensibles a la Oligomicina, aunque también se requieren concentraciones muy superiores a las necesarias para inhibir la ATPasa mitocondrial. Por su parte, Mandala y Taiz (1985), en vesículas microsomales y de tonoplasto de coleoptilos de maíz, también observan una inhibición del 70% de la actividad extrusora de H⁺ por elevadas concentraciones de Oligomicina (10 µg/ml); sin embargo, esta inhibición es atribuida por los autores a efectos no específicos, o bien a contaminación con membranas mitocondriales. De manera semejante, Oleski et al. (1987A) encuentran una pequeña disminución de la actividad H⁺-ATPasa de vesículas de tonoplasto de tomate por la adición de Oligomicina a concentraciones altas, que también atribuyen a contaminación con membrana mitocondrial. Igual ocurre en el trabajo de Gabathuler y Cleland (1985), donde se observa una ligera inhibición por Oligomicina de la H⁺-ATPasa de vesículas de plasmalema de guisante, atribuida por los autores a la presencia de contaminación mitocondrial. Por su parte, Dupont et al. (1988), usan la Oligomicina para ver la contaminación de F₀F₁-H⁺-ATPasa mitocondrial en fracciones de membrana de tonoplasto y plasmalema de raíces de cebada. Finalmente, De Michelis y Spanswick (1986) demuestran que las concentraciones de Oligomicina que inhiben la ATPasa mitocondrial de raíces de maíz no afectan a la H⁺-ATPasa de vesículas de plasmalema del mismo material. A la misma conclusión llegan

Somarin et al. (1985) en un estudio de la H⁺-ATPasa del plasmalema de trigo y avena, donde comprueban que el inhibidor de la ATPasa mitocondrial Oligomicina no tiene ningún efecto sobre la ATPasa del plasmalema, al igual que Norling et al. (1996) con la H⁺-ATPasa aislada del plasmalema del alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

Respecto al **efecto de la Oligomicina sobre el transporte de K⁺**, Lin (1984) y Gronwald y Leonard (1982) han observado una fuerte inhibición de la absorción de K⁺ por protoplastos de raíces de maíz tras la adición de Oligomicina. Igualmente, Atkinson y Baker (1989), estudiando el intercambio de K⁺/H⁺ inducido en suspensiones de células de tabaco, observan que dicho intercambio es inhibido por inhibidores respiratorios como la Oligomicina. En todos los casos se propone que la inhibición del transporte de K⁺ por Oligomicina se debería a la falta del sustrato respiratorio necesario, por inhibición de la actividad mitocondrial.

4.3.2.- Vanadato

Las moléculas de ortoVanadato o Vanadato (Na₃VO₄) tienen la capacidad de unirse entre sí dando lugar a complejos, que pueden presentarse en dos formas con diferente índice de coordinación: oligo- y deca-Vanadato, dependiendo la formación de una u otra forma tanto del pH como de la concentración. Así, a pH inferior a 6 se detecta la forma deca-Vanadato y a pH superior a 6 la conformación oligo-Vanadato. Conforme aumenta la concentración mayor probabilidad hay de que las moléculas se unan entre sí en complejos de mayor índice de coordinación, adoptando la configuración deca-Vanadato (Coan et al., 1986).

La forma inhibidora es la oligo-Vanadato, que inhibe diferentes tipos de fosfohidrolasas cuya característica común es la formación de un intermediario fosforilado en su mecanismo de acción (Cleland, 1976; Macara, 1980). En consecuencia, **el Vanadato inhibe la actividad H⁺-ATPasa tipo "P"** (aquellas que pasan por un intermediario fosforilado en su ciclo catalítico) de células animales (Cantley et al., 1978), hongos (Bowman y Slayman, 1979) y plantas superiores; en este último caso, la H⁺-ATPasa afectada es la del plasmalema (Fry, 1983; O'Neill y Spanswick, 1984B; Perlin y Spanswick, 1981), con lo que se produce el cese de acidificación del medio, es decir, se inhibe la extrusión de H⁺ por las células vegetales.

El mecanismo de acción del Vanadato parece ser la unión al residuo Aspartato de la H⁺-ATPasa tipo "P", que debe fosforilarse para formar el intermediario fosforilado del enzima, formándose una estructura de bipirámide trigonal muy estable que bloquea la formación de dicho intermediario fosforilado y con ello la acción del enzima (Sze, 1985). La F₁-F₀ -ATPasa de las mitocondrias, cloroplastos y bacterias no es sensible al Vanadato, por tanto no debe formar en su mecanismo de acción intermediario fosforilado (Sze, 1985). Igual sucedería con la H⁺-ATPasa tipo "V" del tonoplasto. Así, en la clasificación de las ATPasas por Pedersen y Carafoli (1987), se propone que el Vanadato sólo afecta a las ATPasas tipo "P" y sirve para distinguir estas ATPasas de las demás: las

de tipo "V" y tipo "F".

En efecto, en células vegetales, el Vanadato se ha usado para diferenciar la H^+ -ATPasa de plasmalema (tipo "P") de la H^+ -ATPasa de tonoplasto (tipo "V"), insensible al Vanadato. Así ocurre en el trabajo de Dupont et al. (1988), que caracterizan fracciones de membrana de tonoplasto y membrana plasmática de raíces de cebada, concluyendo que la H^+ -ATPasa del tonoplasto no se afecta por el Vanadato y a la del plasmalema sí. Igualmente, Gabathuler y Cleland (1985) separan en varias fracciones las vesículas microsomales de raíces de guisante, asegurando que la fracción más enriquecida con membrana plasmática es la más afectada por el Vanadato. Oleski et al. (1987A) también observan que el transporte de H^+ en vesículas de tonoplasto de tomate es insensible al Vanadato. Schumaker y Sze (1985), estudiando el transporte de Ca^{2+} en vesículas microsomales de raíces de avena, aseguran que este transporte se produce gracias al gradiente de pH generado por la H^+ -ATPasa, y observan que un 80% de este transporte de Ca^{2+} se lleva a cabo por vesículas insensibles al Vanadato, que se asocia con el tonoplasto y el resto (20%) es sensible al Vanadato y se asocia probablemente con la membrana del retículo endoplásmico. Por su parte, Sommarin et al. (1985), en vesículas de plasmalema de trigo y avena, observaron que la actividad ATPasa que es estimulada por K^+ es inhibida por el Vanadato. Finalmente, Anthon y Spanswick (1986) comprueban cómo el Vanadato inhibe la actividad H^+ -ATPasa purificada procedente de membrana plasmática de raíces de maíz, y posteriormente, Ward y Sze (1992) con la H^+ -ATPasa vacuolar purificada de avena comprueban definitivamente la insensibilidad al Vanadato de su actividad transportadora de H^+ .

Algunos autores han propuesto que las actividades bombeadora de H^+ y ATPasa (hidrólisis de ATP) de algunas vesículas parecen mostrar diferente sensibilidad al Vanadato. Así, De Michelis y Spanswick (1986) aseguran que es posible obtener una fracción de membrana procedente de raíces de maíz que contiene una bomba de H^+ sensible a Vanadato y con baja sensibilidad a NO_3^- , que presenta características similares a la actividad ATPasa de la membrana plasmática del mismo material, pero que aparentemente el IC50 del Vanadato para ambas actividades es diferente, es decir, tendrían distinta sensibilidad al inhibidor. Sin embargo, los autores también destacan que la inhibición del Vanadato en fracciones de membrana de raíces de maíz depende del tiempo de incubación (a más tiempo, más inhibición); esto indicaría que la accesibilidad del Vanadato a sus lugares de unión (en la cara interna de la membrana) limitaría las condiciones experimentales y podría ser la causa de los diferentes IC50 observados para ambas actividades.

Se ha estudiado también el efecto del Vanadato sobre diferentes materiales vegetales que llevan a cabo transporte de H^+ asociado al transporte de otros metabolitos o a la cadena redox, o bien que va ligado a procesos tales como el crecimiento, la apertura estomática etc. Así, Vreugdenhil y Spanswick (1987) han estudiado el efecto del orto-Vanadato sobre la

absorción de sacarosa por cotiledones de *Ricinus*, indicando que lo que ocurre es un cotransporte H^+ -sacarosa que depende de una bomba de H^+ que extruye H^+ y crea la fuerza protón motriz adecuada para que ocurra este transporte. En este sistema el Vanadato parece no afectar a la bomba de H^+ cuando la concentración de sacarosa es baja, pero sí cuando la concentración es alta. La explicación dada por estos autores es que en el plasmalema de las células podrían existir dos sistemas bombecedores de H^+ distintos: uno bombearía H^+ tanto en ausencia como en presencia de sacarosa y sería insensible a Vanadato o bien estaría localizado en un lugar al cual no puede acceder el inhibidor; el otro sistema sería sensible a Vanadato, extruyendo H^+ que de nuevo serían cotransportados con la sacarosa al interior celular.

Puesto que la acidificación de la pared celular va ligada al crecimiento por elongación de las células, Jacobs y Taiz (1980) observan una inhibición rápida por Vanadato de la acidificación de la pared celular y por tanto del crecimiento de epicotilos de guisantes y coleoptilos de avena, siendo este efecto reversible por pH ácido, ya que ello supone la inactivación del Vanadato.

Se ha intentado comprobar el efecto del Vanadato sobre la cadena redox del plasmalema. Así, El HCF (III) induce la acidificación del medio al aceptar electrones de la cadena redox del plasmalema y por tanto estimular su funcionamiento (Rubinstein y Stern, 1986); esta acidificación es inhibida también por la adición de Vanadato, lo que indicaría que en la transferencia de electrones a través de la membrana plasmática hay un intermediario fosforilado y el Vanadato interferiría en esta fosforilación, o bien, que en la extrusión de H^+ por la cadena redox estuviera también implicada la H^+ -ATPasa del plasmalema, sensible al Vanadato, según la polémica a que nos hemos referido en apartados anteriores (Rubinstein y Stern, 1986; Alcántara et al., 1991). Por su parte Schmidt (1993), comparando la actuación de la cadena redox en raíces de judía normales y deficientes en hierro, observa que la reducción de quelatos de hierro se inhibe por la adición de Vanadato, tanto en raíces normales como deficientes, mientras que la reducción de HCF (III) solamente se afecta ligeramente en el caso de raíces deficientes, por lo que concluyen que el Vanadato influiría solamente en un determinado sistema redox ("sistema turbo"), que se detallará en el apartado dedicado a la cadena redox del plasmalema en este mismo capítulo. Amodeo et al. (1992) han estudiado el efecto de la luz azul sobre protoplastos de células de guarda de *Vicia faba*, donde provoca un hinchamiento de las mismas, que en estomas intactos significaría la apertura del poro. Se propone que la luz azul actuaría sobre la bomba de H^+ , estimulándola, y siendo el efecto inhibido por Vanadato. Serrano et al. (1988), mediante técnicas de patch clamp estudian el efecto de la luz roja en el mismo material, donde provoca una estimulación del bombeo de H^+ . Si se añade Vanadato intracelularmente (en la pipeta del patch clamp) ocurre una inhibición del efecto, por lo que concluyen que el bombeo de H^+ está mediado por una H^+ -ATPasa del plasmalema.

Beffagna et al. (1993) han buscado una interpretación completa del mecanismo de acción

del Vanadato en hojas enteras de *Elodea densa* y en plántulas etioladas intactas de *Arabidopsis thaliana*, concluyendo que dependería de la concentración del inhibidor: A concentraciones bajas el Vanadato inhibiría la síntesis de malato (inhibición de la PEP-carboxilasa), lo que provocaría una alcalinización del citoplasma y haría disminuir la actividad de la bomba de H^+ del plasmalema, produciendo una leve disminución de la extrusión de H^+ . Cuando las concentraciones de Vanadato son mayores ocurrirían dos efectos opuestos: una acidificación del citoplasma debida a la inhibición específica de la bomba de H^+ del plasmalema y un cambio opuesto en el pH citoplasmático debido a la inhibición de la actividad de la PEP carboxilasa. En este sentido nuestros trabajos con ^{31}P -RMN de ápices de raíz de girasol no han detectado cambios de pH citoplasmático en respuesta a tratamiento con Vanadato (Espinosa et al., 1992).

Finalmente, Gabbay-Azaria et al. (1994) han comprobado que la ATPasa de membrana plasmática de cianobacterias tolerantes a la salinidad, la cual está implicada en la extrusión de Na^+ y por tanto en dicha resistencia a la sal, es sensible a orto-Vanadato.

Respecto al **efecto del Vanadato sobre el transporte de K^+** , Gronwald y Leonard (1982), con protoplastos de raíces de maíz, observaron que el Vanadato inhibe el influjo de K^+ , aunque la inhibición es pequeña (25% con 1 mM de Vanadato). Posteriormente Lin (1984) con el mismo material, profundiza más en las circunstancias de la inhibición, observando que el Vanadato inhibe la absorción de K^+ y la extrusión de H^+ ligada a la actividad ATPasa; sin embargo, cuando la absorción de K^+ está estimulada por la adición de NADH el Vanadato sólo inhibe ligeramente el transporte de K^+ , aunque inhibe parcialmente la extrusión neta de H^+ . Con esto Lin concluye que la ATPasa no estaría involucrada en el mecanismo de transporte de K^+ promovido por NADH, del cual sería responsable la cadena redox, insensible al Vanadato.

Atkinson y Baker (1989), estudiando el efecto de inhibidores de H^+ -ATPasa sobre el intercambio K^+/H^+ en suspensiones de células de tabaco, observan que el Vanadato acaba inhibiendo dicho intercambio, aunque requiere más tiempo que otros inhibidores (aproximadamente 1.5 h). De nuevo observan problemas de acceso del inhibidor a la cara interna de la membrana, que afectan a la interpretación de los resultados

Thibaud et al. (1986) con raíces de maíz concluyen que cuando la bomba de H^+ está específicamente bloqueada por Vanadato ocurre un desacoplamiento entre el transporte de H^+ y de K^+ (que ellos describen como un intercambio H^+/K^+ , tipo antiporter): los canales de K^+ permanecerían abiertos a altas concentraciones de K^+ , siendo incapaces de energizar el influjo neto de K^+ , y sólo permitiendo intercambios isotópicos cuando se utiliza $^{86}Rb^+$ como catión análogo del K^+ .

Resumiendo, parece claro que el Vanadato es un inhibidor específico de la H^+ -ATPasa del plasmalema, inhibiendo tanto la actividad extrusora de H^+ como la hidrólisis de ATP, aunque cada una de estas actividades podrían presentar diferente sensibilidad al inhibidor tanto en concentración necesaria como en tiempo de actuación. Ello podría deberse

simplemente a problemas de acceso a la cara interna de la membrana, donde ejerce su acción, pero también podría ser, como defiende Lin (1984) que la extrusión de H^+ se realice, en parte, por intermedio de la cadena redox del plasmalema, cuya diferente sensibilidad al inhibidor podría ser la causa de las discrepancias encontradas.

4.4.- EFECTORES QUE ACTÚAN SOBRE LA CADENA REDOX DEL PLASMALEMA

4.4.1.- Donadores y aceptores de electrones de la cadena redox del plasmalema

Tradicionalmente se ha pensado que la única responsable del gradiente de H^+ a través del plasmalema era la bomba de extrusión H^+ -ATPasa. Sin embargo, hay evidencias claras que demuestran la existencia de un sistema redox en el plasmalema de células vegetales. Las principales de estas evidencias fueron obtenidas por el equipo de Ivankina y Novak (Novak y Ivankina, 1978; Ivankina y Novak, 1980; Ivankina et al., 1984) en hojas de *Elodea* y *Vallisneria*, así como por los equipos de Crane y Morré en células de callus de tabaco (Barr et al., 1984), en floema de zanahoria (Misra et al., 1984) y en vesículas de plasmalema y tonoplasto de hipocotilos de soja (Barr et al., 1985B, 1986); finalmente, en secciones de raíz, protoplastos y coleoptilos de maíz (Federico y Giantosio, 1983; Leong y Briggs, 1981; Lin, 1982A-B, 1984; Pupillo y De Luca, 1982) y en raíces de avena (Rubinstein et al., 1984).

En resumen, según la hipótesis propuesta por Craig y Crane (1981, 1982) para cultivos celulares de zanahoria y levaduras, el **sistema redox en condiciones naturales operaría** de la siguiente forma: el NADH y el NADPH (**NAD(P)H**) **endógenos** serían **los donadores naturales de electrones y H^+** para la actuación de la cadena redox, cediéndolos en la cara citoplasmática del plasmalema y utilizándose para acidificar el medio (mediante la extrusión de los H^+) y crear un potencial electroquímico en la membrana. Como aceptores terminales actuaría el O_2 y otros compuestos, como veremos, a continuación.

El sistema **puede funcionar con donadores y aceptores artificiales**, añadidos exógenamente. Así, pronto se comprobó que el sistema también admite NAD(P)H exógeno como donador de electrones artificial, y puesto que los piridín-nucleótidos no son permeables a través de la membrana, ello indica que existe una actividad NAD(P)H deshidrogenasa de la cadena redox cuyo lugar de acción es accesible desde la superficie apoplástica del plasmalema, aparte de la de la cara citoplasmática de esa membrana. En efecto, Qiu et al. (1985) y Rubinstein et al. (1984), observaron que el NADH exógeno era oxidado por raíces intactas de avena y segmentos de raíces de maíz, y que esta oxidación se activaba por la adición de Hexacianoferrato (III) (HCF (III)), un aceptor no natural de electrones. Igualmente, Böttger y Hilgendorf (1988) demostraron que, al bajar la presión de O_2 en raíces de maíz, se inhibía la extrusión de H^+ por dichas raíces, y esta inhibición se

reducía al adicionar el aceptor de electrones artificial HCF (III), que aceptaba los electrones en la cara externa de la membrana ya que no es permeable. También se han realizado experimentos semejantes con vesículas de plasmalema, obteniéndose resultados que están de acuerdo con los obtenidos para tejidos intactos y protoplastos (Møller y Lin, 1986). Todo ello demuestra la posibilidad de funcionamiento artificial, no natural, de la cadena redox de la membrana, lo cual ha demostrado ser muy útil para investigar el funcionamiento de dicha cadena redox.

Sin embargo, en **condiciones naturales el aceptor terminal de electrones de la cadena redox** del plasmalema parece ser el O_2 , como en la cadena redox mitocondrial, que podría generar especies activas (como H_2O_2 ó O_2^-) (Penel y Castillo, 1991), siendo los H^+ bombeados fuera. Otros posibles aceptores naturales de e^- serían, según Gonzalez-Reyes et al. (1992) los **radicales libres de ascorbato (AFR)**, ya que la presencia de altas cantidades de ascorbato apoplástico ha sido demostrada por Castillo et al. (1986) y los AFR pueden ser generados por una ascorbato oxidasa. Así, los AFR (Gonzalez-Reyes et al., 1992) provocan la estimulación de la extrusión de H^+ y la hiperpolarización del plasmalema de células de raíces de cebolla.

Otros aceptores terminales naturales de los electrones de la cadena redox del plasmalema parecen ser los **quelatos de Fe** (Rubinstein y Luster, 1993), y en general el **ion Fe^{3+}** , que ha de ser reducido para ser absorbido, especialmente en condiciones de deficiencia (Bienfait, 1985; Ivankina et al., 1984; Sijmons et al., 1984B). En este caso, según Bienfait (1985) el sistema redox implicado sería distinto al denominado "**sistema standard**": se trataría de un sistema que se induce en las plantas deficientes en Fe para su reducción y absorción, denominado "**sistema turbo**". Schmidt (1993) indica que este sistema "turbo" (inducible) no es sólo distinto al "standard" (constitutivo), sino que también presenta distinta regulación; en sus experimentos con raíces de judía deficientes y no deficientes en hierro, encuentra que las raíces deficientes tienen muy aumentada su capacidad de reducción tanto de quelatos de hierro como de HCF (III): es decir, tienen estimulados ambos sistemas transportadores de electrones; sin embargo, al añadir Vanadato (inhibidor de la H^+ -ATPasa de plasmalema) la reducción de quelatos de hierro practicamente se anula en raíces deficientes y también se afecta de forma importante en raíces no deficientes, mientras que la reducción de HCF (III) solamente se ve disminuida (y ni siquiera al 50%) en el caso de raíces deficientes. Esto quiere decir que la actividad reductora de quelatos de hierro precisa un gradiente de H^+ para la regulación del transporte de electrones a aceptores extracelulares, y que ésta es la actividad que principalmente se induce en respuesta a la deficiencia de hierro. Rabotti y Zocchi (1994) abordan el mismo problema, comparando las actividades redox de membrana plasmática de raíces de pepino crecidas en condiciones de aporte normal y deficiente de Fe; las raíces deficientes presentan una actividad H^+ -ATPasa dos veces superior a la de las normales, y tambien muestran una capacidad mucho mayor para reducir quelatos de Fe (mucho más que para reducir HCF

(III)); además, las raíces deficientes usan preferentemente NADH como donador de electrones (mejor que NADPH). La reducción del Fe^{3+} parece ocurrir usando el ión superóxido (O_2^-): el O_2 aceptaría un electrón del NADH via una semirreducción de flavina o quinona (Misra y Fridovich, 1972), formándose el O_2^- , el cual reduciría al Fe^{3+} . Por ello, al añadir Superóxido dismutasa (SOD) al medio con las raíces ocurre una inhibición de la reducción del Fe^{3+} , y si se añade catalasa esta inhibición se alivia algo, pero no se suprime. Los autores también comprueban que las raíces de pepino presentan actividad peroxidasa tanto en la pared celular como en la membrana plasmática, y esta actividad es muy superior en las raíces deficientes en Fe; no obstante, no se sabe si este incremento es debido a una respuesta específica a la deficiencia en Fe o inespecífica al estrés en general.

Como **aceptores terminales de electrones artificiales o exógenos** se han utilizado diferentes compuestos: **hexacianoferrato III (HCF-III)**, **hexabromoiridato IV (HCl-IV)**, **hexafluoroiridato IV (HCl-IV)**, **duroquinona**, **citocromo c**, **diclorofenolindofenol (DCIP)**, **diclorofenolindofenol sulfonato (DCIP-S)**, entre los más importantes. El más utilizado de estos compuestos es el Hexacianoferrato (HCF III), como ya hemos indicado. Así, la adición de HCF (III) provocaba su reducción por raíces intactas de avena (Rubinstein et al., 1984), maíz (Federico y Giantosio, 1983) y judías (Bienfait et al., 1983; Sijmons y Bienfait, 1983), donde además se observaba una despolarización del potencial de membrana (Sijmons et al., 1984A) y una disminución del NADPH endógeno (Qiu et al., 1985; Sijmons et al., 1984B); esto indicaría que, en este material, el NADPH sería el donador natural endógeno de electrones para la reacción, en la cara citoplasmática de la membrana. Puesto que la reducción del HCF (III) por células y protoplastos de zanahoria (Chalmers et al., 1984) va acompañada de la acidificación del medio y depende del NAD(P)H citoplasmático, siendo inhibida por inhibidores de la glicolisis (Barr et al., 1985A; Craig y Crane, 1981), se ha propuesto que ésta sería la fuente de NAD(P)H. Es posible también que el NADH sea producido por la malato deshidrogenasa en la pared celular y que se oxide por la cadena redox produciendo H_2O_2 o radicales de oxígeno que se usarían en la síntesis de la pared celular (Gross, 1977).

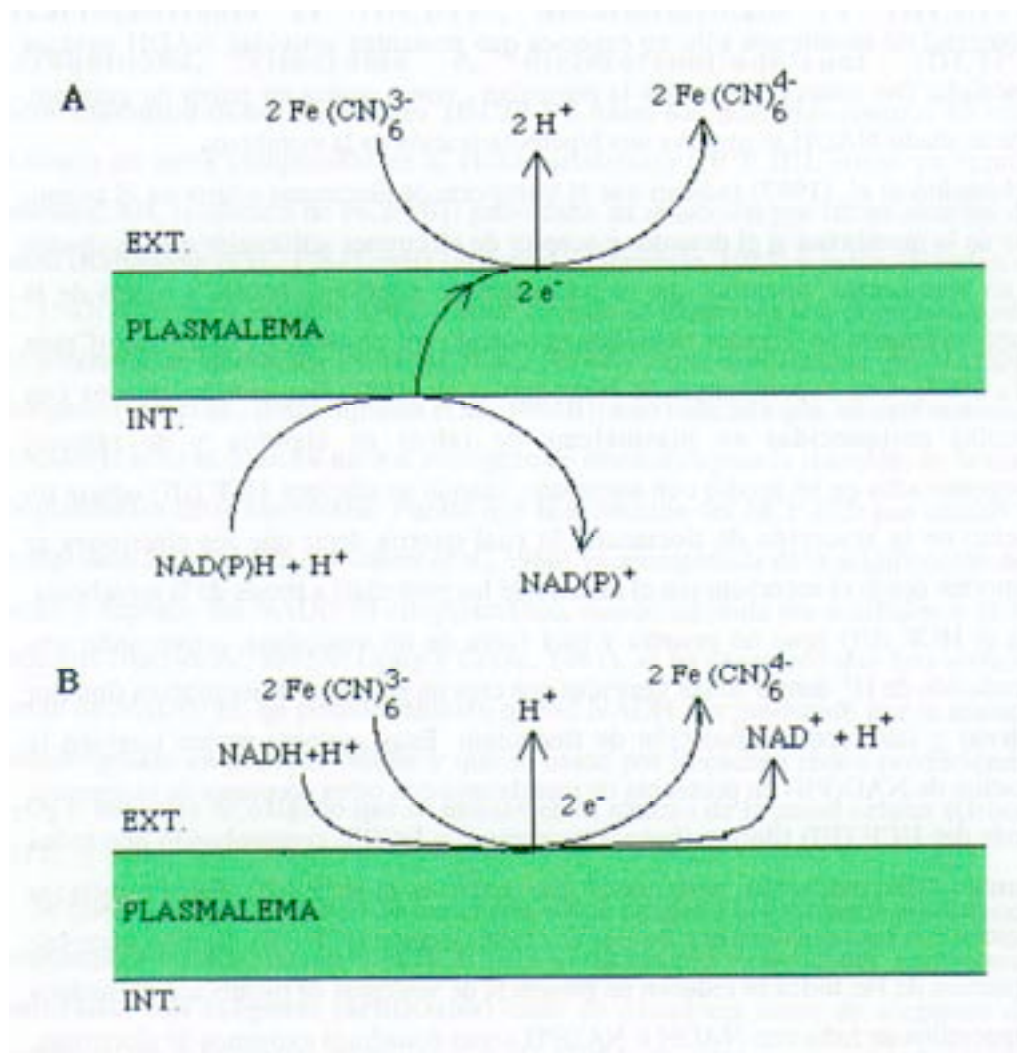
Se pueden obtener todo tipo de reacciones redox ligadas a la membrana plasmática, semejantes a las descritas para el HCF (III), **combinando actividades endógenas (naturales) con exógenas (artificiales)** tanto de donadores como de aceptores de electrones. En este sentido Rubinstein et al., (1984) detectan tres actividades redox diferentes en raíces de avena; **Actividad I**: reducción del HCF (III) exógeno por un supuesto donador de electrones endógeno; **Actividad II**: oxidación del NADH exógeno por HCF (III) exógeno (la oxidación del NADH en presencia de HCF (III) ocurre también, aunque lentamente, en ausencia de raíces y esto ha de tenerse en cuenta para medir la oxidación debida a la presencia de las raíces); y **Actividad III**: oxidación del NADH exógeno por oxígeno u otro aceptor de electrones. Según estos autores, la actividad I estaría mediada por un complejo enzimático distinto al de las actividades II y

III; además, la actividad I estaría asociada más estrechamente a la extrusión de H^+ . Las actividades II y III son detectadas solamente con donadores exógenos de electrones y pertenecerían ambas al mismo sistema transportador de electrones. Así, Lin (1984) y Rubinstein et al. (1984) proponen la existencia de dos NAD(P)H deshidrogenasas en el plasmalema de células de raíces, posiblemente enlazadas entre sí por componentes de la cadena redox: un sistema actuaría con NADH exógeno y otro con NAD(P)H endógeno. En el mismo sentido, Ivankina y Novak (1988) indican que el NADH endógeno afecta al potencial de membrana sólo en especies que presentan actividad NADH oxidasa extracelular (no todas las especies la presentan), como ocurre en raíces de guisante, donde al añadir NADH se observa una hiperpolarización de la membrana.

Hassidim et al. (1987) indican que el transporte de electrones ocurre en el mismo plano de la membrana si el donador y aceptor de electrones artificiales que se añaden son no permeantes, mientras que el transporte de electrones ocurre a través de la membrana cuando un donador citosólico es oxidado por un aceptor extracelular (Crane et al., 1985). Los experimentos de Hassidim et al. (1987) han sido realizados con vesículas enriquecidas en plasmalema de raíces de algodón y de rábano, homogeneizadas en un medio con ascorbato: cuando se adiciona HCF (III) ocurre un aumento de la absorción de tiocianato, lo cual querría decir que los electrones se transportan desde el ascorbato (en el interior de las vesículas) a través de la membrana, hasta el HCF (III) (que no penetra y está fuera de las vesículas), provocando una acumulación de H^+ dentro de las vesículas que crea un potencial de membrana (interior positivo) y favorece la absorción de tiocianato. Estos autores miden también la oxidación de NAD(P)H en presencia de membranas con otros aceptores de electrones, además del HCF (III) (duroquinona, citocromo c y DCIP), comprobando que todos estimulan dicha oxidación, pero que el más activo es el HCF (III). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Barr et al. (1986) usando HCF (III), DCIP, citocromo c y quelatos de Fe: todos se reducen en presencia de vesículas de membrana plasmática de hipocotilos de haba con NADH o NADPH como donadores exógenos de electrones, siendo el aceptor de electrones más efectivo el HCF (III).

Finalmente, Vani y Raghavendra (1992) en experimentos con protoplastos de células de guarda de hoja de guisante, proporcionan una útil nomenclatura para las diferentes actividades redox asociadas al plasmalema. Así, observan que al añadir HCF (III) y NADH exógenos ocurre la reducción del primero y la oxidación del segundo; esta reacción se llevaría a cabo por un sistema redox que transferiría electrones del donador al aceptor, ambos de localización externa, al que han llamado "Actividad cis"; este sistema podría considerarse enteramente artificial, y si en lugar de HCF (III) usan DCIP o citocromo c, observan que baja en gran medida tanto la oxidación del NADH como la reducción de los aceptores. Cuando se añade solamente HCF (III) exógeno (sin aporte exógeno de NAD(P)H) también se observa reducción del aceptor, aunque en menor cantidad, siendo el donador de electrones en este caso, presumiblemente, el NAD(P)H

interno. A esta reacción, que implicaría transporte de e^- a través de la membrana la denominan "**Actividad trans**".



Esquema III: Modelo de Gautier et al. (1992). (A) "Actividad trans" de la cadena redox del plasmalema: reducción del HCF (III) exógeno ($\text{Fe}(\text{CN})_6$, en el esquema), los electrones proceden de NAD(P)H endógeno. (B) "Actividad cis": Donador y aceptor de electrones exógenos.

Estos mismos autores inician el estudio de **inhibidores respiratorios sobre la actividad redox del plasmalema**, observando que la adición a sus protoplastos de un inhibidor respiratorio clásico como el **KCN** no tenía ningún efecto sobre la reducción del HCF (III). Por su parte, Rubinstein et al. (1984) también describen la ausencia de efecto del KCN sobre la oxidación del NADH provocada por HCF (III) o por citocromo c en raíces de avena. Sin embargo, el KCN inhibe marcadamente la oxidación del NADH exógeno cuando éste se adiciona sólo, sin aceptores de electrones, y también cuando el aceptor añadido es ácido dehidroascórbico, lo cual se atribuye a que los distintos aceptores actuarían a diferentes niveles del sistema redox y sólo uno de estos lugares sería sensible al

CN. Thom y Marezki (1985) indican que la oxidación del NADH en protoplastos de caña de azúcar también es inhibida por KCN. Por su parte, Barr et al. (1986) estudian también el efecto del KCN sobre la reducción del HCF (III) por vesículas de membrana plasmática de hipocotilos de haba, concluyendo que en este material el cianuro no solo no inhibe dicha reducción sino que la aumenta en un 20%. Igualmente, Gautier et al. (1992) describen la ausencia de efecto del KCN sobre la reducción del HCF (III) por protoplastos de células de guarda de *Commelina communis* L.

Luster y Buckhout (1989) han aislado una enzima de 27 KD perteneciente a la cadena redox de la membrana plasmática de raíz de maíz; esta enzima es capaz de aceptar electrones del NADPH y NADH y reducir HCF (III), juglona, duroquinona o citocromo c, pero no transfiere electrones ni a radicales libres de ascorbato (AFR) ni al nitrato. Esta actividad no se ve afectada por inhibidores del transporte electrónico mitocondrial, como el KCN; sin embargo se inhibe con **PCMPS**, lo cual indica la presencia de grupos sulfidrilos en algún lugar activo del enzima.

Döring y Böttger (1994), estudiando la despolarización de membrana de raíces de maíz causada por HBI (IV) y HCF (III), observan que al añadir **KCN** y **SHAM** (ácido salicilhidroxámico, inhibidor específico de la respiración resistente o insensible al cianuro, ya que bloquea la oxidasa alternativa de mitocondrias, Schonbaum et al., 1971), disminuye drásticamente el nivel de ATP citoplasmático; sin embargo, al añadir los aceptores de electrones sigue ocurriendo una despolarización de la membrana. Esto querría decir, como Böttger y Lüthen (1986) proponen, que el sistema redox (standard) energiza la membrana plasmática de forma independiente a la H⁺-ATPasa, y funciona incluso cuando ésta no puede actuar por falta de sustrato (ATP).

Por su parte, Møller y Berczi (1986) miden como consumo de O₂ la oxidación del NADH exógeno llevada a cabo por vesículas purificadas de plasmalema, comprobando que se inhibe por 1 mM de KCN pero no por otros inhibidores específicos de la respiración mitocondrial como Rotenona, Antimicina A desacopladores de la fosforilación, lo que descarta la posibilidad de que la actividad NAD(P)H-oxidasa medida se deba a contaminación por vesículas mitocondriales. Además, esta actividad se inhibe completamente con catalasa, lo cual indicaría un posible requerimiento de H₂O₂ (Møller y Berczi, 1985). También comprueban que el consumo de O₂ provocado por la oxidación de NADH aumentaba 10-20 veces en presencia de SHAM (inhibidor específico de la oxidasa resistente a los cianuros), y este consumo extra era también inhibido por KCN y catalasa. Los autores indican la posibilidad de que la NADH oxidasa del plasmalema sea idéntica al sistema citocromo P_{450/420}, que oxida NADH y produce H₂O₂. Askerlund et al. (1987) obtienen resultados semejantes en membrana plasmática purificada de inflorescencia de coliflor, donde la actividad NAD(P)H oxidasa era inhibida por catalasa y KCN, mientras que SHAM la estimula.

Askerlund y Larsson (1991), con vesículas de membrana plasmática de remolacha,

estudian el transporte de electrones a través de la membrana cuando las vesículas se cargan con NADH como donador de e^- (en su interior) y se adicionan como aceptores exógenos DCIP-sulfonato, HCF (III), citrato férrico o citocromo c. De todos ellos sólo el DCIP-sulfonato era reducido; la explicación a estos resultados sería que este aceptor es el único cuyas moléculas poseen la parte que acepta los electrones (el DCIP) que es hidrofóba, mientras que las demás moléculas usadas comoceptoras son totalmente hidrófilas; así, el DCIP-sulfonato puede introducirse en la membrana, con lo que la donación-aceptación de electrones se realizaría, completa, en la cara interna de la membrana. Sin embargo, si se cargan las vesículas con ascorbato como donador de e^- , en lugar de NADH, se detecta reducción tanto del DCIP-sulfonato como del citrato férrico. Además, el inhibidor de la actividad redox PCMPS (impermeable a través de la membrana) solamente afecta al transporte de electrones cuando se usa como donador el NADH y no el ascorbato. Todos estos resultados podrían indicar que en la superficie externa de la membrana existen lugares distintos para aceptar los electrones procedentes del NADH y del ascorbato. Estos autores concluyen indicando que el transporte de e^- a través de la membrana plasmática constituye sólo una pequeña parte del total de la actividad transportadora de electrones de la membrana: el resto de la actividad ocurre en un sólo plano de la membrana, con donador y aceptor localizados ambos en la superficie citoplasmática. El transporte a través de la membrana ($\approx 10\%$) tiene, sin embargo, un importante significado fisiológico, y puede aumentar en condiciones especiales.

Respecto a los **componentes que forman parte de la cadena redox del plasmalema** no se conocen en su totalidad. En preparaciones de plasmalema purificado se ha encontrado actividad NAD(P)H-**citocromo c** reductasa (Jesaitis et al., 1977; Larsson, 1985; Widell y Larsson, 1984), **flavina** NAD(P)H deshidrogenasa (Jesaitis et al., 1977; Ramirez et al., 1984) y **citocromo tipo b** (Jesaitis et al., 1977; Leong et al., 1981; Ramirez et al., 1984; Widell y Larsson, 1984), el cual es probable que sea del tipo $P_{450/420}$ (Kjellbom et al., 1985). En vesículas de membrana plasmática de hipocotilo de soja, Barr et al. (1986) han descrito la presencia de citocromos tipo b y una flavina asociada en unión no covalente, como componentes del sistema redox. Leong y Briggs (1981, 1982) han demostrado la presencia de citocromos y flavinas, y su función como **Fotorreceptores de luz azul** en maíz y Borgeson y Bowman (1985) en *Neurospora*. Ramirez et al. (1984) han encontrado un citocromo tipo b en preparaciones de membrana plasmática de raíces de avena. Un citocromo tipo b, que se reduce con la luz azul ha sido también descrito en membrana plasmática purificada de coleoptilos de avena (Widell et al., 1982) y de hojas de espinaca y cebada (Kjellbom y Larsson, 1984). Las flavinas descritas por Barr et al. (1986) en hipocotilos de haba se encuentran a concentración similar a los valores descritos por Ramirez et al. (1984) para avena. Askerlund et al. (1989), analizando la composición en citocromos de fracciones vesiculares de membrana plasmática de hojas y raíces de diferentes especies, encuentran que los citocromos tipo b están presentes en todas las

especies testadas, siendo el componente que se halla en menor concentración el citocromo b5, mientras que el Citocromo P_{450/420} está en concentraciones superiores. Asard et al. (1989), analizando también la composición de la membrana plasmática purificada procedente de distintas especies, han encontrado la presencia de diferentes citocromos tipo b, que presentan fuertes semejanzas entre las distintas especies; sin embargo, ninguno de estos citocromos se pueden relacionar con el citocromo P_{450/420}. Por el contrario, Betz et al. (1993) indican que 1 mM de HCF (III) activa la cadena redox del plasmalema en discos de hoja de *Valerianella locusta* y *Lemna gibba*, actuando como aceptor de electrones exógeno, y que esta cadena tiene como componente el citocromo P₄₅₀.

Como ya hemos indicado, la actividad redox identificada en la membrana plasmática dependiente de la reducción de NAD(P)H puede ceder sus electrones a distintos aceptores exógenos, como son radicales libres de ascorbato (AFR) (Morré et al., 1986), citocromo c (Lundborg et al., 1981; Buckhout y Hubrec, 1986; Sandelius et al., 1986), diclorofenolindofenol (Buckhout y Hubrec, 1986), HCF (III) (Sandelius et al., 1986) y violeta yodonitrotetrazolium (Buckhout y Hubrec, 1986). Luster y Buckhout (1988) han identificado la estructura molecular de las proteínas redox asociadas a la NADH reductasa en la membrana plasmática de raíces de maíz. Así, crea tres clases de aceptores de e⁻ (HCF (III), duroquinona y AFR) aseguran que, como intermediarios en la cadena hay, al menos, dos tipos de moléculas con actividad piridin nucleótido deshidrogenasa: una molécula (o más) capaz de transferir e⁻ al HCF (III) y a la duroquinona y uno que sólo es capaz de reducir al HCF (III). Para la reducción de los AFR existiría aún otra deshidrogenasa diferente, y esta reducción requeriría un flujo de electrones a través del Citocromo b5. Buckhout y Hubrec (1986) aseguran que la actividad NAD(P)H-citocromo c reductasa endógena de membrana plasmática de raíces de maíz implica la reducción de un citocromo tipo b. También Horemans et al. (1994) aseguran la existencia de citocromo b implicado en el transporte de electrones por vesículas de plasmalema de hipocotilos de judía cargadas con ascorbato (que actúa como donador de e⁻), ya que cuando se adiciona AFR (radicales libres de ascorbato, aceptor de electrones) se provoca una rápida oxidación de dicho citocromo.

Lin (1984) propone la existencia de un **"pool" de quinonas**, como componente del sistema redox, puesto que la NADH oxidasa aislada parece funcionar con un cofactor quinónico. Este "pool" de quinonas podría ser reducido por el NADH tanto en la cara citoplasmática como en la apoplástica de la membrana, y cuando la quinona es reoxidada, le cedería los e⁻ al citocromo b del plasmalema y a la NADH oxidasa, y los H⁺ serían liberados fuera.

Lüthje et al. (1992) establecen la presencia de quinonas tipo vitamina K. Así, la vitamina K₃ despolariza la membrana plasmática de raíces de maíz (Lüthje et al., 1992; Döring et al., 1992) mientras que el antagonista de esta vitamina (dicumarol) no tiene efecto significativo sobre el potencial de membrana. Sin embargo, plantas tratadas con vitamina K₃ durante 30

minutos, seguido de un intenso lavado, presentan mayor capacidad de reducción del HCF (III) y una estimulación de la acidificación del medio, mientras que el pretratamiento con dicumarol causa una inhibición de la reducción del HCF (III) y de la acidificación del medio. De acuerdo con estos resultados, Lüthje et al. (1992) y Döring et al. (1992) proponen que la vitamina K₃ actuaría como un aceptor de electrones del sistema redox del plasmalema de raíces de maíz: la estimulación de la reducción del HCF (III) y HBI (IV) en presencia de vitamina K₃ indicaría que esta vitamina actúa como un intermediario en el transporte de electrones, acelerando la transferencia o incrementando el número de electrones en movimiento desde el sistema redox de la membrana plasmática al aceptor (la vitamina K₃ es una molécula hidrofóbica y puede integrarse dentro de la bicapa lipídica del plasmalema). Resultados similares obtiene Yamashoji y Kajimoto (1986) con levaduras, donde la vitamina K₃ activa la reducción del HCF (III) actuando como mediador extracelular del sistema redox.

La relación existente entre componentes de diferentes sistemas redox, así como si éstos operan conjunta o independientemente, no se conoce (Rubinstein y Luster, 1993).

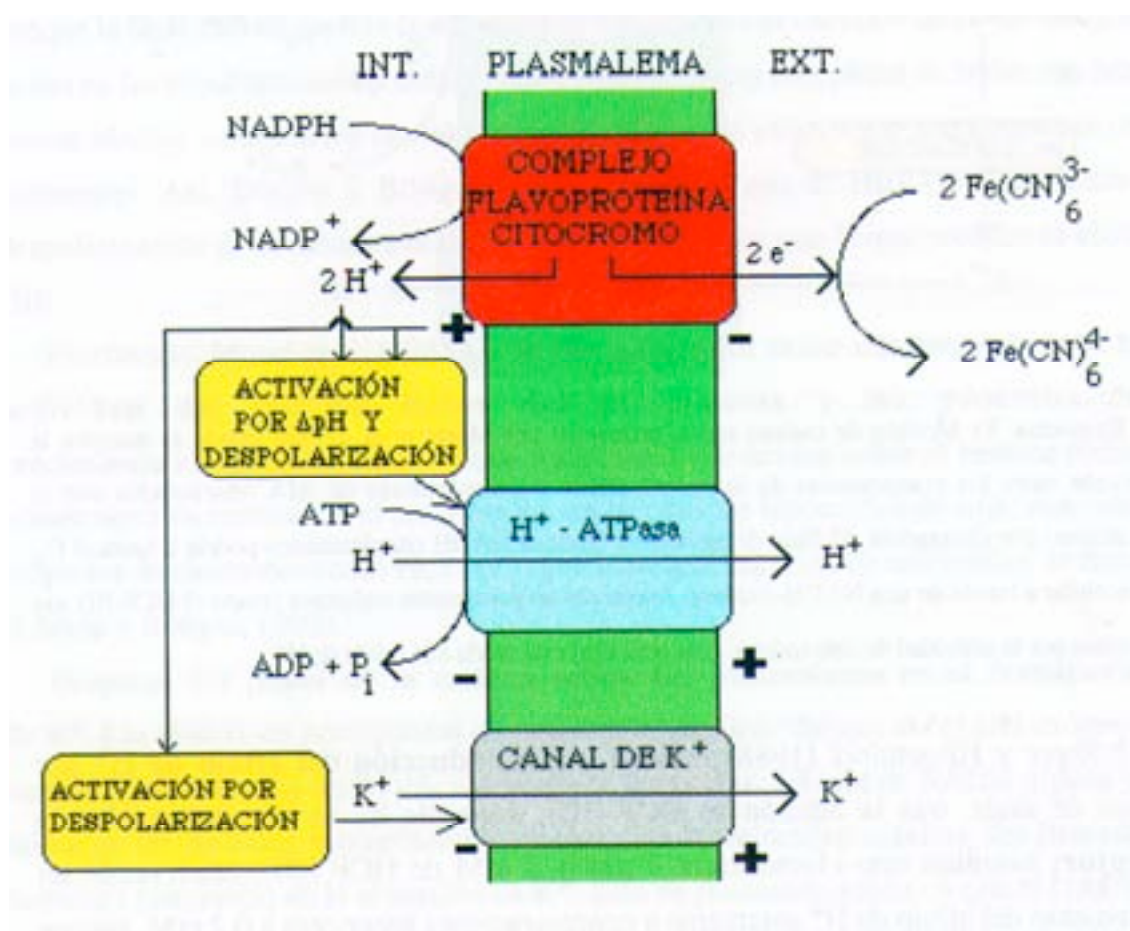
Al activar el **sistema redox del plasmalema se produce una estimulación de la extrusión de H⁺**, y existe una fuerte controversia acerca de si este eflujo de H⁺ se lleva a cabo por un sistema específico de la cadena redox, distinto (o no) de los canales de H⁺ de la H⁺-ATPasa. Según Lin (1984) la extrusión de H⁺ se lleva a cabo por un lugar y mecanismo diferente al de la H⁺-ATPasa. Igualmente, Craig y Crane (1985), en trabajos con células de zanahoria, llegan a la conclusión de que el sistema redox es responsable tanto del transporte de electrones como del transporte de H⁺. También piensan así Neufeld y Bown (1987) y Bown y Crawford (1988) que, con células aisladas del mesófilo de espárrago observan que, al adicionar 1 mM de HCF (III), ocurre una acidificación del medio que no sería debida a la actuación de la H⁺-ATPasa, ya que eliminando la actividad de esta bomba con inhibidores como DES o DCCD, la acidificación en presencia de HCF (III) seguía ocurriendo, así que sería debida directamente a la cadena redox. Además, se ha probado repetidas veces que el bombeo de H⁺ inducido por el transporte de e⁻ no es realmente inhibido por el vanadato, inhibidor específico de la H⁺-ATPasa (Böttger y Lüthen, 1986; Ullrich et al., 1989). Por su parte, Yamashoji y Kajimoto (1986) indican que, en levaduras, la liberación de H⁺ acoplada a la reducción de HCF (III) en presencia de vitamina K₃ (una quinona que al parecer actúa como intermediario en el transporte) es independiente de la extrusión de H⁺ controlada por la H⁺-ATPasa puesto que, al añadir un inhibidor de la misma, la extrusión de H⁺ no se ve afectada. De manera semejante, Vani y Raghavendra (1992) han medido la actividad del sistema redox de protoplastos de células de guarda de hoja de guisante, cuya función básica sería el eflujo de H⁺, comprobando que al añadir inhibidores de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática (ABA y vanadato) dicha actividad redox no se ve afectada, lo cual querría decir que el eflujo de H⁺ llevado a cabo por la H⁺-ATPasa sería independiente del sistema redox. Finalmente, Grabov et al. (1993),

estudiando el efecto del HCF (III) en células de raíces de *Limnobium stoloniferum*, observan que en su presencia aumenta la extrusión de H^+ , se despolariza la membrana plasmática y sube el pH citoplasmático. Estos autores opinan que el flujo de H^+ en presencia de HCF (III) tiene dos componentes: uno independiente del sistema redox (el de la H^+ -ATPasa) y otro acoplado a dicho sistema redox.

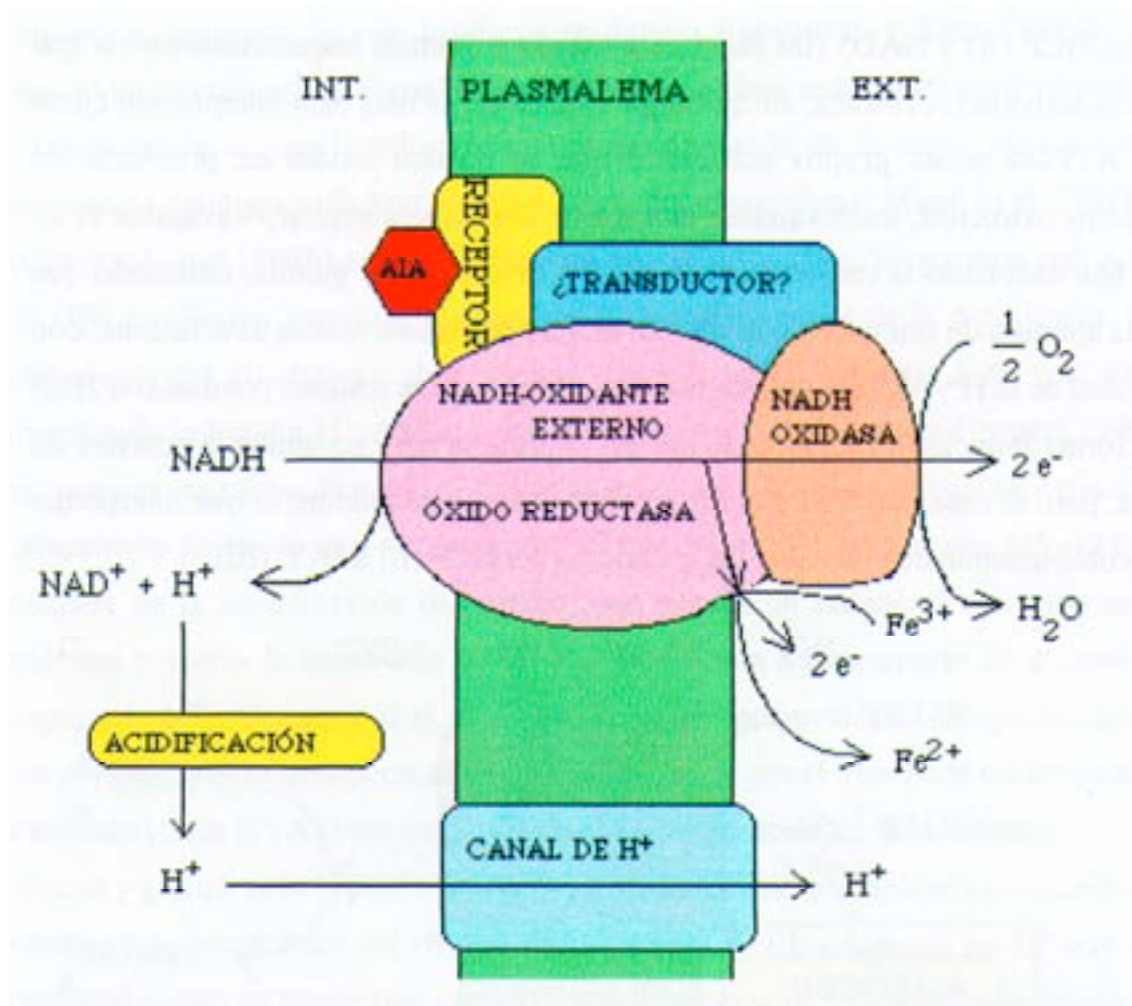
Otros autores, por el contrario, no creen que la cadena redox del plasmalema posea sistemas propios de transporte de H^+ , diferentes de los de la H^+ -ATPasa. La primera formulación completa de esta hipótesis se debe a Rubinstein y Stern (1986), que proponen un modelo según el cual la actividad de la cadena redox solamente implicaría un transporte de e^- , que produciría una despolarización de la membrana y como consecuencia estimularía la bomba H^+ -ATPasa del plasmalema. Marré et al. (1988) y Trockner y Marré (1988) también observan que la activación del sistema redox por HCF (III) en *Eloдея* provoca, además de la despolarización de la membrana, una acidificación del citoplasma, defendiendo que ello sería la causa, a su vez, de la activación de la bomba H^+ -ATPasa. En el mismo sentido, Zocchi y Cocucci (1990) proponen que las raíces de pepino "Fe eficientes", que tienen aumentada su capacidad de absorción de Fe, lo son por la capacidad que poseen de activar una H^+ -ATPasa encargada de la acidificación del medio, que genera un potencial eléctrico en la membrana y activa la reducción de Fe por un sistema de transporte de e^- , que no transportaría H^+ . Alcántara et al. (1991) también defienden la idea de que la cadena redox del plasmalema transporta solamente electrones y que el transporte de H^+ se debe a la actividad de la H^+ -ATPasa inducida por la despolarización de la membrana.

Guern y Ullrich (1988) ponen de manifiesto que durante la actividad cis (cuando los electrones son transferidos del NADH exógeno a HCF (III) exógeno) los H^+ que son liberados al medio no tienen que proceder necesariamente de su transporte a través del plasmalema. Sin embargo, durante la actividad trans, en que hay un transporte de e^- a través de la membrana, el HCF (III) exógeno cambia su carga de 3- a 4-, y puesto que ha de mantenerse la neutralidad de cargas, esta carga negativa debe ser neutralizada con una especie iónica con carga positiva, como sería un H^+ procedente de la célula; así, la acidificación del medio podría ser el resultado indirecto de la alteración de cargas del medio, y no una reacción molecular que implicara transporte de H^+ asociado al flujo de electrones a través del plasmalema (Ullrich y Guern 1990). También es posible que ocurra una salida de K^+ de la célula para neutralizar el incremento de carga negativa durante la reducción del HCF (III) pero, en este caso los cambios de pH serían pequeños, no ocurriría una acidificación como la que se detecta. De todos modos, no se puede descartar la contribución de una extrusión de K^+ en el funcionamiento del sistema redox cuando opera en actividad trans. Ivankina y Novak (1988) también proponen que el sistema redox sería un mecanismo electrogénico que actuaría bombeando H^+ , pudiendo tener una acción reguladora sobre la H^+ -ATPasa.

Para comprobar la implicación de la ATPasa en las reacciones redox de la membrana, Elzenga et al (1989) han medido la actividad ATPásica de vesículas de membrana plasmática de hojas de *Elodea*, encontrando que 0.5 mM de HCF (III) y 5 mM de NADH no tienen sobre dicha actividad ATPásica un efecto apreciable; sin embargo, HCF (II) y NAD^+ (las especies reducida y oxidada respectivamente) sí que inhiben la actividad ATPásica; sin embargo, este efecto es más bien interpretado como que la ATPasa posee grupos sulfidrilos que se pueden oxidar en presencia de compuestos oxidantes, inactivándose el sistema. De manera similar, Vavasseur et al. (1995) han estudiado la respuesta al HCF (III) de células de guarda, indicando que inhibe la apertura de estomas y que además interacciona más o menos directamente con la actividad de la H^+ -ATPasa del plasmalema. Estos autores realizan pruebas con HCF (II) (la forma reducida), encontrando que en la primera hora no inhibe la apertura de estomas, pero si pasa más tiempo (2.5 h.) sí se observa inhibición, lo que interpretan como probablemente debido a una fotooxidación del HCF (II) a HCF (III).



Esquema IV: Modelo de cadena redox propuesto por Marré et al. (1988) para el flujo de electrones y H^+ dependiente de la reducción de HCF (III) ($\text{Fe}(\text{CN})_6$, en el esquema), así como la posible relación entre el sistema redox del plasmalema y la H^+ -ATPasa.



Esquema V: Modelo de cadena redox propuesto por Morré et al. (1988A) donde se muestra la relación entre los componentes de la cadena redox y los receptores de AIA relacionados con el crecimiento por elongación. El flujo de electrones desde el NADH citoplasmático podría ir hasta el O_2 extracelular a través de una NADH-oxidasa. Aceptores no permeantes exógenos (como el HCF-III) son reducidos por la actividad de esta cadena. Esta actividad está unida a la salida de H^+ .

Böttger y Hilgendorf (1988) indican que la **inducción del eflujo de H^+** por raíces de maíz, tras la adición de HCF (III), **depende de la concentración de aceptores**; estudian este efecto entre $1 \mu M$ y $5 mM$ de HCF (III), observando un incremento del eflujo de H^+ solamente a concentraciones superiores a $0.2 mM$, aunque la reducción del HCF (III) aumenta linealmente al aumentar la concentración. Esto podría ser debido a que la estimulación del eflujo de H^+ se superpone a una inhibición de otro sistema; es decir, podría ocurrir que el HCF (III) inhibiera la actividad extrusora de H^+ de una bomba (H^+ -ATPasa) pero estimulara otra actividad (la del sistema extrusor de H^+ asociado a la cadena redox). Un efecto similar ocurriría con HCl (IV), que a muy bajas concentraciones (de 1 a $5 \mu M$) también inhibe el eflujo de H^+ en ese mismo material (Lüthen y Böttger, 1988),

pero a concentraciones superiores provoca una estimulación de la excreción de H^+ . Estos mismos autores han indicado, además, que el HCF (III) puede causar cierto efecto tóxico, ya que puede liberar pequeñas cantidades de cianuro (Lüthen y Böttger, 1988) y afectar a la respiración sensible al cianuro (Lüthje y Böttger, 1989). Por eso se ha generalizado, como alternativa a este aceptor el uso de los complejos de Iridato, como HBI (IV) y HCI (IV) (Döring et al., 1992); estos complejos son reducidos mucho más eficientemente que el HCF (III), con lo que se pueden usar a menores concentraciones y por tanto menos tóxicas, siendo los efectos sobre el eflujo de H^+ y el potencial de membrana similares a los del HCF (III). Además, la reducción de HCI (IV) parece estar controlada por los mismos factores que la transferencia de electrones al HCF (III) (Lüthen y Böttger, 1988). Lüthje y Böttger (1989), en un estudio comparativo de HCF (III), HCI (IV) y HBI (IV) indican que, aunque la toxicidad de los tres compuestos es muy baja en el intervalo de concentración usado en los experimentos de transporte de electrones, los complejos de iridio son aún menos tóxicos comparados con el HCF (III) y son más efectivos como aceptores de electrones. Así, Döring y Böttger (1994) observan que el HBI (IV) causa una despolarización de la membrana de raíces de maíz mayor que la que produce el HCF (III). Finalmente, Morré et al. (1988A, 1988B) indican que existe una conexión entre la **actividad del sistema redox del plasmalema y los procesos de crecimiento** en las plantas, puesto que inhibidores que actúan sobre el sistema redox actúan también inhibiendo el crecimiento, en su caso, de hipocotilos de soja. Además, aceptores de electrones como HCI (IV) estimulan la elongación de coleoptilos de maíz (Lüthen y Böttger, 1993).

Respecto del **papel de la cadena redox del plasmalema en el transporte de K^+** , Lin (1984), en protoplastos de raíces de maíz, describe que el NADH exógeno incrementa el consumo de O_2 y la absorción de iones. Así, 1.5 mM de NADH triplica la salida de H^+ de estos protoplastos y cuadruplica la velocidad máxima del llamado Sistema I (saturable) de la absorción de K^+ . Esto se produciría gracias a que el NADH activaría el sistema redox del plasmalema, que puede conducir H^+ hacia el exterior y crear así un potencial de membrana y una fuerza protón-motriz (pmf) adecuados para el transporte de otros iones (Lin, 1984, 1985). Igualmente, adicionando NADH a protoplastos de zanahoria se produce un incremento del consumo de O_2 y de la absorción de K^+ (Misra et al., 1984).

Por el contrario, si se adiciona un aceptor de e^- , como el HCF (III), se obtiene una inhibición de la absorción de K^+ . Así, la adición de 0.8 mM de HCF (III) a raíces de maíz (Rubinstein y Stern, 1986) provoca una estimulación de la excreción de H^+ después de un lag de 5 minutos, mientras que paralelamente se observa una inhibición de la absorción de K^+ , que a los 5 minutos ya alcanza el 90%. Esta inhibición del influjo de K^+ ha sido también descrita por Kochian y Lucas (1985) pero, para ellos, comenzaba a ser apreciable a partir de los 15 min de la adición del HCF (III). Los mismos autores, sin embargo, también apreciaban una inhibición de la absorción de K^+ por segmentos de raíces de maíz

tras la adición de NADH exógeno; esto podría ser consecuencia de una cascada de eventos regulatorios, en los cuales la cadena redox del plasmalema actuaría como reguladora del transporte de K^+ (Kochian y Lucas, 1991). Rubinstein y Stern (1986), por su parte, indican que la inhibición de la absorción de K^+ en presencia de HCF (III) no debe ser debida solamente a la despolarización de la membrana, sino que también podría ocurrir una oxidación del algún componente del mecanismo encargado de la absorción de dicho ión. Estos mismos autores tratan de encontrar una posible correlación entre la actividad redox y la absorción de K^+ ; así, tomando segmentos apicales de raíces y lavándolos durante 4 horas, comprueban que la actividad reductora del HCF (III) ha descendido un 35% y la absorción de K^+ se ha incrementado en un 140%; sin embargo, cuando los segmentos son subapicales, después del lavado lo que ocurre es un incremento de un 25% en la reducción del HCF (III) y un incremento en la absorción de K^+ del 640%; esto querría decir que no existe una relación demasiado estrecha y rígida entre la capacidad de la célula para absorber K^+ y la actividad redox del plasmalema, al menos la actividad medida cuando se añade HCF (III) exógeno.

Grabov y Böttger (1994), en pelos radiculares de *Limnobium stoloniferum*, han estudiado el efecto del HCF (III) sobre los canales de K^+ , y la relación de éstos con el cambio del potencial de membrana, observando que el HCF (III) modula los canales de K^+ , pero no afecta la selectividad del canal y presenta un efecto reversible, lo cual indicaría que no provoca cambios estructurales de la membrana plasmática, sino que la actividad del canal se modifica dentro de márgenes fisiológicos. Estos autores concluyen que la despolarización de la membrana plasmática producida por HCF (III) no está provocada por la modulación de los canales de K^+ , sino que estaría originada por la transferencia de e^- a través de la membrana plasmática.

Marré et al. (1988), trabajando con hojas de *Elodea*, indican que 1 mM de HCF (III) provoca una despolarización de la membrana que, además de activar la H^+ -ATPasa (extruyendo H^+), produce un eflujo de K^+ que se acumula en el medio (donde la concentración de este ión es baja), activando canales pasivos transportadores de K^+ . Este efecto de salida de K^+ también está descrito por Gonzalez-Reyes et al. (1992) en células de raíces de cebolla, que usan como aceptor de electrones radicales libres de ascorbato (AFR); además, cuando se adiciona TEA (bloqueador de los canales de K^+) a este sistema ocurre una reversión de la hiperpolarización causada por AFR, lo cual quiere decir que el eflujo de K^+ es el responsable de la hiperpolarización.

Ivankina y Novak (1988), estudiando el efecto que produce el HCF (III) en distintas especies vegetales, indican que, además de disminuir el potencial y la resistencia de la membrana, siempre provoca o bien una inhibición del influjo de K^+ , o bien un cambio de influjo a eflujo, o bien, en aquellas otras especies en que ocurre eflujo de K^+ sin HCF (III), una intensificación de dicho eflujo al añadir el aceptor de e^- .

Sijmons et al. (1984A), por su parte, postulan que el reajuste de la diferencia de potencial a

través de la membrana creado por aceptores externos de e^- , podría ocurrir por la estimulación del eflujo de K^+ . En apoyo de esta interpretación, Colombo y Cerana (1993) destacan que los canales de K^+ dependientes de voltaje de *Arabidopsis* se inactivan a temperaturas inferiores a 15° ; esta observación podría explicar el hecho de que la diferencia de potencial a través de la membrana creada por aceptores de electrones no pueda ser regulada a bajas temperaturas (Döring y Böttger, 1994).

Finalmente, Roth-Bejerano et al. (1988) también encuentran que el HCF (III) inhibe la absorción de K^+ ligada a la apertura de estomas de células de guarda en epidermis aislada; sin embargo, en protoplastos de las mismas células de guarda ocurría un aumento de la absorción de K^+ por las células. Este diferente comportamiento dificulta aún más la correcta interpretación de los resultados aquí descritos, y no permiten extraer conclusiones claras acerca del papel de la cadena redox en la regulación de los flujos de K^+ .

4.4.2.- cis-Platino (II)

Se ha demostrado que el cis-Pt (II) inhibe la proliferación celular a través de la inhibición de la actividad de la cadena redox en cultivos de células de mamíferos (Sun y Crane, 1981, 1984, 1985).

Como ya hemos descrito con detalle en el apartado anterior, en la membrana plasmática de células de plantas superiores existe un sistema redox semejante al de células animales (Møller y Lin, 1986), que está involucrado en varias funciones, entre ellas la extrusión de H^+ y absorción de K^+ (Rubinstein y Stern, 1986). Al igual que en las células animales, este sistema es inhibido por cis-Pt (II), como describen Morré et al. (1988A, 1988B) en vesículas de membrana plasmática de raíces de soja, donde al adicionar cis-Pt (II) ocurre una inhibición de la NADH/HCF (III) oxido-reductasa. Si se aplica este inhibidor a hipocotilos de la misma planta se produce una inhibición de la elongación de los mismos, que es aún más acusada si el crecimiento es inducido por auxina. Así pues, estos autores sugieren por primera vez que existe una conexión entre la actividad redox del plasmalema y los procesos de crecimiento.

El poco tiempo necesario para que actúe el cis-Pt (II) sobre las vesículas parece indicar que no es necesaria su penetración en el interior celular, puesto que se obtienen los mismos resultados con y sin incubación previa con el inhibidor. Sin embargo, en órganos enteros tal vez se requieran mayores concentraciones y/o tiempos de incubación superiores, ya que el inhibidor debe penetrar a través del apoplasto del tejido (Morre et al., 1988B).

5.- EL USO DE ELECTRODOS ESPECÍFICOS EN LAS MEDIDAS DE FLUJOS IÓNICOS DE H^+ Y K^+

La técnica usada en este trabajo, como se explicará en el capítulo de Materiales y Métodos

consiste en medir las variaciones de pH y la concentración de K^+ en el medio debidas a la actuación de las raíces de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.); para ello se usa un electrodo no combinado de pH junto con su electrodo de referencia para la medida de la variación de pH, ambos conectados a un pHmetro, y un electrodo selectivo de K^+ junto con su electrodo de referencia para la medida de la variación de la concentración de K^+ , conectados a un ionómetro (todos estos aparatos serán descritos de forma detallada en el capítulo de Materiales y Métodos).

Escasa bibliografía se obtiene del uso de este tipo de medidas de flujos simultáneos, aunque sí de H^+ sólo, mediante la medida de la variación de pH del medio con electrodo de pH (combinado). Así, cabe destacar los trabajos de Paredes (1989): "La extrusión de H^+ dependiente de auxina en coleoptilos de *Avena sativa* L." y Salguero (1989): "La extrusión de H^+ dependiente de auxina en coleoptilos de *Zea mays* L.", que desarrollan este método tomando como base el de Cleland (1976) y Rayle y Cleland (1977). También hay que destacar trabajos anteriores de nuestro laboratorio (Espinosa, 1991): "Estudio del eflujo neto de H^+ por raíces de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) en condiciones normales y de toxicidad de Boro".

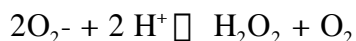
Respecto al uso del electrodo selectivo de K^+ , Huerta y Murphy (1989A-B) usan un electrodo similar, con su electrodo de referencia, para medir la variación de la concentración de K^+ en el medio en su estudio de la cinética de salida de K^+ de cultivos celulares de rosa tratados con luz ultravioleta. Mención especial merece el trabajo de Sarro et al. (1984), que usan este tipo de electrodos selectivos para evaluar la cantidad de K^+ en soluciones nutritivas, describiendo la puesta en marcha, calibrado y control de funcionamiento de estos electrodos.

Finalmente, Ullrich y Novacky (1990) combinan el uso de microelectrodos para medir potencial de membrana y pH intracelular con macroelectrodos para medir concentración extracelular de iones; entre estos últimos usan un electrodo de pH combinado y un electrodo selectivo de K^+ junto con su electrodo de referencia, semejantes a los usados en este trabajo.

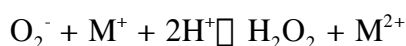
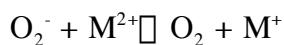
6.- SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD)

Las Superóxido dismutasas (SODs) junto con las Catalasas, son las enzimas antioxidantes más eficientes encontradas en las células (Scandalios, 1993). Están presentes en todos los organismos aerobios (Marschner, 1986) y juegan un papel esencial en la supervivencia de estos organismos que viven en presencia de oxígeno, protegiendo de los efectos deletéreos del exceso de radicales Superóxido (O_2^-) generados en los procesos respiratorios y fotosintéticos, así como en numerosas condiciones adversas (en realidad, todos aquellos procesos en los que interviene un transporte de electrones a través de una cadena redox,

incluida la del plasmalema). La reacción que cataliza la SOD es:



El mecanismo implica la reducción y oxidación del metal constitutivo del enzima (Salin, 1987):



El H_2O_2 formado en la reacción suele ser eliminado por la Catalasa, ya que ambas enzimas ejercer su papel en la destrucción del exceso de radicales superóxido generados en la actuación de una cadena redox. De todas formas, como veremos más adelante, la función fisiológica de las SOD está sometida a fuerte controversia.

La primera SOD aislada lo fue de células sanguíneas bovinas (Mann y Keilin, 1938), atribuyéndosele la función de acumulación de Cu. La función catalítica del enzima fue descubierta por Mc Cord y Fridovich (1969), y el primer trabajo detallado de SOD en plantas fue publicado por Sawada et al. (1972).

Todas las **SOD son metaloproteínas multiméricas**. Las Cu/ZnSOD, las MnSOD de procariotas y las FeSOD son díméricas y las MnSOD de mitocondrias y ciertas bacterias termofílicas son tetraméricas. Basándose en el ión metálico del centro activo, se han descrito tres tipos de SOD: Las Cu/ZnSOD, las MnSOD y las FeSOD (Salin, 1987):

a) Las **Cu/ZnSOD** son dímeros de 33KDa, formados por dos subunidades de 16.5KDa, y se caracterizan por su inhibición por CN^- y su inactivación por H_2O_2 . Con algunas excepciones, están generalmente en el citosol de células eucariotas (aunque Marklund, 1984, describe la existencia de una tetramérica Cu/ZnSOD en fluidos extracelulares de mamíferos). En plantas, Steller y Wingsle (1994) han descrito la existencia de una **SOD extracelular (Cu/ZnSOD)** en acículas de *Pinus sylvestris* L. compuesta por dos subunidades de 17.8 KDa cada una. Sin embargo, en plantas están principalmente asociadas a cloroplastos y otros orgánulos subcelulares, y son las más abundantes de las tres isoenzimas. Kröninger et al. (1992) han purificado y caracterizado dos Cu/ZnSOD (ambas homodiméricas) en acículas y raíces de *Pinea abies* L., una en el citoplasma y otra en el cloroplasto. En las acículas la mayor actividad estaba asociada al cloroplasto y en raíces al citosol. Bueno y del Rio (1992) han purificado una Cu/ZnSOD de glioxisomas de cotiledones de sandía, formada por dos subunidades iguales. Indican, además, que en estos cotiledones hay tres SOD más: dos MnSOD (en mitocondrias) y otra Cu/ZnSOD, distribuida entre mitocondrias y citosol.

b) Las **MnSOD** son enzimas de 46 a 92 KDa, dependiendo del organismo, y tienen 2 ó 4 subunidades iguales. Se caracterizan por no ser inactivadas por el H_2O_2 y ser insensibles al CN^- . Se encuentran en organismos procariotas y eucariotas donde principalmente están asociadas a orgánulos subcelulares como mitocondrias (Fridovich, 1975). En plantas superiores se han encontrado en mitocondrias (Arron et al., 1976; Jackson et al., 1978;

Baum y Scandalios, 1979; Salin y Bridges, 1981) y glioxisomas (Del Rio et al., 1983; Sandalio y Del Rio, 1987). En cianobacterias y algas verdes se han descrito una MnSOD asociada a tilacoides del cloroplasto (Kanematsu y Asada, 1979; Lumsden y Hall, 1974). La presencia de este isoenzima en tilacoides de cloroplastos de plantas superiores ha sido también puesta de manifiesto por algunos autores (Hayakawa et al., 1984) y ha sido demostrada por Lumsden y Hall (1974); sin embargo, otros autores ponen en duda esta conclusión, entre ellos Palma et al. (1986), quienes aseguran que en tilacoides de cloroplastos solamente se detecta una Cu/ZnSOD.

c) Las **FeSOD** son isoenzimas que se caracterizan por no ser sensibles al CN^- , pero que se inactivan por H_2O_2 . Tienen de 36 a 46 KDa y están compuestas por dos subunidades iguales, siendo muy parecidas a las MnSOD en su secuencia de aminoácidos (Martin et al., 1986). Generalmente están presentes en procariotas (bacterias aerobias y anaerobias), aunque también se han encontrado en, al menos, 5 familias de plantas: Ginkgoaceae, Nymphaeaceae, Cruciferae, Rutaceae y Solanaceae (Duke y Salin, 1985; Bridges y Salin, 1981; Kwiatowski et al., 1985). Almansa et al. (1989) y Sevilla et al. (1984) han encontrado este isoenzima, junto con los otros dos, en hojas de varias especies de cítricos, siendo similar al isoenzima encontrado en procariotas. Están asociadas a cloroplastos y algunos autores aseguran que están ausentes de las mitocondrias (Salin y Bridges, 1981; Salin y Lyon, 1983). Sin embargo, Droillard y Paulin (1990) han aislado de pétalos de clavel una MnSOD y una FeSOD, presentes ambas tanto en mitocondrias como en peroxisomas; la coexistencia de dos isoenzimas en el mismo orgánulo puede ser debido a que ocupan distinto lugar dentro de dicho orgánulo; así ocurre en el caso de glioxisomas de cotiledones de sandía, donde existen dos SOD: una Cu/ZnSOD, que es la más abundante, en la fracción soluble y una MnSOD unida a la membrana por su cara externa (Sandalio y del Rio, 1988). En peroxisomas de hojas maduras del mismo material, sin embargo, solamente hay una MnSOD (Sandalio et al., 1987), que mayoritariamente se encuentra en la fracción soluble. Esta coexistencia de dos isoenzimas en el mismo orgánulo significaría que presentan distinta regulación de su biosíntesis (Droillard y Paulin, 1990) y sería una ventaja para proteger de los efectos deletéreos del estrés ambiental.

Wingste et al. (1991) han purificado dos isoenzimas, de las 4 SOD existentes en acículas de *Pinus sylvestris* L.: de ellas, una es citosólica y la otra está asociada a cloroplastos, tratándose de enzimas diméricas del tipo Cu/ZnSOD. Las otras dos no purificadas también son Cu/ZnSOD. En este material se detecta también una pequeña actividad MnSOD (del 1 al 4%). Un trabajo posterior con semillas germinadas del mismo material (Streller et al., 1994) indica la existencia de al menos 5 Cu/ZnSOD. Comparando la secuencia de aminoácidos de estas Cu/ZnSOD de *Pinus sylvestris* con las secuencias de Cu/ZnSOD de otras plantas, se observa que una de estas isoenzimas es del tipo presente en cloroplastos, mientras que las otras 4 son citosólicas. En efecto, estos autores han

aislado mitocondrias y glioxisomas observando que la mayor parte de la actividad Cu/ZnSOD no deriva de estos orgánulos (en ellos se encuentra menos del 10% de la actividad). La existencia de 4 tipos distintos de Cu/ZnSOD en el citosol podría ser debida a que procedieran de otros orgánulos, o bien que diferentes tipos de estreses hayan sido la fuerza evolutiva conductora para crear varios isoenzimas citosólicos codificados por distintos genes, que se regulan de forma distinta y en respuesta a diferentes estímulos estrésicos.

Becana et al. (1989) describen la presencia de **SODs en nódulos de leguminosas**: MnSOD en bacteroides y mitocondrias y Cu/ZnSOD en citosol; ambas actividades parecen mezcla de varias isoenzimas, asegurándose también en este trabajo la presencia de una FeSOD en la fracción vegetal de los nódulos de *Vigna unguiculata*; este sería el primer caso en el cual aparece esta isoenzima en tejido eucariota no fotosintético.

En plantas superiores las Cu/ZnSOD son las más abundantes, los otros dos tipos representaban sólo una pequeña proporción de la actividad total de SOD (Asada et al., 1980). En *Nicotiana plumbaginifolia* han sido clonados 3 DNA de 3 SOD: una MnSOD mitocondrial, otra FeSOD de cloroplasto y otra Cu/ZnSOD citosólica. (Hérovart et al., 1991).

Como se ha indicado anteriormente, el cianuro es un inhibidor de las Cu/ZnSOD y es usado para distinguirlas de las otras dos isoenzimas, a las cuales no afecta el cianuro. Para distinguir los otros dos tipos se usa el H_2O_2 : las FeSOD son irreversiblemente inactivadas por H_2O_2 , que no afecta a las Mn SOD (Baum y Scandalios, 1979).

La **función de las SOD** es, en general, jugar un papel preventivo de los efectos peligrosos del oxígeno en orgánulos celulares (Eltner, 1982). Son enzimas constitutivas en eucariotas y en la mayoría de procariontes, pero sus niveles pueden incrementarse en determinadas condiciones estrésicas, que provoquen un aumento de radicales O_2^- . Así sucede con las **respuestas de las plantas a herbicidas**, como Paraquat y Diquat, que aumentan la producción de especies activas de oxígeno (Halliwell, 1984): cuando semillas de maíz son tratadas con cantidades pequeñas de estos herbicidas se observa que aumenta la actividad de Cu/Zn y MnSOD en respuesta a este estrés (Matlers y Scandalios, 1986). Igualmente, se ha observado un aumento de la capacidad antioxidante en relación con la **tolerancia a drogas** en plantas superiores (Burke et al., 1985). Así, Dhindsa y Matowe (1981) relacionaron por primera vez la actividad SOD con los bajos niveles de peroxidación de lípidos observados bajo los efectos de drogas. También aumenta la actividad SOD con la presencia de **concentraciones letales de Ozono** en hojas de espinacas, como un mecanismo de defensa y detoxificación (Declaire et al., 1984). Así mismo, se ha observado un aumento de la actividad de SOD en pinos, al aumentar el **SO₂ atmosférico** (Heiska y Huttunen, 1987).

Puppo et al. (1989) en nódulos de *Frankia*, concluyen que la SOD y la catalasa juegan un papel muy importante para proteger del O_2 y sus especies activas a la **fijación simbiótica**

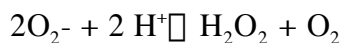
del nitrógeno por la enzima Nitrogenasa. Becana et al. (1989), con distintas leguminosas, también determinan la presencia de SOD (junto con catalasa y peroxidasa) en los nódulos fijadores de N_2 , siendo su principal misión la de proteger del efecto tóxico del O_2^- y H_2O_2 a la Nitrogenasa.

La actividad SOD también se asocia con **estados de envejecimiento**. Así, en semillas viables de soja se ha observado una activación de la síntesis de SOD, mientras que en semillas viejas la ausencia de SOD estaba asociada a la peroxidación de lípidos y a la disminución de la viabilidad (Stewart y Bewley, 1980). Igualmente, en *Castanea sativa*, Louga et al. (1994) describen la presencia de tres tipos de Cu/ZnSOD (de localización dudosa). En hojas senescentes se observaba un considerable incremento en la generación de O_2^- y un aumento de la actividad total SOD, a la vez que decrecía la actividad peroxidasa y catalasa; en estas condiciones debería haber una superproducción de H_2O_2 y probablemente también de O_2^- , que participaría en el mecanismo oxidativo responsable del proceso de senescencia. Droillard et al., (1987) indican que durante la senescencia hay un aumento de radicales libres de oxígeno, que a su vez provocan el aumento de la actividad de SOD y catalasas; pero, al parecer, esta actividad no es suficientemente efectiva para eliminar los radicales, que acaban provocando efectos deletéreos. Posteriormente, Droillard y Paulin (1990) aislaron una FeSOD y una MnSOD, presentes ambas en mitocondrias y peroxisomas de pétalos de clavel, comprobando que la actividad de ambas isoenzimas durante su senescencia decrece en mitocondrias y aumenta en peroxisomas, es decir, que estos peroxisomas jugarían un papel importante en el proceso de senescencia de los pétalos.

Deficiencias de Ca en patata provocan también un alto estado oxidativo y una alta actividad de SOD como medida de resistencia (Monk y Bavies, 1989). También se ha detectado una inducción de la actividad de MnSOD en plantas con **altas concentraciones de Zn y Mn** (Del Rio et al., 1985); esto podría indicar una relación entre esta metaloenzima y la prevención de efectos tóxicos del H_2O_2 y del O_2^- . En hojas de algodón (Cakmak y Marschner, 1987) el exceso de P induce **deficiencia de Zn**, y esta deficiencia va acompañada de un decrecimiento de una actividad SOD que es inhibida por 1mM de cianuro potásico (inhibidor de las Cu/ZnSOD). Igualmente, Cakmak y Marschner (1988), con raíces de algodón deficientes en Zn, demuestran que esta deficiencia afecta la integridad de las membranas a través de su interferencia con la oxidación del NAD(P)H por las cadenas redox, produciéndose radicales O_2^- (por la NAD(P)H oxidasa). Posteriormente, estos mismos autores (Cakmak y Marschner, 1992) indican que la actividad SOD y de los enzimas que eliminan el H_2O_2 en hojas de judía aumenta con la **intensidad de luz** y particularmente si las hojas son **deficientes en Mg**; en consecuencia, esta deficiencia hace que los mecanismos antioxidativos aumenten, probablemente porque la falta de Mg desacople la fosforilación del transporte de electrones por las cadenas redox.

La actividad SOD también aumenta en rizomas de *Iris pseudacorus* **tolerantes a la anoxia** (Monk et al., 1989) cuando, tras sufrir un periodo de anoxia, la planta se expone de nuevo al aire y hay peligro oxidativo; en este periodo de post-anoxia es donde la SOD parece jugar su papel protector.

Mehdy (1994) describe la producción de especies activas de oxígeno como **defensa contra patógenos** en plantas. Entre estas especies activas se encuentra el ión O_2^- (que puede producirse por la NAD(P)H oxidasa de la cadena redox del plasmalema o por una peroxidasa), que en soluciones acuosas puede sufrir una reacción de dismutación espontánea, que sólo ocurre a pH ácido, tal y como el que encontramos en la pared celular:



Así, Doke (1983) observó que al tratar protoplastos de patata con componentes de la pared del hongo *Phytophthora infestans* ocurría una reacción de defensa que genera O_2^- dependiente de la oxidación de NAD(P)H, en la que posiblemente estaba involucrada la NAD(P)H oxidasa de la cadena redox del plasmalema del protoplasto. La producción de estos O_2^- se ponía de manifiesto mediante la reducción de citocromo c o de NBT extracelular, que se inhibía al adicionar SOD. En inflorescencias de coliflor, Askerlund et al. (1987) también observan que la actividad NAD(P)H oxidasa de membrana plasmática se ve estimulada por componentes fenólicos (compuestos típicamente implicados en las reacciones de defensa), y que esta activación es inhibida al añadir SOD; por tanto, en esta reacción se producirían O_2^- que en condiciones normales pasan a H_2O_2 en una reacción no enzimática como las que hemos descrito. Por su parte, Devlin y Gustine (1992) estudian un tipo especial de reacciones de defensa: la respuesta hipersensible, en *Trifolium repens* L. y *Nicotiana tabacum* L. En este material, al adicionar los elicitores *Pseudomonas corrugata* o $HgCl_2$ se produce una “explosión” oxidativa, con especies activas de oxígeno tales como H_2O_2 y O_2^- . Sin embargo, estos autores no aseguran que este efecto sea un elemento necesario para la respuesta de defensa a patógenos, sino que podría ser un hecho independiente de respuesta general al estrés.

Finalmente, Zhu y Scandalios (1994) describen un aumento de la transcripción de genes de la MnSOD mitocondrial de maíz cuando hay un **incremento de Ácido Abscísico (ABA)**, bien aplicado exógenamente o bien sintetizado “de novo” durante el desarrollo o por estrés osmótico. Puesto que el ABA es la fitohormona del estrés, éste podía ser uno de los mecanismos implicados en la respuesta a diferentes estreses: la inducción por ABA de la MnSOD, requerida para la supervivencia de la planta bajo condiciones de estrés ambiental.

OBJETIVO

La planificación de este trabajo se encuadra dentro del Proyecto Coordinado de Investigación de la DGICYT, PB-91-0100-C02-02 así como de la **Beca FPI-PN (BOE 8/9/88)**. El objetivo que se planteaba en nuestro subproyecto era **el estudio del transporte simultáneo de H^+ y de K^+ a través de las membranas plasmáticas de las células de la raíz de girasol**, estudiando en especial la relación entre ambos.

En este contexto, la presente Memoria es una parte importante de nuestros trabajos de evaluación del **sistema de raíces aeróbicas estériles de plántulas de girasol**, como un modelo para el estudio "in vivo" del transporte de membrana de estas raíces (órganos enteros), paso esencial previo, y a la vez punto de referencia final a los estudios con sistemas aislados, como vesículas o protoplastos de las mismas raíces (para patch-clamp), en realización en nuestro laboratorio. Nuestras raíces de 36 horas de cultivo en condiciones estériles no han realizado aún la masiva biosíntesis, oxidación y deposición de compuestos fenólicos en las paredes celulares que acompañan a la diferenciación de los tejidos de la raíz (por ejemplo, no poseen aún exodermis, y la endodermis no está completa). Bien sea por esta falta de diferenciación, bien porque en las raíces los sistemas de transporte iónico del medio estén concentrados mayoritariamente en las primeras capas de células, principalmente epidérmicas (Schroeder et al., 1994; White y Lemtiri-Chlieh, 1995), nuestros trabajos anteriores con este mismo material han dado resultados de dependencia de la temperatura (plot de Arrhenius), datos cinéticos y respuesta a inhibidores específicos, que en su conjunto prueban que el eflujo de H^+ por las raíces se lleva a cabo, o está limitado por sistemas de transporte ligados al plasmalema de, aparentemente, un sólo tipo de células de la raíz (Espinosa, 1991; Espinosa y Alvarez-Tinaut, 1987; Espinosa et al., 1989; Espinosa et al., 1991; Espinosa et al., 1992; Espinosa y Alvarez-Tinaut, 1992; Paredes et al., 1993).

En consecuencia, el objetivo de la presente Memoria es estudiar y **caracterizar los sistemas responsables del transporte de K^+ y H^+** de nuestras raíces estériles de girasol, midiendo los cambios simultáneos en el pH y la concentración de K^+ del medio que baña las raíces, **mediante electrodos específicos** no combinados de alta sensibilidad, ya que este **método no invasivo** se ha demostrado que es muy apropiado para seguir los flujos de H^+ y K^+ por las raíces en condiciones similares a las naturales, en que ambos sistemas operan simultáneamente, y por tanto para estudiar la mutua dependencia de ambos flujos bajo diferentes condiciones.

Dicha caracterización ha supuesto la planificación de los siguientes pasos o **Apartados** de la presente Memoria:

1º) En primer lugar, se ha realizado una exhaustiva **puesta a punto del sistema de medida de los flujos de H^+ y K^+ de forma simultánea**, mediante electrodos específicos, que incluye la comprobación de la histéresis del electrodo de K^+ y su comportamiento en las diferentes soluciones de medida (incluyendo el efecto del pH), las posibles interferencias entre los electrodos, así como las diferencias observadas entre raíces procedentes de semillas de diferentes cosechas.

2º) Posteriormente, se ha realizado la caracterización de la cinética de influjo de K^+ por las raíces mediante el estudio de dicha **cinética con diferentes concentraciones iniciales de K^+** en el medio, que cubren el intervalo de actuación de los Sistemas I y II de transporte de K^+ .

3º) A continuación se aborda **el estudio del funcionamiento simultáneo de los flujos de H^+ y K^+** , así como su mutuo acoplamiento o interacción, usando **diferentes efectores** que actúan en diferentes puntos del sistema:

a) **Efectores** que afectan primariamente los **flujos de K^+** (como **Valinomicina** y **Ouabaina**, este último usado para determinar si se trata de un transportador Na^+/K^+).

b) **Efectores** que actúan sobre **los canales de H^+** , sean éstos de la H^+ -ATPasa y/o de la cadena redox (**DCCD**).

c) **Efectores** que actúan sobre **la H^+ -ATPasa** del plasmalema (**Vanadato** y **Oligomicina**).

d) **Efectores** que actúan prioritariamente **a nivel de la cadena redox del plasmalema**, como donadores de electrones (**NADH**, **HCF-II**), aceptores de electrones (**HCF (III)**, **HCI (IV)**, **citocromo c**), y bloqueantes de la cadena (**cis-Pt -II**).

e) Finalmente, se incluyen medidas de **Superóxido Dismutasa (SOD)** exocelular, como enzima clave íntimamente ligada a los procesos oxidativos que transcurren tras la cesión de electrones al oxígeno, con formación de radicales libres, por actuación de la cadena redox del plasmalema, ya que se ocupa de la dismutación y por tanto de la detoxificación de dichos radicales libres. El motivo de la inclusión de tales medidas es comprobar si los inhibidores empleados afectan dicha actividad, lo que indirectamente sería la causa del efecto de dichos efectores sobre los flujos de H^+ y K^+ , como se ha propuesto.

MATERIAL Y MÉTODO

1.- MATERIALES

1.1.- MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron semillas de *Helianthus annuus* L. variedad híbrido enano, suministradas por la compañía Koipe S.A. de Sevilla, usándose aproximadamente 400 semillas de *Helianthus annuus* L. en cada experimento. Las etapas que se siguieron para obtener plántulas con raíces estériles fueron:

1º) Esterilización en superficie de las semillas: se desinfectaron con etanol 96° durante 4 minutos, seguido de lavado con agua destilada estéril, pasándose a continuación a una solución de hipoclorito sódico (40 gr/l) y agua destilada al 12% v/v durante 20 minutos, con agitación. Después se lavaron con abundante agua destilada estéril, al objeto de retirar todos los restos que pudieran quedar de hipoclorito sódico y que interferirían en la germinación.

Todas las manipulaciones de semillas y plántulas se realizaron en cámara de flujo laminar, y todo el material y medios utilizados fueron esterilizados en un autoclave durante 40 minutos a 131°C para material de vidrio, papel de celulosa y agua destilada, y 20 minutos a 121°C para el medio de siembra. Los medios de incubación, que llevaban sustancias no autoclavables, fueron filtrados a través de filtros de bacterias.

2º) Imbibición de las semillas en una solución estéril de CaCl₂ 1mM durante 4 horas con agitación y aireación a través de una pipeta Pasteur con filtro de bacterias.

3º) Siembra: Transcurrido este tiempo se sembraron en papel de filtro humedecido con solución estéril de CaCl₂ 1 mM, en un recipiente hermético de plástico del tamaño apropiado para mantener una relación de 70-80 cm³ de aire por semilla.

4º) Germinación: Para que germinen las semillas se introdujeron en una estufa de cultivo, en oscuridad, a 27° C durante 36 h.

5º) Obtención de raíces: Transcurrido el tiempo de germinación, se observaba que aproximadamente 1.5 cm de raíz emergían de cada semilla, sin que hubiera aún emergencia de los cotiledones. Las raíces tenían gran cantidad de pelos absorbentes bien desarrollados, correspondiendo al tipo "raíces aeropónicas" descritas por Zsoldos et al. (1987). En la cámara de flujo laminar se corta la porción apical de las raíces, de una longitud aproximada de 1 cm (la que incluía toda la zona de pelos absorbentes) hasta tener unos 2.5 g de peso fresco de raíces, exactamente pesado en cada caso por diferencia entre el pocillo con 50 ml de medio de incubación (Hepes 1 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 6.5), y el mismo con las raíces, al

objeto de referir las medidas de flujo iónico a g de peso fresco de raíz.

6°) Preincubación en frío: Antes de realizar las medidas, las raíces se incubaron en 50 ml. del citado medio de incubación, durante una hora a 4° C, con aireación a través de filtro de bacterias. (Paredes, 1989).

7°) Temperatura óptima para las raíces: Experiencias anteriores con nuestras raíces (Espinosa, 1991) establecieron que 30° C era la temperatura óptima para la actividad de las mismas, por lo que todas las medidas que se hicieron con las raíces vivas, así como todos los controles y calibraciones, fueron realizados manteniendo constante esta temperatura.

1.2.- REACTIVOS UTILIZADOS

Los reactivos utilizados, todos con grado de pureza máximo, fueron los siguientes:

Acido Clorhídrico (HCl) (Merck).

Carbonato disódico (CO₃Na₂) (Merck).

Carbonato monosódico (CO₃HNa) (Sigma).

Cianuro Sódico (NaCN) (Panreac).

cis-Platino (II) diamino dicloruro (cis-Pt (II)) (Sigma).

Citocromo c (Sigma).

Cloranfenicol (Parke-Davis).

Cloruro Cálcico (CaCl₂) (Merck).

Cloruro Potásico (KCl) (Merck).

DCCD (N,N'-Diciclohexilcarbodiimida) (Sigma).

Diclorofenolindofenol (DCIP) (Sigma).

Diclorofenolindofenol-sulfonato (DCIP-S) (cedido por el Prof. P. Askerlund).

EDTA (Acido etilendiamino tetracético) (Panreac).

Etanol 96° (Merck).

Hepes (Acido N-2-Hidroxietyl 1-Piperacil-N'-2-Etano Sulfónico) (Sigma).

Hexacianoferrato II, sal potásica (HCF-II) (K₄Fe(CN)₆) (Merck).

Hexacianoferrato III, sal potásica (HCF-III) (K₃Fe(CN)₆) (Merck.)

Hexacloroiridato (IV) (HCl) (Sigma).

Hidróxido Sódico (NaOH) (Merck).

Hipoclorito Sódico (ClONa) (lejía comercial).

Metionina (Sigma).

NADH (β-Nicotinadenin dinucleótido, forma reducida) (Sigma).

NBT (Azul de Nitrotetrazolio) (Fluka).

Oligomicina (Sigma).
Ortovanadato sódico (Na_3VO_4) (Sigma).
Ouabaina. (Sigma).
Penicilina G Sódica (Laboratorio Level S.A.).
Penicilina G Potásica (Sigma).
Riboflavina (Sigma).
SOD Horseradish (Superóxido dismutasa) (Sigma).
Valinomicina (Sigma).

1.3.- APARATOS

Para mantener las condiciones de esterilidad se utilizó una **cámara de flujo laminar** Captair tipo 2005 HPS, provista de un filtro de $0.3 \mu\text{m}$ y una lámpara fungicida de rayos ultravioletas, y un **autoclave** "Autester" mod.437-P de P-Selecta, así como **filtros de bacterias** Millex-GV $0.22 \mu\text{m}$.

Para el cultivo de las semillas se usó una estufa P-Selecta S-207.

La solución de medida se encontraba en un **vaso termostatzado** por agua Vidra Foc E11550, empleando un equipo **fuera de borda** termostatzado Kowel FB-3-V-B.

La solución se agitaba continuamente por un **imán agitador** movido por un **agitador** P-Selecta S242 a velocidad 5, y era aireada por una **bomba de acuario** Hagen Elite 801 a través de un filtro Millex-GV $0.22 \mu\text{m}$.

Para medir el pH del medio se utilizó un **electrodo no combinado de pH** Radiometer G202 C y el **electrodo de referencia** de doble puente salino Radiometer K701, que contenía en el puente salino primario (el superior) una solución saturada de KCl Radiometer S4004 y en el puente salino secundario (el inferior) una solución de NaCl 100 mM Radiometer S3506. Ambos electrodos se conectaron a un **pHmetro** Radiometer pHM84, y éste a su vez, a través de un **amplificador** de ganancia variable, construido específicamente para ello (ITI, Badajoz), a un **registrador** Hitachi modelo 561.

Para medir la concentración de K^+ del medio de medida se utilizó el **electrodo selectivo de K^+** Radiometer F2312K y el **electrodo de referencia** Radiometer K701. El electrodo selectivo de K^+ F2312K estaba formado por el electrodo F2002 que se insertaba en el tubo de electrodo 940-240 al que se ha adicionado previamente $200 \mu\text{l}$ de solución electrolítica Radiometer S 43416. El electrodo de referencia K701 es de doble puente salino, el puente primario (el superior) contenía solución saturada de KCl S4004, y el segundo puente salino (el inferior) era rellenado con una solución de ClNa 100 mM

S3506.

Ambos electrodos se conectaban a un **ionómetro** Radiometer Ion 85 Ion Analyzer, y éste, a su vez, a través de un **amplificador** de ganancia variable construido específicamente para ello (ITI, Badajoz), a un **registrador** de doble entrada Hitachi modelo 561. En el esquema 1 se reproduce, completo, el sistema empleado en la medida de flujos iónicos.

Se usó, como método alternativo, para medir K^+ un **fotómetro de llama** "Sharlau Science".

Para las medidas de absorbancia se utilizó un **espectrofotómetro** "Uvikon 810".

Para las medidas de **actividad de SOD**, en las cuales fue necesaria la aplicación de luz, esta aplicación se realizó mediante una **lámpara fluorescente circular** en el centro de la cual se colocó una gradilla con los tubos, todo ello tapado con un recipiente forrado de papel de aluminio en su interior para que todos los tubos recibieran una intensidad de luz semejante.

Para el procesamiento de este trabajo se utilizó un **ordenador Macintosh LC 475**. Para texto el programa usado fue: WriteNow 3.0. Para las representaciones gráficas, ajustes estadísticos de curvas y obtención de las ecuaciones de las mismas, se utilizó el programa gráfico-estadístico Cricket Graph 1.3. Para el cálculo de medias y βH^+ y βK^+ se usó el programa Microsoft Excel 1.8.

2- MÉTODOS

2.1.- CALIBRACIONES REALIZADAS CON EL ELECTRODO SELECTIVO DE K^+

Es conocida la dificultad de trabajar con electrodos específicos por la facilidad con que pueden ocurrir interferencias con componentes del medio de medida o, como en nuestro caso, con otros electrodos presentes en el mismo medio. Por ello, antes de realizar medidas con raíces, se hace necesario una calibración exhaustiva del electrodo de K^+ Radiometer, que por primera vez se usaba en nuestro laboratorio, en idénticas condiciones y con las soluciones que luego se emplearán en las medidas con raíces. Así, manteniendo el mismo sistema y condiciones que se describen más adelante para dichas medidas, se realizaron las siguientes calibraciones:

2.1.1.- Comprobación del buen funcionamiento del electrodo selectivo de K^+

Para asegurarse de que el electrodo selectivo de K^+ funcionaba correctamente se hizo una primera calibración (Sarro et al., 1984) midiendo la diferencia de potencial entre dos soluciones de KCl de distinta concentración (10 mM y 1 mM), para verificar si coincidía con la teórica descrita en las instrucciones de uso de este electrodo selectivo (≥ 54 mV). Las soluciones de KCl fueron preparadas a partir de la solución standard de KCl 100 mM Radiometer S3626, por dilución con agua destilada.

2.1.2.- Comprobación de la carencia de histéresis del electrodo

También se hicieron comprobaciones para asegurarse de que el electrodo selectivo de K^+ no presentaba histéresis. Para ello, se hicieron medidas incrementando la concentración de K^+ del medio de 0.01 a 100 mM, y a continuación en sentido decreciente, de 100 a 0.01 mM. Las lecturas en mV correspondientes a cada concentración de K^+ no deben variar por el hecho de que se halla realizado en la serie ascendente o descendente de concentración. Las distintas concentraciones que se utilizaron (100; 50; 25; 10; 5; 1; 0.5; 0.1; 0.05 y 0.01 mM), se obtuvieron por dilución con agua destilada de la solución standard de KCl 100 mM Radiometer S3626.

2.1.3.- Curvas de calibración del electrodo de K^+ a diferentes pH, en Hepes 1 mM

En las medidas de flujos con raíces “in vivo” se utilizaba un medio debilmente tamponado con Hepes 1 mM. Por tanto, se imponía comprobar el funcionamiento del electrodo de K^+ en presencia de dicho tampón, y además a pH variable, tal como ocurría en las experiencias con raíces “in vivo”, en que la actividad de las mismas hacía variar el pH del medio dentro de un intervalo comprendido entre 6.5 y 4.8. Por esta razón se realizaron curvas de calibración del electrodo ($mV/[K^+]$) con soluciones patrón de las siguientes concentraciones de KCl: 0.50; 0.75; 1; 1.25; 1.5; 1.75 y 2 mM; para cada una de las 7 concentraciones de K^+ se prepararon 8 soluciones patrón, a cada uno de los siguientes pH: 4.8; 5.0; 5.2; 5.5; 5.8; 6.0; 6.3 y 6.5. En total se prepararon $8 \times 7 = 56$ soluciones patrón independientes, con las que se realizaron las curvas de calibración; todo el proceso se repitió 4 veces, de manera que se obtuvieron 4 repeticiones independientes para cada pH y concentración de K^+ .

2.1.4.- Curvas de calibración del electrodo de K^+ a diferentes pH, en Hepes 1 mM + $CaCl_2$ 1 mM

Este medio es el medio base utilizado en las medidas de flujos con raíces “in vivo”, ya que la extrusión de H^+ depende de la presencia de Ca_2^+ en el medio de medida (Coen y Nadler, 1976); 1 mM era la concentración de $CaCl_2$ más adecuada según trabajos anteriores de este laboratorio (Paredes, 1989). Las medidas se realizaron siguiendo idéntico protocolo al descrito en el apartado anterior.

2.2.- INTERFERENCIAS ENTRE LOS ELECTRODOS USADOS EN LAS MEDIDAS

Todas las medidas descritas en el apartado 2.1 fueron hechas para calibrar el comportamiento del electrodo de K^+ , de manera que sólo éste y el correspondiente de referencia estaban presentes en el medio de medida. Las medidas descritas en los dos apartados siguientes (2.3.: estimación de la capacidad tampón para H^+ y K^+ del medio sin y con raíces preincubadas con NaCN, y 2.4.: medida de flujos de H^+ y K^+ por raíces “in vivo”) se realizaron, con fines comparativos, de dos maneras: a) conjunta y simultáneamente para H^+ y K^+ (estando presente simultáneamente en el medio de medida los 4 electrodos: 2 de medida -para H^+ y para K^+ - y los 2 correspondientes de referencia) y b) separadamente para H^+ y K^+ de manera que en este caso en el medio sólo estaban presentes los dos electrodos correspondientes a cada ión (el de medida y el de referencia). De esta forma, aparte de las repeticiones con fines estadísticos, cada una de las medidas se hacía 3 veces: una para H^+ sólo, otra para K^+ sólo y otra para H^+ y K^+ simultáneamente. Con ello se trataba de ver las posibles interferencias de unos electrodos sobre otros, con objeto de evaluar su importancia, y en su caso tenerla en cuenta en nuestras medidas simultáneas de flujos de H^+ y K^+ .

2.3.- CALIBRACIÓN DE LA CAPACIDAD TAMPÓN PARA H^+ Y K^+ DEL MEDIO DE MEDIDA SIN Y CON RAÍCES

La presencia de Hepes 1 mM hace que los medios estén debilmente tamponados; además, las paredes celulares también retienen cationes. Por esta razón se hicieron titulaciones para comprobar la capacidad de retención (capacidad tampón β) para H^+ y K^+ del medio sólo, y con las raíces, al objeto de poder corregir las medidas de los respectivos flujos por las raíces vivas, que de otra forma quedarían subestimados.

Como ya hemos indicado en el apartado 2.2., se hicieron titulaciones por separado para pH y para K^+ (con sólo los correspondientes electrodos de medida y referencia en la cámara de medida), y simultáneamente para ambos (con los cuatro electrodos en la cámara de medida), para detectar posibles interferencias siguiendo idéntico protocolo en los tres casos.

2.3.1.- Calibración de la capacidad tampón del medio base (Hepes 1 mM + $CaCl_2$ 1 mM)

Las titulaciones se realizaron tratando de reproducir lo más fielmente posible los cambios simultáneos en pH y $[K^+]$ observados en el medio durante una experiencia standard con raíces “in vivo”. En ella, se partía de un pH 6.5 y una $[K^+]$ de 2 mM, y la actividad de las raíces llevaba a un pH final de 4.8 y $[K^+]$ de 0.125 mM; a lo largo de la cinética, una determinada concentración de K^+ se correspondía con un determinado pH, con la posibilidad que hay que tener en cuenta en las titulaciones de una posible competición entre H^+ y K^+ por los lugares de retención de los mismos. Al no ser fácil de reproducir la disminución de K^+ en el medio, en las titulaciones se partió de las condiciones finales de la cinética, para llegar a las condiciones iniciales mediante la adición sucesiva de cantidades fijas de NaOH y KCl, ya que ni los electrodos ni el proceso de fijación muestran histéresis (Paredes, 1989, Espinosa, 1991). El protocolo era el siguiente:

- a) 50 ml de medio se estabilizaron a un pH de 4.8 y una concentración de KCl de 0.125 mM (medida en mV).
- b) Se adicionaban simultáneamente cantidades fijas de NaOH ($7\mu\text{l}$ de NaOH 100 mM, que equivalen a 700 nanomoles de OH^-) para calibrar el pH, y de KCl ($6.25\mu\text{l}$ de KCl 1 M, que equivalen a 6250 nanomoles de K^+) para calibrar $[K^+]$. Entre cada adición se dejaba el tiempo necesario para que el medio se estabilizase de nuevo.
- c) Se registraban los nuevos valores de pH y las variaciones de mV debido a la adición de NaOH y KCl respectivamente.
- d) Se repiten las adiciones sucesivamente hasta alcanzar las condiciones iniciales (pH 6.5 y $[K^+]$ 2 mM).
- e) Para cada punto de la calibración se calculaba la capacidad tampón (β) del medio, según las siguientes relaciones:

$$\text{Para } H^+: \quad \beta_{H^+} = \frac{\text{nmoles de NaOH añadidos}}{\Delta \text{pH}}$$

$$\text{Para } K^+: \beta K^+ = \frac{\text{nmoles de KCl añadidos}}{\Delta mV}$$

f) Los datos se ajustaban a la curva con mayor significación estadística mediante programa estadístico-gráfico en un ordenador Macintosh (véase apartado 1.3.)

2.3.2.- Calibración de la capacidad tampón del medio (Hepes 1 mM + CaCl₂ 1 mM) con raíces preincubadas en NaCN

Puesto que las paredes celulares tienen una considerable capacidad de retención de cationes, no es válido considerar como control de referencia la capacidad tampón del medio sólo, sino la del medio con raíces. Para ello es necesario anular el transporte de membrana de las células, pero manteniendo éstas intactas y las paredes en el estado más semejante posible al que existe cuando se realiza la medida "in vivo". El método más adecuado, comprobado en experiencias anteriores (Espinosa, 1991), era usar **raíces preincubadas en NaCN**, según el siguiente protocolo:

En cada experimento, las mismas raíces que habían sido utilizadas en las medidas, se ponían en 50 ml de medio fresco estéril: Hepes 1 mM + CaCl₂ 1 mM, pH 4.8, y se les sometía al siguiente tratamiento:

- Adición de 0.015 g de NaCN (concentración final en el medio 5mM), incubándose durante 3 horas.
- Lavado con abundante medio estéril.
- Mantenimiento durante media hora en medio fresco estéril.
- Lavado de nuevo con medio estéril.
- Finalmente, mantenimiento durante varias horas en medio fresco estéril, al objeto de eliminar todos los posibles restos de NaCN.

A continuación se pasaban las raíces "envenenadas" a la cámara de medida con 50 ml. de medio: Hepes 1 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 0.125 mM, pH 4,8 realizándose las calibraciones siguiendo idéntico protocolo al descrito para el medio sólo, en el apartado anterior.

A partir de los valores obtenidos se calculó la capacidad tampón βH^+ y βK^+ y se obtuvieron las correspondientes curvas, de la misma manera que se hizo con el medio sin raíces. Estos valores de βH^+ y βK^+ se utilizaron en el cálculo de la velocidad de eflujo neto de H^+ y de la velocidad de influjo neto de K^+ , respectivamente, en las correspondientes experiencias con raíces vivas.

2.4.- MEDIDA SIMULTÁNEA DE LA CINÉTICA DE EFLUJO NETO DE H⁺ Y DE INFLUJO NETO DE K⁺ POR RAÍCES “IN VIVO”

Como en el caso del apartado 2.3., las medidas de cinética de flujos iónicos con raíces vivas se realizaron simultáneamente para H⁺ y K⁺, con los 4 electrodos en la cámara de medida, y por separado para cada uno de los iones con sólo los 2 electrodos correspondientes en el medio de medida, siguiendo en los tres casos el siguiente protocolo:

Durante la preincubación de una hora a 4°C de las raíces de girasol, se preparó el vaso o cámara de medida, con 50 ml del medio estéril (Hepes 1 mM, CaCl₂ 1 mM) al que se adicionaban 100 µl de KCl 1 M, de manera que la concentración final de K⁺ era 2 mM; se estabilizaba a pH 6.5 y se termostataba a 30° C de temperatura, se agitaba mediante agitador magnético esterilizado con etanol de 96° y se aireaba mediante una pipeta Pasteur estéril, a través de filtro de bacterias. En el medio se incluían igualmente los correspondientes electrodos que se iban a utilizar en la medida.

A continuación se introducían las raíces en el vaso termostaticado, produciéndose una pequeña acidificación del pH del medio, que era corregida con NaOH (entre 20 y 30 nmoles/ml de medio), alcanzándose el equilibrio de nuevo a pH 6.5 ± 0.05 en no más de 10 minutos. En estas condiciones se medían los flujos iónicos (de H⁺, de K⁺ o simultáneamente ambos), registrando los cambios de pH y de concentración de K⁺ ininterrumpidamente durante al menos 7 horas (en ocasiones, cuando la experiencia lo requería, se alargaba hasta 9 horas).

A partir de las lecturas de pH y mV registrados en dicha cinética, y teniendo en cuenta los valores de βH⁺ y βK⁺ obtenidos en la titulación del medio con las raíces preincubadas en NaCN, tal como se describe en el apartado anterior, se calculaba la velocidad de eflujo neto de H⁺ (VH⁺) y de influjo neto de K⁺ (VK⁺), según las fórmulas:

$$V_{H^+} = \frac{h \cdot \beta_{H^+} \cdot (pH_o - pH_f)}{P \cdot D \cdot Des} \cdot v$$

$$V_{K^+} = \frac{h \cdot \beta_{K^+} \cdot (mV_o - mV_f)}{P \cdot D \cdot Des} \cdot v$$

Siendo:

h =La variación en mm. de la señal de pH (para H^+) o de mV (para K^+), frente al tiempo.

v =La velocidad del papel de registro.

P =El peso fresco de las raíces en g.

D =La distancia en mm de la señal pH_o a la señal pH_f (para H^+) o de mV_o a la mV_f (para K^+).

Des =El desplazamiento del papel en mm. durante el tiempo que se ha medido h

βH^+ y βK^+ =la capacidad tampón del medio más las paredes celulares para H^+ y K^+ respectivamente.

VH^+ y VK^+ se calculaban mediante las fórmulas indicadas con un ordenador Macintosh, utilizando un programa de hoja de cálculo, y tomando los respectivos valores de βH^+ y βK^+ en cada punto a partir de las ecuaciones matemáticas obtenidas con el programa gráfico-estadístico (ver apartado 1.3.).

Como método alternativo se hicieron medidas con el fotómetro de llama para comprobar si la concentración de K^+ coincidía con ambos métodos, para ello se tomaron muestras de medio de medida a diferentes tiempos de la cinética (que estaba siendo medida con los electrodos) y se midió la concentración de K^+ con dicho fotómetro de llama.

2.5.- MEDIDA SIMULTÁNEA DE LA CINÉTICA DE FLUJOS NETOS DE H^+ Y K^+ POR RAÍCES "IN VIVO" EN PRESENCIA DE DIFERENTES EFECTORES (ACTIVADORES E INHIBIDORES).

A partir de este momento, y una vez evaluadas las posibles interferencias entre electrodos, sólo se hicieron medidas simultáneas de ambos flujos iónicos, con los 4 electrodos en la cámara de medida.

2.5.1.- Preparación de los aditivos

Siempre que su solubilidad lo permitía, los aditivos se prepararon a la mayor concentración posible, para que al ser añadidos al medio de medida se hiciera en cantidades tan pequeñas que no tuvieran efecto significativo sobre el volumen; sin embargo, cuando era preciso añadir un volumen considerable, previamente se retiraba la misma cantidad de medio para evitar errores de dilución. Cuando estas adiciones provocaban cambios de pH, se procedía a su inmediato ajuste con NaOH o HCl 100 mM.

Se realizaron controles para comprobar el efecto del etanol, a las concentraciones usadas como disolvente de algunos aditivos, sobre los flujos iónicos por las raíces vivas. En todo caso, la concentración de etanol en el medio nunca superó el valor 100 μ M.

La preparación pormenorizada de cada aditivo fue como sigue:

- a) **Antibióticos** (Cloranfenicol, Penicilina sódica y Penicilina potásica): Se adicionó la correspondiente cantidad de sustancia directamente al medio de medida
- b) **Valinomicina**: Se preparó una solución de stock 10 mg de valinomicina en 4 ml de una mezcla de medio de medida y etanol de 96°. en una proporción 1:3, almacenándose a 4°C.
- c) **Ouabaina**: Se preparó una solución stock 10 mM en medio de medida. Se almacenó a temperatura ambiente y en oscuridad.
- d) **DCCD**: Se preparó una solución stock 100 mM en etanol 96°, almacenándose a 4°C.
- e) **Vanadato**: Este compuesto no debía prepararse a un pH inferior a 6.0 ni muy concentrado, porque si no podía formar complejos inactivos (Coan et al., 1986). La solución se preparó siguiendo las instrucciones de O'Neil y Spanswick (1984B), adaptadas a nuestras condiciones de medida. Así, se preparó una solución stock de ortovanadato sódico 5 mM en el medio de medida (pH 6.5) manteniéndose durante 3 horas a 38°C. Se corrige de nuevo el pH y se lleva a volumen final con medio de medida, almacenándose a 4°C.
- f) **Oligomicina**: Se preparó una solución stock de 5 mg de oligomicina en 4 ml de una mezcla de medio de medida y etanol de 96° en una proporción 1:3, almacenándose en congelador.
- g) **NADH**: Para prevenir su posible hidrólisis se pesaron 0.0106 g de sustancia y se adicionó directamente al medio de medida (concentración final en el medio 300 μ M).
- h) **HCF (II)**: Se adicionó la correspondiente cantidad de sustancia directamente al medio de medida.
- i) **cis-Pt (II)**: Se preparó una solución stock 5 mM en el medio de medida a 30°C con agitación durante 4 horas, almacenándose a 4°C.
- j) **HCF (III)**: Se adicionó la correspondiente cantidad de sustancia directamente al medio de medida.
- k) **HCl (IV)**: Se preparó una solución stock 100 mM en el medio de medida, almacenándose a temperatura ambiente.
- l) **Citocromo c**: Se adicionó la correspondiente cantidad de sustancia directamente al medio de medida

2.5.2.- Adición de los efectores a la cámara de medida donde se realiza la cinética

El momento en que se adicionaban al medio de medida con las raíces vivas los diferentes aditivos dependía de la rapidez de actuación de los mismos sobre los flujos iónicos. Así, los de actuación lenta se adicionaban al principio de la cinética para dar tiempo a que se

manifieste totalmente el efecto. Por el contrario, los que producían efectos rápidos se adicionaban cuando la cinética había alcanzado su velocidad máxima (pH 6.0):

Valinomicina, Ouabaina, DCCD y Oligomicina se añadían al medio cuando el pH alcanzado por las raíces era de 6.0.

En las experiencias con cis-Pt (II) se adicionaba NADH al inicio de la cinética (pH 6.5), y posteriormente el cis-Pt (II) cuando el pH había bajado a 6.0

Por razones que se detallan en el capítulo de Resultados, en presencia de HCl (IV) no se podía medir cinética de pH, solamente de K^+ . Por tanto, el efector se añadía al medio a las dos horas aproximadamente de haber añadido las raíces.

Antibióticos, Vanadato, NADH, HCF (II), HCF (III) y Citocromo c se adicionaban al medio de medida al inicio de la cinética, es decir a pH 6.5.

2.5.3.- Calibración de la capacidad tampón para H^+ y K^+ del medio con raíces preincubadas en NaCN en presencia de efectores

La adición de compuestos al medio de medida y las raíces pueden alterar la capacidad de retención de H^+ y K^+ de éstos. Por tal razón, después de cada experiencia con efectores se inactivaban las raíces por preincubación con NaCN y se procedía a la titulación de la capacidad tampón (βH^+ y βK^+) de las mismas, en medio fresco al que se adicionaban todas las sustancias empleadas en la correspondiente experiencia; es decir, tanto el efector utilizado como los disolventes empleados (p. ej., etanol de 96°), en idénticas concentraciones a las usadas en la cinética. Las curvas de βH^+ y βK^+ obtenidas de esta forma eran incluidas en los cálculos de las correspondientes velocidades de flujo en presencia del efector considerado.

2.5.4.- Expresión de los resultados de inhibición o activación de los flujos iónicos en presencia de los diferentes efectores

En primer lugar, se calculaba la velocidad de eflujo neto de H^+ (VH^+) e influjo neto de K^+ (VK^+) en presencia de cada efector, según las fórmulas descritas en el apartado 2.4., en las cuales se incluían los valores de βH^+ y βK^+ medidos en presencia del mismo efector, tal como se refiere más arriba. Además, para tener una idea relativa de los porcentajes de inhibición o estimulación de los flujos para cada efector, se procedía a calcular un nuevo parámetro: **Actividad Relativa de eflujo de H^+ y de influjo de K^+** ($\%AVH^+$ y $\%AVK^+$), o relación entre el valor de la velocidad de flujo neto (de H^+ o K^+)

obtenido a un determinado pH y/o tiempo en presencia del efector, y el valor del control (sin el efector) a ese mismo pH y/o tiempo, tomando este último como el 100% de Actividad.

2.6.- CONTROLES O “BLANCOS” DE CINÉTICA DE FLUJOS IÓNICOS, CON RAÍCES PREINCUBADAS EN NaCN

En las mismas condiciones utilizadas en cada uno de los experimentos de cinética de flujos iónicos descritos en los apartados 2.4 y 2.5., se realizaron controles o “blancos” de cinética de flujos iónicos. Para ello se usaron raíces preincubadas en NaCN, según se describe en el apartado 2.3., con las cuales se hacía una experiencia de cinética de flujos iónicos idéntica a la realizada con raíces vivas, y durante el mismo tiempo (7-9 h). Estos controles se repitieron siempre que se introducían cambios en las condiciones de medida, como por ejemplo en las experiencias con aditivos activadores e inhibidores.

La finalidad de estos controles era demostrar que los cambios del medio detectados por los electrodos durante una cinética con raíces vivas eran causados por la actividad de transporte de sus membranas, y no por cualquier otra interacción física o química en el medio o con las paredes celulares, las raíces preincubadas en NaCN, con sus sistemas de transporte inactivados, no deberían ser capaces de reproducir tales cambios.

2.7.- MEDIDAS DE LA ACTIVIDAD REDOX DE LAS RAÍCES

Una forma de medir la actividad redox que presentaban las raíces es adicionar aceptores artificiales de electrones que varían su longitud de onda máxima de absorbancia cuando aceptan electrones de los sistemas redox del plasmalema y se reducen. Según fuera más conveniente en cada caso, se medía la desaparición de la forma oxidada (o su aparición en el caso del HCF-II) a la correspondiente longitud de onda máxima (Rubinstein y Stern, 1990).

Por efecto de la agitación y el burbujeo de aire en la cámara de medida, se desprendían restos de las raíces que hacían aumentar progresivamente la turbidez del medio conforme avanza la cinética, y esto podía provocar un aumento de la absorbancia; para evitarlo, normalmente se realizaba una corrección midiendo a dos longitudes de onda: una donde el

aceptor (en su forma oxidada) presenta el máximo de absorbancia, longitud de onda que se corregía restándole la absorbancia a una segunda longitud de onda denominada “longitud de onda de compensación”, donde la absorbancia del compuesto era mínima, y sólo se medía la turbidez del medio (Lüthje y Böttger, 1989; Rubinstein y Stern, 1990).

Las longitudes de onda a las que se midió en cada caso fueron las siguientes:

HCF (II) y HCF (III): 415 menos 480 nm (Lüthje y Böttger, 1989); HCl (IV): 488 menos 700 nm (Lüthen y Böttger, 1988; Lüthje y Böttger, 1989); Citocromo c: 550 menos 600 nm (Askerlund y Larsson, 1991).

En todos los casos excepto en los dos últimos, los cambios de absorbancia se medían en el medio donde se estaba realizando una cinética de flujos iónicos con las raíces vivas, mientras se registraba simultáneamente la cinética, para comprobar el efecto de la adición de aceptores de electrones sobre los flujos de H^+ y K^+ .

La absorbancia se medía en el momento de añadir el aceptor, y a continuación cada 10 min. durante las siguientes 2 horas; a partir de ese momento, se medía cada 15 min. hasta el final de la cinética. En todas estas mediciones se tomaba una muestra de 1 ml del medio, que se devolvía al mismo una vez realizada la medida; para evitar la contaminación se filtraba dicha muestra por filtro de bacterias antes de ser devuelta a la cámara de medida.

2.8.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD SOD EXOCELULAR DE LAS RAÍCES

2.8.1.- Técnica utilizada

Para medir la actividad de la SOD se usó el ensayo de Beauchamp y Fridovich (1971) modificado por Giannopolitis y Ries (1977): La producción de radicales superóxido (O_2^-) tenía lugar por iluminación de una mezcla de reacción que contenía Riboflavina, Metionina y azul de Nitrotetrazolio (NBT); en estas condiciones, se producía la fotorreducción de la riboflavina por la metionina; la flavina reducida cedía electrones al oxígeno para producir radicales O_2^- , que a su vez reducían el NBT, coloreándose la mezcla por la formación de azul de formazato; la presencia de SOD inhibía dicha coloración, por su capacidad para secuestrar y destruir los radicales O_2^- .

La mezcla de reacción contenía la solución generadora de O_2^- , que estaba compuesta por 1.33×10^{-6} M de riboflavina, 13.32×10^{-3} M de metionina y 64.57×10^{-6} M de NBT en tampón carbonato sódico 50 mM (preparado a partir de carbonato monosódico y disódico) pH 10.2 y EDTA 0.1 mM. Tanto el tampón como la solución generadora de

O_2^- se estabilizaron a 30°C y se airearon abundantemente. La aparición de color se midió en espectrofotómetro a 560 nm. El volumen final de cada tubo era de 4.5 ml, de los cuales 4 ml eran de solución generadora de O_2^- y los 500 μ l restantes tampón carbonato sólo o con los distintos aditivos usados en cada caso. Para la medida se usaron tubos de ensayo de grosor y color uniforme que se colocaron en una gradilla circular (3 tubos para cada muestra y control), colocada en el centro del tubo fluorescente circular usado para estas medidas, tal como se describe en el Apartado 1.3. Todas las manipulaciones se realizaron en la oscuridad, excepto los periodos de iluminación necesarios para producir la reacción, que eran de 1 minuto. Como blanco se usó, en cada caso, tubos con idéntico contenido que la muestra que se iba a medir, pero mantenidos en todo momento en la oscuridad.

2.8.2.- Estimación de la actividad SOD exocelular

En primer lugar, se realizaron pruebas con SOD de Horseradish, a partir de una solución que contenía 0.20 mg/ml. A continuación se hicieron medidas con nuestras raíces estériles de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.), (6 raíces en cada tubo, aproximadamente 0.1 g). Al añadir las raíces aumentaba la turbidez del medio, lo que se corregía usando como blanco el mismo medio con las raíces mantenido en oscuridad, puesto que la muestra no se podía filtrar, ya que el filtro retenía el azul de formazato que es el compuesto que se mide espectrofotométricamente.

Con las raíces se realizaron pruebas para determinar cuál era la forma más correcta de estimar la actividad SOD exocelular. Se utilizaron raíces lavadas en tampón carbonato durante aproximadamente 30 minutos a 30° C con agitación, (96 raíces, aproximadamente 1.6 g, en 10 ml de medio de lavado -0.16 g/ml-) realizándose medidas de SOD tanto con estas raíces en medio nuevo (donde sólo habría actividad SOD exocelular insoluble), como con el medio de lavado de las mismas (donde se mediría la actividad SOD endocelular soluble, procedente del interior de las células rotas por el corte de las raíces y exocelular soluble); en este último caso se pusieron en cada tubo 200 μ l de medio.

2.8.3.- Cálculo de la Actividad enzimática

Para calcular la actividad SOD se tomaba como referencia la inhibición de la reducción del NBT calculada de la siguiente forma: Absorbancia (a 560 nm) obtenida por la prueba control, sin SOD ni raíces en el medio (media de tres tubos en cada experimento), menos la Absorbancia (media también de tres tubos) del caso problema, aquel en el cual se mide la actividad SOD, dividido por la Absorbancia control:

$$\%I = \frac{A. \text{ control} - A. \text{ problema}}{A. \text{ control}} \times 100$$

Puesto que 1 Unidad de SOD se definía como la cantidad de enzima requerida para provocar una inhibición de la reducción del NBT del 50% (McCord y Fridovich, 1969), para pasar estas medidas a Unidades de SOD por mg, en el caso de la SOD de Horseradish.

$$U \text{ SOD/mg} = \frac{\% \text{ Inhibición}}{50 \cdot \text{mg. añadidos}}$$

Los mg añadidos son 0.02 puesto que se añadían 100 μl de la solución 0.2 mg/ml. Así, 50 x 0.02 es 1, con lo cual el valor de la U SOD/mg coincide con el % de Inh.

En el caso del medio de lavado, los resultados se expresan en Unidades de SOD/g de raíz (correspondiente a 1 g de peso fresco de raíz).

$$U \text{ SOD/ml} = \frac{\% \text{ Inhibición}}{50 \cdot \text{g de raíz}}$$

Los g de raíz son 0.032 puesto que se añadían 200 μl de la solución 0.16 g/ml.

Los resultados con raíces se expresaban en Unidades de SOD por g de peso fresco de raíz, calculándose según la fórmula:

$$U \text{ SOD/g P. fresco raíz} = \frac{\% \text{ Inhibición}}{50 \cdot \text{peso en g de raíz}}$$

En estas experiencias el peso de las 6 raíces depositadas en cada tubo era de aproximadamente 0.1 g, exactamente pesados en cada caso por diferencia entre el tubo con una pequeña cantidad de medio solo y el mismo con las raíces.

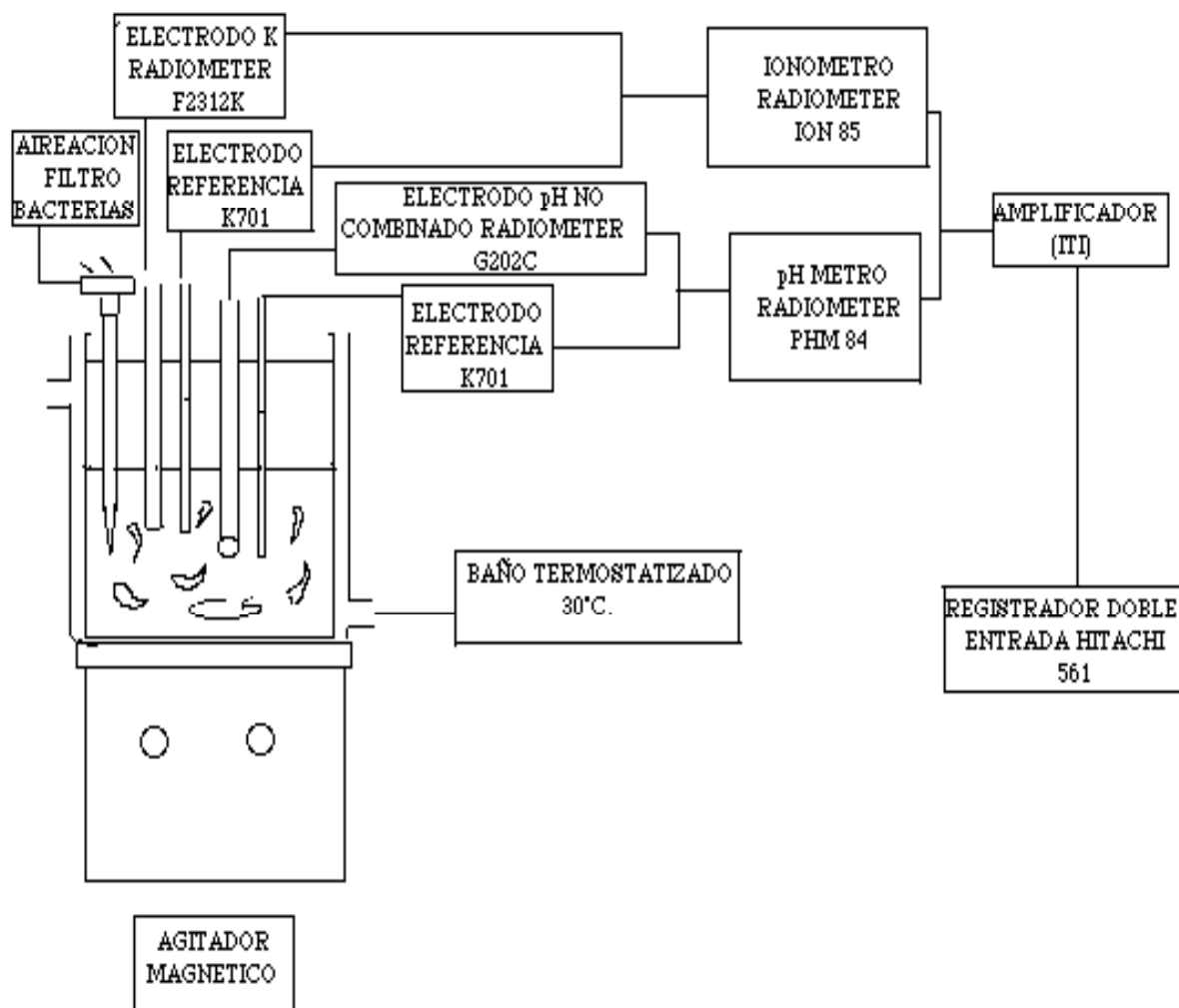
2.8.4.- Medida de la Actividad SOD exocelular en presencia de efectores

La Actividad SOD de Horseradish, la de las raíces lavadas (actividad SOD exocelular de las raíces) y la del medio de lavado (actividad endocelular de las células rotas por el corte de las raíces y exocelular soluble) se midieron en presencia de los siguientes efectores, utilizados en las medidas de flujos iónicos:

- NaCN (1 mM concentración final en el medio de medida)
- cis-Pt (500 μM concentración final en el medio de medida)

- NADH (300 μ M concentración final en el medio de medida)
- DCCD (100 μ M concentración final en el medio de medida)
- Vanadato (500 μ M concentración final en el medio de medida)

En todos los casos se incluían los correspondientes blancos, con los mismos componentes del medio pero sin iluminación, para corregir las posibles interferencias de los efectores con los demás compuestos del medio. Así mismo, siempre que se estudia el efecto de cada uno de estos aditivos sobre la actividad SOD, en la gradilla donde se sitúan los distintos tubos hay uno denominados "control" que no tienen ni SOD, ni raíces, ni "medio de lavado" y otros con SOD, raíces o "medio de lavado" (según corresponda) sin ningún otro aditivo que sirven para medir, en cada caso la inhibición de la reducción del NBT (comparada con el "control") y comprobar si existe alguna diferencia con la inhibición que causa la SOD, raíces o "medio de lavado" solamente.



Esquema VI.- Esquema del sistema empleado en la medida de flujos iónicos por las raíces de girasol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- CALIBRACIONES REALIZADAS CON EL ELECTRODO SELECTIVO DE K^+

Puesto que el electrodo de pH Radiometer usado en estas experiencias ha sido repetidamente usado y calibrado en experiencias anteriores de nuestro laboratorio, en este trabajo se describen las calibraciones y controles realizados para el electrodo selectivo de K^+ , que se usaba por primera vez en la realización de la presente memoria.

1.1.- CONTROL DEL FUNCIONAMIENTO DEL ELECTRODO

El electrodo selectivo de K^+ (Radiometer F2312K) nos muestra los cambios en la concentración externa de K^+ mediante cambios de voltaje (mV). Antes de iniciar las medidas procedemos a la realización de controles de funcionamiento de dicho electrodo selectivo, midiendo la diferencia de voltaje (mV) que existe entre las medidas de dos soluciones con diferente concentración de K^+ , 10 mM y 1 mM (Sarro et al., 1984). Según el manual de instrucciones del electrodo, esta diferencia ha de ser igual o mayor de 54 mV si el electrodo está en un buen estado de uso, mientras que si es menor, es necesario el cambio de la membrana del mismo. Realizados estos controles obtuvimos un valor de $60.54 \text{ mV} \pm 1.9$, ($n=8$ experimentos independientes $\pm SD$) que se encuentra en la zona de **óptimo funcionamiento**. Estos controles de funcionamiento fueron contrastados periódicamente cada 15 días, (mayor frecuencia que la indicada en el manual de funcionamiento -30 días-), sin que se encontraran cambios significativos en el valor obtenido, durante el tiempo que duraron las experiencias.

1.2.- COMPROBACIÓN DE LA AUSENCIA DE HISTÉRESIS EN LA RESPUESTA DEL ELECTRODO SELECTIVO DE K^+

El manual de instrucciones del electrodo selectivo de K^+ describe que los casos de histéresis del mismo son raros. Sin embargo, para tener mayor seguridad en la medida, realizamos diferentes mediciones para comprobar si el electrodo presenta o no histéresis.

Se considera que el electrodo carece de histéresis si la medida en mV para cada concentración de K^+ es idéntica, tanto si se realizan las medidas en sentido creciente como decreciente de concentraciones de KCl (desde 0.01 a 100 mM y viceversa, vease Materiales y Métodos).

En la **Fig. 1** mostramos los resultados de estas medidas. Puesto que al aumentar la concentración de K^+ se produce un aumento exponencial del voltaje, hemos representado el voltaje frente al logaritmo de la concentración de KCl. Hemos realizado el ajuste de

diferentes ecuaciones matemáticas a los valores obtenidos, consiguiéndose la mejor correlación con un polinomio de primer grado o línea recta ($R > 0.99$), confirmándose que la relación entre ambas magnitudes es de las llamadas "logarítmicas". El ajuste se ha realizado a dos rectas, una para los valores obtenidos en sentido creciente de concentraciones de K^+ y otra para los de sentido decreciente, junto con una tercera incluyendo todos los valores obtenidos en ambos sentidos. Las tres rectas eran prácticamente coincidentes, mostrando, además, coeficientes de correlación (R) semejantes y mayores de 0.99 en todos los casos. Esta coincidencia en los valores experimentales obtenidos muestra la ausencia de fenómenos de histéresis del electrodo selectivo de K^+ , lo que asegura la correcta medida de los cambios en el tiempo de la concentración de K^+ del medio de medida, tanto si se deben a la absorción como a la extrusión de K^+ por las raíces.

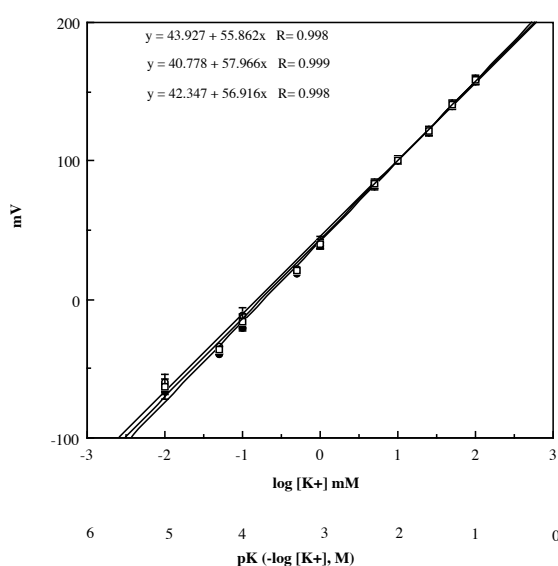


Fig. 1: Histéresis del electrodo de K^+ : Variación del voltaje incrementando (\circ) y decreciendo (\bullet) la concentración de KCl. Los datos son media de, al menos cuatro repeticiones \pm SD. Se incluyen las ecuaciones ajustadas a los datos experimentales, con el correspondiente coeficiente de correlación (R) para ambas rectas, junto con una tercera ajustada a todos los puntos (\square). También se incluye la escala de pK ($-\log [K^+]$, M), similar a pH.

1.3.- CURVAS DE CALIBRACIÓN DEL ELECTRODO DE K^+ EN LOS MEDIOS DE MEDIDA UTILIZADOS EN LAS EXPERIENCIAS

Por las razones que expondremos más adelante, en las medidas de los flujos simultáneos de H^+ y K^+ llevados a cabo por las raíces "in vivo" de girasol, utilizaremos un medio ligeramente tamponado con Hepes 1 mM; por ello es necesario estudiar el comportamiento del electrodo de K^+ en este medio tamponado y en el intervalo de variación del pH observado durante las experiencias, en las que la actividad de las raíces

cambia el pH de 6.6 a 4.8. Por este motivo se realizaron curvas de calibración del electrodo (mV frente a $[K^+]$) a diferentes valores de pH.

1.3.1.- Curvas de calibración del electrodo de K^+ en Hepes 1 mM

Las curvas de calibración del electrodo las hemos realizado para diferentes concentraciones de KCl (0.50; 0.75; 1; 1.25; 1.50; 1.75 y 2 mM). Cada una de estas concentraciones se preparó independientemente a ocho diferentes valores de pH (4.8; 5.0; 5.2; 5.5; 5.8; 6.0; 6.2 y 6.5), midiendo el voltaje según la metodología descrita en Materiales y Métodos. El proceso completo se repitió cuatro veces, de manera que se obtuvieron cuatro valores independientes para cada pH y $[K^+]$. En la **Fig. 2** se observan los resultados ajustados a distintas rectas, una para cada pH utilizado, mostrando ligeras diferencias entre ellas: para una misma $[K^+]$, el voltaje se incrementa ligeramente con el pH. En todos los casos el ajuste de dichas rectas muestra una alta significación, como indica el elevado coeficiente de correlación (próximo a la unidad en todos los casos, $R \geq 0.996$), lo que significa que, en el intervalo de concentraciones de K^+ utilizado (0.5 a 2 mM), existe siempre una relación lineal entre el $\log [K^+]$ en el medio y los mV medidos.

Para observar mejor el efecto que la variación de pH tiene sobre la medida del voltaje obtenida para una misma concentración de K^+ , representamos el voltaje frente al pH para las distintas concentraciones de K^+ (**Fig 3**), comprobándose que, en general, el aumento del voltaje con el pH nunca llega a ser superior al 20% entre el valor inicial, al pH más bajo, y el valor final, al más alto, para cualquiera de las concentraciones de K^+ medidas. Ello parece indicar que el estado del tampón (Hepes 1 mM) para cada pH afecta, aunque levemente, la concentración de iones K^+ libres en el medio, y por tanto las medidas de mV correspondientes.

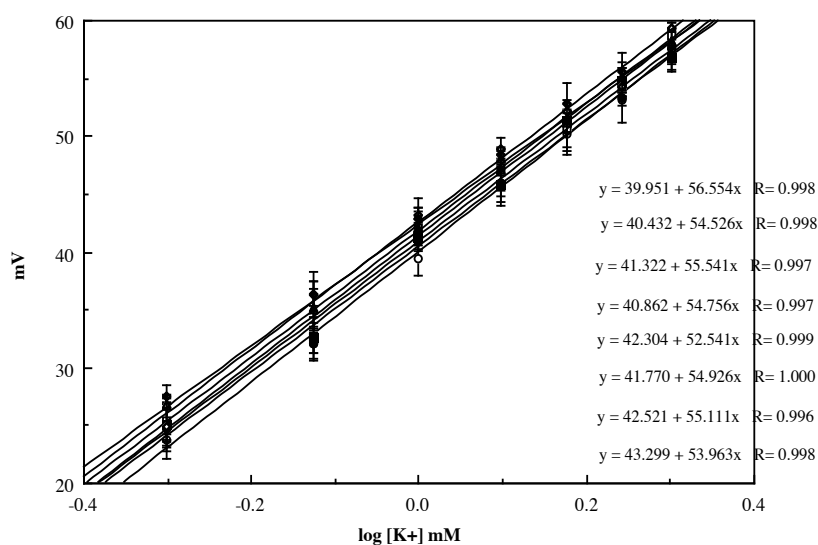


Fig. 2: Curvas de calibración del electrodo de K^+ en Hepes 1 mM: Relación entre la concentración de K^+ y el voltaje a diferentes pH: 4.8 (○); 5.0 (●); 5.2 (□); 5.5 (■); 5.8 (△); 6.0 (▲); 6.3 (◇) y 6.5 (◆). Los valores son media de, al menos, cuatro repeticiones independientes \pm SD. Se incluyen también las ecuaciones y sus coeficientes de correlación (R) en cada caso.

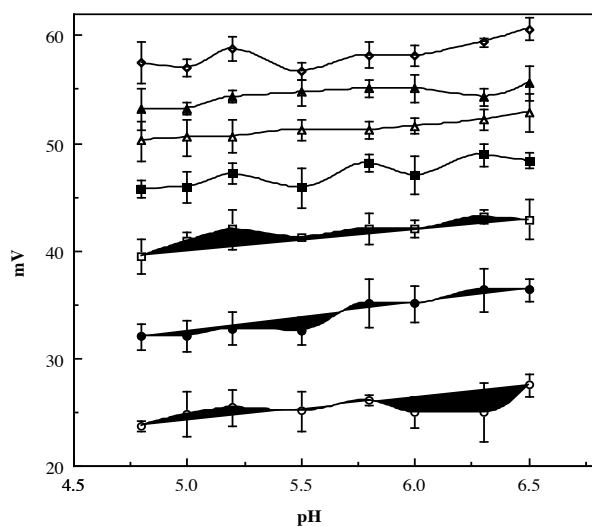


Fig 3. Relación entre la variación del pH y los valores en mV para cada concentración de K^+ . Los valores representados son los mismos de la Fig. 2 para las distintas concentraciones de K^+ : 0.50 (○); 0.75 (●); 1 (□); 1.25 (■); 1.50 (△); 1.75 (▲) y 2 mM (◇).

1.3.2.- Curvas de calibración del electrodo de K^+ en Hepes 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM

El medio base utilizado en todas las experiencias con raíces era Hepes 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM. Los iones Ca^{2+} han de estar siempre presentes en el medio de medida de cultivo y de los flujos de H^+ y K^+ por las raíces, ya que son necesarios para el buen funcionamiento de las membranas y sus transportadores; por ello hemos realizado las correspondientes calibraciones de dicho medio de medida, siguiendo igual metodología que la descrita en el apartado anterior para el Hepes 1 mM solamente.

Como puede observarse en la **Fig 4**, la relación entre el logaritmo de la concentración de K^+ y el voltaje es igual que la del medio sin $CaCl_2$ descrita en el apartado anterior, obteniéndose distintas rectas para cada pH, con un alto coeficiente de correlación (cercano a 1); pero en este caso el electrodo se muestra insensible al pH, como lo prueba el hecho de que las rectas para los distintos pH se solapan dentro de las barras de desviación de los valores medios representados, y todas ellas muestran el mismo coeficiente de correlación que una recta única ajustada a todos los puntos, de todos los pH (*, $R=0.999$). La representación del voltaje frente al pH para cada concentración de K^+ (**Fig 5**), pone igualmente de manifiesto lo dicho anteriormente: que el pH no afecta las medidas de concentración de K^+ realizadas en este medio con el electrodo selectivo de K^+ .

De acuerdo con estos resultados podemos concluir que en el medio base normalmente utilizado en nuestras experiencias (Hepes 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM) el aumento de la concentración de KCl provoca un aumento del valor en mV del electrodo que es independiente del valor de pH del medio, en el intervalo de variación de pH (4.8 a 6.5) en el que se realizan las experiencias con raíces.

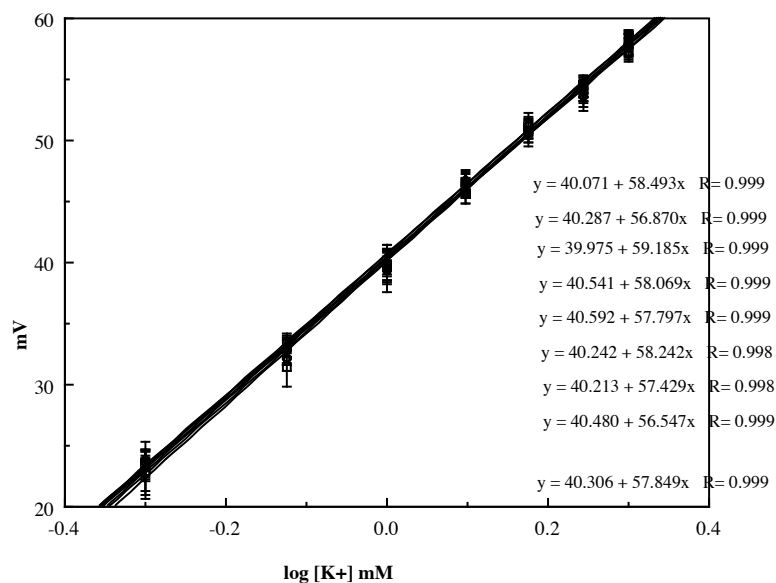


Fig. 4: Curvas de calibración del electrodo de K⁺ en Hepes 1 mM, CaCl₂ 1 mM: Relación entre la concentración de K⁺ y el voltaje a diferentes pH: 4.8 (○); 5.0 (●); 5.2 (□); 5.5 (■); 5.8 (△); 6.0 (▲); 6.3 (◇) y 6.5 (◆). Los valores son media de, al menos, cuatro repeticiones independientes ±SD. Se incluyen las ecuaciones y sus coeficientes de correlación (R) en cada caso, además de la ecuación correspondiente a todos los puntos (*).

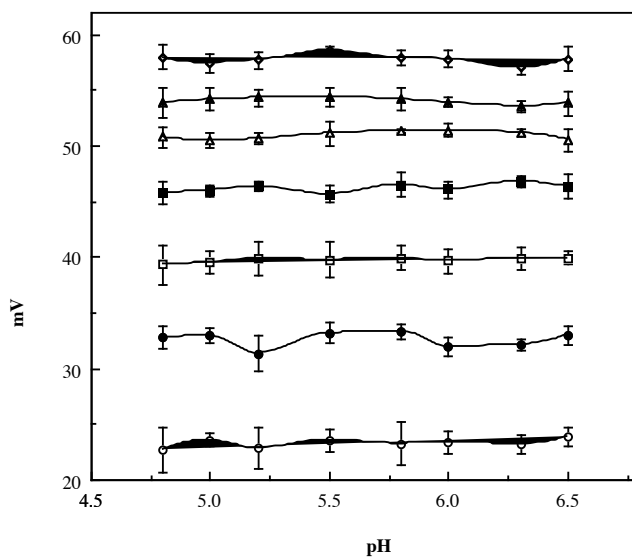


Fig 5: Relación entre la variación del pH y los valores en mV para cada concentración de K⁺. Los valores representados son los mismos de la Fig. 4 para las distintas concentraciones de K⁺: 0.50 (○); 0.75 (●); 1 (□); 1.25 (■); 1.50 (△); 1.75 (▲) y 2 mM (◇).

2.- CAPACIDAD TAMPÓN PARA H⁺ Y K⁺ DEL MEDIO SIN Y CON RAÍCES

2.1. CAPACIDAD TAMPÓN (β) DEL MEDIO HEPES 1 mM, CaCl₂ 1 mM. COMPROBACIÓN DE LA EXISTENCIA O NO DE INTERFERENCIAS ENTRE ELECTRODOS

En todas las experiencias realizadas utilizamos siempre un medio tamponado con Hepes 1 mM. La tamponación con Hepes se realiza para evitar los pequeños cambios de pH provocados por la disolución en el medio del CO₂ atmosférico procedente de la aireación y del CO₂ de la respiración de las raíces, a lo que coadyuva una activa aireación y agitación del medio para asegurar un rápido equilibrio de la solución con el aire. 1 mM Hepes tampona ligeramente el medio en el intervalo de pH en el que realizamos las medidas (de 6.5 a 4.8). Sin embargo, la capacidad tampón del Hepes del medio no es constante en todo el intervalo, de modo que es necesario evaluar la capacidad tampón de dicho medio tanto para el pH (β_{H^+}) como para la concentración de K⁺ (β_{K^+}), ya que tanto el eflujo neto de H⁺ como el influjo neto de K⁺ llevados a cabo por las raíces serían infravalorados si se calcularan directamente de los cambios de pH o [K⁺] del medio, sin tener en cuenta la posible retención de cationes por los componentes del mismo. Las titulaciones se realizaron mediante adiciones sucesivas de NaOH junto con KCl, intentando reproducir los cambios simultáneos de pH y concentración de K⁺ del medio que se observan durante la medida de una cinética de flujos por raíces "in vivo", donde cierta concentración de K⁺ coincide en el tiempo con un cierto pH, de manera que sea tenida en cuenta la posibilidad de que ambos cationes compitan por los lugares de enlace del tampón. Sin embargo, puesto que la bajada de [K⁺] del medio por la absorción de las raíces no podía ser reproducida fácilmente, y dado que los electrodos no muestran histéresis, las titulaciones se hicieron en las condiciones inversas a las de la cinética "in vivo": incrementando la concentración de K⁺ (por adición de K⁺) y simultáneamente alcalinizando el medio (por adición de OH⁻). La forma de realizar la calibración simultánea se detalla en el capítulo correspondiente de Materiales y Métodos: adiciones sucesivas de 700 nmol de OH⁻ junto con 6250 nmol de K⁺.

Para medir de forma simultánea los flujos de H⁺ y K⁺ por las raíces, en la vasija de medida han de estar los cuatro electrodos necesarios (de pH y K⁺, con sus respectivos de referencia). Por ello se hizo necesario comprobar si existían interferencias entre los cuatro electrodos, para lo cual realizamos medidas, con cada pareja de electrodos por separado (el de pH, o el de K⁺, con su electrodo de referencia respectivo) y con los cuatro electrodos en el medio, aunque la titulación se llevó a cabo siguiendo la misma metodología (adición simultánea de OH⁻ y K⁺).

2.1.1.- Capacidad tampón del medio para H^+ (βH^+)

En la **Fig 6** representamos las titulaciones "tipo" para el pH del medio, realizadas sólo en presencia del electrodo de pH y su correspondiente de referencia y con los electrodos de pH, de K^+ y sus respectivos de referencia. En este último caso se registraba simultáneamente la titulación del medio para el K^+ , que se muestra en la **Fig 8**. En ambos casos observamos que la variación de pH no es constante para cada adición de 700 nmol de OH^- , lo que indica que la capacidad tampón del medio va variando con el pH. Paralelamente realizamos un control del medio, manteniéndolo en las mismas condiciones de agitación y aireación, a pH 6.5 sin adición de OH^- , no observándose variaciones de pH del medio durante el tiempo que duraron las titulaciones.

Realizada las titulaciones para el pH del medio, calculamos su capacidad tampón (βH^+) para los diferentes valores de pH, de la forma descrita en Materiales y Métodos (βH^+ , nmol de OH^- añadidos / ΔpH medido por el electrodo).

Cuando representamos βH^+ frente a pH (**Fig 7**) obtenemos en ambos casos, y para el intervalo de pH estudiado (6.5 a 4.6), una curva que se ajusta a un polinomio de segundo grado con un alto coeficiente de correlación. Fuera de este intervalo de pH, la capacidad tampón del Hepes 1 mM era demasiado fuerte para que los cambios de pH del medio provocados por la adición de OH^- pudieran ser fácilmente detectados, de manera que estos son los límites de pH en nuestras medidas; sin embargo, éste es el intervalo de pH de máxima actividad extrusora de H^+ de las raíces de girasol descrita en la bibliografía, aunque para microsomas aislados de estas raíces se han descrito apreciables velocidades de extrusión de H^+ hasta pH 7.0 (O'Neill y Spanswick, 1984A).

Como puede comprobarse en la **Fig 7**, βH^+ muestra, prácticamente, la misma variación cuando la medida se realiza con la pareja de electrodos para pH y cuando se realiza de forma simultánea, con las dos parejas de electrodos de pH y K^+ presentes en el medio. Ello se demuestra por la práctica coincidencia de ambas curvas entre sí y con una tercera, procedente del ajuste de todos los datos anteriores al correspondiente polinomio de segundo grado, que muestra un alto coeficiente de correlación ($R=0.985$), semejante al de las otras dos curvas.

Así pues, teniendo en cuenta estos resultados, podemos concluir que **entre los electrodos usados no se producen interferencias detectables** en cuanto a la capacidad tampón para el pH del medio base utilizado, y para el intervalo de cambio de pH observado en nuestras experiencias.

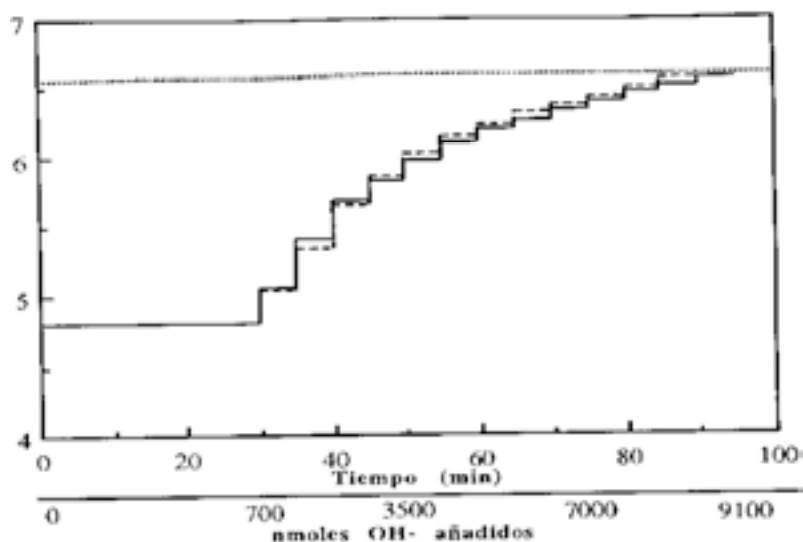


Fig. 6. Titulaciones "tipo" para el pH del medio base (50 ml Hepes 1 mM, CaCl_2 1 mM), realizadas con el electrodo de pH y su electrodo de referencia (trazo continuo) o con los cuatro electrodos (de pH, de K^+ y sus correspondientes de referencia, trazo discontinuo), mediante sucesivas adiciones de 700 nmol de OH^- junto con 6250 nmol de K^+ . En línea de puntos está representado el control, cuyo pH (≈ 6.5) no varía durante el tiempo que dura la titulación. (los datos de K^+ , correspondientes a las titulaciones medidas simultáneamente con los cuatro electrodos, se muestran en la Fig 8).

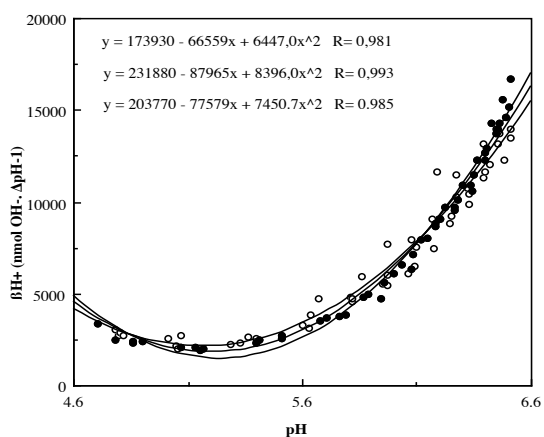


Fig. 7: Capacidad tampón para H^+ (BH^+ , calculada de las titulaciones mostradas en la Fig 6) del medio base (50 ml Hepes 1 mM, CaCl_2 1 mM), realizadas con el electrodo de pH y el correspondiente de referencia (○) o con los cuatro electrodos (de pH, de K^+ y los correspondientes de referencia -●-). Los valores representados corresponden a los datos directos procedentes de 4 experimentos independientes en cada caso, ajustados a sendos polinomios de segundo grado, junto con una tercera curva (·) ajustada a todos los puntos. En la parte superior se encuentran las ecuaciones de las tres curvas, con sus respectivos coeficientes de correlación (R). (Los datos de BK^+ , correspondientes a las titulaciones medidas simultáneamente con los cuatro electrodos, se muestran en la Fig 9).

2.1.2.- Capacidad tampón del medio para los iones K^+ (βK^+)

La **Fig 8** muestra las titulaciones "tipo" para el K^+ , que realizamos con sólo la pareja de electrodos para el K^+ y con los cuatro electrodos (de K^+ , de pH y sus respectivos de referencia). En este último caso se registraba simultáneamente la titulación del medio para el pH que se muestra en la **Fig 6**. Como ya hemos indicado en el Apto. 1.3.1. de este Capítulo, al aumentar la concentración de K^+ en el medio el voltaje medido aumenta de forma exponencial logarítmica. En la figura también se representan los valores obtenidos en el experimento control, realizado midiendo la variación en mV del medio de medida mantenido en las mismas condiciones de agitación y aireación que las muestras, pero con una concentración constante de 2 mM de K^+ , y que, como podemos observar, no sufre variación alguna.

En la **Fig 9** se representa la capacidad tampón (βK^+), calculada de la forma descrita en el Capítulo de Materiales y Métodos ($\text{nmol de } K^+ / \Delta mV$), frente al pK ($-\log [K^+] \text{ M}$), para que sea similar al pH y así la **Fig 9** sea comparable con la **Fig 7**). La relación $\beta K^+ / pK$ se ajusta también a un polinomio de segundo grado, aunque para nuestro intervalo de pK es una semiparábola, tanto si la titulación se ha realizado sólo con el electrodo de K^+ y su correspondiente de referencia en el medio, como con los cuatro electrodos (de K^+ , pH y sus correspondientes de referencia), obteniéndose en todos los casos un elevado coeficiente de correlación ($R=0.980$ y $R=0.987$ respectivamente). Como en el caso de βH^+ , ambas curvas son prácticamente coincidentes, entre sí y con una tercera ajustada a todos los valores de βK^+ , la cual presenta un coeficiente de correlación igualmente elevado ($R=0.983$), y muy semejante al de las curvas anteriores.

De acuerdo con estos resultados podemos concluir que los **electrodos de pH y K^+** , con sus electrodos de referencia respectivos, **no interfieren entre sí** en la medida de la capacidad tampón del medio, ya sea para los iones H^+ (βH^+) o K^+ (βK^+).

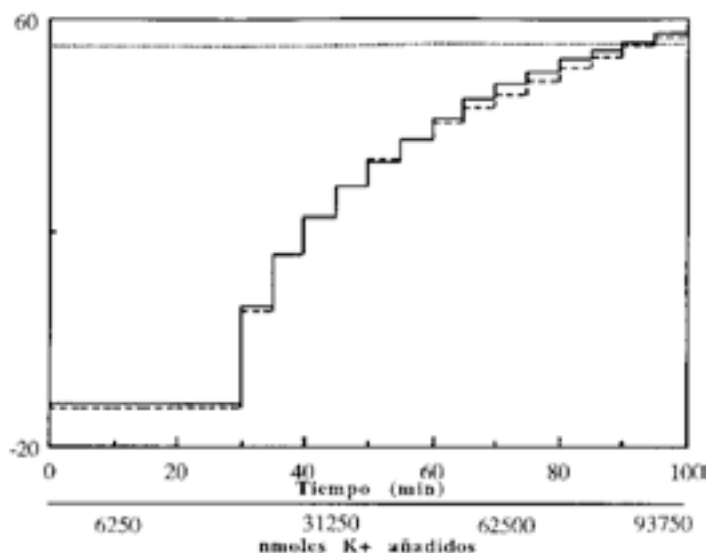


Fig. 8. Titulaciones "tipo" para el K^+ del medio base (50 ml Hepes 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM), realizadas con el electrodo de K^+ y su electrodo de referencia (trazo continuo) o con los cuatro electrodos (de K^+ , de pH y sus correspondientes de referencia, trazo discontinuo), mediante sucesivas adiciones de 6250 nmol de K^+ junto con 700 nmol de OH^- . En línea de puntos está representado el control, cuya $[K^+]$ (≈ 2 mM) no varía durante el tiempo que dura la titulación. (los datos de pH, correspondientes a las titulaciones medidas simultáneamente con los cuatro electrodos, se muestran en la Fig 6).

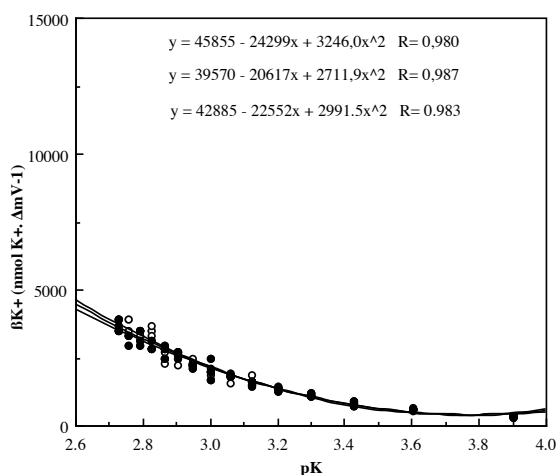


Fig. 9: Capacidad tampón para K^+ (βK^+ , calculada de las titulaciones mostradas en la Fig 8) del medio base (50 ml Hepes 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM), realizadas con el electrodo de K^+ y el correspondiente de referencia (○) o con los cuatro electrodos (de K^+ , de pH y los correspondientes de referencia -●-). Los valores representados corresponden a los datos directos procedentes de 4 experimentos independientes en cada caso, ajustados a sendos polinomios de segundo grado, junto con una tercera curva (·) ajustada a todos los puntos. En la parte superior se encuentran las ecuaciones de las tres curvas, con sus respectivos coeficientes de correlación (R). (Los datos de βH^+ , correspondientes a las titulaciones medidas simultáneamente con los cuatro electrodos, se muestran en la Fig 7).

2.2.- EFECTO DE LAS RAÍCES SOBRE LA CAPACIDAD TAMPÓN DEL MEDIO. COMPROBACIÓN DE LA EXISTENCIA O NO DE INTERFERENCIAS ENTRE ELECTRODOS

La presencia de raíces en el medio de medida puede modificar la capacidad tampón del mismo, debido a la capacidad de retención de cationes de los componentes de sus paredes celulares, muchos de los cuales están cargados negativamente y por tanto poseen una capacidad adicional para fijar H^+ y K^+ , variable además con el pH. Por ello, para calcular correctamente la actividad de las raíces en el eflujo de H^+ e influjo de K^+ es necesario medir la capacidad tampón del medio de medida con dichas raíces, en el intervalo de variación de pH y pK observados en las experiencias con raíces "in vivo". Durante las titulaciones es necesario anular el transporte de membrana de las células, ya que en caso contrario la actividad de las raíces cambiaría pH y pK entre dos adiciones sucesivas, haciendo imposible la titulación. Además se deben mantener intactas las paredes celulares y en el estado más semejante posible al que presentan en las raíces "in vivo", ya que βH^+ y βK^+ se incluyen en el cálculo de velocidad de flujos de H^+ y K^+ por las raíces. Este problema ha sido resuelto en trabajos anteriores en nuestro laboratorio (Espinosa, 1991) preincubando las raíces en NaCN 5 mM, según el protocolo descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. El cianuro bloquea tanto los sistemas de extrusión de H^+ como los canales de K^+ , manteniendo la integridad de las membranas (Blatt, 1988), sin cambiar aparentemente la capacidad tampón de las paredes celulares.

Por todo lo anterior, las titulaciones de la capacidad tampón del medio se llevaron a cabo con raíces preincubadas en NaCN, tanto para el pH como para el K^+ , realizándose pruebas semejantes a las descritas en el apartado anterior para el medio sin raíces, con objeto de comprobar si se producen interferencias entre los electrodos cuando en el medio hay raíces: a) sólo con la pareja de electrodos para el pH (βH^+); b) sólo con la pareja de electrodos para el K^+ (βK^+) y c) con los electrodos de pH y K^+ , junto a los respectivos de referencia (βH^+ y βK^+ simultáneamente).

2.2.1. Capacidad tampón para H^+ (βH^+) del medio con raíces

En la **Fig 10** se muestran sendas titulaciones "tipo" para pH (desde un pH inicial de 4.8 hasta un pH final de 6.5) de 50 ml de medio base con 175 raíces preincubadas en NaCN, siguiendo la metodología repetidamente referida en Aptsdos. anteriores, con sólo el electrodo de pH y su electrodo de referencia y con los electrodos de pH, K^+ y sus respectivos de referencia, observándose pequeñas pero claras diferencias entre ambas titulaciones, que comentaremos al hablar de βH^+ . En ambos casos realizamos controles con raíces preincubadas en NaCN, mantenidas a pH constante (6.5), y por lo demás en idénticas condiciones que las raíces con las que se realizaron las titulaciones. Se observa que no se produce acidificación del medio, manteniéndose el pH estable con pequeñas

oscilaciones durante todo el tiempo que se emplea en las titulaciones. Ello demuestra que las raíces no extruyen H^+ al medio, debido al bloqueo por el NaCN de sus sistemas de extrusión.

A partir de los resultados de las titulaciones, calculamos la capacidad tampón para H^+ (βH^+) del medio con las raíces preincubadas en NaCN, representándola frente al pH (**Fig 11**) y obteniendo, como en el caso del medio sin raíces, curvas que se ajustan a un polinomio de segundo grado, con alto coeficiente de correlación (0.923 y 0.979, para dos y cuatro electrodos respectivamente). Comparando ambas curvas de tamponación de pH observamos **diferencias pequeñas pero apreciables**, sobre todo para los **pH intermedios** (5.3-6.4), en el sentido de que βH^+ es débil pero significativamente mayor cuando se mide en presencia de los cuatro electrodos que cuando sólo los de pH están presentes. Este resultado ha de ser atribuido a interferencias entre las raíces y los cuatro electrodos, ya que nunca se observan en el medio sin raíces. Quizás las conocidas interferencias entre algunos electrodos y los ápices de las raíces descritas por Tanada (efecto "Tanada") y atribuidas por él al potencial de membrana, que hace que los ápices radiculares cargados sean atraídos y descargados en la membrana de los electrodos, podrían ser la causa de esta respuesta.

Como podemos observar en la **Fig 12**, las raíces preincubadas en NaCN provocan un aumento de la capacidad tampón del medio para H^+ (βH^+) con respecto al medio solo; en la figura se representan los datos con cuatro electrodos, que son las condiciones de medida que vamos a utilizar en las experiencias "in vivo". Estos resultados corroboran la predicción de que las paredes celulares de las raíces, cargadas negativamente, muestran una capacidad adicional a la del tampón para fijar H^+ , y que ésta es variable con el pH, mostrando por tanto las propias raíces propiedades semejantes a las de un tampón.

Todos estos resultados, que muestran diferencias, aunque pequeñas, en la capacidad tampón para H^+ (βH^+) por diferentes causas, nos dejó claro que βH^+ debe ser medido en cada experiencia con raíces "in vivo", utilizando raíces preincubadas en NaCN bajo idénticas condiciones, ya que las ecuaciones de βH^+ se utilizan para calcular la velocidad de eflujo neto de H^+ por las raíces "in vivo" en las distintas condiciones experimentales.

Nuestras curvas de tamponación del medio con raíces son similares a las obtenidas por el equipo de del Valle-Tascón (Salguero, 1989; Gonzalez-Darós et al., 1993), que usan una metodología similar para determinar βH^+ en coleoptilos de maíz, así como a las obtenidas en nuestro laboratorio con las mismas raíces, usando un electrodo combinado de pH (Espinosa, 1991).

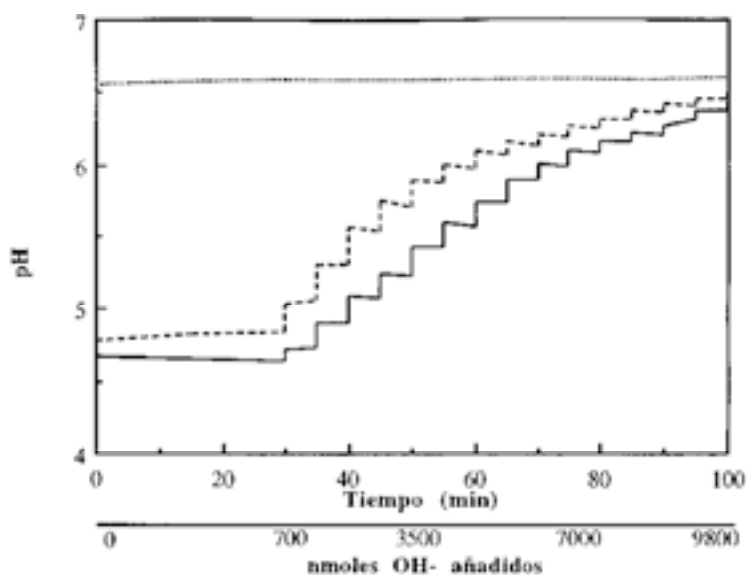


Fig. 10. Titulaciones "tipo" para el pH del medio base (50 ml Hepes 1 mM, CaCl_2 1 mM) con 175 raíces preincubadas en NaCN 5 mM, realizadas con el electrodo de pH y su electrodo de referencia (trazo continuo) o con los cuatro electrodos (de pH, de K^+ y sus correspondientes de referencia, trazo discontinuo), mediante sucesivas adiciones de 700 nmol de OH^- junto con 6250 nmol de K^+ . En línea de puntos está representado el control, cuyo pH (≈ 6.5) no varía durante el tiempo que dura la titulación. (los datos de K^+ , correspondientes a las titulaciones medidas simultáneamente con los cuatro electrodos, se muestran en la Fig 13).

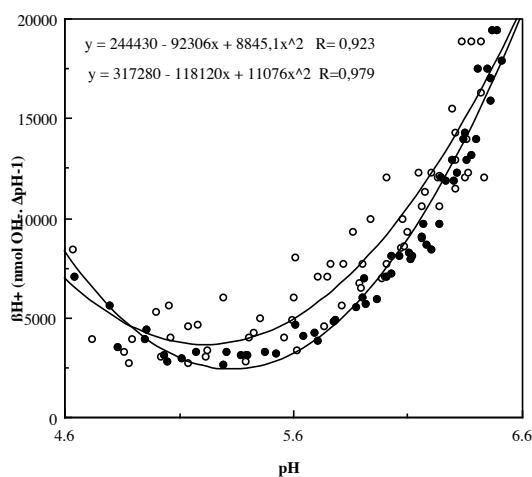


Fig. 11: Capacidad tampón para H^+ (βH^+ , calculada de las titulaciones mostradas en la Fig 10) del medio base (50 ml Hepes 1 mM, CaCl_2 1 mM) con 175 raíces preincubadas en NaCN, realizadas con el electrodo de pH y el correspondiente de referencia (○) o con los cuatro electrodos (de pH, de K^+ y los correspondientes de referencia -●-). Los valores representados corresponden a los datos directos procedentes de 4 experimentos independientes en cada caso, ajustados a sendos polinomios de segundo grado. En la parte superior se encuentran las ecuaciones de las dos curvas, con sus respectivos coeficientes de correlación (R). (Los datos de βK^+ , correspondientes a las titulaciones medidas simultáneamente con los cuatro electrodos se muestran en la Fig 14).

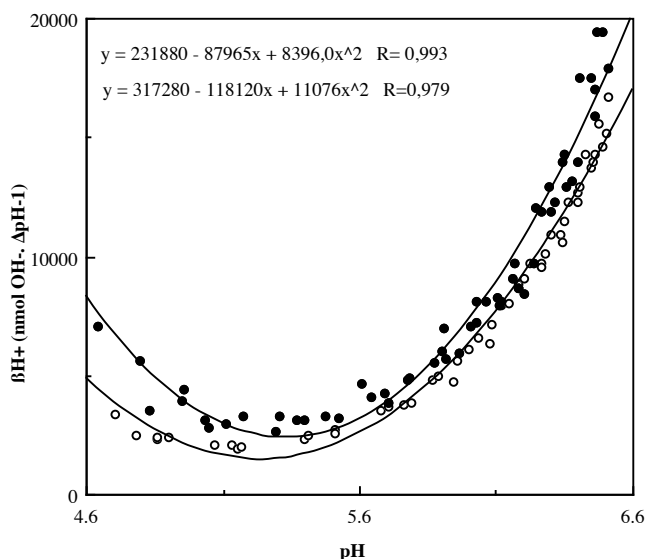


Fig. 12: Comparación de la capacidad tampón para H^+ del medio sólo (\circ) y del medio más las raíces preincubadas en NaCN (\bullet), medida en presencia de los cuatro electrodos. Están representadas las curvas correspondientes a cuatro electrodos de las Figs. 7 y 11. En la parte superior se encuentran las ecuaciones respectivas y sus coeficientes de correlación (R).

2.2.2.- Capacidad tampón para K^+ (βK^+) del medio con raíces

De igual forma que hemos estimado la capacidad de retención de H^+ de las raíces (capacidad tampón, βH^+), comprobamos si también retienen K^+ (capacidad tampón para este ión, βK^+). Para ello, realizamos calibraciones del medio con raíces preincubadas en NaCN, utilizando la metodología referenciada en Materiales y Métodos y en los Aptos. anteriores. En la **Fig 13** se representan sendas titulaciones "tipo" para el K^+ (desde una concentración de K^+ inicial de 0.625 mM hasta una final de 2 mM) de 50 ml de medio base con 175 raíces preincubadas en NaCN, realizadas respectivamente con la pareja de electrodos para el K^+ y con los cuatro electrodos (el de K^+ , el de pH y sus correspondientes de referencia; en este último caso se registraba simultáneamente la titulación para pH, que se muestra en la **Fig 10**). En la figura incluimos un control del medio con raíces preincubadas en NaCN, mantenidas a $[K^+]$ máxima y constante (2 mM), y por lo demás en las mismas condiciones que las raíces empleadas en las titulaciones. Como puede observarse, la concentración de K^+ del medio no sufre ningún tipo de variación, lo que demuestra que los sistemas de absorción de K^+ de las raíces están bloqueados por el NaCN.

A partir de los resultados de las titulaciones, calculamos la capacidad tampón para el K^+ (βK^+) del medio con las raíces preincubadas en NaCN, representándose frente al pK ($-\log [K^+] \text{ M}$) en la **Fig 14**. Los datos obtenidos, como en el caso del medio sin raíces, se ajustan a sendas curvas polinómicas de segundo grado con elevados coeficientes de

correlación ($R=0.970$ y $R=0.966$ para dos y cuatro electrodos respectivamente). Si comparamos estas curvas de tamponación para K^+ , realizadas con dos y cuatro electrodos, se comprueba que no existen diferencias significativas que no puedan ser atribuibles a las variaciones entre repeticiones, siendo las curvas prácticamente coincidentes entre sí y con una tercera, ajustada a todos los datos anteriores, la cual presenta un coeficiente de correlación igualmente elevado ($R=0.966$), y prácticamente igual al de las otras dos curvas. Estos resultados nos muestran que la utilización conjunta de los **cuatro electrodos no produce interferencias apreciables en las medidas de capacidad tampón para K^+** del medio con las raíces preincubadas en NaCN, como no las producía con el medio solo. La presencia de raíces tampoco altera la capacidad tampón para el K^+ del medio, como puede comprobarse en la **Fig 15** donde representamos los valores de β_{K^+} del medio solo y con raíces preincubadas en NaCN, medidos con los cuatro electrodos presentes en el medio. En efecto, ambas curvas son prácticamente coincidentes, lo que indica que las paredes celulares de las raíces no muestran una capacidad apreciable para retener iones K^+ en el intervalo de pH y concentración de K^+ en el que se realizan las experiencias. Sin embargo, pese a no apreciarse variaciones, en el cálculo de la velocidad de flujo de K^+ (V_{K^+}) de una experiencia con raíces "in vivo" utilizamos la correspondiente ecuación de la curva de β_{K^+} , realizada con las raíces preincubadas en NaCN, en el mismo medio y condiciones en que se lleva a cabo dicha experiencia.

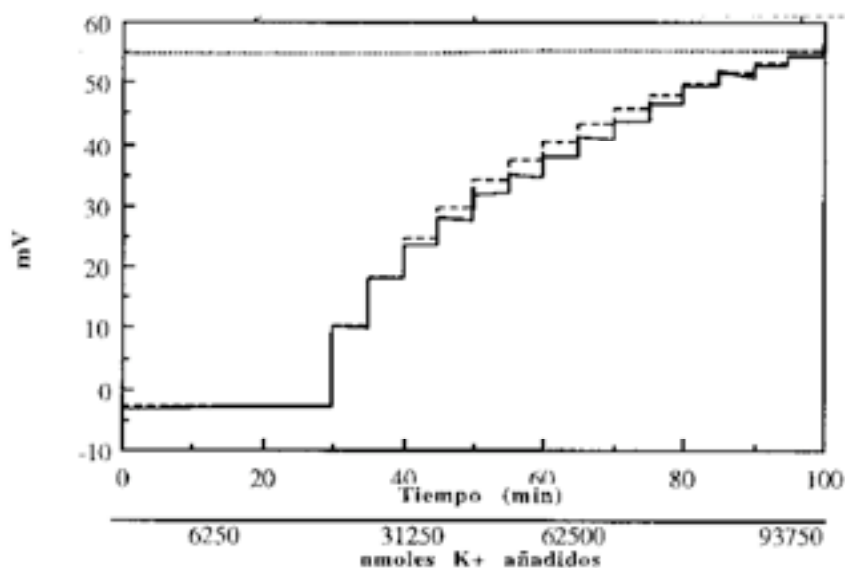


Fig. 13. Titulaciones "tipo" para el K^+ de medio base (50 ml Hepes 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM) con 175 raíces preincubadas en NaCN 5 mM, realizadas con el electrodo de K^+ y su electrodo de referencia (trazo continuo) o con los cuatro electrodos (de K^+ , de pH y sus correspondientes de referencia, trazo discontinuo), mediante sucesivas adiciones de 6250 nmol de K^+ junto con 700 nmol de OH^- . En línea de puntos está representado el control, cuya $[K^+]$ (≈ 2 mM) no varía durante el tiempo que dura la titulación. (los datos de pH, correspondientes a las titulaciones medidas simultáneamente con los cuatro electrodos, se muestran en la Fig 10).

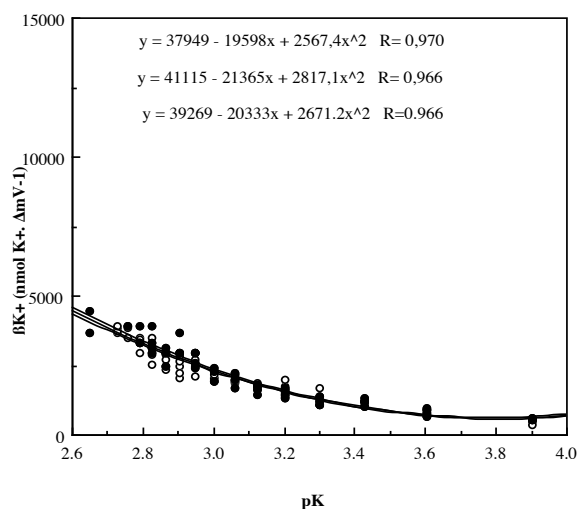


Fig.14: Capacidad tampón para K^+ (βK^+ , calculada de las titulaciones mostradas en la Fig 13) del medio base (50 ml Hepes 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM) con 175 raíces preincubadas en NaCN, realizadas con el electrodo de K^+ y el correspondiente de referencia (○) o con los cuatro electrodos (de K^+ , de pH y los correspondientes de referencia -●-). Los valores representados corresponden a los datos directos procedentes de 4 experimentos independientes en cada caso, ajustados a sendos polinomios de segundo grado, junto con una tercera curva (·) ajustada a todos los puntos. En la parte superior se encuentran las ecuaciones de las tres curvas, con sus respectivos coeficientes de correlación (R). (Los datos de βH^+ , correspondientes a las titulaciones medidas simultáneamente con los cuatro electrodos, se muestran en la Fig 11).

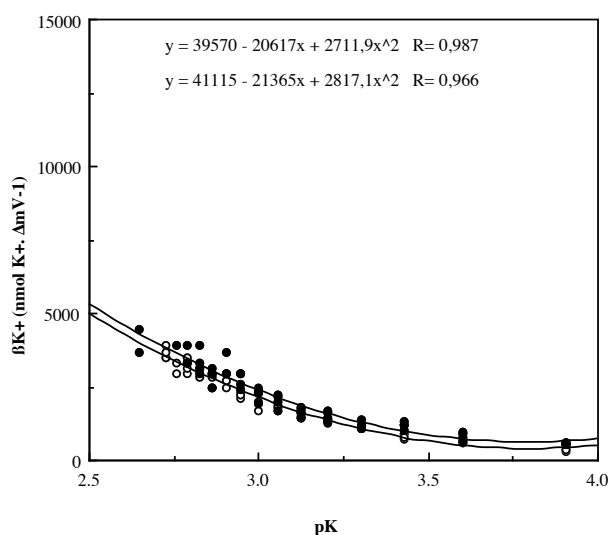


Fig. 15: Comparación de la capacidad tampón para K^+ del medio sólo (○) y del medio más las raíces preincubadas en NaCN (●), medida en presencia de los cuatro electrodos. Están representadas las curvas correspondientes a cuatro electrodos de las Figs. 9 y 14. En la parte superior se encuentran las ecuaciones respectivas y sus coeficientes de correlación (R).

3.- ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE FLUJOS SIMULTÁNEOS DE H⁺ Y K⁺ POR RAICES ESTERILES DE GIRASOL "IN VIVO"

3.1.- CINÉTICA DE FLUJOS SIMULTÁNEOS DE H⁺ Y K⁺ EN DIFERENTES REMESAS DE SEMILLAS (DE 1991 A 1995)

Para las medidas simultáneas de ambos flujos por raíces de girasol "in vivo" se sigue la metodología descrita en Materiales y Métodos, utilizando 175 raíces preincubadas en Hepes 1 mM, CaCl₂ 1 mM a 4° C, ya que este pretratamiento estimula el transporte iónico de sus membranas (Paredes, 1989; Espinosa, 1991). A continuación se pasaban las raíces a 50 ml de medio de medida (Hepes 1 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 2 mM) termostatzado a 30° C, agitado y aireado con los electrodos de pH, K⁺ y sus respectivos de referencia, midiéndose así simultáneamente la variación de pH y de concentración de K⁺ de dicho medio, cambios ambos provocados por la actividad de las raíces que extruyen H⁺ y absorben K⁺ simultáneamente.

En este apartado incluimos también el estudio de los flujos iónicos en distintas remesas recibidas en diferentes fechas, a lo largo de todos los experimentos de este trabajo, y que corresponden a distintas cosechas (desde 1991 hasta 1995). Con semillas de la primera de estas remesas, representada en la **Fig. 16A**, realizamos experimentos para comprobar la existencia o no de posibles interferencias entre los electrodos de K⁺ y de pH, comparando los resultados de las medida de los flujos realizados simultáneamente, con los de las medidas de ambos flujos iónicos por separado, con sólo la correspondiente pareja de electrodos en el medio. Estos resultados se comentan en el Apto 3.2.1.

La **Fig 16 (A-H)** muestra los valores medios de **variación de pH** del medio de medida y de **velocidad de eflujo neto de H⁺** (VH⁺, calculada teniendo en cuenta βH⁺ en cada caso) por raíces procedentes de las 8 diferentes remesas obtenidas y medidas en las fechas indicadas en el pie de la gráfica. Las medidas se realizaron de forma simultánea a las de variación de pK del medio, con los electrodos de pH, K⁺ y sus respectivos de referencia en el medio de medida.

En todo los casos la variación del pH del medio (causada por la extrusión de H⁺ por las raíces) con respecto al tiempo, sigue una curva sigmoidal que se corresponde con una respuesta en campana de la velocidad de eflujo (VH⁺), sin lag a partir del momento en el que estabilizamos el pH a 6.55±0.03 tras la adición de las raíces, que acidifican ligeramente el medio; esta estabilización inicial del pH (por adición de 20 a 30 nmoles de NaOH por ml de medio) se alcanza en menos de 10 min (no incluido en las figuras), de manera que éste debería considerarse como el tiempo máximo de lag para el eflujo de H⁺, si es que existe. Después de alcanzar la velocidad máxima, el eflujo neto de H⁺ decrece de nuevo hasta valores cercanos a 0 (200-240 min desde el inicio del experimento) cuando el pH del medio alcanza la estabilización, en un valor alrededor de 5.0. Este **pH de**

equilibrio sería debido al balance entre el eflujo de H^+ por la bomba y el influjo de H^+ por los simportadores que “co-absorben” H^+ junto con otros iones.

Hemos observado **diferencias entre las distintas remesas** con respecto a la cinética del eflujo de H^+ por las raíces. Así, el pH final de equilibrio oscila entre 4.7 en la remesa H (**Fig 16H**) y 4.98 para la remesa D (**Fig 16D**). De la misma forma, la velocidad máxima (VH^+_{max}) varía entre 1.50 y 2.27 nmol H^+ /h. mg p. fr. de las remesas A y H respectivamente. El tiempo que se tarda en alcanzar VH^+_{max} (el inicio de la meseta de VH^+_{max}) también varía desde aproximadamente 60 min (las correspondientes a las remesas C, E, F y G) hasta 90 min (las correspondientes a las remesas A, B, D y H). En todas las remesas la meseta de VH^+_{max} se mantiene entre 40 y 45 min. En general, cuanto mayor era la VH^+_{max} antes se alcanza la meseta de VH^+_{max} y más pronto se alcanza el pH final de equilibrio de flujos en la solución.

Estas diferentes características cinéticas descritas para el eflujo de H^+ deben ser atribuidas a diferencias en la capacidad endógena de extrusión de H^+ de las raíces procedentes de distintas remesas, y ponen de manifiesto que deben realizarse controles cuando las condiciones experimentales se modifiquen, incluso cuando lo hagan mínimamente.

En la **Fig 17 (A-H)** mostramos experimentos representativos ($n \geq 3$) de **la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+** llevados a cabo por raíces procedentes de las mismas remesas que las mostradas en la **Fig 16**. En esta figura están representadas tanto las variaciones de pK y pH del medio (insertas) como las de VK^+ y VH^+ (calculadas teniendo en cuenta las correspondientes capacidades tampón, βK^+ y βH^+ , **Figs 11 y 14**). En estas gráficas se muestran experimentos representativos, en lugar de medias, ya que la planificación de todo el trabajo está basada en la medida simultánea de los flujos de H^+ y K^+ , para estudiar su interacción y acoplamiento, y esto sólo puede observarse claramente en un mismo experimento, ya que la simultaneidad de las respuestas de uno y otro flujo iónico quedaría enmascarada al comparar las respectivas medias respecto al tiempo, ya que existen diferencias entre repeticiones en cuanto al momento exacto en que ocurren los cambios en uno y otro flujo. De todas formas, hay que resaltar que en cada experimento se utilizan 175 raíces, de manera que las variaciones del material vegetal están suficientemente compensadas.

El primer resultado importante que podemos destacar es que, en todos los casos se observa **que el influjo de K^+ muestra un lag de, según las remesas, 30-60 minutos con respecto al eflujo de H^+** . El lag podía alcanzar hasta 70 min con raíces de otros cultivares de girasol enano (no incluidos en esta Memoria). Este resultado es congruente con la hipótesis de que el sistema transportador de K^+ sería secundariamente dependiente del sistema primario transportador de H^+ , que suministra la fuerza energizadora para los sistemas transportadores de K^+ ; el lag indicaría el tiempo requerido para que el pH externo alcance un valor lo suficientemente bajo (ácido) para que se produzca la entrada de K^+ ($pH \approx 6.37$, en nuestros experimentos).

Como puede observarse, el **influjo neto de K^+** , al contrario que el eflujo de H^+ , aumenta continuamente a lo largo de la experiencia, ya que las raíces seminales necesitan una continua absorción de K^+ para mantener un crecimiento adecuado (White y Lemtiri-Chlieh, 1995). Así, para todas las remesas de semillas, el pK de la solución aumenta (la concentración de K^+ disminuye, debido al influjo neto de K^+ llevado a cabo por las raíces) mostrando cinéticas semiparabólicas multifásicas, con lo que la velocidad de influjo neto de K^+ (VK^+) aumenta continuamente a través de varios lóbulos o fases semiparabólicas saturables, de variable intensidad y duración. Comparando las cinéticas de las diferentes remesas observamos que, con algunas diferencias, la primera fase es cuantitativamente la más importante, saturándose ≈ 180 min después del inicio del experimento, cuando la velocidad de influjo neto de K^+ ha alcanzado $2 \text{ nmol } K^+ / \text{ h. mg p. fr.}$ para todos los casos, excepto la remesa E (**Fig 17E**) que muestra una menor actividad. En ese momento la velocidad de eflujo neto de H^+ (VH^+), tras haber alcanzado los máximos valores, ha caído de nuevo a valores bajos, indicando que está muy cerca del equilibrio eflujo/influjo de H^+ . Estas condiciones experimentales son similares a las "condiciones basales" de Bellando et al. (1995) en experiencias con hojas de *Elodea densa*, en las que la actividad de la bomba de H^+ se mantiene cerca del equilibrio, y la velocidad de eflujo neto de H^+ es baja. De acuerdo con estos autores, en estas condiciones la pequeña pero continua absorción de K^+ por las raíces se mantendría por la actuación homeostática y transitoria del "carrier" co-simporteador secundario de influjo K^+/H^+ , y los sucesivos lóbulos corresponderían a la apertura de este sistema, que no es constante en tiempo ni duración para los distintos experimentos. Esta situación se mantendría mientras no hubiera fuertes cambios en la concentración de K^+ del medio, ni sustancias o condiciones activadoras o inhibitoras de los flujos, y sería la razón de la variabilidad de VK^+ entre las repeticiones de un mismo experimento, especialmente respecto al tiempo, como hemos comentado más arriba. Así, hasta 180 min, las variaciones de VK^+ eran semejantes a las de VH^+ ($\leq 5\%$), pero a tiempos superiores aumentaban al 10%, aunque este margen es aún admisible en experiencias con sistemas vivos.

Los valores de VK^+ alcanzados al final de la experiencia son diferentes según la remesa, siendo los más bajos los correspondientes a las remesas A, D y E ($2.3 \pm 0.2 \text{ nmol } K^+ / \text{ h. mg p. fr.}$) y los mayores los correspondientes a las remesas B, C y H ($3.3 \pm 0.4 \text{ nmol } K^+ / \text{ h. mg p. fr.}$). En este último caso (remesa H) la velocidad máxima alcanzada es muy elevada ($4.5 \text{ nmol } K^+ / \text{ h. mg p. fr.}$); es decir, el sistema de absorción de K^+ es muy activo en estas raíces, razón por la cual VK^+ sufre una fuerte caída al final de la experiencia, asociada a que la concentración de K^+ externa ha bajado a valores inferiores a 1 mM.

Los valores de VK^+ para las raíces de girasol de nuestras experiencias son similares a los que han obtenido White y Lemtiri-Chlieh (1995) para raíces seminales de centeno.

Las diferencias encontradas en la cinética de flujos de H^+ y K^+ por distintas remesas de semillas dejan claro que debemos realizar controles cuando las condiciones experimentales

cambien mínimamente, para obtener resultados fiables. Ello incluye un estudio completo de los flujos cuando cambia la remesa de semillas.

En conclusión, los datos comentados en este apartado constituyen evidencia de que, en estas raíces, los sistemas de absorción de K^+ no están muy estrechamente acoplados a los de extrusión de H^+ , dependiendo sólo secundariamente de la fuerza impulsora (ΔpH y Δe) creada por la actuación de las bombas de extrusión de H^+ ; ello se demuestra por el lag que presenta el influjo de K^+ respecto del eflujo de H^+ , y las muy diferentes características que muestra la cinética de ambos flujos iónicos.

3.2.- CONTROLES REALIZADOS EN EL ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE FLUJOS DE H^+ Y K^+ POR LAS RAÍCES

3.2.1. Interferencia entre electrodos: Cinética de los flujos de H^+ y K^+ medidos por separado con sólo la correspondiente pareja de electrodos en el medio

Igual que se hizo con las calibraciones de la capacidad tampón, se hacía necesario comprobar si en las medidas de flujos iónicos por raíces "in vivo" se producían interferencias entre los cuatro electrodos necesariamente presentes en el medio cuando se estudia la cinética de flujos simultáneos. Para ello, paralelamente a los experimentos con semillas de la primera remesa (**Fig 17A**), se realizaron medidas de los flujos de H^+ y K^+ por separado, con sólo la correspondiente pareja de electrodos presentes en el medio. En la **Fig 18** se representan comparativamente los resultados de dichas experiencias, realizadas con 2 y 4 electrodos, en cuanto a la velocidad de eflujo neto de H^+ (VH^+). Como hemos indicado repetidas veces, estos datos se han calculado a partir de los datos de pH del medio, representados en la inserta, teniendo en cuenta la capacidad tampón para los H^+ (βH^+) del medio de medida con raíces preincubadas en NaCN, obtenida a partir de la calibración realizada con 2 ó 4 electrodos, según correspondía (vease **Fig. 11**).

Como puede observarse, existen algunas diferencias en la cinética de eflujo de H^+ por las raíces de la misma remesa, medida con la pareja de electrodos para el pH o con los cuatro electrodos presentes en el medio. Así, con los cuatro electrodos se obtenía una velocidad máxima (VH^+_{max}) de aproximadamente 1.50 nmol H^+ /h. mg p. fr., muy similar a la medida por otros autores con electrodo combinado de pH para raíces de girasol, tanto intactas (Röhmeld et al, 1984) como escindidas (Espinosa, 1991), manteniéndose la meseta de valores máximos durante 40-45 min y alcanzando el pH final de equilibrio a 4.8 ± 0.05 . En contraste, las medidas realizadas con sólo la pareja de electrodos para pH mostraban una velocidad máxima similar, pero se mantenía durante aproximadamente el doble de tiempo 80 a 90 min, siendo el pH final de equilibrio significativamente más alto (5.05 ± 0.05). Estos resultados podrían explicarse por las diferencias encontradas en la capacidad tampón (βH^+) del medio con raíces preincubadas en NaCN (**Fig 11**), que se utilizó en el cálculo

de VH^+ , y que, en el intervalo de pH en que se observan las diferencias de VH^+ , muestra una capacidad tampón superior cuando se medía en presencia de los cuatro electrodos.

En cuanto a las diferencias encontradas entre la cinética de influjo de K^+ , medida con dos o cuatro electrodos en el medio, no las atribuimos a interferencias entre los distintos electrodos, sino más bien a la variabilidad que existe en la medida de esta cinética bajo condiciones estables, por las causas que se han referido en el Apartado anterior.

De cualquier forma, en todas las experiencias realizadas con los cuatro electrodos simultáneamente en el medio de medida, siempre se repitieron los controles pertinentes cuando las condiciones experimentales cambiaban mínimamente, o bien variaba la remesa de semillas utilizadas.

3.2.2. Cinética de flujos de H^+ y K^+ por raíces "envenenadas" por preincubación en NaCN

Para comprobar que la variación de pH y pK detectada en el medio es debida a la actividad de transporte iónico de las raíces vivas, y no a alguna interacción física o química del medio con los electrodos o con las paredes celulares de las raíces, hemos realizado controles o blancos con raíces "envenenadas" por preincubación en NaCN, mantenidas en idénticas condiciones que las raíces normales y durante el tiempo que dura un experimento de cinética de flujos iónicos con raíces "in vivo": es decir, 175 raíces "envenenadas" eran mantenidas en 50 ml de Hepes 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM, KCl 2 mM a pH 6.55 ± 0.01 a $30^\circ C$, con los cuatro electrodos empleados en las medidas, durante ≈ 400 min. Dichas raíces no mostraron actividad alguna de transporte de H^+ ni K^+ (datos incluidos en la **Fig 17A, inserta**), lo cual quiere decir que los cambios de pH y de concentración de K^+ observados durante una experiencia con raíces "in vivo" son causados, efectivamente, por la actividad transportadora de estas raíces.

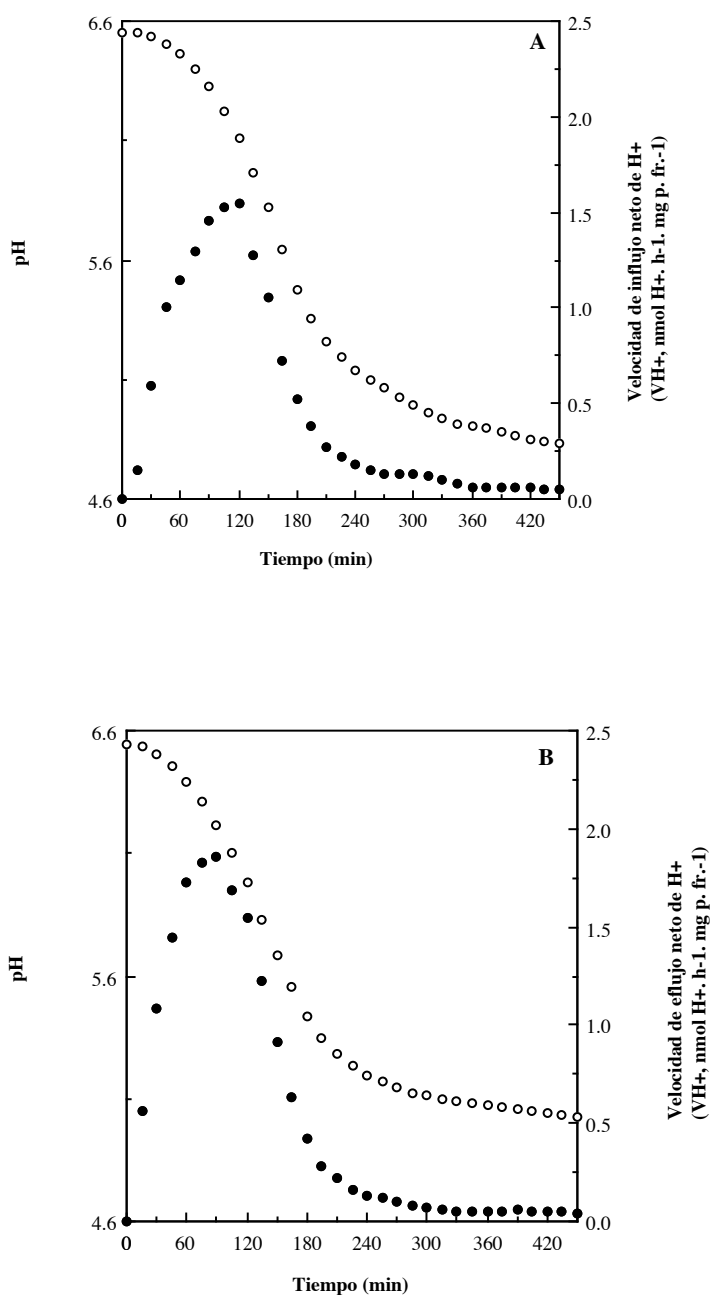


Fig 16 (A-H): Cinéticas de variación de pH (○) y velocidad de eflujo neto de H⁺ (●) calculada teniendo en cuenta las correspondientes BH⁺, por 175 raíces "in vivo", medidas en 50 ml de Hepes 1 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 2 mM y con los electrodos de pH, K⁺ y sus correspondientes de referencia. Los valores son medias de tres experimentos (SD≤5%). Cada gráfica corresponde a una remesa :A, de Marzo-91; B, de Febrero-92; C, de Julio-93; D, de Octubre-94; E, de Marzo-95; F y G diferentes variedades de Febrero-94 y H de Julio-95).

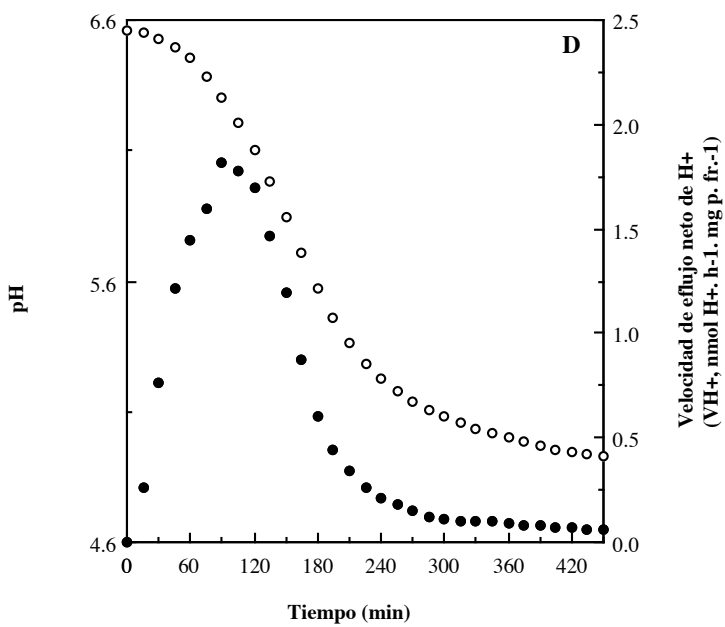
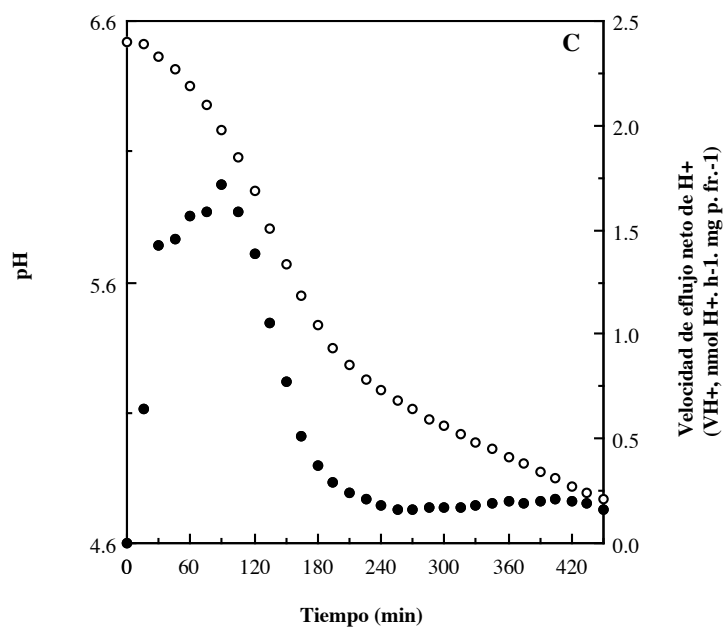


Fig 16: Continuación.

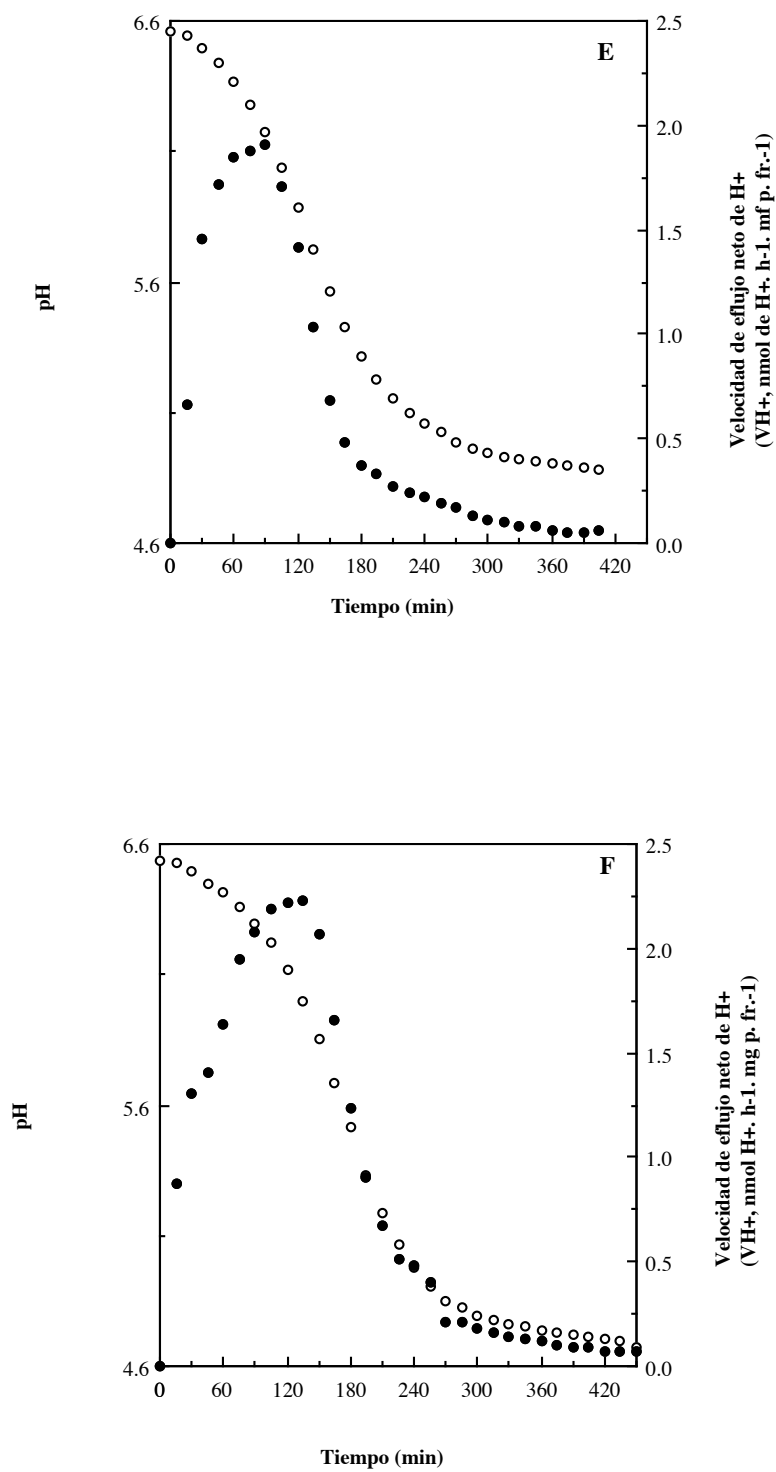


Fig 16: Continuación.

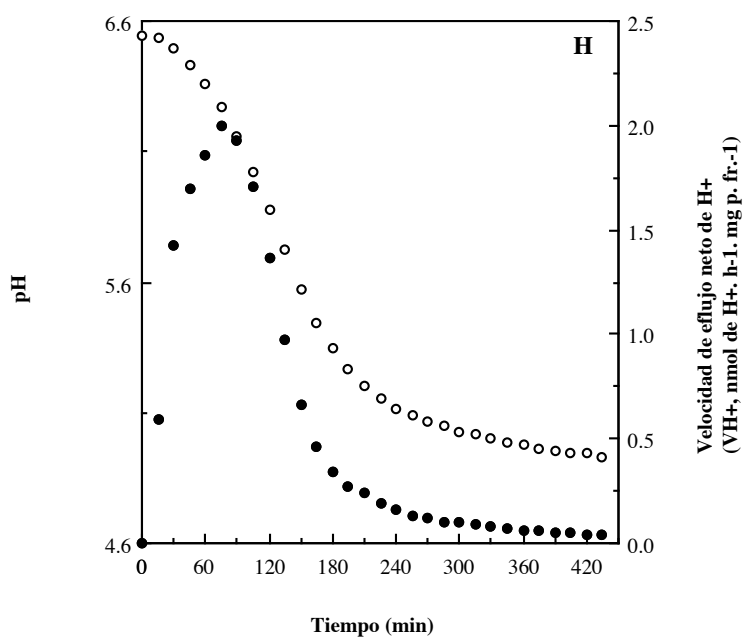
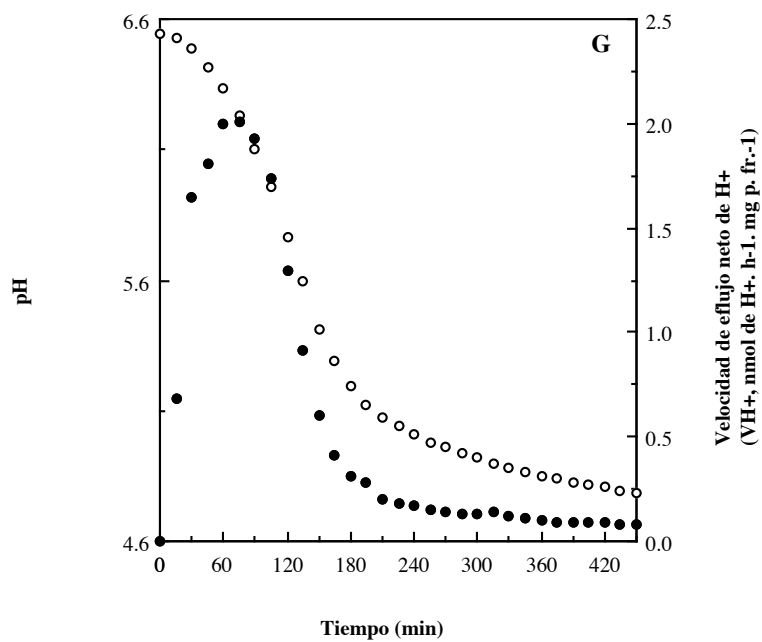


Fig 16: Continuación.

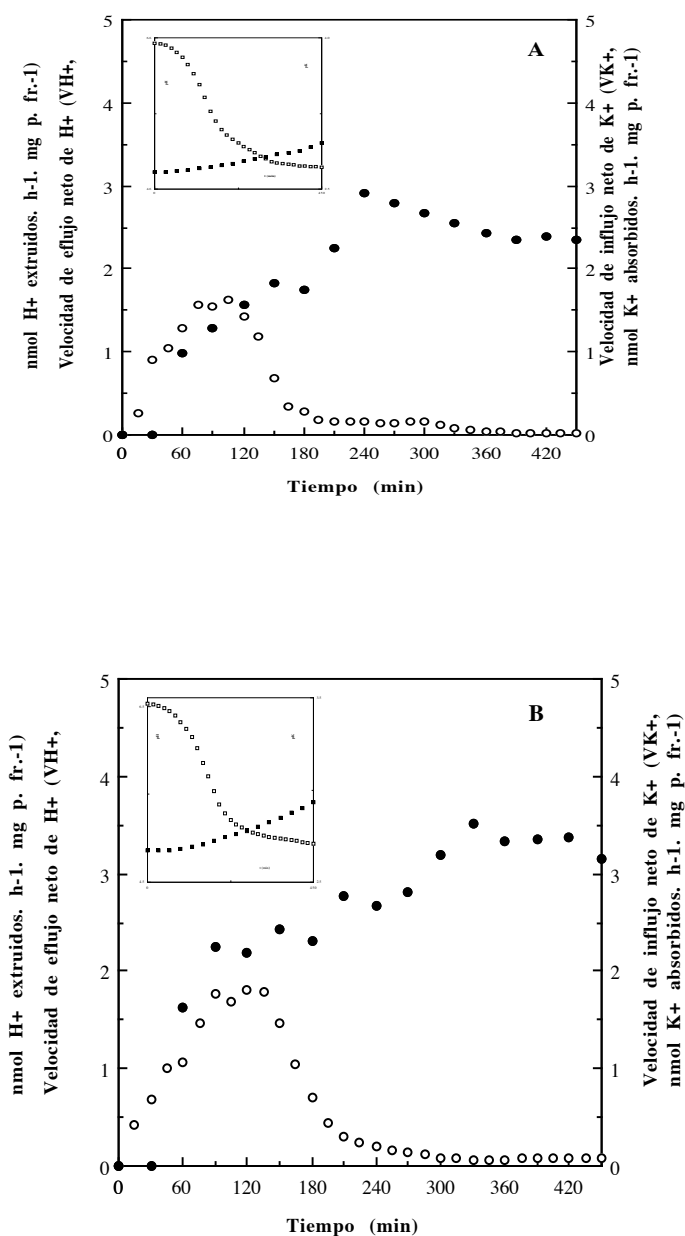


Fig 17 (A-H): Velocidad de eflujo neto de H⁺ (○) y de influjo neto de K⁺ (●) (VH⁺ y VK⁺, calculadas según las diferentes βH⁺ y βK⁺) por 175 raíces procedentes de las distintas remesas de semillas, medidas simultáneamente con las dos parejas de electrodos (para pH y K⁺) en 50 ml de medio standard (Hepes 1 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 2 mM). Insertas, los datos directos de pH (□) y pK (■), y en (A) los controles de pH (△) y pK (▲) con raíces "envenenadas" por preincubación en NaCN. Los resultados corresponden a un experimento representativo (n≥3) (SD≤5% para VH⁺ y ≤10% para VK⁺).

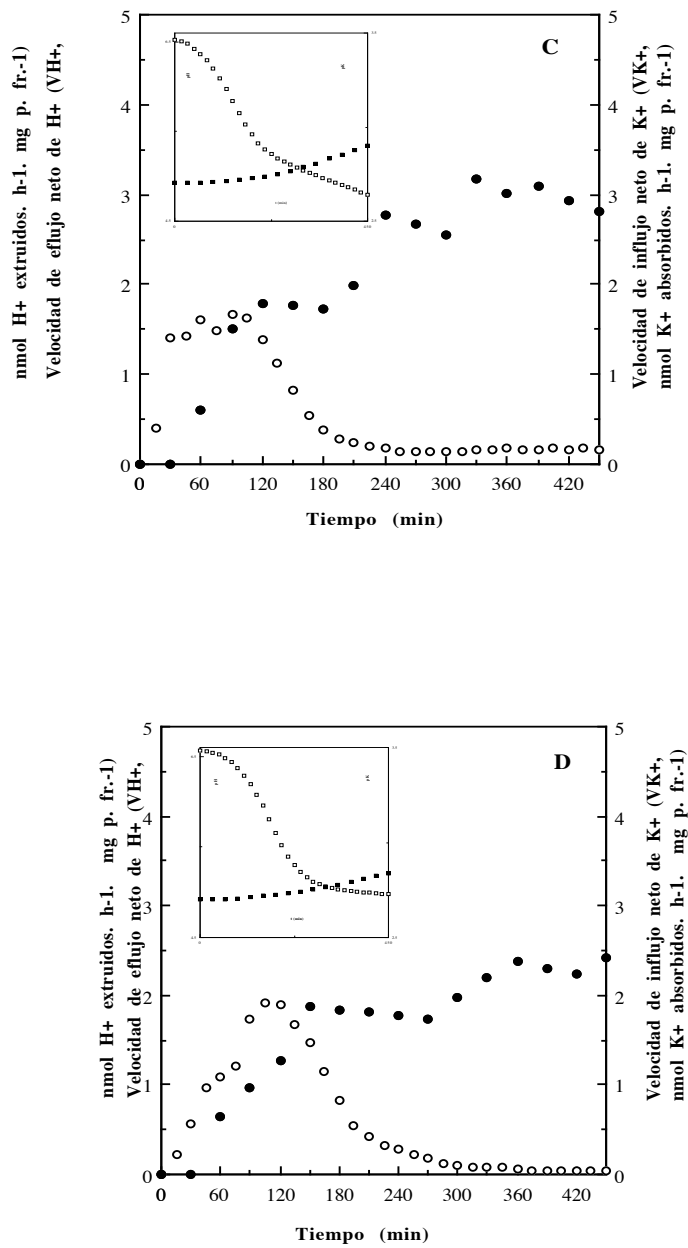


Fig 17: Continuación.

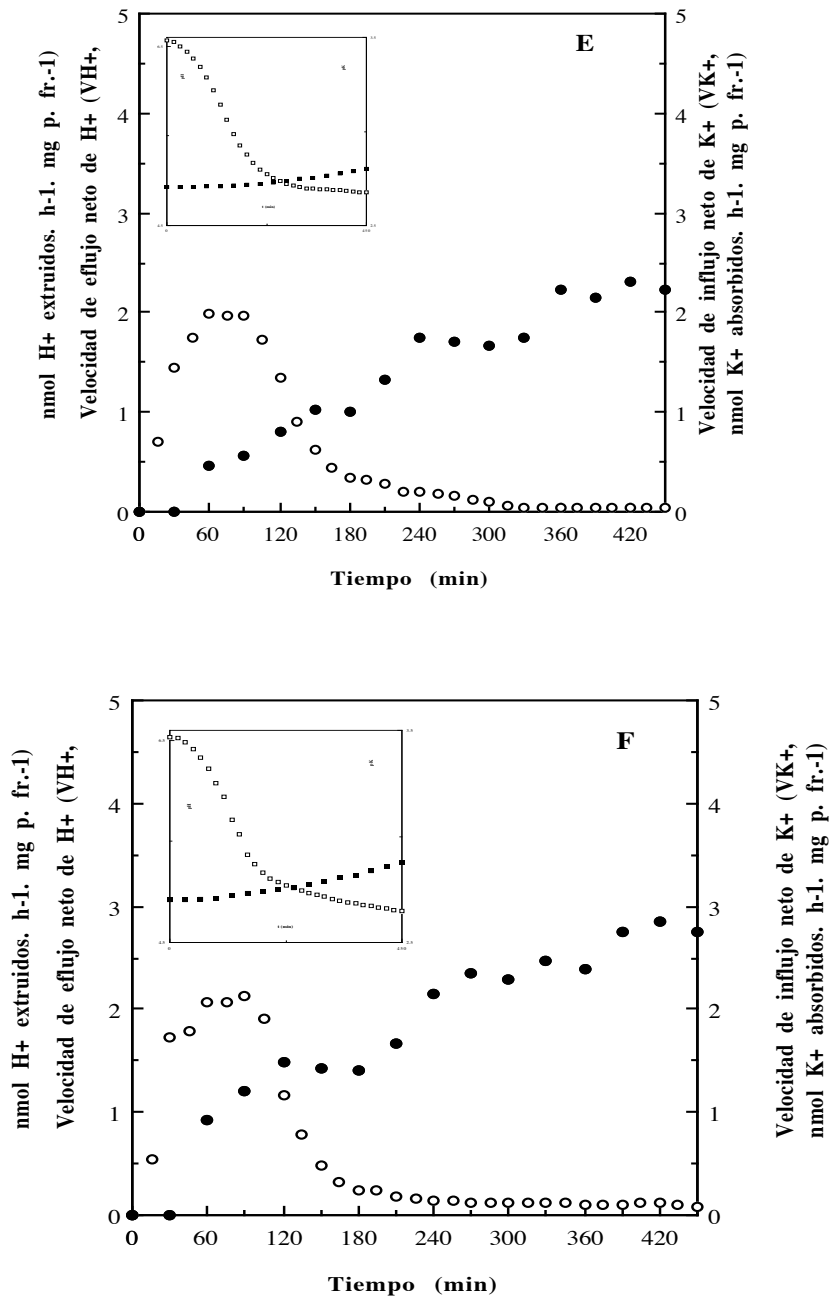


Fig 17: Continuación.

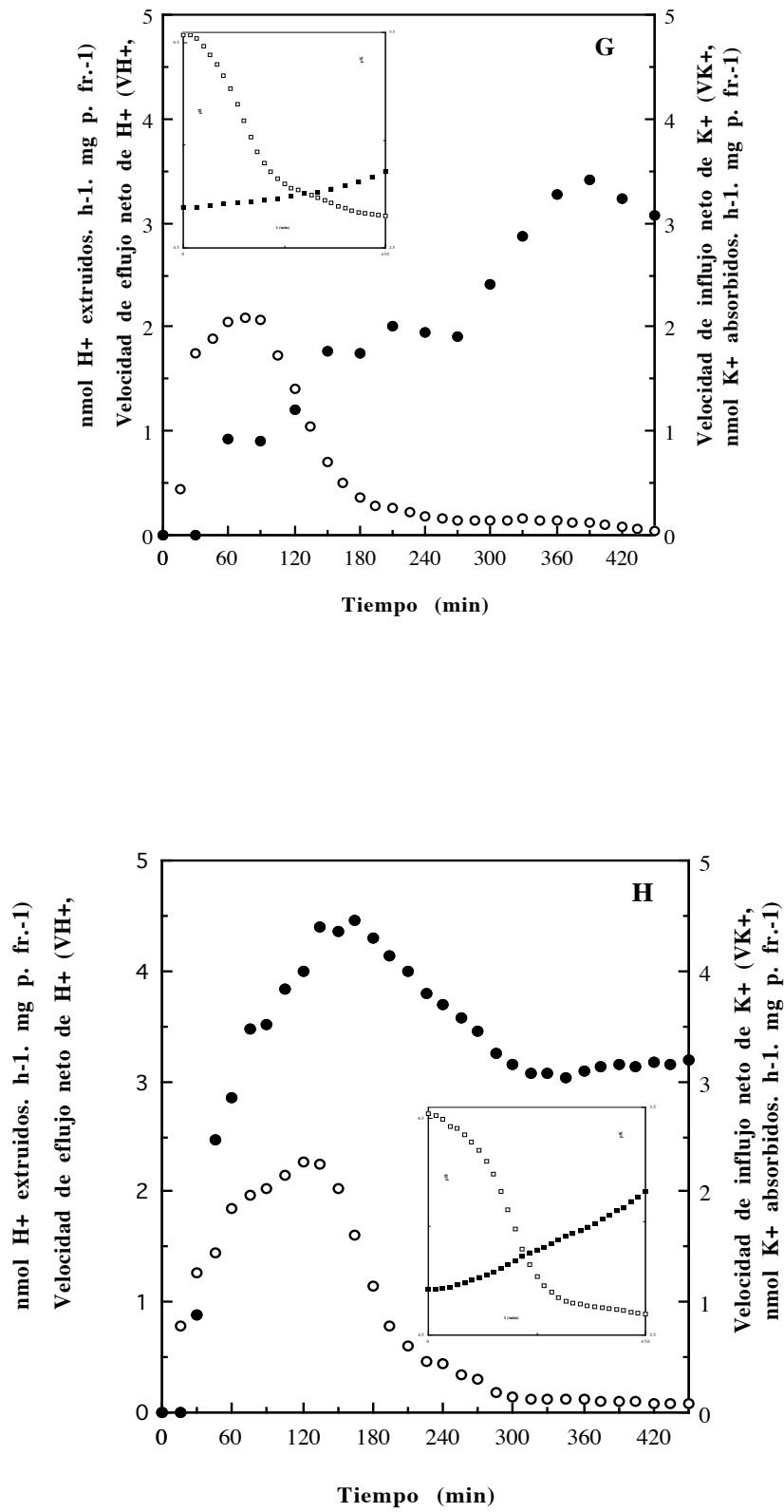


Fig 17: Continuación.

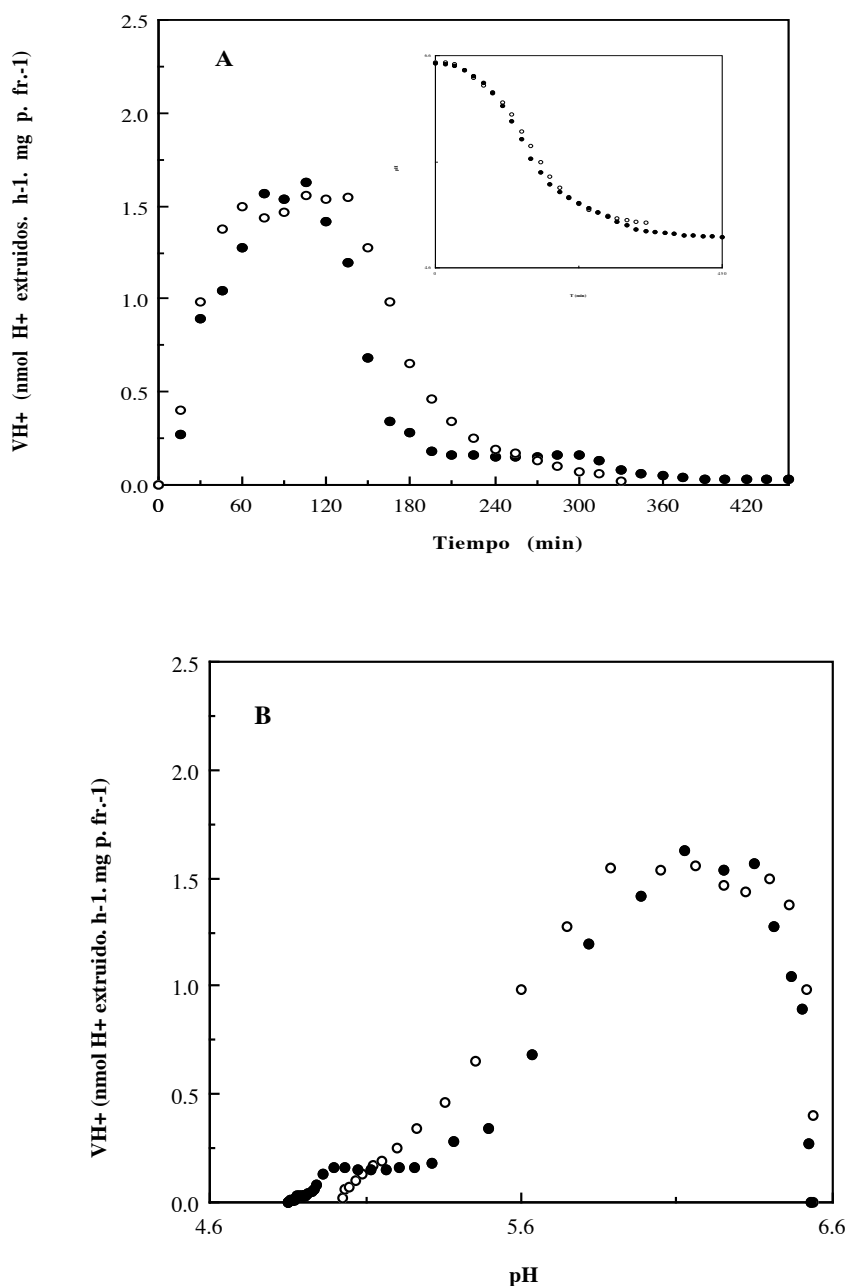


Fig 18: (A) Cinética de velocidad de eflujo neto de H^+ (VH^+) por 175 raíces en 50 ml de medio, Hepes 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM, KCl 2 mM, medida con la pareja de electrodos de pH (○) o con las dos parejas de electrodos (de pH y K^+ -●-) presentes en el medio. **Inserta** los correspondientes valores directos de cambio de pH del medio, a partir de los cuales, y teniendo en cuenta la correspondiente capacidad tampón (βH^+ , ver Fig 11), se han calculado los valores de VH^+ . (B) Representación de la velocidad de eflujo neto de H^+ (VH^+) de las mismas experiencias frente al pH externo. Los datos corresponden a experimentos representativos realizados paralelamente con semillas de la remesa A (ver Fig 17A) ($n \geq 3$), ($SD \leq 5\%$).

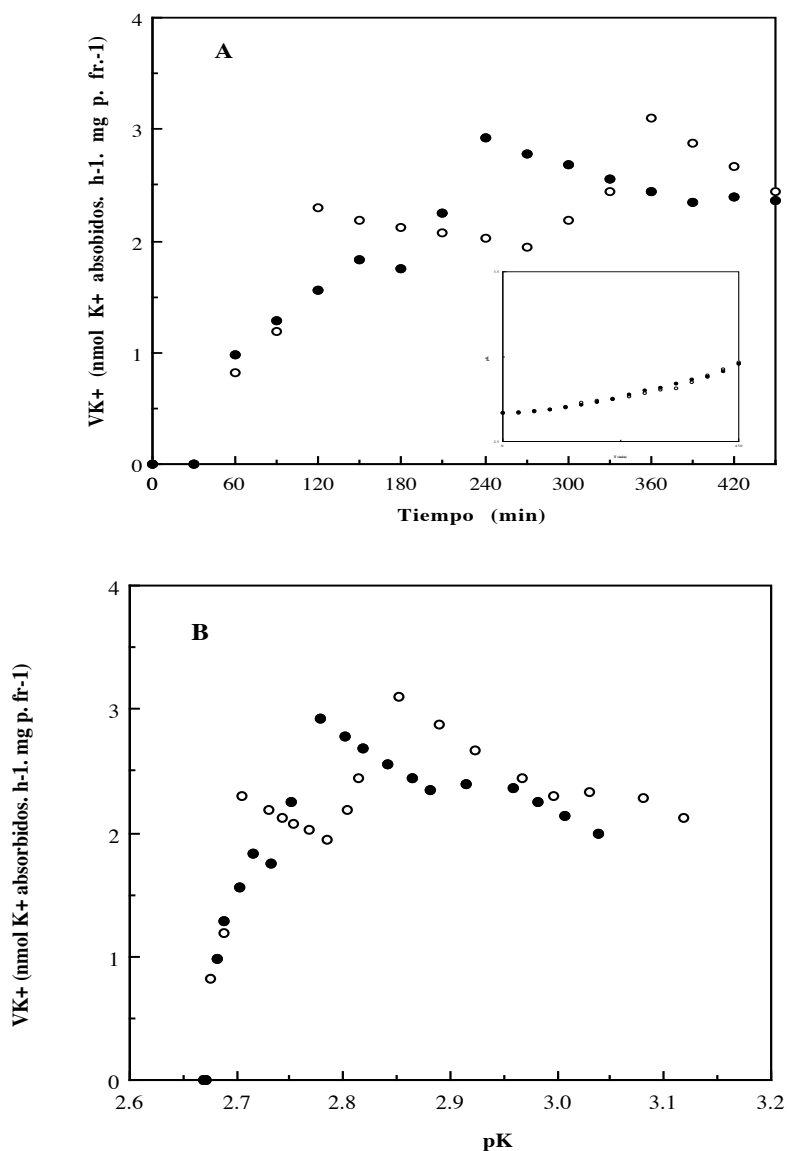


Fig 19: (A) Cinética de velocidad de influjo neto de K⁺ (VK⁺) por 175 raíces en 50 ml de medio, Heps 1 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 2 mM, medida, de forma paralela, con la pareja de electrodos de K⁺ (○) o con las dos parejas de electrodos (de pH y K⁺ -●-) presentes en el medio. **Inserta** los correspondientes valores directos de cambio de pK del medio, a partir de los cuales, y teniendo en cuenta la correspondiente capacidad tampón (BK⁺, ver Fig 14), se han calculado los valores de VK⁺. (B) Representación de la velocidad de influjo neto de K⁺ (VK⁺) de las mismas experiencias frente al pK externo. Los datos corresponden a experimentos representativos realizados paralelamente con semillas de la remesa A (ver Fig 17A).(n≥3), (SD≤10%).

3.2.3.- Efecto de la adición de antibióticos al medio de medida sobre la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+ por las raíces

Una de las remesa de semillas de girasol, que finalmente no pudimos utilizar, presentaba contaminación endógena y, a pesar de ser sometidas a esterilización externa antes de la siembra, las raíces mostraban cinéticas complejas multilobuladas de eflujo neto de H^+ , con VH^+ y VK^+ máximas siempre inferiores a las de las raíces estériles, y en todo semejantes a las obtenidas con raíces procedentes de semillas sin esterilizar superficialmente (Espinosa, 1991). Aunque siempre con las características generales descritas, las cinéticas obtenidas eran diferentes en cada ocasión, mostrándose en las gráficas un experimento tipo, representativo de una serie de ellos, $n \geq 3$, (**Fig 20**). Para tratar de obtener cinéticas semejantes a las obtenidas con semillas estériles, adicionamos al medio de medida los **antibióticos Cloranfenicol** (50 mg/l) y **Penicilina G Sódica** (250 mg/l) (Sentenac y Grignon, 1987). Estos antibióticos son comúnmente empleados en este tipo de medidas, pues su mecanismo de acción sobre la pared celular bacteriana no afecta a las membranas de células eucariotas, por lo que no se observan alteraciones en la extrusión de H^+ por las raíces (Espinosa, 1991). Igualmente, comprobamos que la adición de estos antibióticos no alteraba la **capacidad tampón del medio** con raíces preincubadas en NaCN, ni para H^+ ni para K^+ (**Fig 21**).

La adición de Cloranfenicol y Penicilina G Sódica al medio de medida con raíces contaminadas anula la cinética compleja de eflujo neto de H^+ , transformándola en una cinética simple semejante a la de raíces estériles (**Fig 22A**). Además, la velocidad de eflujo neto de H^+ aumenta, pasando de aproximadamente 1.6 nmol H^+ extruidos/h. mg p. fr. para las raíces contaminadas sin antibióticos a aproximadamente 2.1 nmol H^+ extruidos/h. mg p. fr. con antibióticos en el medio. También los resultados se hacen más repetitivos entre experimentos diferentes.

En cuanto al influjo neto de K^+ , como puede observarse en la **Fig 22B**, la presencia de los antibióticos altera considerablemente la velocidad de influjo neto de K^+ , lo que indica que alguno de los dos antibióticos utilizados, o ambos, tienen efecto negativo sobre el influjo de K^+ por las raíces. En primer lugar, se hacía necesario conocer qué antibiótico provocaba el efecto sobre el influjo de K^+ , realizamos una serie de experimentos (cuyos resultados se muestran en la misma **Fig 22 A y B**, con fines comparativos) en los que se midieron los flujos simultáneos de H^+ y K^+ en presencia de sólo Cloranfenicol o sólo Penicilina G Sódica. En el primer caso, el Cloranfenicol producía efectos similares a los obtenidos en presencia de los dos antibióticos, tanto sobre VH^+ como sobre VK^+ , mientras que en el segundo caso, la Penicilina G sódica sola produciría un efecto sobre el eflujo neto de H^+ , pero el influjo neto de K^+ parecía inhibirse menos que en los casos anteriores, aunque manteniéndose por debajo de los niveles obtenidos cuando no se adicionan antibióticos al medio de medida.

A partir de estos resultados parece claro que tanto el Cloranfenicol como la Penicilina G Sódica rectifican y mejoran el eflujo neto de H^+ de las raíces contaminadas, eliminando las cinéticas complejas debidas a la contaminación endógena de las raíces y aumentando la VH^+_{max} , con lo que se obtienen cinéticas semejantes a las de raíces estériles. Sin embargo, ambos antibióticos afectan negativamente el influjo neto de K^+ de las raíces, sobre todo el Cloranfenicol.

La posibilidad de que se produjeran interferencias en el transporte de K^+ por la presencia de Na^+ en el medio, al utilizar Penicilina G Sódica, nos hizo realizar una serie de experimentos con **Penicilina G Potásica**, en lugar de Penicilina G Sódica. En estos experimentos se corregía la cantidad de KCl que se adiciona al medio, de manera que la concentración inicial de K^+ se mantuviera en 2 mM, como en el resto de las experiencias. La concentración de Penicilina G Potásica empleada fue idéntica a la de Penicilina G Sódica (250 mg/ml), utilizándose en combinación o no, con 50 mg/ml de Cloranfenicol, y comparándose con la respuesta de las raíces sin antibióticos (**Fig 23 A y B**). En la **Fig 23A** se observa el efecto sobre el eflujo neto de H^+ de los antibióticos. Todas las combinaciones eliminan la cinética compleja producida por la contaminación, sin afectar, al menos aparentemente, al eflujo neto de H^+ llevado a cabo por las raíces. La velocidad máxima de eflujo neto de H^+ (VH^+_{max}) en presencia de ambos antibióticos era ligeramente superior a las obtenidas en ausencia de ellos o sólo con Penicilina G Potásica, observándose también que dicha velocidad máxima se alcanza antes (≈ 40 min antes) en presencia de antibióticos que sin ellos. En cuanto al influjo neto de K^+ (**Fig 23B**), la adición de ambos antibióticos conjuntamente inhibe fuertemente la velocidad de influjo neto de K^+ ; sin embargo, si se adiciona únicamente Penicilina G Potásica, aunque la velocidad también se reduce, posteriormente se recupera y se mantiene constante aunque a niveles inferiores a los observados sin antibióticos.

Todas estas experiencias las realizamos con raíces procedentes de semillas con contaminación endógena, de una remesa que finalmente no utilizamos. Por ello, y para comprobar si la Penicilina G Potásica provoca alguna alteración sobre los flujos simultáneos de H^+ y K^+ por raíces que no presentan contaminación endógena y que se esterilizan en superficie, estudiamos el efecto del antibiótico que menos parece afectar al transporte de K^+ (Penicilina G Potásica) tiene sobre los flujos de H^+ y K^+ de raíces procedentes de las remesas F y G (ver **Fig 17F-G**), utilizadas en parte de nuestros experimentos posteriores. El objeto de estas experiencias era comprobar si el efecto de la Penicilina G Potásica es idéntico en raíces estériles y contaminadas o si, por el contrario, el efecto observado anteriormente era consecuencia de la contaminación endógena de las semillas.

En la **Figs 24A y 25A** se muestra la cinética de la velocidad de eflujo neto de H^+ (VH^+) de ambas remesas en presencia o no de 250 mg/ml de Penicilina G Potásica. Prácticamente no se observan alteraciones del eflujo neto de H^+ por las raíces estériles de

girasol por efecto de la adición del antibiótico. En efecto, las velocidades son similares con y sin antibiótico, alcanzándose la zona de velocidades máximas en tiempos similares, estando las pequeñas diferencias comprendidas en el intervalo de variación normal de los datos. Por el contrario, el efecto producido por el antibiótico sobre el influjo neto de K^+ en las dos remesas de semillas analizadas (**Figs 24B y 25B**) muestran cómo la cinética de la velocidad de influjo neto de K^+ (VK^+), aunque varía de forma similar con y sin antibiótico (mostrando varios lóbulos), muestra valores de VK^+ sensiblemente inferiores en presencia del antibiótico.

En conclusión, la Penicilina G Potásica afecta el influjo neto de K^+ , reduciendo claramente la velocidad de influjo neto de K^+ de las raíces, aunque el/los sistema/s de transporte de K^+ muestran un comportamiento cinético similar al observado sin el antibiótico. Ello indicaría que este antibiótico no anula los sistemas de transporte de K^+ pero su funcionamiento se altera en cuanto a la eficacia del transporte. Efectos más negativos aún se obtienen con Penicilina G Sódica y Cloranfenicol, solos o combinados. Estos resultados demuestran que, en las medidas de flujos simultáneos de H^+ y K^+ debemos usar raíces procedentes de semillas sin contaminación endógena y esterilizadas externamente, desechando aquellas que presenten contaminación, ya que debe descartarse el uso de antibióticos en el medio de medida por su actuación sobre el/los sistema/s de transporte de K^+ .

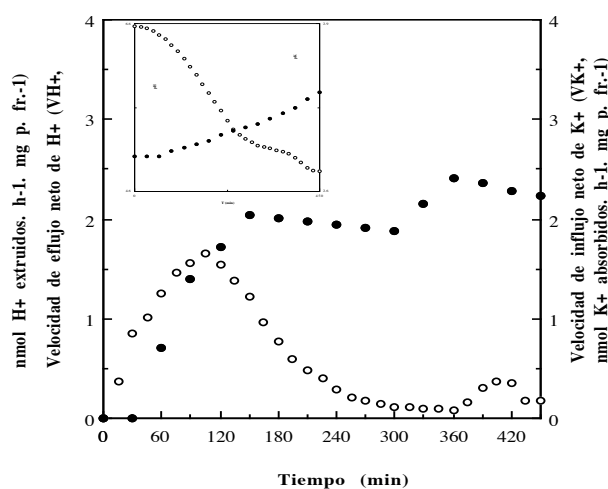


Fig 20: Velocidad de flujos netos simultáneos de H^+ (VH^+ -○-) y K^+ (VK^+ -●-) por raíces con contaminación endógena. **Inserta** los datos directos de cambio de pH (□) y pK (■). Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo ($n \geq 3$) ($SD \leq 5\%$ para VH^+ y $\leq 10\%$ para VK^+).

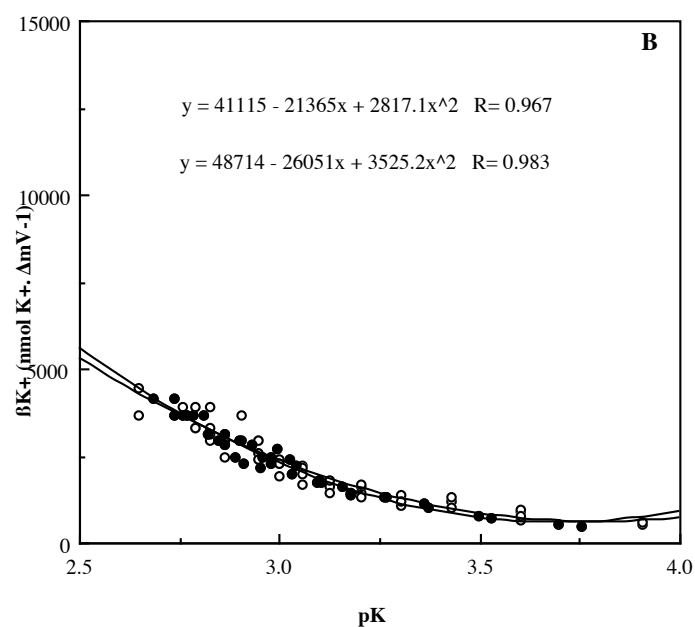
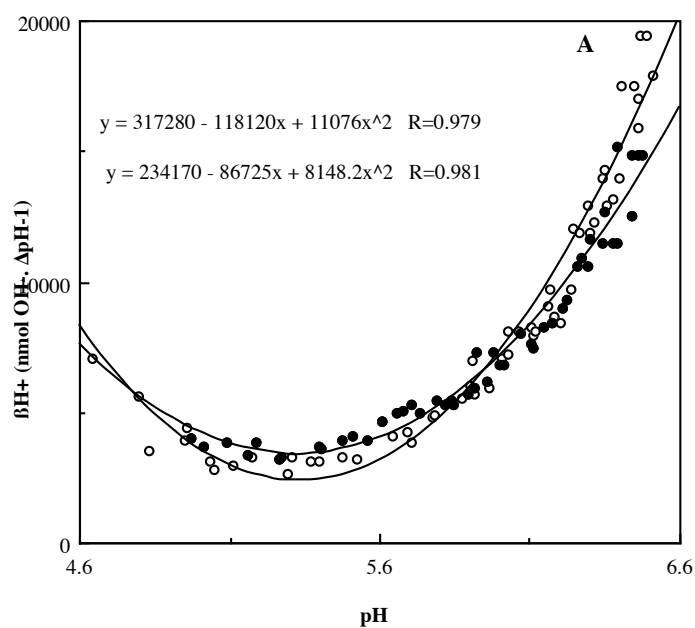


Fig 21: Capacidad tampón de 50 ml de medio base con 175 raíces preincubadas en NaCN sin (○) y con (●) 50 mg/ml Cloranfenicol y 250 mg/ml Penicilina G Sódica. **(A)** Capacidad tampón para H^+ (βH^+). **(B)** Capacidad tampón para K^+ (βK^+).

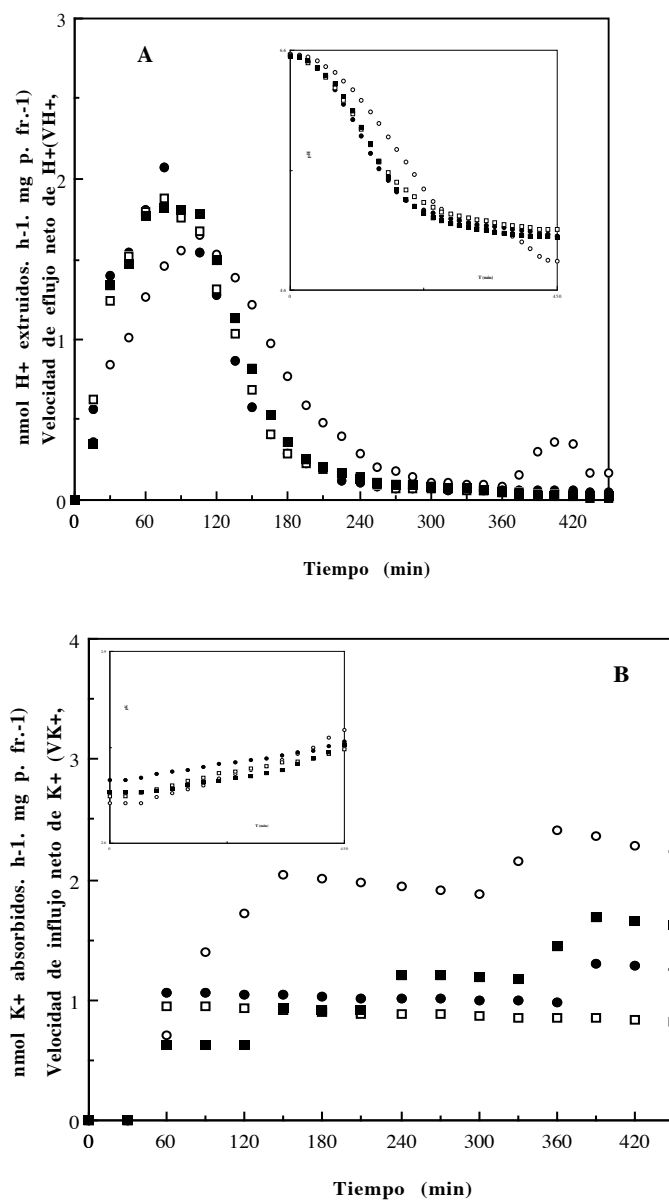


Fig 22: Efecto de la adición de Cloranfenicol (50 mg/ml) y Penicilina G Sódica (250 mg/ml) al medio de medida sobre la velocidad de eflujo neto de H⁺ (**A**) y de influjo de K⁺ (**B**) por raíces con contaminación endógena sin antibióticos (○), con Penicilina G Sódica + Cloranfenicol (●), con Cloranfenicol (□) y con Penicilina G Sódica (■). **Insertas**, los correspondientes datos directos de cambio de pH y pK del medio. los datos en A y B corresponden a los mismos experimentos representativos (n≥3) en cada caso, ya que las medidas de pH y pK se han realizado simultáneamente, con las mismas raíces en el mismo medio. (SD≤5% para VH⁺ y ≤10% para VK⁺).

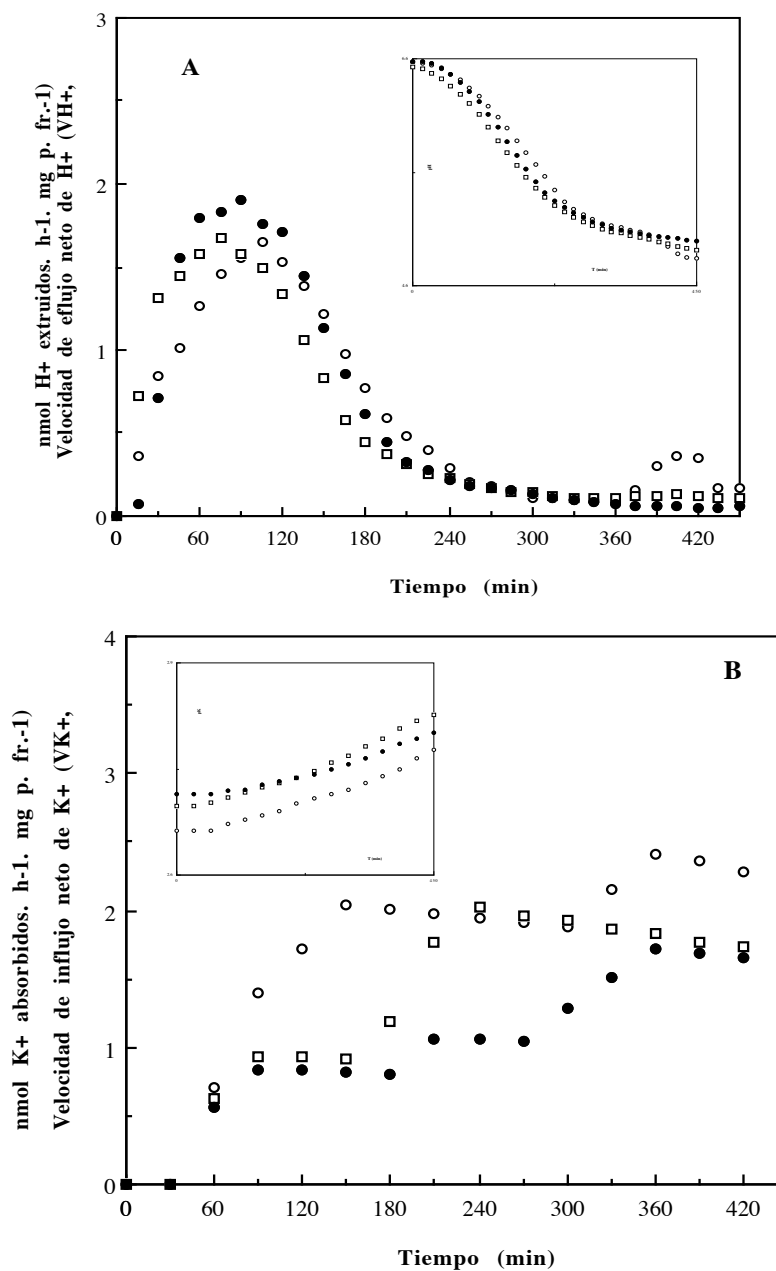


Fig 23: Efecto de la adición de Cloranfenicol (50 mg/ml) y Penicilina G Potásica (250 mg/ml) al medio de medida sobre la velocidad de eflujo neto de H⁺ (**A**) y de influjo de K⁺ (**B**) por raíces con contaminación endógena sin antibióticos (○), con Penicilina G Potásica + Cloranfenicol (●), y con Penicilina G Potásica (□). **Insertas**, los correspondientes datos directos de cambio de pH y pK del medio. los datos en A y B corresponden a los mismos experimentos representativos (n≥3) en cada caso, ya que las medidas de pH y pK se han realizado simultáneamente, con las mismas raíces en el mismo medio. (SD≤5% para VH⁺ y≤10% para VK⁺).

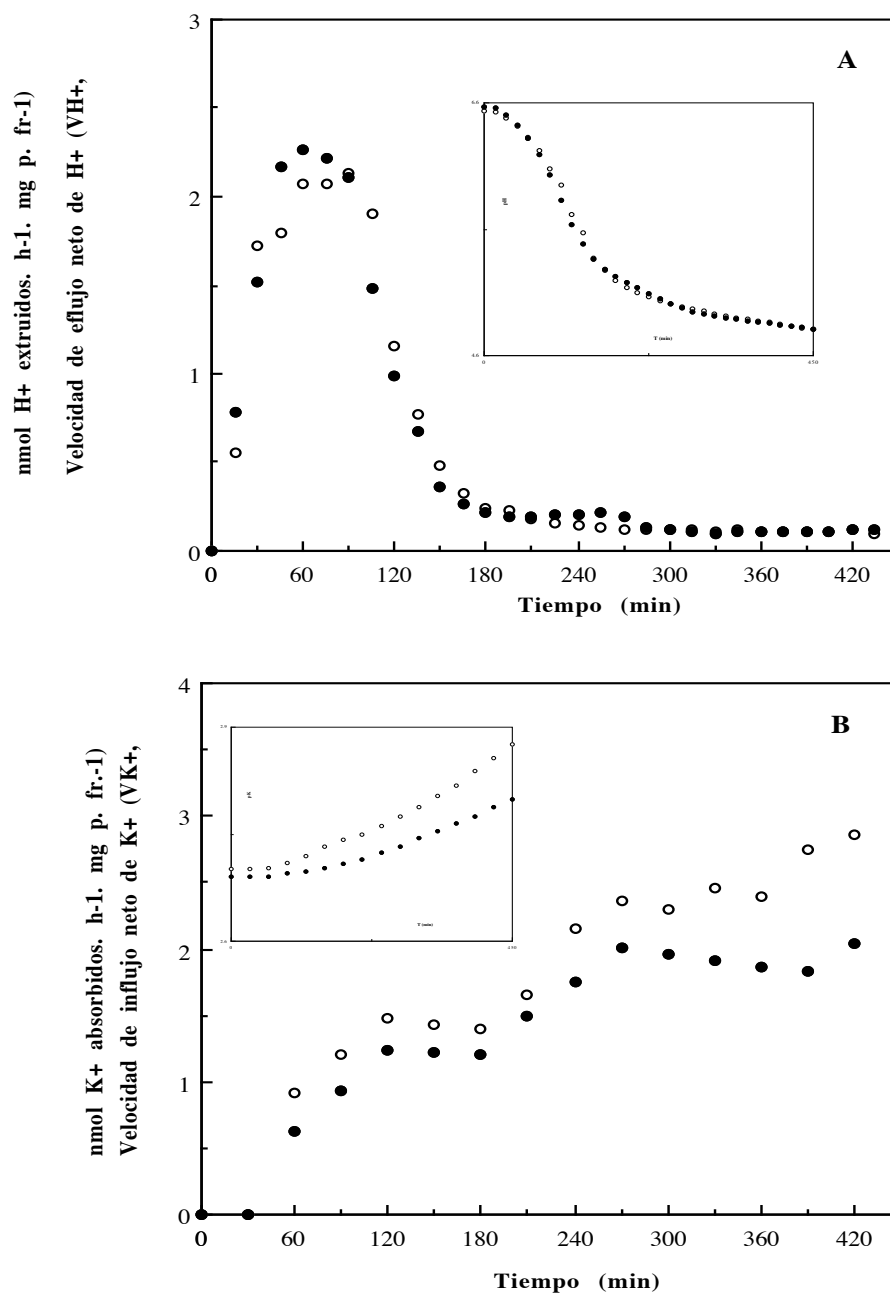


Fig 24: Efecto de la adición de Penicilina G Potásica (250 mg/ml) sobre la velocidad de eflujo neto de H⁺ (A) y de influjo de K⁺ (B) por raíces estériles procedentes de la remesa de semillas F medidos sin (○) y con (●) antibiótico en el medio. **Insertas**, los correspondientes datos directos de cambio de pH y pK del medio. los datos en A y B corresponden a los mismos experimentos representativos (n≥3) en cada caso, ya que las medidas de pH y pK se han realizado simultáneamente, con las mismas raíces en el mismo medio. (SD≤5% para VH⁺ y ≤10% para VK⁺).

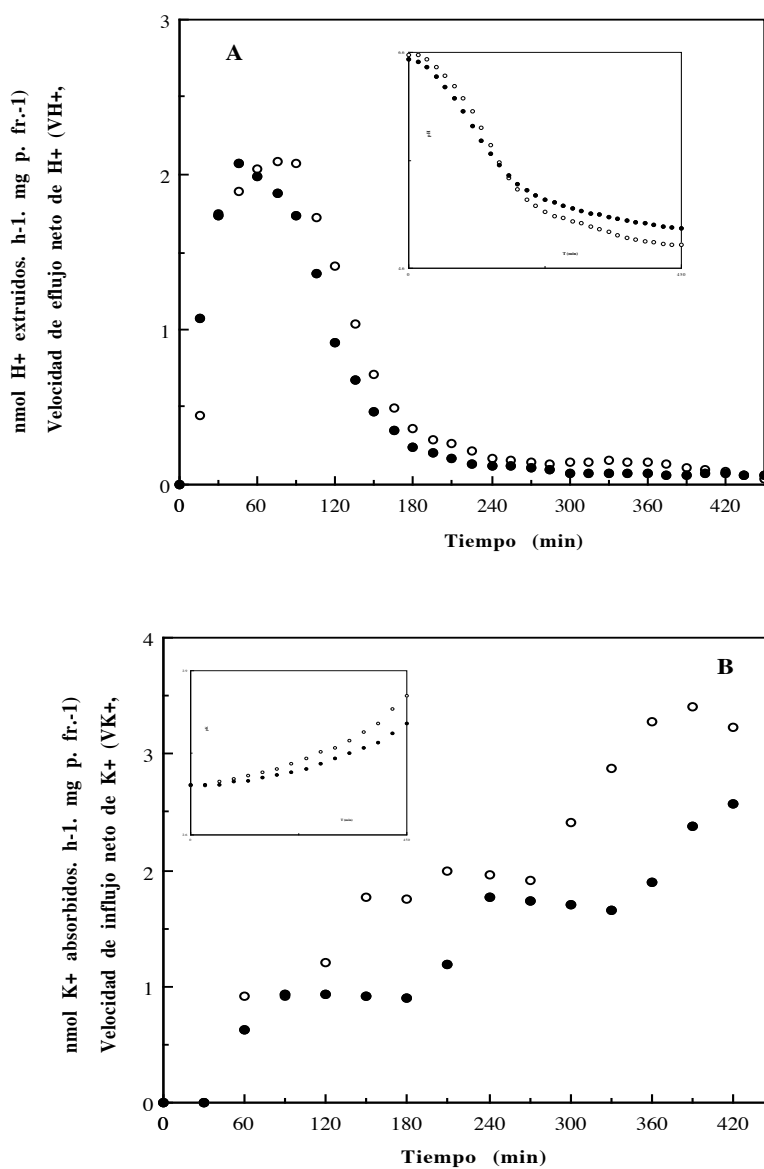


Fig 25: Efecto de la adición de Penicilina G Potásica (250 mg/ml) sobre la velocidad de eflujo neto de H⁺ (A) y de influjo de K⁺ (B) por raíces estériles procedentes de la remesa de semillas G medidos sin (○) y con (●) antibiótico en el medio. **Insertas**, los correspondientes datos directos de cambio de pH y pK del medio. los datos en A y B corresponden a los mismos experimentos representativos (n≥3) en cada caso, ya que las medidas de pH y pK se han realizado simultáneamente, con las mismas raíces en el mismo medio. (SD≤5% para VH⁺ y≤10% para VK⁺).

3.2.4. Comparación entre la concentración de K^+ en el medio de medida con el electrodo específico de K^+ , y con fotometría de llama, a lo largo de la cinética de flujo de K^+

Con objeto de comprobar si la medida de la concentración de K^+ en el medio con el electrodo específico de K^+ daba resultados correctos, durante una experiencia de cinética simultánea de flujos de H^+ y K^+ , realizamos medidas de la concentración de K^+ en el medio con un fotómetro de llama. Para ello tomamos muestras del medio en diferentes tiempos de la cinética que corresponden también a diferentes pH, como hemos visto, por si este factor pudiera afectar las medidas con el electrodo específico. Los resultados comparativos entre ambos tipos de medidas están recogidos en la **Tabla II**. Como puede observarse, las variaciones entre las medidas por uno y otro método están dentro del intervalo de variación admitido en estas metodologías ($\leq 5\%$).

[K+] (mM) fotometría de llama	[K+] (mM) electrodo selectivo
2.15	2.08
2.05	1.99
1.70	1.70
1.30	1.25

Tabla II: Comparación de las medidas de concentración de K^+ en el medio durante la cinética de flujos de H^+ y K^+ por raíces de girasol, obtenidas mediante fotometría de llama y electrodo selectivo de K^+ .

4.- ESTUDIO CINÉTICO DE LOS FLUJOS SIMULTÁNEOS DE H⁺ Y K⁺ CON DIFERENTES APORTES DE K⁺ EN EL MEDIO

Como hemos discutido en la Introducción, un aspecto esencial en la caracterización de los sistemas de transporte de K⁺ es su dependencia de la concentración externa de K⁺, siendo el estudio de la cinética de absorción de K⁺ de medios con diferente aporte del mismo objeto de los trabajos más importantes en este campo, desde Epstein (1966) hasta los más modernos de biología molecular. Por ello, y tendentes a caracterizar los sistemas de nuestras raíces "in vivo", y su acoplamiento o no al transporte de H⁺, se realizaron los siguientes experimentos, con la misma metodología descrita anteriormente para la medida simultánea del influjo neto de K⁺ y eflujo neto de H⁺, pero con diferentes aportes iniciales de K⁺ en el medio de medida.

Como, según la bibliografía, los Sistemas de transporte de K⁺ de alta (Sistema I de Epstein) y baja afinidad (Sistema II de Epstein) operan, aproximadamente, a concentraciones de K⁺ por debajo y por encima, respectivamente, de 1 mM, decidimos utilizar concentraciones mayores y menores de 1 mM: 0.25; 0.50; 1; 2 y 5 mM, para intentar poner de manifiesto el funcionamiento de ambos sistemas en nuestras raíces y su dependencia del transporte primario de H⁺, cuando uno u otro sistema está operando.

Después de las pruebas realizadas con diferentes remesas de semillas, comentadas en el apartado anterior, decidimos escoger una remesa que presentara las mejores características para medir la dependencia de concentración externa de K⁺ de los sistemas de transporte de K⁺ y H⁺ de nuestras raíces. Estas características eran, en general, un actividad de flujos de las raíces no demasiado elevada, ya que, como hemos visto en el citado apartado, ello podía llevar a un agotamiento del K⁺ del medio al final de los experimentos, que conduciría a una inhibición de la velocidad de absorción de K⁺ (VK⁺) a partir de un determinado momento. Es decir, queríamos raíces que se mantuvieran en periodo de absorción de K⁺ a lo largo de todo el tiempo en que se realizaban los experimentos. La remesa que, a nuestro juicio, cumplía mejor dichas características, y además disponíamos de abundante cantidad de semillas era la remesa E (**Figs 16 y 17E**); esta fue la remesa utilizada en estas experiencias.

En trabajos de nuestro laboratorio no incluidos en esta Memoria, se midió el pH citoplasmático de ápices de raíces de esta misma remesa, en el mismo medio standard, mediante espectroscopía de ³¹P-RMN, siguiendo la técnica de Amancio y Santos (1992). Encontramos un valor de **pH_{cit} muy constante y estable** (pH_{cit}=7.6±0.05) bajo muy variadas condiciones externas, incluyendo aquellas en que los sistemas de extrusión de H⁺ operan a pleno rendimiento, acidificando el medio en dos unidades de pH, como en los experimentos que aquí se describen (Espinosa et al., 1992; Paredes et al., 1993). Sólo la anoxia o el envenenamiento con CN⁻ acidificaba el pH citoplasmático significativamente. De esta forma, al ser el pH citoplasmático constante, se puede hacer una estimación del

gradiente de pH entre la célula y el medio ($\Delta\text{pH}_{i,o} = \text{pH}_{\text{citoplasmático, "in"}} - \text{pH}_{\text{externo, "out"}}$) en cada momento de la cinética, con sólo conocer el pH de la solución en ese punto, permitiendo así relacionar este ΔpH con la absorción de K^+ en ese momento.

Finalmente, hemos de señalar que, en estas experiencias, cuando necesariamente habían de compararse resultados que se obtienen en experimentos diferentes, realizados en condiciones diferentes (diferentes concentraciones de K^+ en el medio) se representa con los datos medios de tres experimentos independientes, indicándose en cada caso el margen de desviación de dichas medias.

4.1.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE K^+ SOBRE EL EFLUJO NETO DE H^+

En la **Fig 26** mostramos el efecto de las distintas concentraciones iniciales de K^+ en el medio de medida standard sobre la **velocidad de eflujo neto de H^+ (VH^+)** por las raíces. En la **Fig 26A** se representa la variación de **pH** frente al tiempo para las diferentes concentraciones de K^+ , a partir de la cual se calculaba **VH^+ (Fig 26B)**, teniendo en cuenta en cada caso la capacidad tampón (βH^+). Como puede observarse VH^+ es idéntica para las concentraciones 0.25, 0.50, 1 y 2 mM de K^+ en el medio, siendo sólo ligeramente superior en presencia de 5 mM de K^+ ($\text{VH}^+_{\text{max}} = 2.05$ nmol H^+ /h. mg. p. fr., frente a los 1.8 nmol H^+ /h. mg. p. fr. para el resto de las concentraciones), y además se alcanza un poco antes (≈ 60 min para 5 mM de K^+ frente a ≈ 90 min para el resto de las concentraciones).

De acuerdo con estos resultados, sólo una concentración de K^+ suficientemente alta parece tener una ligera influencia sobre el eflujo neto de H^+ , en el sentido de hacerlo más rápido (se alcanzan antes las velocidades máximas) y eficiente (mayor velocidad), probablemente a través de la activación directa de la H^+ -ATPasa propuesta por Briskin (1988) y Lin y Hanson (1976), o bien de la cadena redox (Lin, 1984).

4.2.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE K^+ EN EL MEDIO SOBRE EL INFLUJO NETO DE K^+

En la **Fig 27** se muestra el efecto que los diferentes aportes iniciales de K^+ en el medio de medida standard tienen sobre el influjo neto de este ion, por raíces "in vivo". En la **Fig 27A** se muestra la cinética de variación de **pK** para las distintas concentraciones de K^+ . A partir de estos valores, teniendo en cuenta la capacidad tampón para el K^+ (βK^+) para cada concentración de K^+ (**Fig 14**), que disminuye con dicha concentración, se han calculado las correspondientes velocidades de influjo neto de K^+ (**VK^+ , Fig 27B**).

Como puede comprobarse, para todas las concentraciones de K^+ probadas se observa un **lag de aproximadamente 60 min**, que es el tiempo que tarda en desarrollarse un $\Delta\text{pH}_{i,o}$ suficiente (desde $\Delta\text{pH}_{i,o} \approx 1.10$ al inicio del experimento hasta $\Delta\text{pH}_{i,o} \approx 1.23$, en el momento

en que comienza el influjo de K^+ , tras el lag). En este momento el eflujo neto de H^+ ha alcanzado ya la meseta de velocidades constantes y máximas (**Fig 26B**). Una vez que se inicia, el influjo de K^+ para todas las concentraciones de K^+ aumenta progresivamente, mostrando una o varias fases de saturación dependiendo del tiempo (y por tanto del $\Delta pH_{i,o}$, ya que el sistema de eflujo de H^+ de estas raíces está simultáneamente operando) y de la concentración de K^+ . Así, a tiempos menores de 180 min ($pH_o \approx 5.357$, $\Delta pH_{i,o} \approx 2.24$) la velocidad de influjo neto muestra una sola fase de saturación para todas las concentraciones de K^+ probadas. Esto sugiere que sólo un sistema de influjo de K^+ está operando. Cuando la $[K^+]_{ext}$ es inferior a 1 mM (0.25, 0.50 mM K^+), las cinéticas son claramente monofásicas y VK^+ permanece constante desde los 180 min hasta el final del experimento. Cuando $[K^+]_{ext}$ es de 1 mM, la cinética es bifásica, comenzando la segunda fase después de los 270 min ($pH_o \approx 5.084$, $\Delta pH_{i,o} \approx 2.51$) y no alcanzando una clara saturación al final de la cinética. A $[K^+]_{ext}$ de 2 mM la segunda fase comienza antes (≈ 210 min, $pH_o \approx 5.192$, $\Delta pH_{i,o} \approx 2.40$) y se satura aproximadamente a los 360 min. Finalmente, a la mayor $[K^+]_{ext}$ (5 mM) la segunda fase aparece aún más temprano, a los 180 min ($pH_o \approx 5.158$, $\Delta pH_{i,o} \approx 2.44$), saturándose a los 270 min.

Como hemos comentado en el apartado anterior, la variabilidad entre las repeticiones de un mismo experimento aumenta cuando cada fase alcanza la velocidad de saturación de cada lóbulo cinético, especialmente cuando opera la segunda fase. Así, las desviaciones de los valores medios eran cercanos al 10% para tiempos superiores a 180 min. Estos resultados, de acuerdo con Bellando et al. (1995), son atribuibles a oscilaciones homeostáticas que ocurren cuando se está cerca de las condiciones de equilibrio, debido a que la actividad transitoria de los carriers K^+/H^+ no es constante en tiempo o duración.

La dependencia de la velocidad de influjo neto de K^+ respecto de la concentración de K^+ en el medio la mostramos en la **Fig 28**, en la cual representamos la velocidad máxima de influjo neto de K^+ para cada concentración externa de K^+ , frente a $[K^+]$ en el medio a diferentes tiempos (**Fig 28A**), comenzando a los 180 min cuando empiezan a observarse cinéticas bifásicas. En la **Fig 28B** representamos los dobles recíprocos ($1/VK^+$ frente a $1/[K^+]$). Tanto uno como otro tipo de representación muestran curvas típicas de Michaelis-Menten, sugiriendo el funcionamiento en nuestras raíces de dos sistemas de transporte saturables por sustrato (K^+), con alta y baja afinidad por el mismo, como indican la mayoría de los autores para raíces de diferentes especies (no se ha observado ninguna fase lineal similar a la descrita por Kochian y Lucas, 1982). Nuestros resultados son similares a los de Epstein et al. (1973), que describen la presencia de dos sistemas de influjo de K^+ en raíces de cebada operando a concentraciones de K^+ por debajo (Sistema I) y por encima (Sistema II) de 1 mM, y mostrando ambos sistemas cinéticas saturables del tipo Michaelis-Menten. Siguiendo la terminología de Epstein, el Sistema I (1ª fase) de nuestras raíces es el más eficiente, puesto que comienza a funcionar antes, cuando el pH_o es ≈ 6.365 ($\Delta pH_{i,o} \approx 1.23$), siendo capaz de absorber K^+ de soluciones con baja

concentración (quizás gastando energía metabólica adicional, como sugieren Kochian y Lucas, 1993). Cuando este sistema ha alcanzado su máxima velocidad de funcionamiento y se halla saturado, pero en el medio sigue existiendo una concentración de K^+ suficientemente alta y suficiente $\Delta pH_{i,o}$ (2.40-2.50), se pone en funcionamiento el Sistema II (2ª fase), haciendo que la cinética se convierta en bifásica.

Siguiendo esta interpretación, **nuestros resultados pueden resumirse en la siguiente secuencia:** a) A tiempos menores de 60 min ($\Delta pH_{i,o} < 1.23$), no puede haber influjo de K^+ porque el $\Delta pH_{i,o}$ creado por la actuación de la bomba de extrusión de H^+ no es suficiente como para que operen ni el Sistema I ni el II. b) Entre 60 y 180 min ($\Delta pH_{i,o} \approx 1.23$ a 2.24) solamente el Sistema I opera, independientemente de la concentración de K^+ que exista en el medio, probablemente porque el $\Delta pH_{i,o}$ es demasiado pequeño para impulsar el funcionamiento del Sistema II (presumiblemente canales K^+_{in}). c) A tiempos mayores de 180 min ($\Delta pH_{i,o} \geq 2.24$) el sistema II comienza a funcionar (los canales K^+_{in} comienzan a abrirse) cuando la concentración de K^+ es superior a 1 mM. d) A tiempos mayores, conforme el pH_o sigue bajando y el $\Delta pH_{i,o}$ aumentando debido al continuo eflujo neto de H^+ por las raíces, el Sistema II opera incluso a concentraciones inferiores a 1 mM (esto puede verse más claramente en la representación de dobles recíprocos (**Fig 28B**): a los 420 min, $\Delta pH_{i,o} \approx 2.73$, la segunda fase -Sistema II- comienza con 0.5 mM de K^+ en el medio). En consecuencia, en nuestras experiencias las diferentes fases de la cinética de absorción de K^+ deben ser referidas tanto al tiempo (y por tanto a $\Delta pH_{i,o}$) como a la concentración de K^+ del medio. El funcionamiento exclusivo del Sistema I (la 1ª fase) se restringe a aquellas condiciones en que no puede operar el Sistema II, no sólo a causa de la baja concentración de K^+ presente en el medio, como indican los otros autores, sino también dependiendo del $\Delta pH_{i,o}$ creado por el sistema primario de extrusión de H^+ .

Así, una **importante conclusión** de estas experiencias es que, en condiciones naturales, donde tanto los sistemas de extrusión de H^+ como de absorción de K^+ funcionan simultáneamente, el intervalo de concentración de K^+ al cual opera cada uno de los dos Sistemas (o fases) de absorción del ion (I o II) depende del tiempo que está funcionando el sistema de extrusión de H^+ , y por tanto del $\Delta pH_{i,o}$ creado por este Sistema de transporte primario entre la célula y el medio externo. De nuevo hemos de resaltar las similitudes entre la situación descrita para nuestras raíces y la de las raíces seminales de centeno (White y Lemtiri-Chlieh, 1995).

En conclusión, el comportamiento tan diferente del transporte de H^+ y el de K^+ bajo diferentes concentraciones de K^+ externo, que incluyen grandes cambios en las características cinéticas del influjo de K^+ , mientras que el eflujo de H^+ se afecta muy ligeramente, hemos de tomarlo como prueba de que ambos Sistemas de transporte no están directamente acoplados, sino que los Sistema transportadores de H^+ parecen conducir y modular los sistemas de transporte de K^+ , como hemos discutido.

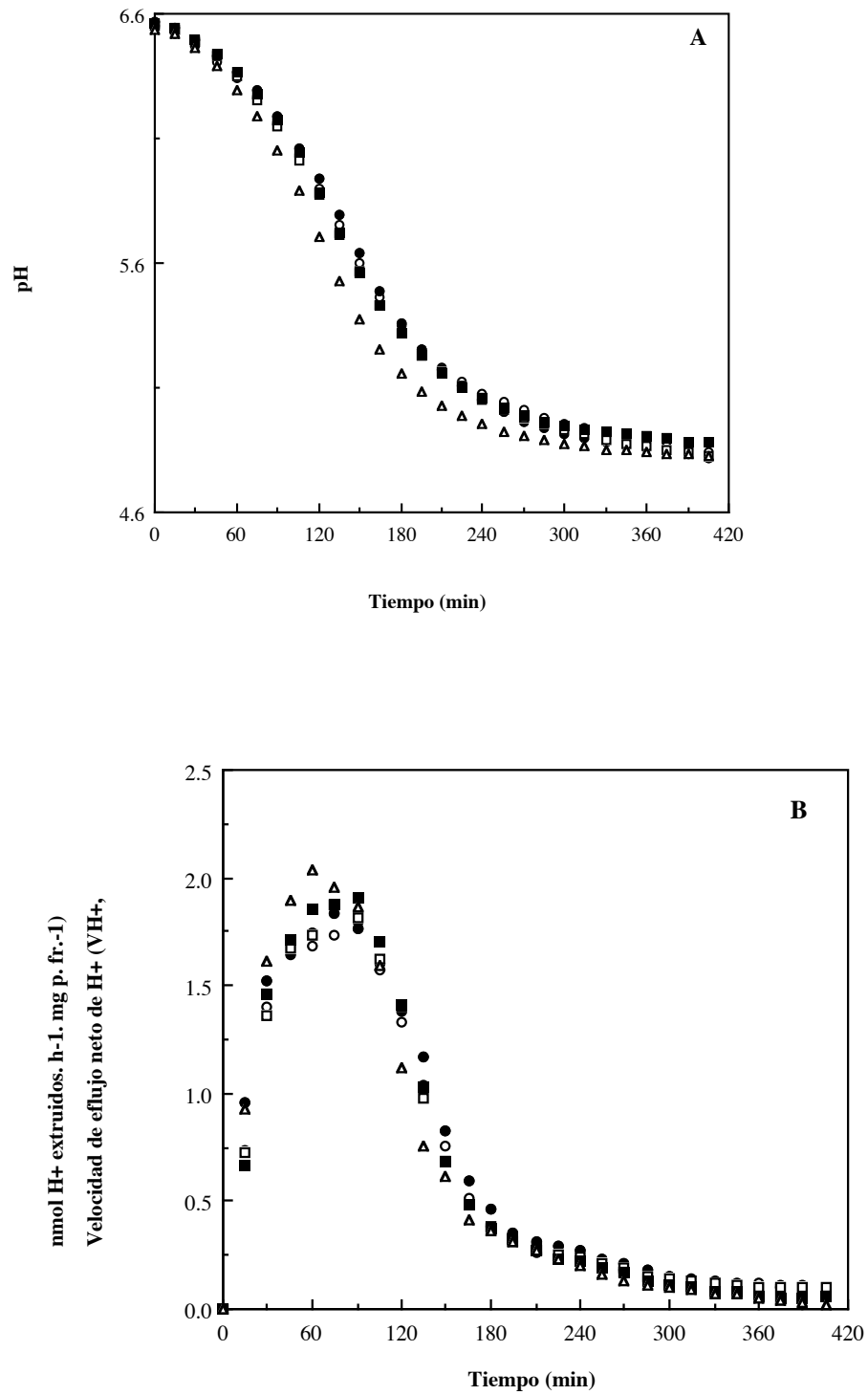


Fig 26: Cinética de variación de pH (A) y VH⁺ (B) por 175 raíces con diferentes concentraciones iniciales de K⁺ en el medio de medida (50 ml Hepes 1 mM, CaCl₂ 1 mM): 0.25 (○), 0.50 (●), 1 (□), 2 (■) y 5 mM (△). Cada valor es media de, al menos, 3 experimentos independientes (Desviación ≤5%).

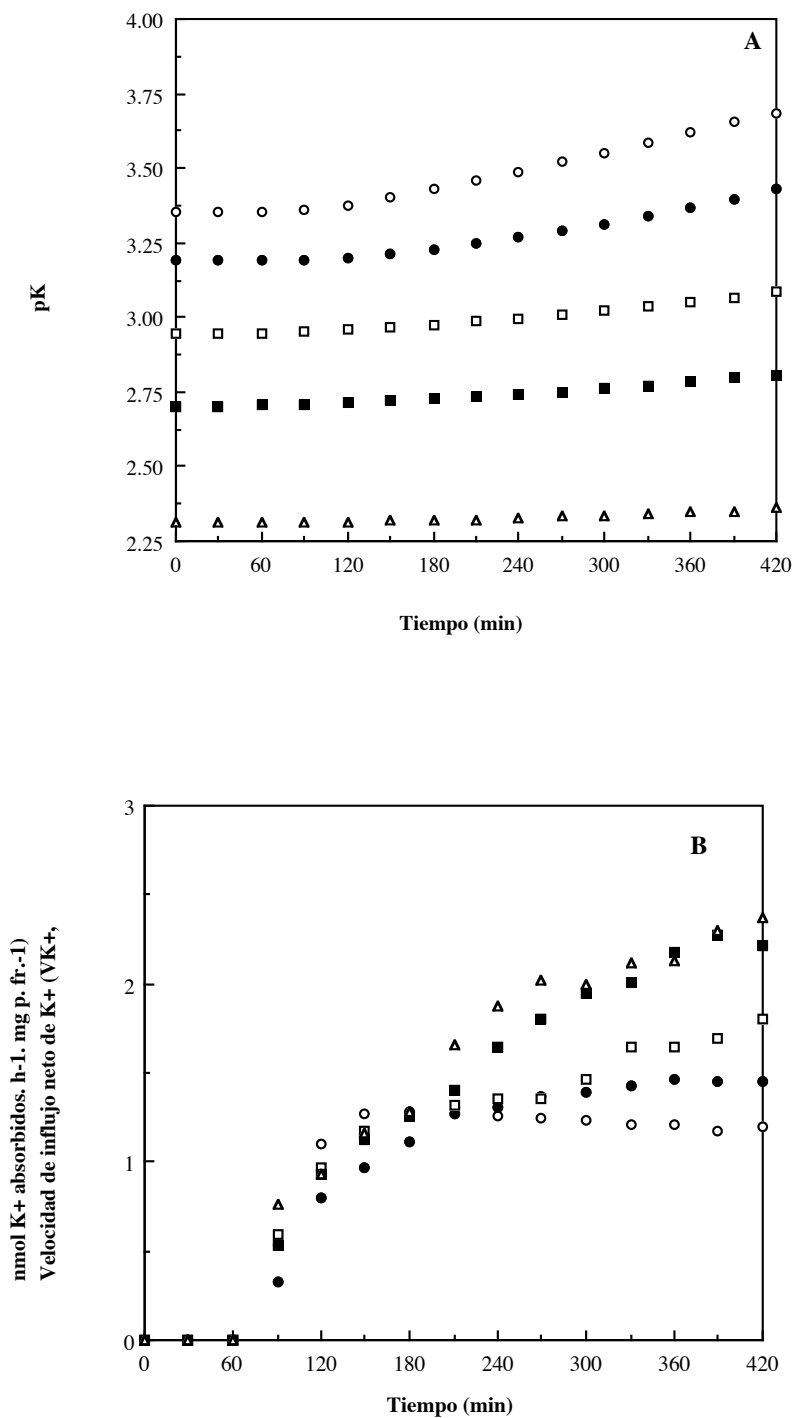


Fig 27: Cinética de variación de pK (A) y V_{K^+} (B) por 175 raíces con diferentes concentraciones iniciales de K^+ en el medio de medida (50 ml Hepes 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM): 0.25 (○), 0.50 (●), 1 (□), 2 (■) y 5 mM (△). Cada valor es media de, al menos, 3 experimentos independientes (Desviación $\leq 5\%$ a tiempos menores de 180 min y entre el 5 y 10% a tiempos superiores).

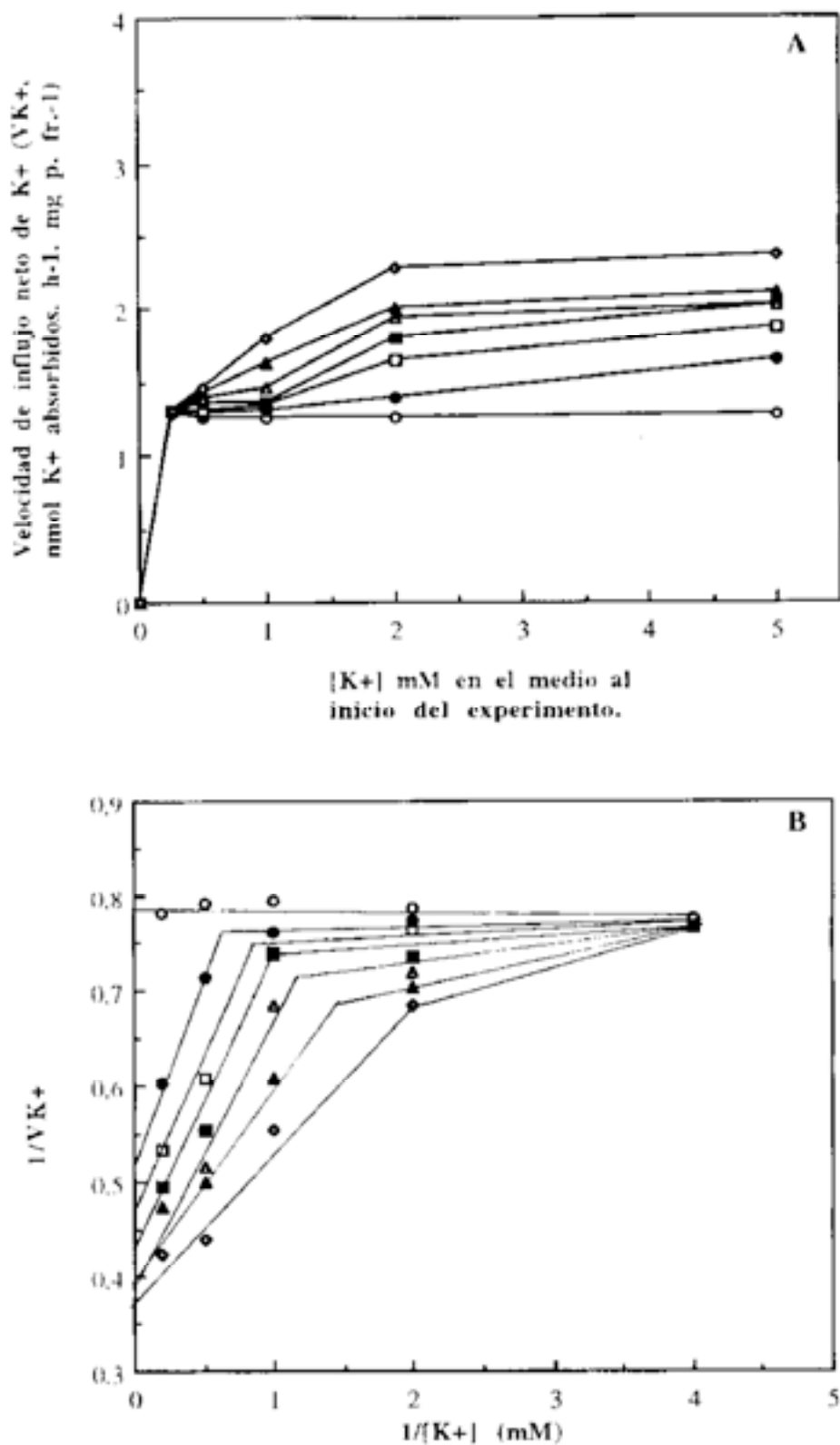


Fig 28: Velocidad de influjo neto de K^+ frente a la concentración de K^+ en el medio. (A) velocidad máxima de influjo neto de K^+ para las diferentes concentraciones de K^+ a los 180 (○), 210 (●), 240 (□), 270 (■), 300 (△), 330 (▲) y 420 min (◇). (B) Representación de los dobles recíprocos de los datos de A. Las desviaciones de las medias son $\leq 5\%$ hasta 180 min y entre 5 y 10% para tiempos superiores.

5.- ESTUDIO DE LA ACCION DE ALGUNOS EFECTORES SOBRE LOS FLUJOS SIMULTANEOS DE H⁺ Y K⁺ POR LAS RAICES

Para intentar poner de manifiesto el posible acoplamiento, o no, entre los flujos simultáneos de H⁺ y K⁺, hemos realizado el estudio de la acción de algunos efectores sobre dichos flujos. La actuación de estos efectores está descrita ampliamente en la Introducción, dividiéndose en cuatro grandes grupos según el lugar donde, de acuerdo con la bibliografía, tengan su lugar de acción:

- 1) **Sobre el transporte de K⁺: Valinomicina** (ionóforo de K⁺) y **Ouabaina** (inhibidor de la Na⁺/K⁺-ATPasa, en caso de que éste sea el transportador responsable).
- 2) **Sobre los canales de H⁺: DCCD** (bloqueador de canales de H⁺)
- 3) **Sobre la H⁺-ATPasa de plasmalema: Oligomicina** (inhibidor de la ATPasa mitocondrial cuando penetra al interior celular y de la H⁺-ATPasa del plasmalema) y **Vanadato** (inhibidor de la H⁺-ATPasa de plasmalema)
- 4) **Sobre la cadena redox del plasmalema: NADH y HCF (II)** (donadores de electrones), **cis-Platino (II)** (bloqueante de la cadena redox), y **HCF (III), HCl (IV), citocromo c, DCIP y DCIP-S** (aceptores de electrones).

Algunos de estos compuestos necesitan disolverse en **etanol** (ver capítulo de Materiales y Métodos), por lo que debemos realizar **controles de disolvente** para comprobar que el efecto que provocan dichos efectores sobre los flujos simultáneos de H⁺ y K⁺ no es debido al etanol añadido con ellos. Para ello realizamos varias experiencias en las que, usando la máxima cantidad de etanol añadida con el efector (300 μ l, lo que corresponde a una concentración de 102 μ M), estudiamos el efecto que produce sobre ambos flujos, utilizando para ello la remesa de semillas H (ver **Fig. 17H**), la que presenta mayor actividad de flujos.

La adición de los 300 μ l de etanol se realiza cuando el pH del medio es 6.0, que es el pH al que se adicionan los efectores que llevan etanol. En la **Fig 29** comparamos la variación de pH y VH⁺ (con y sin etanol), observándose cómo prácticamente no existe variación alguna (las variaciones entran dentro del margen de variabilidad entre repeticiones); es decir, el etanol no parece afectar al flujo neto de H⁺ por nuestras raíces, resultado similar al obtenido por otros autores (Bown y Crawford, 1988; Espinosa, 1991).

El efecto del etanol sobre el transporte de K⁺, medido simultáneamente con el de H⁺, se muestra en la **Fig 30**, donde representamos la correspondiente variación de pK y de VK⁺ en ausencia y presencia de la misma concentración de etanol. Como puede comprobarse, dicha concentración de etanol tampoco altera significativamente la cinética del influjo neto de K⁺ (las variaciones entran dentro del margen de variabilidad entre repeticiones).

En conclusión, podemos decir que **el etanol**, al menos en la concentración utilizada en estos experimentos, **no altera ni el eflujo neto de H⁺ ni el influjo neto de K⁺** por las raíces estériles de girasol, con lo cual, los efectos que se observen al adicionar los

diferentes efectores disueltos en él, serán debidos a dichos compuestos, y no a efectos achacables al etanol en que se disuelven.

La **expresión de los resultados en las experiencias con efectores** siguió siempre la misma pauta:

En primer lugar, mostramos **un experimento representativo**, para poder estudiar el efecto del aditivo simultáneamente sobre ambos flujos de H^+ y K^+ , que están ocurriendo al mismo tiempo, en la misma cámara de medida, por las mismas raíces. En esta representación no se utilizan valores medios, ya que pequeñas diferencias en el tiempo entre una repetición y otra llevarían a que, al realizar las medias, se pudiera perder información clave acerca de la simultaneidad o el retardo de los efectos del aditivo sobre uno y otro flujo, que es fundamental para poner de manifiesto la existencia de un acoplamiento directo o indirecto de ambos flujos, objetivo de esta Memoria, y que fue lo que condicionó la realización de las medidas simultáneas de ambos flujos.

En segundo lugar cuando realizamos un estudio del efecto de las concentraciones del aditivo, en comparación con el control, que necesariamente han de llevarse a cabo en experimentos diferentes, realizamos un estudio comparativo del efecto que presentan dichas concentraciones sobre cada uno de los flujos por separado, utilizándose en este caso los **valores medios de, al menos 3 experimentos independientes** en cada caso, y cuyas desviaciones son siempre $\leq 5\%$ en el eflujo de H^+ y entre el 5 y el 10% de dicha media para el influjo de K^+ .

Finalmente al objeto de calcular el IC_{50} (concentración de aditivo que provoca la inhibición del 50% de la actividad de flujos), expresamos los valores medios de VH^+ y VK^+ , por separado, como % de los testigos (a lo que llamamos **Actividad relativa** del flujo que se trate). En este caso, y por tratarse de un porcentaje, no es correcta la estimación de desviaciones de las medias.

En aquellos casos en que se consideró un dato interesante para la interpretación de los resultados, se incluyen representaciones de **flujo neto total** (J) de H^+ y K^+ (nmol totales de H^+ extruidos o K^+ absorbidos por las raíces al final de la cinética).

Todas las experiencias con efectores, excepto las de Valinomicina, se realizaron con **2 mM de concentración de K^+** en el medio standard (Hepes 1 mM $CaCl_2$ 1 mM).

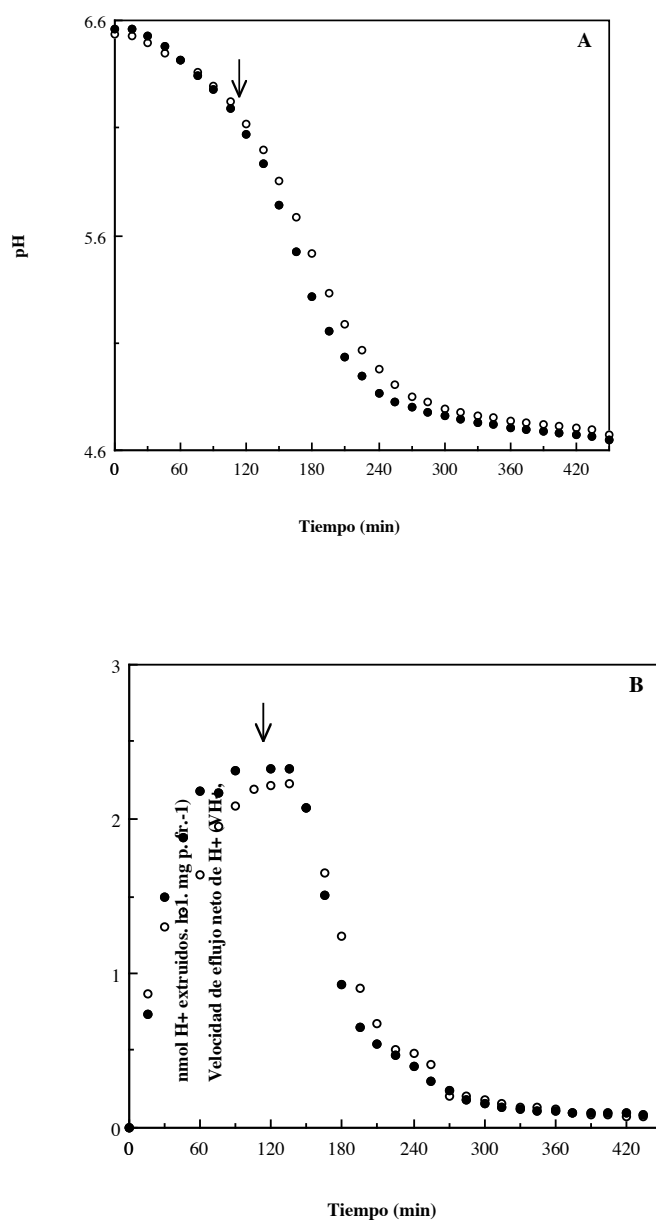


Fig 29: (A) Cinética de variación de pH y (B) V_{H^+} por 175 raíces en 50 ml Hepes 1 mM $CaCl_2$ 1 mM, KCl 2 mM sin (○) y con (●) 300 μ l de etanol. La flecha indica el momento de adición del etanol. Los datos son medias de, al menos, 3 experimentos independientes (desviación $\leq 5\%$).

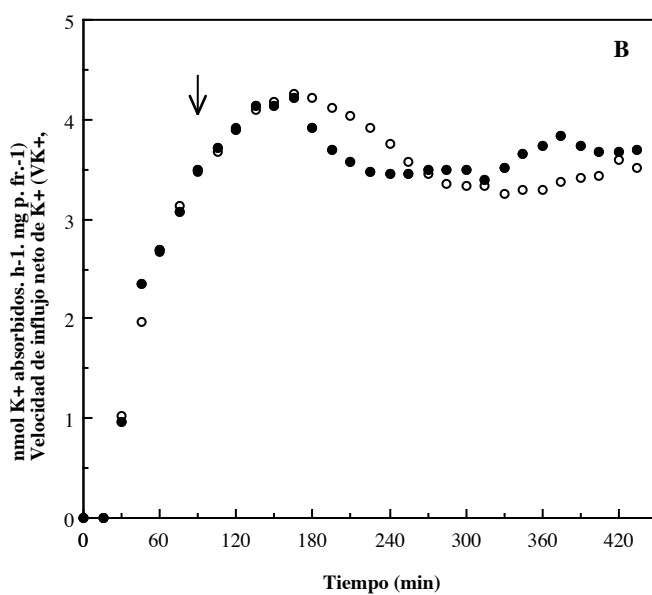
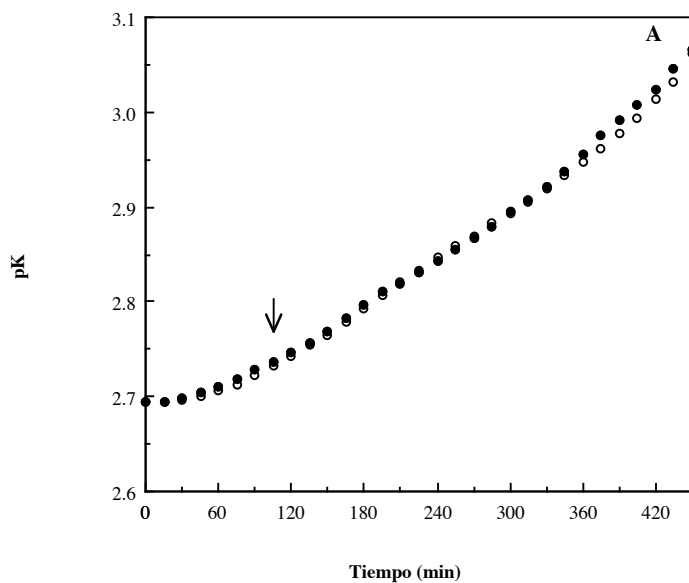


Fig 30: (A) Cinética de variación de pK y (B) VK^+ por 175 raíces en 50 ml HEPES 1 mM $CaCl_2$ 1 mM, KCl 2 mM sin (○) y con (●) 300 μ l de etanol. La flecha indica el momento de adición del etanol. Los datos son medias de, al menos, 3 experimentos independientes (desviación entre el 5 y el 10%).

5.1.- EFECTORES QUE ACTUAN SOBRE EL TRANSPORTE DE K^+

5.1.1.- Efecto de la VALINOMICINA sobre la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+

La Valinomicina, como se describe en el apartado 4.1.1. de Introducción, es un **ionóforo de K^+** , pudiendo producir un eflujo casi instantáneo del catión; este eflujo daría lugar a la igualación de las concentraciones de K^+ a ambos lados del plasmalema alterando el potencial de dicha membrana en el sentido de la hiperpolarización de la misma. En esta hiperpolarización podría también intervenir la H^+ -ATPasa; así, Lin y Hanson (1976) describen una hiperpolarización transitoria provocada por la adición de Valinomicina, que ellos atribuyen a la estimulación de dicha H^+ -ATPasa. De todas formas, sea cual sea la causa, la hiperpolarización modifica los flujos de K^+ , a través de la apertura de los canales K^+_{in} (Blatt, 1997).

Por todo ello, la Valinomicina podría ayudar a demostrar si el eflujo de H^+ está estrechamente acoplado al influjo de K^+ , ya que si ambos cationes fueran transportados por el mismo sistema, los cambios causados en el transporte de K^+ (debido al ionóforo) se reflejarían inmediatamente en el eflujo de H^+ .

Las experiencias con Valinomicina las realizamos con la **remesa E** de semillas (**Fig 17E**), en presencia de **alto y bajo aporte inicial de K^+ en el medio (2 mM y 0.50 mM)**, para tratar de poner de manifiesto el efecto cuando el Sistema I o el Sistema II están operando.

El primer paso necesario es la calibración de las **capacidades tampón (βH^+ y βK^+)** del medio con raíces y Valinomicina. La concentración utilizada de Valinomicina es 20 $\mu g/ml$, cantidad que no altera la capacidad tampón de las raíces preincubadas en NaCN para los distintos valores de pH, como puede observarse en la **Fig 31A**, al menos entre pH 4.7 y 6.0, intervalo en el que realizamos la calibración con este aditivo, ya que, en los experimentos con raíces "in vivo", la adicionamos cuando el pH del medio es 6.0. Así, la curva a la cual se ajustan los datos de las calibraciones, como en el caso de la calibración sin aditivo alguno, es una polinómica de 2º grado, aunque algo más abierta. Tampoco varía la capacidad tampón para los distintos pK (**Fig 31B**), prácticamente coincidente con la obtenida sin Valinomicina en el medio.

En las **Figs 32 y 33** se muestra un **experimento representativo (n=3) de la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+** con 20 $\mu g/ml$ de Valinomicina (**A**), comparándose con un experimento control (**B**). En la **Fig 32** el aporte inicial de K^+ en el medio es alto (2 mM), mientras que en la **Fig 33** se muestran las mismas medidas con aporte inicial de K^+ bajo (0.50 mM). En las **insertas** se muestran los datos directos de variación de pH y pK del medio, a partir de los cuales, teniendo en cuenta las respectivas capacidades tampón (βH^+ y βK^+ de la **Fig 31**), se han calculado las respectivas velocidades de flujo (VH^+ y VK^+). Por último, en las **Figs 34 y 35** se representan los valores medios (n=3) de VH^+ (**A**) y VK^+

(B) con y sin Valinomicina, para las dos concentraciones de K^+ probadas, para una mejor comparación del efecto del inhibidor sobre ambos flujos por separado.

Como puede observarse, la adición de Valinomicina al medio, cuando la absorción de K^+ ya ha comenzado claramente, tras el lag (a los 105 min, $pH_o=6.0$) no provoca diferencias significativas en la cinética de **eflujo neto de H^+** respecto a los controles sin aditivo, ni en los experimentos con aporte inicial alto (**Fig 32 y 34**) ni bajo (**Fig 33 y 35**) de K^+ en el medio. Al menos en este material, la Valinomicina no afecta el eflujo de H^+ , tanto si está operando el Sistema I como el II de absorción de K^+ . Varios autores (Sze, 1980; Churchill et al., 1983; Scherer, 1982; Wang y Sze, 1984) han demostrado cómo la Valinomicina sólo tiene poco efecto sobre la estimulación de la H^+ -ATPasa, mientras que si se adiciona junto con CCCP (ionóforo de H^+) se observa una estimulación mayor; ello ha de ser interpretado como la carencia de un efecto, al menos directo, de la Valinomicina sobre la H^+ -ATPasa.

Por el contrario, la adición de Valinomicina provoca un aumento inmediato de la concentración de K^+ en el medio (reflejado en la **inserta** de las **Fig 32 y 33** como **disminución de pK**) indicando que ocurre un repentino y fuerte eflujo de K^+ desde las raíces al exterior. Este es el resultado esperado, ya que la Valinomicina permite la distribución del K^+ a ambos lados de la membrana plasmática de acuerdo con el potencial de Nerst para este catión. Sin embargo, el eflujo neto de K^+ es transitorio, recuperándose de nuevo el influjo neto, a velocidades normales, lo que provoca que la concentración de K^+ del medio disminuya de nuevo, aunque permanece un poco superior a la de los controles, sin Valinomicina (comparar **A** y **B** de las **Figs 32 y 33**).

El efecto es similar en las experiencias con concentraciones de K^+ alta (2 mM, **Fig 32 y 34**) o baja (0.5 mM, **Fig 33 y 35**), aunque cuantitativamente la respuesta es más acusada en el primer caso, de tal forma que en el intervalo de tiempo en que aumenta la **velocidad de influjo (VK^+)**, tras el breve periodo de eflujo, VK^+ multiplica por 5 los valores normales, mientras que para 0.50 mM de K^+ la velocidad se multiplica por 3.5; es decir, el efecto de la Valinomicina es similar tanto si opera el Sistema I como el II, aunque cuantitativamente es diferente. Esta respuesta no es atribuible a cambios de la capacidad tampón (βK^+) por efecto de la Valinomicina, puesto que, como hemos comprobado, esta capacidad tampón no se ve afectada, y lo poco que pudiera afectarse ha sido corregido en el cálculo de VK^+ .

La rápida recuperación del influjo de K^+ debemos atribuirla a una fuerte y transitoria estimulación de los sistemas de absorción de K^+ , probablemente por la apertura masiva de canales K^+_{in} , impulsada por la hiperpolarización de la membrana provocada por la salida masiva de carga (+) (Blatt, 1997), que acaba compensando el eflujo debido al ionóforo, puesto que no parece probable que la Valinomicina pueda ser eliminada o destruida durante el corto tiempo en que ocurre dicha recuperación. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Lin y Hanson (1976) que comprueban que, al adicionar

Valinomicina, se produce una hiperpolarización de la membrana debido a la rápida salida de K^+ , seguida de un fuerte aumento de la velocidad de influjo para recuperar el potencial de equilibrio; una vez alcanzado este nuevo potencial de equilibrio, el influjo de K^+ se realiza normalmente. Según datos recientes de patch-clamp en protoplastos de raíces seminales de centeno (White y Lemtiri-Chlieh, 1995), altos voltajes (hiperpolarización) abren los canales de absorción de K^+ (K^+_{in}), tanto a baja como a alta concentración externa de K^+ , y ésta podría ser la causa de que la respuesta de nuestras raíces sea la misma con alta y baja concentración de K^+ en el medio.

Como **conclusión**, podemos decir que la Valinomicina no afecta al transporte de H^+ de las raíces de girasol aunque sí lo hace, fuertemente, sobre el transporte de K^+ . Puesto que las medidas de ambos flujos las realizamos de forma simultánea, siendo el medio de medida y las raíces las mismas, podemos decir que, al menos en estas raíces, los sistemas de absorción de K^+ no están directamente acoplados a los sistemas de eflujo de H^+ , siendo más probable que exista un acoplamiento indirecto. Así, parece que la extrusión de H^+ y la intrusión de K^+ en raíces de plántulas de girasol no sucede a través de un sistema transportador único (H^+/K^+ ATPasa ó Antiporteador H^+/K^+), ni en el intervalo de $[K^+]$ externa en que está funcionando el Sistema I ni el II, ya que los parámetros cinéticos del transporte de H^+ y K^+ son distintos en cuanto a su respuesta a la Valinomicina. Nuestros resultados se ajustarían mejor a un acoplamiento indirecto (como los resultados de Vara y Serrano, 1982), donde la H^+ -ATPasa produciría la fuerza conductora para un transporte de K^+ secundario, por carriers o canales. Estos resultados coinciden con la hipótesis de Sussman (1994) en su revisión sobre las proteínas de membrana plasmática, siendo también compatibles con el modelo propuesto por Schchatman y Schroeder (1994) para el Sistema I (simporte de K^+ - H^+) y Sistema II (canales de K^+ “inward-rectifying”), ambos energizados por un sistema primario de eflujo de H^+ (la bomba y/o la cadena redox) que crea el ΔpH entre el interior y el exterior celular necesario para el posterior transporte de K^+ .

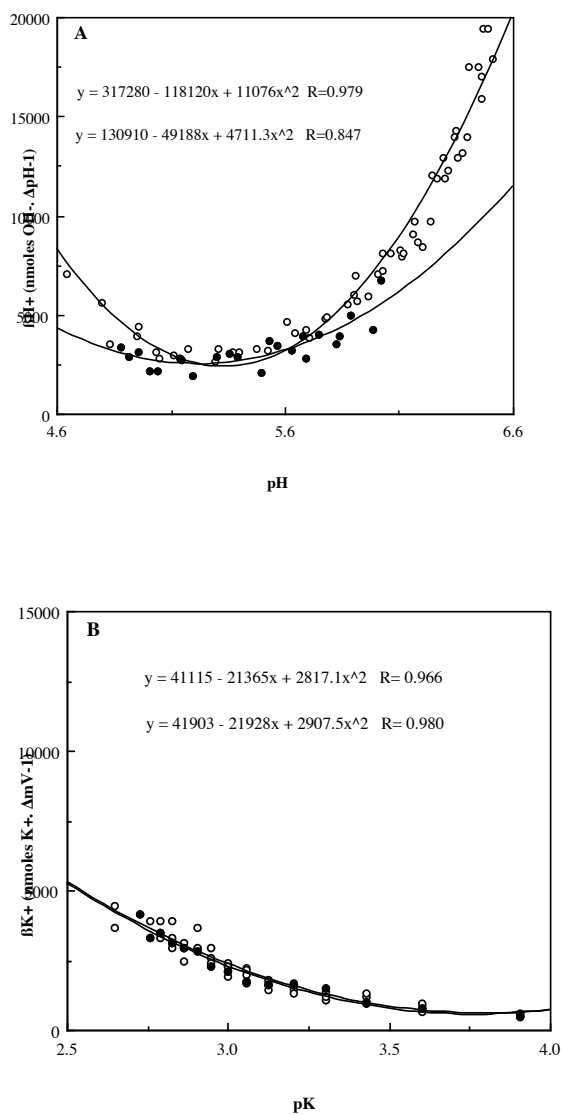


Fig 31: Capacidad tampón del medio con 175 raíces preincubadas en NaCN, sin (○) y con (●) 20 $\mu g/ml$ de Valinomicina. **(A)** Capacidad tampón para H^+ (βH^+). **(B)** Capacidad tampón para K^+ (βK^+).

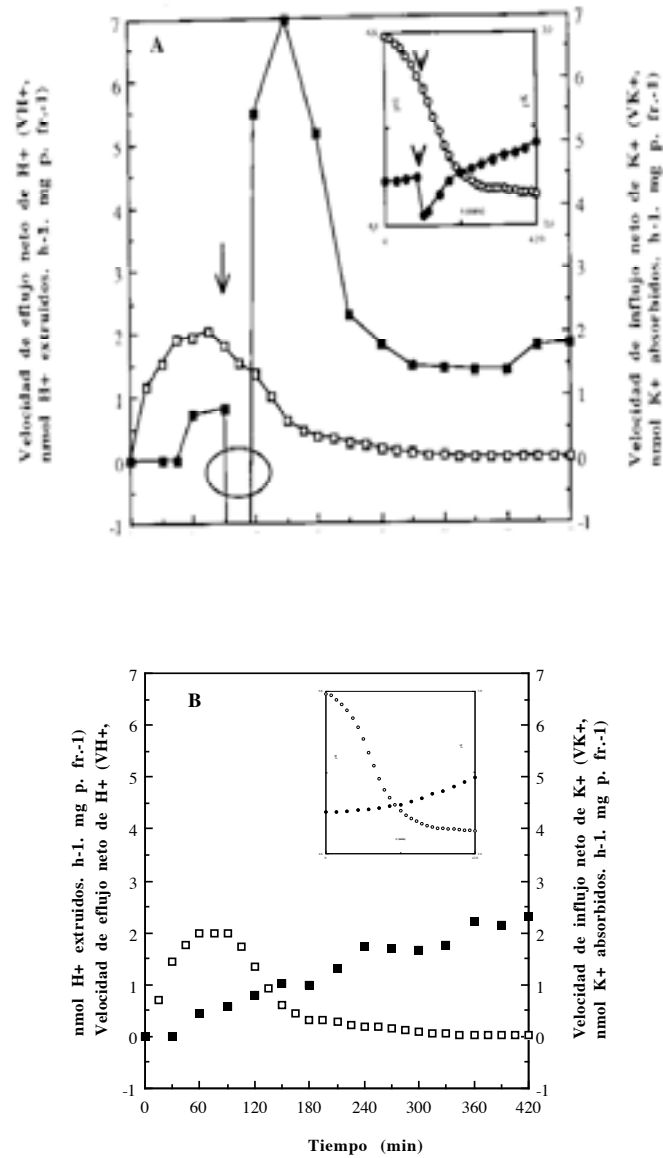


Fig 32: Velocidades netas de eflujo de H^+ (\square) e influjo de K^+ (\blacksquare) por las raíces medidas simultáneamente con aporte inicial de K^+ alto (2 mM), (A) con y (B) sin 20 μ g/ml de Valinomicina, adicionada en el momento indicado por la flecha. \circ Rápido eflujo de K^+ . **Inserta**, los datos directos de disminución de pH (\circ) e incremento pK (\bullet) del medio. Los resultados se corresponden con un experimento representativo ($n \geq 3$).

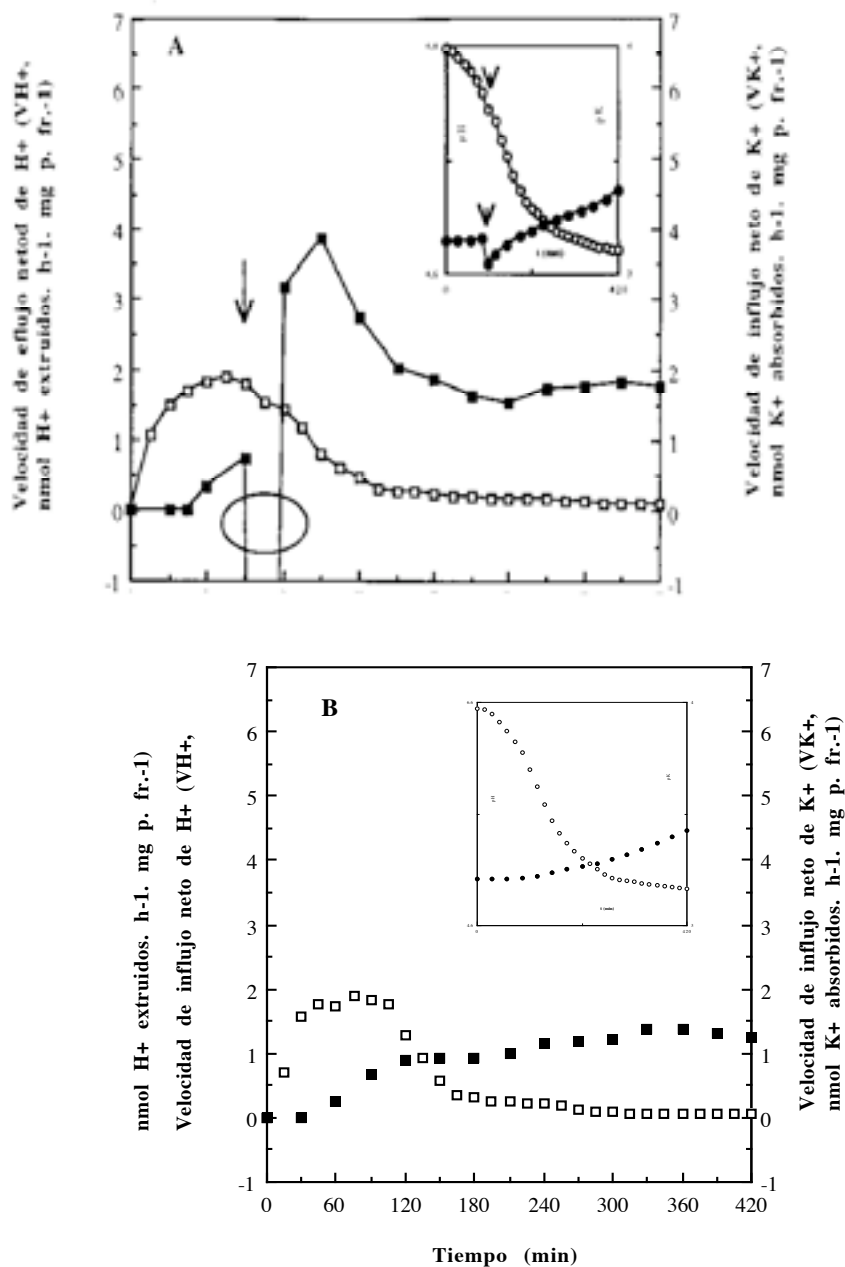


Fig 33: Velocidades netas de eflujo de H^+ (\square) e influjo de K^+ (\blacksquare) por las raíces medidas simultáneamente con aporte inicial de K^+ bajo (0.50 mM), (**A**) con y (**B**) sin $20 \mu\text{g/ml}$ de Valinomicina, adicionada en el momento indicado por la flecha. \circ Rápido eflujo de K^+ . Inserta, los datos directos de disminución de pH (\circ) e incremento pK (\bullet) del medio. Los resultados se corresponden con un experimento representativo ($n \geq 3$).

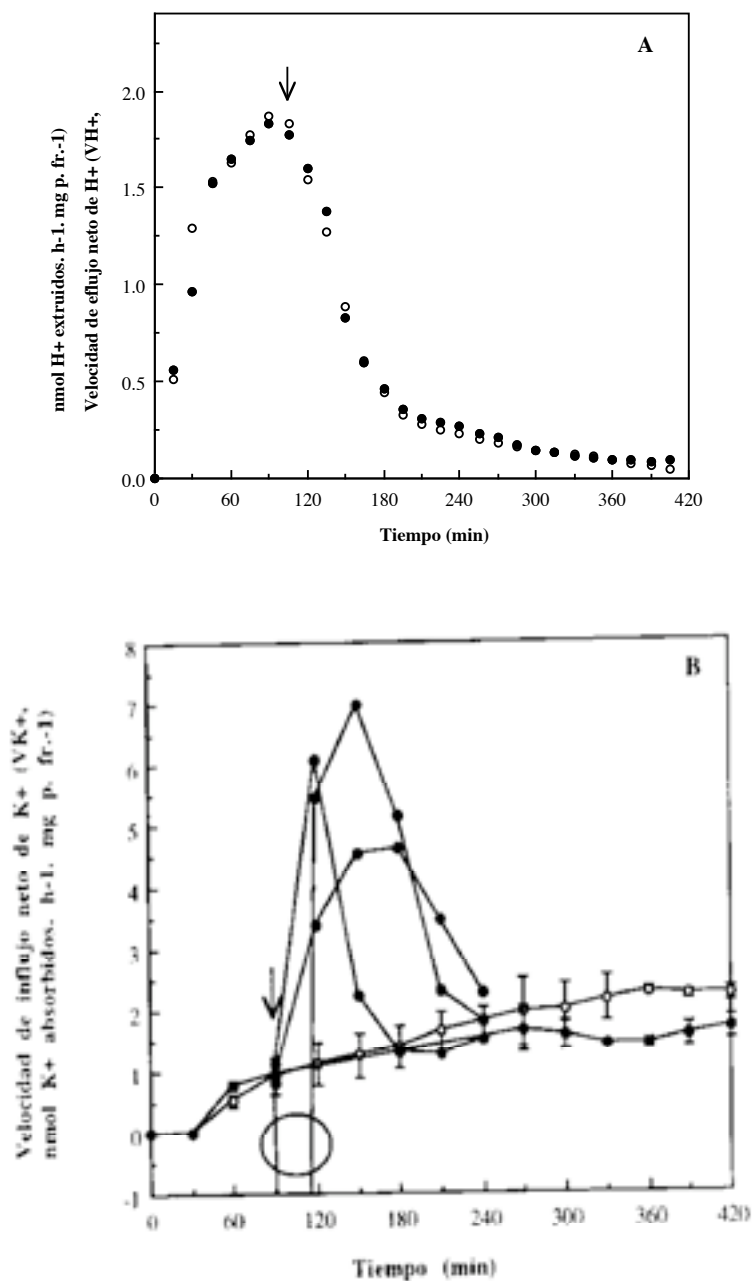


Fig 34: Variación de la velocidad (A) de eflujo de H⁺ (VH⁺) y (B) de influjo neto de K⁺ (VK⁺) por las raíces sin (○) y con (●) 20 μg/ml de Valinomicina adicionada en el momento señalado por la flecha, en un medio con aporte inicial de K⁺ alto (2 mM). ○ Rápido eflujo de K⁺. Los datos son media de, al menos, 3 experimentos independientes, excepto en el caso de VK⁺ con Valinomicina, donde en el intervalo entre 120 y 240 min se representan los datos de los 3 experimentos por ser la respuesta demasiado variable para hacer medias (excepto para estos puntos, desviación ≤5% en VH⁺ y entre 5 y 10% en VK⁺).

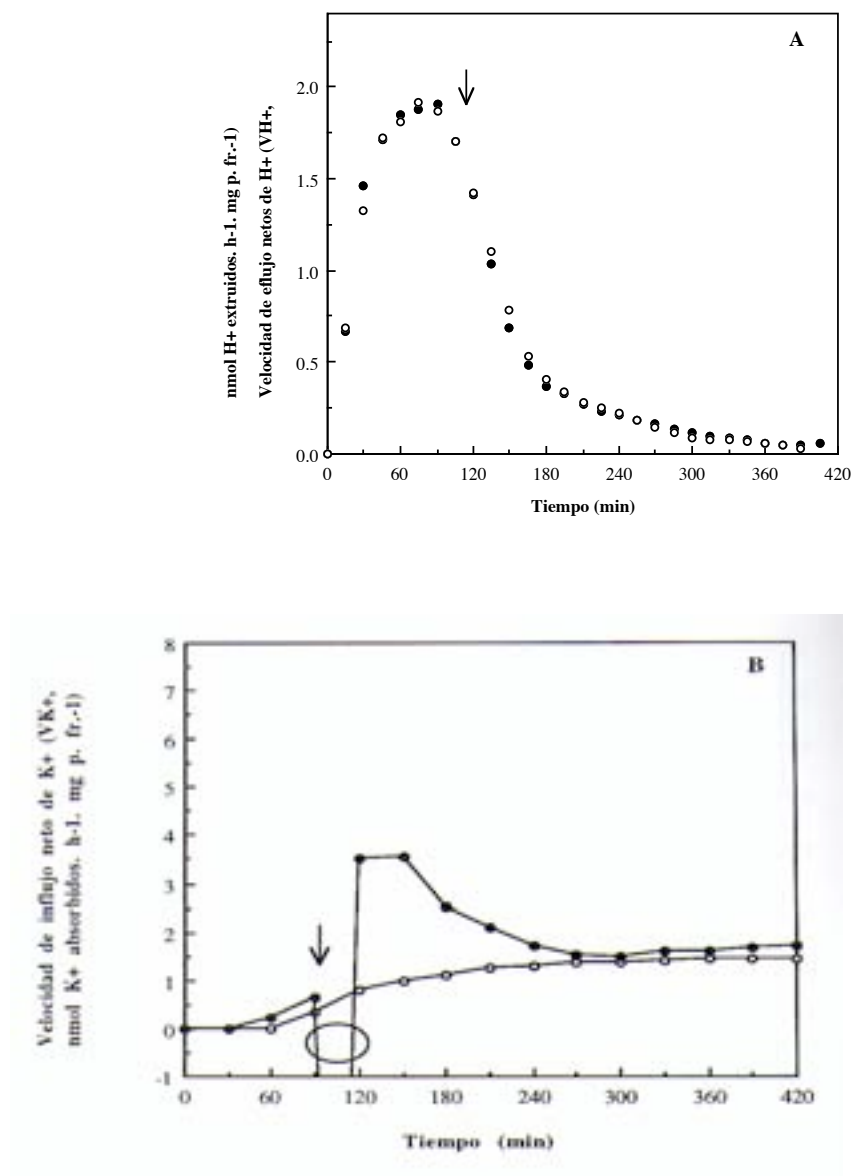


Fig 35: Variación de la velocidad (A) de eflujo de H⁺ (VH⁺) y (B) de influjo neto de K⁺ (VK⁺) por las raíces sin (○) y con (●) 20 μg/ml de Valinomicina adicionada en el momento señalado por la flecha, en un medio con aporte inicial de K⁺ bajo (0.50 mM). ○ Rápido eflujo de K⁺. Los datos son media de, al menos, 3 experimentos independientes (desviación ≤5% en VH⁺ y entre 5 y 10% en VK⁺).

5.1.2.- Efecto de la OUABAINA sobre la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+

La Ouabaina (Aptdo 4.1.2. de Introducción) es un inhibidor específico del transportador Na^+/K^+ -ATPasa de células animales, habiéndose también observado en células vegetales un efecto inhibitor del transporte de Na^+ (en algunos casos afecta al intercambio K^+/Na^+ , mientras que en otros solamente afecta al transporte de Na^+ , pero no al de K^+); sin embargo, no se ha descrito ningún caso en que afecte a la H^+ -ATPasa de plasmalema de plantas.

La concentración de Na^+ en nuestro medio de medida era pequeña pero apreciable (entre 20 y 30 μM) ya que se utilizaba NaOH para estabilizar el medio a pH 6.6, en los 10 min tras la adición de las raíces,, que lo acidifican. La presencia de esta pequeña cantidad de Na^+ fue la causa de la utilización de la Ouabaina como inhibidor.

La concentración utilizada en nuestras experiencias fue 1 mM, igual a la utilizada por Sommarin et al. (1985) y muy superior a la de Gabbay-Azaria et al. (1994), 0.1 mM. Concentraciones inferiores a 1 mM no provocaban efecto alguno sobre los flujos de H^+ y K^+ de nuestras raíces (resultados no incluidos).

La adición de 1 mM de Ouabaina al medio de medida con raíces preincubadas en NaCN, no provoca modificación alguna de la **capacidad tampón** ni para los H^+ (βH^+) ni para los K^+ (βK^+) de dicho medio con raíces (**Fig 36**). Al igual que en el caso de la Valinomicina, la titulación de pH se realiza entre pH 4.7 y 6.0, puesto que la Ouabaina la adicionamos al medio con raíces "in vivo" a pH 6.0. Por ello, las posibles modificaciones de la cinética de pH y pK que se observen no pueden ser achacadas a modificaciones de la capacidad tampón, sino al efecto de la Ouabaina sobre la actividad de los flujos de las raíces. De todas formas, estas capacidades tampón se tomaron en cuenta para calcular las VH^+ y VK^+ de las experiencias con Ouabaina.

También en estas experiencias se utilizaron semillas de la remesa E (**Fig 17E**).

En la **Fig 37** se representa un **experimento tipo** de cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+ por raíces a cuyo medio de medida adicionamos 1 mM de Ouabaina (**A**), en comparación con un experimento control, sin aditivos (**B**). La Ouabaina se añadió a los 105 min aproximadamente a pH 6.0 del inicio de la cinética, cuando el influjo de K^+ se había iniciado, tras el lag. En la **Fig 38** se representan los valores medios ($n=3$) de VH^+ (**A**) y VK^+ (**B**) con y sin Ouabaina, para una mejor comparación del efecto del inhibidor sobre ambos flujos por separado.

Como puede observarse, la adición de 1 mM de Ouabaina al medio no altera prácticamente el eflujo neto de H^+ por las raíces. En efecto, comparando tanto la variación de **pH** (**inserta** de las gráficas) como la **velocidad de eflujo neto de H^+** (VH^+) sin y con Ouabaina (**Fig 37**), comprobamos que son similares a lo largo de toda la cinética de acidificación, no presentando cambio alguno. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores con diferentes materiales vegetales; así, Gabbay-Azaria et al. (1994) con vesículas de plasmalema de *S. subsalsa* y Sommarin et al. (1985) con vesículas

de plasmalema procedentes de raíces de trigo y avena, tampoco observan inhibición alguna de la actividad H^+ -ATPasa por la adición de Ouabaina. De nuestros resultados, al igual que sugiere Higinbotham (1973), podemos concluir que 1 mM de Ouabaina no afecta al eflujo neto de H^+ por las raíces de girasol.

El efecto de la Ouabaina sobre el **pK** y la **velocidad de influjo neto de K^+ (VK^+)** se muestra en la misma **Fig 37**, donde puede apreciarse un claro efecto inhibitorio. Esta inhibición, si bien empieza a manifestarse desde el momento de la adición, se hace más evidente a partir del minuto 180 de la cinética (aproximadamente 75 min después de la adición) para, a partir del minuto 300, comenzar a recuperarse el influjo neto hasta niveles cercanos al control. El efecto puede apreciarse mejor en la **Fig 38**, donde se representan por separado los valores medios de VH^+ y VK^+ en comparación con el control, sin aditivo. Así, se comprueba que la inhibición del influjo neto de K^+ por 1 mM Ouabaina muestra el máximo de inhibición obtenido del $\approx 40\%$ a los 240 min del inicio de la cinética (135 min después de la adición); a partir de este tiempo VK^+ empieza a recuperarse lentamente, igualándose prácticamente con el control al final de la experiencia.

Estos resultados nos indican que la Ouabaina, como ya hemos descrito, y al menos en la concentración utilizada, no inhibe el eflujo neto de H^+ , mientras que sí afecta, transitoriamente, al influjo neto de K^+ , aunque sin llegar a ser un efecto muy notable. Este efecto diferencial sobre ambos flujos pone de manifiesto de nuevo, como sugiere Higinbotham (1973), que los sistemas responsables de ambos flujos no estarían relacionados directamente, sino que el transporte de K^+ se produciría a través de un(os) transportador(es) diferente(s) a la H^+ -ATPasa, lo que no impide que pueda existir una relación entre la H^+ -ATPasa y los transportadores de K^+ , de forma indirecta como hemos indicado en casos anteriores.

El efecto sobre el eflujo neto de K^+ estaría en consonancia con la posibilidad de que una parte del transporte de K^+ por las raíces se realizara acoplado al de Na^+ , que está en nuestras soluciones a pequeña pero apreciable concentración. Los resultados contradictorios pero discutidos en la Introducción sobre el efecto de la Ouabaina sobre el intercambio Na^+/K^+ en plantas no permiten extraer conclusiones acerca del transportador sobre el que actuaría este inhibidor. De todas formas, no hay que olvidar que los resultados más modernos de biología molecular concluyen que el gen HKT1 de raíces de maíz, expresado en el sistema heterólogo de levadura, se ha propuesto que funciona como un simporteador K^+-Na^+ .

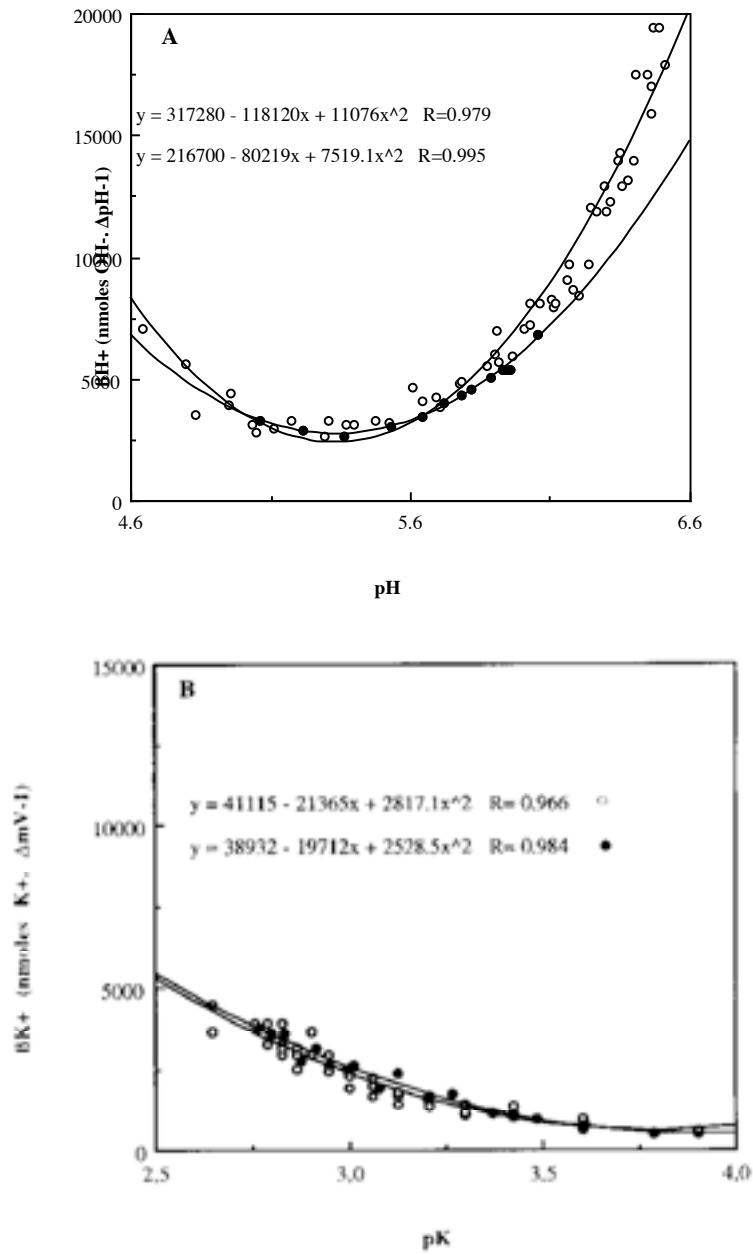


Fig 36: Capacidad tampón del medio con 175 raíces preincubadas en NaCN, sin (○) y con (●) 1 mM de Ouabaina. (A) Capacidad tampón para H^+ (βH^+). (B) Capacidad tampón para K^+ (βK^+).

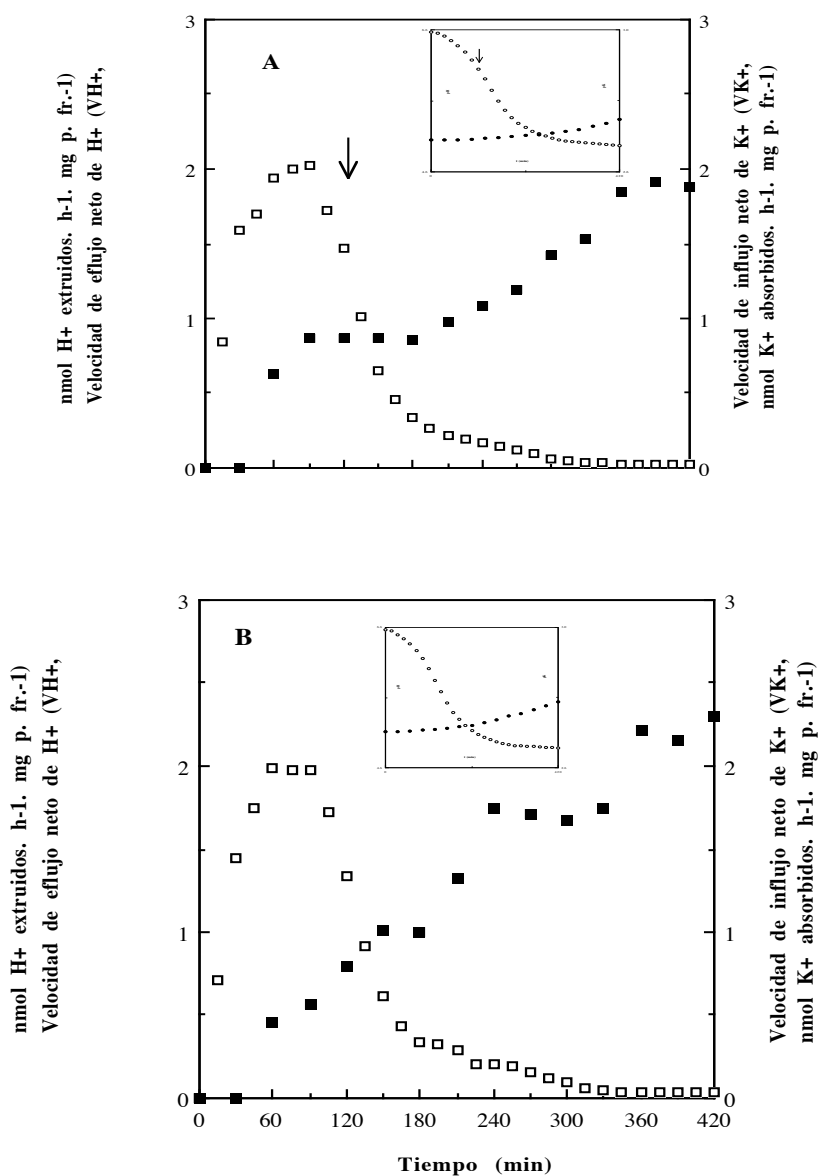


Fig 37: Velocidades netas de eflujo de H⁺ (□) e influjo de K⁺ (■) por las raíces, medidas simultáneamente, (A) con y (B) sin 1 mM de Ouabaina. **Insertas,** los datos directos de variación de pH (○) y pK (●) del medio. La flecha indica el momento de adición de la Ouabaina. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo (n≥3, variaciones ≤5% para VH⁺ y entre 5 y 10% para VK⁺).

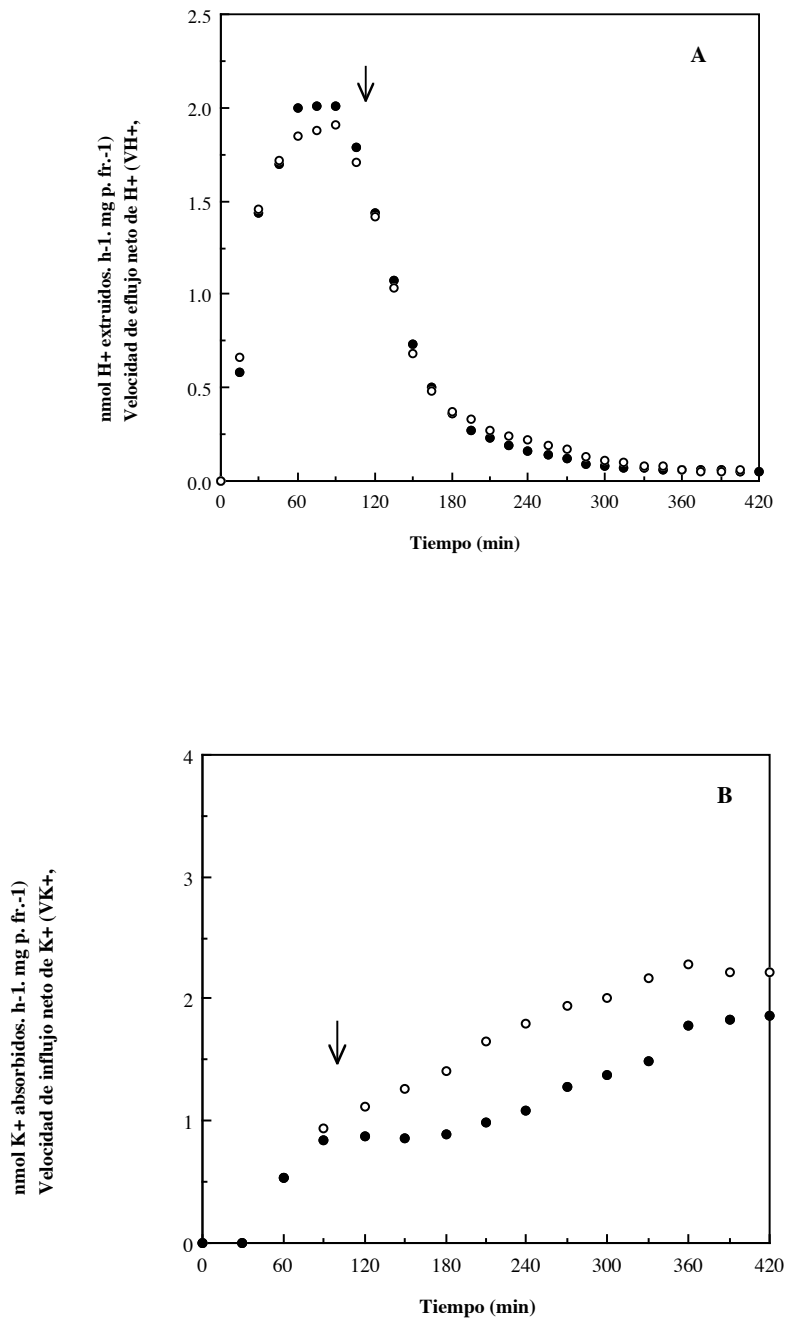


Fig 38: Variación de la velocidad (A) de eflujo neto de H⁺ (VH⁺) y (B) de influjo neto de K (VK⁺) por las raíces sin (○) y con (●) 1mM de Ouabaina adicionada en el momento señalado por la flecha. Los datos son media de, al menos, 3 experimentos independientes (desviación ≤5% en VH⁺ y entre 5 y 10% en VK⁺).

5.2.- EFECTORES QUE ACTÚAN SOBRE CANALES DE H⁺

5.2.1.- Efecto del DCCD (Diciclohexilcarbodiimida) sobre la cinética de flujos de H⁺ y K⁺

El DCCD (apartado 4.2.1 de Introducción) bloquea el transporte de H⁺ mediante su unión covalente a un resto carboxilo del canal de H⁺ de la H⁺-ATPasa de plasmalema (Sussman y Slayman, 1983). Así mismo, podría interaccionar con alguna proteína de la cadena redox (Rubinstein y Stern, 1986) o con un posible canal de H⁺ de la misma (Bown y Crawford, 1988). Su actuación bloquea el flujo de H⁺, lo que además nos permitirá dilucidar si el eflujo de H⁺ y el influjo de K⁺ están acoplados directa o indirectamente.

La **capacidad tampón** del medio con raíces inactivadas con NaCN no se modifica por la adición de 100 μ M de DCCD (concentración máxima utilizada), ni para H⁺ (β H⁺) ni para K⁺ (β K⁺) (**Fig 39**), como en casos anteriores, la calibración de pH la realizamos para el intervalo de pH de 4.7 a 6.0, cuando se adiciona el DCCD en las experiencias con las raíces "in vivo".

Las concentraciones de DCCD que hemos utilizado son: 20, 30, 40, 50, 60, 80 y 100 μ M y la concentración de K⁺ en el medio standard de medida 2 mM.

Las experiencias con DCCD se realizaron con la remesa de semillas B, cuyos controles se muestran en la **Fig 17B**.

5.2.1.1.- Efecto de la adición de algunas concentraciones de DCCD sobre los flujos de H⁺ y K⁺, simultáneamente

Como en el caso de la Vallinomicina y Ouabaina, la adición del DCCD la realizamos a los 105 min del inicio de la cinética, cuando el pH del medio de medida alcanza el valor 6.0 como consecuencia de la actividad de eflujo de H⁺ de las raíces. El momento de la adición se encuentra en la zona de velocidad máxima de eflujo neto de H⁺, siendo además este pH muy próximo al pH óptimo. Existe, por tanto una actividad extrusora de H⁺ muy alta y funcionando el sistema en condiciones óptimas, por lo que pequeños cambios que produzca el inhibidor son fácilmente detectables. En cuanto al influjo de K⁺ también se ha iniciado, tras el lag, encontrándose cercano a la saturación de la 1ª fase o lóbulo de la cinética.

En la **Fig 40** puede apreciarse el efecto de 50 μ M de DCCD, concentración que ya provoca fuerte inhibición sobre los flujos simultáneos de H⁺ y K⁺, en un **experimento representativo (A)**, en comparación con un experimento control, sin aditivo (C). En dicha Fig se observa una rápida inhibición de ambos flujos, aunque con claras diferencias en intensidad y tiempo. Así, se manifiesta antes y más intensamente sobre el eflujo de H⁺: a los 30 min de la adición de DCCD la acidificación del medio (**pH, inserta**) ha cesado completamente, por lo que la **velocidad de eflujo neto de H⁺ (VH⁺)** ha alcanzado valores cercanos a cero, mientras que a ese tiempo el influjo neto de K⁺ (**pK,inserta**), sigue

produciéndose, y la **velocidad de influjo neto de K^+ (VK^+)** ha disminuido aún muy poco. VH^+ se mantiene a valores cercanos a cero desde los 30 min hasta ≈ 240 min desde la aplicación del inhibidor (las distintas repeticiones mostraban pequeñas diferencias en ese punto), y a tiempos mayores se producía un claro influjo neto de H^+ (la velocidad de eflujo neto de H^+ , VH^+ , alcanzaba valores negativos). Por su parte, VK^+ alcanzaba su valor mínimo ≈ 100 min tras la adición de DCCD (≈ 0.6 nmol K^+ /h. mg p. fr., que representa $\approx 25\%$ de la velocidad de los testigos) manteniéndose a esa velocidad hasta el final de la cinética sin que llegue nunca a anularse como ocurría con el eflujo de H^+ . Existe, por tanto, un retardo, o lag, del efecto del DCCD sobre el influjo de K^+ de unos 30 min respecto al efecto sobre el eflujo de H^+ , y además, aunque la sensibilidad que presentan ambos flujos al DCCD es alta, el influjo de K^+ se afecta en menor medida que el eflujo de H^+ , y no existe ningún paralelismo en la respuesta de uno y otro flujo. Estos datos de nuevo hablan de la no existencia de acoplamiento directo entre ambos flujos; el efecto primario de $50 \mu M$ de DCCD sería la inhibición de los canales de H^+ del (o los) sistema(s) de eflujo de H^+ , lo que haría que no se produjera el gradiente de pH y/o eléctrico necesario para mantener el influjo neto de K^+ a niveles normales, por lo que indirectamente también éste se vería afectados secundariamente.

Es interesante observar un experimento tipo con la **concentración de DCCD más alta** utilizada ($100 \mu M$), que se muestra en la **Fig 40B**. Como puede verse, en este caso la respuesta tanto del eflujo de H^+ como del influjo de K^+ es inmediata, siendo la inhibición de ambos flujos prácticamente total (VH^+ y $VK^+ \approx 0$) a los 15 min de la aplicación del inhibidor. A continuación, los flujos se invierten (VH^+ y VK^+ tienen valores negativos), es decir, ocurre una no muy acusada pero clara intrusión de H^+ (VH^+ se estabiliza a valores ligeramente negativos) y una fuerte extrusión de K^+ (VK^+ llega a alcanzar valores muy negativos). Según la interpretación de Blatt (1997) de los canales de K^+ , ello indicaría que la despolarización de la membrana (no sólo porque no se extruyen, sino que incluso se intruyen H^+) abriría canales K^+_{out} , que extruirían K^+ para repolarizar la membrana.

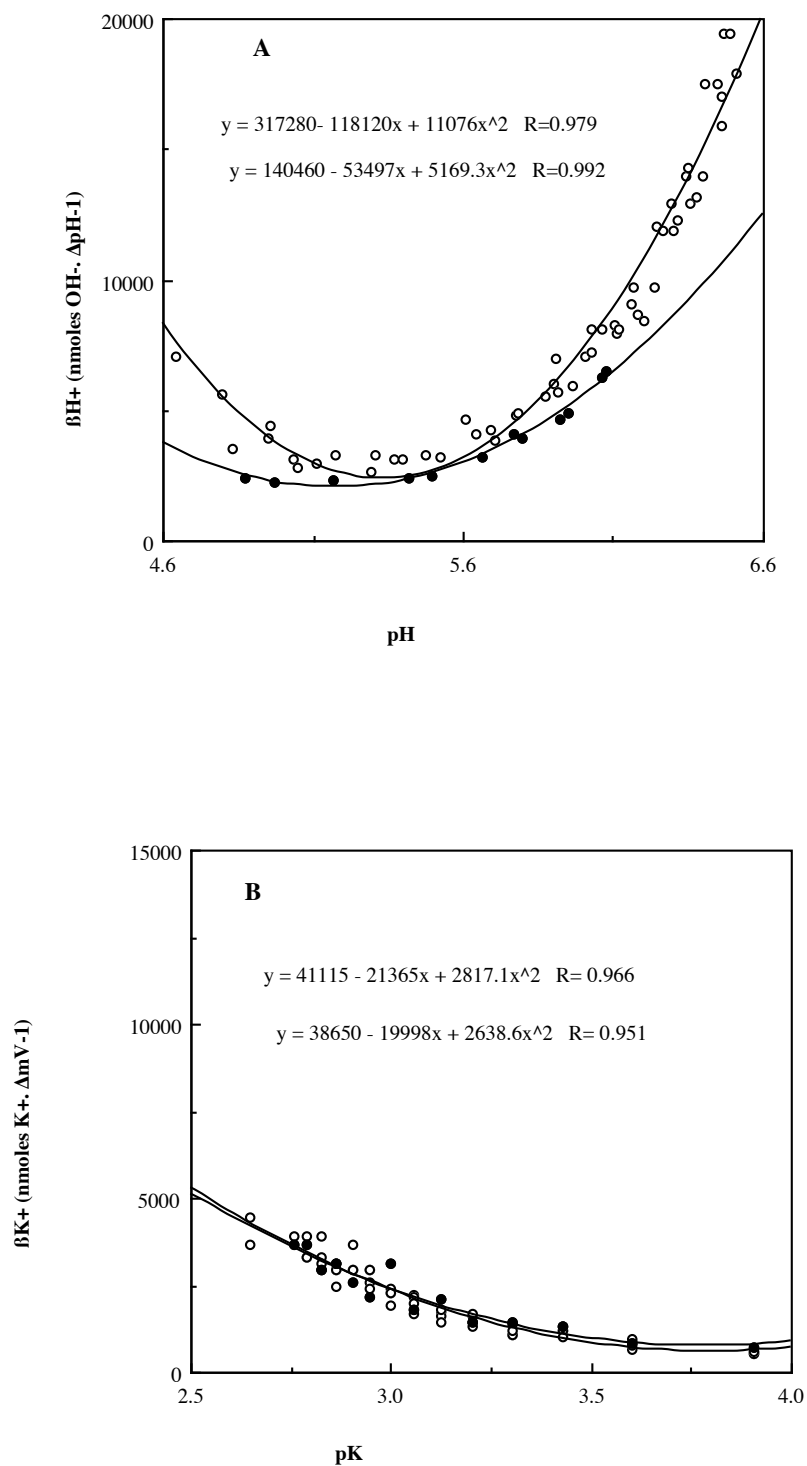


Fig 39: Capacidad tampón del medio con 175 raíces preincubadas en NaCN, sin (○) y con (●) 100 μM de DCCD. (A) Capacidad tampón para H^+ (βH^+). (B) Capacidad tampón para K^+ (βK^+).

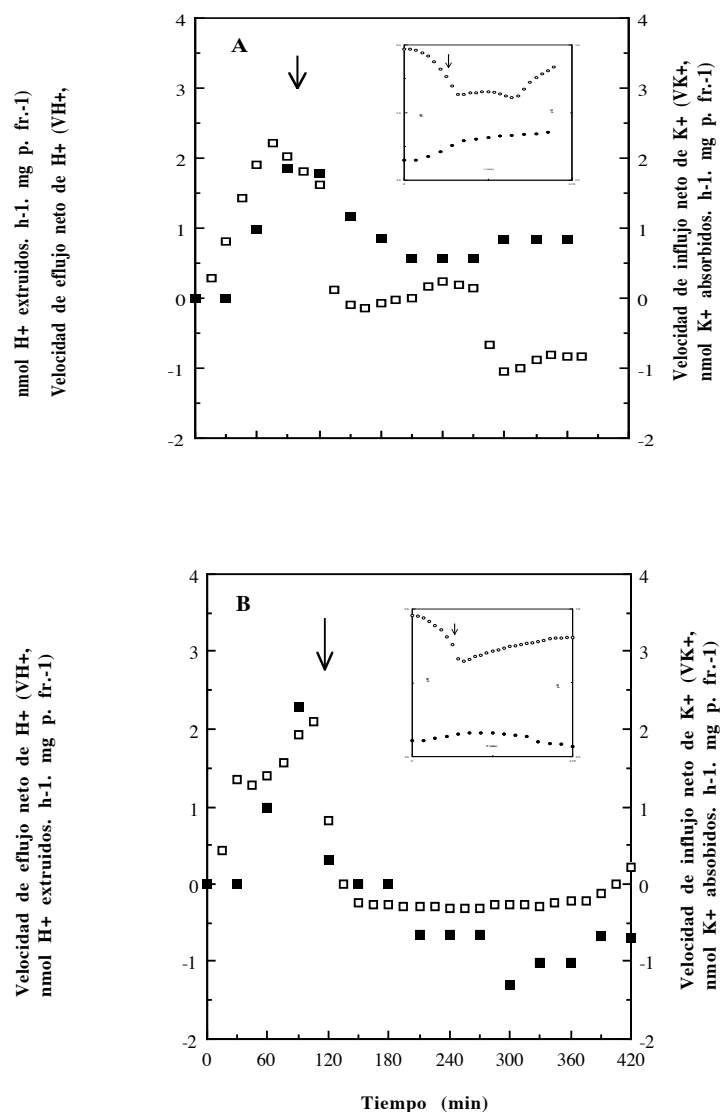


Fig 40: Velocidades netas de eflujo de H⁺ (□) e influjo de K⁺ (■) por las raíces, medidas simultáneamente, (A) con 50 μM, (B) con 100 μM y (C) sin DCCD. **Insertas**, los datos directos de variación de pH (○) y pK (●) del medio. La flecha indica el momento de adición del DCCD. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo (n≥3, variaciones ≤5% para VH⁺ y entre 5 y 10% para VK⁺).

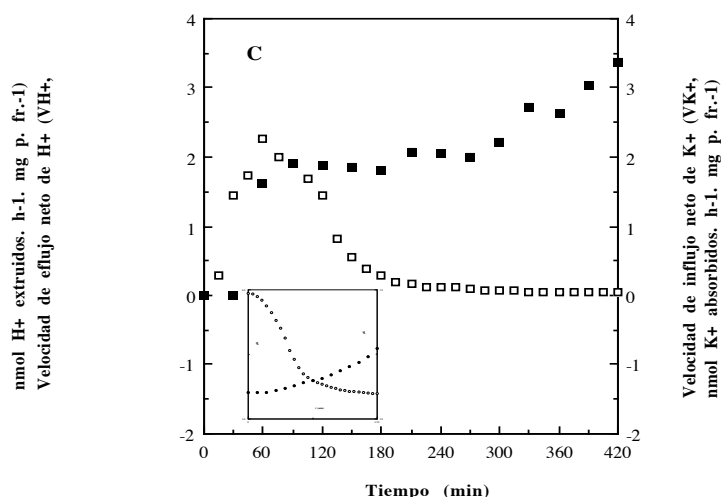


Fig 40: Continuación.

5.2.1.2.- Efecto de varias concentraciones de DCCD sobre el flujo neto de H^+ : Curvas dosis-respuesta

Para estudiar el efecto del DCCD sobre el flujo neto de H^+ por raíces escindidas, realizamos **curvas dosis-respuesta**, representándose en la Fig 41 los **valores medios** de la variación de pH (A) y VH^+ (B) para cada una de las concentraciones utilizadas, ya que se comparan resultados obtenidos en experimentos necesariamente diferentes, cada vez con una concentración de inhibidor. Cada concentración fue repetida 3 veces (variabilidad $\leq 5\%$). Debido a que el efecto inhibitorio sobre el flujo neto de H^+ es tan rápido, representamos también la variación de pH y VH^+ a tiempos más cortos (intervalos de 5 min), a partir de la adición del inhibidor, que se toma como tiempo 0; esto nos permitía observar mejor los diferentes niveles de inhibición. Así, en la Fig 42 se muestra el efecto de las concentraciones de DCCD utilizadas, tanto sobre el pH del medio (A) como sobre la velocidad de flujo neto de H^+ (B) desde el momento de su adición hasta 45 minutos después de la misma.

Con 20 y 30 μM de DCCD se produce una rápida inhibición del flujo neto de H^+ observable a los 10 min de la adición del inhibidor, aunque con la concentración más baja, comienzan a recuperarse los valores normales de velocidad de flujo neto de H^+ a partir de los 20 min posteriores a la adición del inhibidor. Mucho más drástico es el efecto de concentraciones $\geq 40 \mu M$ que no solamente reducen la velocidad de flujo neto, sino que acaban produciendo la parada del mismo (40 min), e incluso a tiempos superiores provocan la alcalinización del medio, es decir, un influjo neto de H^+ , lo que se refleja en que la velocidad de flujo neto (VH^+) adquiere valores negativos.

El **pH final de equilibrio**, excepto con 20 μM , se alcanza a valores menos ácidos que en el control. Así, mientras con 20 μM de DCCD las raíces alcanzan un pH final de aproximadamente 5.1, con 50 μM el valor es 5.8 y para 100 μM es 6.4.

Estos datos ponen de manifiesto la alteración del eflujo de H^+ por el bloqueo del DCCD de los canales específicos para H^+ , encargados de su extrusión activa. A partir de, aproximadamente 180 min después de la adición del DCCD también se anula el influjo neto de H^+ , resultado similar al obtenido por otros autores (Warnurst et al., 1982; Schumaker y Sze, 1984; Beavis y Garlid, 1983) que achacan este efecto a cambios en el potencial electroquímico de la membrana plasmática, provocados por la actuación de otros transportadores.

A continuación calculamos la **Actividad relativa de eflujo neto de H^+** (VH^+ para cada concentración de DCCD, en % respecto a VH^+ del control, sin inhibidor). La Actividad relativa se representa frente al tiempo para las distintas concentraciones de DCCD (**Fig 43**) y frente a la concentración de DCCD para distintos tiempos de actuación (**Fig 44**), en ambos casos hasta los 45 min posteriores a la adición del inhibidor.

En la **Fig 43**, se observa cómo la velocidad de eflujo neto de H^+ disminuye drásticamente, con todas las concentraciones utilizadas, 5 min después de la adición de DCCD. Como puede verse, la inhibición del eflujo es tanto mayor cuanto mayor es la concentración utilizada de inhibidor para un tiempo dado. También, conforme aumenta el tiempo de actuación del inhibidor la inhibición del eflujo es mayor, hasta estabilizarse a los 20 min, en todas las concentraciones, permaneciendo a partir de este tiempo prácticamente constante durante, al menos, los 45 min considerados. La concentración mayor de DCCD (100 μM) se estabiliza a valores negativos (influjo de H^+), incluso a este tiempo tan corto (45 min).

En la **Fig 44** se puede apreciar cómo a partir de 20 minutos después de la adición de DCCD la actividad del eflujo neto de H^+ , para concentraciones mayores de 20 μM , se ha reducido a niveles por debajo del 50%; con 40 μM se anula totalmente, y concentraciones superiores (80 y 100 μM) a partir de los 20 min no sólo anulan sino que revierten el eflujo neto de H^+ a influjo neto.

A partir de los datos de velocidad y concentración se ha realizado la **representación de Dixon-Webb (Fig 44 inserta)**, para calcular los IC_{50} (la concentración de inhibidor a la que la actividad es el 50% del control). Esta representación se realiza sólo hasta 40 μM , ya que a partir de esta concentración empieza a producirse influjo, lo que impide la correcta representación e interpretación de este plot. Como podemos observar, la respuesta al DCCD es bifásica, apareciendo dos rectas de diferente pendiente en la respuesta del transporte de H^+ al DCCD. La respuesta para 40 μM no se alinea con la de las concentraciones inferiores, dando una segunda fase que comienza a manifestarse claramente a partir de los 20 min (a tiempos inferiores la respuesta es monofásica). La **primera fase** de la respuesta presenta un IC_{50} de 40 μM a los 10 min, y a partir de los **20 min** permanece constante, siendo de aproximadamente **30 μM** . Para la **segunda fase**, el IC_{50} a los 20 min es 35 μM , permaneciendo **constante a $t \geq 30$ min**, en un valor de **30 μM** .

Esta doble respuesta podría indicar la existencia de dos canales diferentes para H^+ , ambos sensibles al bloqueo por DCCD. El primer canal sería más accesible, como indica el hecho de que ya a los 10 min su IC_{50} sea $45 \mu M$, siendo a partir de este tiempo constante e igual a $30 \mu M$. El segundo canal presenta una sensibilidad similar, pero requiere tiempos mayores, es decir presenta menor accesibilidad; así, a los 10 min no se observa aún la 2ª respuesta (el DCCD no ha alcanzado aún el lugar de actuación del 2º canal), mientras que a los 20 min el IC_{50} es ligeramente superior ($35 \mu M$) al que muestra el primer canal y a partir de este tiempo ($t \geq 30$ min) se obtiene un valor de IC_{50} constante y similar al del primer canal ($30 \mu M$). El primero de estos canales, el más accesible, correspondería al de la H^+ -ATPasa del plasmalema, mientras que el segundo (que necesita tiempo de incubación mayor, menos accesible al inhibidor) podría ser, tal y como mantienen otros autores (Bown y Crawford, 1988; Lin, 1984; Craig y Crane, 1985; Böttger y Lüthen, 1986) un canal de H^+ asociado a la cadena redox del plasmalema.

De estos resultados podemos concluir que la inhibición por DCCD del eflujo de H^+ es dependiente del tiempo sólo en los primeros 20 minutos, que sería el tiempo que tarda el inhibidor en penetrar hasta sus lugares de enlace (Espinosa, 1991) y dependiente de la concentración hasta $40 \mu M$, a partir de la cual los lugares de enlace se saturan y se obtienen respuestas prácticamente coincidentes, lo que indicaría la fuerte especificidad del inhibidor por los canales de H^+ . (Las concentraciones más elevadas, actuando a tiempos más largos, probablemente acaben afectando también a otros transportadores, provocando la reversión del flujo, como hemos visto).

Las concentraciones de DCCD necesarias para la inhibición del eflujo de H^+ por nuestras raíces son del mismo orden que las obtenidas por otros autores: Romheld et al. (1984), en raíces adultas intactas de girasol, observa el bloqueo total de la acidificación con $5 \mu M$ de DCCD en 20 min, mientras Oleski y Bennett, (1987) en vesículas de plasmalema de raíces de maíz obtienen un valor de IC_{50} de $20 \mu M$ ($t=105$ min) y Kasamo (1986) en vesículas de plasmalema de *Phaseolus*, un IC_{50} de $10 \mu M$ ($t=30$ min). Estos valores son similares a los obtenidos en este trabajo, tanto en concentración como tiempo.

Como **conclusión**, podemos decir que el sistema que controla la extrusión de H^+ al medio externo por las raíces se bloquea rápida y eficientemente por DCCD, lo que indica la presencia de canales de H^+ en la membrana que controlan dicha extrusión de H^+ . Nuestros resultados parecen indicar la implicación de dos canales distintos, de diferente accesibilidad y sensibilidad al DCCD, que proponemos pertenecerían uno a la H^+ -ATPasa y otro a la cadena redox del plasmalema.

5.2.1.3.- Efecto de varias concentraciones de DCCD sobre el influjo neto de K^+ : Curvas dosis-respuesta

El efecto que la adición de diferentes concentraciones de DCCD provoca en el influjo neto de K^+ se muestra en la **Fig 45A** (variaciones de pK) y en la **Fig 45B** (variaciones de la

velocidad de influjo neto de K^+ , VK^+) frente al tiempo. En primer lugar, se pone de manifiesto la necesidad de tiempos relativamente largos y concentraciones más elevadas, en comparación con el efecto del inhibidor sobre el eflujo de H^+ , para que se observe la inhibición del influjo neto de K^+ por el DCCD. Así, 20 μM no produce efecto alguno sobre el influjo de K^+ por lo que ha sido eliminada de las gráficas; 30 μM sólo produce inhibición a los 195 min de la adición de DCCD, y concentraciones mayores presentan tiempos algo menores. Tan sólo 100 μM provoca un efecto inhibitorio inmediato.

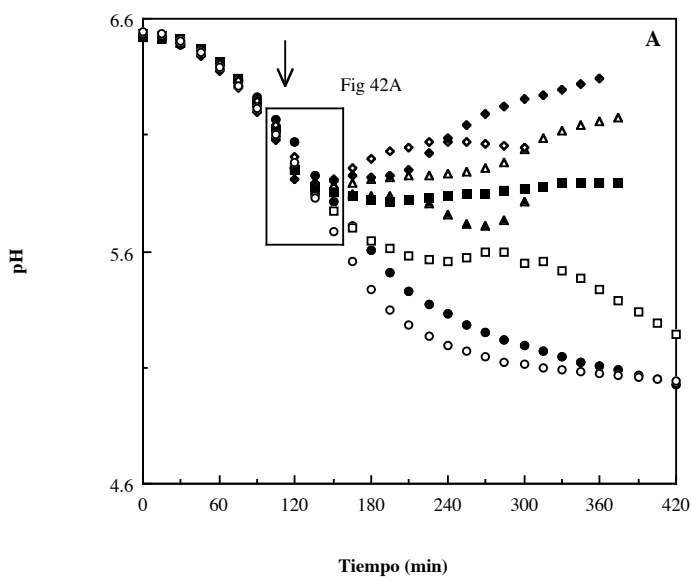
Estos efectos se observan mejor cuando calculamos la **Actividad relativa de influjo neto de K^+ con DCCD**, (velocidad de influjo neto de K^+ para cada concentración de inhibidor en % respecto a la control, sin inhibidor, a los mismos tiempos de medida). En la **Fig 46** se representa dicha Actividad relativa frente al tiempo y en la **Fig 47** frente a las concentraciones de DCCD utilizadas, siendo en ambos casos el tiempo 0 aquél al cual adicionamos el inhibidor. En la **Fig 46** se observa cómo con 30 μM de DCCD la disminución de la Actividad es escasa, no apreciándose un claro efecto depresor del influjo hasta los 195 min tras la adición del inhibidor. Con 40, 50 y 60 μM la Actividad disminuye de forma semejante en los tres casos, notándose mayor inhibición a mayor concentración de DCCD, sobre todo a partir de los 75 min (aunque a los 45 min ya hay una inhibición apreciable). Con 80 y 100 μM la bajada de la actividad es ya evidente a los 45 y 15 minutos respectivamente, siendo el efecto sobre el influjo mucho mayor que con las concentraciones anteriores.

En la **Fig 47** se representa la **Actividad relativa de influjo neto de K^+ frente a la concentración de DCCD** para distintos tiempos de actuación del inhibidor. Se observa cómo a los 15 min sólo se produce inhibición con 100 μM , necesitando el resto de concentraciones mayores tiempos de actuación. A los 45 min la inhibición es mayor, especialmente a partir de 50 μM de DCCD. A partir de los 75 min la inhibición producida por todas las concentraciones probadas de DCCD es alta, excepto para 30 μM que, en general, tiene muy poco efecto a todos los tiempos estudiados. Para $t \geq 105$ min se observa un fuerte efecto inhibitorio, obteniéndose ya un 50% de inhibición con 40 μM . Para estos tiempos, con las concentraciones más altas usadas (80 y 100 μM) se anula totalmente el influjo neto, llegando a revertir, produciéndose una fuerte actividad de eflujo neto de K^+ (representada en la gráfica como $-VK^+$).

En la representación de **Dixon-Webb (Fig 47 inserta)** se observa, al igual que en el eflujo de H^+ , una respuesta bifásica al DCCD por parte del influjo de K^+ . La primera de las fases no alcanza el IC_{50} en ninguno de los tiempos de actuación, mientras que la segunda, que empieza a manifestarse a 40 μM de DCCD, presenta diferentes IC_{50} dependiendo del tiempo; así, a $t=45$ min es 56 μM , a $t=75$ min es 50 μM y para tiempos superiores permanece ya constante, siendo su valor 45 μM . Esta respuesta parece indicar también la existencia de dos sistemas que afectan al transporte de K^+ , el primero más accesible, pero poco sensible, ya que no llega a alcanzar el 50% de inhibición, y el segundo

más sensible ($IC_{50}=45 \mu M$), pero más inaccesible al inhibidor, ya que alcanza el 50% de inhibición a tiempos superiores a 45 min. Esta necesidad de tiempos "largos" para inhibir el influjo de K^+ podría significar, tal y como mantienen Atkinson y Baker (1989), que el transporte de K^+ estaría acoplado al funcionamiento de la H^+ -ATPasa, en cuanto a que requiere un determinado gradiente o fuerza protón motriz, pero que dicho influjo no sería realizado por ella.

En consonancia con estos datos están los valores de IC_{50} , altos incluso para tiempos largos, que ponen de manifiesto el, relativamente, poco efecto inhibitor del DCCD sobre el influjo de K^+ , ya que el efecto del DCCD sobre el influjo neto de K^+ sería consecuencia de su actuación a nivel del eflujo neto de H^+ .



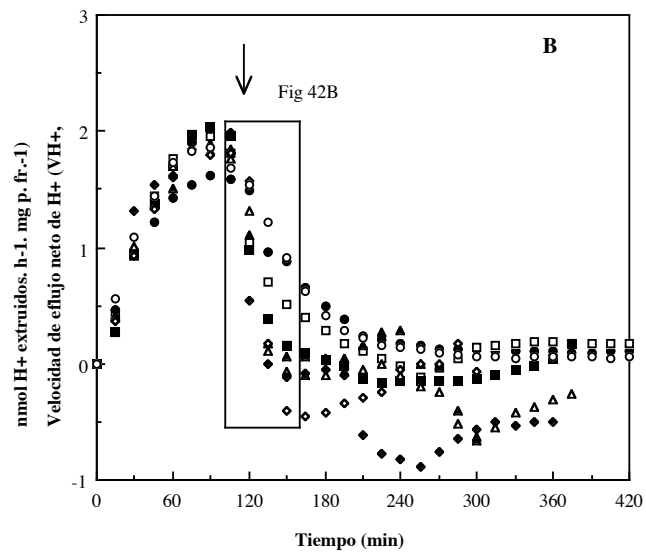
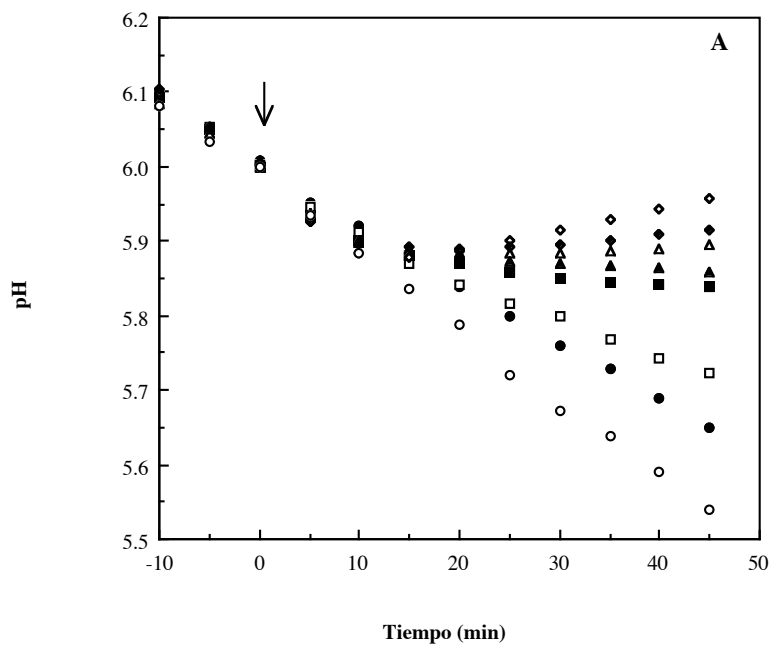


Fig 41: (A) Variación de pH del medio y (B) Velocidades de eflujo neto de H⁺ (VH⁺) por las raíces sin (○) y con 20 (●); 30 (□); 40 (■); 50 (△); 60 (▲); 80 (◇) y 100 μM (◆) de DCCD. La flecha indica el momento de adición del DCCD. Los datos son media de, al menos, 3 experimentos independientes (desviación ≤5%).



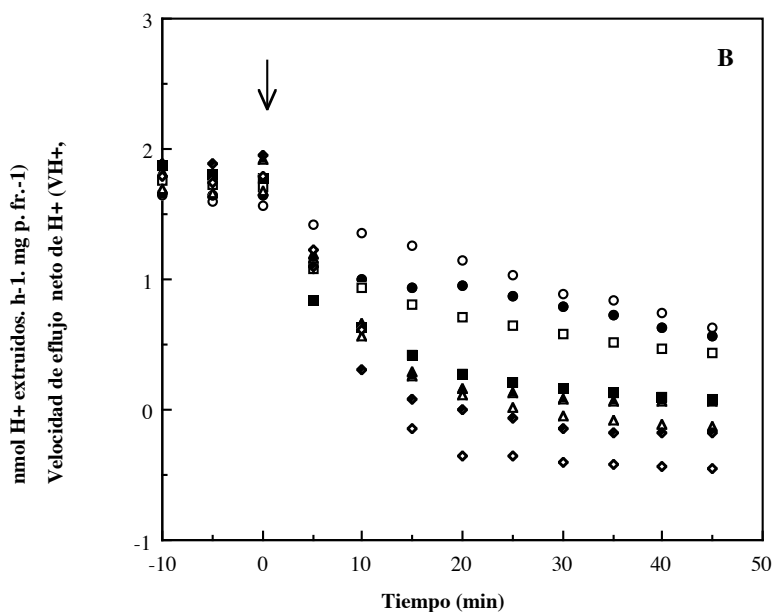


Fig 42: (A) Variación del pH del medio y (B) Velocidades de eflujo neto de H^+ (VH^+) por las raíces, para tiempos cortos sin (\circ) y tras la adición de 20 (\bullet); 30 (\square); 40 (\blacksquare); 50 (\triangle); 60 (\blacktriangle); 80 (\diamond) y 100 μM (\blacklozenge) de DCCD. La flecha indica el momento de adición del DCCD ($pH=6.0$; $t=0$). Los datos son media de, al menos tres repeticiones (desviación $\leq 5\%$).

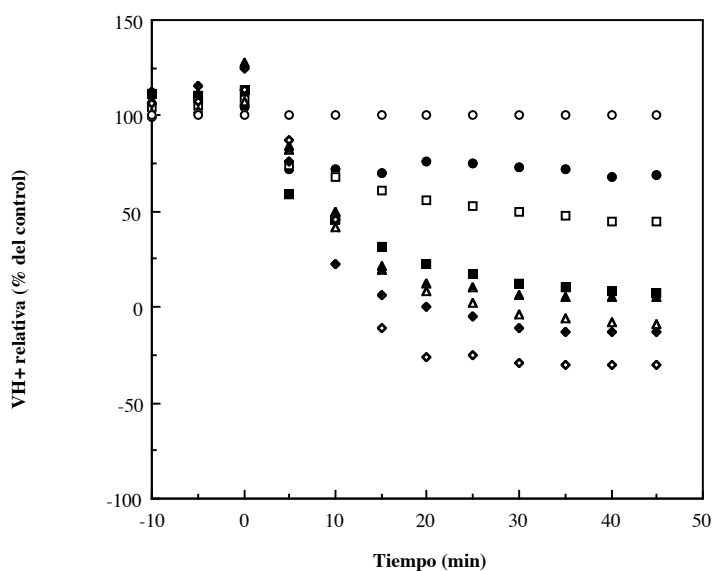


Fig 43: Actividad relativa de eflujo de H^+ frente al tiempo (en % de los valores de VH^+ control $-\circ-$), 20 (\bullet); 30 (\square); 40 (\blacksquare); 50 (\triangle); 60 (\blacktriangle); 80 (\diamond) y 100 μM (\blacklozenge) de DCCD. Los datos son media de, al menos tres experimentos independientes (las desviaciones de los datos directos a partir de los que se calculan los correspondientes porcentajes son $\leq 5\%$).

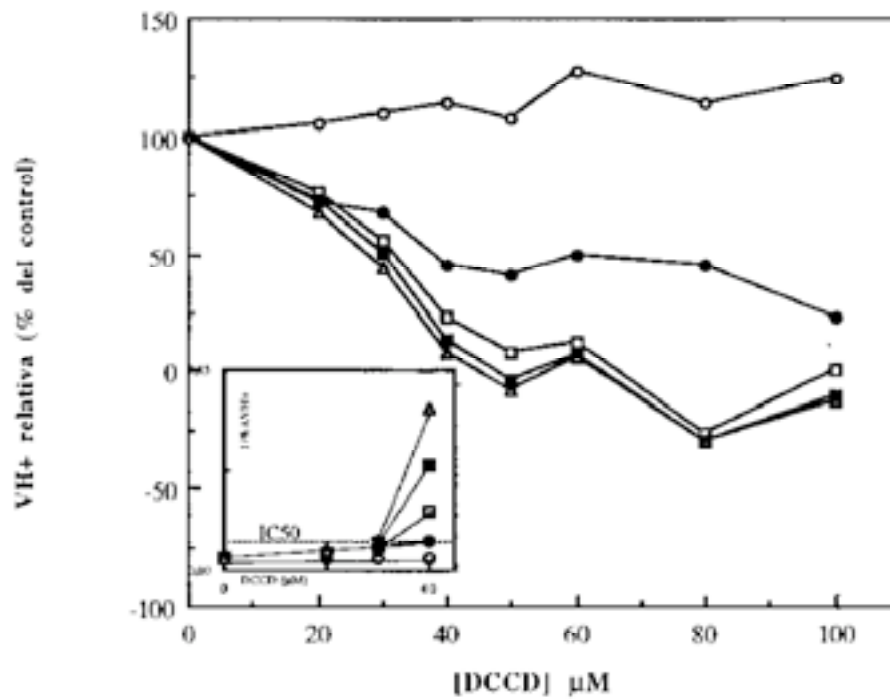
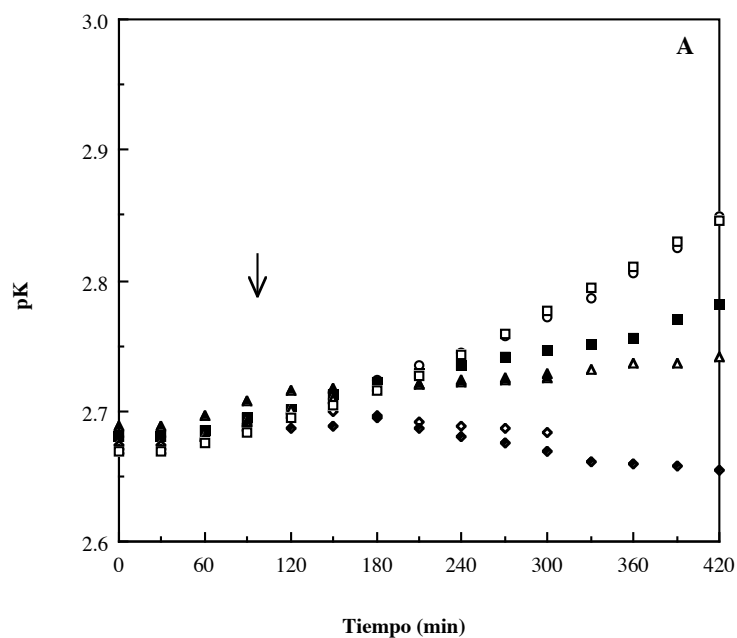


Fig 44: Actividad relativa de eflujo de H^+ frente a la concentración de DCCD a 0 (○); 10 (●); 20 (□); 30 (■) y 40 min (△) después de la adición de DCCD. Los datos son media de, al menos tres experimentos independientes. Inserta, el plot de Dixon-Webb (para los valores >0).



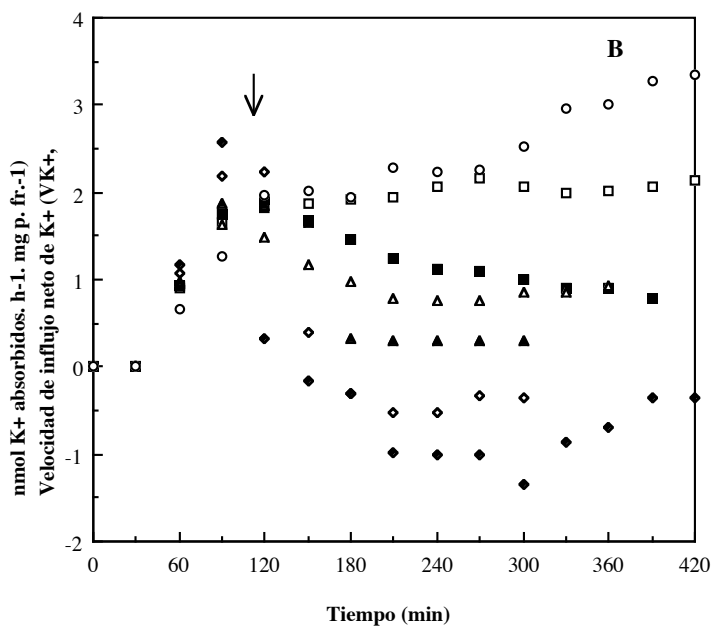


Fig 45: (A) Variación de pK del medio y (B) Velocidades de influjo neto de K⁺ (VK⁺) por las raíces sin (○) y con 30 (□); 40 (■); 50 (△); 60 (▲); 80 (◇) y 100 μM (◆) de DCCD. La flecha indica el momento de adición del DCCD. Los datos son media de, al menos, 3 experimentos independientes (desviación entre 5 y 10%).

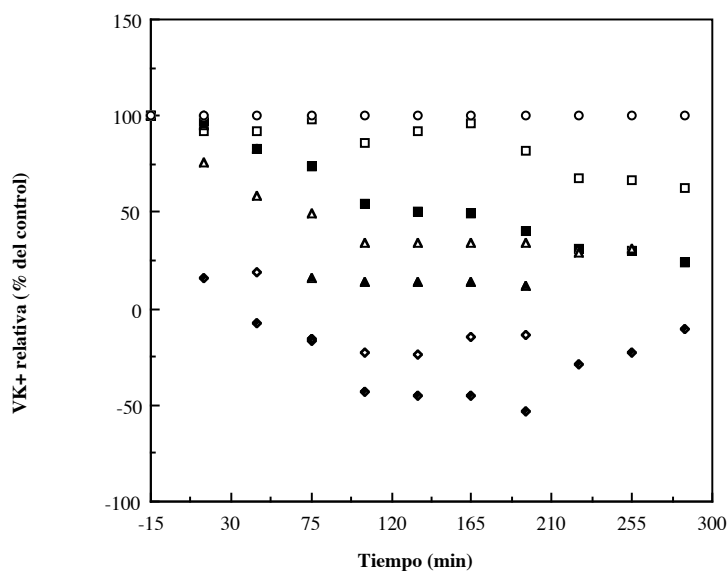


Fig 46: Actividad relativa de influjo de K⁺ frente al tiempo (en % de los valores de VK⁺ control -○-), con 30 (□); 40 (■); 50 (△); 60 (▲); 80 (◇) y 100 μM (◆) de DCCD. Los datos son media de, al menos tres experimentos independientes (las desviaciones de los datos directos a partir de los que se calculan los correspondientes porcentajes estan entre 5 y 10%).

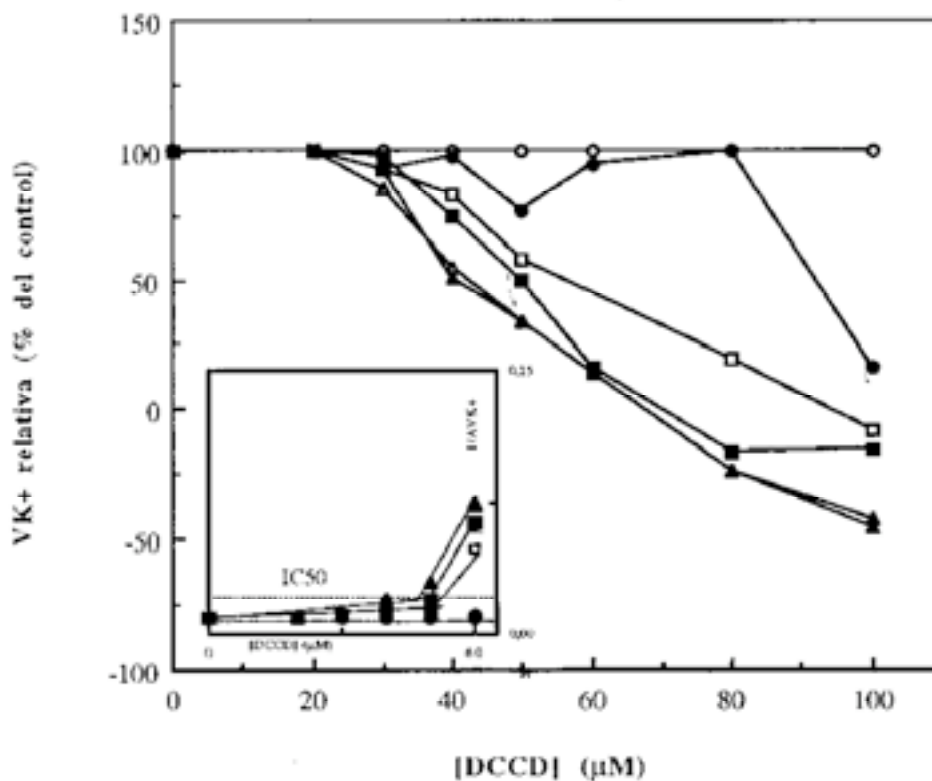


Fig 47: Actividad relativa de flujo de K^+ frente a la concentración de DCCD a -15 (○); 15 (●); 45 (□); 75 (■); 105 (△) y 135 min (▲) después de la adición de DCCD. Los datos son media de, al menos tres experimentos independientes. Inserta, el plot de Dixon-Webb (para los valores >0).

En resumen, de acuerdo con nuestros resultados podemos decir que el DCCD afecta tanto al eflujo neto de H^+ , como al influjo neto de K^+ , pero no de igual manera: el efecto inhibitor del DCCD sobre el eflujo de H^+ ocurre antes en el tiempo y a concentraciones más bajas que sobre el influjo de K^+ . Así, mientras que el eflujo de H^+ se anula en gran medida a los 20 min, el influjo de K^+ no muestra alteraciones hasta, aproximadamente, los 75 min, excepto para las concentraciones más elevadas. Respecto a la concentración de inhibidor ocurre algo semejante: el efecto sobre el eflujo de H^+ se satura a $40 \mu M$, con una inhibición apreciable no sólo con 30 sino también con $20 \mu M$; por el contrario, el efecto sobre el influjo de K^+ va aumentando conforme aumenta la concentración, siendo insensible a $20 \mu M$, y teniendo $30 \mu M$ escaso efecto. Como consecuencia de ello, los IC_{50} del eflujo de H^+ son sensiblemente menores que los del influjo de K^+ , produciéndose, además, a tiempos más cortos. Atkinson y Baker (1989) en suspensiones celulares de tabaco observan cómo la adición de DCCD inhibe el intercambio K^+/H^+ con un IC_{50} de $2.7 \mu M$ ($t=30$ min), requiriendo la inhibición total, a este tiempo, valores superiores a $20 \mu M$. Esto autores mantienen que este efecto pone de manifiesto la necesidad del funcionamiento de la H^+ -ATPasa para que se produzca el influjo de K^+ , aunque esta necesidad sería debida a la exigencia de un determinado gradiente de pH y/o eléctrico

(fuerza protón motriz), y no a que esté ocurriendo un transporte directo del K^+ por la H^+ -ATPasa, sino que más bien existiría un acoplamiento indirecto entre ellos, como también defienden Vara y Serrano (1982).

En conclusión, los resultados de este apartado parecen confirmar, de nuevo, la hipótesis de que el transporte de K^+ sería secundario y dependiente del transporte de H^+ ; el DCCD actuaría en primer lugar sobre los canales para el eflujo de H^+ , que al ser bloqueados provocarían, a su vez, la alteración del transporte de K^+ , por despolarización del potencial de membrana; de ahí la necesidad de mayores concentraciones y tiempo de actuación del inhibidor para que se altere el transporte de K^+ .

5.3.- EFECTORES QUE ACTUAN SOBRE LA H^+ -ATPasa DE PLASMALEMA

5.3.1.- Efecto del VANADATO sobre la cinética de flujos de H^+ y K^+

impidiendo la formación del intermediario fosforilado (Cleland, 1976; Macara, 1980); es por tanto, un inhibidor específico de la H^+ -ATPasa del plasmalema. Así mismo, se ha descrito la inhibición por Vanadato del transporte de K^+ (Lin, 1984; Thibaud et al., 1986).

Al ser nuestro material vegetal raíces enteras, lo que conlleva mayores dificultades de acceso del inhibidor hasta su lugar de actuación en la parte interna de la membrana plasmática, las concentraciones que utilizamos fueron: 50, 100, 200 y 500 μM de o-Vanadato. Estas concentraciones son superiores a las descritas en la Bibliografía, donde casi todos los trabajos se han realizado con vesículas microsomales o de plasmalema, utilizándose concentraciones inferiores a 100 μM . Sin embargo son similares a las utilizadas por otros autores cuando trabajan con órganos; así Brummell et al. (1986) utilizan 1 mM en epicotilos de guisante, Xia y Saglio (1990) 300 μM y Colombo et al. (1981) 200 μM en raíces de maíz.

Al igual que con el resto de efectores comprobamos, en primer lugar, el efecto que sobre la **capacidad tampón del medio** con raíces preincubadas en NaCN tiene la adición de la mayor concentración de o-Vanadato usada (500 μM); como se muestra en la **Fig 48** no varía, ni para el pH (βH^+) ni para el pK (βK^+), quedando las variaciones observadas incluídas dentro del intervalo de variabilidad existente entre diferentes repeticiones de una misma serie de calibraciones.

El Vanadato se adiciona al comienzo de la experiencia, (Espinosa, 1991) a pH 6.550, debido a los siguientes condicionantes que impone el uso de este inhibidor en nuestras raíces, observados en trabajos anteriores de nuestro equipo (Espinosa, 1991):

1º) A la propia naturaleza del o-Vanadato, que a pH inferior a 6.0 comienza a adoptar la forma deca-Vanadato, inactiva en la inhibición de la H^+ -ATPasa del plasmalema. Ello obliga a dar tiempo a que penetre y ejerza su acción antes de que por la extrusión de las raíces, se alcance dicho pH 6.0 en la solución.

2º) Por las características del material vegetal, que es un órgano entero, estando el lugar de actuación del Vanadato situado en la cara interna del plasmalema; ello implica que el inhibidor debe atravesar los espacios libres, la pared celular y el plasmalema, precisando, por tanto, de un periodo de tiempo más largo para alcanzar sus lugares de acción.

Estas experiencias las hemos realizado con las semillas procedentes de la **remesa C (Fig 17C)**.

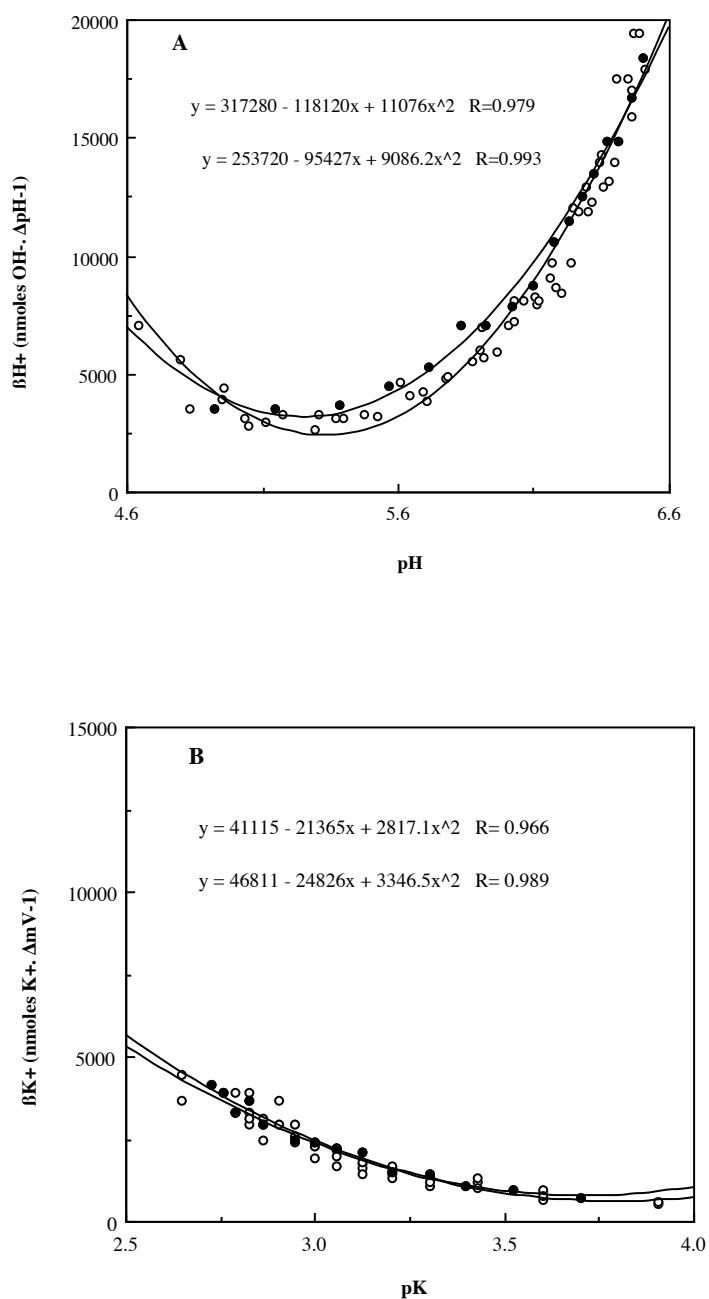


Fig 48: Capacidad tampón del medio con 175 raíces preincubadas en NaCN, sin (○) y con (●) 500 μM de o-Vanadato. (A) Capacidad tampón para H^+ (βH^+). (B) Capacidad tampón para K^+ (βK^+).

5.3.1.1. Efecto de la adición de algunas concentraciones de Vanadato sobre los flujos de H^+ y K^+ , simultáneamente

El efecto de la adición de $200 \mu M$ de Vanadato sobre los flujos simultáneos de H^+ y K^+ se muestra en la **Fig 49** donde se comparan sendos **experimentos representativos** con 200 y $500 \mu M$ de Vanadato en el medio (**Fig 49A-B**) con un control sin aditivo (**Fig 49C**). Como podemos ver, La adición, al inicio de la cinética, de **$200 \mu M$** de Vanadato ralentiza la capacidad de eflujo de H^+ a partir de los 120 min, lo que hace que el **pH final de equilibrio** se alcance a valores superiores (5.15) al del control (4.7) (**Fig 49 A y C insertas**). Lo mismo sucede con el influjo de K^+ , observándose que empieza a manifestarse antes el efecto inhibitor (a los 90 min) y además es más acusado, con una notable reducción de la **velocidad de influjo neto (VK^+)** y un **pK final** con $200 \mu M$ de Vanadato de 2.74 frente a 2.9 en el control. El desfase del efecto sobre los flujos de H^+ y K^+ se pone mejor de manifiesto comparando las variaciones de VH^+ y VK^+ en el mismo experimento. Así, a pesar del poco efecto que a tiempos inferiores a 240 min tiene el Vanadato sobre VH^+ , VK^+ se ve ya algo disminuida desde el minuto 60, siendo el efecto especialmente acusado a partir del minuto 120, en que VK^+ no sólo no aumenta, como en el control, sino que disminuye. A partir de los 300 min de la cinética VK^+ alcanza valores muy bajos, pero ya constantes hasta el final de la misma.

Cuando la concentración de Vanadato empleada es la máxima (**$500 \mu M$, Fig 49C**), el efecto que se observa es similar al descrito para $200 \mu M$, tanto para el eflujo de H^+ como para el influjo de K^+ , pero más acusado en ambos casos. Así, el pH final de equilibrio es aún más alto (5.25, frente a 5.15 con $200 \mu M$ y 4.7 en el control), y el pK final también (2.72 frente a 2.74 con $200 \mu M$ y 2.9 en el control). El principal efecto diferencial es la mayor inhibición del influjo de K^+ a partir de los 300 min de la cinética, con anulación total a partir de 360 min.

Estos resultados demuestran un fuerte efecto de esta concentración de Vanadato sobre el transporte de K^+ y relativamente poco sobre el de H^+ , poniendo de manifiesto que el influjo de K^+ depende directamente de algún sistema de transporte muy sensible al Vanadato.

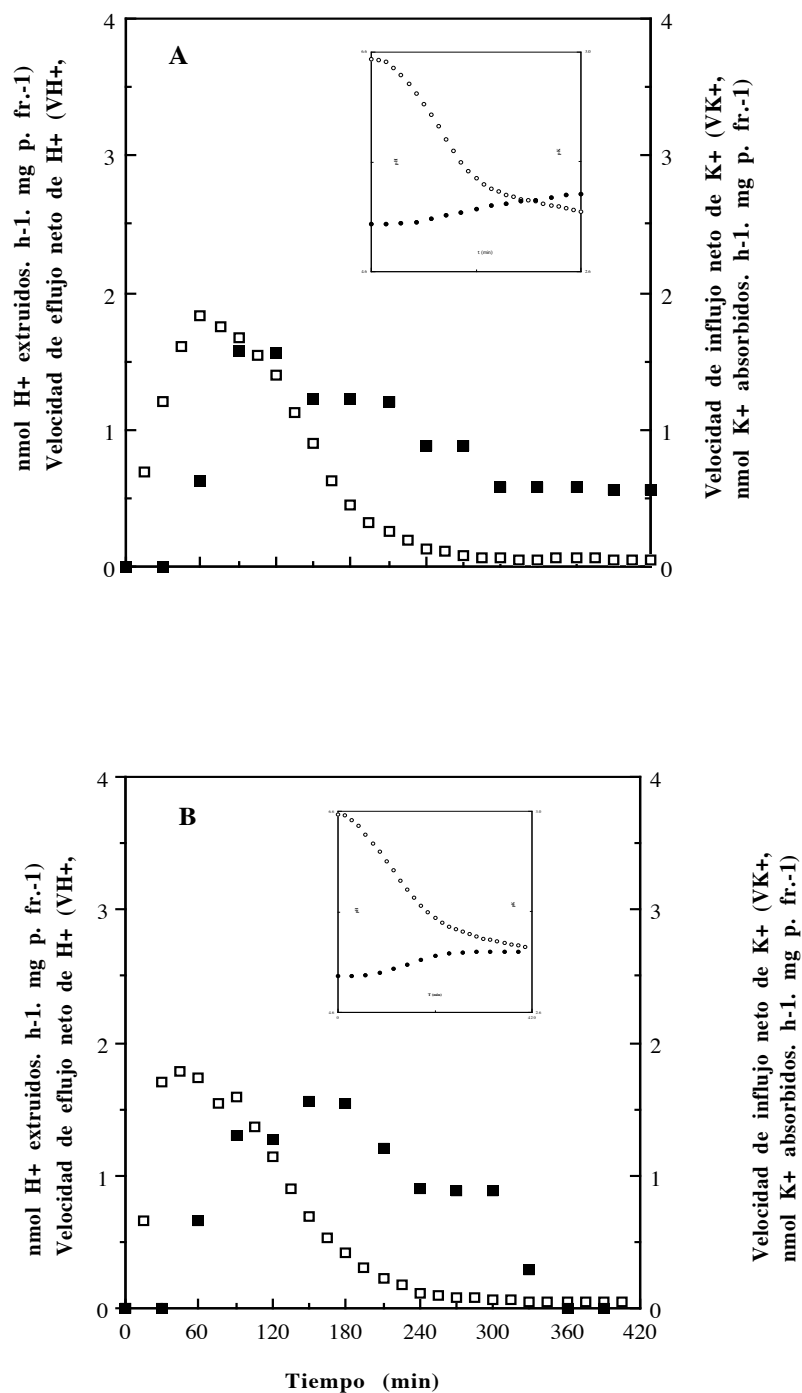


Fig 49: Velocidades netas de eflujo de H^+ (\square) e influjo de K^+ (\blacksquare) por las raíces, medidas simultáneamente, (A) con $200 \mu M$, (B) con $500 \mu M$ y (C) sin Vanadato. **Insertas**, los datos directos de variación de pH (\circ) y pK (\bullet) del medio. El vanadato se adiciona al inicio de la cinética. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo ($n \geq 3$, variaciones $\leq 5\%$ para VH^+ y entre 5 y 10% para VK^+).

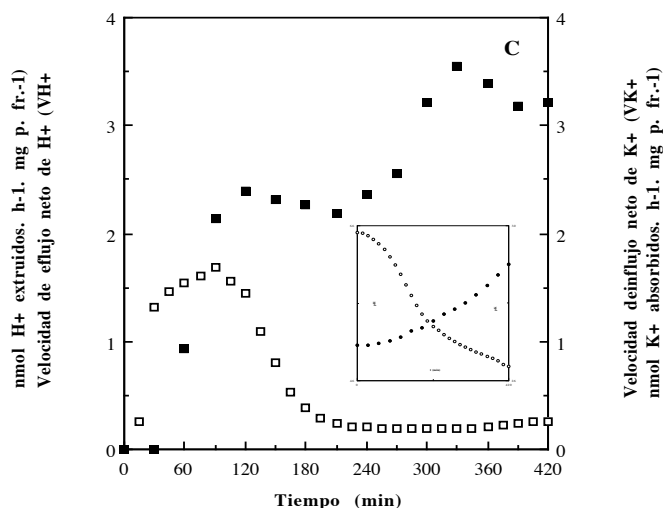


Fig 49: Continuation.

5.3.1.2.- Efecto de varias concentraciones de Vanadato sobre el eflujo neto de H^+ : Curvas dosis-respuesta

El efecto del Vanadato sobre el eflujo de H^+ se muestra en la **Fig 50**, donde se muestran los **valores medios** de las variaciones de **pH del medio** provocadas por las distintas concentraciones de Vanadato, comparadas con la control sin Vanadato (**A**) y la **velocidad de eflujo neto de H^+ (VH^+ , B)**; para cada concentración ($n=3$, variabilidad $\leq 5\%$). Como podemos ver, conforme aumenta la concentración de inhibidor la acidificación del medio es menor, el eflujo neto de H^+ disminuye. La inhibición se pone de manifiesto, aproximadamente, a partir de los 150 min del inicio de la cinética, excepto con $500 \mu M$, concentración con la que se aprecia la inhibición a los 90 min.

En el **pH final de equilibrio** se comprueba mejor la inhibición del eflujo de H^+ por las raíces con Vanadato. Así, a medida que la concentración utilizada es mayor, el valor de este pH es menos ácido: mientras sin Vanadato el pH de equilibrio es 4.7, con $50 \mu M$ es de 4.925, con $100 \mu M$ de 5.08, con $200 \mu M$ de 5.2 y con $500 \mu M$ de 5.3.

La **velocidad de eflujo neto de H^+ (VH^+)**, calculada a partir de estas cinéticas y de la capacidad tampón del medio (βH^+ , **Fig 48**), se representa frente al tiempo en la **Fig 50B**. Sin embargo, esta gráfica aporta poca información en el caso de este inhibidor, pues, debido a que las variaciones son pequeñas, los valores no se diferencian claramente; además, el efecto inhibitorio no es claramente detectable hasta los 150 minutos (excepto con $500 \mu M$), estando a este tiempo el valor de VH^+ muy lejos del máximo, lo cual hace que los cambios que pudieran producirse por la inhibición sean menos detectables que si el efecto se diera antes, más cercano al funcionamiento óptimo del sistema. En efecto, excepto con $500 \mu M$, en que se manifiesta antes el efecto inhibitorio y en consecuencia disminuyen más las velocidades máximas (de 1.7 a $1.5 \text{ nmol } H^+/\text{h. mg p. fr.}$), el resto de concentraciones no las alteran.

La representación de VH^+ frente a pH (Fig 50C), muestra más claramente la inhibición del vanadato entre pH 6.170 y 5.370, estando en dicho intervalo los valores del control siempre por encima de los obtenidos en presencia de Vanadato, aunque todas las concentraciones inferiores (50, 100 y 200 μM) dan valores muy semejantes entre sí, y superiores a las velocidades obtenidas con 500 μM , que es la concentración que provoca una más clara inhibición del eflujo neto de H^+ .

En la gráfica de la **Actividad relativa de eflujo neto de H^+** , representada **frente al tiempo** (Fig 51, VH^+ para cada concentración de Vanadato en % de VH^+ control al mismo tiempo) es donde mejor se pone de manifiesto la inhibición del transporte de H^+ por la adición de Vanadato al medio. Como podemos observar, la VH^+ desciende a partir de los 100 min para todas las concentraciones utilizadas, siendo más drástico el descenso para 500 μM (aproximadamente VH^+ representa el 60% de la del control, a los 180 min, mientras concentraciones inferiores como 50 y 100 μM presentan una VH^+ de, aproximadamente el 82% del control). Es a partir de los 240 min cuando la inhibición es más fuerte, apareciendo ya claras diferencias entre las diferentes concentraciones: 50 μM presenta una VH^+ superior al 75% de la del control, mientras con 100 μM se reduce a un 65%, y con 200 μM y 500 μM a un 30%. En ningún caso se anula totalmente el eflujo, en el tiempo que dura la cinética.

La **Actividad relativa frente a la concentración de Vanadato**, a distintos tiempos, se muestra en la Fig 52. A los 60 min del inicio de la cinética no observamos inhibición del eflujo de H^+ con ninguna de las concentraciones del inhibidor. No es hasta los 120 min que comienza a observarse inhibición para 200 y 500 μM , aunque no para las concentraciones inferiores. Resultados similares han sido obtenidos por Brummell et al. (1986) con epicotilos de pepino, donde se requieren 2 horas de incubación para obtener inhibición, y por Colombo et al. (1981), quienes necesitaban pretratamientos de 1 hora con 200 μM de Vanadato para conseguir inhibir la extrusión de H^+ por raíces de maíz. A partir de este tiempo vamos apreciando diferentes grados de inhibición según las concentraciones, aunque no es hasta los 240 min que la velocidad de extrusión de H^+ baja por debajo del 50% de la del control con las dos concentraciones mayores. A partir de los 300 min y 100 μM de Vanadato los resultados son ya muy semejantes entre sí.

En la **inserta** de la gráfica se representan las inversas de las Actividades relativas frente a la concentración de Vanadato, para diferentes tiempos (**plot de Dixon-Webb**). Como podemos observar, la respuesta es siempre monofásica, mostrando líneas rectas de pendiente creciente con el tiempo. Esto pone de manifiesto que la actuación del Vanadato es sobre un único sistema de transporte de H^+ (presumiblemente la H^+ -ATPasa, según la Bibliografía). En esta representación hemos calculado los diferentes valores de IC_{50} que, como hemos indicado con anterioridad no se alcanza para tiempos inferiores a 240 min con ninguna concentración; a 240 min es 144 μM , valor que se reduce a 86 μM para 300 y 360 min y a 49 μM para 420 min. Estos valores de IC_{50} son similares a los obtenidos

por otros autores (Brummell et al., 1986; Colombo et al., 1981; De Michelis y Spanswick, 1986; Xia y Saglio, 1990) con materiales similares, siendo las diferencias existentes referidas al tiempo de incubación necesario, más largo en nuestras experiencias.

Resumiendo, el efecto del Vanadato sobre el eflujo de H^+ depende tanto de la concentración como del tiempo de incubación. La actuación de este inhibidor depende del tiempo hasta los 300 min, y a partir de ese momento la inhibición se mantiene constante. En cuanto la concentración (**Fig 52**), podemos decir que el efecto depende de ella sólo hasta 200 μM , donde alcanza el máximo; concentraciones superiores no producen significativamente mayor inhibición, que ahora dependerá del tiempo de incubación (hasta 300 min). De estos resultados podemos concluir que el inhibidor requiere concentraciones altas ($\geq 100 \mu M$) y tiempos de actuación largos (entre 240 y 300 min) para producir su efecto, lo que pone de manifiesto las dificultades del inhibidor para penetrar y alcanzar su punto de actuación, en la cara interna de la membrana plasmática. Otros investigadores han comprobado también las dificultades de acceso del inhibidor en órganos enteros (De Michelis y Spanswick, 1986); además, parte del Vanadato que penetra podría fijarse en otros componentes celulares, reduciendo la cantidad que se fija y ejerce su acción en la membrana plasmática (O'Neill y Spanswick, 1984B). Todo ello explicaría la necesidad de periodos "largos" para que se produzca la inhibición y de concentraciones elevadas, es decir, la relativamente baja sensibilidad al Vanadato que ha sido descrita en otros materiales (Cruz-Mireles y Ortega-Blake, 1991) y que, como hemos dicho, podría deberse a dificultades de penetración. Sin embargo, estos resultados también podrían indicar que, además del eflujo de H^+ provocado por la H^+ -ATPasa de plasmalema, hay otro/s sistema/s implicado/s en este transporte, probablemente la cadena redox del plasmalema, insensible(s) al inhibidor, y que sigue(n) extruyendo H^+ en presencia del mismo. Sin duda que el eflujo de H^+ que aún mantienen las raíces, en la mayor concentración del inhibidor, y a los tiempos más largos ($\approx 25\%$ de la velocidad del control al mismo tiempo) corresponde a un sistema insensible al Vanadato (¿la cadena redox?).

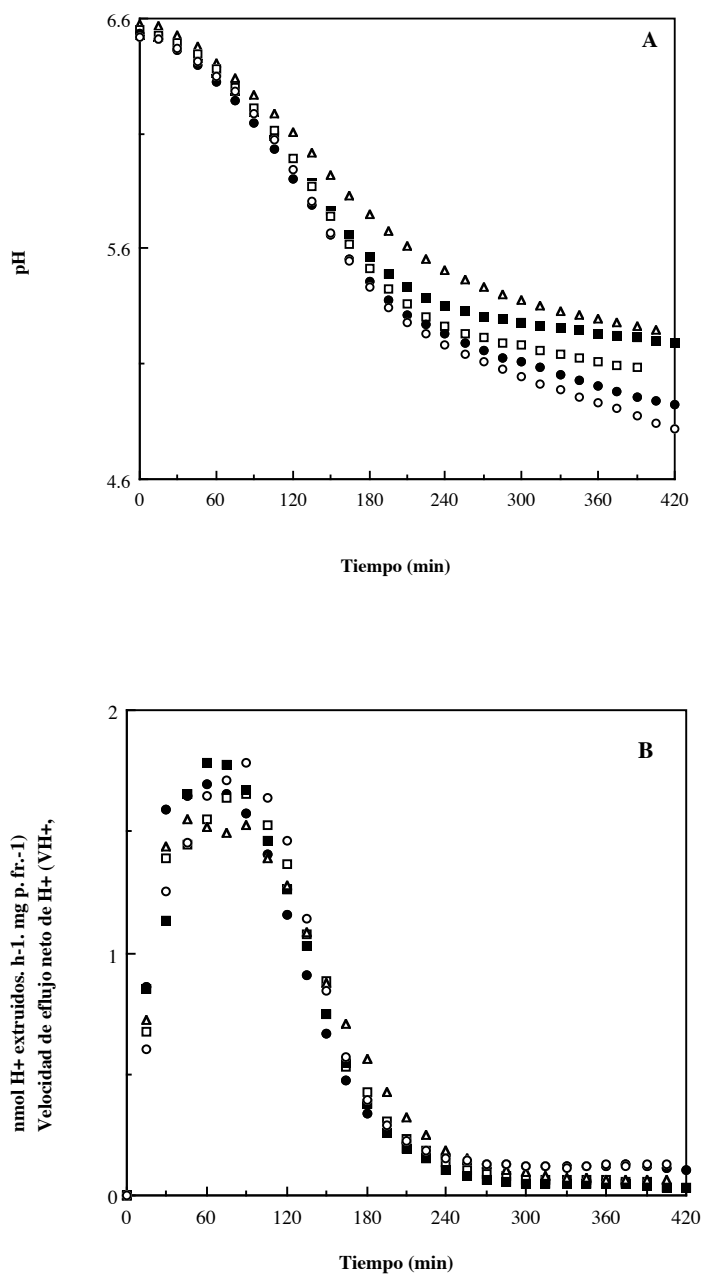


Fig 50: (A) Variación de pH del medio y (B) velocidades de eflujo neto de H⁺ (VH⁺) frente al tiempo y (C) frente al pH por las raíces sin (○) y con 50 (●); 100 (□); 200 (■) y 500 μM (△) de Vanadato adicionado al inicio de la cinética. Los datos son media de, al menos, 3 experimentos (desviación ≤5%)

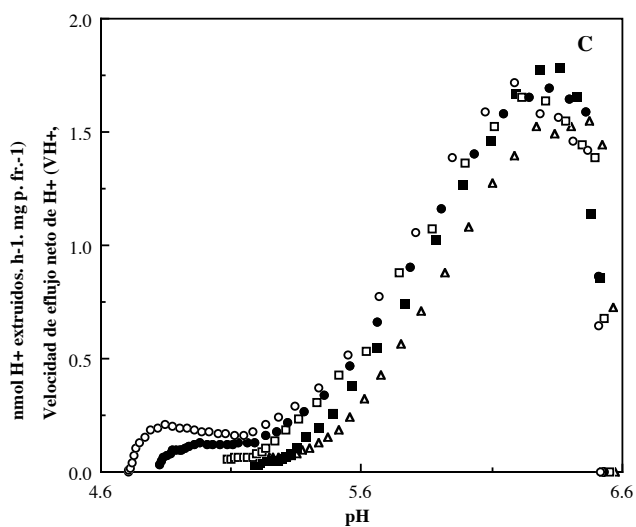


Fig 50: Continuación

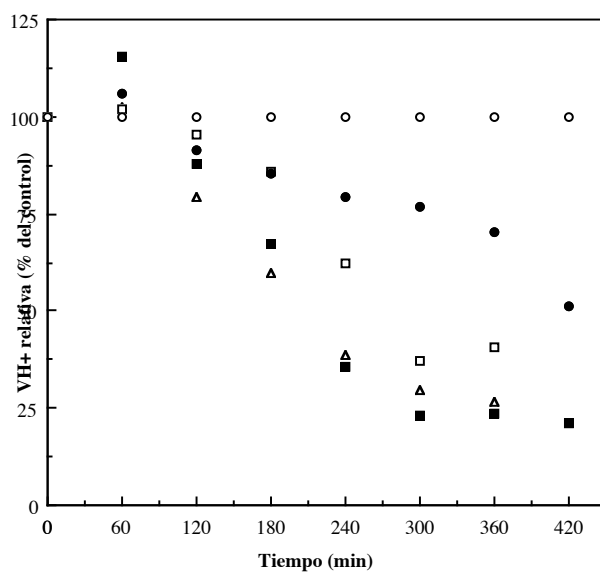


Fig 51: Actividad relativa de eflujo de H^+ frente al tiempo (en % de los valores de VH^+ control - \circ -), con 50 (\bullet); 100 (\square); 200 (\blacksquare) y 500 μM (\triangle) de Vanadato. Los datos son media de, al menos tres experimentos independientes (las desviaciones de los datos directos a partir de los que se calculan los correspondientes porcentajes son $\leq 5\%$).

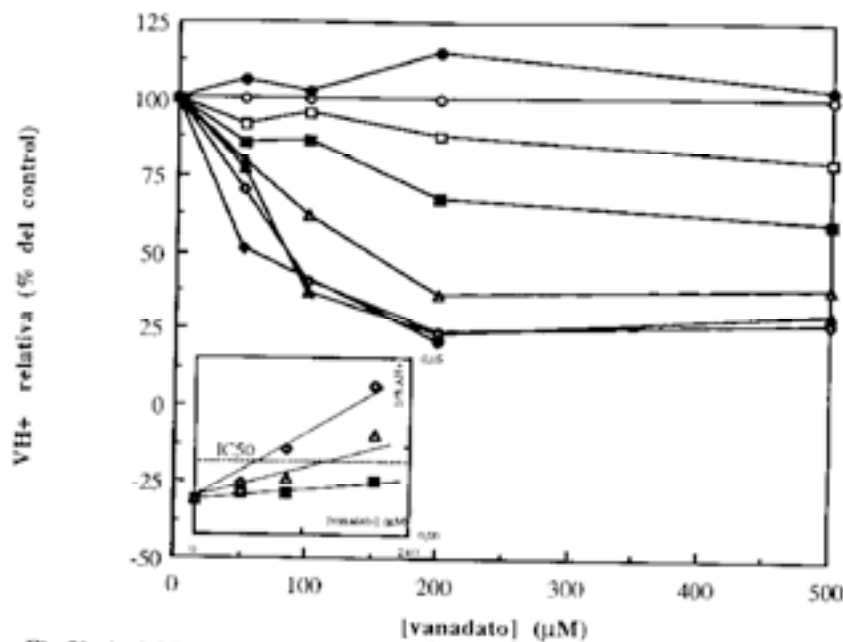


Fig 52: Actividad relativa de eflujo de H^+ frente a la concentración de Vanadato a 0 (○); 60 (●); 120 (□); 180 (■); 240 (△); 300 (▲); 360 (◇) y 420 min (◆) después de la adición del Vanadato. Los datos son media de, al menos tres experimentos. **Inserta,** el plot de Dixon-Webb (para valores >0).

5.3.1.3.- Efecto de varias concentraciones de Vanadato sobre el influjo neto de K^+ : Curvas dosis-respuesta

El efecto de las mismas concentraciones de Vanadato sobre el influjo neto de K^+ se muestra en la **Fig 53**, en la que hemos representado frente al tiempo la variación de **pK** (A) y **VK⁺** (B). La inhibición del influjo de K^+ por Vanadato es severa, notándose tanto si consideramos la variación directa de pK (**Fig 53A**) como en el descenso en VK⁺ (**Fig 53B**). La inhibición es ya apreciable a los 90 min, sobre todo para las concentraciones altas, siendo a los 120 min evidente para todas ellas. La inhibición con 200 y 500 μM de Vanadato es similar, y sensiblemente más severa que con 50 y 100 μM . El **incremento de pK** (disminución de la concentración de K^+ del medio) en el tiempo que dura la cinética, es muy inferior al control ($\Delta pK \approx 0.185$), tanto con las concentraciones bajas ($\Delta pK \approx 0.070$) como con las altas ($\Delta pK = 0.035$). Todo ello pone de manifiesto el efecto inhibitor del Vanadato sobre el influjo neto de K^+ .

El efecto puede comprobarse mejor en la **Fig 53B**, donde se observa que todas las concentraciones de Vanadato producen una fuerte reducción de la **velocidad de influjo neto de K^+ (VK⁺)** a los 90 min, (1.8 en el control frente a 1.25 y 0.90 nmol K^+ /h. mg p. fr. para 50-100 μM y 200-500 μM , respectivamente). A partir de este momento, con 50 y 100 μM VK⁺ se mantiene prácticamente constante, con las pequeñas oscilaciones homeostáticas que ya conocemos, mientras que con 200 μM la velocidad continúa bajando hasta los 330 min manteniéndose después constante a valores muy bajos. Con 500 μM VK⁺ sigue bajando hasta los 360 min, en que se anula totalmente el influjo de K^+ . Con

ninguna de las concentraciones de Vanadato, el transporte de K^+ muestra las cinéticas multifásicas normales, lo que es indicativo de las alteraciones producidas sobre el influjo de K^+ por el inhibidor.

La **Actividad relativa de influjo de K^+** (% de VK^+ respecto a los controles) en función del tiempo, para las distintas concentraciones de Vanadato (**Fig 54**) pone de manifiesto cómo en los primeros 120 min hay un descenso brusco de la Actividad relativa para todas las concentraciones (VK^+ relativa, entre el 63% y 50% de la velocidad control al mismo tiempo, para 50 y 500 μM , respectivamente). A partir de este momento, la inhibición depende, igual que sucedía con el eflujo de H^+ , de la concentración: así, mientras que 50 μM mantiene una VK^+ relativa casi constante en torno al 60% del control, hasta el final de la cinética, el resto de las concentraciones disminuyen progresivamente dicha Actividad relativa, siendo el efecto tanto mayor cuanto mayor es la concentración y el tiempo, anulándose totalmente sólo en el caso de 500 μM (a partir de 360 min).

En la **Fig 55** se representa la Actividad relativa de influjo de K^+ frente a la concentración de Vanadato. Podemos observar que a los 60 min apenas si existe inhibición, cualquiera que sea la concentración de Vanadato utilizada. Es a partir de los 120 min cuando hay una disminución apreciable de la Actividad relativa (VK^+ para todas las concentraciones $\approx 60\%$ de la VK^+ del control al mismo tiempo), siendo este descenso mayor a medida que aumenta el tiempo, hasta llegar a 360 min en que la inhibición es prácticamente igual para todas las concentraciones. La inhibición depende de la concentración de inhibidor sólo hasta 200 μM (se saturan los lugares de enlace con esta concentración), de manera que si ésta aumenta (500 μM) no se produce variación significativa en la inhibición. Las altas concentraciones y el largo tiempo requeridos para su actuación vuelven a resaltar las dificultades de acceso del inhibidor a sus lugares de actuación, así como la baja sensibilidad de los mismos al inhibidor.

Gronwald y Leonard (1982), con protoplastos de células corticales de raíces de maíz tratadas 15 min con 1 mM de o-Vanadato, obtienen una inhibición del influjo de K^+ del 25%, similar a los valores observados con raíces intactas (Colombo et al, 1981) y similar también a la inhibición aquí mostrada con raíces de girasol a concentraciones inferiores (100, 200 y 500 μM), aunque con un tiempo de incubación sensiblemente mayor (90 min). Esto parece poner de manifiesto que la inhibición del influjo de K^+ debida al Vanadato depende tanto de la concentración como del tiempo de penetración, aunque, para cada concentración y una vez alcanzado el máximo de inhibición (mayor cuanto mayor es la concentración), se alcanza la saturación, manteniéndose constante.

La **representación de Dixon-Webb (Fig 55 inserta)** pone de manifiesto que, a diferencia de lo que ocurría con el transporte de H^+ , el influjo de K^+ parece presentar una respuesta bifásica al Vanadato. Así, para tiempos inferiores a 360 min hay una sola respuesta, con IC_{50} de 200 μM (t=180 min), 85 μM (t=240 min) y 62 μM (t=360 min). A los 360 min aparece una segunda respuesta, que presenta un IC_{50} de 100 μM , es decir, con

menor sensibilidad al inhibidor y mayor dificultad de acceso, ya que necesita mayores tiempos para penetrar. Esto se interpreta como evidencia de que, a $t < 360$ min, un único lugar responsable del influjo de K^+ está siendo afectado por el Vanadato, mostrando un IC_{50} mínimo de $62 \mu M$, mientras que a $t > 360$ min y a partir de $100 \mu M$ un segundo lugar de inhibición del influjo de K^+ comienza a manifestar su sensibilidad al Vanadato. Este resultado podría estar poniendo de manifiesto dos efectos diferentes del Vanadato sobre el influjo de K^+ , y sería congruente con el resultado ya descrito de que el efecto del inhibidor sobre el influjo neto de K^+ es anterior en el tiempo al efecto que tiene sobre el eflujo neto de H^+ .

En conclusión, los resultados expuestos anteriormente, parecen indicar que el Vanadato actúa sobre un único sistema implicado en el eflujo de H^+ (como lo indica la respuesta única observada en el plot de Dixon-Webb), que, según la Bibliografía sería la H^+ -ATPasa del plasmalema, y debido al requerimiento de tiempos largos para su actuación, su lugar de actuación estaría en la parte del enzima que da a la cara interna de dicha membrana, como se ha descrito. Sin embargo, ni con la concentración más elevada y los tiempos más largos se produce la inhibición total del eflujo neto de H^+ , creemos que porque algún otro sistema excretor de H^+ continúa funcionando que no es afectado por el inhibidor; este sistema podría ser la cadena redox del plasmalema. Por otra parte, el mayor efecto inhibitor del Vanadato sobre el influjo neto de K^+ , junto con el hecho de que la inhibición del influjo de K^+ se manifiesta antes que la del eflujo de H^+ , podría ser indicativo de la existencia de un efecto directo del Vanadato sobre algún transportador implicado directamente en el influjo de K^+ , que se correspondería con la primera fase de la respuesta observada en el plot de Dixon-Webb, la que presenta menor requerimiento de tiempo y concentración (la más sensible). A tiempos largos se produciría una segunda inhibición por Vanadato de otro componente implicado en la absorción de K^+ , como pone de manifiesto la segunda fase de la respuesta del plot de Dixon-Webb, que requiere más tiempo y más concentración para la inhibición (el sistema implicado es menos sensible y accesible al inhibidor). Por analogía en tiempo y concentración con la inhibición del eflujo de H^+ , esta segunda fase de la inhibición del influjo de K^+ podría deberse al efecto de bloqueo de la H^+ -ATPasa, con lo que el gradiente de pH generado sería menor y por tanto el influjo de K^+ se vería afectado, ahora de manera indirecta. El acoplamiento indirecto entre el eflujo de H^+ y el influjo de K^+ es también observado por Atkinson y Baker (1989): de sus datos se desprende el requerimiento de actividad ATPasa para el transporte de K^+ , pero esta ATPasa no estaría implicada de forma directa, en el flujo de K^+ .

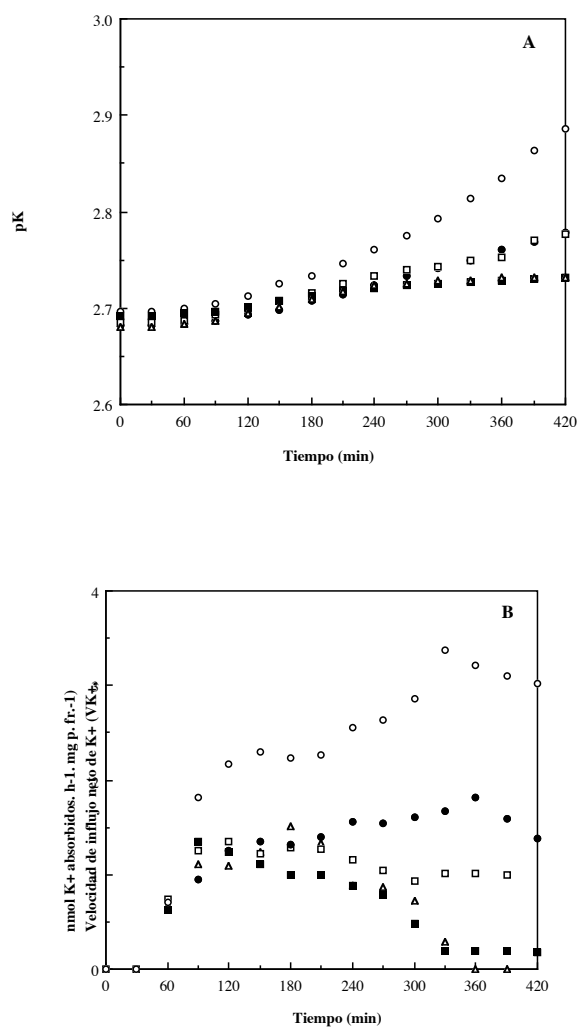


Fig 53 : (A) Variación de pK del medio y (B) velocidades de influjo neto de K⁺ (VK⁺) por las raíces sin (○) y con 50 (●); 100(□); 200 (■) y 500 μM (△) de Vanadato adicionado al inicio de la cinética. Los datos son media de, al menos, 3 experimentos (desviación entre 5 y 10%).

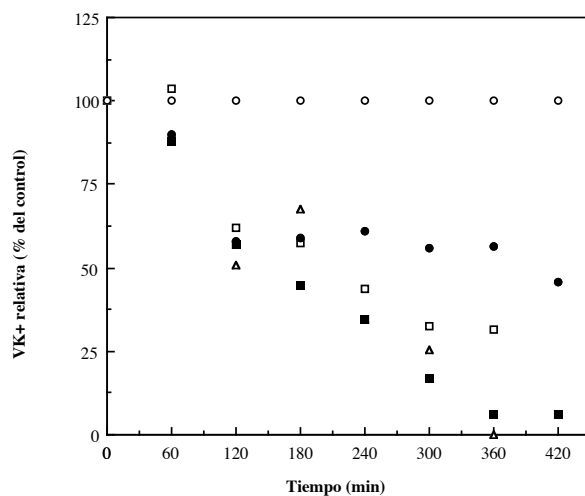


Fig 54: Actividad relativa de influjo de K^+ frente al tiempo (en % de los valores de VK^+ control - ○ -), con 50 (●); 100(□); 200 (■) y 500 μM (△) de Vanadato. Los datos son media de, al menos tres experimentos independientes (las desviaciones de los datos directos a partir de los que se calculan los correspondientes porcentajes están entre 5 y 10%).

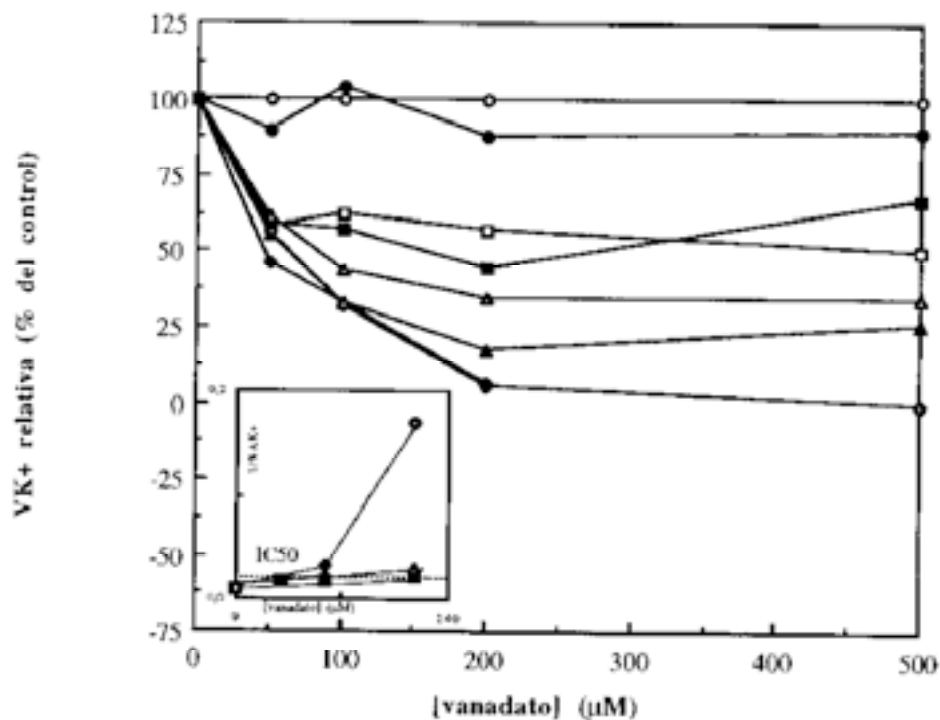


Fig 55: Actividad relativa de influjo de K^+ frente a la concentración de Vanadato a 0 (○); 60 (●); 120 (□); 180 (■); 240 (△); 300 (▲); 360 (◇) y 420 min (◆) después de la adición de Vanadato. Los datos son media de, al menos tres experimentos. **Inserta**, el plot de Dixon-Webb (para los valores >0).

5.3.2.-Efecto de la OLIGOMICINA sobre la cinética de flujos de H⁺ y K⁺

La Oligomicina (Apartado 4.3.1. de Introducción) es un inhibidor que actúa sobre el complejo F₀F₁ de la ATPasa mitocondrial, bloqueando la hidrólisis del ATP (Nicholls, 1987); sin embargo también puede afectar a la actividad de la H⁺-ATPasa del plasmalema, habiéndose demostrado su efecto sobre la extrusión de H⁺ y la absorción de K⁺ (Malone et al., 1977; De Michelis et al., 1984; Lin, 1984). En nuestras raíces, experiencias anteriores de nuestro laboratorio con espectroscopía de ³¹P-RMN han puesto de manifiesto que la Oligomicina, aplicada exógenamente como en estas experiencias, no afecta el contenido de ATP endógeno de las células, o sea, no altera la ATP-sintasa mitocondrial, seguramente porque no es capaz de penetrar en la célula (Espinosa et al., 1992), de modo que sus efectos han de ser atribuidos a la inhibición de la H⁺-ATPasa del plasmalema.

En consecuencia decidimos utilizar Oligomicina en nuestras experiencias como un inhibidor más que nos permitirá estudiar su efecto sobre el eflujo de H⁺, si tiene alguna actuación sobre el de K⁺, medidos ambos flujos simultáneamente, y si se manifiesta o no un acoplamiento entre ambos.

Como en todos los casos en los que se adiciona algún compuesto al medio de medida, realizamos en primer lugar la titulación de éste con la máxima concentración de Oligomicina utilizada (7.5 µg/ml) y raíces preincubadas en NaCN, para determinar la **capacidad tampón** en estas condiciones. En la **Fig 56** se observa cómo la adición de 7.5 µg/ml de Oligomicina no modifica la capacidad tampón, ni βH⁺ ni βK⁺, al menos en el intervalo de pH en que se llevan a cabo nuestra experiencias (pH 4.7 a 6.0).

Las concentraciones de Oligomicina utilizadas en las curvas dosis-respuesta fueron 0.75; 1.25; 2; 2.5; 3.75; 5 y 7.5 µg/ml, con 2 mM K⁺ en el medio standard de medida.

Los experimentos se realizaron con la **remesa C (Fig 17C)**.

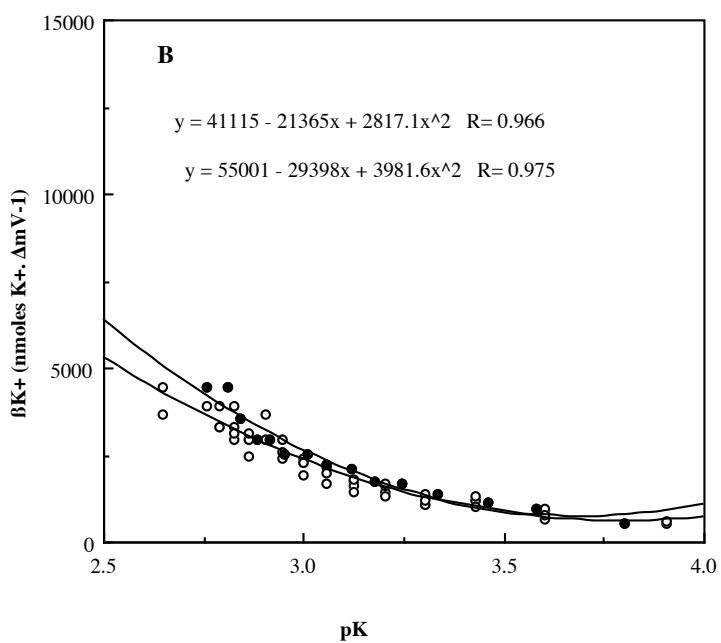
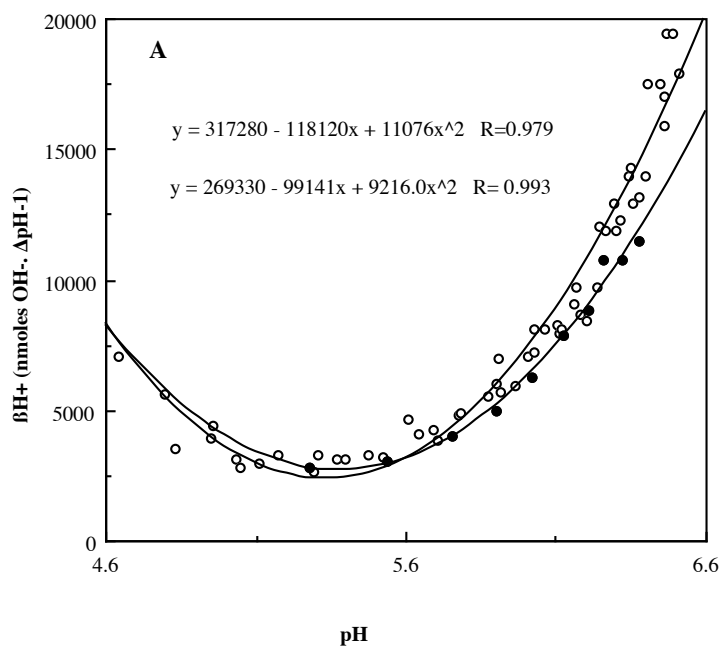


Fig 56: Capacidad tampón del medio con 175 raíces preincubadas en NaCN, sin (○) y con (●) 7.5 $\mu g/ml$ de Oligomicina. (A) Capacidad tampón para H^+ (βH^+). (B) Capacidad tampón para K^+ (βK^+).

5.3.2.1.- Efecto de la adición de algunas concentraciones de Oligomicina sobre los flujos de H^+ y K^+ , simultáneamente

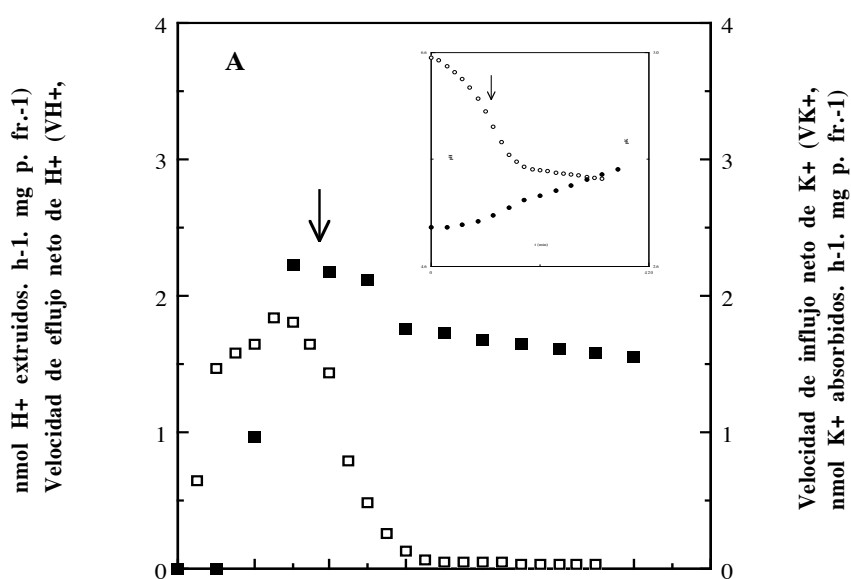
En un **experimento representativo** de flujos simultáneos (**Fig 57A**), se comprueba el efecto de la adición de $2.5 \mu\text{g/ml}$ de Oligomicina a pH 6.0 (≈ 105 min del inicio de la cinética), en comparación con un experimento control, sin aditivo (**Fig 57C**). Como puede observarse, dicha concentración de Oligomicina produce una inhibición del eflujo neto de H^+ que comienza a ponerse de manifiesto, aproximadamente, a los 45 min de la adición. Así, se comprueba en la **Fig 57A inserta (pH)**, que la acidificación del medio comienza a ser más lenta (comparada con la control -**Fig 57C inserta-**) tras la adición del inhibidor, siendo el efecto más evidente a partir de los 45 min de la aplicación. A los 90 min, mientras el pH del medio es 5.510 con las raíces tratadas, el control tiene, a ese tiempo, un pH de 5.290; la diferencia se hace cada vez mayor, y el pH final de equilibrio en el medio con las raíces tratadas con $2.5 \mu\text{g/ml}$ de Oligomicina es ≈ 5.4 , mientras que en la control es ≈ 5.0 . Comparando estas variaciones del pH con las variaciones de **pK**, medidas de forma simultánea a las de pH (**Fig 57A inserta**), se observa cómo también la Oligomicina produce una fuerte inhibición del aumento del pK en el medio, con respecto al control (**Fig 57C, inserta**). Sin embargo el efecto presenta un **retardo o lag** con respecto al pH. Así, mientras el efecto sobre el pH se manifiesta claramente a los 45 min, el pK necesita tiempos más largos, observándose claramente cuando las raíces ya han alcanzado el pH final de equilibrio y no producen acidificación neta del medio ($t=90$ min); los valores de pK normales no se recuperan, quedando el valor final muy por debajo del control (ΔpK control: 0.15, mientras que con $2.5 \mu\text{g/ml}$ de Oligomicina ΔpK : 0.10).

Los efectos descritos se ponen de manifiesto con mayor claridad y exactitud al considerar **las velocidades netas de eflujo de H^+ (VH^+) e influjo de K^+ (VK^+)** (**Fig 57A**), con respecto al control (**C**). Así, VH^+ disminuye rápidamente tras la adición de $2.5 \mu\text{g/ml}$ de Oligomicina (a los 15 min de la adición ya se observa un descenso de velocidad respecto del control, **Fig 57C**), mientras que VK^+ no se ve afectada hasta transcurridos 45 min, que también disminuye (aunque sin llegar a anularse totalmente), no mostrando la cinética multifásica típica del transporte de K^+ (**Fig 57C**). Parece que la inhibición provocada sobre el eflujo neto de H^+ por la Oligomicina hace que el influjo de K^+ disminuya, aunque aparentemente el gradiente de pH generado ($\Delta\text{pH}_{i,o} \approx 2.2$, ya que esta concentración de Oligomicina tampoco altera el pH citoplasmático, medido por espectroscopía de ^{31}P -RMN, Espinosa et al., 1992) permite mantener unas velocidades de influjo neto de K^+ de, aproximadamente, el 50% de los valores normales.

Hemos incluido también un experimento tipo con la **concentración de Oligomicina más alta ($7.5 \mu\text{g/ml}$)** empleada en nuestra experiencias (**Fig 57B**). Incluso a esta alta concentración se observa un claro desfase entre el efecto sobre ambos flujos. Así, el eflujo de H^+ se inhibe inmediatamente tras la aplicación del inhibidor (la acidificación del medio -pH, **inserta-** se para, y VH^+ disminuye drásticamente, a los 15 min de la aplicación -120

min de la cinética-), mientras que el influjo de K^+ no está afectado. El desfase del efecto sobre uno y otro flujo parece ser de 15 min. Así, a los 30 min, VH^+ ha alcanzado valores cercanos a 0, mientras que VK^+ los alcanza a los 45 min de aplicación del inhibidor (min 135 y 150 de la cinética, respectivamente). A continuación se invierten los flujos (VH^+ y VK^+ alcanzan valores negativos, es decir, está ocurriendo una neta intrusión de H^+ y extrusión de K^+), igualmente retrasados los efectos sobre uno y otro flujo en ≈ 15 min (VH^+ a los 165 min y VK^+ a los 180 min de la cinética). Finalmente los flujos se recuperan algo, de manera que VH^+ alcanza de nuevo valores positivos (extrusión de H^+), comparables a los que muestran las raíces control a esos tiempos, manteniéndose hasta el final de la cinética, mientras que VK^+ sólo sube hasta valores cercanos a 0 (flujo neto de K^+ nulo). En esta recuperación se mantiene también el desfase entre ambas respuestas, siempre en el sentido de que el cambio en el flujo de K^+ muestra un lag de 15 min respecto al flujo de H^+ .

Estos resultados son de nuevo congruentes con la idea de que los cambios de potencial electroquímico para los H^+ , creados por la actuación del inhibidor sobre la H^+ -ATPasa de la membrana, son los responsables de los cambios de flujo de K^+ detectados, dando efectos paralelos, pero desfasados en el tiempo, como si fueran causa y efecto. En este punto es interesante destacar, como en casos anteriores, cómo cuando el flujo de H^+ revierte a influjo neto, despolarizando la membrana, se compensa esta situación con una posterior (15 min de lag) reversión del flujo de K^+ a eflujo neto, presumiblemente por la apertura de canales K^+_{out} , para repolarizar la membrana (Blatt, 1997).



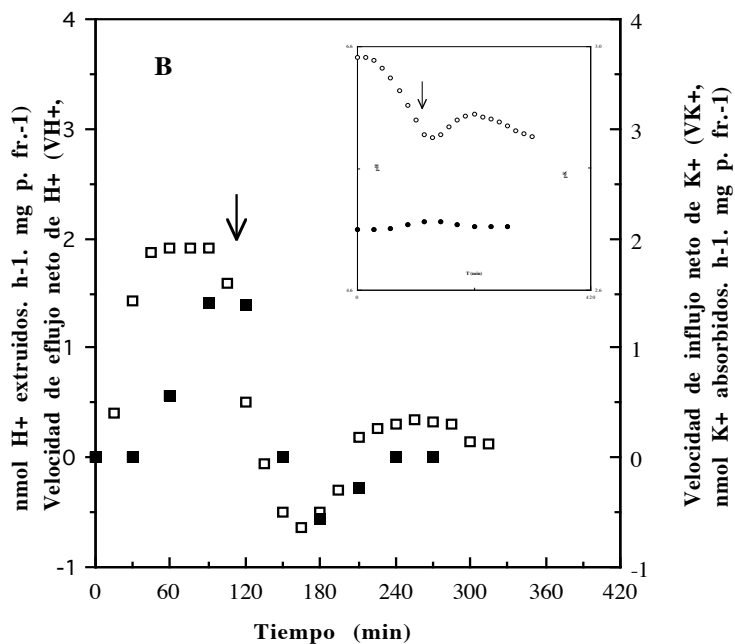


Fig 57: Velocidades netas de eflujo de H^+ (□) e influjo de K^+ (■) por las raíces, medidas simultáneamente, (A) con $2.5 \mu\text{g/ml}$, (B) con $7.5 \mu\text{g/ml}$ y (C) sin Oligomycin. Insertas, los datos directos de variación de pH (○) y pK (●) del medio. La flecha indica el momento de adición de la Oligomycin. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo ($n \geq 3$, variaciones $\leq 5\%$ para VH^+ y entre 5 y 10% para VK^+).

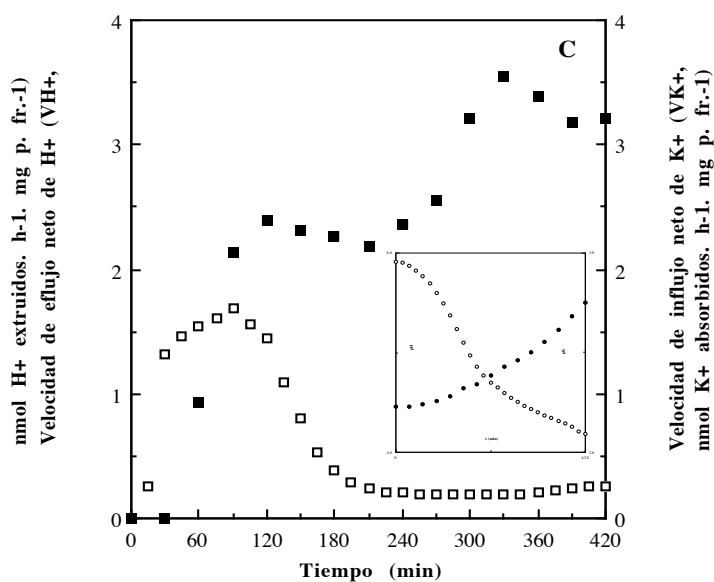


Fig 57: Continuación.

5.3.2.2.- Efecto de varias concentraciones de Oligomicina sobre el flujo neto de H^+ : Curvas dosis-respuesta

Para estudiar el efecto de la Oligomicina sobre el flujo neto de H^+ por raíces escindidas, realizamos **curvas dosis-respuesta** con varias concentraciones del inhibidor, representándose en la **Fig 58** los **valores medios** de la variación de pH (A) y VH^+ (B) para cada una de las concentraciones utilizadas. Cada concentración fue repetida 3 veces (variabilidad $\leq 5\%$).

La **Fig 58A** muestra el efecto que la adición de las diferentes concentraciones de Oligomicina utilizadas provoca sobre la acidificación del medio externo por las raíces, y la **Fig 58B** las correspondientes velocidades de eflujo (VH^+). Además de las concentraciones que se incluyen en la gráfica, se probó también $0.75 \mu\text{g/ml}$, observándose que no tenía efecto alguno detectable sobre la capacidad de acidificación, por lo que no se ha incluido en las gráficas. Con $1.25 \mu\text{g/ml}$ empieza a observarse ya una menor capacidad de acidificación del medio, con una disminución de VH^+ , inhibición que aumenta conforme lo hace la concentración de Oligomicina añadida y el tiempo transcurrido desde la adición. La inhibición del eflujo de H^+ es más rápida en el tiempo cuanto mayor es la concentración de inhibidor utilizada, tal y como se pone de manifiesto con 5 y $7.5 \mu\text{g/ml}$, concentraciones que anulan totalmente el eflujo neto de H^+ en 30 min ($VH^+ \approx 0$). La inhibición se pone de manifiesto también en el **pH final de equilibrio**, tanto más alcalino cuanto mayor es la concentración utilizada.

A partir de $2.5 \mu\text{g/ml}$ de concentración, y a tiempos superiores a 30 min desde la aplicación del inhibidor, se obtiene no sólo la inhibición del eflujo neto sino valores de influjo neto de H^+ , lo que se refleja como alcalinización del medio, observándose de forma más clara en la gráfica de VH^+ donde, para $2.5 \mu\text{g/ml}$ se observan valores negativos de VH^+ (es decir influjo), a partir de los 75 min, y aún más drásticamente para $7.5 \mu\text{g/ml}$ de Oligomicina, en que el influjo neto de H^+ empieza a detectarse a partir de, aproximadamente, 30 min.

En la **Fig 59** se ha representado pH y VH^+ a "**tiempos cortos**", es decir, desde 15 minutos antes de añadir el inhibidor hasta 120 minutos después, al objeto de ver la cinética de inhibición con de la Oligomicina con más detalle. Podemos observar que con 1.25 y $2 \mu\text{g/ml}$ se produce una clara disminución de la acidificación del medio a los 45 min, aunque a los 30 min ya se nota un descenso de VH^+ respecto al control. Con $1.25 \mu\text{g/ml}$ no se inhibe totalmente el eflujo neto de H^+ durante los 120 min posteriores a la adición, mientras que con $2 \mu\text{g/ml}$ se alcanza la inhibición total del eflujo neto a los 90 min. Con 2.5 y $3.75 \mu\text{g/ml}$ la inhibición es total a los 60 min, permaneciendo después prácticamente constante. Con estas concentraciones apenas se produce una ligerísima alcalinización del medio (influjo neto de H^+). Finalmente, las concentraciones más altas, 5 y $7.5 \mu\text{g/ml}$, inhiben la velocidad de eflujo neto de H^+ muy rápidamente, a los 15 min, siendo total a los 30 min (VH^+ cercana a 0) y posteriormente producen un fuerte influjo de H^+ (VH^+

valores negativos), que alcanza su máxima velocidad a los 75 min para 5 $\mu\text{g/ml}$ y a los 60 min para 7.5 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente se recupera de nuevo.

En la **Fig 60** está representada la **Actividad relativa de eflujo neto de H^+** frente al tiempo, para las distintas concentraciones de Oligomicina y en la **Fig 61** frente a la concentración de inhibidor a los distintos tiempos. En ellas se puede cuantificar mucho mejor el efecto de la Oligomicina, expresándose VH^+ en % de los controles, sin aditivo. Así, se comprueba que, cuanto más alta es la concentración de inhibidor, más fuerte es la inhibición, excepto para las dos concentraciones mayores (5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$) que presentan una respuesta similar, en la que se anula el eflujo neto de H^+ desde los 30 min, con reversión a partir de los 45 min. A partir de los 90 min sólo la concentración menor, 1.25 $\mu\text{g/ml}$, no ha producido anulación o reversión del eflujo neto de H^+ .

En la **Fig 61** se observa cómo a medida que aumenta el tiempo transcurrido tras la adición, hay menor Actividad, para todas las concentraciones. A los 90 min de la adición todas las concentraciones, excepto la más baja (1.25 $\mu\text{g/ml}$) han inhibido totalmente el eflujo neto de H^+ , lo que parece indicar que este es el tiempo necesario para saturar la respuesta de inhibición, y tiempos mayores ya no la modifican apreciablemente. Para tiempos inferiores a 90 min la respuesta es proporcional a la concentración utilizada.

En resumen, el efecto de la Oligomicina sobre el eflujo neto de H^+ depende tanto de la concentración como del tiempo; aunque a partir de 5 $\mu\text{g/ml}$ la respuesta no aumenta por aumento de la concentración, y para tiempos mayores de 90 min tampoco se aumenta el efecto, que se mantiene constante. El tiempo mínimo necesario para obtener respuesta es de 15 min (para las concentraciones más altas), lo que nos indica que éste podría ser el tiempo necesario para que el inhibidor alcance sus lugares de actuación.

Al igual que ocurría con el DCCD, la **representación de Dixon-Webb (Fig 61 inserta)** muestra una **respuesta bifásica**. Así, para tiempos menores de 45 min, las respuestas del eflujo neto de H^+ para todas las concentraciones de Oligomicina utilizadas se alinean en una sola recta, lo que nos indica que un sólo lugar de inhibición es responsable de la respuesta; para $t=15$ min, el inhibidor no alcanza el 50% de inhibición; a 30 min presenta un $\text{IC}_{50}=6 \mu\text{g/ml}$, que disminuye tiempos superiores: 2.1 $\mu\text{g/ml}$ a $t=45$ min y 1.50 $\mu\text{g/ml}$ para $t=60$ min, a partir de los **90 min** este IC_{50} es prácticamente constante, con un valor de **0.6 $\mu\text{g/ml}$** . Para tiempos ≥ 45 min se observa una 2ª fase de la respuesta, a partir de 3.75 $\mu\text{g/ml}$, que no se alinea con la de concentraciones inferiores, lo que nos indica la existencia de un 2º lugar de actuación del inhibidor. Esta **segunda respuesta** empieza a manifestarse a concentraciones más bajas conforme el tiempo de actuación del inhibidor aumenta. Así, a los 60 min se manifiesta a partir de 2.5 $\mu\text{g/ml}$, y a los 105 min aparece ya con 1.25 $\mu\text{g/ml}$. Los IC_{50} de esta segunda respuesta son: 3.5 $\mu\text{g/ml}$ para $t=45$ min, 2.2 $\mu\text{g/ml}$ para $t=60$ min, permaneciendo **constante** a partir de los **90 min** en **1.5 $\mu\text{g/ml}$** , valor superior al de la primera respuesta (0.6 $\mu\text{g/ml}$).

Esta doble respuesta, ha de ser interpretada como evidencia de la implicación de dos sistemas de transporte de H^+ , ambos sensibles a la Oligomicina. El primero de estos sistemas es más accesible (como indica el hecho de que a los 30 min muestre un IC_{50} 6 $\mu g/ml$) y se satura a los 90 min, dando IC_{50} constante a concentración muy baja (0.5 $\mu g/ml$), lo que indica su gran sensibilidad. El segundo es menos accesible, ya que requiere tiempos de actuación del inhibidor superiores a 45 min para saturarse, y es algo menos sensible, pues su IC_{50} constante es más alto (1 $\mu g/ml$).

En la Bibliografía está bien descrito el efecto inhibitor de la Oligomicina sobre la actividad de la ATPasa mitocondrial, (Nicholls, 1987). Sin embargo, en algunos trabajos con vesículas purificadas de plasmalema (Malone et al., 1977; De Michelis et al., 1984; Mandala y Taiz, 1985; Oleski et al., 1987B) se demuestra que también tiene efecto inhibitor sobre la H^+ -ATPasa de esta membrana, aunque se discute si su efecto es directo o indirecto. Nuestros resultados estarían de acuerdo con una inhibición a nivel de la H^+ -ATPasa de plasmalema, ya que los tiempos a los que se detecta su efecto son demasiado cortos para explicar una inhibición a nivel mitocondrial. Además, los resultados de RMN de nuestro equipo, a que nos hemos referido, muestran que los niveles de ATP citoplasmático no se ven afectados por la adición de 2.5 $\mu g/ml$ de Oligomicina durante 500 min (Espinosa et al., 1992). Una acción a nivel mitocondrial requeriría tiempos más largos y un descenso de los niveles de ATP citoplasmático. Pensamos que para concentraciones altas (>3.75 $\mu g/ml$) y tiempos largos (>45 min), pudieran existir también alteraciones adicionales a nivel de la cadena redox del plasmalema, tal y como parece ponerse de manifiesto en la ya comentada representación de Dixon-Webb (**Fig 61 inserta**) donde la doble respuesta podría significar la actuación sobre los dos sistemas de extrusión de H^+ del plasmalema: H^+ -ATPasa y cadena redox. Esta interpretación vendría apoyada por los resultados de Lin (1984) en protoplastos de raíces de maíz, donde obtiene la inhibición por Oligomicina del eflujo de H^+ estimulado por NADH, que es un donador de electrones que activa específicamente la cadena redox.

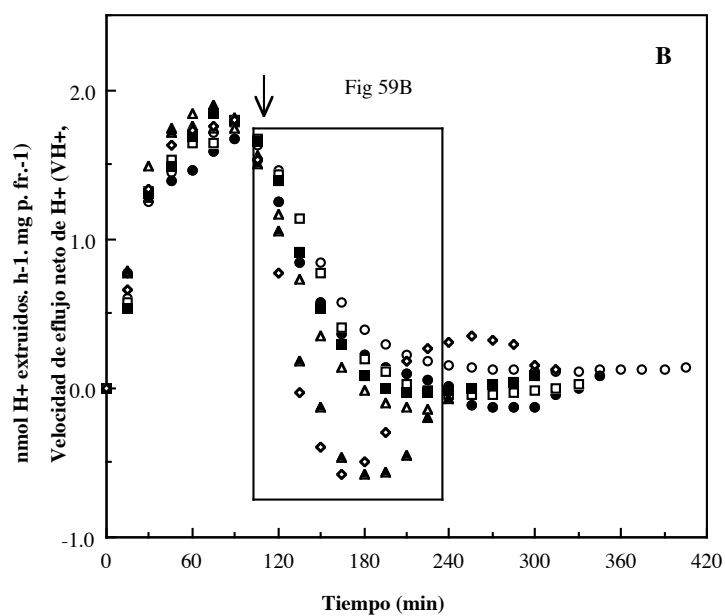
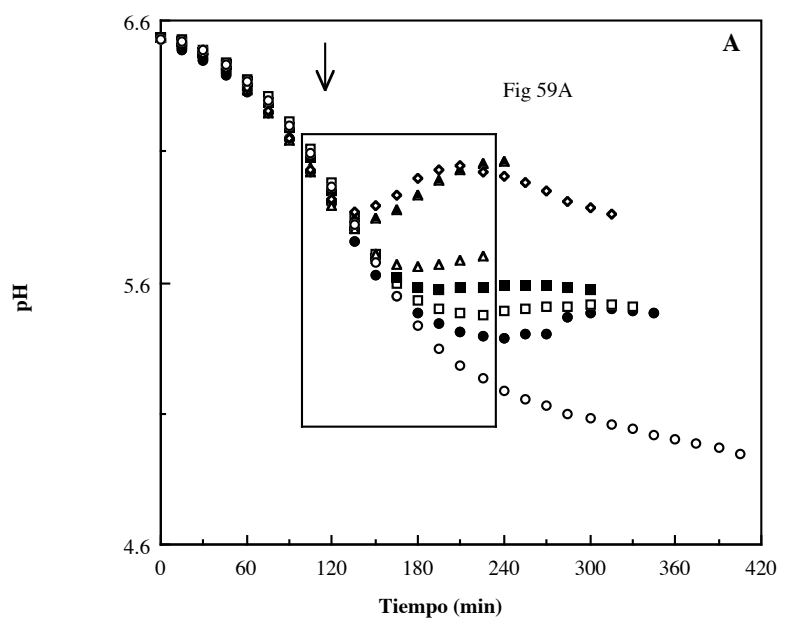


Fig 58: (A) Variación de pH del medio y (B) Velocidades de eflujo neto de H⁺ (VH⁺) por las raíces sin (○) y con 1.25 (●); 2 (□); 2.5 (■); 3.75 (△); 5 (▲); y 7.5 μg/ml (◇) de Oligomycin. La flecha indica el momento de adición de la Oligomycin. Los datos son media de, al menos, 3 experimentos (desviación ≤5%)

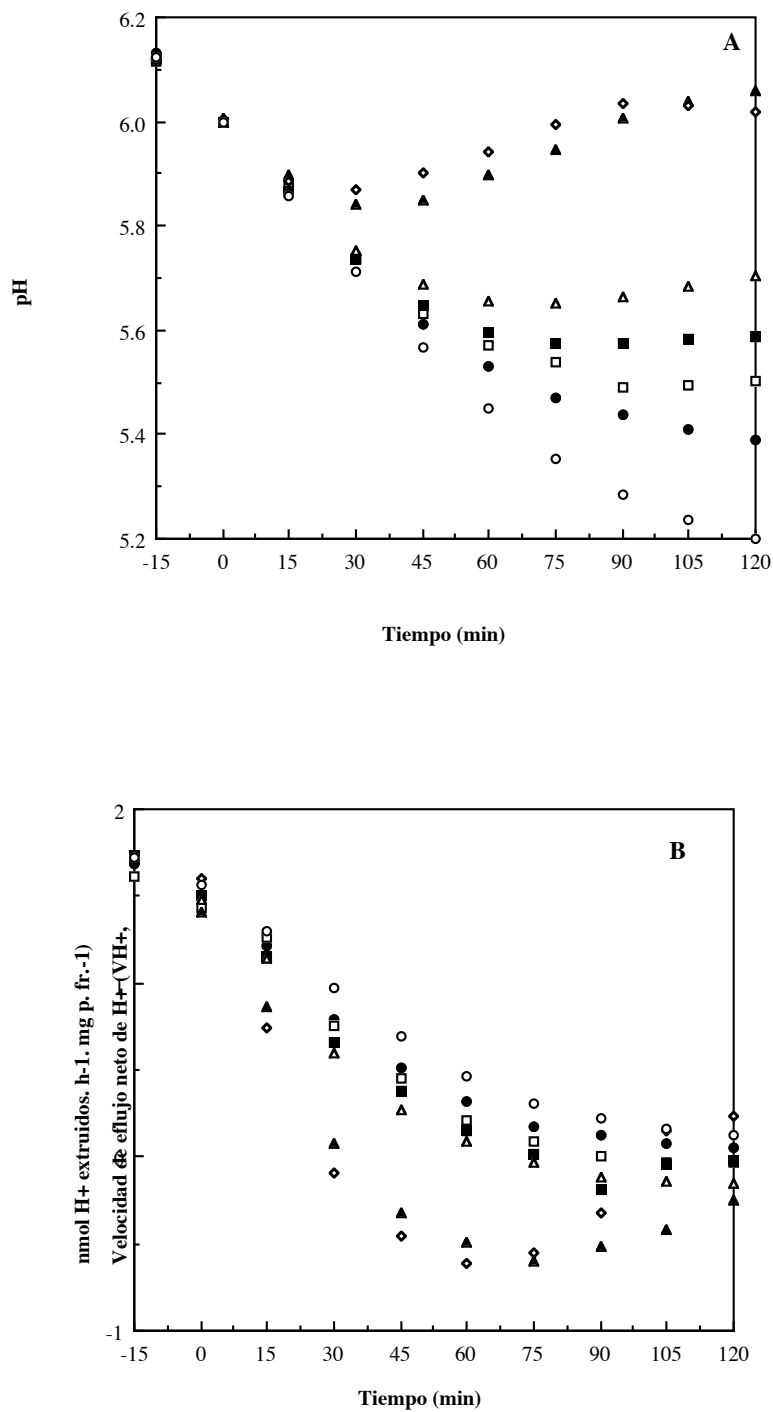


Fig 59: (A) Variación del pH del medio y (B) Velocidades de eflujo neto de H^+ (VH^+) por las raíces, para tiempos cortos sin (○) y con 1.25 (●); 2 (□); 2.5 (■); 3.75 (△); 5 (▲); y 7.5 $\mu g/ml$ (◇) de Oligomicina. La flecha indica el momento de adición de la Oligomicina (pH=6.0; t=0). Los datos son media de, al menos tres repeticiones (desviación $\leq 5\%$).

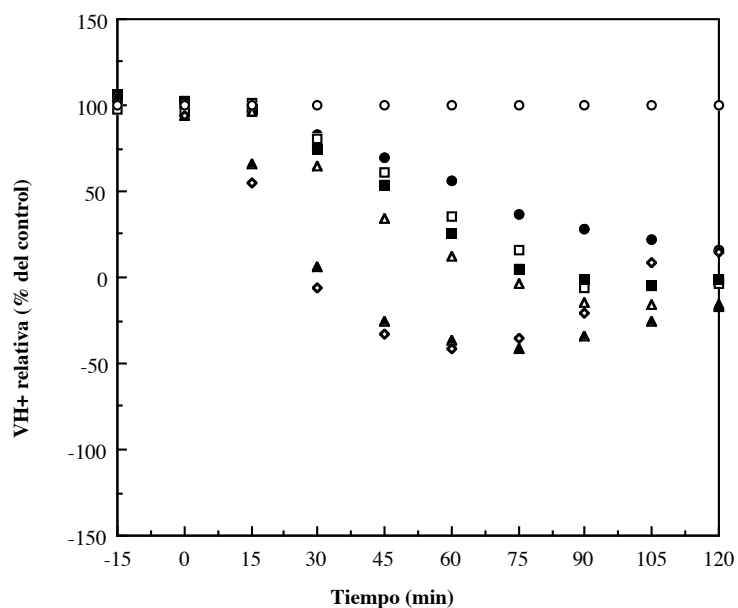


Fig 60: Actividad relativa de eflujo de H^+ frente al tiempo (en % de los valores de VH^+ control- \circ .), con 1.25 (\bullet); 2 (\square); 2.5 (\blacksquare); 3.75 (\triangle); 5 (\blacktriangle); y 7.5 $\mu\text{g/ml}$ (\diamond) de Oligomicina. Los datos son media de, al menos tres experimentos (la desviación de los datos directos a partir de los que se calculan los correspondientes porcentajes son $\leq 5\%$).

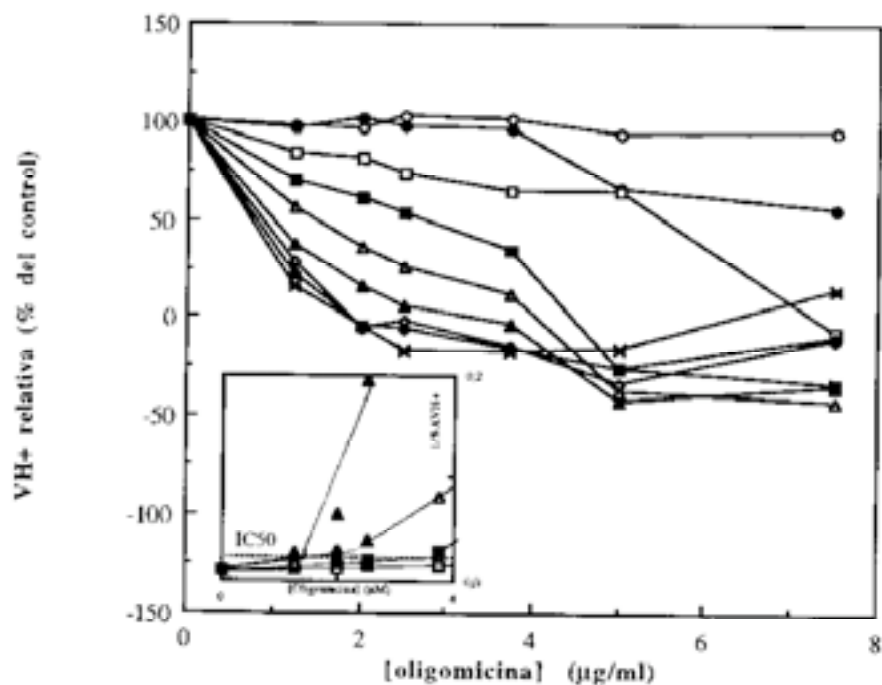


Fig 61: Actividad relativa de eflujo de H^+ frente a la concentración de Oligomicina a 0 (\circ); 15 (\bullet); 30 (\square); 45 (\blacksquare); 60 (\triangle); 75 (\blacktriangle); 90 (\diamond); 105 (\blacklozenge); y 120 min ($*$) después de la adición de Oligomicina. Los datos son media de, al menos tres experimentos. **Inserta,** el plot de Dixon-Webb (para los valores >0).

5.3.2.3.- Efecto de varias concentraciones de Oligomicina sobre el influjo neto de K^+ : Curvas dosis-respuesta

La **Fig 62** muestra el efecto de las concentraciones de Oligomicina sobre la actividad de influjo neto de K^+ por las raíces (**Fig 62A**, el efecto directo sobre el pK del medio, y **Fig 62B**, la velocidad de influjo neto de K^+). En ambas figuras se comprueba cómo a medida que la concentración de inhibidor aumenta se produce una disminución en el influjo neto de K^+ , siendo este efecto general tanto más "rápido" cuanto mayor es la concentración; así, mientras con 1.25 $\mu\text{g/ml}$ son necesarios aproximadamente 135 min para que se observen alteraciones en el influjo neto de K^+ , con 2 $\mu\text{g/ml}$ el tiempo se reduce a 70-75 min, y a 40-45 min para concentraciones superiores a 2.5 $\mu\text{g/ml}$. Así mismo, en la **Fig 62B** puede verse cómo las concentraciones más altas (5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$) no sólo anulan totalmente la velocidad de influjo neto, sino que la hacen revertir a eflujo neto de K^+ (valores de VK^+ negativos), lo que representa una fuerte alteración de los sistemas implicados en el transporte de K^+ .

La **Actividad relativa de influjo neto de K^+** para cada concentración de inhibidor (en % del control a igual tiempo), se representa en la **Fig 63**, desde los 15 minutos anteriores a su adición hasta los 135 minutos posteriores, y en la **Fig 64** frente a la concentración de inhibidor, para distintos tiempos. En estas gráficas se pone de manifiesto la dependencia que existe entre la concentración de inhibidor y el tiempo de actuación. Así, en la **Fig 63** se observa que, transcurridos 15 min de la adición, ya hay inhibición del influjo neto de K^+ , sobre todo a las concentraciones mayores (por ejemplo, 3.75, 5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$ provocan inhibición del 20 al 25% en la velocidad de influjo neto de K^+ a los 15 min), aunque las concentraciones menores no tienen todavía efecto alguno. Para cada concentración, la inhibición aumenta con el tiempo, hasta 45 min después de la adición; a partir de este momento las diferentes concentraciones mantienen prácticamente constantes sus niveles de inhibición (con la excepción de 5 $\mu\text{g/ml}$ que produce fuerte eflujo neto de K^+ a los 75 min). Esto nos indica que el tiempo requerido para completar la inhibición es, independientemente de la concentración, de 45 min. Después de este tiempo, la actividad relativa no depende ya del tiempo, sino de la concentración (aunque 2 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ dan respuestas similares). Las concentraciones más elevadas (5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$) son las únicas que producen eflujo neto de K^+ , dando ambas también una respuesta muy similar.

En la **Fig 64** está representada la Actividad relativa de influjo neto de K^+ frente a la concentración de Oligomicina para los distintos tiempos. En ella se aprecia cómo en los 15 minutos posteriores a la adición del inhibidor su acción es muy pequeña para las concentraciones inferiores, aunque las superiores ($\geq 3.75 \mu\text{g/ml}$) tienen ya una inhibición cercanas al 25% ($VK^+ \approx 75\%$). Este efecto es mayor a los 45 min (para 3.75 $\mu\text{g/ml}$ la velocidad de influjo neto de K^+ se reduce al 50% y con 7.5 $\mu\text{g/ml}$ al 10% del control), aumentando progresivamente la inhibición a partir de este tiempo en las concentraciones menores de 3.75 $\mu\text{g/ml}$, y permaneciendo ya constante para 3.75; 5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$

En la representación de **inversas de Dixon-Weeb (Fig 64 inserta)** puede observarse cómo el valor de IC_{50} no puede calcularse para tiempos inferiores a 45 min. Para tiempos >45 min se observa nuevamente una **respuesta bifásica**. En este caso, los IC_{50} tanto de la primera como de la segunda respuesta se mantienen prácticamente **constantes** a partir de **45 min** (se han calculado para 45, 75 y 105 min), siendo de **$\approx 6.5 \mu\text{g/ml}$ y $3.6 \mu\text{g/ml}$** de Oligomicina respectivamente. Esto indica que, a partir de los 45 min, el inhibidor ha completado su acción sobre ambas fases (como puede verse para cada una de las concentraciones). La primera respuesta sería menos sensible, ya que necesita concentraciones mayores que la segunda para mostrar igual inhibición, aunque el requerimiento de tiempo (accesibilidad) es similar.

En conclusión, la Oligomicina produce la inhibición tanto del eflujo neto de H^+ como del influjo neto de K^+ , tanto mayor cuanto más alta es la concentración del inhibidor. Sin embargo, el efecto sobre el eflujo de H^+ es anterior en el tiempo, mostrando periodos de retardo o lag (el tiempo que transcurre desde el momento en que adicionamos el inhibidor hasta que comienza a detectarse su acción), de ≈ 15 min para los H^+ frente ≈ 30 min para el K^+ . Además, comparando los valores de IC_{50} de ambos flujos se comprueba una mayor sensibilidad al inhibidor del eflujo de H^+ . Todo ello, junto con el hecho de que los efectos sobre el eflujo de H^+ anticipan siempre, en ≈ 15 min, aquellos sobre el influjo de K^+ , como hemos visto en los experimentos "tipo", de flujos simultáneos, nos hacen pensar que el efecto primario de la Oligomicina se ejerce sobre los sistemas de transporte de H^+ , lo que repercutiría, con un cierto retardo, en los sistemas transportadores de K^+ , que se verían afectados secundariamente por la alteración del eflujo de H^+ , al que se encontraría indirectamente acoplado a través del gradiente electroquímico de H^+ . El caso de la reversión de los flujos de H^+ y K^+ por la concentración más elevada de Oligomicina ($7.5 \mu\text{g/ml}$) es un ejemplo claro y extremo de esta dependencia indirecta: la intrusión de H^+ despolarizaría la membrana, lo que provocaría la apertura de canales K^+_{out} , para repolarizarla de nuevo, tal como ha propuesto Blatt (1997).

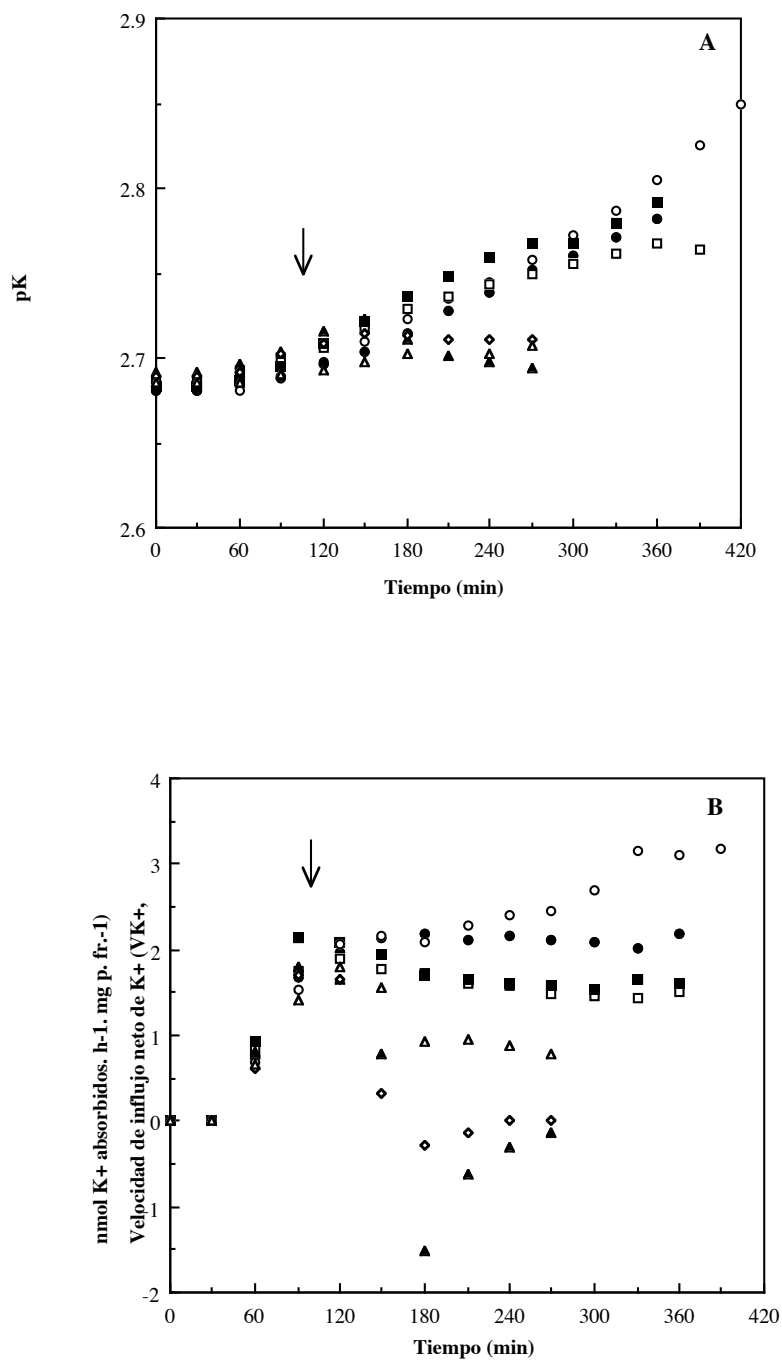


Fig 62: (A) Variación de pK del medio y (B) Velocidades de influjo neto de K⁺ (VK⁺) por las raíces sin (○) y con 1.25 (●); 2 (□); 2.5 (■); 3.75 (△); 5 (▲) y 7.5 μg/ml (◇) de Oligomicina. La flecha indica el momento de adición de la Oligomicina. Los datos son media de, al menos, 3 experimentos (desviación entre 5 y 10%).

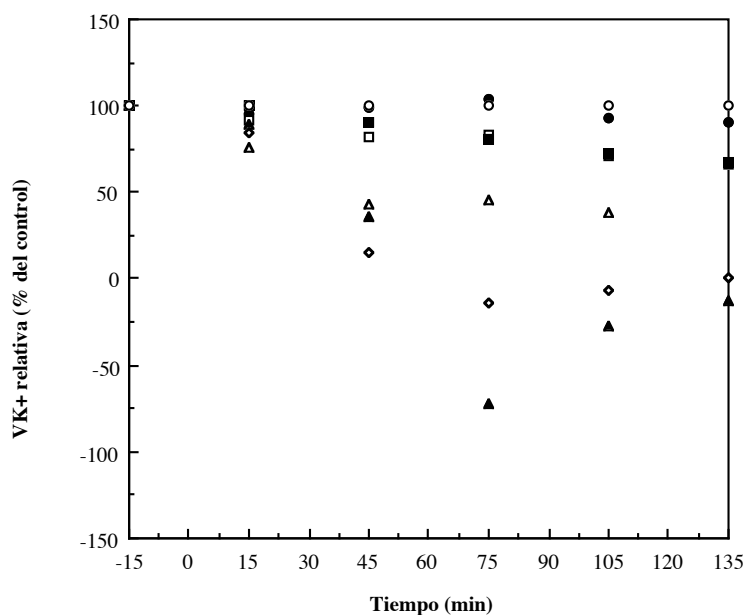


Fig 63: Actividad relativa de influjo de K^+ frente al tiempo (en % de los valores de VK^+ control - \circ -), con 1.25 (\bullet); 2 (\square); 2.5 (\blacksquare); 3.75 (\triangle); 5 (\blacktriangle) y 7.5 $\mu\text{g/ml}$ (\diamond) de Oligomicina. Los datos son media de, al menos tres experimentos independientes (las desviaciones de los datos directos a partir de los que se calculan los correspondientes porcentajes están entre 5 y 10%).

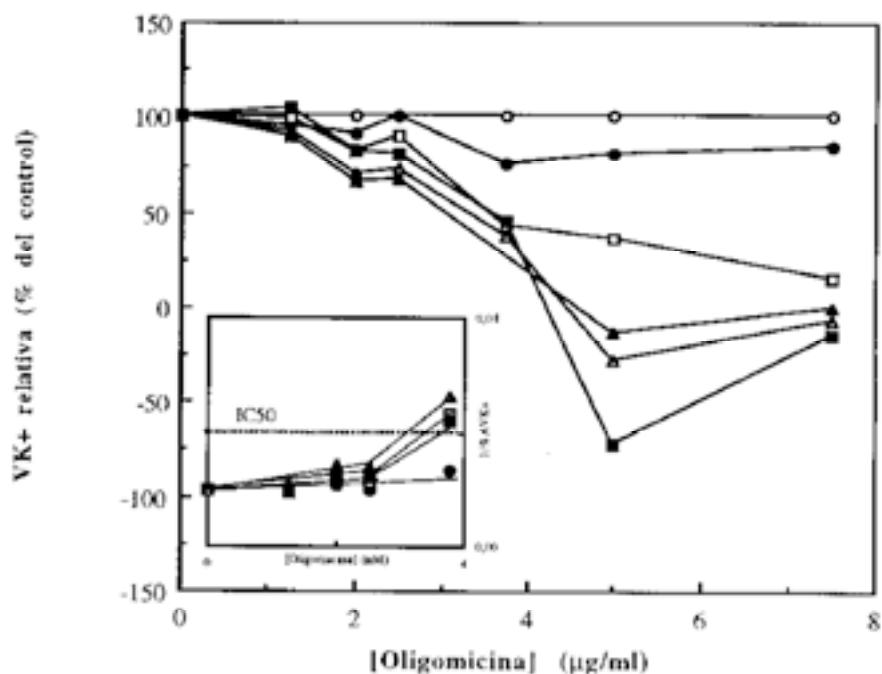


Fig 64: Actividad relativa de influjo de K^+ frente a la concentración de Oligomycin a -15 (\circ); 15 (\bullet); 45 (\square); 75 (\blacksquare); 105 (\triangle) y 135 min (\blacktriangle) después de la adición de Oligomycin. Los datos son media de, al menos tres experimentos. **Inserta**, el plot de Dixon-Webb (para los valores >0).

5.4.- EFECTORES QUE ACTUAN SOBRE LA CADENA REDOX

5.4.1.- Donadores de electrones a la cadena redox:

5.4.1.1.- Efecto de la adición de 300 μM de NADH exógeno sobre la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+

El NADH interviene como donador de electrones, tanto endógena como exógenamente, para el funcionamiento de la cadena redox del plasmalema, tal como se describe en el Apto 4.4.1. de la Introducción.

En nuestras experiencias usamos **300 μM de NADH** adicionado al inicio de la cinética (a pH 6.550), ya que tratamos de comprobar su actuación como sustrato de la cadena redox; además, en anteriores trabajos de nuestro laboratorio (Espinosa, 1991) se ha comprobado que esta concentración estimula el eflujo neto de H^+ por raíces de girasol.

Las semillas utilizadas son las correspondientes a la **remesa C**, cuyas características de transporte de H^+ y K^+ se muestran en la **Fig 17C** y la concentración de K^+ de 2 mM en el medio standard con raíces "in vivo".

Como siempre, hemos comprobado el efecto que la adición de 300 μM de NADH tiene sobre la **capacidad tampón** de las raíces preincubadas en NaCN. En la **Fig 65A** se observa cómo la adición de 300 μM de NADH al medio de medida con raíces preincubadas en NaCN produce un aumento apreciable de su capacidad tampón para los H^+ (βH^+), no observándose, sin embargo, alteración alguna en cuanto a la capacidad tampón para K^+ (βK^+), (**Fig 65B**). Puesto que es uno de los pocos aditivos que presentan este efecto, es necesario recordar que en el cálculo de las velocidades de eflujo neto de H^+ (VH^+) tenemos en cuenta esta variación de la capacidad tampón, calculándose βH^+ a partir de la ecuación ajustada a los nuevos valores de βH^+ en presencia de NADH, lo que permite obtener los valores reales de la correspondiente velocidad de eflujo neto H^+ (VH^+).

La **Fig 66** muestra un **experimento representativo** ($n=3$) de la cinética de los flujos de H^+ y K^+ medidos simultáneamente, con 300 μM de NADH adicionado al inicio de la cinética (**A**), en comparación con la cinética control, sin NADH (**B**). Como podemos observar, la adición de 300 μM de NADH provoca un aumento del **lag** inicial del eflujo neto de H^+ con respecto al control; mientras que el lag del influjo neto de K^+ no se ve afectado, lo que hace que coincidan por primera vez el inicio en el tiempo de ambos flujos. En los datos de variación directa de **pH** y **pK** (**inserta**) se observa que, mientras que pK no cambia apreciablemente respecto al control, la acidificación del medio es más lenta. Los efectos descritos sobre el pH se deben a la modificación de la capacidad tampón del medio (βH^+) provocada por el NADH, ya que se requiere un mayor eflujo neto de H^+ para bajar el pH de un medio más tamponado. Este efecto es también responsable de que, por primera vez, coincidan en tiempo VH^+ y VK^+ máximas.

La comparación entre VH^+ con y sin NADH se observa mejor en la **Fig 67** donde comparamos los valores medios ($n=3$) de VH^+ frente a tiempo (**A**) y frente al pH (**B**) con y sin NADH en el medio. Así vemos que, al incluir la capacidad tampón (βH^+) en el cálculo de la **velocidad de eflujo neto de H^+ (VH^+)** se puede apreciar que VH^+ en realidad aumenta significativamente al añadir NADH, aunque ello no era evidente en los datos directos de bajada de pH del medio; en efecto, VH^+ máxima aumenta, aproximadamente, un 25% (de 1.75 nmol H^+ /h. mg p. fr a 2.20 nmol H^+ / h. mg p. fr, sin y con NADH respectivamente). Sin embargo, el efecto de la mayor βH^+ sobre el aumento del lag no puede ser corregido en el cálculo de VH^+ , ya que mientras no haya cambios de pH en el medio ($\Delta pH=0$), $VH^+=0$. Por efecto del mayor lag, también VH^+ máxima en presencia de NADH, se alcanza a los 120 min del inicio de la cinética, mientras que sin NADH se alcanzaba a los 75 min. Por lo demás, la curva de respuesta de la velocidad de eflujo neto de H^+ muestra las mismas características que sin NADH, tanto frente al tiempo que dura el eflujo y, muy especialmente, el intervalo de pH óptimos, a los que se da la meseta de VH^+ máxima (**Fig 67B**).

Cuando calculamos al final de la cinética la cantidad total de H^+ extruidos por las raíces o **eflujo neto total de H^+ (JH^+ , Fig 68)**, observamos un incremento del 20% (14408.9 y 11828.3 nmol H^+ totales a los 420 min de la cinética, con y sin NADH respectivamente). Ello demuestra de nuevo que, en este medio más tamponado por el NADH, se ha necesitado una mayor liberación de H^+ por las raíces para provocar la bajada de pH en comparación con el medio sin NADH.

Este comportamiento similar en las cinéticas con y sin NADH, excepto por la estimulación de VH^+ y el lag, nos indica que el NADH activa un sistema de transporte de H^+ que ya estaba ocurriendo, y que se ve estimulado por efecto del NADH. Se propone que este proceso sería la cadena redox del plasmalema, a la que el NADH dona los electrones y proporciona los H^+ para que se extruyan fuera de la célula como aseguran, entre otros autores, Lin (1984); Craig y Crane (1985); Vani y Raghavedra (1992). Como discutimos en la Introducción, las alternativas son: que la misma cadena redox posea un canal de extrusión de los H^+ (Lin, 1984), o que el funcionamiento de la cadena contribuya a crear el gradiente de potencial de membrana necesario para que los H^+ se extruyan por la H^+ -ATPasa, sin que la cadena esté directamente implicada en el transporte de H^+ (Rubinstein y Stern, 1986, Marré et al., 1988).

La **Fig 67C** se muestra el efecto de la adición de 300 μM de NADH sobre la **velocidad de influjo neto de K^+ (VK^+)**, en comparación con la obtenida sin NADH. La adición de 300 μM de NADH no modifica ninguno de los parámetros del influjo de K^+ , puesto que, en ambos casos, las curvas de VK^+ son semejantes, con pequeñas variaciones no significativas, y unas VK^+ máximas de influjo neto de K^+ también semejantes (entre 2.2 y 2.4 nmol K^+ /h. mg p. fr., en ambos casos). En consecuencia, el **influjo neto total de K^+**

(J_{K^+} , **Fig 68**) es semejante al del control (36379.01 y 35850.28 nmol K^+ absorbidos a los 420 min con y sin NADH, respectivamente).

La Bibliografía consultada aporta resultados contradictorios sobre el efecto del NADH sobre el influjo de K^+ ; así, mientras Lin (1984) obtiene resultados que indican una mayor velocidad de influjo de K^+ en protoplastos de raíces de maíz, a las que se adiciona 1.5 mM de NADH (concentración muy superior a la utilizada por nosotros), Kochian y Lucas (1985, 1991) no sólo no obtienen activación de influjo de K^+ por la adición de NADH exógeno, sino una inhibición de dicho influjo. Nuestros resultados muestran que, al menos en la concentración de NADH usada y en raíces de girasol, el influjo neto de K^+ por estas raíces no se altera.

En conclusión podemos decir que el NADH no altera ninguna de las características cinéticas del influjo neto de K^+ mientras que sí aumenta la velocidad de eflujo neto de H^+ , aunque sin alterar ningún otro parámetro de la cinética, en cuanto al tiempo que dura el eflujo activo, pH óptimos, etc. Creemos que el NADH activaría el eflujo neto de H^+ que probablemente ya se está llevando a cabo a través de la cadena redox del plasmalema que normalmente controla el funcionamiento de la H^+ -ATPasa regulando el potencial de membrana. Este aumento en el eflujo de H^+ , según Lin (1984, 1985) supondría la activación el transporte de otros iones, como el influjo de K^+ puesto que aumentaría la hiperpolarización de la membrana; sin embargo, la concentración de NADH utilizada por Lin es 5 veces la utilizada por nosotros, y seguramente esta es la causa de que en nuestra experiencias, no se aprecie un aumento del influjo de K^+ : la pequeña hiperpolarización provocada por el leve aumento del eflujo de H^+ en nuestras raíces (por la estimulación de la cadena redox) no sería suficiente para provocar un aumento adicional del número de canales K^+_{in} abiertos (Blatt, 1997), por encima del que existe en las condiciones control, donde la H^+ -ATPasa y la cadena redox están también funcionando, y el potencial de membrana impulsando un influjo de K^+ a velocidad suficientemente alta.

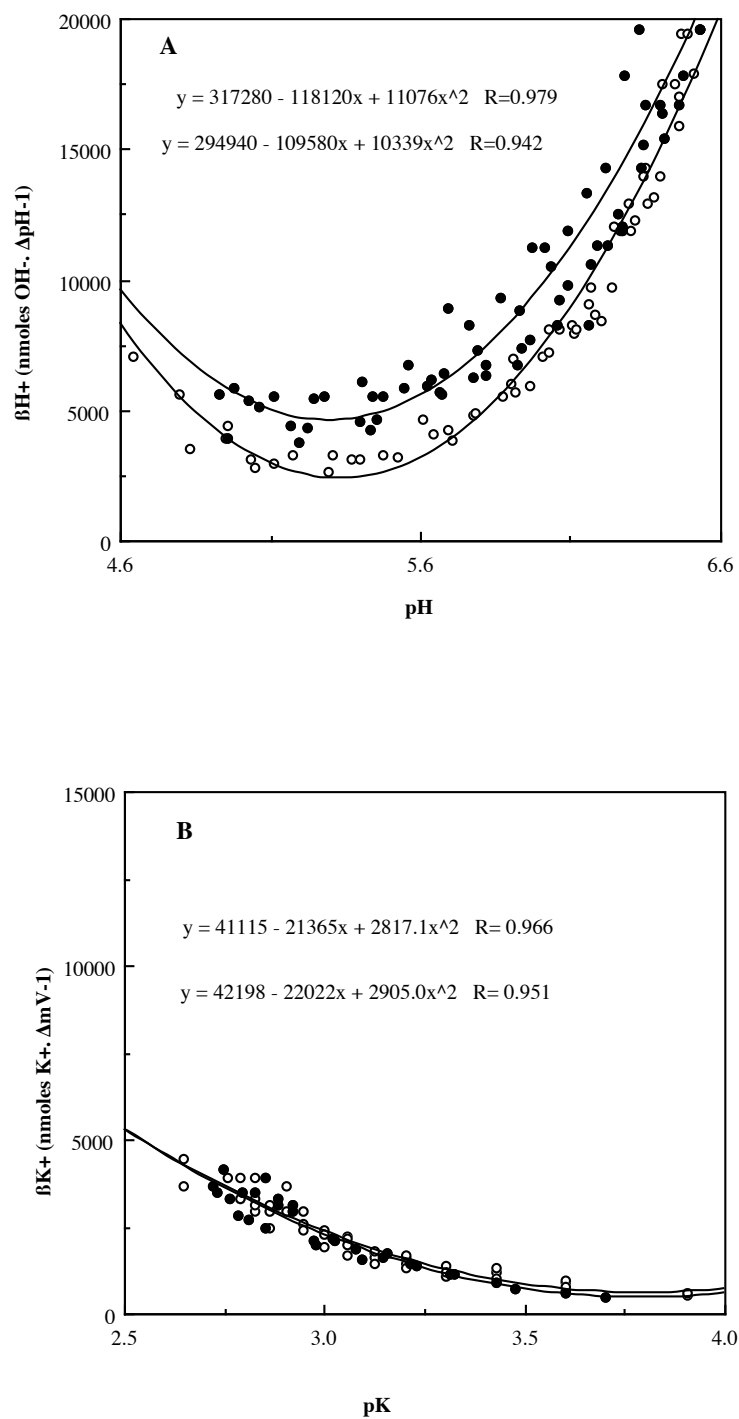


Fig 65: Capacidad tampón del medio con 175 raíces preincubadas en NaCN, sin (○) y con (●) 300 μM de NADH. (A) Capacidad tampón para H^+ (βH^+). (B) Capacidad tampón para K^+ (βK^+).

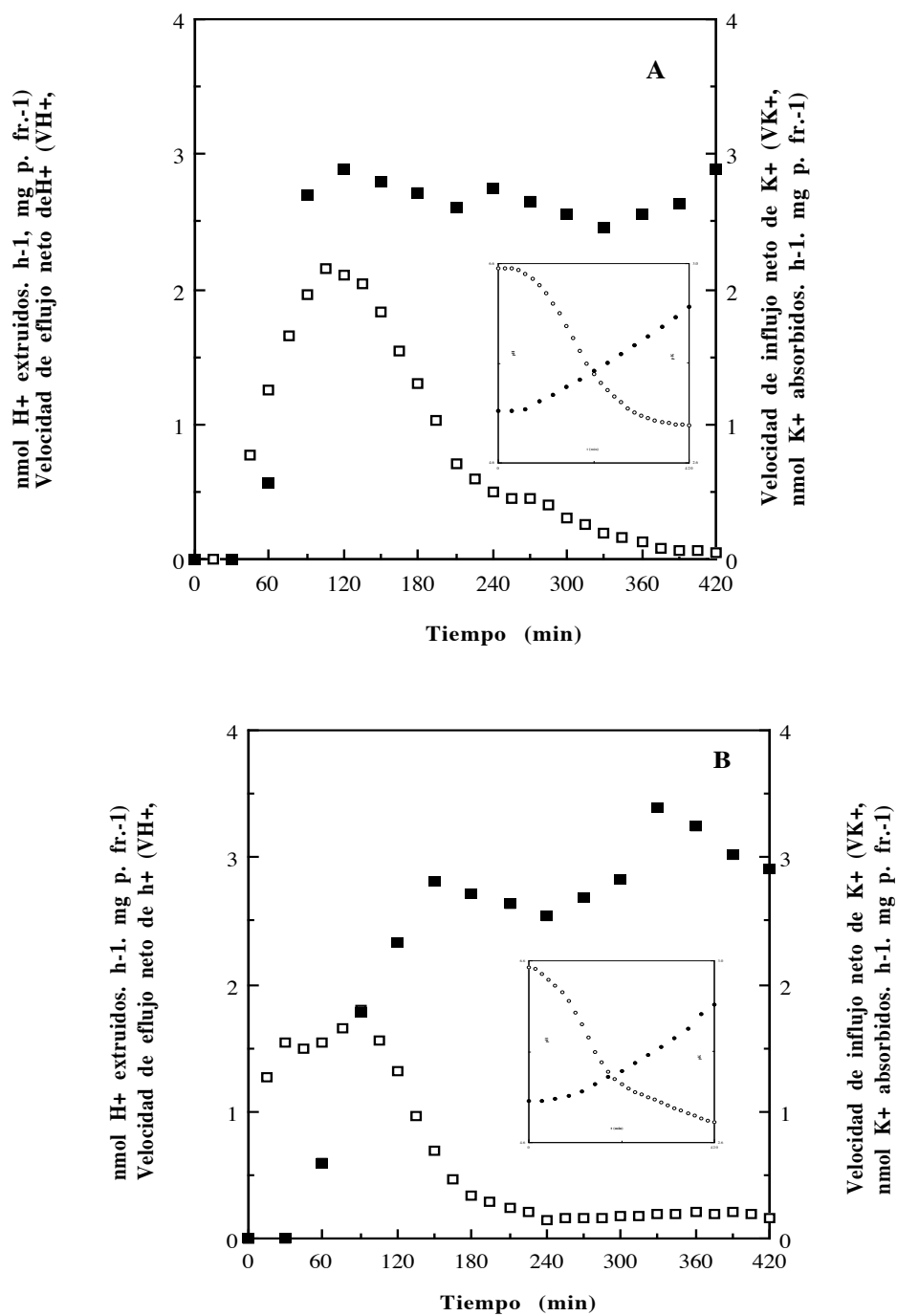


Fig 66: Velocidades netas de eflujo de H⁺ (□) e influjo de K⁺ (■) por las raíces, medidas simultáneamente, (A) con y (B) sin 300 μM de NADH adicionado al inicio de la cinética. Insertas, los datos directos de variación de pH (○) y pK (●) del medio. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo (n≥3, variaciones ≤5% para VH⁺ y entre 5 y 10% para VK⁺).

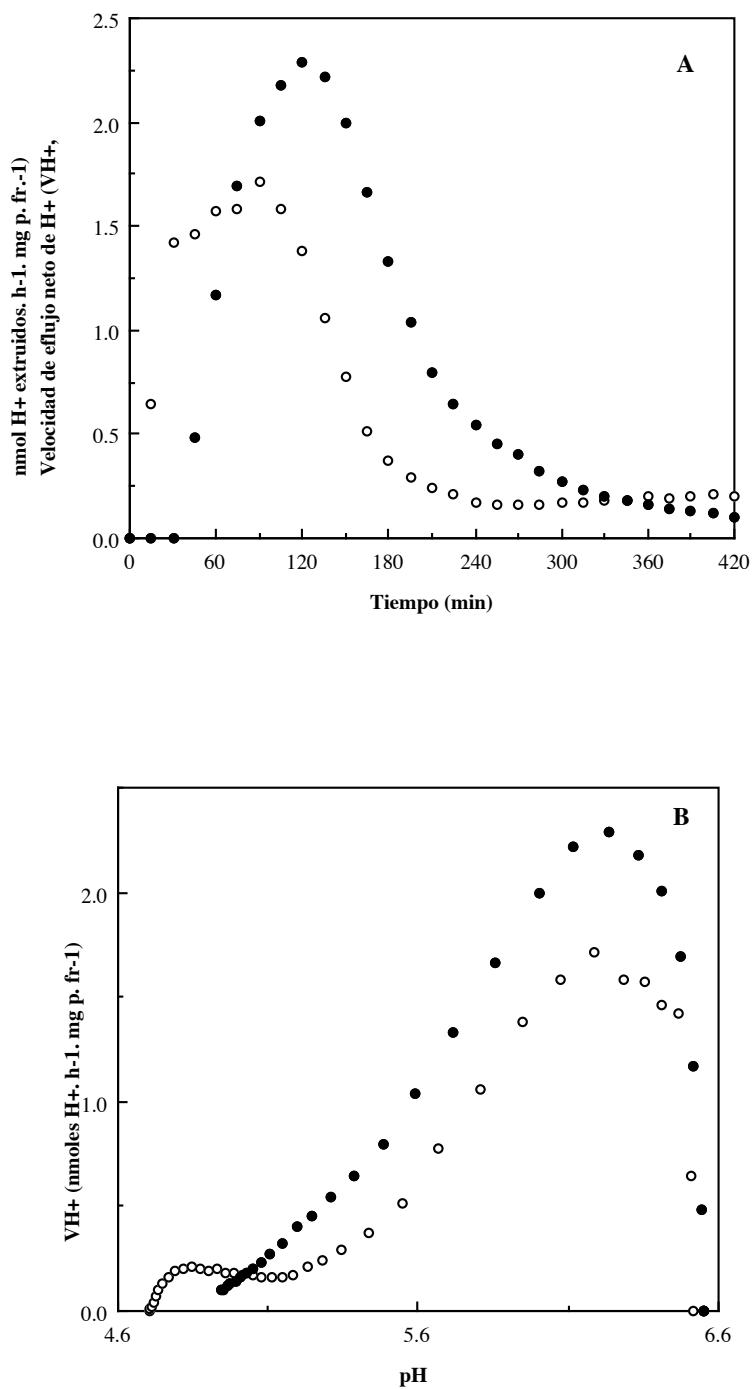


Fig 67: (A) Variación de la velocidad de eflujo neto de H⁺ (VH⁺) frente al tiempo y (B) frente al pH. (C) Variación de la velocidad de influjo neto de K⁺ (VK⁺) por las raíces sin (○) y con (●) 300 μM de NADH adicionado al inicio de la cinética. Los datos son media de, al menos, 3 experimentos independientes (desviación ≤5% en VH⁺ y entre 5 y 10% en VK⁺).

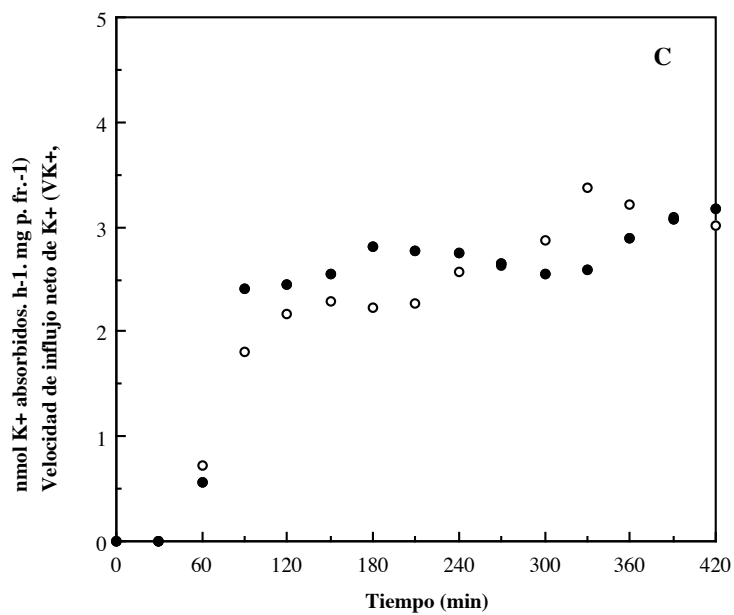


Fig 67: Continuación.

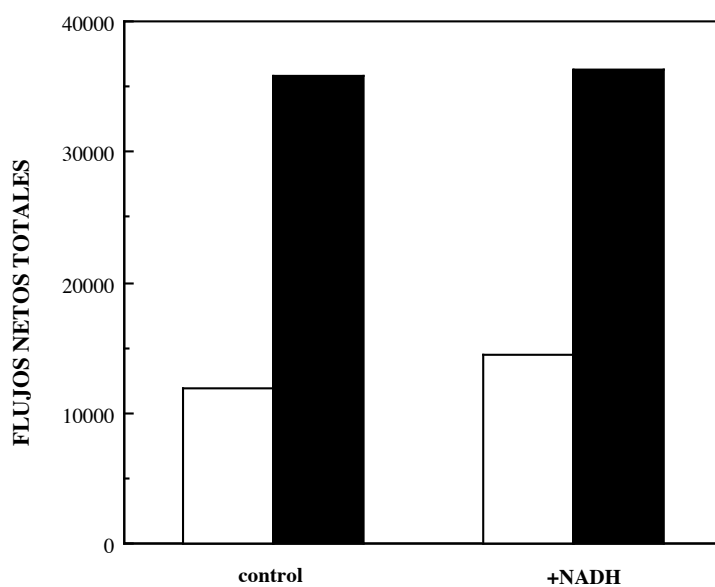


Fig 68: Flujo neto total de H⁺ (H⁺, hueco) y K⁺ (K⁺, relleno) como nmol totales de ión extruidos (H⁺) o absorbidos (K⁺) por las raíces cuando acaban los experimentos, al final de la cinética, con y sin NADH. Los datos están calculados a partir de la media de 3 experimentos independientes.

5.4.1.2.- Efecto de la adición de 0.60 mM de hexacianoferrato-II (HCF-II) sobre la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+

El HCF (II), forma reducida del HCF (III), aceptor de e^- muy utilizado en las experiencias con la cadena redox de células de raíz, se ha utilizado por dos razones:

- a) Como donador de **sólo electrones** a la cadena redox, para comparar su efecto con el del NADH, que cede tanto e^- como H^+ .
- b) Puesto que algunos autores (Lüthen y Böttger, 1988) sugieren que alguno de los efectos del HCF (III), la forma oxidada, podrían ser debidos a la liberación de iones Fe y CN^- , se suele utilizar la forma reducida de dicho compuesto, HCF (II), para comprobar los posibles efectos de los iones que lo componen y separarlos de los que la reducción del HCF (III) provoca sobre los flujos de H^+ y K^+ , que veremos en el Apto 5.4.3.1. Por esta razón, las experiencias con HCF (II) están hechas con la misma remesa de semillas (**remesa E**) que las de HCF (III), y no con la que se hicieron las pruebas con NADH (la remesa C).

El HCF (II) utilizado ha sido en forma Potásica, añadiéndose al inicio de la cinética. La concentración utilizada ha sido ligeramente inferior que en el caso del HCF (III), 0.60 mM, ya que tiene un mayor aporte de K^+ , y esta concentración aporta ya más cantidad de K^+ (**≈ 2.20 mM**) de la que normalmente usamos en nuestras experiencias.

En la **Fig 69** se expone la **capacidad tampón del medio** con 0.60 mM de HCF (II) y raíces preincubadas en NaCN (solamente βH^+ , ya que no puede determinarse βK^+ pues ello significa titular la solución con cantidades crecientes de K^+ , hasta 2 mM, y la solución de partida, con el aditivo, ya contiene K^+ 2.2 mM, de todas formas, ninguno de los aditivos empleados en estas experiencias altera βK^+). Como vemos, la capacidad tampón para H^+ (βH^+) se ve claramente aumentada por la adición de HCF (II), lo que hace necesario que para calcular la velocidad de eflujo neto de H^+ en presencia de HCF (II) se utilice esta nueva capacidad tampón, con su ecuación de ajuste.

Para seguir la formación de HCF (III), por oxidación del HCF (II), se midió la absorbancia ($A_{415-480}$) del medio cada 10 min.

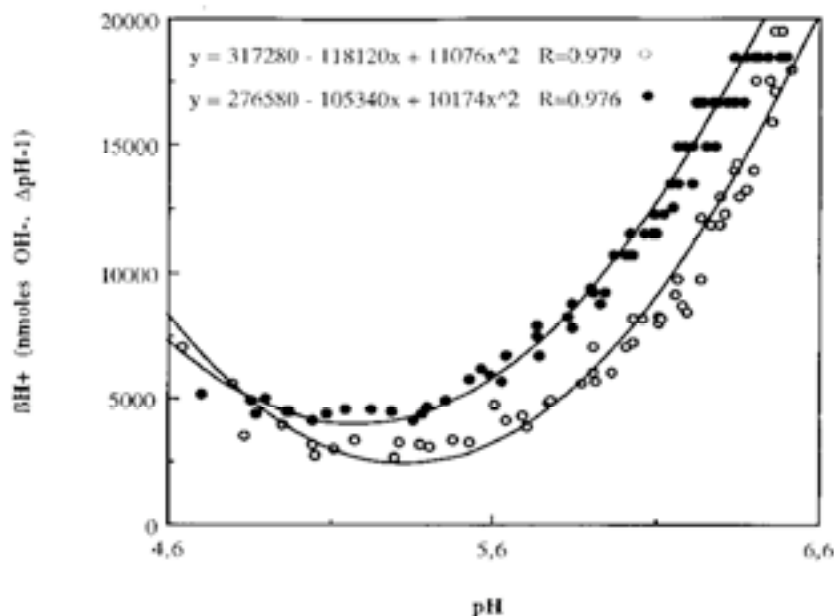


Fig 69: Capacidad tampón del medio con 175 raíces preincubadas en NaCN, para H^+ (BH^+) sin (○) y con (●) 0.60 mM de HCF (II).

En la **Fig 70** se muestra un **experimento representativo** ($n=3$) de los **flujos simultáneos de H^+ y K^+** en presencia de 0.60 mM HCF (II) (**A**), en comparación con el control (**B**). Como puede observarse, la presencia de HCF (II) en el medio provoca cambios en la cinética de los flujos de H^+ y K^+ por las raíces. En primer lugar, se observa que la acidificación (pH) del medio por las raíces en presencia de HCF (II) (**Fig 70 inserta**), muestra un periodo inicial de lag mucho mayor que el control, tanto para pH (45 min) como para pK (60 min). Además, el descenso de pH es más suave, lo que hace que la velocidad máxima de eflujo neto de H^+ en presencia de HCF (II) sea algo menor, aunque se mantiene durante más tiempo. El **pH final de equilibrio** alcanzado es similar al control. En cuanto a la variación simultánea de **pK**, hay que destacar que, puesto que el lag también es mayor, la entrada de K^+ se inicia cuando ya ha comenzado el eflujo de H^+ , como en el control. Además, el tratamiento con HCF (II) hace que el influjo de K^+ sea mucho mayor, como puede claramente apreciarse en la variación de pK: mientras el control alcanza un **pK final** de 2.77, en presencia de HCF (II) se llega a un pK final de 2.83, mostrando también mucho mayores velocidades de influjo (V_{K^+}) desde, prácticamente, el inicio del mismo. De la comparación de las **velocidades netas de eflujo de H^+ (V_{H^+}) e influjo de K^+ (V_{K^+})** cabe resaltar que las raíces con HCF (II) muestran un mayor acoplamiento entre ambos flujos, pues el aumento de V_{H^+} se refleja en un aumento de V_{K^+} , con ≈ 15 min de retardo. A partir de los 200 min, V_{H^+} disminuye, pero no el influjo de K^+ , que sigue aumentando su velocidad. En las raíces sin HCF (II) las velocidades de

influjo de K^+ llevan mucho mayor retraso respecto a las de eflujo de H^+ , y alcanzan valores máximos que son la mitad que los observados en presencia de HCF (II).

La comparación entre VH^+ sin y con HCF (II) se observa mejor en la **Fig 71** donde se representan los **valores medios** ($n=3$) de **VH^+ frente al tiempo o cinética (A) y frente al pH (B)** con y sin 0.60 mM de HCF (II); se comprueba más claramente el mayor lag que provoca la presencia de HCF (II), debido a la mayor capacidad tampón del medio, como hemos razonado para el NADH que daba el mismo efecto (en los valores de VH^+ está corregido el efecto de la mayor capacidad tampón con HCF (II), pero el lag no puede corregirse, pues $\Delta pH=0$). Una vez transcurrido el periodo de retardo o lag (≈ 50 min), las velocidades máximas se alcanzan a partir de los 120 min, siendo la VH^+ máxima muy ligeramente inferior respecto al control (1.8 nmol H^+ /h. mg p. fr. frente a 1.9 nmol H^+ /h. mg p. fr. del control); sin embargo, la meseta de VH^+ máxima se mantiene durante mucho más tiempo (≈ 75 min frente a los 30 min del control). Este efecto también se observa en la **Fig 71B**, en que se representa la dependencia de VH^+ del pH, comprobándose que, aunque la curva es similar con y sin HCF (II), la VH^+_{max} , aunque algo menor con HCF (II), se mantiene para un intervalo de pH mayor que la control (de 6.50 a 5.95 con HCF (II) y de 6.50 a 6.05 en el control). En consecuencia, aunque el cambio en la magnitud de VH^+ es escaso, el mayor intervalo de pH y de tiempo a que funciona el sistema a su velocidad máxima es la causa de que el **eflujo neto total de H^+** (JH^+ , **Fig 72**) sea muy superior en presencia de HCF (II) (16687.6 nmol de H^+ frente a 11965.3 nmol de H^+), siendo el incremento del 39%. Esta diferente cinética nos induce a pensar que el eflujo extra de H^+ en presencia de HCF (II), impulsado por la cesión de e^- (y no de H^+) a una cadena redox del plasmalema, ocurre por un sistema redox diferente al que operaba en ausencia del efector, ya que cambian claramente importantes parámetros cinéticos y de dependencia del pH con respecto a los controles, sin aditivo.

El efecto del HCF (II) sobre la **velocidad de influjo neto de K^+** (VK^+) queda reflejado en la **Fig 71C**, donde se compara la variación VK^+ con y sin HCF (II). Como vemos, los valores de VK^+ en presencia de HCF (II) son claramente superiores a los control en todo momento desde el inicio del influjo de K^+ ; así, y a pesar de que también es mayor el lag (50 min), la presencia de HCF (II) en el medio hace que VK^+ sea mayor que en el control ya a los 60 min de iniciado el influjo de K^+ ($t=120$ min), dando valores próximos a 2 nmol K^+ /h. mg p. fr. (frente a ≈ 1.0 nmol K^+ /h. mg p. fr. de las control). El aumento de VK^+ continúa hasta los 240 min en que se estabiliza a una VK^+_{max} que es casi el doble que en las control; es decir, no sólo VK^+_{max} aumenta sino que se alcanza una amplia meseta de VK^+_{max} que no se observa en los controles. Ello provoca que la absorción total de K^+ (JK^+ , **influjo neto total de K^+** al final de la cinética, **Fig 72**) sea muy superior al de los controles (35432.6 frente a 17458.6 nmol de K^+ , respectivamente, aproximadamente un incremento del 100%).

En resumen el HCF (II) activa ambos flujos de H^+ y K^+ , aunque de manera diferente: aumenta la duración de la meseta de VH^+_{max} , mientras que aumenta VK^+ (por 2) y además durante más tiempo, de manera que el influjo de K^+ es el más afectado. Posiblemente la continua extrusión de H^+ provoca una sostenida hiperpolarización de la membrana, que hace aumentar el influjo de K^+ por apertura de un número mayor de canales K^+_{in} .

Se ha medido el cambio de **Absorbancia 415-480 nm** en el medio, para detectar la formación de HCF (III) por oxidación del HCF (II) añadido. Si todo el HCF (II) se oxidara a HCF (III) la absorbancia detectada debería ser 0.6 (puesto que el coeficiente de extinción molar del HCF (III) es $1000 M^{-1} \cdot cm^{-2}$ -Lüthje y Böttger, 1989- y la concentración añadida de HCF (II) es 0.6 mM); consideramos, por tanto, 0.6 de absorbancia como el 100%.

Las medidas se realizaron adicionando HCF (II) 0.6 mM al medio de medida: a) solo, b) con raíces "in vivo" y c) con raíces preincubadas en NaCN. Los resultados se muestran en la **Fig 73**, donde se aprecia que:

a) La adición de HCF (II) al medio solo, sin raíces, apenas si altera la absorbancia a lo largo del tiempo, detectándose, si acaso, un ligerísimo aumento; por tanto, el HCF (II) de forma espontánea no se oxida a HCF (III), al menos en nuestras condiciones y medio de medida.

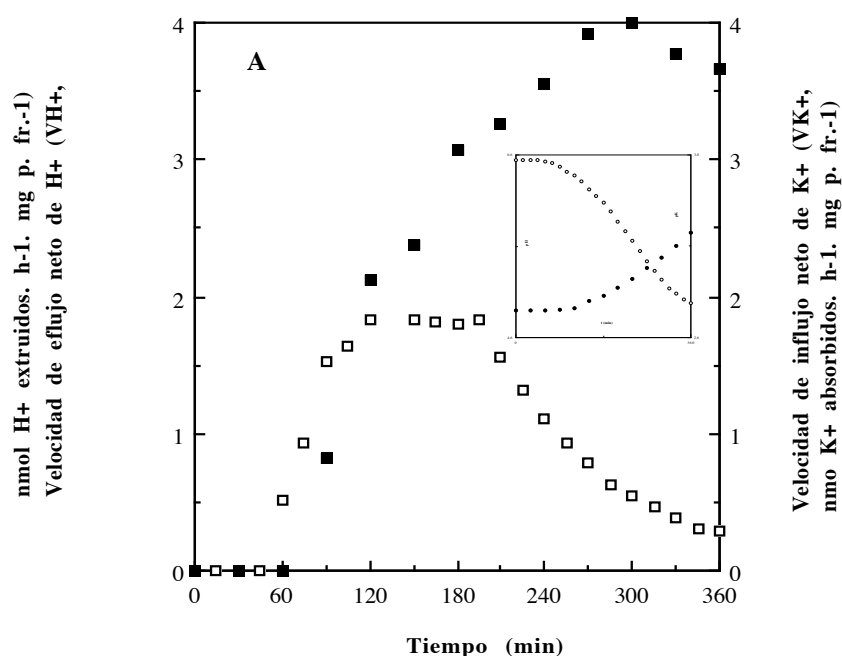
b) Las raíces "in vivo" producen un aumento rápido de la absorbancia en los primeros 30 min; a partir de este tiempo continúa aumentando la absorbancia, aunque lo hace de forma más lenta, y a partir de los 60 min prácticamente no se reduce más compuesto, de manera que en el minuto 120 se tiene una oxidación constante del HCF (II) hasta HCF (III) del 28%.

c) En cuanto a las raíces preincubadas en NaCN muestran un aumento lento y mantenido de la absorbancia a lo largo del tiempo (la mitad que en el caso anterior) de manera que la oxidación producida a los 120 min es del 12% de HCF (II) oxidado a HCF (III). En presencia de CN^- la reducción es más lenta y no llega a alcanzar el equilibrio a los 120 min, cuando está el 12% de HCF (III) y 88% HCF (II). Ello podría deberse a la interacción del CN^- con algún intermediario que ralentiza la reducción.

En resumen, tomados en conjunto estos resultados demuestran que los sistemas redox de las raíces son capaces de oxidar el HCF (II) hasta HCF (III); incluso las preincubadas con CN^- (aunque en menor grado), mantienen en funcionamiento un sistema redox capaz de producir la oxidación del HCF (II) a HCF (III), sistema que es sensible inicialmente al CN^- , pero que a partir de los 45 min empieza a funcionar más rápidamente, manteniéndose activo aunque sin llegar a los niveles de las raíces "in vivo". Consideraremos más adelante el caso del funcionamiento del sistema cuando se añade la forma oxidada HCF (III).

En conclusión, nuestros resultados indican que el HCF (II) actuaría, en presencia de raíces de girasol, como un donador de electrones (no de H^+) a una cadena redox diferente (o con algunos intermediarios o funcionamiento diferentes) a la que normalmente está

operando para modular el potencial de membrana y la actuación de la H^+ -ATPasa (Rubinstein et al., 1984). El funcionamiento de esta cadena redox alternativa afectaría tanto al eflujo de H^+ como al influjo de K^+ , de manera que el aumento del eflujo de H^+ es debido, al menos en su mayor parte, a la mayor actividad sostenida de esta cadena redox, que transportaría H^+ de origen endógeno al exterior (o sea, operando en configuración "trans"), para compensar los e^- cedidos exógenamente. La actividad de esta cadena redox y el mayor eflujo neto de H^+ provocarían una hiperpolarización sostenida de la membrana, que se compensaría con un mayor influjo neto de K^+ . Este sistema redox sería total o parcialmente diferente al que se activa por NADH, o bien la cesión de e^- por el HCF (II) se realiza a un componente distinto al que los cede el NADH, ya que, si bien el NADH estimula el eflujo neto de H^+ , lo hace aumentando VH^+ y manteniendo idénticas características cinéticas y de dependencia de pH que las que mantienen los controles (de manera que el NADH exógeno estimularía la cadena redox que ya está funcionando en las raíces control) mientras que el HCF (II) haría funcionar una cadena redox que, al menos en parte, sería diferente.



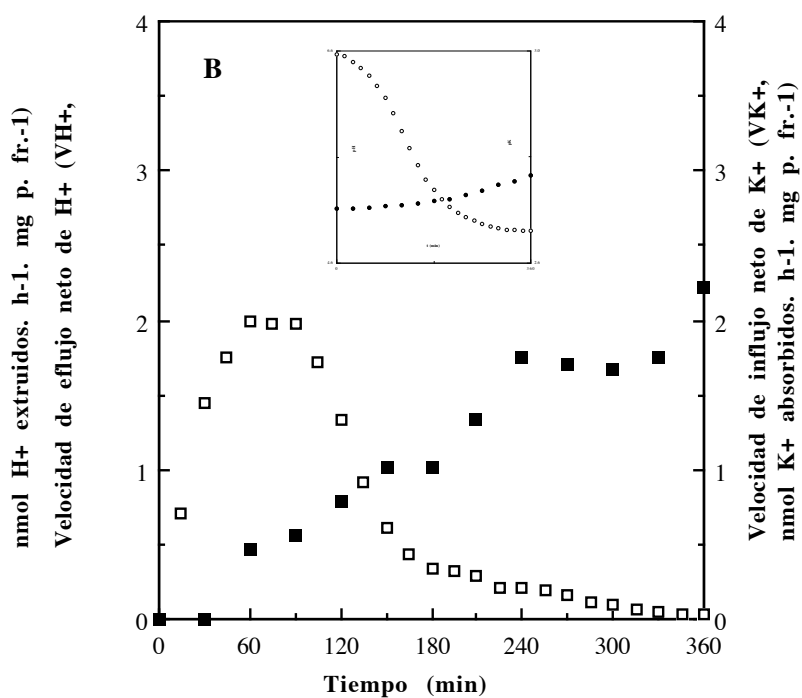
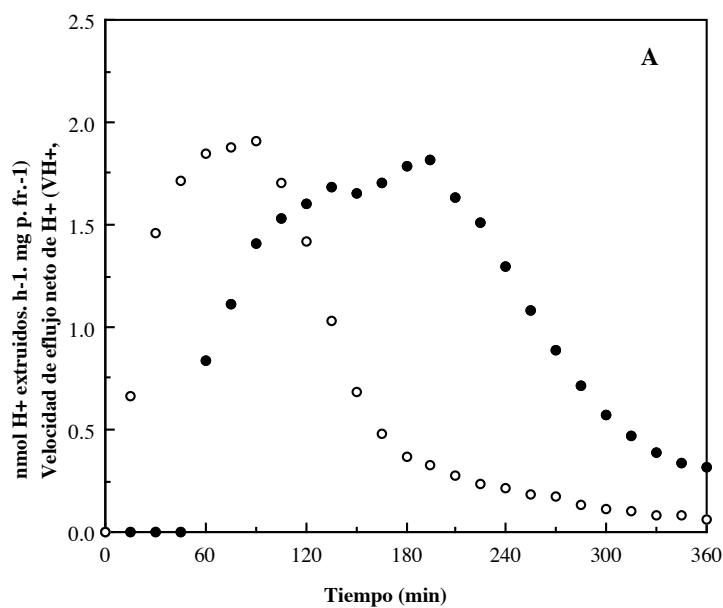


Fig 70: Velocidades netas de eflujo de H^+ (\square) e influjo de K^+ (\blacksquare) por las raíces, medidas simultáneamente, (A) con y (B) sin 0.60 mM de HCF (II) adicionado al inicio de la cinética. **Insertas,** los datos directos de variación de pH (\circ) y pK (\bullet) del medio. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo ($n \geq 3$, variaciones $\leq 5\%$ para VH^+ y entre 5 y 10% para VK^+).



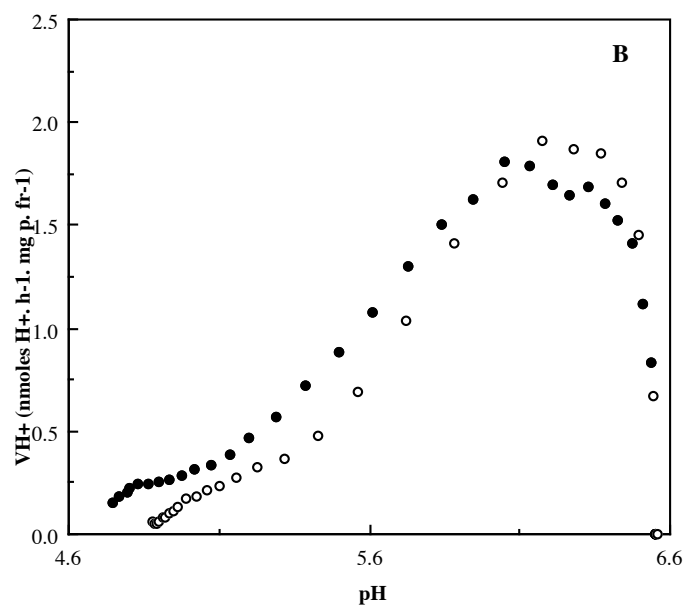


Fig 71: (A) Variación de la velocidad de eflujo neto de H^+ (VH^+) frente al tiempo y (B) frente al pH. (C) Variación de la velocidad de influjo neto de K^+ (VK^+) por las raíces sin (○) y con (●) 0.60 mM de HCF (II) adicionado al inicio de la cinética. Los datos son media de, al menos, 3 experimentos independientes (desviación $\leq 5\%$ en VH^+ y entre 5 y 10% en VK^+).

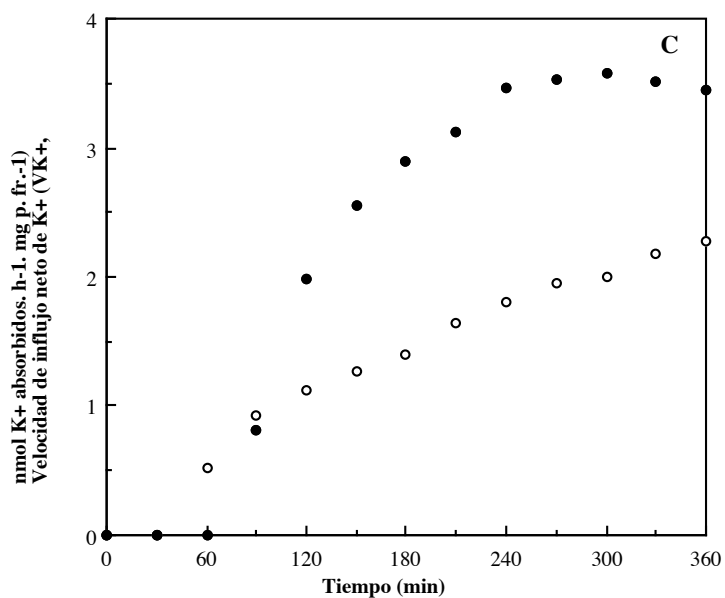


Fig 71: Continuación

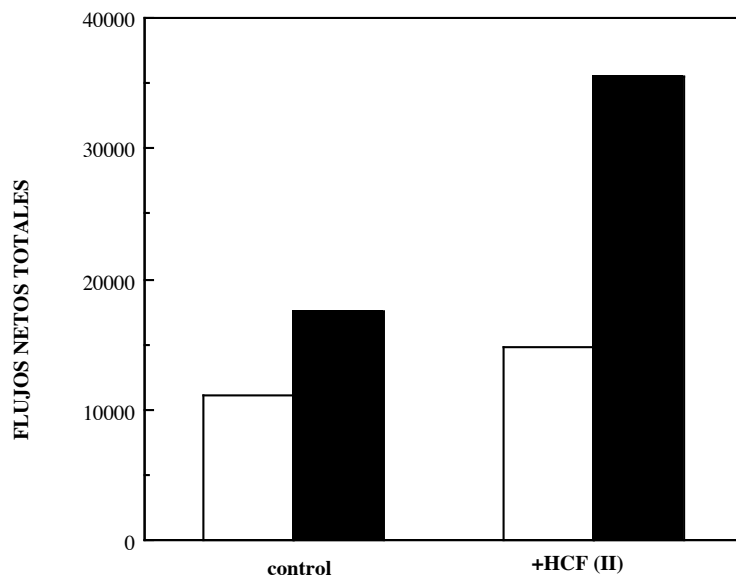


Fig 72: Flujo neto total de H⁺ (H⁺, hueco) y K⁺ (K⁺, relleno) como nmol totales de ión extruidos (H⁺) o absorbidos (K⁺) por las raíces cuando acaban los experimentos, al final de la cinética, con y sin HCF (II). Los datos están calculados a partir de la media de 3 experimentos independientes.

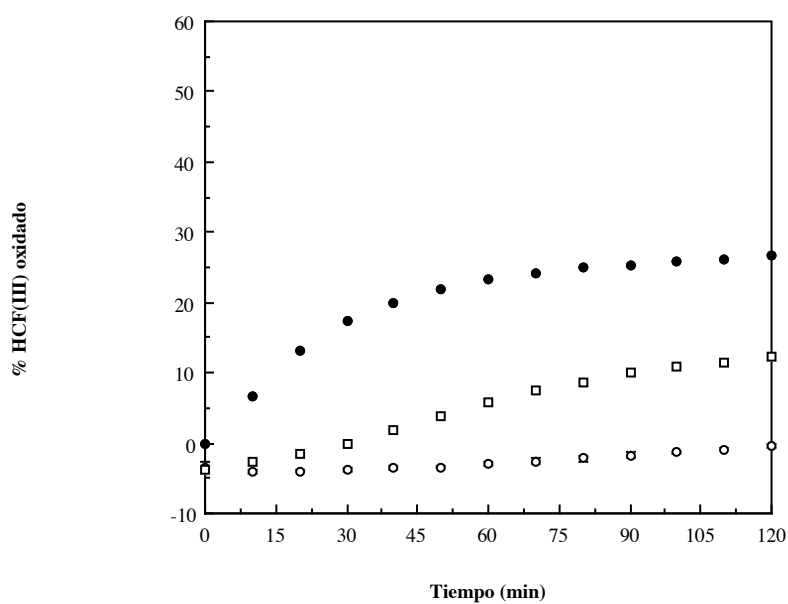


Fig 73: Oxidación de HCF (II) a HCF (III) en medio solo (○), con raíces "in vivo" (●) y con raíces preincubadas en NaCN (□). Cada caso es media de, al menos tres experimentos (Desviación ≤10%).

5.4.2.- Bloqueantes de la cadena redox: cis-Platino, cis-Pt (II)

Se ha comprobado el efecto bloqueante del cis-Pt (II) sobre componentes de la cadena redox del plasmalema tanto de células animales como vegetales (Apartado 4.4.2. de Introducción); el estudio de su efecto sobre los flujos simultáneos de H^+ y K^+ es interesante a la hora de poner de manifiesto la posible implicación de una cadena redox del plasmalema de las raíces de girasol en estos flujos.

Previamente a la **adición de cis-Pt (II)** realizamos la **adición de 300 μM NADH** que, como se ha comprobado anteriormente, cede los electrones y activa la cadena redox; de esta forma aseguramos que dicha cadena está en funcionamiento cuando añadamos cis-Pt (II). Al igual que en el apartado anterior, la adición de NADH se realiza al inicio de la cinética (pH=6.550), y el cis-Pt (II) cuando el medio ha alcanzado un pH 6.00 (aproximadamente a los 135 min del inicio de la cinética, ya que el lag provocado por la adición de NADH (Aptdo 5.4.1.1) retrasa dicha cinética).

Para comprobar si el cis-Pt (II) provoca modificaciones en la **capacidad tampón** de las raíces (BH^+ ó BK^+), realizamos calibraciones del medio con 300 μM de NADH, 500 μM de cis-Pt (II) y raíces preincubadas en NaCN. Como puede observarse (**Fig. 74**) la adición de 500 μM cis-Pt (II) no provoca alteración alguna de la capacidad tampón del medio con raíces + 300 μM NADH (que se toma como control de referencia en este caso).

Las diferentes concentraciones de cis-Pt (II) utilizadas fueron: 100, 250 y 500 μM , perteneciendo las semillas utilizadas en estas experiencias a la misma **remesa C** que las usadas en las experiencias de NADH (**Fig 17C**).

5.4.2.1.- Efecto de algunas concentraciones de cis-Pt (II) sobre los flujos de H^+ y K^+ , simultáneamente

El efecto que la adición de 250 μM de cis-Pt (II) (+ 300 μM de NADH adicionado al inicio de la cinética) tiene sobre los flujos simultáneos de H^+ y K^+ se observa en la **Fig 75A**, que muestra un **experimento representativo** (n=3) en comparación con el control (raíces + 300 μM NADH adicionado al inicio de la cinética, **Fig 75C**). En las figuras insertas de ambas gráficas se aprecia cómo una vez añadido el cis-Pt (II) hay una ralentización de la bajada del **pH** del medio (**Fig 75A, inserta**) siendo apreciable entre los 45-60 min posteriores a la adición. En la variación de **pK** (**Fig 75A, inserta**) el efecto es algo más tardío, necesitando entre 60 y 75 min. En ambos casos se produce después una inversión de los flujos, aunque desfasada en el tiempo: primero revierte el de H^+ a influjo neto de H^+ (evidente ya a los 75 min) y después revierte también el de K^+ a eflujo neto de K^+ (a los 90 min). Esto es indicativo de que la alteración ocasionada en el eflujo de H^+ es la causa de que revierta después el de K^+ : la entrada neta de H^+ despolariza fuertemente la membrana, abriendo canales K^+_{out} para restaurar el potencial a valores normales. De nuevo se observa un efecto causa-efecto entre el flujo de H^+ y K^+ , que estarían acoplados

indirectamente, siendo las variaciones del potencial de membrana provocadas por los flujo de H^+ las que secundariamente harían cambiar los de K^+ .

En las **velocidades netas de ambos flujos (VH^+ y VK^+)**, se aprecia aún mejor la rápida disminución de los flujos tras la adición del inhibidor, manteniéndose un desfase de VK^+ respecto a la caída de VH^+ . Finalmente, a partir del minuto 220 de la cinética se produce un influjo neto de H^+ que se compensa y estabiliza de nuevo a valores de flujo nulo ($VH^+ \approx 0$) a partir de los 280 min. Con el mismo retraso de ≈ 60 min revierte también el flujo de K^+ a eflujo neto, estabilizándose a valores de eflujo neto de K^+ hasta el final de la cinética.

Con la **concentración más alta de cis-Pt (II) ($500 \mu M$)** el efecto es similar para los H^+ pero aún más acusado para el K^+ (**Fig 75B**) que muestra una respuesta más rápida alcanzando valores de eflujo neto a los ≈ 60 min de aplicado el inhibidor y VK^+ mucho más negativo que en el caso anterior (mayor velocidad de eflujo neto).

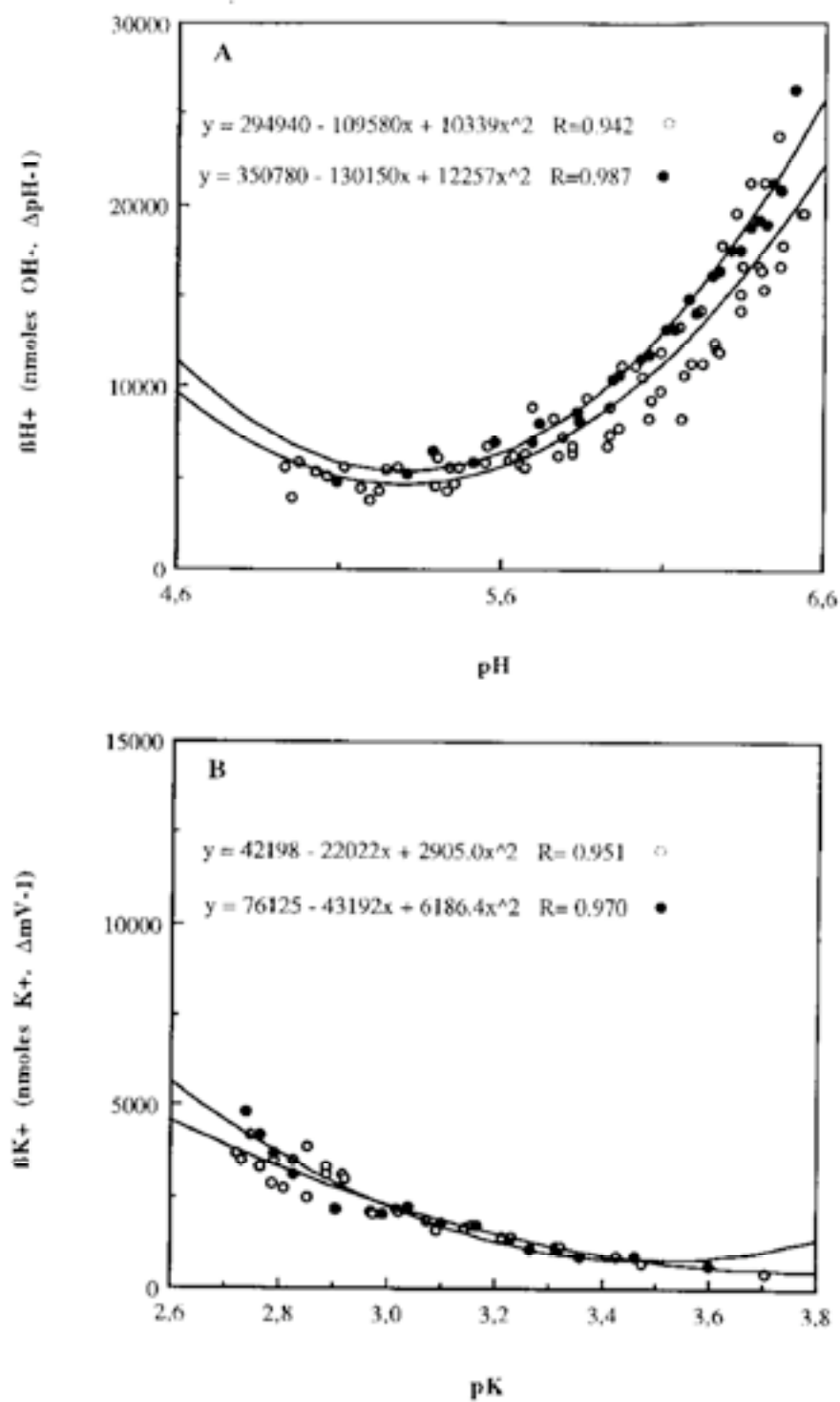


Fig 74: Capacidad tampón del medio con 175 raíces preincubadas en NaCN con 300 μ M de NADH y sin (○) y con (●) 500 μ M de cis-Pt (II). (A) Capacidad tampón para H^+ (BH^+). (B) Capacidad tampón para K^+ (BK^+).

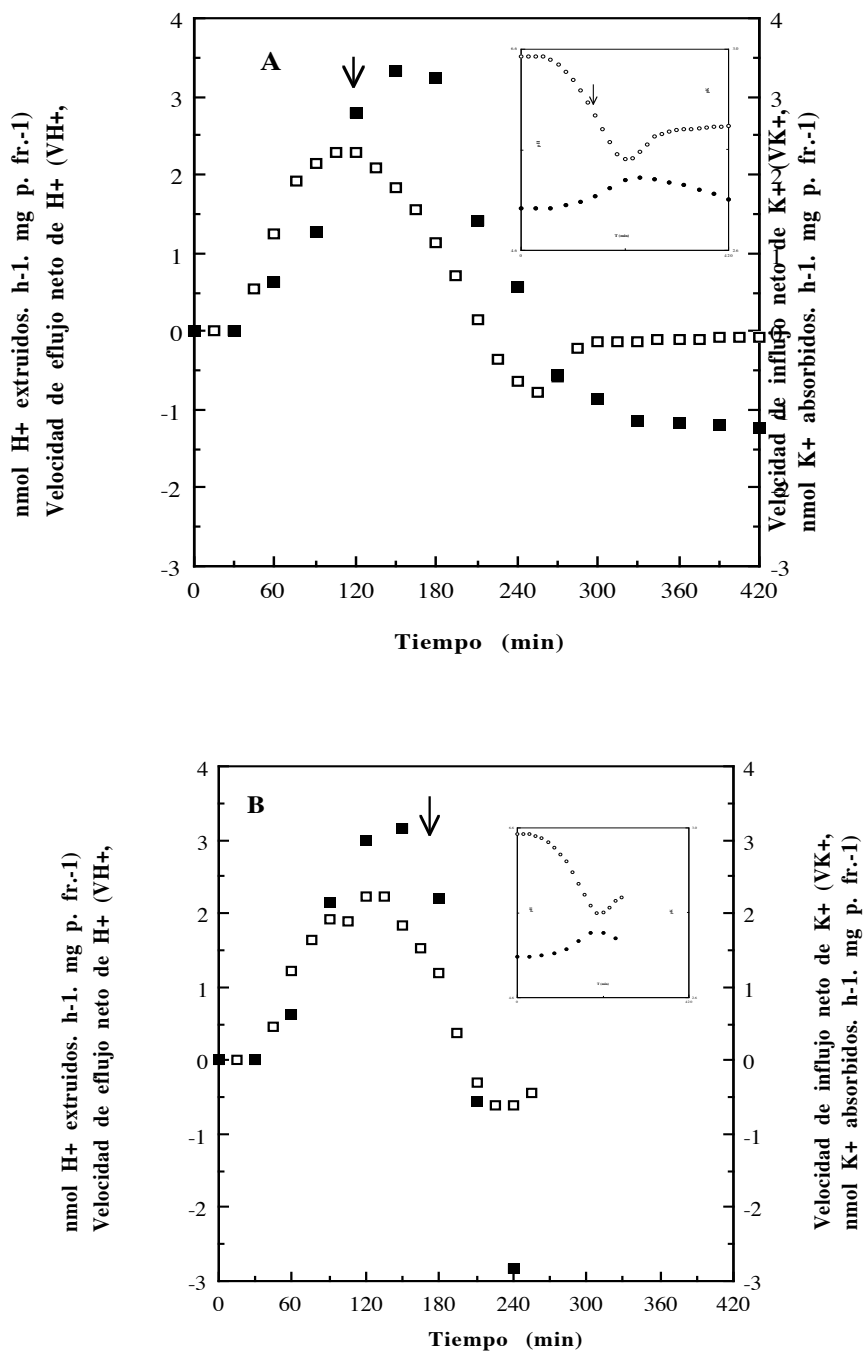


Fig 75: Velocidades netas de eflujo de H⁺ (□) e influjo de K⁺ (■) por las raíces, medidas simultáneamente, con NADH adicionado al inicio de la cinética y (A) con 250 μM, (B) con 500 μM y (C) sin cis-Pt(II). **Insertas,** los datos directos de variación de pH (○) y pK (●) del medio. La flecha indica el momento de adición del cis-Pt(II). Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo (n≥3 variaciones ≤5% para VH⁺ y entre 5 y 10% para VK⁺).

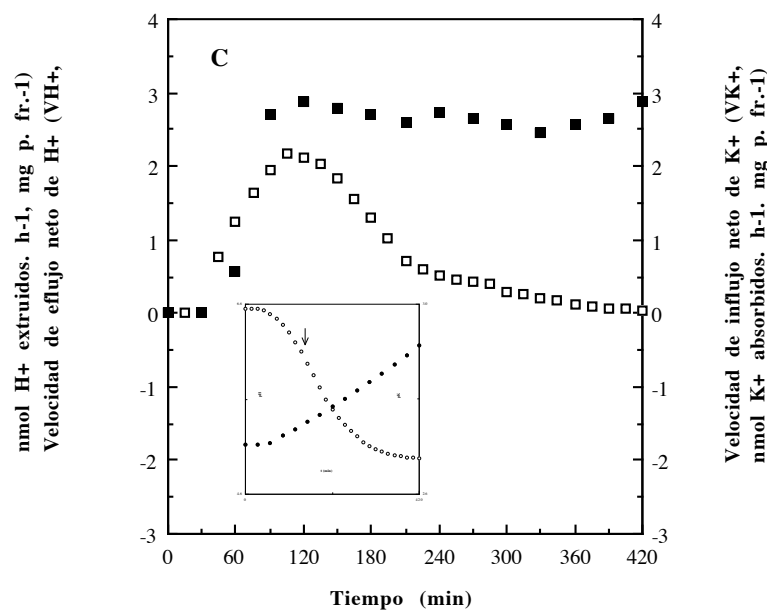


Fig 75: Continuación

5.4.2.2.- Efecto de varias concentraciones de cis-Pt (II) sobre el flujo neto de H⁺: Curvas dosis-respuesta

En la Fig 76 se muestra la **curva dosis-respuesta** de flujo neto de H⁺ [pH (A) y VH⁺ (B)] con respecto a diferentes concentraciones de cis-Pt (II). En ella se representan los **valores medios** de 3 experimentos, para cada concentración, ya que en estos casos se ha de realizar comparativa entre experimentos necesariamente diferentes. la variabilidad se mantenía siempre $\leq 5\%$. Tanto en los valores de pH (A) como de VH⁺ (B) se observa una caída de flujo de H⁺ en presencia de cis-Pt (II), siendo la caída tanto mayor, y ocurriendo antes en el tiempo, cuanto mayor es la concentración de inhibidor adicionada al medio. Los cambios en la VH⁺ comienzan a ser apreciables a partir de los 60 min posteriores a la adición para 250 y 500 μM , mientras que 100 μM requiere tiempos ligeramente más largos (≥ 90 min).

Para estudiar con más detalles el efecto del cis-Pt (II) hemos representado, como en casos anteriores, la variación de pH y de VH⁺ a “tiempos cortos” que, en este caso, van desde los 15 min previos a la adición del inhibidor hasta los 120 min posteriores (Fig 77 A y B). Así, se pone de manifiesto que son necesarios, aproximadamente, 60 min para comenzar a detectar el efecto del cis-Pt (II) sobre el flujo neto de H⁺. A este tiempo 250 y 500 μM han reducido fuertemente la capacidad que las raíces tienen de acidificación del medio, de forma que mientras el control alcanza un pH de 5.460, las concentraciones mayores de cis-Pt (II) presentan valores superiores (5.540 y 5.600 respectivamente). Sólo 100 μM mantiene un comportamiento semejante al control, hasta los 105 min de la adición, en que

comienzan a observarse pequeñas diferencias en el pH del medio, respecto del control. En la representación de VH^+ (**Fig 77B**) este efecto se pone más claramente de relieve. Así, incluso a los 45 min, 250 y 500 μM ya muestran una menor velocidad de eflujo neto. A los 60 min de la adición, mientras 100 μM de cis-Pt (II) no altera la velocidad de eflujo neto de H^+ , 250 μM la reduce a valores que son el 50% de la control y 500 μM provoca la anulación total del flujo neto de H^+ . Para tiempos superiores a 60 min, las concentraciones más altas comienzan a dar valores negativos VH^+ (aparición de influjo neto de H^+), mientras que con 100 μM sólo a partir de los 90 min comienza a notarse una leve disminución de VH^+ , que va acentuándose a tiempos más largos hasta que el eflujo se anula ($VH^+ \approx 0$) a partir de los 120 min hasta el final de la cinética (**Fig 76B**), no llegando a alcanzarse influjo neto de H^+ . A tiempos aún superiores se revierte el flujo de H^+ de nuevo a valores de VH^+ cercanos a 0 para aquellas concentraciones que mostraban influjo neto de H^+ a tiempos cortos. El **pH final de equilibrio**, a los 360 min de la cinética, se alcanzaban a valores menos ácidos que el control ($pH_f=5.010$), del que estaban tanto más alejado cuanto mayor era la concentración de inhibidor empleada (100 μM $pH_f=5.315$; 250 μM $pH_f= 5.775$ y 500 μM $pH_f=5.895$).

A continuación calculamos la **Actividad relativa de eflujo neto de H^+** (VH^+ para cada concentración de cis-Pt (II) en % respecto a VH^+ del control, sin inhibidor), representándose frente al tiempo (**Fig 78**) y a la concentración de inhibidor (**Fig 79**). En la primera de estas gráficas se muestra de nuevo, cómo hasta los 30 min posteriores a la adición del inhibidor no se aprecia efecto alguno para ninguna de las concentraciones probadas. A partir de este momento comienza a observarse una rápida reducción de la actividad de eflujo neto de H^+ , tanto mayor cuanto mayor es la concentración de cis-Pt (II); a los 45 min 250 y 500 μM reducen la actividad de eflujo del/os sistema/s hasta valores del 80% y 60% respectivamente, mientras que 100 μM necesita 90 min para que se observe una reducción de la actividad de eflujo hasta el 80%. Hay que destacar cómo todas las concentraciones terminan anulando la actividad de eflujo neto de H^+ , aunque igualmente con requerimiento de tiempo tanto menor cuanto mayor es la concentración (500 μM a los 60 min, 250 μM a los 75 min y 100 μM a los 135 min). También cabe destacar el similar comportamiento que presentan 250 y 500 μM , a partir de 90 min, con valores similares de influjo neto de K^+ .

En la **Fig 79** se representa la Actividad relativa de eflujo de H^+ frente a la concentración de cis-Pt (II) para distintos tiempos, apreciándose cómo a partir de los 45 min comienza el descenso de la Actividad, siendo mayor conforme más tiempo transcurre y mayor es la concentración. Esto sucede hasta los 90 min, tiempo a partir del cual, y para concentraciones por encima de 250 μM aparentemente se satura la respuesta, no produciéndose aumento de la inhibición y mostrando repuestas semejantes. La respuesta a las concentraciones de cis-Pt (II) y su interacción con el tiempo, así como el cálculo de IC_{50} para el cis-Pt (II), se analiza en la **representación de Dixon-Webb (Fig 79 inserta)**.

Para tiempos inferiores a 60 min, las diferentes concentraciones muestran una única respuesta proporcional a la concentración para cada tiempo, no alcanzándose el IC_{50} hasta los 45 min ($IC_{50} \approx 500 \mu M$). Para tiempos mayores ($t \geq 60$ min) comienza a observarse una respuesta bifásica, ya que las respuestas para las concentraciones más altas no se alinean con la de $100 \mu M$, indicando con ello que un segundo sistema podría estar siendo afectado. Mientras el **IC_{50} de la primera respuesta** sigue sin modificarse (**$IC_{50} \approx 500 \mu M$**), el IC_{50} de esta **segunda respuesta** es $260 \mu M$ para 60 min y $130 \mu M$ para 90 min. A los 120 min la segunda respuesta se inicia a concentraciones inferiores a $100 \mu M$, de manera que su **$IC_{50} \approx 50 \mu M$** .

Estos resultados pueden ser interpretados como sigue: el cis-Pt (II) inhibiría el eflujo neto de H^+ impulsado por la oxidación del NADH añadido exógenamente, que lleva a cabo directamente la NADH oxidoreductasa de la cadena redox del plasmalema, según proponen Morrè et al. (1988B). Este efecto es apreciable a partir de los 45 min, con las concentraciones superiores usadas (250 y $500 \mu M$). Según Morrè et al. (1988B), no es necesaria la penetración del cis-Pt (II) en el interior celular para que actúe sobre la NADH oxidoreductasa, así que el periodo de 45 min podría deberse a que, mientras el eflujo de H^+ por la cadena redox del plasmalema se afecta, sigue ocurriendo aún eflujo por la H^+ -ATPasa. Llegado un momento, el bloqueo de la cadena afectaría suficientemente el potencial de membrana para que, indirectamente, se inhibiera la actuación de la H^+ -ATPasa, anulándose totalmente el eflujo de H^+ , y produciéndose un influjo neto de H^+ . Esta explicación estaría en consonancia con la representación de Dixon-Webb que muestra cómo para tiempos cortos hay una única respuesta lineal, es decir, un único sistema afectado. Sin embargo, para tiempos superiores y a las concentraciones mayores comienza a observarse una doble respuesta, similar a la obtenida por Morrè et al. (1988B) con vesículas de plasmalema, que se va observando a concentraciones cada vez menores conforme aumenta el tiempo de exposición del inhibidor. Esta doble respuesta podría reflejar un **efecto primario** y rápido (de fácil acceso), que enseguida alcanza un IC_{50} constante, sobre la cadena redox, tal vez sobre una actividad NADH oxidoreductasa en la cara apoplástica de la membrana, de fácil acceso exocelular, como mantienen Morrè et al. (1988B); y otro **efecto secundario**, posterior en el tiempo, sobre la H^+ -ATPasa, a través de la alteración del potencial de membrana o bien por una acción directa sobre la misma H^+ -ATPasa, tal y como parecen poner de manifiesto de Morrè et al. (1988B) en el trabajo anteriormente citado, donde observan la inhibición de la elongación de epicotilos por cis-Pt (II), relacionada con la inhibición de la actividad de extrusión de H^+ según teoría del crecimiento ácido.

En **conclusión**, tal como veíamos en el caso de otros inhibidores, podemos decir que el sistema de extrusión de H^+ de nuestras raíces se bloquea por cis-Pt (II) según una respuesta bifásica, con dos lugares o fases de actuación del inhibidor, uno de fácil acceso pero poco sensible ($IC_{50} \approx 500 \mu M$, constante a partir de 45 min) y otro menos accesible

pero mucho más sensible ($IC_{50} \approx 50 \mu M$, constante a partir de 120 min). Estos lugares se asocian con la cadena redox el primero y la H^+ -ATPasa, directa o indirectamente, el segundo.

5.4.2.3.- Efecto de varias concentraciones de cis-Pt (II) sobre el influjo neto de K^+ : Curvas dosis-respuesta

En la **Fig 80** se observa el efecto que las concentraciones de cis-Pt (II) tienen sobre el influjo neto de K^+ . Hemos representado la variación de **pK (A)** y **VK⁺ (B)** para cada una de ellas, comparándolas con el control (con NADH y sin cis-Pt (II)). La disminución del influjo neto de K^+ comienza a ponerse de manifiesto claramente a partir de los 180 min (45 min después de la adición de cis-Pt (II)) aunque no es hasta los 90 min posteriores a la adición cuando esta disminución se observa en todas las concentraciones. A partir de este momento los valores de pK se mantienen o descienden (según la concentración de inhibidor), reflejando, respectivamente, un cese del influjo neto o bien una salida neta de K^+ (eflujo neto de K^+). El eflujo neto de K^+ acaba ocurriendo con todas las concentraciones; sólo varía en cuanto al tiempo necesario para que se produzca: así, 100 μM requieren 210 min para anular el influjo y que se observen valores netos de eflujo, mientras que concentraciones mayores consiguen estas mismas alteraciones a tiempos más cortos; 150 min para 250 μM y 90 min para 500 μM . Consecuencia de este eflujo de K^+ continuado es que, al final de la cinética pueda darse el caso, como ocurre con 500 μM de cis-Pt (II), de que el pK sea inferior incluso al inicial ($pK_i=2.69$, $pK_f=2.71$) es decir, hay más K^+ en el medio al final que al inicio del experimento. Por el contrario, las raíces sin cis-Pt (II) presentan un $pK_f=2.93$ ($pK_i=2.71$).

El cese del influjo neto de K^+ y la aparición de eflujo queda más claramente reflejado en la **Fig 80B** donde representamos las **velocidades netas de influjo de K^+ (VK⁺)** respecto del tiempo. Así, vemos que hasta los 30 min después de la adición no se observan cambios significativos de VK⁺, ni siquiera con las concentraciones más altas de cis-Pt (II). Sin embargo, a partir de los 30 min VK⁺ comienza a descender, obteniéndose ya a los 45 min la anulación total del influjo neto con 500 μM , y reduciéndose VK⁺ al 30% con 250 μM . Con todas las concentraciones de cis-Pt (II) adicionadas, se producen valores negativos de VK⁺ (eflujo neto), dependiendo estos valores tanto de la concentración como del tiempo. El cese del influjo neto de K^+ es más rápido cuanto mayor concentración adicionamos, sucediendo lo mismo con la velocidad del eflujo (VK⁺ tanto más negativo, mayor eflujo, cuanto mayor es la concentración).

Cuando calculamos la **Actividad relativa de influjo de K^+** (% de VK⁺ respecto a los controles, con NADH pero sin cis-Pt-II) frente al tiempo para las diferentes concentraciones de cis-Pt (II) (**Fig 81**), observamos cómo la inhibición aumenta con la concentración y con el tiempo, hasta un momento determinado para cada concentración, a partir del cual permanece constante, es decir, se alcanza la saturación del efecto. Este

tiempo es menor cuanto mayor es la concentración: 90 min para 500 μM , 120 min para 250 μM y 180 min para 100 μM . Para todas las concentraciones observamos cómo tras la anulación del influjo neto de K^+ se produce un eflujo (actividades de influjo negativas) y que AVK^+ se estabiliza siempre en valores negativos, de eflujo neto, tanto más negativas cuanto mayor es la concentración (para 100 μM , $\text{AVK}^+_{\text{cte}} \approx 10\%$; para 250 μM , $\text{AVK}^+_{\text{cte}} \approx -50\%$ y para 500 μM , $\text{AVK}^+_{\text{cte}} \approx -125\%$).

La **Fig 82** muestra la Actividad relativa de influjo neto de K^+ frente a la concentración de cis-Pt (II) para distintos tiempos. De nuevo observamos que la actividad no comienza a disminuir hasta los 45 min posteriores a la adición del inhibidor (30 min no muestra alteración alguna), y que en este tiempo la inhibición es solamente apreciable a las concentraciones de cis-Pt (II) superiores (250 y 500 μM). Para tiempos superiores, la $\text{AVK}^+_{\text{cte}}$ sufre ya una fuerte disminución para todas las concentraciones usadas, dependiendo esta inhibición del tiempo hasta, aproximadamente, los 90 min; a partir de este momento apenas si se modifican los valores obtenidos para cada una de las concentraciones.

A partir de esta figura obtenemos la **representación de Dixon-Webb** en la que calculamos el valor de IC_{50} para cada tiempo. En esta representación se pone de manifiesto nuevamente una respuesta bifásica, cada fase con diferente sensibilidad al inhibidor. Así, mientras la **primera fase** presenta un $\text{IC}_{50} \approx 550 \mu\text{M}$ ($t=60$ min), de 300 μM ($t=90$ min) y 100 μM ($t=120$ min), la **segunda fase** presenta un valor de 300 μM a los **60 min**, permaneciendo a partir de este tiempo prácticamente constante, $\approx 125 \mu\text{M}$. Esto nos indica una mayor sensibilidad de esta segunda respuesta, que además, requiere tiempos similares para la actuación del inhibidor y que podría corresponderse con algún efecto directo sobre los sistemas de transporte de K^+ .

En conclusión, el efecto del cis-Pt (II) sobre los flujos netos de H^+ y K^+ es muy similar: a medida que aumenta la concentración de cis-Pt (II) y el tiempo de actuación, se incrementa la inhibición. La acción inhibidora es mayor en el caso del eflujo neto de H^+ , como se puede apreciar observando los IC_{50} en ambos casos (el influjo neto de K^+ tiene IC_{50} ligeramente superiores que el eflujo de H^+ para tiempos iguales). Esto indica que el influjo de K^+ es menos sensible al cis-Pt (II) que el eflujo de H^+ , lo que apoyaría la hipótesis de una actuación del cis-Pt (II) sobre la cadena redox del plasmalema, a nivel de una NADH oxidorreductasa de acceso exocelular, como afirman Morré et al. (1988B); su actuación provocaría la anulación de la diferencia de potencial de membrana, impidiendo con ello la actuación de la ATPasa, si bien no es descartable un efecto directo sobre ella; con ello deja de existir el gradiente de potencial necesario para la actuación de los sistemas de absorción de K^+ , produciéndose finalmente un débil influjo de H^+ (a favor de gradiente) y como consecuencia una despolarización que induciría la apertura de canales K^+_{out} , lo que

provocaría un fuerte eflujo de K^+ , que al ser consecuencia secundaria del efecto del cis-Pt (II), presentaría una menor sensibilidad al inhibidor, como hemos descrito.

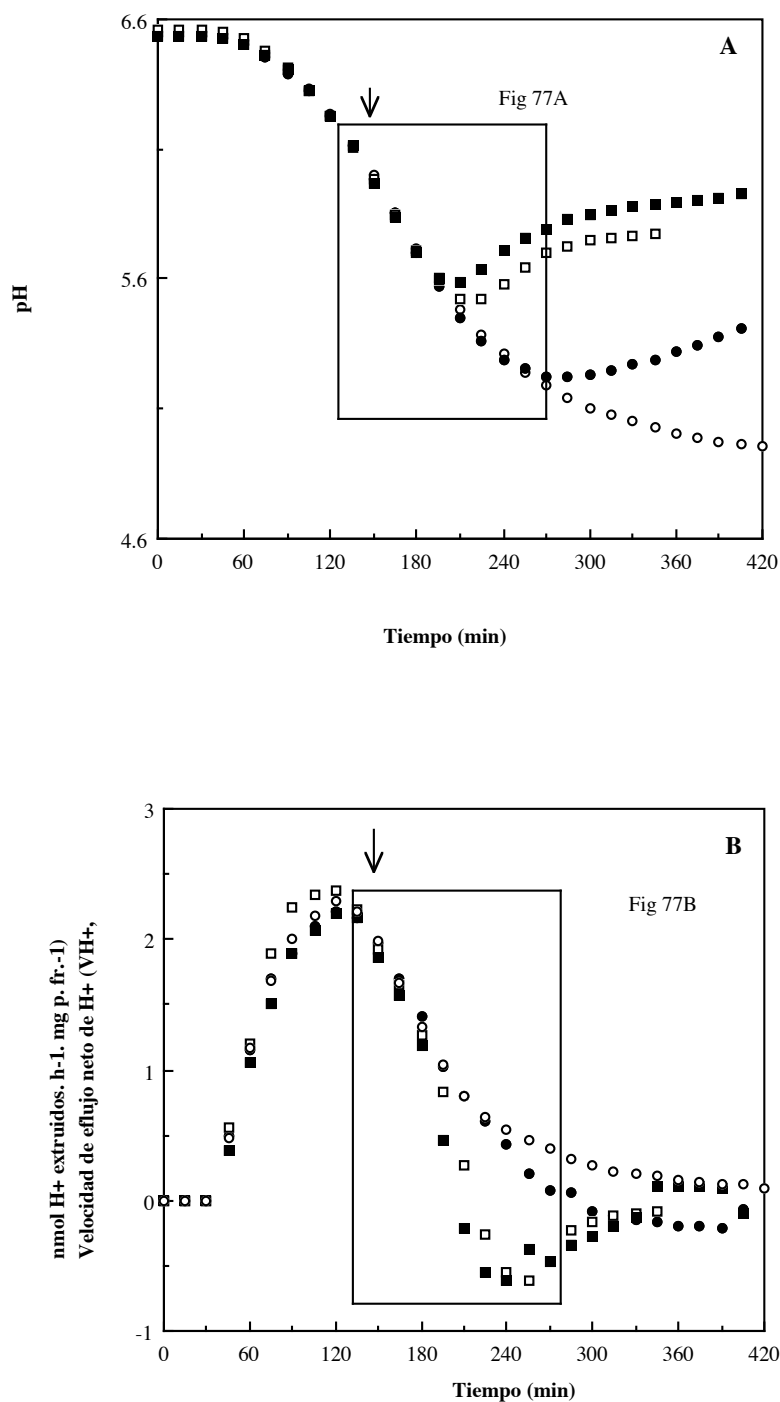


Fig 76: (A) Variación del pH del medio y (B) velocidades de eflujo neto de H^+ (VH^+) por las raíces con NADH añadido al inicio de la cinética y sin (○) y con 100 (●); 250 (□) y 500 μM (■) de cis-Pt (II). La flecha indica el momento de adición del cis-Pt (II). Los datos son media de, al menos 3 experimentos independientes (desviación $\leq 5\%$).

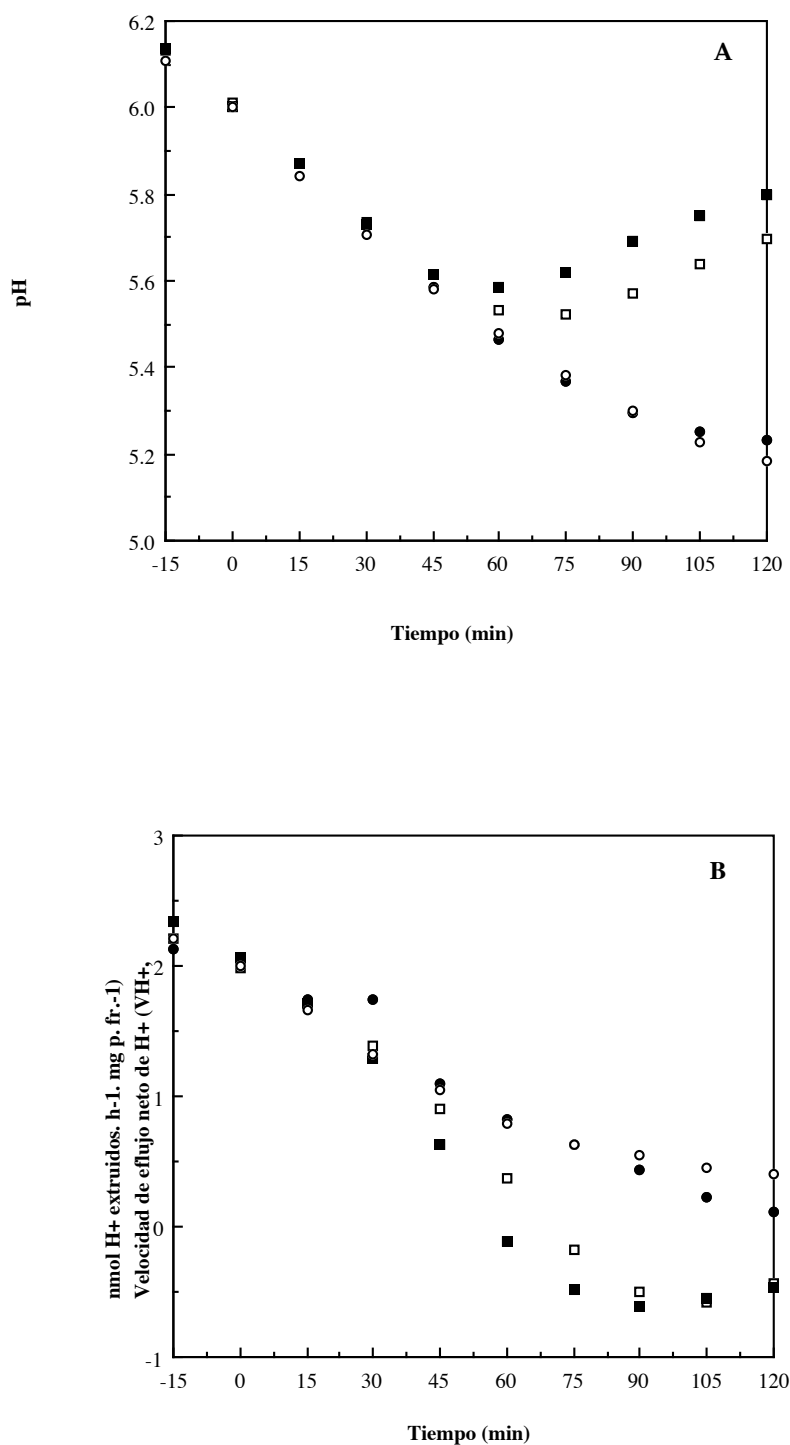


Fig 77: (A) Variación del pH del medio y (B) velocidades de eflujo neto de H^+ (VH^+) por las raíces, a tiempos cortos, con NADH añadido al inicio de la cinética y sin (○) y con 100 (●); 250 (□) y 500 μM (■) de cis-Pt (II). La flecha indica el momento de adición del inhibidor, (pH=6.0, t=0). Los datos son media de, al menos tres repeticiones (desviación $\leq 5\%$).

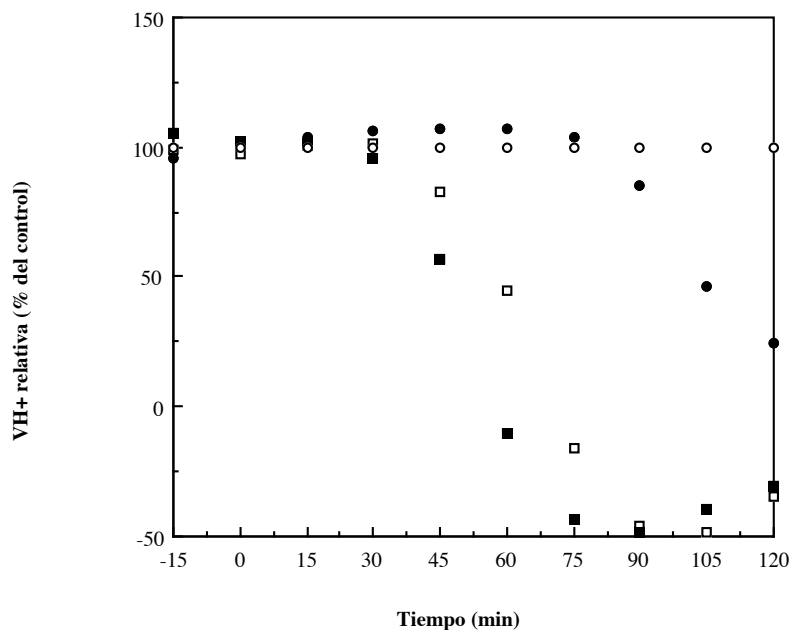


Fig 78: Actividad relativa de eflujo de H⁺ frente al tiempo (en % de los valores de VH⁺ control -○-) con 100 (●); 250 (□) y 500 μM (■) de cis-Pt (II). Los datos son media de, al menos tres experimentos (las desviaciones de los datos directos a partir de los que se calculan los correspondientes porcentajes son ≤5%).

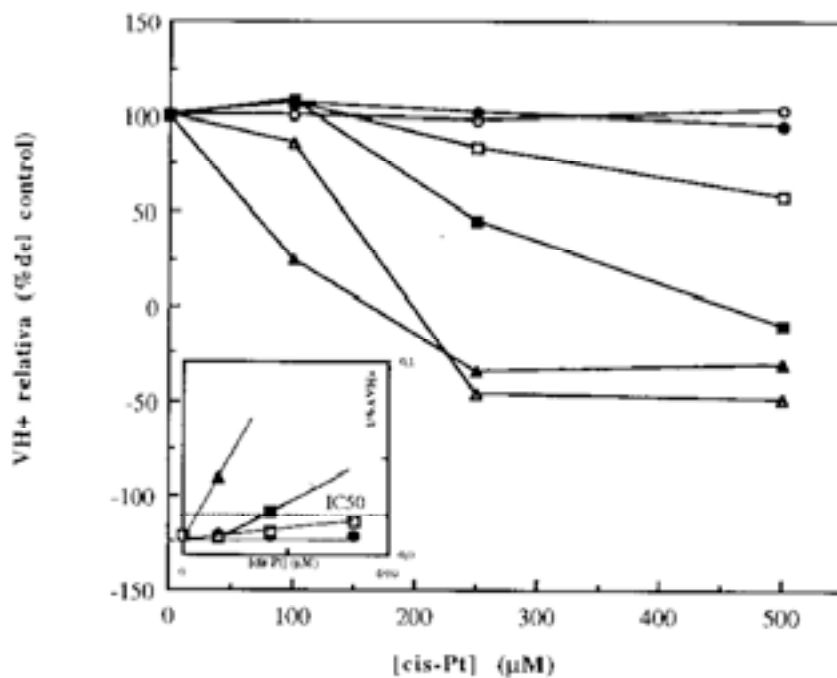


Fig 79: Actividad relativa de eflujo de H⁺ frente a la concentración de cis-Pt (II) a 0 (○); 30 (●); 45 (□); 60 (■); 90 (△) y 120 min (▲) después de la adición de cis-Pt (II). Los datos son media de, al menos tres experimentos independientes. **Inserta**, el plot de Dixon-Webb (para valores >0).

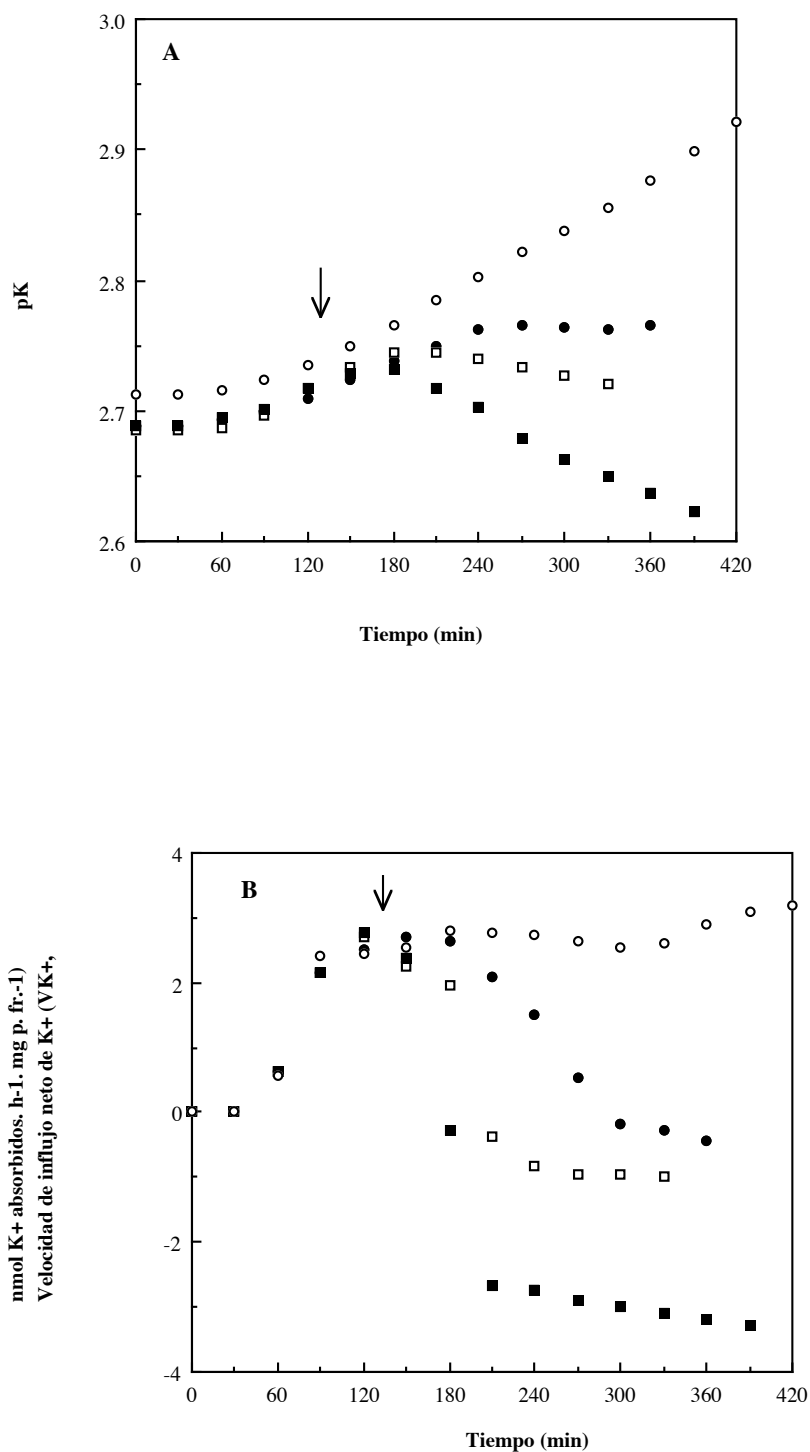


Fig 80: (A) Variación de pK del medio y (B) velocidades de influjo neto de K^+ (V_{K^+}) por las raíces con NADH adicionado al inicio de la cinética y sin (○) y con 100 (●); 250 (□) y 500 μ M (■) de cis-Pt (II). La flecha indica el momento de adición del cis-Pt (II). Los datos son media de, al menos, 3 experimentos independientes (desviación entre 5 y 10%).

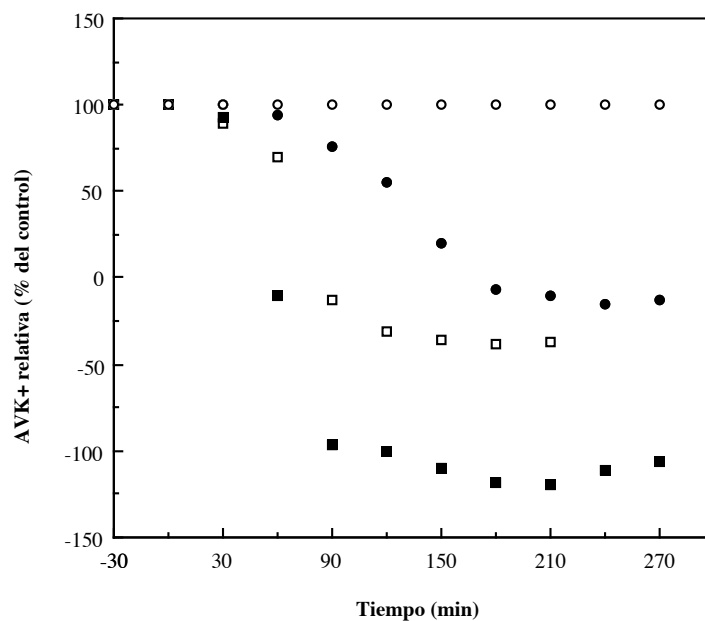


Fig 81: Actividad relativa de influjo de K⁺ frente al tiempo (en % de los valores de VK⁺ -○-) con 100 (●); 250 (□) y 500 μM (■) de cis-Pt (II). Los datos son media de, al menos tres experimentos independientes (las desviaciones de los datos directos a partir de los que se calculan los correspondientes porcentajes están entre 5 y 10%).

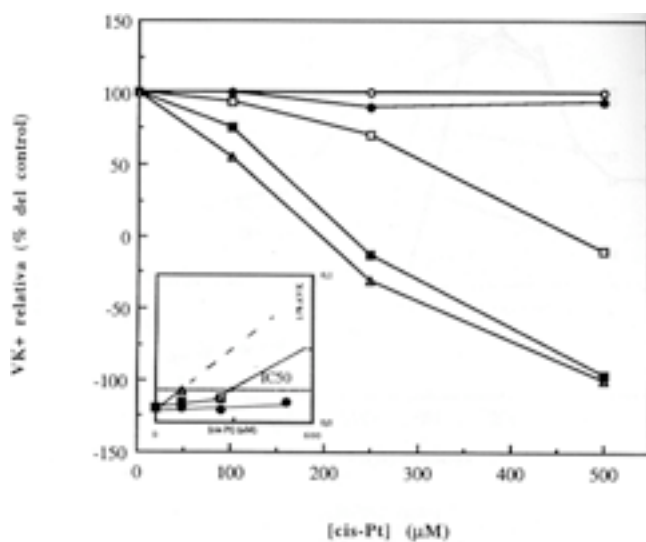


Fig 82: Actividad relativa de influjo de K⁺ frente a la concentración de cis-Pt (II) a 0 (○); 30 (●); 60 (□); 90 (■) y 120 min (△).después de la adición de cis-Pt (II). Los datos son media de, al menos tres experimentos independientes. **Inserta**, el plot de Dixon-Webb (para valores >0).

5.4.3. Aceptores de electrones de la(s) cadena(s) redox

Como se ha señalado en la Introducción al referirnos a los diversos componentes de la cadena redox del plasmalema, se han detectado distintas actividades reductoras en la misma dependiendo de la utilización de diferentes aceptores artificiales de electrones. El **hexacianoferrato (III) (HCF-III)** es el aceptor soluble no permeante de e^- de la cadena redox del plasmalema más utilizado en la Bibliografía; por ello decidimos su utilización en primer lugar, para tratar de poner de manifiesto la existencia en las raíces de girasol de cadena(s) capaz(es) de transportar electrones y cederlos al HCF (III), así como estudiar su funcionamiento, tal y como ha sido descrito en otros materiales como: protoplastos de raíces de maíz (Lin, 1982A), microsomas de raíces de maíz (Macri y Vianello, 1986) y raíces de maíz (Böttger y Hilgerdorf, 1988) y de avena (Rubinstein et al, 1984). Además, se hicieron experiencias con este mismo aceptor **en combinación con cis-Pt (II)** para adquirir información sobre los lugares de la cadena donde actuarían ambos compuestos.

También hicimos experiencias con otros aceptores de e^- el **hexacloroiridato IV (HCl-IV)** (Böttger y Hilgerdorf, 1988) también soluble y no permeante y el **citocromo c** (Barr et al., 1986), aceptor de e^- natural de las membranas, donde queda incluido en forma no soluble con posibilidad de tener acceso al interior. Decidimos la utilización de estos aceptores de e^- en nuestras experiencias para intentar comprobar si en nuestras raíces se encuentran también presentes estas mismas actividades redox, su funcionamiento y su posible implicación en los flujos de H^+ y K^+ .

En estas experiencias se utilizan semillas procedentes de la **remesa E**, cuyas características cinéticas de flujos simultáneos de H^+ y K^+ se recogen en la **Fig 17E**.

5.4.3.1. Efecto de la adición de 0.66 mM de hexacianoferrato (III) (HCF-III) sobre los flujos simultáneos de H^+ y K^+

En las experiencias realizadas hemos utilizado HCF (III) potásico, esto hace que al adicionar 0.66 mM de HCF (III) al medio de medida se haga innecesaria la adición de KCl al mismo, ya que aporta la concentración de K^+ requerida al inicio de la cinética (2 mM).

Antes de iniciar las experiencias con HCF (III), añadido al inicio de las mismas, hemos realizado la **calibración de la capacidad tampón** del medio con las raíces preincubadas en NaCN y HCF (III), para ver el efecto que sobre βH^+ presenta este aceptor electrónico. En el caso de βK^+ no es posible realizar la calibración, ya que adicionamos todo el K^+ al añadir el HCF (III), aunque no cabe esperar que se altere este parámetro, ya que, como se ha comprobado con el resto de aditivos, βK^+ no se ve afectado por la adición de ningún compuesto, ni tan siquiera por la adición de las raíces. El HCF (III), en la concentración utilizada, sí afecta a βH^+ ; así, tal y como puede apreciarse en la **Fig 83**, se produce una disminución de la capacidad tampón para nuevos valores de pH superiores a 6.2, respecto de la control (medio con raíces preincubadas en NaCN y sin HCF (III)). Esto hace, por

tanto, necesario para el correcto cálculo de las velocidades de eflujo neto de H^+ (VH^+) la utilización de la curva de ajuste con los valores de βH^+ en presencia de HCF (III), ya que de lo contrario las velocidades no serían las reales, sobre todo por encima de pH 6.2.

En la **Fig 84** se muestra un **experimento tipo** ($n=3$) de los flujos simultáneos de H^+ y K^+ en presencia de 0.66 mM de HCF (III) (**A**), en comparación con el control (**B**). Como puede observarse, la acidificación del medio (**pH, inserta**) en presencia de 0.66 mM HCF (III) es más lenta que en el control, lo que hace que las velocidades de eflujo neto de H^+ sean menores (aunque en el cálculo de VH^+ ya está corregida la mayor capacidad tampón), manifestándose claramente inferiores desde los 45 min, y manteniéndose esta situación hasta los 135 min en que se iguala con la control e incluso la supera levemente. En cuanto a la variación simultánea de **pK**, se observa un aumento en el **periodo de retardo, lag**, en el inicio del influjo de K^+ frente al eflujo de H^+ . Así, mientras las raíces con HCF (III) necesitan 60 min para iniciar la absorción neta de K^+ la control tiene este periodo reducido a 30 min. También en el caso del K^+ se observa una ralentización en los cambios de pK (**Fig 84, inserta**), sobre todo a partir de los 240 min. De la comparación de las **velocidades netas de eflujo de H^+ (VH^+) e influjo de K^+ (VK^+)** cabe destacar el hecho de que el menor eflujo de H^+ producido hasta los 185 min hace que el ΔpH creado sea menor, y sería la causa de que las velocidades de influjo neto de K^+ también sean menores, estabilizándose finalmente a valores muy inferiores al control. El mayor periodo de retardo que presenta el influjo de K^+ en presencia de HCF (III) estaría también en relación con esta menor capacidad de las raíces para establecer el ΔpH necesario para que se inicie el flujo de K^+ . En consecuencia, nuestros datos parecen indicar un efecto del HCF (III) sobre el eflujo de H^+ anterior en el tiempo al que se produce sobre el influjo de K^+ , ya que se observa cómo el lag del influjo de K^+ aumenta (se retrasa su inicio).

Para mejor observar los efectos del HCF (III) sobre la **velocidad de eflujo neto de H^+ (VH^+)**, se incluye la **Fig 85A**, en la que se representan los **valores medios** ($n=3$) de VH^+ en presencia y ausencia del efector. La presencia de HCF (III) en el medio reduce la velocidad máxima de eflujo neto de H^+ , obteniéndose una velocidad de ≈ 1.5 nmol H^+ /h. mg p. fr., frente a ≈ 1.90 nmol H^+ /h. mg p. fr. de las raíces control. Además, se produce una ampliación del intervalo de pH óptimos (se amplía la meseta de velocidades máximas) y el **pH final** de equilibrio alcanzado al final de la cinética es similar. Como consecuencia de la ampliación de la meseta de VH^+_{max} , a partir de 135 min del inicio de la cinética las raíces con HCF (III) muestran velocidades de eflujo neto de H^+ superiores a las control (p.e.: a los 165 min, $VH^+=0.70$ nmol H^+ /h. mg p. fr. con HCF (III) frente a 0.5 nmol H^+ /h. mg p. fr. de las control), manteniéndose ligeramente por encima hasta el final de la misma. Esta cinética de VH^+ en presencia de HCF (III) se asemeja a la descrita para la forma reducida (HCF-II), ya discutida en el apartado de donadores de e^- , y es la causa de que el **influjo neto total (JH^+ , Fig 86)** se mantenga prácticamente igual que en el control, pese a que la VH^+_{max} es sensiblemente inferior en presencia de HCF (III), como hemos descrito.

Como indicábamos para la forma reducida, el HCF (III) parece aceptar e^- de una cadena redox diferente a la normal, ya que se altera la cinética normal de eflujo de H^+ , cambiando importantes parámetros de dicha cinética.

El efecto provocado por el HCF (III) sobre la extrusión de H^+ en nuestras experiencias es similar al observado en raíces de maíz por Böttger y Hilgendorf (1988). Ellos interpretan que el HCF (III) podría inhibir por un lado la H^+ -ATPasa y por otro lado estimular algún otro sistema de eflujo de H^+ asociado a la cadena redox. Sin embargo, si el HCF (III) activara la cadena redox normal del plasmalema (actuando como aceptor de electrones) cabría esperar que se produjera una estimulación del eflujo de H^+ llevado a cabo por la misma (Bown y Crawford, 1986, entre otros) o por activación de la H^+ -ATPasa (Marré et al, 1988, entre otros). Por el contrario, si el HCF (III) aceptara e^- de una cadena redox alternativa, que no participara directamente en la extrusión de H^+ , podría explicarse que VH^+_{max} fuera menor en presencia del aceptor, ya que se están drenando e^- que dejan de estar acoplados a la extrusión de H^+ , pero a la vez se mantiene más tiempo el potencial de membrana adecuado para mantener un eflujo sostenido por la H^+ -ATPasa, por lo que la meseta de VH^+_{max} se amplía. Todo esto podría explicar los datos obtenidos en nuestras experiencias, en los que por un lado hay un efecto inhibitor del eflujo de H^+ , no alcanzándose los valores máximos de VH^+ de las control) y por otro lado hay una ampliación de la meseta de VH^+_{max} (reflejada en los valores de VH^+ más altos a partir de los 150 min).

El efecto que el HCF (III) muestra sobre la **velocidad de influjo neto de K^+ (VK^+)** se ha estudiado, como con los efectores anteriores, comparando su variación respecto al tiempo con y sin 0.66 mM HCF (III) (**Fig 85B**). Como vemos, excepto por el lag, los valores de VK^+ son semejantes con y sin HCF (III) hasta los 200 min; a partir de este momento VK^+ sigue aumentando en los controles, mientras que en presencia de HCF (III) las velocidades se mantienen prácticamente constantes, e incluso muestran una disminución a partir del minuto 240, como pone de manifiesto el que a los 360 min las velocidades sean 2.3 nmol K^+ /h. mg p. fr. y 1.5 nmol K^+ /h. mg p. fr., sin y con HCF (III), respectivamente. Estos resultados indican un efecto inhibitor del HCF (III) sobre el influjo de K^+ , cuya iniciación retrasa (aumenta el lag) y además disminuye la VK^+ máxima, aunque lo hace a tiempos largos (superiores a 200 min); al final de la cinética resulta un **influjo neto total de K^+ (JK^+)** mucho menor que en el control (17530.6 nmol de K^+ frente a 12873.1 nmol de K^+) (**Fig 86**).

El efecto del HCF (III) sobre el influjo de K^+ es similar al descrito por otros autores como Rubinstein y Stern (1986) y Kochian y Lucas (1985, 1991), quienes sugieren que la inhibición provocada sobre el influjo de K^+ podría ser debida, además de a una alteración del potencial de membrana, a la posible oxidación de algún componente del transportador involucrado en el influjo de este ión (canales K^+_{in} a las concentraciones de K^+ (2 mM) empleadas en estas experiencias). Para otros autores como Grabov y Böttger (1994) el

HCF (III) actuaría también modulando los canales de K^+ , lo que modificaría el flujo del ión. También se ha descrito incluso un eflujo neto de K^+ provocado por el HCF (III) (Marré et al., 1988; Ivankina y Novack, 1988, entre otros), lo que atribuyen a la alteración del potencial de membrana o a modificaciones de la resistencia de la membrana. Nuestra opinión es que la presencia de HCF (III) provocaría, según la hipótesis anteriormente propuesta, un drenaje de e^- por una cadena redox alternativa a la normal, lo que estabilizaría el potencial de membrana a valores ligeramente más despolarizados (sobre todo por su efecto sobre la extrusión de H^+), y ello haría que existieran menos canales K^+ abiertos y con ello menor influjo de K^+ .

En cuanto a que, como afirman Lüthen y Böttger (1988), el posible efecto tóxico del HCF (III), producido por la liberación de iones CN^- e iones Fe , fuera el responsable de los efectos del HCF (III) sobre los flujos de H^+ y K^+ , en las experiencias con HCF (II) (el mismo compuesto pero en su forma reducida) descritasen el Apto 5.4.1.2., puede observarse que los resultados sobre los flujos de H^+ y K^+ de la forma oxidada y reducida del HCF son opuestos. Si estos efectos se debieran a los iones liberados, los efectos serían semejantes, ya que ambos liberan iones en igual cantidad. Los efectos contrarios de una y otra forma son congruentes con una función contraria también: el compuesto en forma reducida cede e^- a la cadena y en su forma oxidada los acepta, y los efectos sobre los flujos de H^+ y K^+ son congruentemente opuestos. Por tanto, parece que la posible liberación de iones Fe o CN^- o no se produce o no afecta a los sistemas de transporte estudiados, por los que los efectos del HCF (II) y HCF (III) no pueden ser achacados a la toxicidad de dichos iones.

Paralelamente a la cinética de flujos, medimos la **reducción del HCF (III)**, cómo disminución de la **Absorbancia (A₄₁₅₋₄₈₀)** del medio (Apto 2.7, Materiales y Métodos). En primer lugar, hemos realizado controles para asegurarnos de que la variación en la absorbancia del medio con HCF (III) se debe a la actividad de las raíces y no ocurre de forma espontánea en nuestro medio de medida, en las condiciones de nuestras experiencias. Así, hemos determinado la variación de absorbancia del medio con HCF (III) en las siguientes condiciones: **a)** medio sólo **b)** medio con raíces "in vivo", **c)** con raíces preincubadas en NaCN y **d)** en el denominado "medio de lavado" de c. Los resultados se muestran en la **Fig 87**.

a) Como puede observarse, el medio con 0.66 mM de HCF (III) no sufre cambios de absorbancia en $A_{415-480}$, indicativo de que no existe reducción espontánea del HCF (III).

b) Cuando se miden las variaciones de $A_{415-480}$ del medio con HCF (III) y raíces "in vivo" se observa una acusada disminución de la absorbancia (reducción del HCF (III)) acusada durante los primeros 40 min (en los que se reduce un 5%), y después se ralentiza hasta prácticamente cesar a los 100 min, estabilizándose a partir de este momento, en el 8% del total de HCF (II), en forma reducida. Esto nos indica, que las raíces "in vivo" son

capaces de reducir HCF (III), mientras están produciendo su efecto sobre el eflujo neto de H^+ e influjo neto de K^+ .

c) Cuando la reducción se determina en idénticas condiciones pero con raíces preincubadas en NaCN, se observa una reducción muy superior; así, la proporción de la forma reducida (HCF-II) a los 15 min es de un 13% y a los 40 min del 22% del total, posteriormente la reducción se ralentiza hasta casi estabilizarse a los 100 min, con una proporción del 29% de la forma reducida respecto al total. Como vemos, las raíces preincubadas en NaCN muestran mayor capacidad de reducción del HCF (III), aunque estas raíces son incapaces de acidificar el medio (no cambian el pH) ni absorber K^+ (tampoco cambian el pK), al estar estas funciones anuladas por efecto del NaCN (ver **Fig 16A**).

d) Para comprobar si el aumento de la reducción del HCF (III) por raíces preincubadas en NaCN es debido a una posible reacción del HCF (III) con restos de NaCN que pudieran quedar, medimos la variación de absorbancia del "medio de lavado" en el que han estado las raíces previamente incubadas en NaCN. Como puede apreciarse, (**Fig 87**) la reducción es prácticamente nula y semejante a la del medio solo (+HCF-III). Esto hace que tengamos que atribuir la reducción del HCF (III) a la actividad de las raíces preincubadas en NaCN y no a una posible reacción entre el HCF (III) y restos de NaCN, lo que podría provocar la disminución de absorbancia. Por el contrario, el porcentaje total de HCF (III) reducido por raíces "in vivo" a los 120 min (tiempo al que cesa la disminución de la absorbancia) es aproximadamente un 10%, mientras que en ese mismo tiempo, las raíces preincubadas en NaCN han reducido un 28% del HCF (III) a HCF (II). Estos resultados confirman que las raíces son las responsables de la reducción del HCF (III), puesto que cuando no están presentes en el medio no ocurre disminución alguna de la absorbancia.

La actividad reductora de HCF (III) de las raíces ha sido ya descrita para raíces intactas de maíz (Federico y Giantosio, 1983), judía (Bienfait et al., 1983; Sijmons y Bienfait, 1983) y avena (Rubinstein et al., 1984). Los resultados obtenidos son semejantes a los nuestros, mostrando que la preincubación de las raíces en NaCN (que provoca la anulación de los flujos de H^+ y K^+) hace que la reducción del HCF (III) no sólo no se vea disminuida, sino que, por el contrario aumente respecto a la reducción provocada por las raíces "in vivo". Así, un efecto similar al nuestro, incluso en magnitud, ha sido ya descrito por Barr et al. (1986), quienes en vesículas de plasmalema de hipocotilos de haba observan un incremento del 20% en la reducción del HCF (III) como consecuencia del tratamiento con CN^- (en nuestras raíces esta reducción es del $\approx 18\%$). Por el contrario, Gautier et al. (1992) en protoplastos de células de guarda de *Commelina communis* L., obtienen como resultado de la adición de CN^- , la disminución de la reducción del HCF (III) lo que hablaría de que la(s) cadena(s) redox pueden ser diferentes en diferentes tipos de células.

Los resultados obtenidos por nosotros y otros investigadores con raíces indican que la actividad de la **cadena redox involucrada en la reducción del HCF (III)** es

insensible al CN^- , y continúa funcionando más eficazmente aunque se anulen tanto el transporte de H^+ como el de K^+ , aunque aparentemente sólo se produce transporte de electrones.

La hipótesis que proponemos es que en el plasmalema de las células de nuestras raíces existiría, tal y como se ha comprobado en las membranas mitocondriales, dos tipos de cadena redox, con dos oxidasas terminales diferentes: una cadena redox cuyo sustrato natural sería el NAD(P)H endógeno y el NADH exógeno, que intervendría directamente en el eflujo de H^+ con canales propios, funcionaría acoplando el transporte de e^- al de H^+ , y cuya oxidasa terminal sería sensible a la inhibición por NaCN. Además de ésta, existiría otra cadena redox alternativa que sólo transportaría e^- , y cuya oxidasa terminal sería insensible al CN^- . Ambas vías competirían por los e^- según las condiciones de la membrana. Proponemos que el HCF (III) aceptaría e^- de la vía alternativa, por lo que su presencia aumentaría el drenaje de e^- desde la otra vía, funcionando en configuración "trans" (e^- del NAD(P)H endógeno al HCF (III) exógeno atravesando la membrana). Puesto que la vía alternativa no transporta H^+ , el eflujo de H^+ disminuiría (no se anularía por la actuación de la H^+ -ATPasa) y también el influjo de K^+ dependiente de él, como hemos visto. En las raíces envenenadas con CN^- todos los e^- circularían por la vía alternativa, por lo que la reducción del HCF (III) sería mayor, mientras que los flujos iónicos serían totalmente nulos.

Otros resultados que apoyan la hipótesis que proponemos son los de Rubinstein et al. (1984) y Thom y Maretzki (1985), que han observado una inhibición de la oxidación del NADH por CN^- en raíces de avena y protoplastos de caña de azúcar respectivamente, mientras Barr et al. (1986) observan un aumento en la reducción del HCF (III) al ser añadido sólo y aún más en presencia de CN^- .

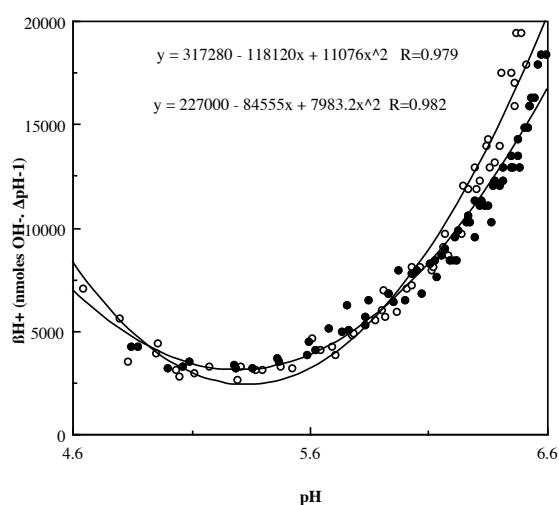


Fig 83: Capacidad tampón para H^+ (βH^+) del medio con 175 raíces preincubadas en NaCN sin (○) y con (●) 0.66 mM de HCF (III).

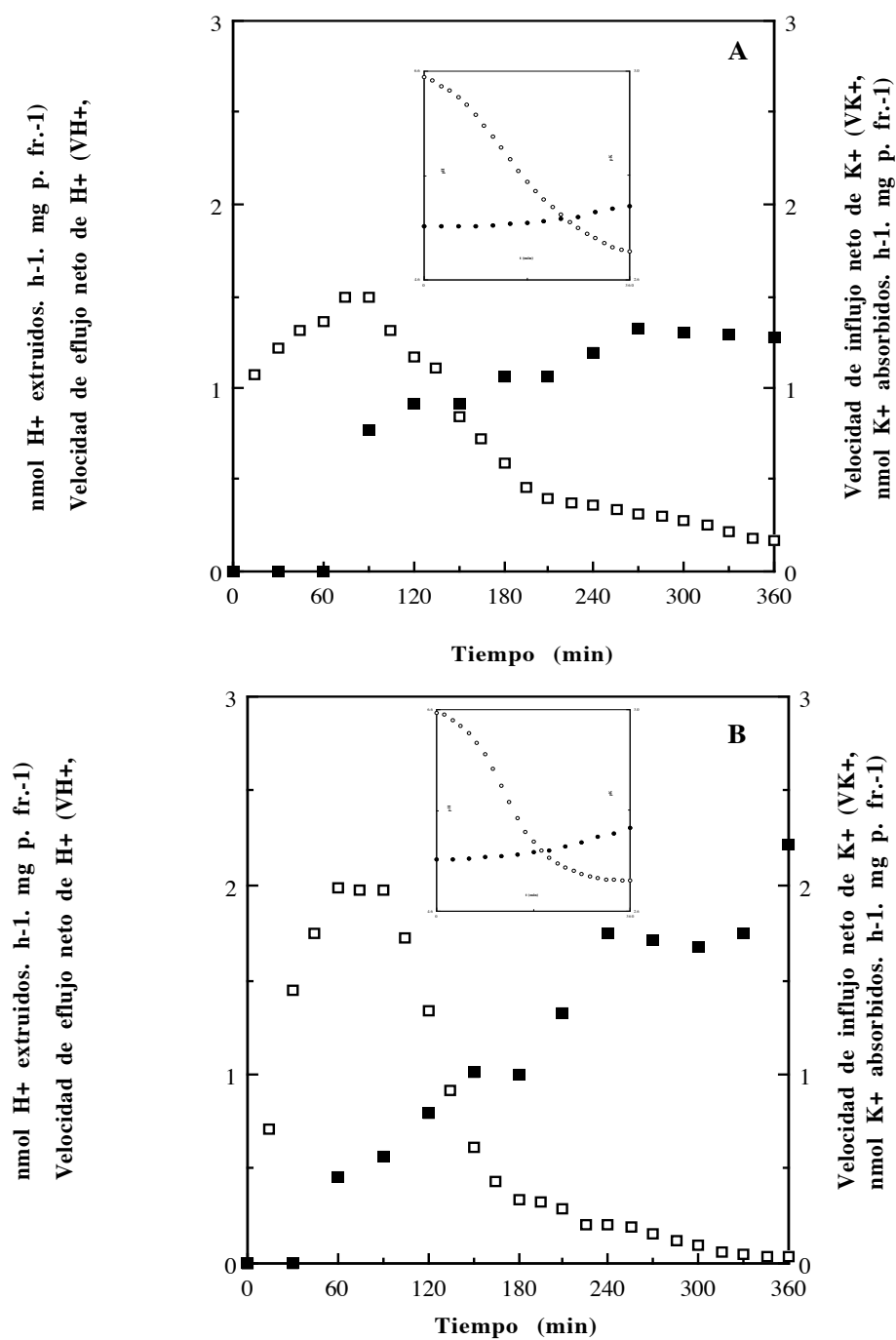


Fig 84: Velocidades netas de eflujo de H⁺ (□) e influjo de K⁺ (■) por las raíces, medidas simultáneamente, (A) con y (B) sin 0.66 mM de HCF (III) adicionado al inicio de la cinética. **Insertas,** los datos directos de variación de pH (○) y pK (●) del medio. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo (n≥3 variaciones ≤5% para VH⁺ y entre 5 y 10% para VK⁺).

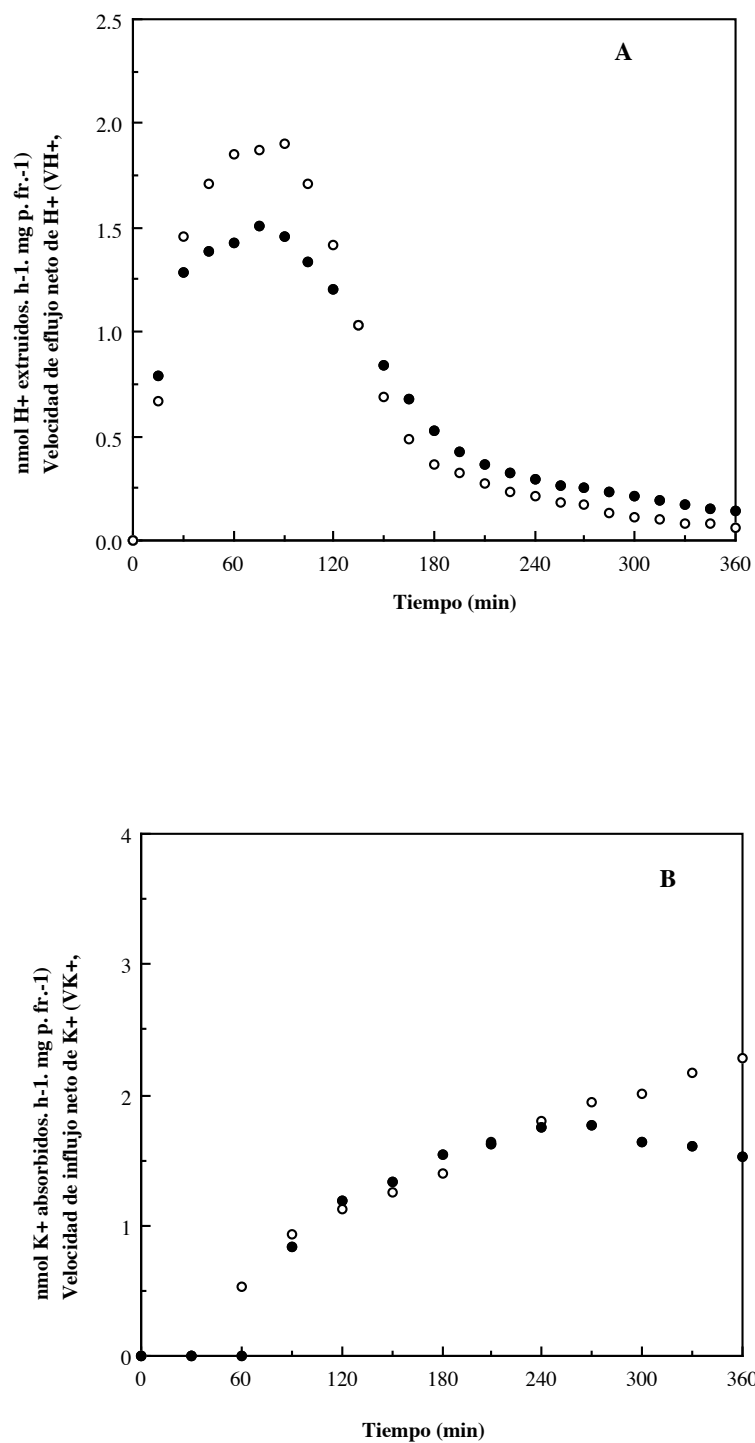


Fig 85: Variación de la velocidad (A) de eflujo neto de H⁺ (VH⁺) y (B) de influjo neto de K⁺ por las raíces sin (○) y con 0.66mM de HCF (III) (●) adicionado al inicio de la cinética. Los datos son media de, al menos tres repeticiones (desviación ≤5% en VH⁺ y entre 5 y 10% en VK⁺).

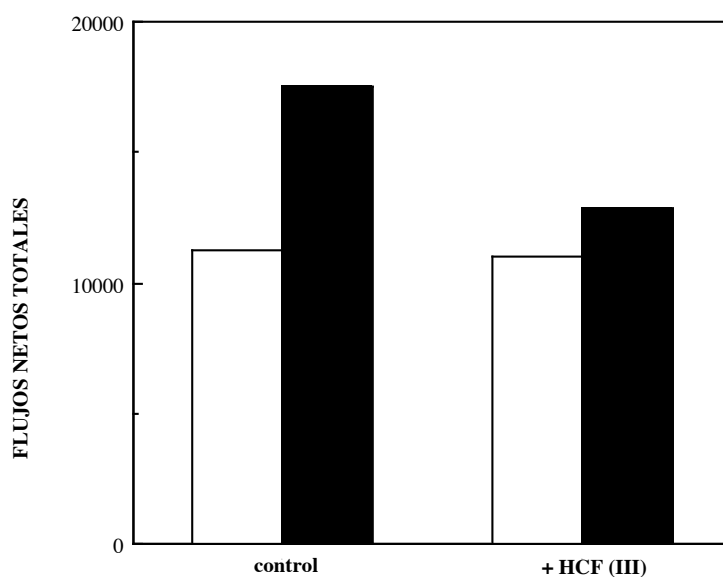


Fig 86: Flujo neto total de H⁺ (H⁺, hueco) y K⁺ (K⁺, relleno) como nmol totales de ión extruidos (H⁺) o absorbidos (K⁺) por las raíces cuando acaban los experimentos, al final de la cinética, con y sin HCF (III). Los datos están calculados a partir de la media de 3 experimentos independientes.

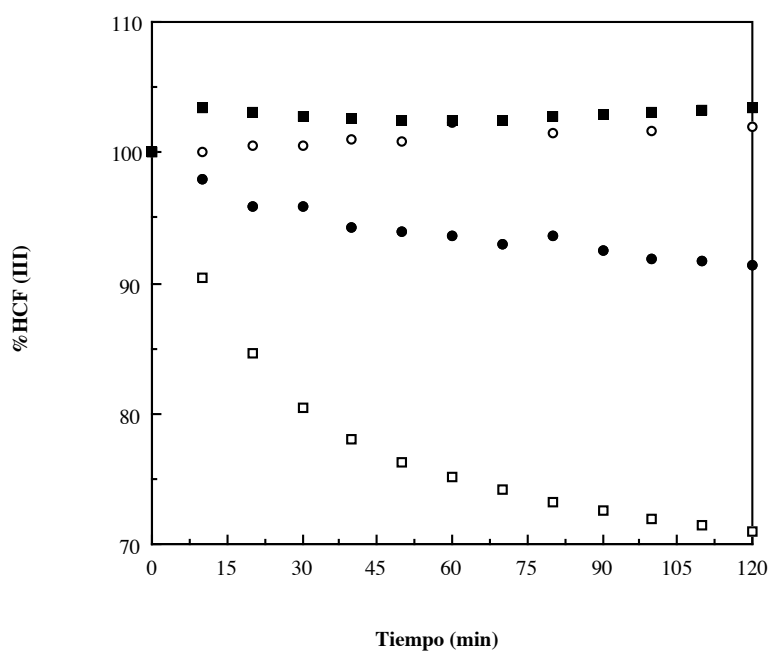


Fig 87: Reducción de HCF (III) potásico en medio solo (○), con raíces "in vivo" (●), con raíces preincubadas en NaCN (□) y en "medio de lavado" (■). Cada punto es media de al menos 3 experimentos. (Desviación $\leq 5\%$)

5.4.3.2.- Efecto de la adición de cis-Pt (II) y HCF (III) sobre la cinética de flujos simultáneos de H⁺ y K⁺

Para estudiar el funcionamiento de la(s) cadena(s) redox, la reducción del HCF (III) y el funcionamiento de la NADH oxidorreductasa, hemos realizado experiencias en las que se adiciona 500 μM de cis-Pt (II) (inhibidor de la NADH oxidorreductasa, apartado 5.4.2. de este capítulo) junto con HCF (III), así como el efecto que se produce sobre los flujos de H⁺ y K⁺. Las medidas se realizaron en presencia de 0.66 mM de HCF (III), sin NADH (donador de electrones) en el medio, con y sin cis-Pt (II) añadido junto con el HCF (III) al inicio de la cinética.

La **Fig 88** muestra un **experimento representativo** (n=3) de los flujos simultáneos de H⁺ y K⁺ en presencia de 0.66 mM de HCF (III) y 500 μM de cis-Pt (II) (**A**) desde el inicio de la cinética, en comparación con la control (**B**), en presencia de HCF (III) pero sin cis-Pt (II). Como puede observarse, la acidificación (**pH**) del medio por las raíces con HCF (III) y cis-Pt (II) es nula (**Fig 88, inserta**) no observándose cambio alguno de pH durante los 360 min de la experiencia. La variación de **pK** del medio por las raíces se ve fuertemente alterada, aunque el lag inicial no se altera. Es a partir de los 75 min cuando empieza a observarse un fuerte descenso de pK (salida de K⁺ al medio) (**Fig 88A, inserta**), que se mantiene a lo largo de toda la cinética, mostrando diferentes lóbulos homeostáticos de aceleración-deceleración de la velocidad de eflujo (VK⁺, **Fig 88A**). Este efecto hace que el pK final sea menor que el inicial (≈ 2.57 frente a 2.78 del control), es decir, se ha producido un aumento en la concentración de K⁺ en el medio, lo que indica la existencia de un fuerte eflujo neto de K⁺.

En la **Fig 89** se comparan las **velocidades de eflujo neto de H⁺ (VH⁺) e influjo neto de K⁺ (VK⁺) en valores medios** de 3 experimentos independientes frente al tiempo, en comparación con los controles. Se observa la total inhibición del eflujo neto de H⁺, no pudiendo calcularse la velocidad neta (VH⁺) al no existir cambios de pH. Este efecto pone de manifiesto el bloqueo de los sistemas de extrusión de H⁺ provocado por el cis-Pt (II). En cuanto a VK⁺ se observa cómo, una vez transcurrido el lag inicial, se producen velocidades de influjo neto de K⁺ negativas, lo que indica un eflujo neto de K⁺. Este eflujo de K⁺ queda cuantificado al calcular el **influjo neto total de K⁺ (fK⁺)** al final de la cinética, siendo de -34442.42 nmol K⁺ (es decir, eflujo) frente a 12873.07 nmol K⁺ del control (**Fig 90**).

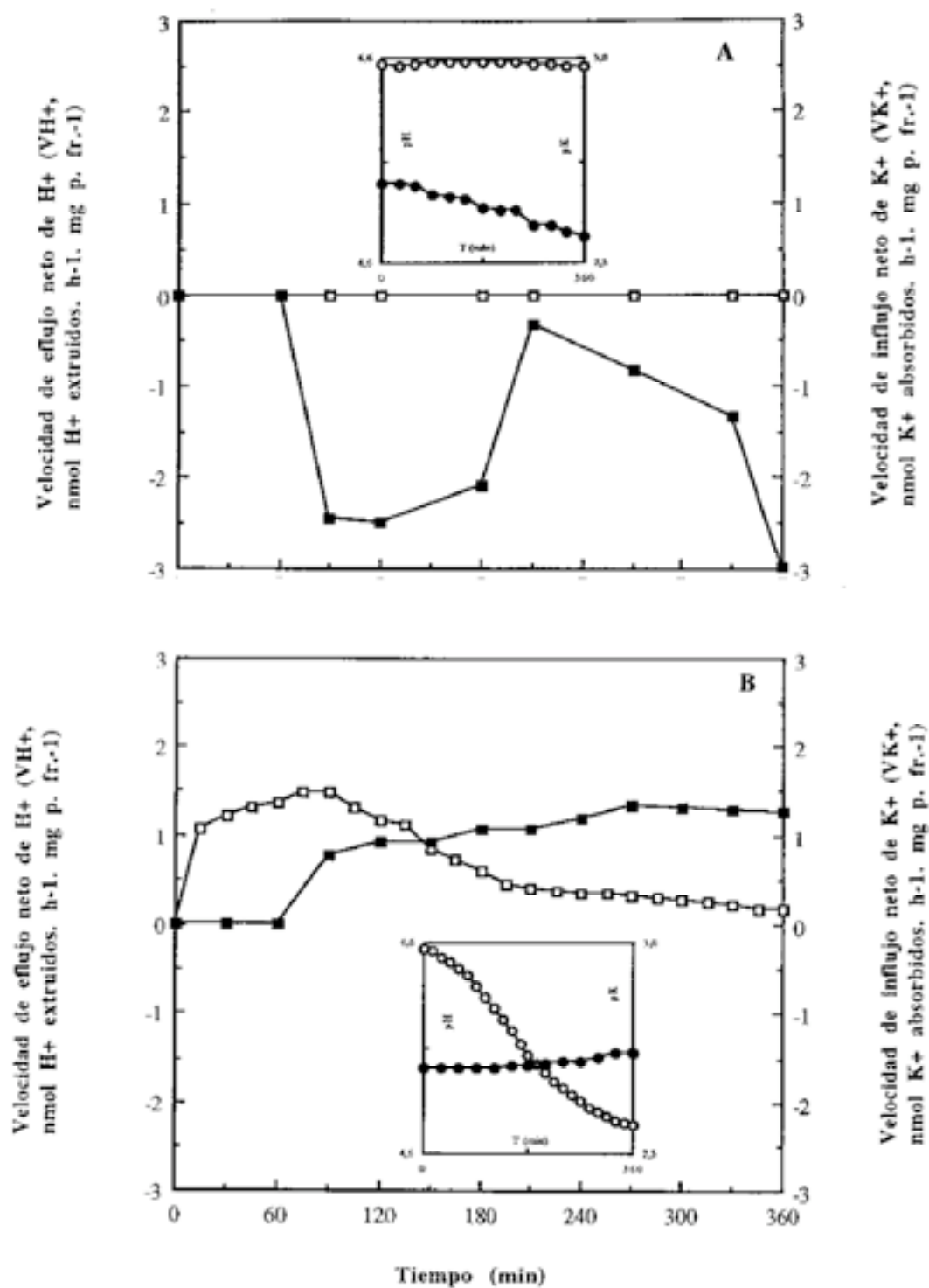


Fig 88: Velocidades netas de eflujo de H^+ (\square) e influjo de K^+ (\blacksquare) por las raíces, medidas simultáneamente con HCF (III) y (A) con y (B) sin $500 \mu\text{M}$ de cis-Pt (II) adicionados ambos al inicio de la cinética. **Insertas**, los datos directos de variación de pH (\circ) y pK (\bullet) del medio. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo ($n \geq 3$ variaciones $\leq 5\%$ para VH^+ y entre 5 y 10% para VK^+).

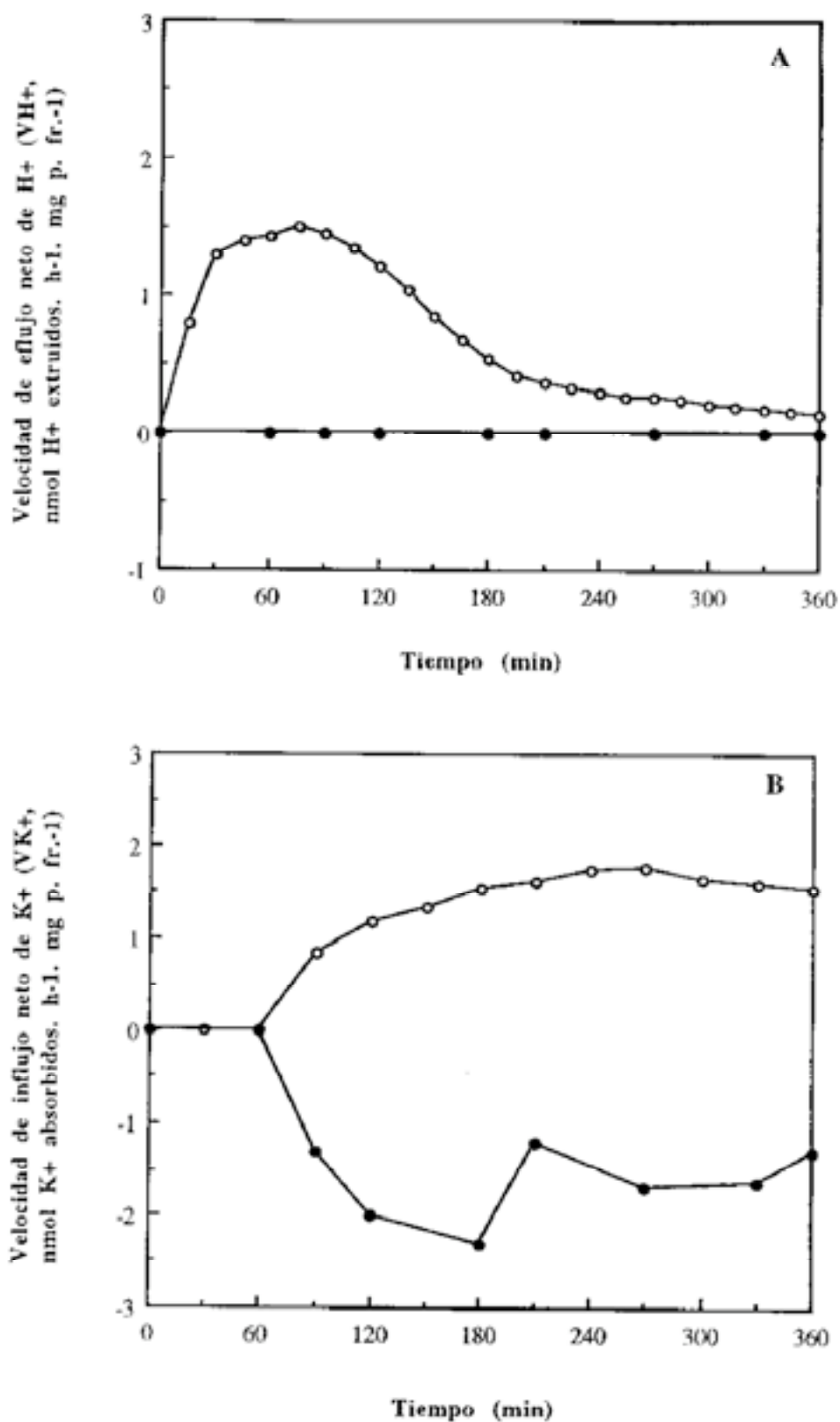


Fig 89: Variación de la velocidad (A) de eflujo neto de H⁺ (VH⁺) y (B) de influjo neto de K⁺ por las raíces con 0.66 mM de HCF (III) y sin (○) y con 500 μM de cis-Pt (II) (●) adicionados ambos al inicio de la cinética. Los datos son media de, al menos tres repeticiones (desviación ≤5% en VH⁺ y entre 5 y 10% en VK⁺).

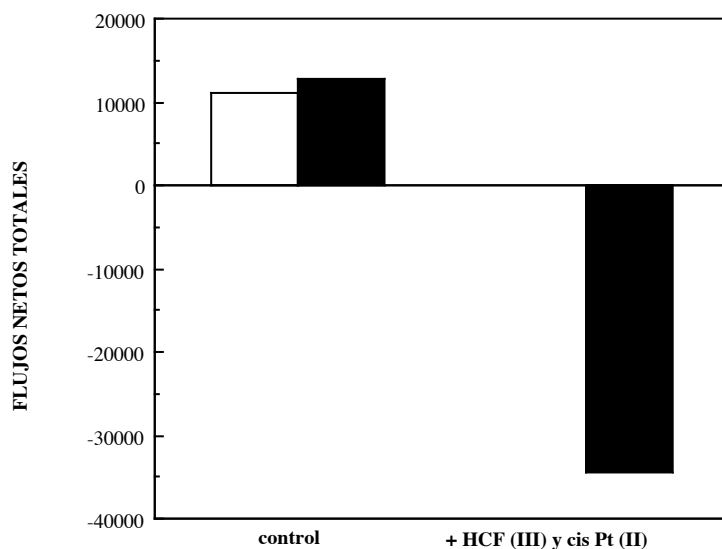


Fig 90: Flujo neto total de H⁺ (H⁺, hueco) y K⁺ (K⁺, relleno) como nmol totales de ión extruidos (H⁺) o absorbidos (K⁺) por las raíces cuando acaban los experimentos, al final de la cinética, con HCF (III) y con y sin cis-Pt (II). Los datos están calculados a partir de la media de 3 experimentos independientes.

Nuestros resultados se interpretarían como sigue: en primer lugar, se produciría la anulación de la capacidad de acidificación del medio por las raíces, ya que, si bien con HCF (III) las velocidades de eflujo neto de H⁺ eran menores, se producía acidificación e influjo neto de K⁺, y tras la adición de 500 μM cis-Pt (II) se anula toda acidificación por las raíces, que es compensada con un eflujo de K⁺.

Esto probaría de nuevo que el transporte de K⁺ se encuentra fuertemente relacionado con el de H⁺, y que al no producirse éste como consecuencia del bloqueo del mismo por el cis-Pt (II), los iones K⁺ actuarían remplazando a los H⁺ en la creación del potencial de membrana, supliendo la falta de extrusión de H⁺ con su salida, a través de canales específicos. Esta función la realizarían los recientemente descubiertos canales K⁺_{out}, que se abren por despolarización de la membrana, que es lo que ocurre cuando se corta la extrusión de H⁺, y que provocan salida de K⁺ para repolarizar dicha membrana.

La actuación del cis-Pt (II), como hemos discutido, se ha propuesto que estaría a nivel de la cadena redox y el transporte de H⁺ a ella acoplado, pero bien directa, bien indirectamente, también ha de actuar sobre la H⁺-ATPasa, ya que anula totalmente la acidificación del medio. En este sentido, Morrè et al. (1988B) han observado una inhibición del 35% aproximadamente de la actividad NADH oxidoreductasa de la cadena redox en vesículas de plasmalema tras la adición de cis-Pt (II); además, el crecimiento por elongación de los hipocotilos se inhibía en más de un 50%, lo que podía ser indicativo de una actuación del

cis-Pt (II) también sobre otros sistemas de eflujo de H^+ (H^+ -ATPasa) relacionados con el crecimiento. Nuestros datos apoyarían esta última hipótesis: el cis-Pt (II) inhibiría tanto el transporte de H^+ por la cadena redox como por la H^+ -ATPasa, siendo el efecto sobre el transporte de K^+ indirecto, a través de la alteración del potencial de membrana.

Paralelamente al efecto sobre los flujos iónicos, estudiamos el efecto del cis-Pt (II) sobre la **reducción de HCF (III)**, en las siguientes condiciones (**Fig 91**): **A**) medio solo, **B**) raíces "in vivo" y **C**) raíces preincubadas en NaCN, comparándose cada caso con su correspondiente control, con HCF (III) pero sin cis-Pt (II).

En los dos primeros casos (**A** y **B**) no se observan diferencias en la reducción del HCF (III) por el tratamiento con cis-Pt (II); sin embargo, en el caso de las raíces preincubadas en NaCN (**C**) se observa una ligera disminución en la reducción de HCF (III) por la presencia de cis-Pt (II) en el medio (aproximadamente del 7%); esta menor reducción es patente a partir de los 30 min. El nulo efecto del cis-Pt (II) sobre la reducción del HCF (III) por las raíces "in vivo" parece implicar que el cis-Pt (II) no anula el flujo de e^- por la vía alternativa, pero tampoco aumenta dicho flujo por esta vía, como ocurría con el NaCN. Así, la vía alternativa no sería sensible al cis-Pt (II) cuando funciona a baja velocidad, en condiciones normales. La pequeña disminución de la reducción de HCF (III) por las raíces envenenadas con NaCN en presencia de cis-Pt (II) podría deberse a un efecto de éste sobre algún intermediario de la cadena alternativa, que en estas condiciones podría ser más sensible al estar funcionando más rápidamente por el bloqueo de la vía normal.

En conclusión, estos datos parecen indicar que, el HCF (III) es reducido por acción de la cadena redox alternativa del plasmalema, y el cis-Pt (II) no afectaría el funcionamiento de esta cadena, al menos mientras funciona a niveles normales. En presencia de CN^- , en que esta cadena alternativa está muy activada por bloqueo de la otra vía, sensible al CN^- , se observa una pequeña inhibición por cis-Pt (II) de la vía alternativa. El cis-Pt (II) sí que afecta al eflujo de H^+ , tanto el producido por la cadena redox como por la H^+ -ATPasa, lo que provoca una fuerte despolarización del potencial de membrana que afecta al transporte de K^+ , que saldría al exterior para intentar equilibrar las cargas y restablecer los potenciales de membrana a niveles cercanos a la normalidad.

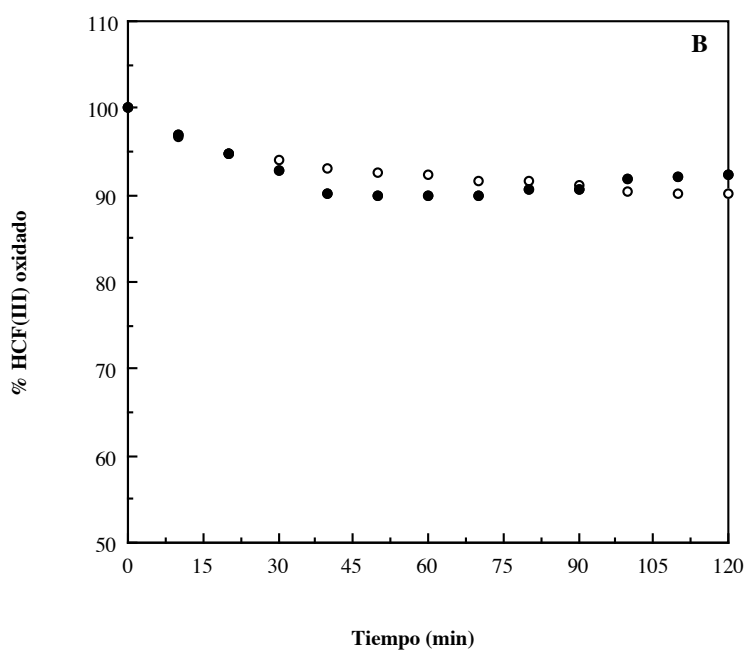
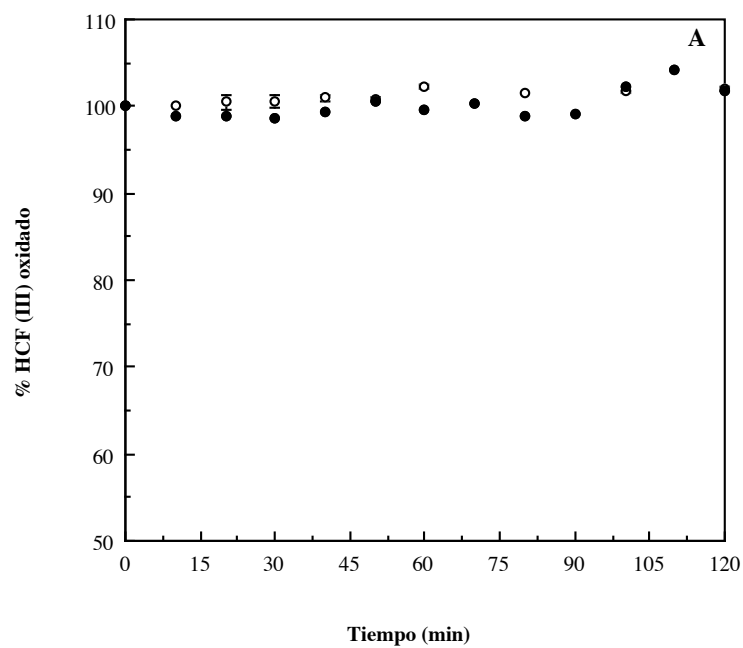


Fig 91: Reducción del HCF (III) potásico, (A) en medio solo, (B) con raíces "in vivo" y (C) con raíces preincubadas en NaCN, sin (○) y con (●) 500 μ M de cis-Pt. Cada caso es media de al menos 3 experimentos independientes (Desviación $\leq 5\%$).

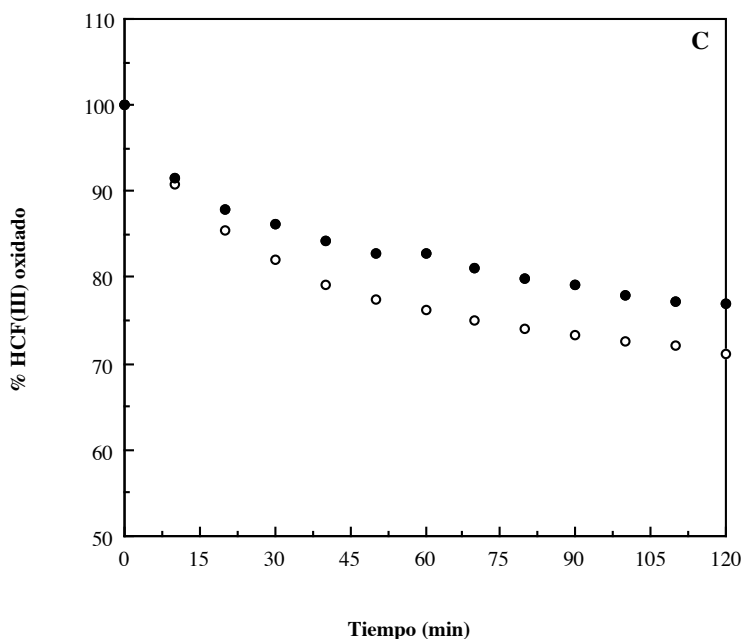


Fig 91: Continuación.

5.4.3.3.- Efecto de la adición de 100 μM de hexacloroiridato IV (HCl-IV) sobre el flujo de K^+

El HCl (IV) es más idóneo que el HCF (III) para el estudio de la capacidad reductora de la cadena redox, al ser un compuesto menos tóxico, mientras que su reducción está controlada por la misma cadena que la transferencia de electrones al HCF (III) (Lüthen y Böttger, 1988; Lüthje y Böttger, 1989; Döring et al., 1992).

En primer lugar tratamos de realizar la determinación de la capacidad tampón (βH^+) del medio con HCl (IV); sin embargo, esta calibración no pudo realizarse debido a que, como veremos con detalle más adelante, la sola presencia del electrodo de pH, en ausencia de raíces, provocaba la reducción del HCl (IV), lo que hacía imposible la utilización de este aceptor en el estudio de los efectos sobre el eflujo neto de H^+ . Por ello, con este compuesto sólo realizamos medidas de transporte de K^+ , con solamente el electrodo específico y el correspondiente de referencia en el medio. La **capacidad tampón** para K^+ (βK^+) del medio con raíces preincubadas en NaCN, a las que se añade 100 μM de HCl (IV) (en la cinética "in vivo" se adiciona a los 105 min del inicio de la cinética) no se ve alterada, tal y como se comprueba en la **Fig 92**, en la que se muestra la capacidad tampón (βK^+) de las raíces sin y con HCl (IV).

En la **Fig 93 (inserta)** se muestra el efecto que 100 μM de HCl (IV) provocan en la variación de **pK** del medio por las raíces. La adición de HCl (IV) provoca un rápido descenso en el pK del medio, produciéndose un fuerte eflujo neto. El descenso de pK se produce 15 min después de la adición de HCl (IV) al medio, alcanzando un valor mínimo

de 2.64 (el pK en el momento de la adición era 2.69); posteriormente, y de manera más lenta, se restablece de nuevo el influjo neto de K^+ haciendo que el pK aumente ligeramente. Al final de la cinética el tratamiento con HCl (IV) ha reducido el **pK final** (2.65 frente a 2.83 del control).

Este efecto sobre el flujo de K^+ se manifiesta más drásticamente en los valores de **velocidad de influjo neto de K^+ (VK^+ , Fig 93)**. Al añadir el HCl (IV) (a los 105 min del inicio de la cinética), se produce un rápido eflujo neto de K^+ (lo que se manifiesta como VK^+ negativa, con un valor mínimo de hasta -6 nmol K^+ /h. mg p. fr.). El efecto es transitorio, ya que tras este periodo de rápido eflujo, a partir del minuto 150, se reinicia el influjo y/o disminuye el eflujo, lo que se manifiesta en una disminución de las velocidades negativas. A partir de los 240 min se empiezan a obtener valores de influjo neto, recuperando VK^+ los valores normales para estos tiempos.

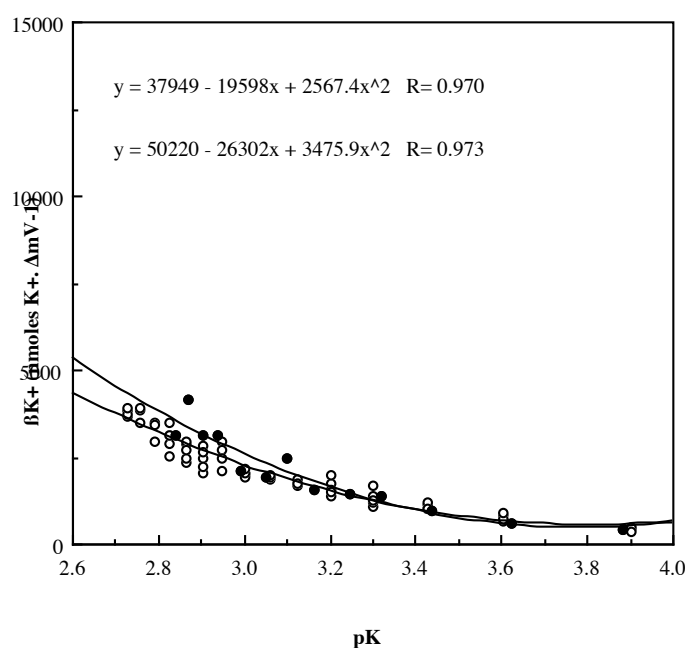


Fig 92: Capacidad tampón para K^+ (βK^+) del medio con 175 raíces preincubadas en NaCN sin (○) y con (●) $100 \mu M$ de HCl (IV).

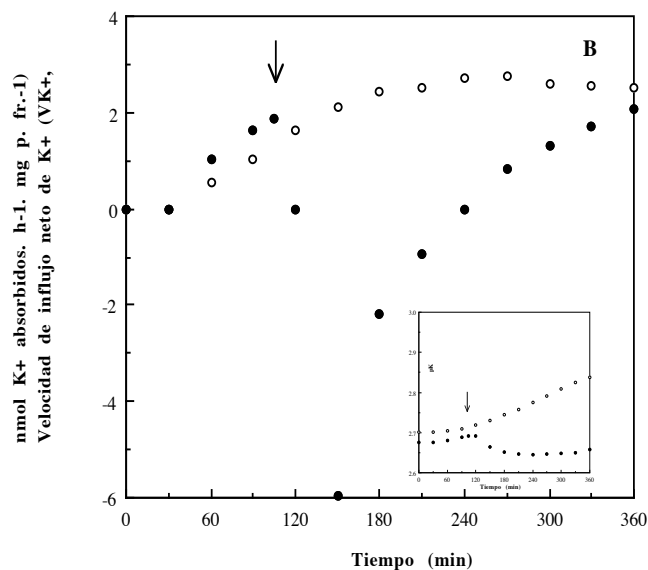


Fig 93: Variación de la velocidad de influjo neto de K^+ (VK^+) por las raíces sin (○) y con (●) $100 \mu M$ de HCl (IV) adicionado en el momento señalado por la flecha. **Inserta** los datos directos de variación de pK. Los datos son media de, al menos tres experimentos independientes (Desviación entre el 5 y 10%).

Paralelamente, se ha determinado la **reducción del HCl (IV)** espectro-fotométricamente ($A_{488-700}$). En primer lugar observamos que, al añadir $100 \mu M$ de HCl (IV) al medio de medida, comienza a reducirse espontáneamente, de manera que hemos realizado controles de esta reducción previos a las experiencias con raíces. Por tanto, la reducción del medio con $100 \mu M$ de HCl (IV) se midió en las siguientes condiciones **a**) sin electrodos en el medio, **b**) con el electrodo selectivo de K^+ (y su electrodo de referencia), **c**) con electrodo de pH no combinado (y su electrodo de referencia) y **d**) con electrodo de pH combinado. Los resultados se muestran en la **Fig 94**, en la que se observa cómo en todos los casos, pero sobre todo en presencia de los electrodos de pH, se produce una fuerte reducción del HCl (IV). La reducción con los dos tipos de electrodo de pH usados es muy rápida, siendo a los 10 min prácticamente total en presencia del electrodo de pH no combinado. Este resultado hacía imposible medir el efecto del HCl (IV) sobre los flujos de H^+ , ya que el aceptor era rápidamente reducido por el electrodo y no estaba disponible para los sistemas redox de las raíces. Cuando se usa el electrodo selectivo de K^+ también se produce una reducción del compuesto pero mucho menor y más lenta que con los electrodos de pH, por lo que se podía trabajar con él siempre que se tuviera en cuenta la reducción por el electrodo, tomándola como control. También se ha detectado reducción de HCl (IV) espontánea, sin ningún electrodo en el medio.

En la **Fig 95** se muestra la reducción del HCl (IV) por las raíces "in vivo" y las raíces preincubadas en NaCN, en comparación con la que se producía en el medio solo, por la

presencia del electrodo de K^+ . La reducción es mucho más rápida y acusada con raíces que sin ellas, aunque no se observan diferencias entre las raíces "in vivo" y las preincubadas en NaCN. Nuevamente, y al igual que sucede con otros aceptores artificiales, observamos que la reducción del HCl (IV) es insensible al CN^- , lo que de nuevo nos indica que la cadena redox implicada en este proceso de transferencia de electrones es una vía alternativa insensible al CN^- . Nótese que los tiempos coinciden con los momentos de máximo efecto sobre el flujo de K^+ : reducción del HCl (IV) con máximo eflujo de K^+ y ausencia de la forma oxidada tras su práctica reducción total con el inicio de la recuperación del influjo de K^+ .

En **conclusión**, parece que este aceptor de electrones se reduce rápidamente, provocando un fuerte eflujo de K^+ (probablemente por alteración del potencial de membrana, que sufriría una rápida despolarización), para posteriormente recuperar el influjo. La despolarización y el eflujo de K^+ han sido descritos por otros autores, en otros materiales y utilizando diferentes aceptores de electrones. Así, Marré et al. (1988) en hoja de Elodea con HCF (III), González- Reyes et al. (1992) en células de raíz de cebolla con radicales libres de Ascorbato, Ivankina y Novak (1988) en diferentes especies vegetales con HCF (III). Sijmons et al. (1984A) indican que el reajuste de la diferencia de potencial de la membrana creada por los aceptores externos de e^- ocurriría a través de la estimulación del eflujo de K^+ , lo que explicaría el efecto producido por el HCl (IV) sobre los sistemas de transporte de K^+ de nuestras raíces.

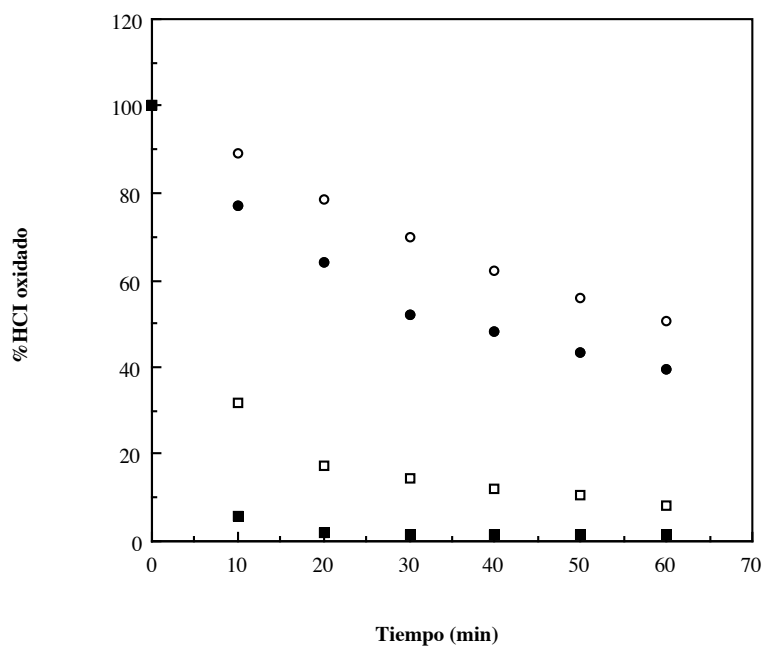


Fig 94: Reducción de HCl (IV) en el medio solo sin ningún electrodo (○), con electrodo selectivo de K^+ (●), con electrodo de pH no combinado (□) y con electrodo de pH combinado (■). Estos datos son medias de 3 experimentos (Desviación $\leq 5\%$).

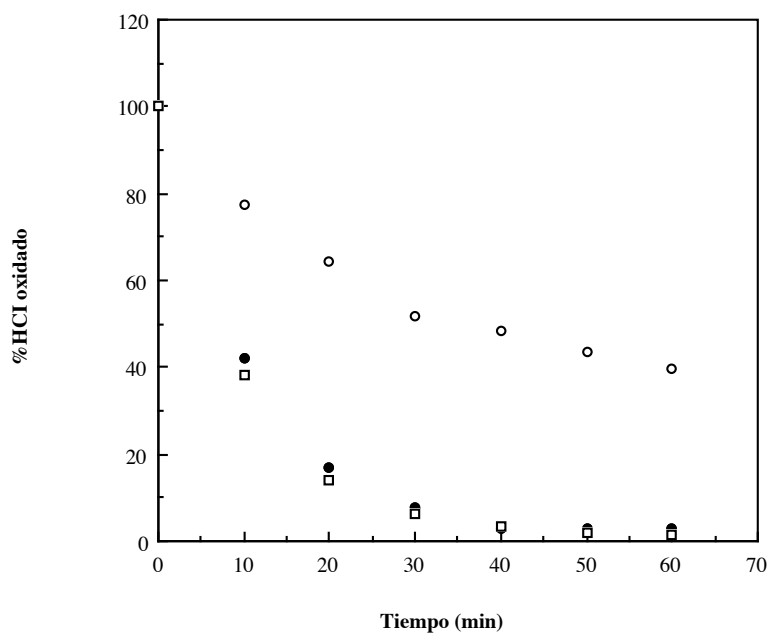


Fig 95: Reducción de HCl (IV) en el medio solo (○), con raíces "in vivo" (●) y con raíces preincubadas en NaCN (□). Estos datos son media de, al menos, 3 experimentos (Desviación $\leq 5\%$).

5.4.3.4.- Efecto de la adición de 100 μM de citocromo c sobre la cinética de flujos simultáneos de H^+ y K^+

El citocromo c es un componente natural de cadenas redox de membranas biológicas, habiéndose descrito como aceptor de electrones procedentes de la actividad de la cadena redox del plasmalema en hipocotilos de soja (Barr et al., 1986); ello nos indujo a utilizarlo en nuestras experiencias, pensando que sería un buen candidato para estimular el flujo por la cadena redox sensible al NaCN. Además, su capacidad para integrarse en las membranas nos daba la posibilidad de estudiar el funcionamiento de la cadena en que se integra en configuración "cis" (e^- del NAD(P)H endógeno al citocromo c al menos parcialmente endógeno, con menor salida de e^-).

El citocromo c se añadió a concentración 100 μM y al inicio de la cinética. Como en casos anteriores, se ha determinado su efecto sobre los flujos simultáneos de H^+ y K^+ , así como su reducción (determinada espectrofotométricamente, $A_{550-600}$ -Askerlund y Larsson, 1991-).

En la **Fig 96A** se muestra la **capacidad tampón** del medio con raíces preincubadas en NaCN, sin y con 100 μM de citocromo c. Como vemos, el citocromo c provoca un aumento en la tamponación del medio para los H^+ (**BH⁺**), lo que hace necesario el ajuste de una nueva ecuación a esta capacidad tampón y su posterior utilización para el cálculo de las velocidades de eflujo neto de H^+ (**VH⁺**) cuando se realizan experimentos con este compuesto. La capacidad tampón para K^+ (**BK⁺**) no varía por la adición de 100 μM de citocromo c.

En la **Fig 97** se muestra un **experimento representativo** ($n=3$) de los flujos simultáneos de H^+ y K^+ en presencia de 100 μM de citocromo c (**A**), comparándose con el control (**B**). La presencia de citocromo c en el medio hace que la acidificación del medio (**pH**) sea más uniforme y lenta que el control (no describiendo una curva sigmoideal tan acusada). También el **pH final** de equilibrio es menos ácido (**Fig 97A, inserta**); 5.150 frente a 4.90 de la control. En el cálculo de **VH⁺** se corrige el efecto de la capacidad tampón del medio, observándose que la **velocidad máxima de eflujo neto de H⁺ (VH⁺)** no llega a alcanzar el valor máximo del control (≈ 2 nmol H^+ /h. mg p. fr. frente a ≈ 1.25 nmol H^+ /h. mg p. fr. respectivamente). Simultáneamente el **pK** presenta un lag inicial semejante al del control, para a continuación mostrar un influjo de K^+ muy superior a los controles. Esto se observa en la mayor variación del pK del medio: mientras el control alcanza un **pK final** de 2.78, con citocromo c el pK llega a 2.84. También la **velocidad de influjo neto de K⁺ (VK⁺)** es mayor, prácticamente desde el principio de la cinética. Comparando ambas velocidades de flujos iónicos (**VH⁺** y **VK⁺**) se observa que cuando se alcanza la meseta de **VH⁺** máximas comienza el mayor influjo de K^+ , manteniéndose altas **VK⁺** durante más tiempo, como consecuencia también de la mayor duración de la meseta de **VH⁺** máximas.

En la **Fig 98A**, se puede comparar mucho mejor las **velocidades de eflujo neto de H⁺ (VH⁺)** sin y con 100 μM de citocromo c, representándose los **valores medios** ($n=3$)

frente al tiempo. En primer lugar cabe destacar que los valores de VH^+ son claramente diferentes a partir de los 30 min del inicio de la cinética. Las velocidades máximas con citocromo c son menores que las control (≈ 1.2 nmoles H^+ /h. mg p. fr frente a ≈ 2 nmoles H^+ /h. mg p. fr, respectivamente); sin embargo, se amplía la meseta de VH^+_{max} (en que el eflujo de H^+ funciona con mayor eficacia), pasando de ≈ 30 min a 140 min, y además, el descenso de VH^+ es mucho más lento, manteniendo niveles de actividad de extrusión de H^+ superiores a los controles a partir de los 120 min. Esto se refleja en que, a los 180 min, la velocidad es de 0.9 nmol H^+ /h. mg p. fr., mientras que las control tienen una $VH^+ \approx 0.3$ nmol H^+ /h. mg p. fr.

Consecuencia de la mayor duración de la meseta de VH^+_{max} es que el **eflujo neto total de H^+ (JH^+ , Fig 99)** es significativamente mayor (14115.97 nmol de H^+ en las raíces con citocromo c frente a los 10581.71 nmol de H^+ de las controles). Estas características cinéticas del eflujo de H^+ coinciden con las descritas para los otros aceptores, por lo que, aparentemente, la misma vía redox está siendo utilizada para la reducción del citocromo c.

El efecto del citocromo c sobre la **velocidad de influjo neto de K^+ (VK^+)** se expone en la **Fig 98B**, donde se comparan la variación de VK^+ con y sin citocromo c. Observamos que se produce una mayor velocidad de influjo neto de K^+ , que además se mantiene durante toda la cinética a niveles muy superiores a los normales (así, a los 120 min $VK^+ = 2$ nmol K^+ /h. mg p. fr. para raíces con y 1 nmol K^+ /h. mg p. fr. para raíces sin citocromo c, respectivamente). A partir de los 240 min, VK^+ en las experiencias con citocromo c comienza a disminuir, y a partir de los 330 min las velocidades tienden a igualarse con el control. La mayor VK^+ durante toda la cinética hace que el **influjo neto total de K^+ (JK^+ , Fig 99)** sea 27867.69 nmoles con citocromo c frente a los 17867.69 nmoles en el control, produciéndose un aumento del 76% en la cantidad de iones K^+ absorbidos por las raíces que reducen citocromo c, en comparación con las controles.

En resumen, podemos decir que el citocromo c provoca un aumento tanto del eflujo neto total de H^+ como del influjo neto total de K^+ ; en el primer caso porque, aunque VH^+ es menor, se mantiene durante más tiempo la velocidad máxima alcanzada, y en el segundo porque el influjo neto de K^+ se ve estimulado, con VK^+ mayores desde el principio al final de la cinética.

Se ha propuesto que estos efectos podrían deberse a que el citocromo c (aceptor fisiológico de cadenas redox de membranas celulares) actuaría inhibiendo un sistema de transporte de H^+ (H^+ -ATPasa) y activando otro (cadena redox), tal y como mantienen Böttger y Hilgendorf (1988) para el HCF (III), ya discutido, produciéndose un mayor eflujo de H^+ y también un incremento en el influjo de K^+ , ya que, de acuerdo con Lin (1984), un mayor flujo de electrones hacia la oxidasa terminal hiperpolarizaría la membrana, lo que sería responsable de la apertura de mayor número de canales K^+_{in} , aumentando la absorción de K^+ . Sin embargo, de nuevo hemos de razonar que, si el citocromo c cediera e^- a la cadena redox que transporta H^+ , cabría esperar que se produjera

un fuerte aumento en la VH_{\max}^+ , bien por dicha cadena o por la H^+ -ATPasa, desde el inicio de la cinética, y siguiendo idénticas características que las que muestra, la cinética con NADH. Por el contrario, si el citocromo c aceptara e^- de la vía alternativa, que no participa en la extrusión de H^+ , podría explicarse el cambio de características de la cinética de eflujo de H^+ , semejantes a las que hemos descrito para los otros aceptores exógenos (menor VH_{\max}^+ , pero durante mucho más tiempo), energizada por el flujo sostenido de e^- que se desvían por esta cadena alternativa hacia el citocromo c. Sin embargo, el fuerte influjo de K^+ inducido por este aceptor, que es un efecto específico que lo diferencia de los demás aceptores, hemos de atribuirlo a que, por su capacidad de incluirse en la membrana, impulse un flujo de e^- diferente a los demás (¿quizás un flujo de e^- con configuración "cis", y no "trans" como hemos propuesto para los otros?), que provocaría un cambio sostenido en el potencial de membrana, en el sentido de una mayor hiperpolarización, que mantendría abiertos un número mayor de canales K_{in}^+ .

La reducción de 100 μ M de citocromo c se ha medido bajo tres condiciones diferentes: **a)** en el medio de medida, **b)** en el medio con raíces "in vivo" y **c)** en el medio con raíces preincubadas en NaCN. Los resultados obtenidos se representan en la **Fig 100**, donde, en primer lugar, se observa cómo el citocromo c se reduce por la actividad de las raíces, ya que cuando éstas no se encuentran en el medio la reducción no se produce. En segundo lugar, los datos obtenidos muestran que las raíces "in vivo" reducen el 15% del citocromo c en los primeros 45 min, manteniéndose a partir de este momento la cantidad reducida prácticamente constante. Como vemos, la reducción del citocromo c por las raíces "in vivo" es pequeña, produciéndose en los primeros minutos de la experiencia. Estos resultados son similares a los obtenidos por Vani y Raghavendra (1992) en protoplastos de células de guarda, donde la reducción del citocromo c es mucho menor que la del HCF (III), e indica que sólo una parte de los electrones circularían por la vía alternativa hacia el citocromo c. Por el contrario, las raíces preincubadas con CN^- muestran una mayor reducción, habiéndose reducido a los 45 min el 50% y a los 120 min el 65%.

De nuevo hemos de **concluir**, con estos resultados, que la reducción del citocromo c se realiza mayoritariamente por la vía alternativa, insensible al CN^- , que en condiciones normales funciona moderadamente, compitiendo por los electrones con la vía sensible a los CN^- , pero que en raíces envenenadas con CN^- es la única vía de drenaje de los e^- procedentes del NAD(P)H endógeno; esta vía no está acoplada a flujos iónicos, que en presencia de CN^- son completamente nulos (**Fig 16A**).

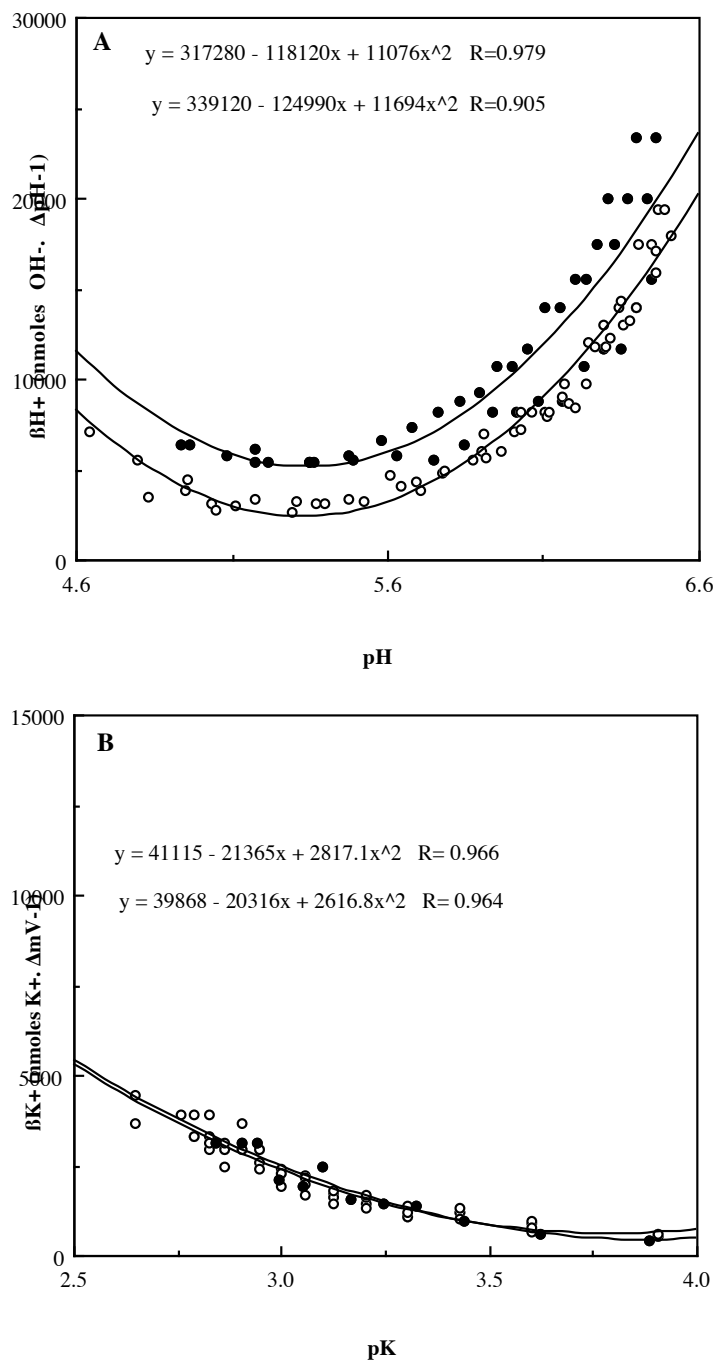


Fig 96: Capacidad tampón del medio con 175 raíces preincubadas en NaCN, sin (○) y con (●) 100 μM de citocromo c. (A) Capacidad tampón para H^+ (β_{H^+}). (B) Capacidad tampón para K^+ (β_{K^+}).

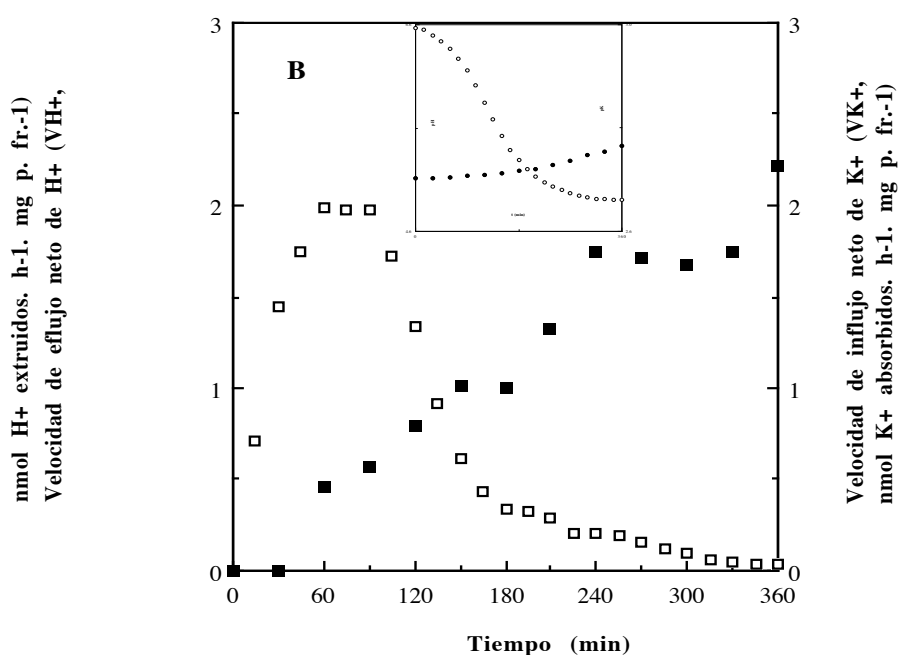
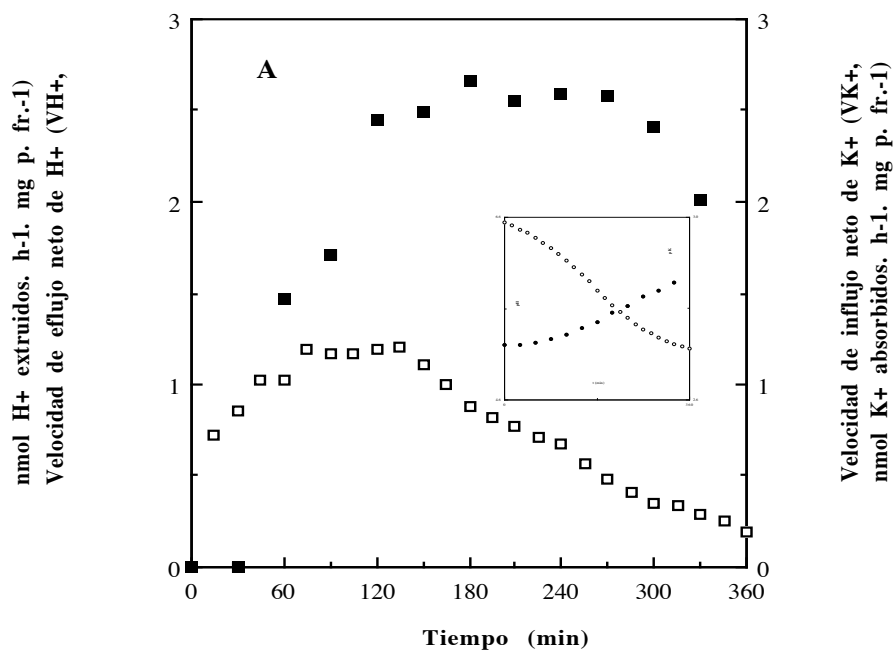


Fig 97: Velocidades netas de eflujo de H^+ (\square) e influjo de K^+ (\blacksquare) por las raíces, medidas simultáneamente, (A) con y (B) sin 100 μ M de citocromo c adicionado al inicio de la cinética. **Insertas,** los datos directos de variación de pH (\circ) y pK (\bullet) del medio. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo ($n \geq 3$, variaciones $\leq 5\%$ para VH^+ y entre 5 y 10% para VK^+).

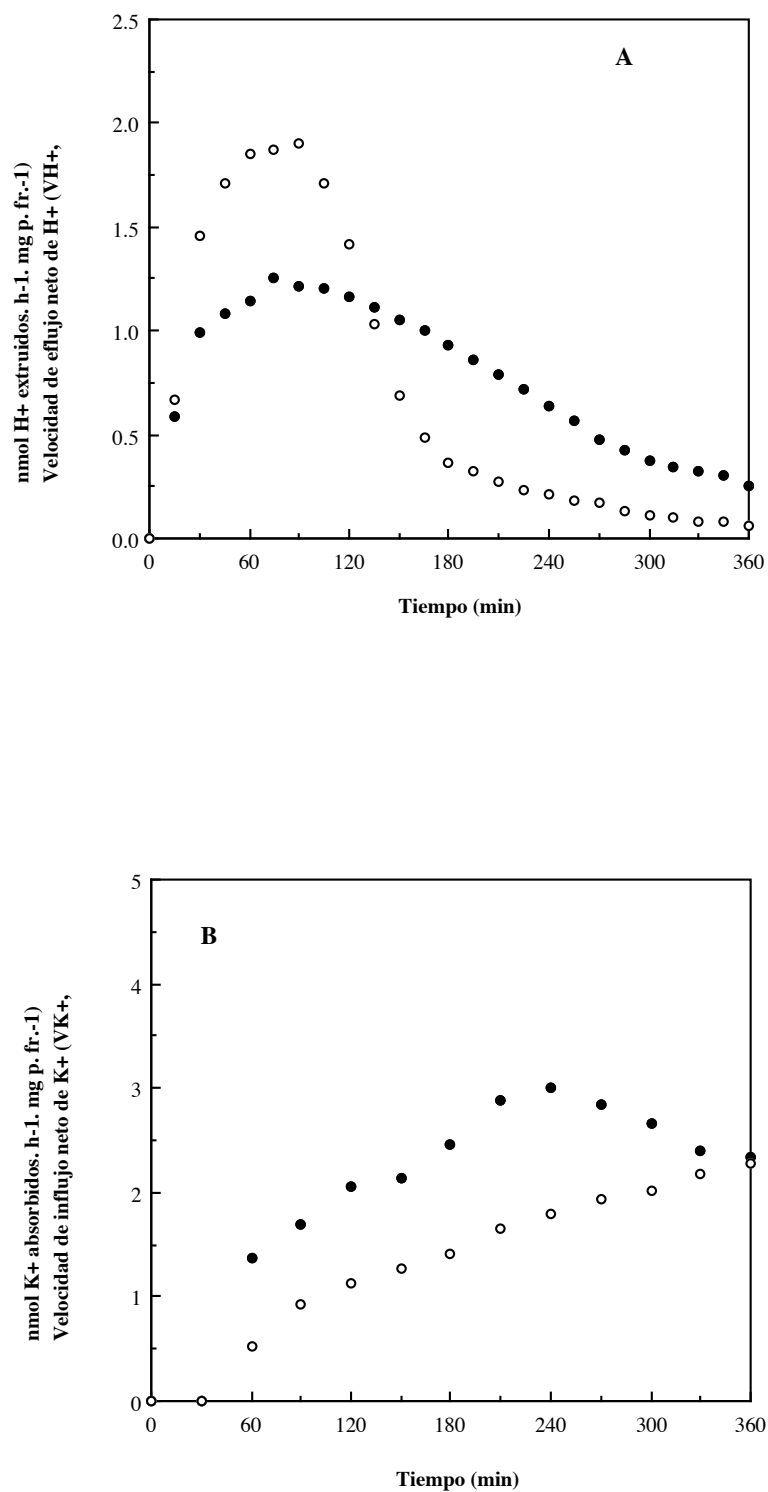


Fig 98: Variación de la velocidad (A) de eflujo neto de H⁺ (VH⁺) y (B) del influjo neto de K⁺ (VK⁺) por las raíces sin (○) y con 100 μM de citocromo c (●) adicionado al inicio de la cinética. Los datos son media de, al menos 3 experimentos independientes (desviación ≤5% en VH⁺ y entre 5 y 10% en VK⁺).

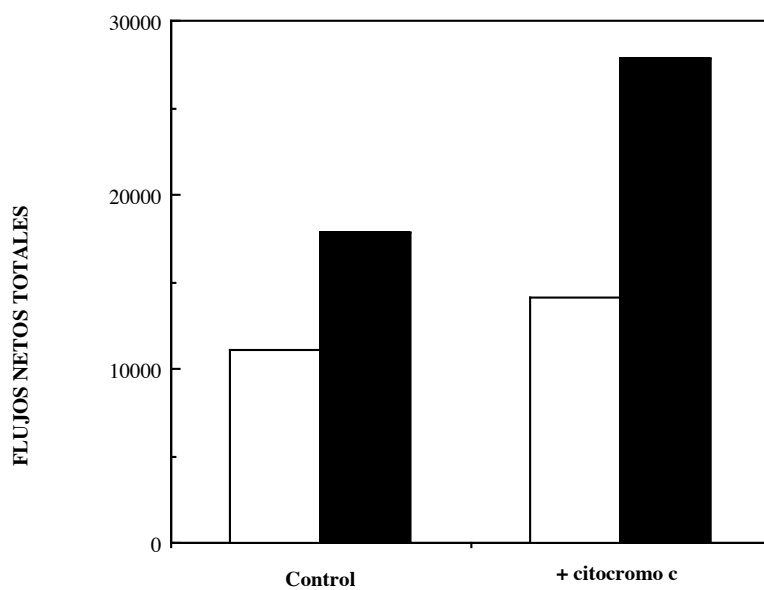


Fig 99: Flujo neto total de H⁺ (H⁺, hueco) y K⁺ (K⁺, relleno) como nmol totales de ión extruidos (H⁺) o absorbidos (K⁺) por las raíces cuando acaban los experimentos, al final de la cinética, con y sin citocromo c. Los datos están calculados a partir de la media de 3 experimentos independientes.

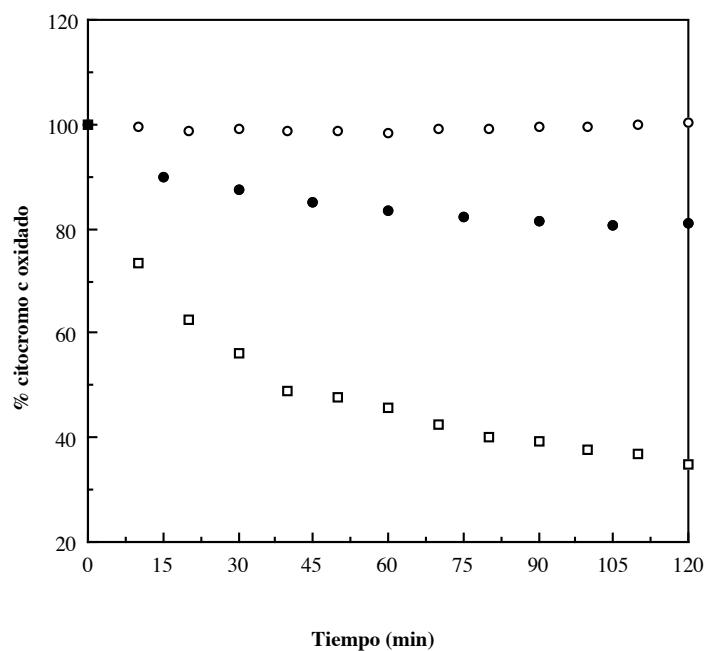


Fig 100: Oxidación del citocromo c frente al tiempo en medio sólo (○), con raíces "in vivo" (●) y con raíces preincubadas en NaCN (□). Cada caso es media de, al menos, tres experimentos (Desviación ≤5%).

6.- ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La actividad Superóxido dismutasa (SOD) se ha medido según la metodología descrita por Beauchamp y Fridovich (1971) (Aptdo 2.8 de Materiales y Métodos), habiéndose utilizado, en primer lugar, SOD de Horseradish (raíz de rábano), para comprobar el efecto que los diferentes aditivos utilizados en estas experiencias tienen sobre esta SOD, bien caracterizada, y poder posteriormente comparar con la actividad SOD de las raíces de nuestras plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.).

La actividad SOD de las raíces se ha determinado en las siguientes condiciones:

A) Actividad de las raíces **escindidas e incubadas** durante 30 min en tampón carbonato - EDTA ("medio de lavado") y posteriormente pasadas al medio de reacción.

B) Actividad en el "**medio de lavado**", añadido como extracto al medio de reacción.

En la primera medida se determina la **actividad SOD exocelular** insoluble. Con la segunda medida se obtiene una estimación de la actividad **SOD endocelular** soluble liberada en la zona del corte, junto con la exocelular soluble. Además se comprueba si los diferentes aditivos utilizados tienen efecto sobre estas actividades.

6.1.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD SOD DE HORSERADISH (RAÍZ DE RÁBANO, Hr-SOD) "IN VITRO"

En primer lugar, se han realizado medidas para cuantificar la actividad "in vitro" de la Hr-SOD con la metodología utilizada. Los datos obtenidos muestran que la Hr-SOD (100 μ l de una solución 0.20 mg/ml) produce una inhibición de la reducción del azul de Nitrotetrazolio (NBT) de, aproximadamente, un 85%. Los radicales superóxido (O_2^-) generados en la fotorreducción de la Riboflavina por la Metionina en el control (sin SOD) provocan la reducción del NBT; la presencia de la SOD impide la reducción del NBT al actuar "secuestrando" los O_2^- generados.

6.1.1.- Efecto de distintos aditivos sobre la actividad SOD de Horseradish (Hr-SOD)

La actividad "in vitro" de la Hr-SOD se ha medido en presencia de los aditivos utilizados en nuestra experiencias: NaCN 1 mM, cis-Pt (II) 500 μ M, NADH 300 μ M, DCCD 100 μ M y Vanadato 500 μ M. Estas medidas tienen como objeto comprobar el efecto de estos compuestos sobre este tipo de SOD para, posteriormente, compararlos con la SOD existente en las raíces de plántulas de girasol. En todos los casos se ha utilizado la concentración que más efecto mostraba sobre los flujos simultáneos de H^+ y K^+ .

La **Tabla III** recoge el efecto de los diferentes aditivos utilizados sobre la actividad Hr-SOD "in vitro".

a) Efecto del NaCN.- Como ya hemos visto, 0.20 mg/ml de Hr-SOD producen una inhibición del 85% en la reducción del NBT; sin embargo, en idénticas condiciones experimentales, pero en presencia de 1 mM de NaCN en el medio, la inhibición desciende al 8%. Esta fuerte caída en la inhibición nos indica la gran sensibilidad que la Hr-SOD presenta al NaCN, que bloquea su actuación, indicando que, de acuerdo con Salin (1987), se trata de una **Cu/ZnSOD**, isoenzima **sensible al NaCN**, y no de FeSOD ó MnSOD (isoenzimas no sensibles al NaCN).

b) Efecto del cis-Pt (II).- La adición de 500 μ M de cis-Pt (II) al medio de reacción, sin Hr-SOD, produce por sí solo una inhibición de la reducción del NBT, impidiendo su reducción por O_2^- , probablemente por producir la dismutación no enzimática de los mismos; es decir, que competiría con la SOD por dichos radicales.

La presencia de SOD de Horseradish en el medio de reacción con cis-Pt (II) produce una inhibición de la reducción del NBT semejante a la del control, sin aditivo. Ignoramos si el efecto del cis-Pt (II) sólo es o no igual en ausencia que en presencia del enzima (la afinidad de ésta por los radicales O_2^- podría ser superior a la del cis-Pt (II), en cuyo caso la presencia del cis-Pt (II) no alteraría la reacción, o viceversa). En consecuencia, los resultados de las medidas de SOD en presencia de este inhibidor no pueden tomarse en consideración, ya que interacciona demasiado con los componentes del medio de reacción, y en una manera no fácilmente predecible.

c) Efecto del NADH.- La adición de NADH al medio de reacción sin SOD aumenta la reducción de NBT en un 12%. Esto sólo es posible si el NADH reduce directamente al NBT o interviene en la formación de O_2^- , que a su vez reduciría más NBT.

La adición al medio de reacción, con SOD, de 300 μ M de NADH disminuye la inhibición de la reducción del NBT respecto del control, pasando de un valor del 82.26% al 67.98%, sin y con NADH respectivamente (es decir, una diferencia del 14%). Puesto que esta diferencia coincide con el efecto del NADH por sí solo, hemos de concluir que el NADH tampoco actúa sobre la actividad Hr-SOD "in vitro".

d) Efecto del DCCD.- 100 μ M de DCCD, añadido al medio, no afecta significativamente, la reducción del NBT. El efecto sobre la actividad Hr-SOD, "in vitro" tampoco es significativo, por lo que de nuevo concluimos que el DCCD no afecta a la actividad Hr-SOD, al menos "in vitro".

e) Efecto del Vanadato.- Tampoco 500 μ M de Vanadato produce efectos significativos sobre la actividad Hr-SOD, respecto al control, por lo que también concluimos que este inhibidor no actúa sobre el enzima, al menos "in vitro".

En resumen, de todos los aditivos usados (**Tabla III**) sólo el NaCN (1 mM) afecta la actividad de la Hr-SOD, provocando una fuerte inhibición de la misma, lo que demuestra que se trata mayoritariamente del **isoenzima Cu/Zn SOD**. La actividad SOD no puede medirse en presencia de cis-Pt (II) por las fuertes interferencias de éste con los compuestos del medio de reacción.

6.2.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD SOD DE LAS RAICES ESCINDIDAS

Para determinar la presencia de actividad SOD en nuestras raíces, se siguió el protocolo ya descrito (apartado 2.8 de Materiales y Métodos), siendo los experimentos realizados idénticos a los descritos para determinar la actividad "in vitro" de la Hr-SOD, excepto que ésta se sustituye por 6 raíces enteras (≈ 0.1 g), escindidas de plántulas estériles de 36 h. Como ya hemos indicado, la inhibición de la reducción del NBT se determinó en: (A) raíces preincubadas 30 min en tampón carbonato - EDTA ("medio de lavado") y puestas después en el medio de reacción y (B) Actividad en el medio de lavado. La actividad SOD obtenida en (A) correspondería presumiblemente sólo a la **actividad SOD exocelular insoluble**, y en (B) a la **actividad endocelular soluble** liberada en el corte junto con la exocelular soluble, si la hubiera.

Como puede observarse en las **Tablas IV y V**, se ha detectado actividad SOD claramente medible tanto en la fracción (A) (4.5 ± 0.5 USOD en los controles, sin aditivos, **Tabla IV**) como (B) (17 ± 1.0 USOD, controles de **Tabla V**). Se ha descrito la presencia de varias SOD de origen endocelular en las raíces de muchas especies, asociadas a mitocondrias y peroxisomas; sin embargo, la localización exocelular, ligada a la pared en la cara externa de la membrana, no ha sido descrita en raíces. Experiencias posteriores con las mismas raíces pero intactas, sin excindir de la plántula, así como en el fluido intercelular de las mismas, han confirmado los datos presentados en esta Memoria (Garrido et al., 1997), que así constituyen las primeras pruebas de la existencia de dicha actividad exocelular.

6.2.1- Efecto de los distintos aditivos sobre la actividad SOD de las raíces lavadas (actividad SOD exocelular insoluble)

Al igual que con la Hr-SOD se ha estudiado el efecto que los aditivos NaCN, cis-Pt (II), NADH, DCCD y Vanadato (en concentraciones idénticas a las anteriormente utilizadas) tienen sobre la actividad de SOD exocelular insoluble de las raíces, presumiblemente ligada a la pared, en la cara externa de la membrana plasmática. En las experiencias se han utilizado raíces que eran previamente "lavadas" para eliminar la actividad SOD endocelular liberada por el corte (aunque también se lavaría la exocelular soluble, si la hubiera); esta actividad también se ha determinado, posteriormente, en el "medio de lavado". Ambos resultados se expresan como U SOD/g de peso fresco de la raíz y se muestran en la

Tabla IV. (La definición de Unidad de SOD está descrita en el Apto 2.8.3. del capítulo de Materiales y Métodos).

a) Efecto del NaCN.- Cuando se adiciona 1 mM de NaCN al medio donde están las raíces se observa una fuerte disminución de la inhibición de la reducción del NBT, pasándose de un 24.86% (≈ 5 USOD en raíces sin NaCN) a un 3.50% (0.7 USOD en las raíces con NaCN). Como vemos igual que ocurría con la Hr-SOD, la actividad SOD exocelular presente en las raíces se ve fuertemente afectada por la adición de NaCN, inhibidor de la Cu/ZnSOD, lo que nos indica la presencia mayoritaria de esta isoenzima en la actividad ligada a las paredes celulares de la raíz.

b) Efecto del cis-Pt (II).- Al añadir 500 μ M de cis-Pt (II) se observa un aumento de la inhibición de la reducción del NBT, es decir, un aumento de la actividad SOD, que pasa del 23.46% para las raíces solas al 36.42% tras la adición del cis-Pt (II), lo que significa casi la duplicación de las USOD (de 4.7 a 7.3). Sin embargo, como en el caso anterior, la interacción del cis-Pt (II) con el medio de reacción nos impide tomar en consideración este resultado.

c) Efecto del NADH.- El efecto de 300 μ M de NADH sobre la actividad SOD detectada en raíces enteras es muy escaso; no obstante, se observa cómo el NADH no disminuye la actividad SOD sino que, por el contrario, la aumenta levemente desde el 23.46% (4.7 USOD) al 28.81% (5.7 USOD) al ser añadido. Si corregimos el efecto del NADH sobre el medio, la estimulación aumenta un poco (40%), observándose una diferencia con el control del 16.5%, la mayor detectada en las medidas de SOD de las raíces, tanto de la fracción insoluble como soluble. Esto podría deberse a que el NADH al oxidarse por la cadena redox de la raíz, genera O_2^- extra, y este aumento de O_2^- activaría la SOD. Así, Doke (1985) en fracciones enriquecidas en membrana plasmática de patata, describe que la generación de O_2^- (como reacción de defensa) está acoplada a la oxidación del NADPH (e inhibida por NADP+); el O_2^- sería producido por la NAD(P)H oxidasa de la cadena redox del plasmalema, y el aumento de O_2^- provocaría la activación de la SOD (Chai y Doke, 1987). Además, al ser el NADH el sustrato de dicha cadena, la actividad de la misma aumentaría, se generarían más O_2^- y habría más actividad SOD. Hay que destacar que este efecto requiere la presencia de la raíz o sus membranas, donde se localiza la cadena redox.

d) Efecto del DCCD.- 100 μ M de DCCD añadidos al medio con las raíces apenas afecta la reducción del NBT por las mismas. Si acaso produce un ligerísimo aumento, en el límite de la significación, respecto del control.

e) **Efecto del Vanadato.**- 500 μM Vanadato añadidos al medio con las raíces no producen efectos significativos sobre la actividad SOD de las mismas.

En resumen, de todos los aditivos usados (**Tabla IV**) sólo el NaCN (1 mM) prácticamente anula la actividad SOD exocelular de nuestras raíces, lo que demuestra que el isoenzima presente, en su casi totalidad, es del tipo Cu/ZnSOD. En cuanto al resto de los aditivos, sólo se observa una pequeña pero apreciable estimulación de la actividad con NADH (300 μM) lo que interpretamos es debido a la producción de radicales libres O₂-extra, por activación de la cadena redox de las raíces, consumiendo NADH. Este efecto sólo se observa en las medidas con raíces "in vivo".

6.2.2.- Efecto de distintos aditivos sobre la actividad SOD del “Medio de Lavado” (Actividad SOD endocelular y exocelular solubles)

Como en los casos anteriores se han utilizado los mismos aditivos para ver su efecto sobre la actividad SOD del “medio de lavado”: 1 mM de NaCN, 500 μM de cis-Pt, 300 μM de NADH, 100 μM de DCCD y 500 μM de Vanadato. En la **Tabla V** se muestran los resultados del porcentaje de inhibición de la reducción del NBT y las USOD/procedentes de 1 g de peso fresco de raíz en cada caso.

a) **Efecto del NaCN.**- La presencia de 1mM en el medio reduce fuertemente la inhibición de la reducción del NBT que provoca el “medio de lavado”, del 29.25% sin NaCN al 9.44% tras su adición. Se produce, por tanto, una actuación del NaCN sobre la SOD, inhibiéndola, por lo que se trataría en su mayor parte de una Cu/ZnSOD. Hay que destacar, si embargo, que la inhibición es, comparativamente, mucho menos drástica que la que observamos en la Hr-SOD (**Tabla III**) y en la actividad ligada a la pared (**Tabla IV**), por lo que probablemente otros isoenzimas no sensibles al NaCN están también presentes en esta fracción. Ello no es de extrañar, ya que muchos isoenzimas endocelulares pertenecen a otro tipo.

b) **Efecto del cis-Pt (II).**- En cuanto al efecto de 500 μM de cis-Pt (II), se aprecia un aumento de la inhibición de la reducción del NBT, del 29.25% sin cis-Pt (II) al 37.83% con cis-Pt (II). Nuevamente la inhibición producida por el cis-Pt (II) en el medio de reacción solo anula cualquier interpretación de estos resultados.

c) **Efecto del NADH.**- La adición de NADH apenas modifica los niveles de inhibición de la reducción del NBT por el “medio de lavado”, como puede comprobarse en la **Tabla V**. En todo caso, si corregimos el efecto del NADH solo, se observa un ligero aumento de la inhibición, lo que sería indicativo de una débil activación de la actividad SOD soluble.

d) Efecto del DCCD.- El efecto del DCCD sobre la actividad SOD soluble en el medio de lavado estimula muy débilmente la actividad; realizando las correcciones, la pequeña estimulación de la actividad SOD sería en todo comparable a la descrita para el NADH.

e) Efecto del Vanadato.- Si realizamos la pequeña corrección del efecto del Vanadato solo, encontramos que el efecto del inhibidor sobre la actividad SOD soluble es completamente nulo.

En resumen, de todos los aditivos usados solamente el NaCN disminuye fuertemente la actividad SOD soluble del medio de lavado, lo cual indicaría la presencia de una Cu/ZnSOD. Sin embargo, la inhibición es menor que en los casos anteriores, por lo que otros isoenzimas no sensibles al NaCN estarían también presentes en esta fracción soluble. Los demás compuestos o no afectan o aumentan muy ligeramente dicha actividad.

Concluyendo, del estudio de la actividad SOD de nuestras raíces se deduce que existe una **actividad exocelular** (al menos la **insoluble**, ligada a las paredes celulares, aunque probablemente también exista en la fracción soluble parte de la actividad **exocelular soluble**) que se describe por primera vez en raíces.

En el caso del **cis-Pt (II)**, los resultados no pueden ser tomados en consideración por las fuertes interferencias de este compuesto con los componentes de la reacción. Sólo el **NaCN** inhibe fuertemente la actividad Hr-SOD medida "in vitro", indicando que se trata mayoritariamente de un isoenzima Cu/ZnSOD. Igual respuesta al NaCN tienen las actividades SOD de nuestras raíces, muy especialmente la de las raíces enteras (exocelular insoluble), que sería casi exclusivamente Cu/ZnSOD, mientras que la soluble muestra una menor inhibición y no se descarta la presencia de otros isoenzimas.

Finalmente, el resto de los aditivos usados (**NADH, DCCD y Vanadato**) no afectan significativamente la actividad Hr-SOD. En el caso de las actividades de las raíces o no afectan significativamente (caso del Vanadato) o estimulan ligeramente las actividades SOD de las raíces. El efecto mayor se observa en la actividad insoluble ligada a la raíz, con NADH (16.5% más de inhibición de la reducción del NBT que en los controles, sin NADH). Ello es congruente, ya que en este caso se trata de medidas "in vivo" con raíces, que puede utilizar dicho NADH para producir radicales libres O_2^- extra, a través de su propia cadena redox, los cuales serían responsables de la mayor actividad SOD. Esta reacción requiere la presencia de la raíz "in vivo", y no podría observarse en las actividades SOD del medio de lavado, donde la estimulación, mucho más débil se debería al efecto directo de los aditivos sobre el enzima "in vitro" o los componentes del medio de reacción.

Aditivo	% I. Red. NBT Medio (-SOD + Aditivo)	U SOD/mg (% I. Red. NBT) Controles (+SOD- Aditivo)	U SOD/mg (% I. Red. NBT) (+ SOD + aditivo)
NaCN	2.5%	85.5 (85.5%)	8 (8%)
cis-Pt (II)	33%	76.61 (76.61%)	79.27 (79.27%)
NADH	-12%	82.26 (82.26%)	67.98 (67.98%)
DCCD	-4.5%	89.63 (89.63%)	88.15 (88.15%)
Vanadato	3.5%	98.53 (98.53%)	91.91 (91.91%)

Tabla III: Efecto de distintos aditivos sobre la actividad SOD de Horseradish (Hr-SOD): Se relacionan los valores de unidades de Hr-SOD/mg con distintos aditivos y sus respectivos controles (entre paréntesis los porcentajes de inhibición de la reducción del NBT en la mezcla de reacción, a partir de los cuales se calculan las correspondientes Unidades de SOD). Se incluye también la inhibición de la reducción del NBT obtenida con los aditivos solos, sin SOD. Cada valor es media de, al menos, 3 experimentos independientes (desviaciones $\leq 5\%$).

Aditivo	% I. Red. NBT Medio (-SOD + Aditivo)	U SOD/g raíz (%I. Red. NBT) Controles (+SOD -Aditivo)	U SOD/g raíz (% I. Red. NBT) (+SOD +Aditivo)
NaCN	2.5%	4.97 (24.86%)	0.70 (3.50%)
cis-Pt (II)	33%	4.69 (23.46%)	7.28 (36.42%)
NADH	-12%	4.69 (23.46%)	5.76 (28.81%)
DCCD	-4.5%	4.78 (23.92%)	5.75 (28.74%)
Vanadato	3.5%	4.56 (22.81%)	6.45 (32.27%)

Tabla IV: Efecto de distintos aditivos sobre la actividad SOD de raíces escindidas: Se muestra lo mismo que en la Tabla III pero la actividad SOD se mide en U SOD/g de peso fresco de raíz. Cada valor es media de, al menos, 3 experimentos independientes (desviaciones entre el 5 y 10%).

Aditivo	% I. Red. NBT Medio (-SOD + Aditivo)	U SOD/g raíz (%I. Red. NBT) Controles (+SOD -Aditivo)	U SOD/g raíz (% I. Red. NBT (+SOD +Aditivo)
NaCN	2.5%	18.28 (29.25%)	5.9 (9.44%)
cis-Pt (II)	33%	18.28 (29.25%)	23.64 (37.83%)
NADH	-12%	18.28 (29.25%)	18.99 (30.39%)
DCCD	-4.5%	16.68 (26.7%)	23.02 (36.84%)
Vanadato	3.5%	14.78 (23.65%)	16.73 (26.77%)

Tabla V: Efecto de distintos aditivos sobre la actividad SOD del “medio de lavado”: Se muestra lo mismo que la Tabla III pero la actividad SOD se mide en U SOD/correspondientes a 1 g de peso fresco de raíz. Cada valor es media de, al menos, 3 experimentos independientes (desviaciones entre el 5 y 10%).

CONCLUSIONES

1ª) La **utilización de electrodos específicos de H^+ y K^+** en un medio débilmente tamponado se demuestra que constituye un buen método "no invasivo" para medir de forma simultánea los flujos de ambos iones por las raíces "in vivo" en condiciones semejantes a las naturales, en que ambos sistemas de transporte están operando simultáneamente. Sin embargo, es necesaria para la correcta medida de los mismos la calibración de la capacidad tampón para H^+ y K^+ del medio con los electrodos y las raíces, ya que éstas contribuyen a la fijación de cationes, de manera semejante a un tampón.

2ª) La **cinética de flujos de H^+ y K^+** por raíces procedentes de **diferentes remesas** de semillas muestra algunas diferencias. Estos resultados, unidos a los citados en la primera conclusión, dejan claro que han de realizarse cuidadosos controles cuando las condiciones experimentales cambien, aún mínimamente.

3ª) La **adición de Antibióticos** (Penicilina G Sódica o G Potásica y/o Cloranfenicol) al medio con raíces estériles no afecta el eflujo de H^+ , pero sí el influjo de K^+ por las raíces, razón por la cual no pueden utilizarse estos antibióticos en experiencias de transporte de K^+ . En consecuencia, las raíces utilizadas deberán ser estériles, no pudiendo prevenirse el efecto de la contaminación por la adición de antibióticos al medio de medida.

4ª) La **concentración de K^+ en el medio** apenas afecta al eflujo de H^+ , que sólo se ve ligeramente incrementado por la mayor concentración de K^+ usada (5 mM). El influjo de K^+ bajo diferentes concentraciones de ión en el medio mostraba siempre un retardo o lag de ≈ 60 min respecto al eflujo de H^+ , y luego la cinética bifásica saturable descrita por Epstein y otros autores: Sistema I de alta afinidad por el K^+ , que opera a concentraciones bajas (μM) y Sistema II de baja afinidad, que opera a concentraciones altas (mM) de K^+ . En nuestras experiencias, el intervalo de concentraciones de K^+ al que uno u otro de los dos Sistemas de transporte de K^+ está operando depende del tiempo que lleva funcionando el sistema de extrusión de H^+ , y presumiblemente del gradiente de pH creado.

5ª) La adición de **Valinomicina**, ionóforo de K^+ , no afecta al transporte de H^+ por las raíces, mientras que sí altera el de K^+ (tanto en el intervalo de concentraciones en que actúa el Sistema I como en el que actúa el II). El efecto es transitorio, provocando un rápido eflujo de K^+ que es compensado inmediatamente, recuperándose en poco tiempo de nuevo el influjo. Este efecto constituye la mejor prueba de que el eflujo de H^+ e influjo de K^+ no ocurren a través de un único sistema transportador primario.

6ª) La **Ouabaina** no afecta al eflujo neto de H^+ , pero inhibe parcialmente el influjo neto de K^+ . Este resultado podría implicar que, al menos, una parte del transporte de K^+ por las raíces se realizaría acoplado al de Na^+ .

7ª) El **DCCD** inhibe los flujos de H^+ y K^+ , aunque sobre el eflujo de H^+ el efecto es más rápido y requiere menor concentración que en el caso del influjo de K^+ . El eflujo de H^+ muestra una respuesta bifásica al inhibidor, lo que interpretamos como prueba de que dos tipos de canales de H^+ , con diferente sensibilidad y accesibilidad al DCCD, están presentes en las plantas. Se propone que no sólo la H^+ -ATPasa, sino también la cadena redox posee canales de extrusión de H^+ , sensibles ambos al DCCD. La respuesta bifásica de los sistemas primarios de transporte de H^+ provoca, proponemos que secundariamente, una respuesta también bifásica del influjo de K^+ .

8ª) La adición de **Oligomicina** inhibe tanto el eflujo neto de H^+ como el influjo neto de K^+ , siendo el primero más sensible y más rápidamente inhibido que el segundo, como en los casos anteriores, por lo que nuevamente se pone de manifiesto que el influjo de K^+ se altera secundariamente como consecuencia de la inhibición del eflujo de H^+ . Como con DCCD, las respuestas de ambos flujos al inhibidor son bifásicas, indicando que dos sistemas diferentes, en sensibilidad y accesibilidad a la Oligomicina, están implicados en el eflujo de H^+ (H^+ -ATPasa y cadena redox) y secundariamente en el de K^+ de nuestras raíces.

9ª) Tanto el eflujo neto de H^+ como el influjo neto de K^+ muestran sensibilidad al **Vanadato**, aunque el transporte de K^+ se inhibe antes y además es más sensible (la mayor concentración de Vanadato usada anula totalmente el influjo de K^+ , mientras que nunca llega a anular totalmente el eflujo de H^+). Puesto que el Vanadato es un inhibidor de la H^+ -ATPasa de plasmalema, la falta de anulación completa del eflujo de H^+ indica la existencia de otra vía de extrusión de H^+ operando, diferente a la H^+ -ATPasa, insensible al Vanadato, que se propone sería la cadena redox del plasmalema. El efecto inhibitorio sobre el influjo de K^+ parece ser la combinación de un efecto directo sobre los transportadores de K^+ y otro indirecto a través de la inhibición de la H^+ -ATPasa.

10ª) La adición de **300 μ M NADH** activa el eflujo neto de H^+ , presumiblemente a través de la activación de la cadena redox, al actuar el NADH como donador exógeno de electrones y H^+ a dicha cadena. Sin embargo, el transporte de K^+ no se ve afectado por el NADH, ya que la H^+ -ATPasa, que funciona a pleno rendimiento, crea ya el gradiente necesario para una eficiente absorción de K^+ , y la pequeña hiperpolarización provocada por el estímulo de la cadena redox no parece suficiente para abrir canales adicionales K^+_{in} .

11^a) El **Hexacianoferrato (II), HCF (II)** (forma reducida del aceptor HCF (III)) parece ser capaz de ceder electrones a una cadena redox de las células de las raíces. Sin embargo, su efecto sobre los flujos netos de H^+ y K^+ es diferente al del NADH. El HCF (II) altera el eflujo total de H^+ no porque aumente la velocidad de extrusión, sino la duración de la meseta de velocidades máximas, así como el intervalo de pH óptimo a que se dan dichas velocidades máximas. Además multiplica por tres el influjo de K^+ . La diferente cinética nos induce a pensar que el HCF (II) actúa sobre una cadena redox diferente o bien sobre un intermediario diferente de la cadena redox.

12^a) El efecto del **cis-Platino (II), cis-Pt (II)** sobre el eflujo neto de H^+ e influjo neto de K^+ es muy similar, aunque el eflujo de H^+ es más sensible que el influjo de K^+ ; además, el efecto sobre el flujo de K^+ presenta un retraso o lag respecto al de H^+ , como si se tratara de causa y efecto. En ambos casos ocurre primero inhibición y luego reversión de los flujos (influjo neto de H^+ y eflujo neto de K^+). Puesto que el cis-Pt (II) se ha propuesto que actuaría sobre la cadena redox del plasmalema (bloqueando la actividad NADH oxidoreductasa exógena), su presencia provocaría la anulación de la diferencia de potencial de membrana (despolarización), lo que también afectaría a la H^+ -ATPasa, y al transporte de K^+ , con el que la planta trata de compensar los cambios en el flujo de H^+ .

13^a) El aceptor de electrones **Hexacianoferrato (III), HCF (III)** parece aceptar los electrones de una cadena redox semejante a la que acepta electrones de la forma reducida (HCF-II) (conclusión 11^a). El efecto sobre los flujos de H^+ y K^+ es, congruentemente, opuesto al de dicha forma reducida, pero las características cinéticas son semejantes. El HCF (III) es reducido por las raíces, como puede comprobarse espectrofotométricamente, ocurriendo en mayor proporción cuando las raíces están envenenadas con NaCN. Proponemos que el sistema encargado de esta reducción sería una cadena redox del plasmalema alternativa, insensible al CN^- , que sigue funcionando aunque se anulen los transportes de H^+ y K^+ (bien por CN^- o por cis-Pt -II).

14^a) El efecto del **Hexacloroiridato (IV), HCl (IV)** (aceptor de electrones) sobre el eflujo de H^+ no puede medirse, puesto que el electrodo de pH provoca la rápida reducción de este compuesto en ausencia de raíces. Su efecto sobre el influjo de K^+ es transitorio, provocando un rápido eflujo para, posteriormente, recuperarse el influjo. Este efecto se debería a que el rápido eflujo de electrones, por la rápida reducción del compuesto, provocaría una brusca despolarización de la membrana, que sería la responsable de la apertura de los canales K^+_{out} , para recuperar el potencial de equilibrio. La reducción de este compuesto es, congruentemente, también muy rápida y no se afecta por CN^- , de manera que proponemos se llevaría a cabo por una cadena alternativa insensible a los CN^- , del plasmalema.

15ª) El **Citocromo c** (aceptor de electrones fisiológico, que forma parte de otras cadenas redox de membranas celulares), produce un efecto semejante al HCF (III) sobre el eflujo de H^+ , y con cinética semejante: disminuye la VH^+ máxima pero la mantiene mucho más tiempo; sin embargo, estimula el influjo neto de K^+ , seguramente porque, al incluirse en la membrana, hace que el flujo de electrones ocurra en diferente configuración ("cis") que cuando la cadena opera con HCF (III) ("trans").

Espectrofotométricamente se comprueba que la presencia de raíces provoca la reducción del Citocromo c; puesto que la reducción tampoco se afecta por la preincubación de las raíces en NaCN, de nuevo la cadena redox alternativa insensible al CN^- sería la vía implicada.

16ª) Los efectos de los aceptores y donadores de electrones (excepto el NADH, donador natural), recogidos en las conclusiones de la 11ª a la 15ª, son congruentes con la existencia en el plasmalema de las células de nuestras raíces de una **cadena redox resistente al CN^-** (como en las mitocondrias), que sólo transportaría electrones, alternativa a la vía redox normal, que transportaría electrones y H^+ (a la cual donaría los electrones el NADH), con la que compite por dichos electrones. Sin embargo, aunque el efecto de los aceptores de electrones sobre el flujo de H^+ es muy semejante, sobre el flujo de K^+ puede ser incluso opuesto. Esto lo atribuimos a las distintas posibilidades de funcionamiento de la cadena, (configuración "trans" o "cis"), según las características de cada transportador de electrones (soluble o incluido en la membrana, con acceso sólo a la cara externa o la interna), que han de afectar de diferente forma al potencial de membrana, el cual es, en definitiva, el que dirige los flujos de K^+ .

17ª) Los resultados recogidos en esta Memoria, en cuanto a los diferentes datos cinéticos de los flujos de H^+ y K^+ (conclusiones 1ª y 2ª), a su diferente respuesta a las concentraciones de K^+ en el medio (conclusión 4ª), y a su diferente respuesta a los inhibidores empleados (conclusiones 3ª y 5ª a 15ª) nos permiten concluir que la **intrusión de K^+ y la extrusión de H^+ por nuestras raíces no se llevan a cabo por un único transportador**, sino que la extrusión de H^+ por las bombas primarias proporcionaría la fuerza impulsora (potencial de membrana y gradiente de pH) necesaria para la posterior actuación de transportadores de K^+ secundarios.

18ª) Todas las condiciones que hacen **revertir el eflujo de H^+** a influjo neto de H^+ acaban revirtiendo también, con un desfase de 30-60 min, el influjo de K^+ a eflujo neto de K^+ . Este efecto es congruente con el reciente descubrimiento de canales K^+_{out} , que se abren por despolarización de la membrana y provocan salida de K^+ , que así compensa la entrada de H^+ y contribuye a repolarizar de nuevo la membrana.

19^a) Los resultados obtenidos con los efectores que actúan a nivel de la H⁺-ATPasa del plasmalema (conclusiones 7^a, 8^a y 9^a), en comparación con los que actúan a nivel de la cadena redox (conclusiones 10^a a 15^a) nos permiten concluir que el **transporte de K⁺ parece depender más directamente de la H⁺-ATPasa** que de la cadena redox. No obstante, puesto que la cadena redox condiciona la actuación de la H⁺-ATPasa (a través de la modificación del potencial de membrana), también se observan efectos a plazo más largo de los efectores de la cadena sobre los sistemas de influjo de K⁺ (conclusiones 11^a a 15^a).

20^a) La actividad **SOD de Horseradish** (raíz de rábano) se inhibe por NaCN, lo que indica que pertenece al tipo Cu/Zn SOD. El resto de los aditivos usados (NADH, DCCD y Vanadato) no alteran dicha actividad.

21^a) La actividad **SOD exocelular insoluble de las raíces** escindidas de girasol, previamente lavadas para eliminar la SOD soluble de origen endo o exocelular, se atribuye a actividad ligada a las paredes celulares de la raíz y a la cara externa de la membrana. Esta conclusión viene apoyada por la apreciable estimulación de esta actividad por el NADH, que implica la actuación de la cadena redox del plasmalema y que no se observa en ausencia de raíces "in vivo". La actividad prácticamente se anula por la adición de NaCN, por lo que se trataría de una Cu/ZnSOD. El resto de los aditivos usados (DCCD y Vanadato) no afectan esta actividad.

22^a) La **actividad SOD medida en el "medio de lavado"** se atribuye a actividad endocelular soluble de las raíces (liberada en la zona de corte) junto con la actividad exocelular soluble, si la hubiera. Esta actividad se inhibe sólo parcialmente por la adición de NaCN de manera que, en su mayor parte, correspondería a una Cu/Zn SOD, aunque también existirían otros tipos de SOD endógenas. Los demás aditivos usados (NADH, DCCD, y Vanadato) o no alteran esta actividad SOD o la estimulan muy ligeramente.

23^a) En consecuencia con los resultados obtenidos con los distintos efectores NADH, DCCD y Vanadato sobre la actividad SOD (conclusiones 20^a a 22^a) podemos concluir que el efecto de dichos **efectores sobre los flujos de H⁺ y K⁺ no está relacionado con un posible efecto sobre la SOD**, como se ha propuesto, ya que dicha actividad no se altera apreciablemente por los citados efectores. En el caso del cis-Pt (II) no nos es posible extraer conclusiones, ya que la fuerte interacción de este aditivo con los componentes de la mezcla de reacción hace imposible que, en su presencia, pueda medirse con garantías la actividad SOD.

BIBLIOGRAFÍA

Alcántara, E.; de la Guardia, M.; Romera, F.J. (1991) Plasmalemma redox activity and H⁺ extrusion in roots of Fe-deficient cucumber plants. *Plant Physiol.* 96: 1034-7.

Almansa, M.S.; Del Rio, L.A.; Alcaraz, C.F.; Sevilla, F. (1989) Isoenzyme pattern of superoxide dismutase in different varieties of citrus plants. *Physiol. Plant.* 76:563-8.

Amancio, S.; Santos, H. (1992) Nitrate and ammonium assimilation by roots of maize (*Zea mays* L.) seedlings as investigated by in vivo ¹⁵N-NMR. *J. Exp. Botany* 250: 633-9.

Amodeo, G.; Srivastava, A.; Zeiger, E. (1992) Vanadate inhibits blue light-stimulated swelling of vicia guard cell protoplasts. *Plant. Physiol.* 100: 1567-70.

Anderson, J.A.; Huprikar, S.S.; Kochian, L.V.; Lucas, W.J.; Gaber, R.F. (1992) Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89:3736-40.

Anthon, G.E.; Spanswick, R.M. (1986) Purification and properties of the H⁺-translocating ATPase from the plasma membrane of tomato roots. *Plant Physiol.* 81: 1080-5.

Arron, G.P.; Henry, L.; Palmer, J.M.; Hall, D.O. (1976) Superoxide dismutase in mitochondria from *Helianthus tuberosus* and *Neurospora crassa*. *Biochem. Soc. Trans.* 4:618-20.

Asada, K.; Kanematsu, S.; Okada, S.; Hayawaka, T. (1980) Phylogenetic distribution of three types of superoxide dismutase in organisms and cell organelles. In *Developments in Biochemistry. Vol. 11A. Chemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase.* (J.U. Bacinister and H.A.O. Hills eds) pp 136-53. Elsevier North Holland, New York ISBN 0-444-00442-4.

Asard, M.; Venken, M.; Caubergs, R.; Reijnders, W.; Oltmann, F.L.; De Greef, J.A. (1989) b-Type Cytochromes in higher plant plasma membranes. *Plant. Physiol.* 90: 1077-83.

Asher, C.J.; Ozanne, P.G. (1963) growth and potassium content of plants in solution cultures maintained at constant potassium concentrations. *Soil Sci.* 103: 155-61.

Askerlund, P.; Larsson, C. (1991) Transmembrane electron transport in plasma membrane vesicles loaded with an NADH-generating system or ascorbate. *Plant. physiol.* (1991) 96: 1178-84.

Askerlund, P.; Larsson, C.; Widell, S. (1989) Cytochromes of plant plasma membranes characterization by absorbance difference spectrophotometry and redox titration. *Physiol. Plant.* 76: 123-34.

Askerlund, P.; Larsson, C.; Widell, S.; Møller, I.M. (1987) NAD(P)H oxidase and peroxidase activities in purified plasma membranes from cauliflower inflorescences. *Physiol. Plant.* 71: 9-19.

Assman, S.M. (1993) Patch clamping plant cells: Tips and tricks. *Axobits* 12: 10-1.

Assman, S.M.; Simoncini, L.; Schroeder, J. (1985) Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplast of *Vicia faba*. *Nature* 318: 285-87.

Atkinson, M.M.; Baker, C.J. (1989) Role of plasmalemma H⁺ATPase in *pseudomonas syringae* induced K⁺/H⁺ exchange in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 91: 298-303.

Ballio, A.; Graniti, A.; Pochiarini, F.; Silano, V. (1968) *Life Sci.* 7: 751.

Barber, D.A (1968) *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 19: 71-8.

Barber, D.A. (1972) "Dual-isotherms" for the absorption of ions by plant tissues *New Phytol.* 71: 255-62.

Barber, S.A. (1981) in *Soil nutrient bioavailability*. Wiley and sons. New York. pp: 45-231.

Barr, R.; Craig, T.A.; Crane, F.L. (1985A) Transmembrane ferricyanide reduction in carrot cells. *Biochim. Biophys. Acta* 812: 49-54.

Barr, R.; Crane, F.L.; Craig, T.A. (1984) Transmembrane ferricyanide reduction in tobacco callus cells. *J. Plant Growth Regul.* 2: 243-9.

Barr, R.; Sandelius, A.S.; Crane, F.L.; Morr , D.J. (1985B) Oxidation of reduced pyridine nucleotides by plasma membranes of soybean hypocotyl. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131: 943-8.

Barr, R.; Sandelius, A.S.; Crane, F.L.; Morr , D.J. (1986) Redox reactions of tonoplast and plasma membranes isolated from soybean hypocotyls by free-flow electrophoresis. *Biochim. et Biophys. Acta* 852: 254-61.

Baum, J.A.; Scandalios, J.G. (1979) Developmental expression and intracellular localization of Superoxide dismutase in maize. *Differentiation* 13: 133-40.

Beauchamp, C.O.; Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44:276-87.

Beavis, A.O.; Garlid, K.D. (1983) *Fed. Proc.* 42: 1096.

Becana, M.; Paris, F.J.; Sandalio, L.M.; Del Rio, L.A. (1989) Isoenzymes of superoxide dismutase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L. and *Vigna unguiculata* L. walp. *Plant. Physiol.* 90:1286-92.

Beffagna, N.; Romani, G.; Lovadina, S. (1993) Inhibition of malate synthesis by vanadate implications for the cytosolic alkalization induced by vanadate concentrations. Partially inhibiting the plasmalemma H⁺ pump. *Journa of Experimental Botany.* Vol 44. 267: 1535-42.

Bellando, M.; Marr , M.T.; Sacco, S.; Talarico, A.; Venegoni, A.; Marr  E. (1995) Transmembrane potential-mediated coupling between H⁺ pump operation and K⁺ fluxes in *Elodea densa* leaves hyperpolarized by fusicoccin, light or acid load. *Plant Cell and Environment* 18: 963-76.

Bellando, M.; Trotta, A., Bonetti, A.; Colombo, R.; Lado, P.; Marr , E. (1979) Dissociation of H⁺ extrusion from K⁺ uptake by means of lipophilic cations. *Plant. Cell Environ* 2: 39-47.

Bennett, A.B.; O'Neill, S.D.; Spanswick, R.M. (1984) H⁺ATPase activity from storage tissue of *Beta vulgaris* L. I. identification and characterization of an anion-sensitive H⁺ATPase. *Plant Physiol.* 74: 538-44.

Bentrup, F.W. (1990) Potassium ion channels in the plasmalemma. *Physiol. Plant.* 79: 705-11.

Bentrup, F.W.; Pfrüner, H.; Wagner, G. (1968) *Planta (Berl.)* 110: 751.

Betz, C.; Ullrich, C.I.; Hartung, W. (1993) Tetracycline and abscisic acid-sensitive reduction of extracellular ferricyanide by mesophyll cells of *Valerianella locusta* and *Lemna gibba*. *Journal of Experimental Botany.* Vol 44 258: 35-9.

Bienfait, H.F. (1985) regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake. *J. Bioenerg. Biomembr.* 17: 73-83.

Bienfait, H.F.; Bino, R.J.; Van der Bliek, A.M.; Duivenoorden, J.F.; Fontaine, J.M. (1983) Characterization of ferric-reducing activity in roots of Fe-deficient *phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 59: 196-202.

Blatt, M.R. (1988) Potassium dependent bipolar gating of K⁺ channels in guard cells. *J. membr. Biol.* 102: 235-46.

Blatt, M.R. (1991) Ion channel gating in plants: Physiological implications and integration for stomatal function. *J. Membrane Biol.* 124: 95-112.

Blatt, M.R. (1997) Plant potassium channels double up. *Trends in Plant Science* 2: 244-6.

Blatt, M.R.; Slayman, C.L. (1987) Role of "active" potassium transport in the regulation of cytoplasmic pH by no animal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 2737-41.

Blatt, M.R.; Thiel, G. (1993) Hormonal control of ion channel gating. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 44:543-67.

Borgeson, C.E.; Bowman, B.J. (1985) *Plant Physiol.* 78: 433-7.

Borstlap, A.C. (1981) Invalidity of the multiphasic concept of ion absorption in plants. *Plant cell Environ* 4: 189-95.

Böttger, M.; Hilgendorf, F. (1988) Hormone action on transmembrane electron and H⁺ transport. *Plant. Physiol.* 86: 1038-43.

- Böttger, M.; Lüthen, H.** (1986) Possible linkage between NADH oxidation and proton secretion in *Zea mays* L. roots. *J. Exp. Bot.* 37: 666-75.
- Bowman, B.J.; Bowman, E.J.** (1982) Identification and properties of an ATPase in vacuolar membranes of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 151: 1326-37.
- Bowman, B.J.; Slayman, C.W.** (1977) Characterization of plasma membrane adenosine triphosphatase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 252: 3357-63.
- Bowman, B.J.; Slayman, C.W.** (1979) The effects of vanadate on the plasmamembrane ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 254: 2928-34.
- Bown, A.W.; Crawford, L.A.** (1988) Evidence that H⁺ efflux stimulated by redox activity is independent of plasma membrane ATPase activity. *Physiol. Plant.* 73: 170-4.
- Bridges, S.M.; Salin, M.L.** (1981) Distribution of iron containing superoxide dismutase in vascular plants. *Plant. Physiol.* 68:275-8.
- Briskin, D.P.** (1986) Plasma membrane H⁺ transporting ATPase: Role in potassium ion transport? *Physiol. Plant.* 68:159-63.
- Briskin, D.P.** (1988) Phosphorylation and dephosphorylation reactions of the red beet plasma membrane ATPase studied in the transient state. *Plant Physiol.* 88: 84-91.
- Briskin, D.P.; Hanson, J.B.** (1992) How does the plant plasma membrane H⁺-ATPase pump protons?. *Journal of Experimental Botany.* Vol 43. 248: 269-89.
- Briskin, D.P.; Poole, R.J.** (1984) Characterization of the solubilized plasma membrane ATPase of red beet. *Plant Phys.* 76: 26-30.
- Brow, H.D.; Jackson, R.T.; Dupuy, H.J.** (1964) *Nature* 202: 722-3.
- Brummell, D.A.; Hall, J.L.; Armstrong, C.S.** (1986) Effect of vanadate on microsomal ATPase activity, acidification of the medium and auxin-stimulated growth in pea and cucumber. *Ann. Botany* 57: 727-35.
- Buckhout, T.J.; Hubrec, T.C.** (1986) Pyridin nucleotide-dependent Ferricyanide reductases associated with isolate plasma membranes of maize (*Zea mays*) roots. *protoplasma* 135: 144-54.

Bueno, P.; del Rio, L.A. (1992) Purification and properties of glycosomal cuprozinic superoxide dismutase from watermelon cotyledons (*Citrullus vulgaris* Schard). *Plant Physiol.* 98:331-6.

Burke, J.J.; Gamble, P.E.; Hatfield, J.L.; Quisenberry, J.E. (1985) Plant morphological and biochemical responses to field water deficits. I. Response of glutathione reductase activity and paraquat sensitivity. *Plant. Physiol.* 79: 415-9.

Bush, D.S.; Hedrich, R.; Schroeder, J.I.; Joves, R.L. (1988) Channel-mediated K⁺ flux in barley aleurone protoplasts. *Planta* 176:368-77.

Cakmak, I.; Marschner, H. (1987) Mechanism of phosphorus-induced zinc deficiency in cotton. III Changes in physiological availability of zinc plants. *Physiol. Plant.* 70:13-20.

Cakmak, I.; Marschner, H. (1988) Zinc-dependent changes in ESR signals, NADPH oxidase and plasma membrane permeability in cotton roots. *Physiol. Plant.* 73:182-6.

Cakmak, I.; Marschner, H. (1992) Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase, and Glutathione Reductase in bean leaves. *Plant. Physiol.* 98:1222-7.

Cantiello, H.F.; Stow, J.L.; Prat, A.G.; Ausiello, D.A. (1991) Actin filaments regulate epithelial Na⁺ channel activity. *Am. J. Physiol.* 261:C882-8.

Cantley, L.C.; Cantley, L.G.; Josephson, L. (1978) A characterization of vanadate interaction with the (Na K)-ATPase. Mechanistic and regulatory implications. *J. Biol. Chem.* 253: 7361-8.

Cao, Y.; Ward, J.M.; Kelly, W.B.; Ichida, A.M.; Gaber, R.F.; Anderson, J.A.; Uozumi, N.; Schroeder, J.I.; Crawford N.M. (1995) Multiple genes, tissue specificity, and expression-dependent modulation contribute to the functional diversity of potassium channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Physiol.* 109: 1093-106.

Cartwright, B. (1972) *Soil. Sci. Plant Anal.* 3: 313-22.

Castillo, F.J.; Cotton, G.; Kevers, C.; Greppin, H.; Gaspar, T.; Van den Diessche, T. (1986) *Differentiation* 33: 17-23.

Chai, H.B.; Doke, N. (1987) Systemic activation of O_2^- generating reaction, superoxide dismutase, and peroxidase in potato plants in relation to induction of systemic resistance to *Phytophthora infestans*. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 53: 585-90.

Chalmers, J.D.C.; Coleman, J.O.D.; Walton, N.J.(1984) use of an electro-chemical technique to study plasmamembrane redox reactions in cultured cells of *Danais carota* L. Plant. Cell Rep. 3: 243-6.

Cheesman, J.M.; Hanson, J.B. (1979) Energy-linked potassium influx as related to cell potential in coorn roots. Plant. Physiol. 64:842-45.

Churchill, K.A.; Holaway, B.; Sze, H. (1983) Separation of two types of electrogenic H^+ -pumping ATPases from oat roots. Plant. Physiol. 73: 921-8.

Cleland, R.E. (1976) kinetics of hormone-induced H^+ excretion. Plant Physiol. 58: 210-13.

Coan, C.; Scales, B.J.; Murphy, A.J. (1986) Effects of oligovanadate binding on S.R. ATPase. J. Biol. Chem. 261: 10394-402.

Coen, J.D.; Nadler, K.D. (1976) Calcium requeriment for indolacetic acid induced acidification by *Avena coleoptiles*. Plant. Physiol. 57: 347-50.

Colombo, R.; Bonetti, A.; Cerana, R.; Lado, P. (1981) Effecto of plasmalemma ATPase inhibitors, Diethylbestrol and Orthovanadate, on Fusicoccin-induced H^+ extrusion in maize roots. Plant Science Lett. 21: 305-15.

Colombo, R.; Cerana, R. (1991) Inward rectifying K^+ channels in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* Plant. Physiol. 97: 1130-5.

Colombo, R.; Cerana, R. (1993) Effect of temperature on plasma membrane and tonoplast ion channels in *Arabidopsis thaliana*. Phisiol. Plant. 87: 118-24.

Cooper, S.; Lerner, H.R.; Reinholt, L. (1991) Evidence for a highly specific K^+/H^+ antiporter in membrane vesicles from oil-seed rape hypocotyls. Plant. Physiol. 97:1212-20.

Craig, T.A.; Crane, F.L. (1981) Evidence for a transplasma membrane electron transport system in plant cells. Proc. Indiana Acad. Sci. 90: 150-5.

Craig, T.A.; Crane, F.L. (1982) Hormonal control of a transplasmamembrane electron transport system in plant cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 150-4

Craig, T.A.; Crane, F.L. (1985) The trans-plasma membrane redox system in carrot cells: inhibited by membrane impermeable DABS and involved in H⁺ release from cells. In Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology. Vol. 4 247. Univ. Missouri Columbia.

Cram, W.J. (1968) J. Exp. Bot. 19: 611-6

Crane, F.L.; Sun, I.L.; Clark, M.G.; Grebing, C.; Löw, H. (1985) Transplasma membrane redox system in growth and development. Biochim. Biophys. Acta. 811: 233-64.

Cruz-Mireles, R.M.; Ortega-Blake, J. (1991) Effect of Na₃VO₄ on the P state of *Nitella translucens*. Plant. Physiol. 96: 91-7.

Czempinski, K.; Zimmermann, S.; Ehrhardt, T.; Mueller-Roeber, B. (1997) New structure and function in plant K⁺ channels: KCO, an outward rectifier with a steep Ca₂⁺ dependency. EMBO J. (In Press).

Dalton, F.N. (1984) Dual Pattern of potassium transport in plant cells: a physical artifact of a single uptake mechanism. J. Exp. Bot. 35: 1723-32.

Davis, R.F.; Jaworski, A.Z. (1979) Effects of ouabain and low temperature on the sodium efflux pump in excised corn roots. Plant Physiol. 63: 940.

Declaire, M.; De Cat, W.; De Temmerman, L.; Baeten, H. (1984) Modifications de l'activité des peroxidase, catalase et superoxide dismutase dans des feuilles d'épinard traité à l'ozone. J. Plant. Physiol. 116:147-52.

Del Rio, L.A.; Lyon, D.S.; Olah, I. Glick, B.; Salin, M.L. (1983) Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. Planta 158: 216-24.

Del Rio, L.A.; Sandalio, L.M.; Yanez, J.; Gómez, M. (1985) Induction of a manganese-containing superoxide dismutase in leaves of *Pisum sativum* L. by high nutrient levels of zinc and manganese. J. Inorg. Biochem. 24:25-34.

De Michelis, M.I.; Rasi-Caldogno, F.; Pugliarello M.C. (1984) On the inhibiting effect of Oligomycin on Mg ATP dependent ΔpH and $\Delta \Psi$ in microsomal vesicles from radish. *Plant. Sci. Lett.* 36: 111-7.

De Michelis, M.I.; Spanswick, R.M. (1986) H^+ -pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant. Physiol.* 81: 542-7.

Devlin, W.S.; Gustine, D.L. (1992) Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. *Plant. Physiol.* 100:1189-95.

Dhindsa, R.S.; Matowe, W. (1981) Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.* 32:79-91.

Doke, N. (1983) Generation of Superoxide anion by potato tuber protoplast during of hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiological Plant Pathology* 23: 359-67.

Doke, N. (1985) NADPH-dependent O_2^- generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Phys. Plant. Pathol.* 27: 311-22

Döring, O.; Böttger, M. (1994) Temperature dependence of trans plasma membrane electron transport in *Zea mays* L. roots. *Plant. Cell and Environment* 17: 451-6.

Döring, O.; Lüthje, S.; Böttger, M. (1992) Modification of the activity of the plasma membrane redox system of *Zea mays* L. roots by vitamin K_3 and Dicumarol. *Journal of Experimental Botany.* Vol 43. 247: 175-81.

Droillard, M.J.; Paulin, A. (1990) Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Physiol. Plant.* 94: 1187-92.

Droillard, M.J.; Paulin, A.; Massot, J.C. (1987) Free radical production catalase and superoxide dismutase activities and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Physiol. Plant.* 71:197-202.

Duke, M.V.; Salin, M.L. (1985) Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eukariote, *Ginkgo biloba*. Arch Biochem. Biophys. 243: 305-14.

Dupont, F.M.; Tanaka, C.K.; Horkman W.J. (1988) Separation and immunological characterization of membrane fractions from barley roots. Plant Physiol. 86:717-24.

Elstner, E.F. (1982) Oxygen activation and oxygen toxicity. Ann. Rev. Plant Physiol. 33:73-96.

Elzam, O.E.; Rains, D.W.; Epstein, E. (1964) Ion transport kinetics in plant tissue: Complexity of the chloride absorption isotherm. Biochem Biophys. Res. Commun 15: 273-76.

Elzenga, J.T.M.; Keller, C.P.; Van Volkenburgh, E. (1991) Patch clamping protoplasts from vascular plants. Method for the quick isolation of protoplasts having a high success rate of gigaseal formation. Plant. Physiol. 97: 1573-5.

Elzenga, J.T.M.; Staal, M.; Prins, H.B.A. (1989) ATPase activity of isolated plasma membrane vesicles of leaves of Elodea as affected by thiol reagents and NADH/NAD⁺ ratio. Phisiol. Plant. 76: 379-85.

Epstein, E. (1966) Nature 212: 1324-27.

Epstein, E. (1973) Mechanism of ion transport through plant cell membranes. Int. Rev. Cytol. 34: 123-68.

Epstein, E.; Hagen, C.E. (1952) A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. Plant Physiol. 27: 457-74.

Epstein, E.; Rains, D.W.; Elzam, O.E. (1963) Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. Proc. Natl. Acad. Sci. US. 49: 684-92.

Espinosa, F. (1991) Estudio del eflujo neto de protones por raíces de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) en condiciones normales y de toxicidad de Boro. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.

Espinosa, F.; Alvarez-Tinaut, M.C. (1987) Medida de la extrusión de H^+ en raíces aisladas de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) en condiciones estériles y no estériles. En VII Reunión Nacional de la SEFV. pp: 208.

Espinosa, F.; Alvarez-Tinaut, M.C. (1992) Estudio del eflujo neto de H^+ por raíces aeropónicas estériles de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) bajo condiciones de toxicidad de B. En Contaminación: Efectos fisiológicos y mecanismos de actuación de contaminantes. pp: 313-29.

Espinosa, F.; Paredes, M.A.; Alvarez-Tinaut, M.C. (1991) Efecto de algunos inhibidores y efectores sobre el eflujo de H^+ y el consumo de O_2 por raíces estériles de *Helianthus annuus* L. En IX Reunión Nacional de la SEFV. II Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. pp: 141.

Espinosa, F.; Paredes, M.A.; Garrido, I.; Utrera, G.; Alvarez-Tinaut, M.C. (1989) Respuesta a la temperatura de la extrusión de H^+ por raíces de girasol (*Helianthus annuus* L.) En VIII Reunión Nacional de la SEFV. I Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. pp: 84.

Espinosa, F.; Paredes, M.A.; Santos, H.; Pinto-Ricardo, C.; Alvarez-Tinaut, M.C. (1992) Vanadate and Oligomycin effect on cytoplasmic pH, Net H^+ efflux and O_2 consumption of sterile sunflower roos. *Physiol. Plant.* 85: A-14.

Farley-Grenot, K.; Assmann, S. (1991) Evidence for G-Protein regulation of inward K^+ channel current in guard cells of fava bean. *The Plant Cell* Vol 3 n°9:1037-44.

Federico, R.; Giantosio, C.E. (1983) A transplasma membrane electron transport system in maize root. *Plant Physiol.* 73: 182-4.

Fisher, J.D.; Hausen, D.; Hodges, T.K. (1970) Correlation between ion fluxes and ion stimulated adenosine triphosphatase activity of plant roots *Plant Physiol.*46: 812-4.

Fridovich, I. (1975) Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* 44:147-59.

Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* 201:875-80.

Fry, S.C. (1983) Feruloyted pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. *Planta* 157: 111-23.

Gabbay-Azaria, R.; Pick, V.; Ben-Hayyim, G.; Tel-Or, E. (1994) The involvement of a vanadate-sensitive ATPase in plasma membranes of a salt tolerant cyanobacterium. *Physiol. Plant.* 90: 692-8.

Gabathuler, R.; Cleland, R. E. (1985) Auxin regulation of a proton translocating ATPase in pea root plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* 79: 1080-5.

Garrido, I.; Espinosa, F.; Paredes, M.A.; Alvarez-Tinaut, M.C. (1997) Reacciones oxidativas de defensa en raíces aeropónicas estériles de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) desencadenadas por tratamiento con Metil-Jasmonato. En XII Reunión Nacional de la SEFV. V Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. pp:160-1.

Gassman, W.; Rubio, F.; Schroeder, J.I. (1996) Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *Plant. J.* 10: 869-82.

Gassman, W.; Ward, J.; Schroeder, J.I. (1993) Physiological role of inward-rectifying K⁺ channels. *The Plant Cell* Vol 5 N° 11:1491-3.

Gautier, H.; Vavasseur, A.; Lascève, G.; Boudet, A.M. (1992) Redox processes in the blue light response of guard cell protoplasts of *Commelina communis* L. *Plant. Physiol.* 98:34-8.

Giannopolitis, C.N.; Ries, S.K. (1977) Superoxide dismutase. I Occurrence in higher plants. *Plant. Physiol.* 59:309-14.

Gonzalez-Darós, F.; Carrasco-Luna, J.; Calatayud, A.; Salguero, J.; del Valle-Tascón, S. (1993) Effects of calmodulin antagonist on auxin-stimulated proton extrusion in *Avena sativa* coleoptile segments. *Physiol. Plant.* 87: 68-76.

Gonzalez-Reyes, J.A.; Döring, O.; Navas, P.; Obst, G.; Böttger, M. (1992) the effect of ascorbate free radical on the energy state of the plasma membrane of onion (*Allium cepa* L.) root cells: alteration of K⁺ efflux by ascorbate? *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 177-83.

Göring, H. (1976). Die Bedeutung ungeörterter Schichten für die Kinetik des Trägerharnmittelten Membrantransportes in pflanzlichen Geweben. *Wissz. Humboldt-Universität Math-Naturwiss. Reihe* 25: 61-65.

Grabov, A.; Böttger, M. (1994). Are redox reactions involved in regulation of K^+ channels in the plasma membrane of *Limnobium stoloniferum* root hairs?. *Plant. Physiol.* 105: 927-35.

Grabov, A.; Felle, H.; Böttger, M. (1993) Modulation of the plasma membrane electron transfer system in root cells of *Limnobium stoloniferum* by external pH. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 44 261: 725-30.

Gronwald, J.W.; Leonard, R.T. (1982) Isolation and transport properties of protoplasts from cortical cells of corn roots. *Plant Physiol.* 70: 1391-5.

Gross, G.G. (1977) Cell wall-bound malate deshydrogenase from Horseradish. *Phytochemistry*. 16:319-21.

Grouzis, J.P.; Gibrat, R.; Rigaud, A.; Georges, A.; Grignon, G. (1990) Potassium stimulation of corn root plasmalemma ATPase. *Plant. Physiol.* 93: 1175-82.

Guern J.; Ullrich, C.I. (1988) The ferricyanide-driven redox system at the plasmalemma of plant cells: origin of the proton production and reappraisal of the stoichiometry e^-/H^+ . In *Plasma Membrane Oxidoreductases in Control of Animal and Plant Growth* (F.L. Crane; D.J. Morré and H. Löw eds) 256-62. Plenum Press, New York ISBN 0-306-43092-4.

Halliwell, B. (1984) Oxygen-derived species and herbicide action. *Physiol. Plant.* 15:21-4.

Hamill, O.P.; Marty, A.; Neher, E.; Sackmann, B.; Sigworth, F.J. (1981) *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 391:85-100.

Haschke, H.P.; Lüttge, U. (1973) *Z. Naturforsch* 28: 555.

Hassidim, M.; Braun, Y.; Lerner, H.R.; 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.**

Hassidim, M.; Rubinstein, B.; Lerner, H.R.; Reinhold, L. (1987) generation of a membrane potential by electron transport in plasmalemma-enriched vesicles of cotton and radish. *Plant. Physiol.* 85: 872-5.

Hayakawa, T.; Kanematsu, S.; Asada, K. (1984) Occurrence of CuZn Superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach chloroplast. *Plant Cell Physiol.* 25:883-9.

Hedrich, R.; Barbier-Brygoo, H.; Felle, H.; Flügge, U.I.; Lüttge, U.; Maathuis, F.J.M.; Marx, S.; Prins, H.B.A.; Raschke, K.; Schnabl, H.; Schroeder, J.I.; Struve, I.; Taiz, L.; Ziegler, P. (1988) General mechanisms for solute transport across the tonoplast of plant vacuoles: a patch-clamp survey of ion channels and proton pumps. *Bot. Acta* 101:7-13.

Hedrich, R.; Schroeder, J.I. (1989) The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 40: 539-69.

Heiska, E. Huttunen, S. (1987) Seasonal variation of superoxide dismutase activity in pine and spruce needles. *Aquilo Ser Bot.* 25:39-47.

Hensike, G.H.; Taylor, A.R.; Brownlee, C.; Assman, S.M. (1996) Laser microsurgery of higher plant cell walls permits patch-clamp access. *Plant. Physiol.* 110: 1063-8.

Hérovart, D.; Bowler, C.; Tsang, E.W.T.; Van Camp, W.; Van Montagu, M. Inzé, D. (1991) Differential expression of superoxide dismutase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* exposed to environmental stress conditions. En: Active oxygen/oxidative stress and plant Metabolism. American Society of Plant Physiologist. pp:250-2.

Hesse, J.E.; Wicorek, L.; Altendorf, K.; Peicin, A.S.; Dorus, E.; Epstein, E. (1984) Sequence homology between two membrane-transport ATPase the Kdp-ATPase of *E. coli* and the Ca_2^+ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 4746-50.

Higinbotham, N. (1973) Electropotentials of plant cells. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 24: 25-46.

Hodges, T.K. (1973) Ion absorption by plants roots. *Adv. Agron.* 25: 163-207.

Hodges, T.K. (1976) ATPase associated with membranes of plant cells. In *Encyclopedia of Plant Physiology New serie.* Lüttge and Pitman eds. Springer-Verlag Berlin. Vol 2A: 260.

Homblé, F. (1987) A tight-seal whole cell study of the voltage-dependent gating mechanism of K⁺-channels of protoplasmic droplets of *Chara corallina*. *Plant. Physiol.* 84: 433-7.

Homblé, F.; Ferrier, J.M.; Dainty, J. (1987) Voltage-dependent K⁺- channel in protoplasmic droplets of *Chara corallina* a single channel patch clamp study. *Plant. Physiol.* 83: 53-7.

Horemans, N.; Asard, H.; Caubergs, R.J. (1994) The role of ascorbate free radical as an electron acceptor to cytochrome b mediated trans-plasma membrane electron transport in higher plants. *Plant. Physiol.* 104: 1455-8.

Huerta, A.J. y Murphy, T.M. (1989A) Effects of extracellular pH on UV-induced K⁺ efflux from cultured rose cells. *Plant. Physiol.* 90:749-53

Huerta, A.J.; Murphy, T.M. (1989B) Kinetics of efflux of K⁺ from cultured rose cells treated with ultraviolet light. *Physiol. Plant.* 77: 525-30.

Ivankina, N.G.; Novack, V.A. (1980) H⁺ transport across plasmalemma. H⁺ATPase or redox chain? in plant membrane transport. *Current Conceptual Issues*. Amsterdam Elsevier North-Holland Biomed. Press. 503-4.

Ivankina, N.G.; Novack, V.A. (1988) Transplasmalemma redox reactions and ion transport in photosynthetic and heterotrophic plant cells. *Physiol. Plant.* 73: 161-4.

Ivankina, N.G.; Novack, V.A.; Micalshevich, A.I. (1984) Redox reactions and active H⁺-transport in the plasmalemma of *Elodea* leaf cells. In Cram, Janacek, Rybova, Sigler eds. *Membrane transport in Plant*. John Wiley & sons. Chichester, Sussex. England. pp: 404-5.

Jackson, C.; Dench, J. Moore, A.L.; Halliwell, B.; Foyer, C.; Hall, D.O. (1978) Subcellular localization and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. *Eur. J. Biochem.* 91:339-44.

Jacobs, M.; Taiz, L. (1980) Vanadate inhibition of auxin-enhanced H⁺ secretion and elongation in pea epicotyls and oat coleoptiles. *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (12): 7242-6.

Jensen, P.; Erdei, L.; Moller, I.M. (1987) K⁺ uptake in plant roots: Experimental approach and influx models. *Physiologia Plantarum*. 70: 743-48.

Jesaitis, A.J.; Heners, P.R.; Hertel, R.; Briggs, W.R. (1977) Characterization of a membrane fraction containing a b-type cytochrome. *Plant. physiol.* 59: 941-7.

Jeschke W.D. (1970) Evidence for a K⁺ stimulated Na⁺ efflux at the plasmalemma of barley root cell. *Planta* 94 :240.

Jeschke W.D. (1979) Univalent cation selectivity and compartmentation in cereals. In *Recent Advances in the Biochemistry of Cereals*. Laidman and Wyn Jones eds. Academic press New York. 37.

Kanematsu, S.; Asada, K. (1979) Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*. *Biochem. Biophys.* 195:535-45.

Kasamo, K. (1986) Purification and properties of the plasma membran H⁺-translocating adenosine triphosphatase of *Phaseolus mungo* L. roots. *Plant. Physiol.* 80: 818-24.

Ketchum, K.A.; Joiner, W.J.; Sellers, A.J.; Kaczmarek, L.K. (1995) **A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem.** *Nature* 376: 690-5.

Ketchum, K.A.; Shrier, A.; Poole, R.J. (1989) Characterization of potassium dependent currents in protoplasts of corn suspension cells. *Plant. Physiol.* 89: 1184-92.

Ketchum, K.A.; Slayman, C.W. (1996) Isolation of an ion channel gene from *Arabidopsis thaliana* using the H5 signature sequence from voltage-dependent K⁺ channels. *FEBS Lett.* 378: 19-26.

Kim, H.Y.; Coté, G.G.; Crain, R.C. (1992) Effects of light on the membrane potential of protoplasts from *Samanea saman* pulvini. Involvement of the K⁺ channels and the H⁺ATPase. *Plant Physiol.* 99:1532-9.

Kjellbom, P.; Larsson, C. (1984) Preparation and polypeptide composition of chlorophyll-free plasma membranes from leaves of light-grown spinach and barley. *Physiol. Plant.* 62: 501-9.

Kjellbom, P.; Larsson, C.; Askerlund, P.; Schelin, C.; Widell, S. (1985) Cytochrome P450-420 in plant plasma membranes: A possible component of the blue light reducible flavoprotein-cytochrome complex. *Photochem. Photobiol.* 42: 779-83.

Klotz, M.G.; Erdei, L. (1988) Effect of tentoxin on K⁺ transport in winter wheat seedlings of different K⁺-status. *Physiol. Plant.* 72: 298-304.

Kochian, L.V.; Lucas, N.J. (1982) Potassium transport in corn roots. Resolution of kinetics into a saturable and linear components. *Plant Physiol.* 70: 1723-31.

Kochian, L.V.; Lucas, N.J. (1983) Potassium transport in corn roots II. The significance of the root periphery. *Plant Physiol.* 73: 208-15.

Kochian, L.V.; Lucas, N.J. (1985) Potassium transport in corn roots III. Perturbation by exogenous NADH and ferricyanide. *Plant Physiol.* 77: 429-36.

Kochian, L.V.; Lucas, N.J. (1991). Do plasmalemma reductases play a role in plant mineral ion transport?. In F. Crane, D. Morré, H. Löw eds. *Oxidoreduction at the Plasma Membrane, Relation to Growth and Transport*. Vol 2 Plants CRC Press Boca Raton F, L. pp189-206.

Kochian, L.V.; Lucas, N.J. (1993) Can K⁺ channels do it all?. *The Plant Cell* vol 5, n° 7: 720-1.

Kochian, L.V.; Shaff, J.E.; Lucas, W.J. (1989) High affinity K⁺ uptake in maize roots. A lack of coupling with H⁺ efflux. *Plant Physiol.* 91: 1202-11.

Kochian, L.V.; Xin Zhi, J.; Lucas, N.J. (1985) Potassium transport in corn roots IV. Characterization of the linear component. *Plant Physiol.* 79:771-6.

Kröniger, W.; Rennenberg, H.; Polle, A. (1992) Purification of two superoxide dismutase isozymes and their subcellular localization in needles and roots of norway spruce (*Picea abies* L.) trees. *Plant. Physiol.* 100:334-40.

Kwiatowski, J.; Safianowska, A.; Kaniuga, Z. (1985) Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from tomato leaves *Lycopersicon esculentum*. *Eur. J. Biochem.* 146:459-66.

Kylin, A. (1973) *The Liverpool workshop on ion transport in plants*. London Academic.

- Larsson, C.** (1985) Plasma membranes. In *Methods of Plant Analysis (NS)* Ed. N.F. Linskens J.F. Jakson. pp 85-104 Berlin: Springer-Verlay.
- Laties, G.G.** (1969). Dual Mechanisms of salt uptake in relation to compartmentation and long distance transport. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20: 89-116.
- Leonard, R.T.; Hodges, T.K.** (1973) characterization of plasma membrane associated adenosine triphosphatase activity of oat roots. *Plant. Physiol.* 52: 6-12.
- Leong, T-Y.; Briggs, W.R.** (1981) Partial purification of a blue light-sensitive cytochrome-flavin complex from corn membranes. *Plant Physiol.* 67: 1042-6.
- Leong, T-Y.; Briggs, W.R.** (1982) Evidence from studies with acifluorfen for participation of a flavin-cytochrome complex in blue light photoreception for phototropism of oat coleoptiles. *Plant Physiol.* 70: 875-81.
- Leong, T-Y.; Vierstra, R.D.; Briggs, W.R.** (1981) A blue light-sensitive cytochrome-flavin complex from corn coleoptiles. Further characterization. *Photochem. Photobiol.* 34: 697-703.
- Lew, R.R.** (1991A) Substrate regulation of single potassium and chloride ion channels in *Arabidopsis* plasma membrane. *Plant. Physiol.* 95: 642-7.
- Lew, R.R.** (1991B) Electrogenic transport properties of growing *Arabidopsis* root hairs. *Plant Physiol.* 97: 1527-34.
- Lew, R.R.; Serlin, B.S.; Schauf, C.L.; Stockton, M.E.** (1990A) Red light regulates calcium-activated potassium channels in *Mougeotia* plasma membrane. *Plant. Physiol.* 92: 822-30.
- Lew, R.R.; Serlin, B.S.; Schauf, C.L.; Stockton, M.E.** (1990B) Calcium activation of *Mougeotia* potassium channels. *Plant. Physiol.* 92: 831-6.
- Lin, W.** (1982A) Isolation of NADH oxidation system from the plasmalemma of corn root protoplasts. *Plant. Physiol.* 70: 326-8.

Lin, W. (1982B) Response of corn root protoplasts to exogenous NADH: oxygen consumption, ion uptake and membrane potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 3773-6.

Lin, W. (1984) Further characterization on the transport property of plasmalemma NADH oxidation system in isolated corn root protoplasts. *Plant Physiol.* 74: 219-22.

Lin, W. (1985) Energetics of membrane transport in protoplasts. *Physiol. Plant.* 65: 102-8.

Lin, W.; Hanson, J.B. (1976) Cell potentials, cell resistance and proton fluxes in corn root tissue. Effects of dithioerythritol. *Plant Physiol.* 58: 276-82.

Linask, J.; Laties, G.G. (1973) Multiphasic absorption of glucose and 3-O methyl-glucose by aged potato slices. *Plant. Physiol.* 51: 289-94.

Louga, M.A.; Del Rio, L.A.; Palma, J.M. (1994) Superoxide dismutase of chestnut leaves, *Castanea sativa*: Characterization and study of their involvement in natural leaf senescence. *Physiol. Plant.* 92:227-32.

Lumsden, J.; Hall, D.O. (1974) Soluble and membrane bound superoxide dismutase in a blue green alga (*spirulina*) and spinach. *Biochem. Biophys. Res Commun* 58:35-41.

Lundborg, T.; Widell, S.; Larsson, C. (1981) Distribution of ATPase in wheat root membranes separated by phase partition. *Physiol. Plant.* 52: 89-95.

Luster, D.G.; Buckhout, T.J. (1988) Characterization and partial purification of multiple electron transport activities in plasmamembranes from maize (*Zea mays*) roots. *Physiol. Plant.* 73: 339-47.

Luster, D.G.; Buckhout, T.J. (1989) Purification and identification of a plasma membrane associated electron transport protein from maize (*Zea mays*) roots. *Plant. Physiol.* 91: 1014-9.

Lüthen, H.; Böttger, M. (1988) Hexachloroiridate as an electron acceptor for a plasmalemma redox system in maize roots. *Plant. Physiol.* 86: 1044-7.

Lüthen, H.; Böttger, M. (1993) Induction of elongation in maize coleoptiles by hexachloroiridate and its interrelation with auxin and fusicoccin action. *Physiol. Plant.* 89:77-86.

Lüthje, S.; Böttger, M. (1989) Hexabromoiridate IV as an electron acceptor: Comparison with hexachloroiridate IV and hexacianoferrate III. *Biochimica et Biophysica Acta* 977: 335-40.

Lüthje, S.; Döring, O.; Böttger, M. (1992) The effects of vitamin K₃ and Dicumarol on the plasma membrane redox system and H⁺ pumping activity of *Zea mays* L. roots measured over a log time scale. *J. Expmtal Botany* Vol 43. 247: 183-8.

Maathuis, F.J.M.; Ichida, A.M.; Sanders, D.; Schroeder, J.I. (1997) Roles of higher plant K⁺ channels. *Plant. Physiol.* 114: 1141-9.

Maathuis, F.J.M.; Sanders, D. (1994) Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 9272-6.

Maathuis, F.J.M.; Sanders, D. (1995) Contrasting roles in ion transport of two K⁺ channel types in root cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 197: 456-64.

Maathuis, F.J.M.; Sanders, D. (1997) Regulation of K⁺ absorption in plant root cells by external K⁺: interplay of different K⁺ transporters. *J. Exp. Bot.* 48: 451-8.

Macara, I.G. (1980) Vanadium-an element in search of a role. *Trends. Biochem. Sci.* 5: 92-4.

Macri, F.; Vianello, A. (1986) Independence of trans-plasmamembrane proton gradient from NAD(P)H ferricyanide oxidoreduction in maize root microsomes. *Plant Sci.* 43: 25-30.

Mac Robbie, E.A.C. (1962) *J. Gen. Physiol.* 45: 861-78.

Mac Robbie, E.A.C. (1970). *Quart Rev. Biophys.* 3: 251-93.

Mac Robbie, E.A.C. (1971) Fluxes and compartmentation in plant cells. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 22: 75-96.

Mac Robbie, E.A.C. (1987) Ionic relations in guard cells. In stomatal function (Mac Robbie, Zeiger y Farguar eds.) Stanford University Press. Stanford CA. pp: 125-6.

Malone, C.P.; Burke, J.J.; Hanson, J.B. (1977) *Plant. Physiol* 60: 916.

Mandala, S.; Taiz, L. (1985) Proton transport in isolated vacuoles from corn coleoptiles. *Plant. Physiol.* 78: 104-9.

Mann, T.; Keilin, D. (1938) Homocuprein and hepatocuprein, copperprotein compounds of blood and liver in mammals. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 126: 303-15.

Marklund, S.L. (1984) Extracellular Superoxide dismutase and other Superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.* 222: 649-55.

Marré, E. (1979) Fusicoccin: A tool in plant physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30: 273-88.

Marré, E.; Lado, P.; Rasi-Caldogno, F.; Colombo, R.; DeMichelis, M.I. (1974) Evidence for the coupling of proton extrusion to K^+ uptake in pea internode segments treated in fusicoccin or auxin. *Plant. Sci. Lett.* 3: 365-79.

Marré, E.; Lado, P.; Rasicaldogno, F.; Colombo, R. (1972) *Rend. Acad. Naz. Lincei.* 53: 453.

Marré, M.T.; Moroni, A.; Albergoni, F.G.; Marré E. (1988) Plasmalemma redox activity and H^+ extrusion. 1-Activation of the H^+ pump by ferricyanide induced potential depolarization and cytoplasm acidification. *Plant Physiol.* 87: 25-9.

Marschner, H. (1986) Mineral nutrition of higher plants. Institute of Plant Nutrition. University of Hohenheim Federal Republic of Germany. Academic Press. Haecourt Brace Jovanovich Publishers.

Martin, M.E.; Byers, B.R.; Olson, M.O.; Salin, M.L.; Aracenaux, J.E.L.; Tolbert, C. (1986) A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. *J. Biol. Chem.* 261:9361-7.

Matlers G.L.; Scandalios, J.G. (1986) Effect of the free radical-generating herbicide paraquat on the expression of the superoxide dismutase (Sod) genes of maize. *Biochem. Biophys. Acta* 882:29-38.

Mc Cord, J.M.; Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocuprein. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-55.

Mehdy, M.C. (1994) Active oxygen in plant defense against pathogens. *Plant. Physiol.* 105:467-72.

Miller, A.G.; Aldrich, R.W. (1996) Conversion of a delayed rectifier K⁺ channel to a voltage-gated inward rectifier K⁺ channel by three amino acid substitutions. *Neuron* 16: 853-8.

Misra, H.P.; Fridovich, I. (1972) The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. *J. Biol. Chem.* 247: 188-92.

Misra, P.C.; Craigt, A.; Crane, F.L. (1984) A link between transport and plasma membrane redox system(s) in carrot cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* 18: 143-52.

Møller, I.M.; Bèrczi, A. (1985) Oxygen consumption by purified plasmalemma vesicles from wheat roots. *FEBS lett* 193: 180-4.

Møller, I.M.; Bèrczi, A. (1986) Salicylhydroxamic acid-stimulated NADH oxidation by purified plasmalemma vesicles from wheat roots. *Physiol. Plant.* 68: 67-74.

Møller, I.M.; Crane, F.L. (1990) Redox processes in plasma membrane. In *The Plant Plasma Membrane*. (Larsson y Møller eds) Springer. Verlag. Berlin. pp:112-6.

Møller, I.M.; Lin, W. (1986) Membrane bound NAD(P)H dehydrogenases in higher plant cells. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 37: 309-34.

Monk, L.S.; Bavies, H.V. (1989) Antioxidant status of the potato tuber and Ca₂⁺ deficiency as a physiological stress. *Physiol. Plant.* 75:411-6.

Monk, L.S.; Fagerstedt, K.V.; Crawford, R.M.N. (1989) Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiol. Plant.* 76: 456-9.

Moran, N.; Ehrenstein, G.; Iwasa, K.; Mischke, C.; Bare, C.; Satter, R.L. (1988) Potassium channels in motor cells of *Samanea saman*. A Patch-Clamp study. *Plant. Physiol.* 88:643-8.

Moran, N.; Iwasa, K.; Ehrenstein, G.; Mischke, C.; Bare, C.; Satter, R.L. (1987) Effects of external K⁺ on K⁺ channels in *Samanea* protoplasts. *Plant. Physiol.* 83: 112.

Morrè, D.J.; Brightman, D.O.; Wu, L.Y.; Barr, R.; Leak, B.; Crane, F.L. (1988A) Role of plasma membrane redox activities in elongation growth in plants. *Physiol. Plant.* 73: 187-93.

Morrè, D.J.; Crane, F.L.; Barr, R.; Penel, C.; Wu, L.Y. (1988B) Inhibition of plasma membrane redox activities and elongation growth of soybean. *Physiol. Plant.* 72: 236-40.

Morrè, D.J.; Navas, P.; Penel, C.; Castillo, F.J. (1986) Auxin-stimulate NADH oxidase (semidehydroascorbate reductase) of soybean plasma membrane: role in acidification of cytoplasm? *Protoplasma.* 133: 195-7.

Müller-Röbert, B.; Ellenberg, N.; Willmitzer, L.; Busch, H.; Becker, D.; Dietrich, P.; Hoth, S.; Hedrich, R. (1995) Cloning and electrophysiological analysis of KST1, an inward rectifying K⁺ channel expressed in potato guard cells. *EMBO J.* 14: 2409-16.

Nagao, T.; Sasakawa, H.; Sugiyama, T. (1987) Purification of ATPase from the plasma membrane of maize roots and preparation of its antibody. *Plant. Cell. Physiol.* 28: 1181-6.

Nakamura, R.L.; McKendree, W.L.; Hirsch, R.E.; Sdbrook, J.C.; Gaber, R.F.; Sussman, M.R. (1995) Expression of an *Arabidopsis* potassium channel gene in guard cells. *Plant. Physiol.* 109: 371-4.

Neher, E.; Sackmann, B. (1976) *Nature* 260: 779-802.

Neufeld, E.; Bown, A.W. (1987) A plasma membrane redox system and proton transport in isolated mesophyll cells. *Plant. Physiol.* 83: 895-9.

Newman, I.A.; Kochian, L.V.; Grusak, M.A.; Lucas, J.W. (1987) Fluxes of H⁺ and K⁺ in corn roots: Characterization and stoichiometries using ion-selective microelectrodes. *Plant. Physiol.* 84: 1177-84.

Nicholls, D.G. (1987) *Bioenergética*. Ed. Reverté.

Nishio, J.N.; Whitmarsh, J. (1991) Dissipation of the proton electrochemical potential in intact and lysed chloroplast. I The electrical potential. *Plant. Physiol.* 95: 522-8.

Nissen, P. (1971) uptake of sulfate by roots and leaf slices of barley mediated of single, multiphasic mechanism. *Physiol. Plant.* 24: 315-24.

Nissen, P. (1973) Multiphasic ion uptake in roots. In Ion transport in plant (Anderson ed.) Acad. Press London. pp: 539-53.

Nissen, P. (1974) Uptake mechanisms inorganic and organic. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 53-79.

Nissen, P. (1977) Ion uptake in higher plants and KCl stimulation of plasmalemma adenosine triphosphatase comparison of models. *Physiol. Plant.* 40: 205-14.

Nissen, P. (1988) Multiphasic uptake of potassium by corn roots. No linear component. *Plant Physiol.* 86: Abstract 891.

Nissen, P. (1989). Multiphasic uptake of potassium by corn roots. No linear component. *Plant Physiol.* 89: 231-37.

Norling, B.; Nurani, G.; Franzén, L.G. (1996) Characterization of the H⁺-ATPase in plasma membrane isolated from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol. Plant.* 97: 445-53.

Novack, V.A.; Ivankina, N.G. (1978) Nature of electrogenesis and ion transport in plant cells. *Docke Biophys.* 242: 1229-32.

Olesky, N.; Bennett, A.B. (1987) H⁺ ATPase activity from storage tissue of *Beta vulgaris* IV N-N' Dicyclohexylcarbodiimide binding and inhibition of the plasma membrane H⁺ATPase. *Plant Physiol.* 83:569-72.

Olesky, N.; Mahdavi, P.; Peiser, G.; Bennett, A.B. (1987A) Transport properties of the tomato fruit tonoplast. I Identification and characterization of an anion sensitive H⁺ATPase. *Plant. Physiol.* 84: 993-6.

Olesky, N.; Mahdavi, P.; Bennett, A.B. (1987B) Transport properties of the tomato fruit tonoplast. II Citrate transport. *Plant. Physiol.* 84: 997-1000.

O'Neill, S.D.; Spanswick, R.M. (1984A) Characterization of native and reconstituted plasma membrane H⁺-ATPase from the plasma membrane of *Beta vulgaris*. *J. Membr. Biol.* 79: 245-56.

O'Neill, S.D.; Spanswick, R.M. (1984B) Effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of red beet and corn. *Plant. Physiol.* 75: 586-91.

Palma, J.M.; Sandalio, L.M.; Del Rio, L.A. (1986) Manganese superoxide dismutase and higher plant chloroplasts: a reappraisal of a controverted cellular localization. *J. Plant. Physiol.* 125:427-39.

Palmgren, M.G. (1990) An H⁺-ATPase assay: Proton pumping and ATPase-activity determined simultaneously in the same sample. *Plant Physiol.* 94: 882-6.

Paredes, M.A. (1989) La extrusión de protones dependiente de auxina en coleoptilos de *Avena sativa* L. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.

Paredes, M.A.; Espinosa, F.; Pinto Ricardo, C.P.; Alvarez-Tinaut, M.C. (1993) Efecto en el pH citoplasmático y vacuolar, contenido de ATP, eflujo de H⁺ y consumo de O₂ por raíces estériles de girasol (*Helianthus annuus* L.) en presencia de inhibidores específicos. En X Reunión Nacional de la SEFV. III Congreso Hispano-Portugués de Fisiología Vegetal. pp: 296.

Pedersen, P.L.; Carafoli, E. (1987). Ion motive ATPases I ubiquity, properties and significance to cell function. *TIBS* 12: 146-50.

Penel, C.; Castillo, F.J. (1991) Peroxidases of plant plasma membranes, apoplastic ascorbate and relation of redox activities to plant pathology. In oxidoreduction at the plasma membrane: Relation to growth and transport. Vol II Plants. 121-47. CRC press. Boca Raton F.L.

Perlin, D.S.; Spanswick, R.M. (1981) Characterization of ATPase activity associated with corn leaf plasma membranes. *Plant. Physiol.* 68: 521-6.

Pitman, M.G.; Schaefer, N.; Wildes, R.A. (1975) Relation between permeability to potassium and sodium ions and fusicoccin-stimulated hydrogen-ion efflux in barley roots. *Planta* 126: 61-73.

Poole, R.J. (1974) Ion transport and electrogenic pumps in storage tissue cells. *Can. J. Bot.* 52: 1023-28.

Poole, R.J. (1978) Energy coupling for membrane transport. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 29: 437-60.

Pupillo, P.; De Luca, L. (1982) Pyridine nucleotide-linked dehydrogenases (quinone-dependent) in plasma membrane and endoplasmic reticulum of plant cells. In *Plasmalemma and tonoplast: their functions in the plant cell.* (Marmé, Marré and Hertel eds.) Elsevier Biomedical Press B.V. Amsterdam. pp: 321-8.

Puppo, A.; Dimitrijevic, L. Rigaud, J. (1989) Superoxide dismutase and catalase activities in purified *Frankia* vesicles. *Physiol. Plant.* 77:308-11.

Purves, W.K. (1966) *Plant Physiol.* 41: 230.

Qiu, Z.S.; Rubinstein, B.; Stern, A.I. (1985) Evidence for electron transport across the plasma membrane of *Zea mays* root cells. *Planta.* 165: 383-91.

Rabotti, G.; Zocchi, G. (1994) Plasma membrane-bound H⁺ATPase and reductase activities in Fe-deficient cucumber roots. *Physiol. Plant.* 90: 779-85.

Ramirez, J.M.; Gallego, G.C.; Serrano, R. (1984) Electron transfer constituents in plasma membrane fractions of *Avena sativa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Sci. Lett.* 34: 103-10.

Rasi-Caldogno, F.; Pugliarello, M.C.; DeMichelis, M. (1985) Electrogenic transport of protons driven by the plasma membrane vesicles from radish biochemical characterization. *Plant. Physiol.* 77: 200-5.

Raschke, K. (1975) Stomatal action. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 26: 309-40.

Ratner, A.; Jacoby, B. (1976) Effect of K⁺, its counteranion and pH on sodium efflux from barley root tips. *J. Exp. Bot.* 27: 843.

Raven, J.A. (1967A) *J. Gen. Physiol.* 50:1607-25.

Raven, J.A. (1967B) *J. Gen. Physiol.* 50:1627-40.

Raven, J.A. (1971) *Planta.* 97: 28-38.

Rayle, D.L.; Cleland, R. (1977) Control of plant cell enlargement by hydrogen ions. *Current Topics Develop. Biol.* 11: 187-214.

Reed, P.W. (1979) Ionophores. *Methods Enzymol.* 55: 435-54.

Rodriguez-Navarro, A.; Blatt, M.R.; Slayman, C.L. (1986) A potassium proton symport in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Physiol.* 87: 649-74.

Römheld, V.; Muller, C.; Marschner, H. (1984) Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant. Physiol.* 76: 603-6.

Roth-Bejerano, N.; Nejdat, A.; Rubinstein, B; Itai, C. (1988) Effect of Ferricyanide on potassium uptake by intact tissue and guard cell protoplasts. *Plant. Cell Physiol.* 29:677-82.

Rubinstein, B.; Luster, D.G. (1993) Plasma membrane redox activity: components and role in plant processes. *Annu. Rev. Plnt. Physiol.* 44: 131-55.

Rubinstein, B.; Stern, A.I. (1986) Relationship of transplasmalemma redox activity to proton and solute transport by roots of *Zea mays*. *Plant. Physiol.* 80: 805-11.

Rubinstein, B.; Stern, A.I. (1990) Measurements of redox activity at the plasmalemma. *Physiol. Plant.* 80: 479-86.

Rubinstein, B.; Stern, A.I.; Stout, R.G. (1984) Redox activity at the surface of oat root cells. *Plant Physiol.* 76: 386-91.

Rubio, F.; Gassmann, W.; Schroeder, J.I. (1995) Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* 270:1660-3.

Rubio, F.; Gassmann, W.; Schroeder, J.I. (1996) High-affinity potassium uptake in plants. *Science* 273: 978-9.

Sacchi, G.A.; Cocucci, M. (1992) Effects of deuterium oxide on growth, proton extrusion, potassium influx, and in vitro plasma membrane activities in maize root segments. *Plant. Physiol.* 100: 1962-7.

Salguero, J. (1989) La extrusión de protones dependiente de auxina en coleótilos de *Zea mays* L. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

Salin, M.L. (1987) Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol. Plant.* 72:681-9.

Salin, M.L.; Bridges, S.M. (1981) Absence of the iron-containing superoxide dismutase in mitochondria from mustard (*Brassica campestris*). *Biochem. J.* 195:229-33.

Salin, M.L.; Lyon, D.S. (1983) Iron-containing superoxide dismutases in eucaryotes: localization in chloroplast from water lily, *Nuphar luteum*. In *Oxy radicals and their scavenger systems I: Molecular Aspects* (G. Cohen and R.A. Greenwald, eds) pp 344-7. Elsevier Press Amsterdam ISBN 0-444-00747-6.

Sandalio, L.M.; Del Rio, L.A. (1987) Localization of superoxide dismutase in glyoxisomes from *Citrullus vulgaris* Functional implications in cellular metabolism. *J. Plant. Physiol.* 127:395-409.

Sandalio, L.M.; Del Rio, L.A. (1988) Intraorganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxisomes and leaf peroxisomes) *Plant. Physiol.* 88:1215-8.

Sandalio, L.M.; Palma, J.M.; Del Rio, L.A. (1987) Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisus sativum* L. *Plant. Sci.* 51:1-8.

Sandelius, A.S.; Barr, R.; Crane, F.L.; Morré, D.J. (1986) redox reactions of plasma membranes isolated from soybean hypocotils by phase partition. *plant. Sci.* 48: 1-10.

Sarro, M.J.; Cadahia, C.; Masaguer, A.; Peñalosa, J. (1984) Evaluación de calcio, magnesio, potasio y sodio en disoluciones nutritivas y plantas mediante electrodos selectivos de iones. *Anales de Edafología y Agrobiología.* 1131-47.

Satter, R.L.; Galston, A.W. (1981) Mechanism of control of leaf movements. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 32: 83-110.

Sawada, Y.; Ohyama, T. Yamazaki, I. (1972) Preparation and physicochemical properties of green pea superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Acta* 268: 305-12.

Scandalios, J.G. (1993) Oxygen stress and Superoxide dismutase. *Plant. Physiol.* 101: 7-12.

Scarborough, G.A. (1977) Properties of the *Neurospora crassa* plasma membrane ATPase. Arch. Biochem. Biophys. 180: 384-93.

Schachtman, D.P.; Schroeder, J.I. (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. Nature 370: 655-8.

Schachtman, D.P.; Schroeder, J.I.; Lucas, W.J.; Anderson, J.A.; Gaber, R.F. (1992) Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. Science. 258:1654-8.

Schauf, C.L.; Wilson, K.J. (1987) Properties of single K⁺ and Cl⁻ channels in *Aclepsia tuberosa* protoplasts. Plant Physiol. 85: 413-8.

Scherer, G.F.E. (1982) A new method to prepare membrane fractions containing ionophore-stimulated ATPase from pumpkin hypocotils. Z. Naturforsch Teil C. 37: 550-2.

Schmidt, W. (1993) Iron stress-induced redox reactions in bean roots. Physiol. Plant. 89:448-52.

Schonbaum, G.R.; Bonner, W.D.; Storey, B.T.; Bahr, J.T. (1971) Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. Plant. Physiol. 47: 124-8.

Schroeder, J.I. (1987) K⁺ kanäle in der plasmamembran von schliesszellen eine patch-clamp untersuchung molekularer mechanismen des K⁺ transportes in höheren pflanzenzellen. Thesis Univ. Göttingen.

Schroeder, J.I. (1988) K⁺ transport properties of ut channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. J. Gen. Physiol. 92: 667-83.

Schroeder, J.I.; Fang, H.H. (1991) Inward-rectifying K⁺ channels in guard cells provide a mechanism for low affinity K⁺ uptake. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:11583-7.

Schroeder, J.I.; Hedrich, R. (1989) Involvement of ion channels and active transport in osmoregulation and signaling of higher plant cells. TIBS 14: 187-92.

Schroeder, J.I.; Hedrich, R.; Fernandez, J.M. (1984) Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. Nature 312: 361-62.

Schroeder, J.I.; Raschke, K.; Neher, E. (1987) Voltage dependence of K⁺ channels in guard cell protoplasts. *Proc. Natl. Sci. USA* 84: 4108-12.

Schroeder, J.I.; Ward, J.M.; Gassmann, W. (1994) Perspective on the physiology and structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plants: biophysical implications for K⁺ uptake. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 441-71.

Schumaker, K.S.; Sze, H. (1984) Properties of a H⁺/Ca₂⁺ antiporter in oat root microsomal vesicles. *Plant. Physiol.* 75:546.

Schumaker, K.S.; Sze, H. (1985) A Ca₂⁺/H⁺ antiport system driven by the proton electrochemical gradient of tonoplast H⁺ATPase from oat roots. *Plant. Physiol.* 79: 1111-7.

Sentenac, H.; Bonneaud, N.; Minet, M.; Lacroute, F.; Salmon, J.-M.; Gaymard, F.; Grignon, C. (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256:663-5.

Sentenac, H.; Grignon, C. (1987) Effect of H⁺-excretion on the surface pH of corn root cells evaluated by using weak acid influx as a pH probe. *Plant. Physiol.* 84: 1367-72.

Serrano, E.E.; Zeiger, E. (1989) Sensory transduction and electrical signaling in guard cells. *Plant. Physiol.* 91: 795-9.

Serrano, E.E.; Zeiger, E.; Hagiwaras, S. (1988) Red light stimulates an electrogenic proton pump in *vicia* guard cell protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 436-40.

Serrano, R. (1984) Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Curr. Top. Cell. Regul.* 23: 87-126.

Serrano, R. (1985) Plasma membrane ATPase of plant and fungi. Boca Raton, Fla. CRC. Press.

Serrano, R. (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 40: 61-94.

Sevilla, F.; Del Rio, L.A.; Hellín, E. (1984) Superoxide dismutase from a citrus plant: presence of two iron-containing isoenzymes in leaves of lemon trees (*Citrus limonum* L.) J. Plant. Physiol. 116:381-7.

Sijmons, P.C.; Bienfait, H.F. (1983) Source of electrons for extracellular Fe (III) reduction in iron-deficient bean roots. Physiol. Plant. 59: 409-15.

Sijmons, P.C.; Lanfermeijer, F.C.; de Boer, A.H.; Prins, H.B.; Bienfait, H.F. (1984A) Depolarization of cell membrane potential during transplasma membrane electron transfer to extracellular electron acceptors in iron-deficient root of *Phaseolus vulgaris* L. Plant. Physiol. 76: 943-6.

Sijmons, P.C.; Van den Briel, W.; Bienfait, H.F. (1984B) Cytosolic NADPH is the electron donor for extracellular Fe³⁺ reduction in iron deficient bean roots. Plant. Physiol. 75: 219-21.

Smith, F.A.; Walker, N.A. (1989) Transport of potassium by *Chara australis* I. A symport with sodium. J. Memb. Biol. 108:125-37.

Solioz, M. (1984) Dicyclohexylcarbodiimide as a probe for proton translocating enzymes. Trends Biochem. Sci 9: 309-12.

Sommarin, M.; Lundborg, T.; Kylin, A. (1985) Comparison of K,Mg ATPases in purified plasmalemma from wheat and oat substrate specificities and effects of pH, temperature and inhibitors. Physiol. Plant. 65: 27-32.

Spalding, E.P.; Goldsmith, M.H.M. (1993) Activation of channels in the plasma membrane of Arabidopsis by ATP produced photosynthetically. The Plant Cell 5: 477-84.

Spalding, E.P.; Slayman, C.L.; Goldsmith, M.H.M.; Gradmann, D.; Bertl, A. (1992) Ion channels in Arabidopsis plasma membrane. Plant. Physiol. 99: 96-102.

Speary, I.; Thimann, K.V. (1949) Plant Physiol. 24: 587.

Stewart, R.R.C.; Bewley, J.D. (1980) Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. Plant. Physiol. 65:245-8.

Streller, S.; Karpinski, S.; Hällgren, J.E.; Wingste, G. (1994) Four cytosolic-type CuZn-superoxide dismutases in germinating seeds of *Pinus sylvestris*. *Physiol. Plant.* 92:443-50.

Streller, S.; Wingste, G. (1994) *Pinus sylvestris* L. needles contain extracellular CuZn superoxide dismutase. *planta* 192:195-201.

Sun, I.L.; Crane, F.L. (1981) Transplasmalemma NADH deshydrogenase is inhibited by actinomycin D. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 101:68-75.

Sun, I.L.; Crane, F.L. (1984) The anti tumor drug cis-diamminedichoroplatin inhibited transplasmalemma electron transport in HeLa cells. *Biochem. Int.* 9:299-306.

Sun, I.L.; Crane, F.L. (1985) Bleomycin control of transplasma membrane redox activity and proton movement in HeLa cells. *Biochem. Pharmacol.* 34: 617-22.

Susman, M.R. (1994) Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annu. Rev. Plant. Physiol.. Plant Mol. Biol.* 45:211-34.

Susman, M.R.; Slayman C.W. (1983) Modification of the *Neurospora crassa* plasma membrane [H⁺] ATPase with N,N'-dicyclohexyl-cabodiimide. *J. Biol. Chem.* 258: 1839-43.

Sze, H. (1980) Nigericin-stimulated ATPase activity in microsomal vesicles of tobacco callus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5904-8.

Sze, H. (1985) H⁺ translocating ATPases advances using membrane vesicles. *Ann. Rev Plant. Physiol.* 36: 175-208.

Taylor, A.R.; Brownlee, C. (1992) Localized patch clamping of plama membrane of a polarized plant cell. *Laser microsurgery of the Fucus spiralis rhizoid cell wall.* *Plant. Physiol.* 99: 1686-8.

Thibaud, J.B.; Soler, A.; Grignon, C. (1986) H⁺ and K⁺ electrogenic exchanges in corn roots. *Plant. Physiol.* 81: 847-53.

Thom, M.; Maretzki, A (1985) Evidence for a plasmalemma redox system in sugarcane. *Plant Physiol.* 77: 873-6.

Torii, K.; Laties, G.G. (1966) Dual mechanism of ion uptake in relation to vacuolation in corn roots *Plant. Physiol.* 41: 863-70.

Trockner, V.; Marré, E. (1988) Plasmalemma redox chain and H⁺ extrusion. II Respiratory and metabolic changes associated with fusicoccin-induced and ferricyanide-induced H⁺ extrusion. *Plant Physiol.* 87: 30-5.

Ullrich, C.I.; Guern, J. (1990) Ion fluxes and pH changes induced by trans-plasmalemma electron transport and fusicoccin in *Lemna gibba* G.1. *Planta* 180: 390-9.

Ullrich, C.I.; Novacky, A.J. (1990) Extra and intracellular pH and membrane potential changes induced by H⁺, Cl⁻, H₂PO₄⁻ and NO₃⁻ uptake and fusicoccin in root hairs of *Limnobium stoloniferum*. *Plant. Physiol.* 94: 1561-7.

Ullrich, C.I.; Sanz, A.; Novacky, A.J. (1989) *J. Exp. Bot.* 40: 119-28.

Vani, T.; Raghavendra, A.S. (1992) Plasma membrane redox system in guard cell protoplasts of pea (*Pisum sativum* L.) *Journal of Experimental Botany.* Vol 43. 248: 291-7.

Vara, F.; Serrano, R. (1982) Partial purification and properties of the proton-translocating ATPase of plant plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 257: 12826-30.

Vavasseur, A.; Lascève, G.; Cousson, A. (1995) Guard cell response to potassium Ferricyanide. *Physiol. Plant.* 93:253-8

Villalobo, A.; Bountry, M.; Goffeau, A. (1981) *J. Biol.. Chem.* 256: 12081.

Vogelzang, S.A.; Prins, H.B.A. (1994) Patch clamp analysis of the dominant plasma membrane K⁺ channel in root cell protoplasts of *Plantago media* L. Its significance for the P and K state. *J. Membr. Biol.* 141: 113-22.

Vreugdenhil, D.; Spanswick, R.M. (1987) The effect of vanadate on proton-sucrose cotransport in *Ricinus* cotyledons. *Plant. physiol.* 84: 605-8.

Wang, Y.; Sze, H. (1984) Similarities and differences between the tonoplast-type and the mitochondrial H⁺-ATPase of oat roots. *Plant. Physiol.* 75: 547.

Warhurst, I.W.; Dawson, A.P.; Selwyn, M.J. (1982) Inhibition of electrogenic anion entry into rat liver mitochondria by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. *FEBS Lett.* 149: 249-52.

Ward, J.M.; Sze, H. (1992) Proton transport activity of the purified vacuolar H⁺ATPase from oats. Direct stimulation by Cl⁻. *Plant. Physiol.* 99: 925-31.

Widell, S.; Larsson, C. (1984) Blue light effects and the role of membranes. In *Blue Light Effects in Biological System*. Ed. H. Senger. pp:177-84. Berlin: Springer-Verlag.

Widell, S.; Lundborg, T.; Larsson, C. (1982) *Plant Physiol.* 70: 1429-35.

Wingste, G.; Gardeström, P.; Hällgren, J.E.; Karpinski, S. (1991) Isolation, purification, and subcellular localization of isozymes of superoxide dismutase from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Plant. Physiol.* 95:21-8.

White, P.J.; Lemtiri-Chlieh, F. (1995) Potassium currents across the plasma membrane of protoplasts derived from rye roots: a patch clamp study. *J. Exptal. Bot.* 46 (286):497-511.

Wyn-Jones, R.G.; Pollard, A. (1983) Protein enzymes and inorganic ions. In *Encyclopedia of Plant Physiology New series*. Vol. 15B (Lauchli y Bielecki eds.) Springer-Verlag Berlin. pp: 528-62.

Xia, J-H; Saglio, P. (1990) H⁺ efflux and hexose transport under imposed energy status in maize root tips. *Plant. Physiol.*93:453-9.

Yamashoji, S.; Kajimoto, G. (1986) Catalytic action of vitamin K₃ on Ferricyanide reduction by yeast cells. *Biochim. et Biophys. Acta* 849: 223-8.

Zhu, D.; Scandalios, J.G. (1994) Differential accumulation of manganese superoxide dismutase transcripts in maize in response to abscisic acid and high osmoticum. *Plant. Physiol.* 106:73-8.

Zocchi, G.; Cocucci, S. (1990) Fe uptake mechanism in Fe-efficient cucumber roots. *Plant. Physiol.* 92:908-11.

Zsoldos, F.; Vashegyi, A.; Erdei, L. (1987) Lack of active K⁺ uptake in aeroponically grown wheat seedlings. *Physiol. Plant.* 71:359-64.