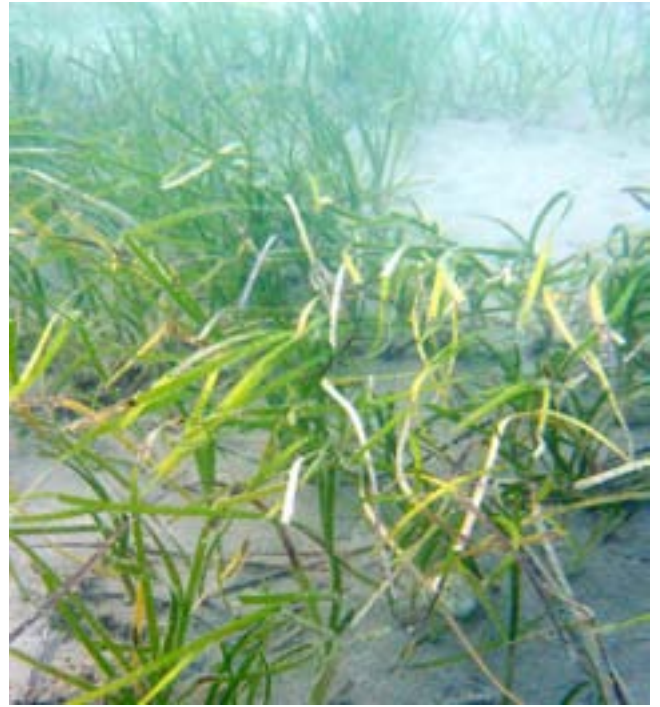




UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL
FISIOLOGÍA VEGETAL

TESIS DOCTORAL

**Mecanismos de transporte
de nitrato, amonio y fosfato
y homeostasis citoplasmática de sodio
en *Zostera marina* L.**

LOURDES RUBIO VALVERDE

OCTUBRE DE 2004



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL
(ÁREA DE FISIOLOGÍA VEGETAL)

TESIS DOCTORAL

**Mecanismos de transporte
de nitrato, amonio y fosfato
y homeostasis citoplasmática de sodio
en *Zostera marina* L.**

Lourdes Rubio Valverde

Octubre de 2004



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE CIENCIAS
DPTO. BIOLOGÍA VEGETAL (FISIOLOGÍA VEGETAL)

Visado en Málaga
En Octubre de 2004
Los Directores

Fdo. Dr. D. José A. Fernández García
Catedrático de Fisiología Vegetal
Universidad de Málaga

Fdo. Dr. D^a. María Jesús García Sánchez
Prof. Titular de Fisiología Vegetal
Universidad de Málaga

Memoria presentada para optar al grado
de Doctor en Ciencias Biológicas

Fdo. Lourdes Rubio Valverde



D. JOSÉ A. FERNÁNDEZ GARCÍA, Catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga y D^a. MARÍA JESÚS GARCÍA SÁNCHEZ, Profesora Titular de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación: **Mecanismos de transporte de nitrato, amonio y fosfato y homeostasis citoplasmática de sodio en *Zostera marina* L.**, realizado por la Licenciada D^a. LOURDES RUBIO VALVERDE, desarrollado bajo nuestra dirección en el Dpto. de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal) de la Universidad de Málaga, se considera finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral.

Fdo. Dr. D. José A. Fernández García

Fdo. Dr. D^a María Jesús García Sánchez

Málaga, a veinte de Octubre de dos mil cuatro.

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a una Beca de Formación de Personal Docente Investigador (III Plan Andaluz de Investigación, convocatoria 2000) y a una Beca de Postgrado para la Formación de Profesorado Universitario (Ministerio de Educación Cultura y Deporte, convocatoria 2001).

El trabajo ha sido desarrollado dentro del grupo de investigación *Ecofisiología de Sistemas Acuáticos* (RNM 176) de la Junta de Andalucía y ha sido financiado por el proyecto de investigación *Regulación de la concentración citoplasmática de Na⁺ y Cl⁻ y transporte de nutrientes en la angiosperma acuática Zostera marina L.* (Ministerio de Ciencia y Tecnología, BOS 2001-1855) y por la Acción Coordinada RNM 176-2001 (Junta de Andalucía).

Parte de los resultados incluidos en esta memoria han sido presentados en el *Fifth International Symposium on Nitrate Assimilation: Genetic and Molecular Aspects* (Julio de 2002, Córdoba, España), en la XV Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal & VII Congreso Hispano-Luso (Septiembre de 2003, Palma de Mallorca, España) y en el *13th International Workshop on Plant Membrane Biology* (Julio de 2004, Montpellier, Francia) y conforman un artículo en prensa: L. Rubio, A. Linares-Rueda, MJ García-Sánchez, JA Fernández. Physiological evidence for a sodium-dependent high affinity phosphate and nitrate transport at the plasma membrane of leaf and root cells of *Zostera marina* L. *Journal of Experimental Botany*.

AGRADECIMIENTOS

Aquella tarde preparaba un parcial de Fisiología Vegetal cuando surgió la duda sobre un registro de la actividad eléctrica de unos canales de K^+ . Al llegar al despacho de José A. Fernández, profesor de la asignatura, además de la respuesta que buscaba, encontré todo un arsenal instrumental para, años más tarde, obtener registros del movimiento de iones a través de las membranas de células vegetales. Entonces sólo era 1997 y, como el destino que ni mengua ni pasa, hubo muchos días de sol y una noche que no consigo olvidar...

De ninguna manera habría logrado esta conquista sin todos los que participáis de ella y a quien estas líneas pretenden elogiar:

José A. Fernández, por el diálogo preciso y tenaz, propio de la *escuela* del Prof. Niell; por lanzarme al abismo de este viaje, rico en experiencias y en conocimiento. Ahora que ha concluido, atesoro la mejor de tus enseñanzas: la búsqueda del aspecto lúdico en la realización de experimentos y, por extensión, de *Ciencia*. Y sé que no hubiera finalizado sin el estímulo intelectual que suponía afrontar cada reto metodológico, sin el entusiasmo compartido por alcanzar cada objetivo, sin tus domingos invertidos en mi *calendario con prisas*.

María Jesús García, por enseñarme a pensar *despacio* para aprender deprisa, doblegando error y confusión con argumentos que, de forma cada vez más rápida, ataviaron mi mente con ideas acertadas. Me has dado más de lo que este trabajo te ha robado, desde vencer a mi temido Poseidón, hasta agrupar los contenidos y corregir el sentido de cada frase de este manuscrito para expresar la visión de conjunto que a mis neuronas miopes escapaba.

Adolfo Linares, por la objetividad, porque antes me cansaré de inventar problemas que tú de despejar su incógnita en una frase. Por ser el *oráculo* de mi dislexia con las búsquedas bibliográficas. Por conservar la calma y el buen hacer de una forma que no deja de sorprenderme.

Rubén Zapico y Miguel Ángel Heredia, los enviados especiales del grupo, por los consejos y las preocupaciones *de lo mío y de lo nuestro*.

Los que habéis hecho mía vuestra casa: los "Eco" del grupo *Ecofisiología de Sistemas Acuáticos*, los *Fisiólogos de Animal* y las *Niñas* y los *Jefes* del grupo CIV. Agustín Barraón, Alberto Ramos, Elena Bañares, Abel Rosado, Laura Palomo y el Club de Buceo Costa Nerja, mi ejército de buceadores, porque *o mar só quiere aos valentes*. Antonio Flores, por los consejos desinteresados y los libros de angiospermas marinas. Baltasar Cabezado, por cuantos visados necesité en las aduanas administrativas. Andrés Belver y Kees Venema por la ayuda en la purificación de membranas. Miguel Ángel Botella por el *business* pendiente con las raíces de tomate.

Y en un mundo que aprendió a girar: Teresa Madrona y los adolescentes que en los 90 iban a clase de Ciencias en el *Luis Barahona de Soto*, porque hoy, arañando los 30, comparten piso en el *Barrio de mi Alegría*.

A todos y a los que estáis entre líneas: GRACIAS.

...Esa noche me recuerda los corazones grandes que hacen mi mundo pequeño. El de mi padre, Francisco Rubio, que desde entonces late para siempre. El de Josefa Valverde, mi madre, cuyos ojos proyectan mi mejor sonrisa. El de mis mecenas del ánimo: Montse Rubio, mi lado responsable; F. Javier Rubio, mi lado masculino y, su marcapasos, Toñi Peralta. Con vosotros soy feliz.

Salinas, Octubre de 2004

A mis dos lados, Mon y Javier Rubio.

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía atómica: la voluntad”*

Albert Einstein

ABREVIATURAS

ACMA	9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina
AMA	Agua de mar artificial
AMN	Agua de mar natural
ANOVA	Análisis de la varianza
BHT	Butilato de hidroxitolueno
Bis Tris Propano	1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano
BSA	Albúmina bovina
C_j	Concentración de j
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitól
ΔE_m	Despolarización
$\Delta G'$	Incremento de energía libre de Gibbs
$\Delta \mu_j / F$	Gradiente de potencial electroquímico del ión j
E_D	Potencial de difusión
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'tetraacético
E_j^N	Potencial de Nernst del ión j
E_m	Potencial de membrana
F	Constante de Faraday
$\Psi_{Na^+}_c$	Actividad citoplasmática de Na ⁺
Ψ	Potencial eléctrico
Ψ_j	Coficiente de actividad del ión j
K_m	Constante de semisaturación
MES	Ácido 2-[N-Morfolino] etanosulfónico

MOPs	Ácido 3-[N-Morfolino]porpanosulfónico
$\tilde{\mu}_j^*$	Potencial electroquímico del ión j en estado estándar
p	Peso
PEG	Polietilenglicol
PF	Peso fresco
P_{K^+}	Coeficiente de permeabilidad para K^+
P_{Na^+}	Coeficiente de permeabilidad para Na^+
P_{Cl^-}	Coeficiente de permeabilidad para Cl^-
P_{Na^+}/P_{K^+}	Índice de permeabilidad relativa para Na^+ respecto a K^+
pH_c	pH citoplasmático
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
R	Constante de los gases ideales
SD	Desviación estándar
SHAM	Ácido salicil hidroxámico
T	Temperatura absoluta
v	Volumen
V_{max}	Velocidad máxima de transporte
z_j	Carga del ión j

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS	I
ÍNDICE GENERAL	V
I. Introducción	1
I.1 Membranas vegetales	3
I.2 Transporte de iones a través de membranas vegetales	4
I.2.1 Fuerzas que actúan sobre los iones	5
I.2.2 Sistemas de transporte en membranas vegetales	7
I.2.2.1 <i>Transporte pasivo: canales</i>	7
I.2.2.2 <i>Transporte activo: bombas y transportadores</i>	9
I.2.2.2a Bombas primarias: energetización de las membranas vegetales	9
I.2.2.2b Transportadores	13
I.3 Relevancia del Na ⁺ en la energetización de las membranas vegetales	19
I.4 Mecanismos de tolerancia a la salinidad	21
I.4.1 Adaptación de <i>Zostera marina</i> L. al medio marino	23
I.5 Objetivos	27
II. Material y Métodos	29
II.1 Material vegetal	31
II.1.1 Taxonomía, distribución y morfología de <i>Zostera marina</i> L.	31
II.1.2 Recolección y mantenimiento de plántulas de <i>Z. marina</i>	37
II.1.3 Germinación de semillas y cultivos de plántulas de <i>Z. marina</i>	39
II.2 Electrofisiología	40
II.2.1 Medida de potencial de membrana: fabricación de microelectrodos simples	41
II.2.2 Medida de actividad iónica intracelular: fabricación de microelectrodos selectivos para iones	47
II.2.2.1 Tratamiento de los capilares de vidrio: silanización	49
II.2.2.2 Microelectrodos de H ⁺ : medida del pH citoplasmático	50

II.2.2.3 Microelectrodos de Na ⁺ : medida de actividades de Na ⁺	54
II.3 Aislamiento y purificación de vesículas de plasmalema	57
II.3.1 Homogeneización de tejidos: obtención de microsomas	59
II.3.2 Columnas de reparto: purificación de vesículas de plasmalema	60
II.3.2.1 Rendimiento de la purificación de plasmalema: cuantificación de proteínas	61
II.3.3 Determinación del transporte de H ⁺ en vesículas de plasmalema	62
II.4 Diseño experimental	63
II.4.1 Estudio electrofisiológico del transporte de NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ y P _i en células del mesófilo foliar y de la epidermis radicular	63
II.4.1.1 Transporte de NO ₃ ⁻	64
II.4.1.1a Efecto de la adición de NO ₃ ⁻ sobre el potencial de membrana	64
II.4.1.1b Determinación del ión motriz para el transporte de NO ₃ ⁻	65
II.4.1.2 Transporte de NH ₄ ⁺	67
II.4.1.2a Efecto de la adición de NH ₄ ⁺ sobre el potencial de membrana	67
II.4.1.2b Determinación del ión motriz para el transporte de NH ₄ ⁺	67
II.4.1.3 Transporte de P _i	68
II.4.1.3a Efecto de la adición de P _i sobre el potencial de membrana	68
II.4.1.3b Determinación del ión motriz para el transporte de P _i	68
II.4.2 Determinación de las tasa netas de incorporación de NO ₃ ⁻ y P _i	69
II.4.2.1 Determinación del efecto del Na ⁺ sobre la tasa de incorporación de NO ₃ ⁻	69
II.4.2.2 Determinación del efecto del Na ⁺ sobre la tasa de incorporación de P _i	70

II.4.3 Estudio de la homeostasis citoplasmática de Na ⁺	72
II.4.3.1 Determinación de la permeabilidad relativa de Na ⁺ con respecto a K ⁺	72
II.4.3.2 Control de las medidas intracelulares de Na ⁺	73
II.4.3.3 Efecto de la adición de inhibidores sobre la actividad intracelular de Na ⁺	74
II.4.3.4 Efecto de la adición de NO ₃ ⁻ y P _i sobre la actividad intracelular de Na ⁺	75
II.4.3.5 Efecto de la adición de Na ⁺ sobre el transporte de H ⁺ en vesículas de plasmalema	75
II.4.3.6 Determinación de los contenidos totales de Na ⁺ y K ⁺ en tejido radicular y foliar	77
II.5 Tratamiento de los datos	77
III. Resultados	79
III.1 Obtención de plántulas de <i>Z. marina</i>	81
III.2 Características eléctricas del plasmalema de células de <i>Z. marina</i>	83
III.2.1 Células de la epidermis radicular	83
III. 2.2 Células del mesófilo foliar	85
III.3 Estudio electrofisiológico del transporte de NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ y P _i	86
III.3.1 Transporte de NO ₃ ⁻ en células de la epidermis radicular	86
III.3.1.1 Efecto de la adición de NO ₃ ⁻ sobre el potencial de membrana	86
III.3.1.1a Efecto de la acidificación del medio sobre las despolarizaciones producidas por NO ₃ ⁻	88
III.3.1.1b Efecto del Na ⁺ sobre las despolarizaciones inducidas por NO ₃ ⁻	90
III.3.2 Transporte de NH ₄ ⁺	91
III.3.2.1 Efecto de la adición de NH ₄ ⁺ sobre el potencial de membrana de células del mesófilo foliar	91

III.3.2.1a Efecto de la acidificación del medio sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ en células del mesófilo foliar	94
III.3.2.1b Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ en células del mesófilo foliar	95
III.3.2.2 Efecto de la adición de NH_4^+ sobre el potencial de membrana de células de la epidermis radicular	97
III.3.2.2a Efecto de la acidificación del medio sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ en células de la epidermis radicular	99
III.3.2.2b Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ en células de la epidermis radicular	100
III.3.3 Transporte de P_i	102
III.3.3.1 Efecto de la adición de P_i sobre el potencial de membrana de células del mesófilo foliar	102
III.3.3.2 Efecto de la adición de P_i sobre el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz	102
III.3.3.2a Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones inducidas por P_i en células epidérmicas de la raíz	105
III.4 Efecto del Na^+ sobre las tasas de incorporación de NO_3^- y P_i	106
III.4.1 Efecto del Na^+ sobre la incorporación de NO_3^- por raíces	107
III.4.2 Efecto del Na^+ sobre la incorporación de P_i por raíces y hojas	109
III.5 Homeostasis de la concentración citoplasmática de Na^+ en células de <i>Z. marina</i>	113
III.5.1 Permeabilidad relativa de Na^+ respecto a K^+ en células epidérmicas de la raíz	114
III.5.2 Contenido total de Na^+ y K^+ en raíces y hojas	116
III.5.3 Actividad iónica intracelular de H^+ y Na^+ en células epidérmicas de la raíz y células del mesófilo foliar	117
III.5.3.1 Medida del pH citoplasmático en células de la epidermis radicular	118

III.5.3.2 Selectividad de los microelectrodos de Na ⁺	119
III.5.3.3 Medida de la actividad citoplasmática de Na ⁺	123
III.5.3.4. Efecto de la adición de inhibidores sobre la actividad citoplasmática de Na ⁺ en células epidérmicas de la raíz	126
III.5.3.5 Efecto de la adición de nutrientes sobre la actividad citoplasmática de Na ⁺ en células epidérmicas de la raíz	129
III.5.4 Estudio del transporte de Na ⁺ en vesículas de plasmalema de células foliares y radicales	131
III.5.4.1 Rendimiento de la purificación de vesículas de plasmalema	131
III.5.4.2 Transporte de H ⁺ en vesículas de plasmalema	131
III.5.4.3 Antiporte Na ⁺ /H ⁺ en vesículas de plasmalema	134
IV. Discusión	139
IV. 1 Germinación y supervivencia de plántulas de <i>Z. marina</i>	141
IV.2 Transporte de NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ y P _i en células de la epidermis radicular y del mesófilo foliar de <i>Z. marina</i>	144
IV.2.1 Característica eléctricas: permeabilidad de la membrana	144
IV.2.2 Cinéticas de transporte	147
IV.2.3 Mecanismos de transporte	157
IV.3 Homeostasis de Na ⁺	167
IV.4 Modelo general de la energetizacion del plasmalema de <i>Z. marina</i>	173
V. Conclusiones	175
VI. Bibliografía	179
VII. Índice de Figuras	205
VIII. Índice de Tablas	211
IX. Índice de Ecuaciones	215

INTRODUCCIÓN

I.1. Membranas vegetales

El funcionamiento de las células vegetales depende de la regulación adecuada del tráfico de iones y moléculas a través del plasmalema y entre los distintos compartimentos celulares. El flujo de iones permite la génesis, el mantenimiento y la regulación de la turgencia; la nutrición mineral; los procesos de adaptación a condiciones salinas o acumulación de sustancias nocivas, como metales pesados e iones radioactivos. Así mismo, el tráfico de iones en las células oclusivas de los estomas está relacionado con el mecanismo de apertura y cierre de los mismos, permitiendo la regulación de los procesos de transpiración y fotosíntesis (Hendirch y Schroeder, 1989; Maathuis y Sanders, 1992; Schroeder, 1995; Taiz y Zeiger 1998; Fernández y Maldonado, 2000; Sanders y Bethke, 2000).

Con una proporción diversa todas las membranas celulares contienen prácticamente los mismos componentes, cuyo ensamblaje da lugar a la formación de barreras de permeabilidad selectiva para el paso de sustancias a través de ellas (Clarkson, 1987). En 1972, Singer y Nicolson propusieron el modelo de *mosaico-fluido* para describir la estructura de las membranas, el cual sigue vigente en nuestros días. Este modelo describe una membrana formada por un conjunto de proteínas (*mosaico*) incluidas en una bicapa de lípidos, que pueden cambiar de posición (*fluida*). Los componentes de este mosaico fluido son de naturaleza anfipática, es decir, son moléculas lo suficientemente grandes como para exhibir regiones polares y no polares o lipofílicas, separadas entre sí. Los grupos polares, tanto de los lípidos como de aminoácidos, interaccionan entre sí formando una *corteza*, más o menos flexible, que proporciona rigidez a las caras externas de la bicapa. Así mismo, tales grupos polares interaccionan con moléculas de agua e iones, siendo de especial relevancia la presencia de Ca^{2+} , la cual está relacionada con la estabilidad de la membrana (Clarkson, 1987).

Los principales lípidos que forman las membranas de las células vegetales son *fosfolípidos* y *esteroles*. Los primeros son muy abundantes y proporcionan

fluidez; los segundos, menos abundantes, proporcionan rigidez. La proporción de cada uno de ellos varía entre las dos capas que constituyen la membrana y determina la orientación de las proteínas que contiene (Clarkson, 1987).

La presencia de proteínas en las membranas confiere una serie de características bioquímicas y la capacidad para transportar sustancias. Las proteínas pueden disponerse atravesando la bicapa lipídica, llegando a sobresalir a ambos lados de la misma; por otra parte, también pueden quedar incluidas en la bicapa. Ambas, denominadas *proteínas intrínsecas a la membrana*, pueden fluir con relativa facilidad en la bicapa o quedar fijas en la membrana (Clarkson, 1987). Por otra parte, existen proteínas que no se extienden en la región lipofílica, denominadas *proteínas periféricas*, que normalmente se unen a las regiones protuberantes de las proteínas transmembranales. La región apolar de la bicapa, así como la rigidez de la interacción entre los grupos polares, confieren una conductancia muy baja a dicha bicapa, es decir, la membrana es altamente resistente al paso de los iones. Salvo raras excepciones, como ocurre con el tiocianato (SCN^-), altamente soluble en disolventes apolares, o con pequeñas moléculas gaseosas (O_2 y CO_2), el paso de sustancias a través de las membranas requiere la actividad de *proteínas transportadoras*.

I.2. Transporte de iones a través de membranas vegetales

Las proteínas transportadoras o sistemas de transporte están incluidas en las membranas y, cuando se activan, son permeables al paso de iones o metabolitos, permitiendo que dichos solutos fluyan a través de la membrana. El correcto funcionamiento de estos sistemas de transporte permite el mantenimiento de gradientes metabólicos e iónicos esenciales para el crecimiento, desarrollo y transducción de señales en plantas (Hendirch y Schroeder, 1989; Maathuis y Sanders, 1992; Maathuis y Sanders, 1999).

I.2.1. Fuerzas que actúan sobre los iones

Los iones tienen masa y carga, por tanto, su movimiento puede ser impulsado por gradientes eléctricos o de difusión o de ambos a la vez. En consecuencia, el potencial electroquímico para un ión (j) es suma de un componente dependiente de concentración y de otro eléctrico:

$$\tilde{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln \Psi_j C_j + z_j F \Psi \quad (\text{ecuación 1})$$

donde μ_j^* es el potencial electroquímico del ión j en estado estándar, R es la constante de los gases ($8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T es la temperatura absoluta (K), Ψ es el coeficiente de actividad del ión j, C_j es la concentración del ión j (mol L^{-1}), z_j es la carga del ión, F es la constante de Faraday ($96,5 \text{ J mol}^{-1} \text{ mV}^{-1}$) y Ψ es el potencial eléctrico (en mV) del sistema que contiene al mencionado ión. Así formulado, la unidad en que se expresa el potencial electroquímico es J mol^{-1} .

En la formulación del potencial electroquímico no se usan concentraciones sino *actividades*, puesto que es el ión libre el que está sometido a un gradiente de potencial electroquímico. En consecuencia, en la ecuación 1 la influencia de la concentración de una especie iónica en particular “j” sobre su potencial electroquímico es ejercida por su *actividad* y no por la concentración (Nobel, 1983). La actividad del ión “j” se obtiene multiplicando su concentración (C_j) por *coeficiente de actividad* (Ψ).

El *coeficiente de actividad* (Ψ) puede tomar valores desde 0 hasta 1. En el caso de soluciones muy diluidas y para determinados iones, tales como K^+ , Na^+ o Cl^- , Ψ toma valores cercanos a 1, siendo el valor de la actividad del ión similar al de concentración (Nobel, 1983).

Las membranas separan compartimentos independientes entre los que existe una asimetría de cargas, y en consecuencia una diferencia de potencial eléctrico o *potencial de membrana* (E_m), al tiempo que una diferencia de

concentración de los iones presentes en los compartimentos. Fruto de ambas asimetrías, la eléctrica y la de concentración, puede definirse la fuerza física que actúa sobre cada ión “j”, el *gradiente de potencial electroquímico* o *fuerza ión motriz* ($\Delta\tilde{\mu}_j/F$), que viene determinado (en mV) por la diferencia entre el potencial de membrana y el *potencial de Nernst* para dicho ión multiplicado por la carga:

$$-\tilde{\mu}_j/F = z_j(E_m - E_j^N) \quad (\text{ecuación 2})$$

donde E_j^N es el potencial de Nernst para el ión “j” y determina el valor de potencial eléctrico para el cual el ión “j” se encontraría en equilibrio a ambos lados de la membrana. Asumiendo la simbología de la ecuación 1 y considerando que la membrana separa un compartimento externo “e” de otro interno “i”, el potencial de Nernst para el ión “j” se obtiene a partir de la ecuación:

$$E_j^N = \frac{RT}{z_j F} \ln \frac{(C_j)_e}{(C_j)_i} \quad (\text{ecuación 3})$$

En una membrana que separa un compartimento externo de otro interno, un valor positivo para $\Delta\tilde{\mu}_j/F$ significa que la fuerza física que empuja al ión “j” está dirigida hacia el exterior. Si, por el contrario, $\Delta\tilde{\mu}_j/F$ tiene signo negativo, la fuerza física que actúa sobre el ión está dirigida hacia dentro. En ambos casos, el valor numérico expresa la intensidad de dicha fuerza. El movimiento del ión a favor de su gradiente de potencial electroquímico se denomina *difusión* o *transporte pasivo*, a diferencia del movimiento en contra de gradiente o *transporte activo*, el cual requiere un aporte adicional de energía para que el proceso sea termodinámicamente posible.

I.2.2 Sistemas de transporte en membranas vegetales

El transporte de los iones o de cualquier otro soluto, salvo las pequeñas moléculas gaseosas citadas anteriormente, se realiza a través de las proteínas transportadoras, sin que el sustrato que se transporta contacte con la región lipofílica de la membrana (Clarkson, 1987). Las proteínas transportadoras son proteínas de membrana que proporcionan vías orientadas en un sentido determinado para dirigir el movimiento de la sustancia que transportan (Sanders y Bethke, 2000). El perfeccionamiento en la preparación de tejidos y células, así como la aplicación de la revolucionaria técnica electrofisiológica de *patch-clamp*, desarrollada inicialmente por Neher y Sakmann en 1976 (Hedrich y Schroeder, 1989), permitió abordar el estudio de los sistemas de transporte como unidades funcionales (Maathuis y Sanders, 1992). En la actualidad, las técnicas moleculares permiten recorrer el camino en sentido contrario, desde la estructura molecular hasta la función fisiológica, caracterizando a nivel genético los diferentes sistemas de transporte y sus mecanismos de regulación (Zimmerman y Sentenac, 1999; Rodríguez-Navarro, 2000; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Palmgren, 2001; Grossman y Takahashi, 2001; Buch-Pedersen y Palmgren, 2003). Al final de este apartado se muestra un esquema de los principales sistemas de transporte identificados en el plasmalema y el tonoplasto de las células vegetales (Figura 1).

I.2.2.1 Transporte pasivo: canales

El flujo difusivo o a favor de gradiente es mediado por proteínas, denominadas *canales*, incluidas en la membrana que pueden abrirse o cerrarse (*gating*) constituyendo poros selectivos para el paso de iones, siendo los principales en células vegetales: K^+ , Ca^{2+} , Na^+ y Cl^- (Tyerman, 1992; Ward *et al.*, 1995; Aidley and Stanfield, 1996; Tyerman y Skerret, 1999; Zimmermann *et al.*, 1999; Zimmermann y Sentenac, 1999; Demidchick *et al.*, 2002). Así mismo, los canales también permiten el paso de moléculas de agua, función atribuida a las denominadas *acuaporinas* (Weig *et al.*, 1997; Schäffner, 1998).

En la década de los 90 los estudios sobre estos sistemas de transporte dieron lugar a la publicación de numerosas revisiones en las que se describen canales implicados en el flujo de iones durante la transducción de señales, los procesos de apertura y cierre de estomas o la homeostasis iónica, especialmente en condiciones de alta salinidad (Tyerman, 1992; Assmann, 1993; Amtmann y Sanders, 1998; Zimmermann y Sentenac, 1999; Tyerman y Skerrett, 1999).

Los primeros canales identificados molecularmente en plantas fueron dos canales de K^+ de *Arabidopsis thaliana* Linnaeus, *AKT1* y *AKT2*, ambos clonados en 1992 mediante la técnica de complementación de cepas mutantes de levaduras (Sentenac *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 1992), y que están implicados en la entrada de K^+ a través del plasmalema (Rodríguez-Navarro, 2000).

Además, se han descrito canales Ca^{2+} , muy importantes en los mecanismos de transducción de señales (Zimmermann *et al.*, 1999); canales de Cl^- y otros aniones como NO_3^- o SO_4^{2-} , cuya implicación en los mecanismos de transducción de señales también pudiera ser importante (Ward *et al.*, 1995); canales rectificadores de entrada (IRCs), que son muy permeables a K^+ en comparación con otros iones (como por ejemplo Na^+); canales rectificadores de salida (ORCs), que presentan una baja discriminación entre K^+ y Na^+ (Amtmann y Sanders, 1999); canales independientes de voltaje (VICs), muy permeables a Na^+ en condiciones de alta salinidad (Amtmann y Sanders, 1999; White, 1999; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001), y canales de cationes divalentes, como la proteína *LCT1* de trigo (*Triticum aestivum* L.) que también puede transportar Na^+ (Clemens *et al.*, 1998; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001). Finalmente, se ha descrito un grupo diverso de canales iónicos (NSCCs) que se caracterizan por presentar una baja discriminación entre cationes esenciales y tóxicos para las plantas (Demidchik *et al.*, 2002).

I.2.2.2 Transporte activo: bombas y transportadores

Los sistemas de transporte activo permiten el flujo de los iones o solutos en contra de su gradiente de potencial electroquímico. Se distinguen dos tipos de sistemas en función de la energía que utilizan para impulsar el transporte. Así, en plantas los *transportadores primarios* o *bombas* realizan el transporte consumiendo energía metabólica (ATP ó PP_i). El segundo grupo lo forman los *transportadores secundarios* o *carriers* que utilizan la energía asociada al flujo difusivo de un ión, en un proceso de *cotransporte*, para impulsar el movimiento de sustancias en contra de gradiente.

I.2.2.2a Bombas primarias: energetización de las membranas vegetales

El establecimiento de una diferencia de potencial eléctrico a ambos lados de las membranas (E_m) en una célula vegetal se debe a la actividad de bombas primarias que transportan H⁺ hacia el exterior celular, en el caso de las localizadas en plasmalema, o hacia el lumen de la vacuola, en el caso de las presentes en tonoplasto (Spanswick, 1981; Felle 1981; Rea y Sanders, 1987; Rea y Poole, 1993; Sze *et al.*, 1999; Palmgren, 2001; Buch-Pedersen y Palmgren, 2003). No obstante, existen algunas excepciones, como algas rojas, donde se postula la existencia de una bomba de Na⁺ como bomba primaria (Raven, 1984); en algas marinas como *Acetabularia mediterranea* L., donde se ha descrito una Cl⁻-ATPasa (Gradmann *et al.*, 1982), o como *Heterosigma akashiwo* Hada, que posee una Na⁺-ATPasa (Shono *et al.*, 1996); así mismo, en el musgo *Physcomitrella patens* (Hedw) Bruch & Schimp también se ha clonado y caracterizado una Na⁺-ATPasa (Benito y Rodríguez-Navarro, 2003). Sin embargo, la búsqueda de bombas primarias, diferentes a las bombas de H⁺, capaces de generar el E_m , ha resultado infructuosa en plantas vasculares (Garcia-deblas *et al.*, 2001; Benito y Rodríguez-Navarro, 2003).

En comparación con la bomba primaria descrita en células animales (Na⁺/K⁺-ATPasa), las bombas primarias de las células vegetales muestran una

actividad muy *electrogénica*, es decir, generan una elevada diferencia de potencial eléctrico a ambos lados de la membrana. Además, como consecuencia de la continua extrusión de H⁺ (en el caso del plasmalema), o su inclusión en la vacuola (en el caso de tonoplasto), el citoplasma de las células vegetales es típicamente alcalino y negativo, siendo mayor la energía acumulada en las membranas vegetales que en las de células animales (Spanswick, 1981; Felle 1981; Rea y Sanders, 1987; Maathuis y Sanders, 1992; Maathuis y Sanders, 1999; Maathuis y Sanders, 1999; Sze *et al.*, 1999; Martinoia *et al.*, 2000; Palmgren, 2001; Buch-Pedersen y Palmgren, 2003).

El valor de E_m de una célula vegetal varía entre -100 y -200 mV (Maathuis y Sanders, 1999; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001), aunque se han descrito valores más negativos en el caso de especies de agua dulce como la hepática *Riccia fluitans* L. o *Chara corallina* Klein ex Willd, cuyo E_m es próximo a -230 mV (Felle, 1981; Mimura *et al.*, 1998). Además de la actividad de la H⁺-ATPasa, a ambos lados de la membrana se produce una reorganización (difusiva) de iones, que genera una diferencia de potencial eléctrico residual denominada *potencial de difusión* (E_D) cuyo valor se obtiene mediante la desactivación de la H⁺-ATPasa (Hope 1971; Felle, 1981).

El potencial de difusión en plantas puede predecirse de las asimetrías entre el exterior y el interior de la célula de tres iones fundamentales, K⁺, Na⁺ y Cl⁻ según la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (Hope, 1971; Nobel, 1983; Hille, 1991).

$$E_D = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{K^+} [K^+]_e + P_{Na^+} [Na^+]_e + P_{Cl^-} [Cl^-]_i}{P_{K^+} [K^+]_i + P_{Na^+} [Na^+]_i + P_{Cl^-} [Cl^-]_e} \quad (\text{ecuación 4})$$

donde P_{K^+} , P_{Na^+} y P_{Cl^-} son las permeabilidades de la membrana para K⁺, Na⁺ y Cl⁻, respectivamente. Siendo R la constante de los gases ($8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T la temperatura absoluta, F la constante de Faraday ($96,5 \text{ J mol}^{-1} \text{ mV}^{-1}$) y los subíndices “e”, “i” se refieren al exterior e interior celular respectivamente.

En la ecuación 4 únicamente se consideran las asimetrías de estos tres iones debido a que suelen encontrarse en elevadas concentraciones alrededor de las células vegetales, siendo los principales iones que fluyen pasivamente a través de la membrana (Hope, 1971; Raven, 1984).

En plantas, como se dijo anteriormente, el E_m es más negativo que el E_D , la diferencia entre ambas variables se denomina *componente metabólico* del E_m y es generada por la extrusión de H^+ (Fernández y Maldonado, 2000). En el caso del plasmalema, dicha extrusión de H^+ se realiza a través de H^+ -ATPasas, consideradas de tipo P porque se unen al anión P_i durante la hidrólisis del ATP (Serrano 1993; Palmgren 2001; Buch-Pedersen y Palmgren, 2003). Esta peculiaridad en la catálisis hace que las H^+ -ATPasas de plasmalema sean sensibles a la presencia de concentraciones micromolares de ortovanadato, puesto que este ión bloquea el lugar de unión a P_i . Las bombas de tipo P consisten en un monómero de unos 100 kD con un dominio de unión a H^+ y un dominio catalítico que se fosforila durante el proceso de transporte (Serrano, 1989; Palmgren, 2001; Buch-Pedersen y Palmgren, 2003). La actividad de esta H^+ -ATPasa y en consecuencia el E_m de las células vegetales, sean fotosintéticas o no, se mantiene en oscuridad; sin embargo, dicha actividad es sensible a los inhibidores de la respiración (CN^- , CCCP, DNP o N_3^-); por tanto, al igual que en las células animales, el ATP que usan proviene del metabolismo respiratorio (Fernández y Maldonado, 2000).

Por otra parte, en el tonoplasto existen dos tipos de bombas de H^+ según el tipo de molécula energética que hidrolizan, aunque ambos tipos median el transporte de H^+ hacia el lumen vacuolar (Rea y Sanders, 1987; Barkla y Pantoja, 1996; Martinoia *et al.*, 2000). Así, existen H^+ -ATPasas, que difieren de la (P) H^+ -ATPasa de plasmalema en el mecanismo de reacción y en los inhibidores a los que son sensibles. La H^+ -ATPasa de tonoplasto no es sensible a la inhibición por ortovanadato, mientras que, como en el caso de las FoF1 ATPasas, es sensible a nitrato (Martinoia *et al.*, 2000). Esta H^+ -ATPasa es de tipo V, muy común en las endomembranas de las células eucariotas, se compone de una fracción

transmembranal por la que circulan los H^+ y una región externa, fácilmente separable, donde se produce la hidrólisis del ATP (Barkla y Pantoja, 1996; Martinoia *et al.*, 2000). El segundo tipo de bombas de H^+ de tonoplasto, lo constituyen las pirofosfatasas (H^+ -PP_iasas) que usan la energía de la hidrólisis del PP_i (Rea y Poole, 1993). Este enzima es exclusivo de las células vegetales y su actividad requiere la presencia de Mg^{2+} , K^+ y H^+ (Rea y Sanders, 1987; Maathuis y Sanders, 1992; Barkla y Pantoja, 1996; Martinoia *et al.*, 2000). La función, aparentemente redundante, de las H^+ -PP_iasas ha suscitado cierta controversia; así, algunos autores sostienen que su actividad permite regular los niveles citoplasmáticos de PP_i en equilibrio con la actividad de otras enzimas (Roberts, 1990); otros autores sugieren que permite la transformación de esta energía metabólica en gradiente de H^+ , útil para el transporte activo secundario (Rea y Sanders, 1987); finalmente, también se ha sugerido que la H^+ -PP_iasa de tonoplasto transporta K^+ además de H^+ (Davies *et al.*, 1991), postulándose su papel en la regulación de la turgencia celular (Rea y Poole, 1993; Barkla y Pantoja, 1996).

Puesto que las membranas vegetales son impermeables a los H^+ , el flujo de los mismos, impulsado por las bombas primarias, genera un gradiente de potencial electroquímico para los H^+ a ambos lados de la membrana, que se disipará, *a posteriori*, para impulsar el transporte de otros iones o moléculas (Serrano, 1989; Maathuis y Sanders, 1992; Maathuis y Sanders, 1999; Palmgren, 2001). Además, la actividad de las bombas de H^+ garantiza la homeostasis del pH citoplasmático (Felle, 1987; Maathuis y Sanders, 1992; Chrispeels *et al.*, 1999). Por otra parte, la extrusión activa de H^+ hacia el apoplasto se relaciona con el crecimiento celular mediante la acidificación de la pared (Maathuis y Sanders, 1992; Palmgren, 2001).

Además de las bombas de H^+ , se han descrito otros transportadores que utilizan directamente la energía metabólica para impulsar el transporte. Así, por ejemplo, existen Ca^{2+} -ATPasas, que participan en la extrusión activa de Ca^{2+} desde el citoplasma, garantizando el mantenimiento de una baja actividad citoplasmática de Ca^{2+} (Evans y Willians, 1998; Garciadeblas *et al.*, 2001; White y Broadley,

2003). También se han descrito bombas iónicas que median el transporte activo de metales pesados consumiendo ATP (Wu *et al.*, 2002). Finalmente, los transportadores ABC, cuya actividad depende directamente de ATP o GTP, y que, al igual que las H⁺-ATPasas de tipo P, se inhiben por ortovanadato. Son transportadores que se localizan tanto en plasmalema como en tonoplasto y su actividad se relaciona con procesos de detoxificación, con la regulación del flujo de iones y con procesos de crecimiento (Martinoia *et al.*, 2002).

1.2.2.2b Transportadores

Los transportadores median el transporte de solutos en contra de gradiente electroquímico, acoplado al movimiento del soluto al flujo de un ión motriz que se transporta a favor de gradiente. Así, para que el proceso de transporte sea termodinámicamente posible es necesario que el gradiente de potencial electroquímico para el ión motriz (generalmente H⁺) supere, en valor absoluto, al gradiente de potencial electroquímico para el soluto. El balance energético entre ambos iones define la estequiometría del transporte.

Según el sentido del movimiento del soluto que se transporta, se distinguen dos tipos de transporte activo secundario. El *simporte*, en el que ambos sustratos se mueven en el mismo sentido, y el *antiporte* en el que los sustratos del transportador se mueven en sentido contrario (Fernández y Maldonado, 2000; Sanders y Bethke, 2000). Los sistemas de simporte suelen mediar la incorporación activa de nutrientes a través del plasmalema, mientras que los sistemas de antiporte permiten la extrusión activa de iones a través del plasmalema o su inclusión en la vacuola.

El transporte activo secundario es desarrollado por proteínas transportadoras o *carriers*, que transportan conjuntamente los dos sustratos, el ión motriz y el soluto que se transporta. Como consecuencia de la actividad del transportador se disipa parte de la energía acumulada en la membrana, siendo un transporte *electroforético*, en contra de lo descrito para el transporte activo

primario, el cual es *electrogénico* (Fernández y Maldonado, 2000). El proceso de transporte ocurre mediante la unión de los sustratos que se transportan a la proteína transportadora, la cual sufre un cambio conformacional, permitiendo que los sustratos atraviesen la membrana y sean liberados del transportador. Puesto que se requiere la unión a dos sustratos y un cambio conformacional, las tasa de transporte es relativamente baja (10^2 - 10^4 s⁻¹; Hille, 1984) comparada con la de canales (10^4 - 10^6 , Hille, 1984), además los flujos mediados por *carriers* se saturan con respecto a la concentración del sustrato y del ión motriz (Sanders y Bethke, 2000; Fernández y Maldonado, 2000).

A finales de los 50, Emmanuel Epstein y su equipo de trabajo, definieron que la relación entre el soluto que se transporta y su transportador era como la relación entre un enzima y su sustrato (Epstein *et al.*, 1963). En este sentido, el transporte de sustancias mediado por transportadores se caracteriza, generalmente, por presentar cinéticas de saturación cuando es expresado respecto a la concentración de sustrato (Marschner, 1995; Fernández y Maldonado, 2000; Sanders y Bethke, 2000). Así, en aquellos transportadores que muestran cinéticas de saturación, ajustables al modelo de Michaelis-Menten, la caracterización del transporte puede definirse en términos de *velocidad máxima* (V_{\max}) y *constante de semisaturación* o de Michaelis (K_m).

La V_{\max} del transportador estima la capacidad máxima de transporte y hace referencia a la velocidad de transporte cuando el sustrato que se transporta ocupa todos los lugares de unión a los transportadores presentes en la membrana. Por otra parte, la K_m , o constante de Michaelis, indica la concentración de sustrato necesaria para que el transportador funcione a la mitad de su velocidad máxima, reflejando la relación específica entre un transportador y su sustrato. En este sentido, se distinguen transportadores denominados de *alta afinidad*, que se caracterizan por presentar un valor bajo de K_m (del orden μM), lo cual indica que el transportador puede funcionar a mitad de su velocidad máxima incluso cuando la concentración de sustrato es escasa. Y, por otra parte, los transportadores de *baja afinidad*, que se caracterizan por tener valores altos de K_m , es decir, requieren

una concentración de sustrato elevada (próxima al orden mM) para que el sustrato sea transportado. Además, la actividad de un transportador puede ser *constitutiva*, es decir, la actividad del transportador está presente en la membrana, o por el contrario, puede ser *inducible*, es decir, la actividad del transportador se manifiesta (o se amplifica) en respuesta a una señal como, por ejemplo, la baja concentración de sustrato en el caso de los transportadores de alta afinidad de NO_3^- , P_i o K^+ (Glass *et al.*, 2002; Rausch y Bucher, 2002; Very y Sentenac, 2003).

Los transportadores median la incorporación de los principales nutrientes inorgánicos (NH_4^+ , NO_3^- , P_i , K^+ y SO_4^{2-}) a través del plasmalema (Grossman y Takahashi, 2001; Williams y Miller, 2001; Glass *et al.*, 2002; Rausch y Bucher, 2002; Smith *et al.*, 2003). Así mismo, los transportadores también son responsables del transporte de iones que se encuentran a baja concentración en el medio como, por ejemplo, Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y Ni^{2+} (Kochian, 2000); o de iones que son menos importantes en el metabolismo celular como Cl^- (Felle, 1994; Ullrich y Novacky, 1990). Finalmente, el transporte de sustancias orgánicas tales como azúcares o aminoácidos también se realiza a través de los transportadores (Kühn *et al.*, 1999; Lalonde *et al.*, 2004).

El avance de las técnicas moleculares ha permitido la identificación y caracterización genética de la mayoría de estos transportadores, al tiempo que determinar sus mecanismos de regulación. Así, se han descrito transportadores de NH_4^+ pertenecientes a la familia *AMT1* en tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) y *Arabidopsis*, donde también se ha encontrado la familia *AMT2*. La expresión de estos transportadores se localiza en raíces y hojas y se induce por deficiencia de N, aunque todavía se desconoce en detalle cual es su mecanismo de transporte (Howitt y Udvardi, 2000; Williams y Miller, 2001).

En el caso de los transportadores de NO_3^- , se han descrito genes pertenecientes a la familia *NRT1* y *NRT2* en diversas especies, que codifican transportadores de NO_3^- que funcionan en simporte con H^+ (Forde, 2000; Williams y Miller, 2001; Glass *et al.*, 2002). La familia *NRT1* contiene genes de

transportadores de NO_3^- que presentan baja afinidad (LATS) o alta afinidad (HATS) y que se expresan mayoritariamente en las raíces; así mismo, parece ser que la expresión de estos genes se induce por NO_3^- (Williams y Miller, 2001). En el caso de los genes de la familia *NRT2*, la expresión se produce en las raíces y, en menor medida, en hojas, flores, peciolo y semillas; codifican para transportadores de NO_3^- de alta afinidad (HATS), siendo su expresión inducible por NO_3^- (Williams y Miller, 2001).

En cuanto al P_i , se han identificado diversos transportadores pertenecientes a la familia *PHT1*, cuyos miembros muestran secuencias muy similares entre sí, se expresan en la raíz y transportan P_i en simporte con H^+ . Así mismo, también se ha identificado otra familia de transportadores de P_i , *PHT2*, que parece intervenir en el transporte de P_i a larga distancia, y que muestra una secuencia distinta a la familia *PHT1*, aunque similar a la de algunos transportadores de P_i dependientes de Na^+ descritos en hongos (Rausch y Bucher, 2002).

Los transportadores de K^+ han sido profusamente estudiados. Partiendo de estudios de homología con transportadores de K^+ de levaduras, se han clonado genes de diferentes especies que codifican transportadores de K^+ de alta y baja afinidad, cuyo mecanismo de transporte puede variar (Rodríguez-Navarro, 2000). *HKT1*, descrito originariamente en trigo, codifica un transportador de K^+ que funciona en simporte con Na^+ (simporte K^+/Na^+) en presencia de concentraciones micromolares de Na^+ (Gassmann *et al.*, 1996), o que funciona como un transportador Na^+/Na^+ en presencia de concentraciones milimolares de Na^+ (Maathuis y Sanders, 1999; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001). Genes homólogos a *HKT1* han sido clonados también en otras especies, como *Arabidopsis*, *Hordeum vulgare* L. (cebada) y *Oryza sativa* L. (arroz); en estas dos últimas, la expresión de *HKT1* se induce en condiciones de deficiencia de K^+ (Wang *et al.*, 1998). Por otra parte, también se han identificado los transportadores de tipo *HAK*, que median el transporte de K^+ de alta afinidad asociado a H^+ (simporte K^+/H^+) y que se expresan en la mayoría de las células vegetales (Rodríguez-Navarro, 2000).

Con respecto a otros nutrientes, también se han aislado genes que codifican transportadores de SO_4^{2-} en *Arabidopsis* y cebada (Takahashi *et al.*, 2000; Vidmar *et al.*, 1999). En *Arabidopsis* se han determinado dos grupos, los genes *SULT1* que codifican transportadores de alta afinidad y los genes *SULT2* que lo hacen para transportadores de baja afinidad (Grossman y Takahashi, 2001).

Además de estos sistemas de transporte, en las membranas vegetales se detecta también la actividad de sistemas de *antiporte*. Estos sistemas aprovechan el gradiente de entrada de H^+ para impulsar la extrusión desde el citoplasma (hacia el exterior celular o hacia el lumen vacuolar) de diferentes solutos en contra de gradiente. Son mecanismos de transporte relacionados con la homeostasis iónica o con la acumulación de solutos en la vacuola. Así, se han descrito antiportadores de Na^+ presentes en tonoplasto, como los antiportadores Na^+/H^+ del tipo *NHX* (Venema *et al.*, 2002; Tester y Davenport, 2003; Zhu, 2003), que también pueden transportar K^+ (Venema *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2004; Pardo, 2004). Además, también se han caracterizado antiportadores Na^+/H^+ de tipo *SOS1*, localizados en el plasmalema (Shi *et al.*, 2000), exclusivos de Na^+ y cuya ruta de activación comienza por un incremento citoplasmático de Ca^{2+} en respuesta a estrés salino (Liu y Zhu, 1997; Zhu, 2002). Por otra parte, se han descrito sistemas de antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, que intervienen en la homeostasis citoplasmática de dicho ión (White y Broadley, 2003); antiportadores $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^+$, que también pueden transportar Zn^{2+} o Cd^{2+} hacia el lumen de la vacuola; antiportadores de metales pesados (Cu^{2+} o Zn^{2+}) y antiportadores que permiten la acumulación de carbohidratos sintetizados durante el proceso fotosintético (Martinoia *et al.*, 2000).

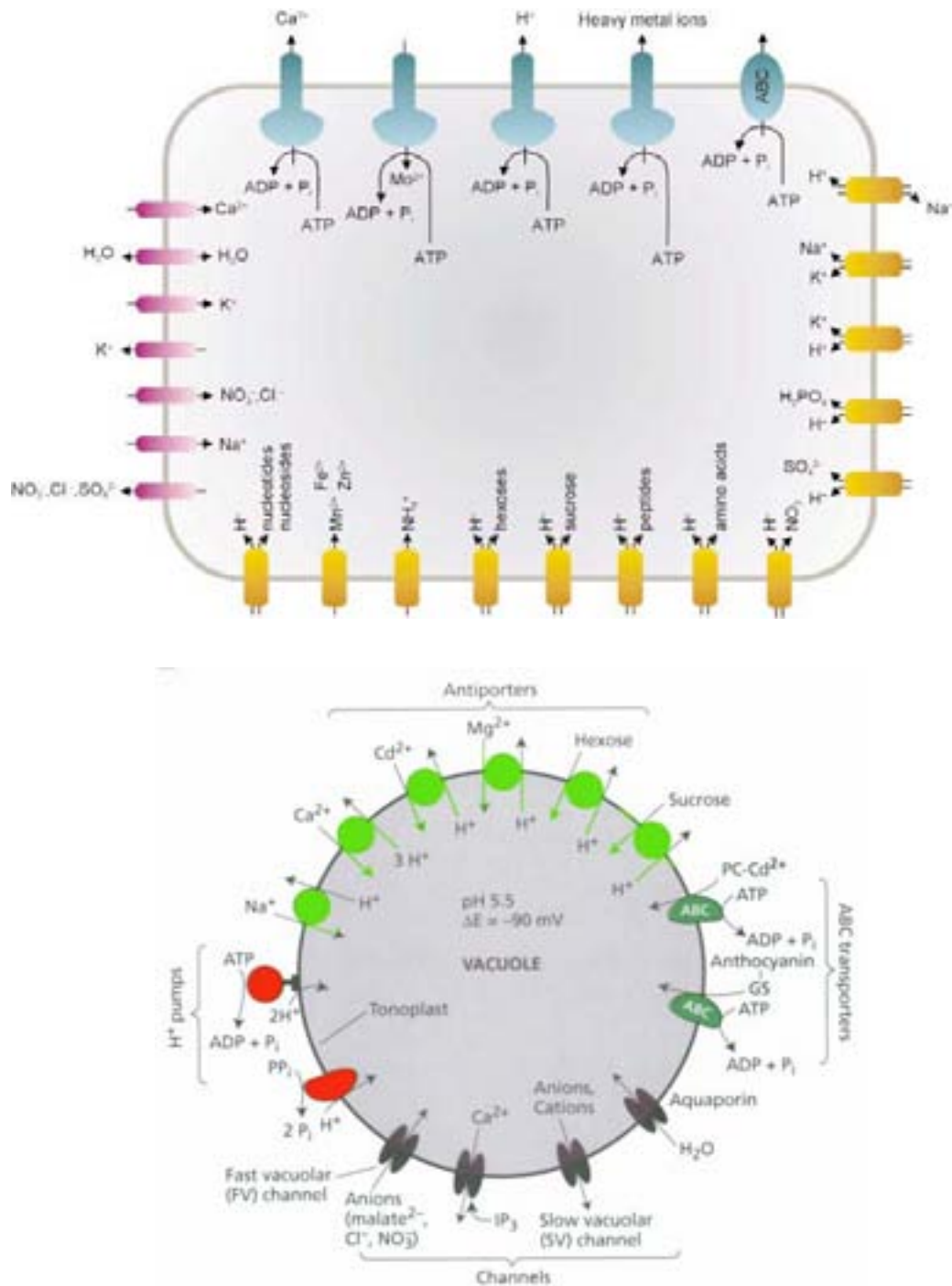


Figura 1. Esquema de diferentes sistemas de transporte presentes en membranas vegetales. En la parte superior de la figura se muestra los sistemas de transporte y identificados en la membrana plasmática, los transportadores primarios en azul, canales en rosa y transportadores secundarios en naranja (tomada de Palmgren, 2001). En el esquema inferior se muestran los sistemas de transporte presentes en tonoplasto, transportadores primarios (*H⁺-pump* y *ABC-Transporters*), canales (*Channels*) y transportadores secundarios (*Antiporters*) (tomada de Taiz y Zeiger, 1998).

I.3. Relevancia del Na⁺ en la energetización de las membranas vegetales

En las plantas vasculares terrestres el ión motriz universal es el H⁺, puesto que la bomba primaria es una H⁺-ATPasa y las membranas son impermeables a los H⁺, es decir, no se han descrito flujos difusivos de este ión. Sin embargo, en determinadas situaciones como, por ejemplo, en medios salinos y alcalinos, la existencia de un elevado gradiente de potencial electroquímico para la entrada de Na⁺, que incluso puede superar al de H⁺, podría ser aprovechada para impulsar la incorporación de nutrientes utilizando al Na⁺ como ión motriz. Esta hipótesis es avalada por la existencia de mecanismos para mantener en las células vegetales una concentración baja de Na⁺ en el citoplasma, dados sus efectos nocivos para la planta (Niu *et al.*, 1995; Amtmann y Sanders, 1998; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Tester y Davenport, 2003). Sin embargo, los transportadores acoplados a Na⁺ parecen ser un mecanismo perdido a lo largo de la evolución de las células vegetales (Ullrich y Glasser, 1982). En el caso de cianobacterias y microalgas, donde se considera como evidencia del funcionamiento de este tipo de transportadores, el requerimiento o la estimulación del transporte por Na⁺ externo (Raven, 1984), se ha descrito que el transporte de NO₃⁻ es dependiente de Na⁺ en cianobacterias (Lara *et al.*, 1993). En el caso de diatomeas marinas, donde la elevada concentración de Na⁺ del agua de mar (500 mM NaCl; Riley y Chester, 1971) participa en la generación de un elevado gradiente de potencial electroquímico para el Na⁺, se ha descrito que la incorporación de glucosa y aminoácidos es dependiente de Na⁺ en la especie *Cyclotella cryptica* (Hellebust, 1978); del mismo modo, el transporte de NO₃⁻, urea y NH₄⁺ es dependiente de Na⁺ en *Phaeodactylum tricornutum* (Rees *et al.*, 1980). Así mismo, el transporte de P_i también es estimulado por Na⁺ en varias microalgas (Raven, 1984).

La actividad de transportadores dependientes de Na⁺ no sólo ha sido demostrada en organismos unicelulares; así, en algunas algas de agua dulce como *Chara sp.*, el transporte de urea, lisina y K⁺ es dependiente de Na⁺, habiéndose demostrado la actividad de simporte con Na⁺ (Smith y Walker, 1989; Walker *et*

al., 1991). Por otra parte, recientemente se ha demostrado la actividad de un transportador de alta afinidad para P_i en simporte con Na^+ en *C. corallina* (Reid *et al.*, 2000). Así mismo, en algunas angiospermas de agua dulce, tales como *Egeria*, *Elodea* y *Vallisneria* se ha descrito el transporte de K^+ dependiente de Na^+ (Walker, 1994; Maathuis *et al.*, 1996). Finalmente, en la angiosperma marina, *Zostera marina* L., se ha caracterizado el transporte de alta afinidad de NO_3^- dependiente de Na^+ (García-Sánchez *et al.*, 2000). Este trabajo constituye la primera evidencia fisiológica del funcionamiento de un transportador de NO_3^- dependiente de Na^+ en una planta vascular, sugiriendo la posibilidad de que otros nutrientes puedan ser incorporados en esta especie a través de un transportador energizado de una forma similar (García-Sánchez *et al.*, 2000).

En otras plantas vasculares, el estudio de transportadores dependientes de Na^+ ha sido realizado en el contexto de adaptación a la salinidad y en relación con la nutrición de K^+ , describiéndose el transportador *HKT1* de trigo como un transportador de K^+ que funciona en simporte con Na^+ (Rubio *et al.*, 1995), y que también puede funcionar como uniporte Na^+/Na^+ en presencia de elevadas concentraciones salinas (Rubio *et al.*, 1995; Gassmann *et al.*, 1996). Sin embargo, este transportador, que fue clonado mediante expresión heteróloga en levaduras, no ha mostrado su actividad en plantas intactas (Maathuis *et al.*, 1996; Rubio *et al.*, 1996).

La existencia de transportadores de P_i dependientes de Na^+ ha sido sugerida con los transportadores de P_i pertenecientes a la familia *PHT2*, cuya secuencia es similar a la de transportadores de P_i acoplados a Na^+ de hongos (Martínez y Persson 1998; Versaw y Metzenberg, 1999; Zvyagilskaya *et al.*, 2001); sin embargo, al igual que se ha descrito para el gen *HKT1*, no se ha demostrado la actividad de este tipo de transportadores en plantas vasculares. En este sentido, los mecanismos de transporte activo que usan Na^+ como ión motriz parecen ser un mecanismo presente en plantas adaptadas a condiciones salinas y de pH alcalino, donde el gradiente electroquímico que impulsa la entrada de Na^+ puede ser utilizado para incorporar nutrientes con mecanismos de alta afinidad

(Rausch y Bucher, 2002). Por esta razón, las angiospermas marinas constituyen un modelo extraordinario para la caracterización de este tipo de transportadores, al tiempo que son modelos esenciales para el conocimiento de los mecanismos de tolerancia a salinidad, los cuales de momento se fundamentan en modelos genéticos como *Arabidopsis* (Zhu, 2000; Zhu, 2001; Zhu 2002; Ward *et al.*, 2003), cuya naturaleza glicófita pudiera oscurecer los procesos que garantizan el desarrollo de otras plantas en ambientes salinos (Hasegawa, P.M. *Centre for Plant Environmental Stress Physiology, Purdue University, USA*, comunicación personal).

I.4. Mecanismos de tolerancia a la salinidad

La capacidad para tolerar una elevada salinidad es uno de los principales ejemplos de adaptación genética en plantas. Aunque la vida surgió en el mar, las células vegetales evolucionaron en un medio pobre en Na^+ . Por esta razón, la mayoría de las plantas terrestres han perdido la capacidad para tolerar una salinidad elevada. El problema puede ser planteado a nivel celular, haciendo hincapié en el motivo por el cual las células de las raíces de plantas terrestres no son capaces de excluir Na^+ y concentrar K^+ de forma tan eficaz a como lo hacen las células de animales o de hongos (Rodríguez-Navarro *et al.*, 1994; Yeo, 1998; Benito y Rodríguez-Navarro, 2003). El incremento de Na^+ en el citoplasma provoca a nivel celular la disminución de la síntesis proteica, daños osmóticos relacionados con la pérdida de agua en las células, la inhibición del transporte de nutrientes y como consecuencia la muerte celular; en la planta completa se observa la pérdida de hojas o la inhibición del crecimiento de las raíces (Hasegawa *et al.*, 2000; Tester y Davenport, 2003).

No obstante, las plantas han desarrollado ciertos mecanismos que les confieren tolerancia a elevadas concentraciones externas de Na^+ . Estos mecanismos se manifiestan en un amplio rango de adaptaciones, que comprenden desde el nivel celular hasta el de planta completa (Yeo, 1998; Hasegawa *et al.*, 2000; Tester y Davenport, 2003). A nivel celular, se minimiza la entrada de Na^+ ,

al objeto de mantener una elevada relación K^+/Na^+ en el citoplasma (Amtmann y Sanders, 1999; Maathuis y Sanders, 1999; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2000); así mismo, se potencia la extrusión de Na^+ desde el citoplasma, hacia el exterior celular o hacia el lumen de la vacuola, a través de antiportadores Na^+/H^+ de tipo *SOS1* o *NHX1*, respectivamente (Serrano y Rodríguez-Navarro, 2000; Zhu, 2001; Zhu, 2003; Ward *et al.*, 2003). A nivel de planta completa, las plantas tolerantes a ambientes salinos suelen minimizar el transporte de Na^+ al xilema (especialmente las glicófitas; Hasegawa *et al.*, 2000) o maximizar, una vez alcanzado el tallo, la recircularización, a través del floema, hacia zonas especializadas de la planta donde se produce la acumulación de Na^+ , como ocurre en hojas maduras o células secretoras (Tester y Davenport, 2003). En la Figura 2 se muestra un esquema de los procesos de transporte de Na^+ , a nivel celular y de planta completa, implicados en la tolerancia a elevadas concentraciones de Na^+ en plantas vasculares.

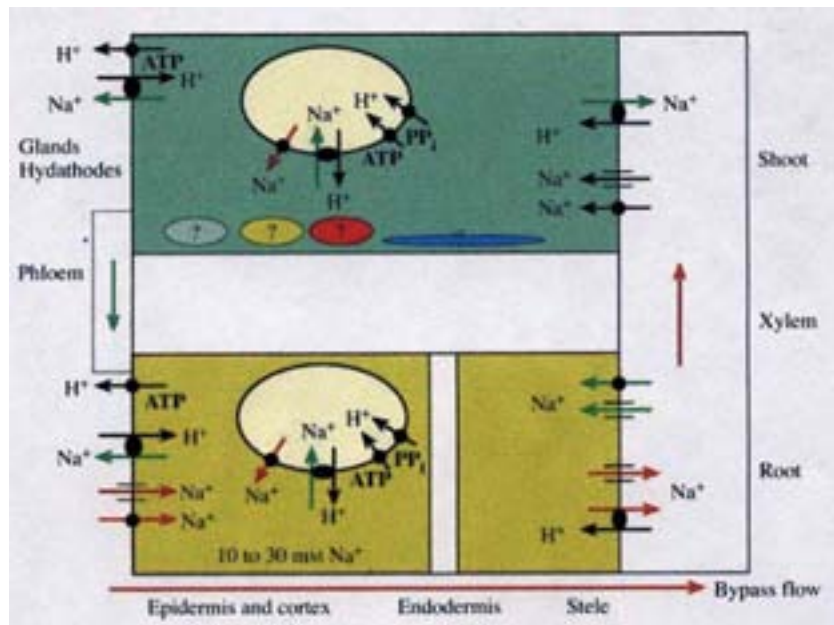


Figura 2. Esquema de los procesos de transporte de Na^+ relacionados con la tolerancia a salinidad de plantas vasculares. Las flechas rojas indican los procesos de transporte de Na^+ cuya minimización incrementaría la tolerancia a salinidad. Las flechas verdes representan los procesos de transporte de Na^+ cuya maximización incrementaría la tolerancia a salinidad. Las formas con interrogación indican el desconocimiento de los procesos de transporte de Na^+ en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplasmático. Las vacuolas se representan en forma elíptica en el centro de la célula radicular (rectángulo inferior izquierda) y de la célula foliar (rectángulo superior). Tomada de Tester y Davenport (2003).

I.4.1 Adaptación de *Zostera marina* L. al medio marino

Z. marina es una planta perteneciente a las angiospermas marinas, un grupo de plantas vasculares que se han adaptado secundariamente al medio marino. Este grupo de plantas posee la capacidad para resistir las elevadas concentraciones de sales presentes en el agua de mar (500 mM NaCl, 55 mM MgCl₂ o 10 mM KCl, entre otras; Riley y Chester, 1971), lo que sugiere que en estas plantas se presentan mecanismos genéticamente controlados que permiten su tolerancia a la salinidad (Pak *et al.*, 1995). Sin embargo, estos mecanismos han sido escasamente estudiados.

En el trabajo clásico de Tyerman (1989), se mostraba la capacidad de las angiospermas marinas para adaptarse progresivamente a la variación de la salinidad en términos anatómicos y fisiológicos. De forma exclusiva, con respecto a halófitas terrestres o algas marinas, estas plantas son capaces de disminuir la presión osmótica a la que están sometidos sus tejidos jóvenes gracias a una vaina que envuelve a los tejidos jóvenes durante su crecimiento, permitiendo su adaptación progresiva a las condiciones hiperosmóticas del agua de mar (Tyerman, 1989). Los cambios en la concentración de sal a la que están sometidas las células durante esta adaptación progresiva, provoca entradas y salidas de Na⁺, Cl⁻ y K⁺, variando su concentración citoplasmática, al objeto de mantener la presión de turgencia (Tyerman, 1989). En este sentido, los flujos de Na⁺ y Cl⁻ en las células de hojas inmaduras parecen ser cruciales durante su adaptación a la salinidad (Tyerman, 1989). Así, se ha determinado la actividad de canales de K⁺ y Cl⁻ en el plasmalema y tonoplasto de células de hojas inmaduras de algunas angiospermas marinas como *Zostera muelleri* Irmisch ex Ascherson (Garrill *et al.*, 1994) o *Posidonia oceánica* L. (Carpaneto *et al.*, 1997; Carpaneto *et al.*, 2004).

Por otra parte, se han desarrollado estudios con respecto a la viabilidad de las angiospermas marinas en diferentes condiciones salinas, en los que se describe que las plantas que crecen en el mar muestran una mayor tolerancia a salinidad elevada (30‰) que las procedentes de estuarios (van Katwitt *et al.*, 1999).

Además, en relación a la nutrición mineral y en contra de lo observado en plantas terrestres, donde el incremento de nutrientes, como NO_3^- , es beneficioso en condiciones salinas (Marschner, 1995), en *Z. marina* tiene un efecto negativo (van Katwitt *et al.*, 1999), aunque dicho efecto no se observa si el aporte de NO_3^- ocurre en el sedimento (Touchette y Burkholder, 2000, Peralta *et al.*, 2003). Así mismo, también se ha descrito la relación entre la salinidad y la tasa de fotosíntesis de *Z. marina* (Hellblom y Bjork, 1999), y de la salinidad con la variación del fotoperiodo (Vermaat *et al.*, 2000) y con la liberación foliar de P_i (Pérez-Lloréns y Niell, 1993) en *Zostera noltii* Hornemann. Sin embargo, sólo en escasos trabajos, que utilizan técnicas modernas como el análisis molecular (Pak *et al.*, 1995; Fukuhara *et al.*, 1996; Muramatsu *et al.*, 2002) o la electrofisiología (Garrill *et al.*, 1994; Carpaneto *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 1999), se ha intentado dar una explicación mecanicista sobre la adaptación a la salinidad de estas plantas. Precisamente, el grupo de investigación donde se ha desarrollado la presente memoria postuló, a partir de estudios electrofisiológicos, la posible existencia de un sistema de antiporte Na^+/H^+ en células del mesófilo foliar de *Z. marina*. Teniendo en cuenta los modelos vigentes para el estudio de los mecanismos de tolerancia a salinidad, tales como *Arabidopsis*, la actividad de este tipo de antiportadores parece ser un mecanismo fundamental para la tolerancia a la salinidad (Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Zhu, 2000; Zhu, 2001; Zhu 2003; Ward *et al.*, 2003).

Por otra parte, en el caso de los trabajos referentes al transporte de nutrientes en las angiospermas marinas ocurre algo similar que con la salinidad. La mayoría de los trabajos sobre la incorporación de nutrientes se plantean desde una perspectiva ecofisiológica (Pérez-Lloréns y Niell, 1997; Invers *et al.*, 1999; Alcoverro *et al.*, 2000; Heminga y Duarte 2000; Peralta *et al.*, 2003). De momento, el transporte de NH_4^+ , NO_3^- y P_i se ha caracterizado únicamente mediante experimentos clásicos de incorporación (Touchette y Burkholder, 2000). Además, existe cierta controversia con la presencia de un posible transportador de carbono inorgánico (Hellblom *et al.*, 2001). En este sentido, únicamente un trabajo previo muestra las evidencias fisiológicas de la actividad de un

transportador de alta afinidad de NO_3^- dependiente de Na^+ en células del mesófilo foliar de *Z. marina* (García-Sánchez *et al.*, 2000).

Z. marina es una de las angiospermas marinas más comunes, distribuida en los mares y océanos al norte y sur de la zona tropical (den Hartog, 1970). A pesar de vivir en un medio alcalino ($\text{pH} \approx 8,2$; Riley y Chester, 1971) y con una elevada concentración de Na^+ (500 mM NaCl), *Z. marina* posee una H^+ -ATPasa como bomba primaria en el plasmalema, que se ha caracterizado a nivel molecular (Fukuhara *et al.*, 1996) y electrofisiológico (Fernández *et al.*, 1999). Esta H^+ -ATPasa tiene un pH óptimo para su actividad similar al descrito en plantas vasculares terrestres ($\text{pH} \approx 6$); así mismo, su sensibilidad al tratamiento con tripsina es parecida, también, a la de las plantas vasculares terrestres (Muramatsu *et al.*, 2002). Sin embargo, la H^+ -ATPasa de plasmalema de las células de *Z. marina* tolera concentraciones de Na^+ superiores a las descritas en otros halófitos, sin que su actividad se vea afectada por 500 mM Na^+ (Muramatsu *et al.*, 2002). No obstante, la actividad H^+ -ATPasa detectada en tonoplasto se inhibe en presencia de 500 mM Na^+ (Muramatsu *et al.*, 2002).

Estudios de expresión muestran que la H^+ -ATPasa del plasmalema de las células de *Z. marina* se expresa mayoritariamente en las células epidérmicas de hojas maduras que, a diferencia de las jóvenes, se localizan en contacto directo con el agua de mar (Fukuhara *et al.*, 1996; Muramatsu *et al.*, 2002). Dichas células epidérmicas poseen una morfología especial, típica de las células de transferencia, con una membrana plasmática altamente invaginada (Arai *et al.*, 1991; Pak *et al.*, 1995). La elevada actividad de la H^+ -ATPasa se ha relacionado con el mantenimiento de una baja concentración de Na^+ en el citoplasma de las células de *Z. marina* (Muramatsu *et al.*, 2002). Esta elevada actividad H^+ -ATPasa potenciaría la extrusión de Na^+ mediante un antiportador Na^+/H^+ que podría estar presente en el plasmalema (Fernández *et al.*, 1999). Por estas razones, y como es frecuente en halófitas monocotiledóneas (Tester y Davenport, 2003), *Z. marina* podría haberse adaptado a la elevada salinidad disminuyendo la acumulación de

Na⁺ en el citoplasma, manteniendo al mismo tiempo una elevada concentración citoplasmática de K⁺.

Al vivir en un medio marino y con un E_m en torno a -160 mV, descrito en células del mesófilo foliar (Fernández *et al.*, 1999), el gradiente electroquímico que impulsa la entrada de Na⁺ hacia el citoplasma es muy elevado. Así mismo, la permeabilidad de la membrana de estas células para Na⁺ es muy baja (Fernández *et al.*, 1999), lo cual permite que dicho ión pueda ser utilizado como ión motriz, tal y como se ha descrito para el transporte de alta afinidad de NO₃⁻ en células del mesófilo foliar, cuya K_m para el ión motriz es $0,78 \pm 0,18$ mM Na⁺ (García-Sánchez *et al.*, 2000). Sin embargo, parece ser que este mecanismo no es único, medidas clásicas de E_m y técnicas de *patch-clamp* muestran que el transporte de Cl⁻ está asociado a H⁺ en *Z. marina* (García-Sánchez *et al.*, 1997).

Estos antecedentes plantearon la cuestión acerca de si la utilización de Na⁺ es un mecanismo general para la energización del transporte de otros nutrientes, como NH₄⁺ y P_i, a través del plasmalema de las células de *Z. marina*. Así mismo, la actividad y/o las características cinéticas de estos transportadores podrían ser diferentes en tejidos distintos, ya que las condiciones del medio pueden variar entre el sedimento donde se anclan las raíces y el agua de mar donde se proyectan las hojas (Touchette y Burkholder; 2000). Por otra parte, dado que existen transportadores dependientes de Na⁺ en esta especie, su actividad, relacionada con la incorporación de nutrientes, podría alterar la concentración citoplasmática del mismo, requiriéndose, por tanto, una estrecha regulación de su homeostasis citoplasmática. Ello estaría directamente vinculado con los mecanismos de adaptación a salinidad de esta planta, los cuales podrían ser similares a los presentes en las plantas vasculares terrestres tolerantes a la salinidad.

I.5. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo son:

En primer lugar, caracterizar mediante técnicas electrofisiológicas el transporte de NO_3^- , NH_4^+ y P_i en células de la epidermis radicular de *Z. marina* y de NH_4^+ y P_i en células del mesófilo foliar, determinando los parámetros cinéticos y el ión motriz responsable del transporte.

En segundo lugar, se estudiaron los mecanismos implicados en la homeostasis citoplasmática de Na^+ en esta especie, determinando la permeabilidad de Na^+ con respecto a K^+ del plasmalema de células epidérmicas de la raíz; la actividad citoplasmática de Na^+ en células de la epidermis radicular y del mesófilo foliar; la relación de contenidos totales de Na^+ y K^+ en hojas y raíces; y, finalmente, la existencia de actividad antiporte Na^+/H^+ en vesículas de plasmalema purificadas a partir de tejido foliar y radicular.

MATERIAL Y MÉTODOS

II.1 Material vegetal

El presente trabajo ha sido desarrollado en *Zostera marina* L. una de las angiospermas marinas más comunes, de amplia distribución en diferentes mares y océanos del mundo, aunque su presencia en la costa andaluza empieza a disminuir.

II.1.1 Taxonomía, distribución y morfología de *Zostera marina* L.

Zostera marina L. es una angiosperma marina, pertenece a la división Magnoliophyta, clase Liliopsida. Esta especie se incluye en el orden Najadales, familia Potamogetonaceae, subfamilia Zosteraceae (den Hartog, 1970). Al tratarse de una planta monocotiledónea, cuyo origen se atribuye a plantas herbáceas propias de lugares húmedos (Strasburguer, 1994), presenta una serie de adaptaciones a este tipo de hábitat; así, la raíz principal se atrofia y las hojas son poco diferenciadas (Hemminga y Duarte, 2000).

Z. marina se distribuye al norte y sur de la zona tropical, en áreas costeras del Atlántico y del Pacífico Norte; además, es la única angiosperma marina que se desarrolla por encima del Círculo Polar Ártico, alcanzando el Mar Blanco al norte de Rusia. El límite meridional de su área de distribución se encuentra cerca de Gibraltar (den Hartog, 1970; Pérez-Lloréns, 2004). En el Mediterráneo forma praderas de considerable extensión desde Málaga hasta Almería y se distribuye de forma poco abundante en lagunas litorales del sur de Francia, en pequeños enclaves del Mediterráneo occidental, como cala Jonquet en Cataluña, y en zonas septentrionales de los mares Adriático y Egeo (Pérez-Lloréns, 2004). En la costa oriental malagueña existen praderas discontinuas desde el dique de Poniente del puerto de Málaga, hasta el límite con la provincia de Granada. Las praderas situadas en Málaga, entre la playa de la Malagueta y el acantilado de El Cantal, así como las localizadas en el Rincón de la Victoria, Chilches, Benajárfes y Torre del Mar está muy degradadas por la pesca de arrastre (Barrajón *et al.*, 2004). Sin embargo, a partir de Nerja aparecen praderas más extensas y algo más densas,

principalmente desde los acantilados de Maro (Nerja, Málaga) hasta las proximidades del acantilado de Cerro Gordo (Granada) (Barrajón *et al.*, 2004).

Esta especie, considerada eurihalina (Pérez-Lloréns, 2004), se desarrolla de manera óptima en un rango de temperaturas de 10 °C a 22 °C (den Hartog, 1970; Hemminga y Duarte, 2000). Crece sobre fondos arenosos o fangosos, en zonas de aguas limpias, que permitan el paso de la luz. Es una especie básicamente infralitoral, aunque en determinados lugares puede aparecer en zonas intermareales, donde su límite superior de distribución se controla por la zona de desecación (Pérez-Lloréns, 2004). En el litoral oriental andaluz es relativamente común, formando desde pequeñas manchas hasta praderas más o menos extensas en zonas abiertas y, en ocasiones, praderas mixtas con otra angiosperma marina, *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson (Barrajón *et al.*, 2004). La configuración en manchas no demasiado densas se debe probablemente a la fisonomía del litoral, con pocas ensenadas someras, que constituyen su hábitat preferente en otros lugares. Además el régimen de lluvias en la costa mediterránea, frecuentemente torrencial, hace que las praderas que se desarrollan en el área de influencia de las ramblas o torrenteras lleguen a desaparecer. Estos otros factores ambientales unidos a la presión humana, especialmente por la pesca de arrastre, la construcción de infraestructuras costeras y la regeneración de playas, son determinantes para la distribución y el grado de desarrollo o degradación de las praderas de *Z. marina* en Andalucía (Barrajón *et al.*, 2004).

Como el resto de las angiospermas marinas, esta especie ha desarrollado una serie de adaptaciones morfológicas que le permiten anclarse en un medio sometido a agitación, debida al hidrodinamismo. Son plantas que se fijan al sedimento por medio de un rizoma común que crece horizontalmente (Hemminga y Duarte, 2000; Pérez-Lloréns, 2004). A intervalos regulares, denominados internodos, se desarrollan unidades compuestas por una porción de rizoma desde la cual se proyectan las hojas y el sistema radicular (Figura 3).

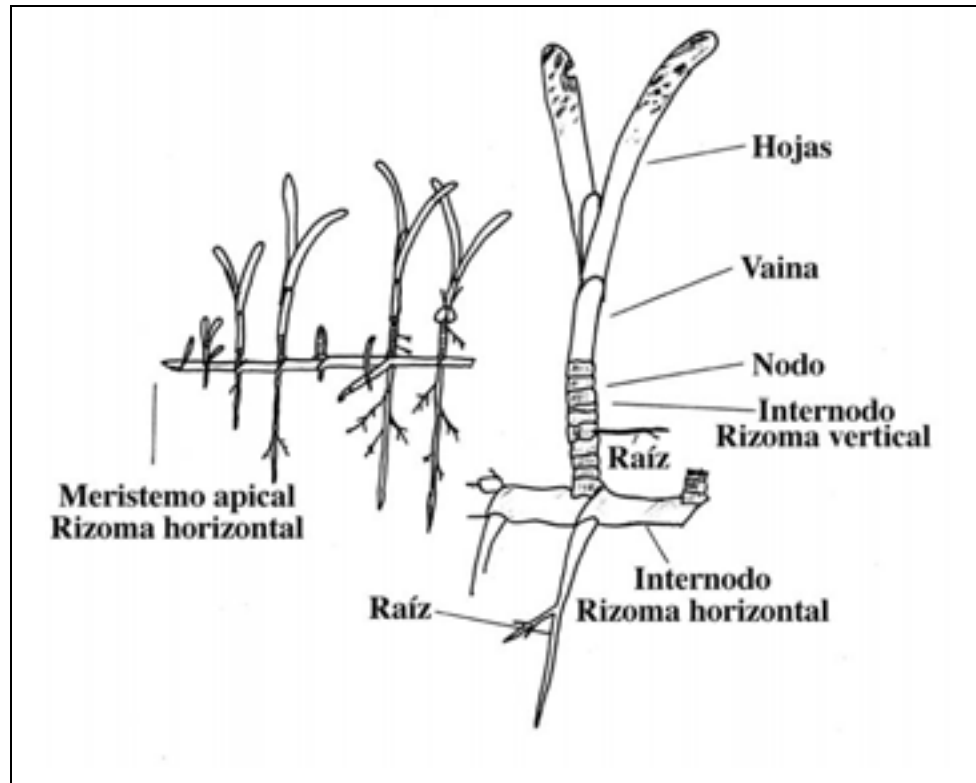


Figura 3. Esquema de la morfología general de las angiospermas marinas. Las hojas se disponen verticalmente, envueltas en la base por una vaina hasta el rizoma vertical. Las raíces se proyectan en la zona inferior desde el rizoma vertical y horizontal (Hemminga y Duarte, 2000).

Z. marina tiene hojas con forma de cinta, de margen liso y con ápice obtuso, a menudo con un pequeño saliente puntiagudo. Su longitud media ronda los 30 cm y su anchura los 6 mm. Cada hoja está envuelta, en su parte inferior, por una vaina, delgada y transparente, de unos 5–10 cm de longitud que, en su parte basal, rodea al rizoma. Las hojas jóvenes aparecen en el centro del haz, quedando revestidas por hojas adultas que se desprenden al alcanzar la senescencia. Las hojas presentan de 5 a 11 nervios distribuidos paralelamente y finas fibras longitudinales que garantizan la integridad estructural de la hoja bajo las condiciones de agitación del medio marino (Hemminga y Duarte, 2000; Pérez-Lloréns, 2004). Son hojas sin estomas, cubiertas por una delgada cutícula, con una epidermis rica en cloroplastos. Las células del mesófilo aparecen rodeadas por numerosos espacios aéreos que confieren flotabilidad a las hojas (den Hartog, 1970).

Las raíces, al igual que en el resto de las monocotiledóneas, son adventicias; se desarrollan a partir de la raíz principal, que surge en la región meristemática del rizoma, aunque dicha raíz principal no alcanza el diámetro suficiente para mantener la planta anclada al sustrato. *Z. marina* produce pares de raíces secundarias, que presentan tricomas y una característica tonalidad pardo amarilla en la zona meristemática, la cual se protege por una cofia o piloriza (Kuo y McComb, 1989).

Aunque la producción de flores y frutos es baja en las angiospermas acuáticas (Hemminga y Duarte, 2000), *Z. marina* produce inflorescencias en espádice, envueltas por una vaina y con una pequeña hoja o espata, que fueron consideradas inicialmente como una única flor (den Hartog, 1970; de Cock, 1980). Las inflorescencias se forman por diferenciación de brotes erectos del rizoma, de crecimiento limitado y que suelen aparecer anualmente (Pérez-Lloréns, 2004). Las flores unisexuadas se presentan a lo largo del eje longitudinal de una de las caras de la espata (Figura 4).

La floración, controlada por la irradiancia y la temperatura (se requieren temperaturas superiores a 10 °C) suele ocurrir a finales de primavera, aunque depende de la latitud. En las praderas de la zona de Maro-Cerro Gordo, la floración parece ocurrir en abril, desarrollándose los frutos durante los meses de mayo, junio y julio (Pérez-Lloréns, 2004). El desarrollo de las semillas, tras la polinización, se caracteriza por la aparición de tonos amarillos, claramente visibles a través de los márgenes de la espata (de Cock, 1980). Este cambio de tonalidad da lugar al característico viraje de colores del verde al amarillo que describen los buceadores locales en las praderas de *Z. marina* durante la primavera tardía.

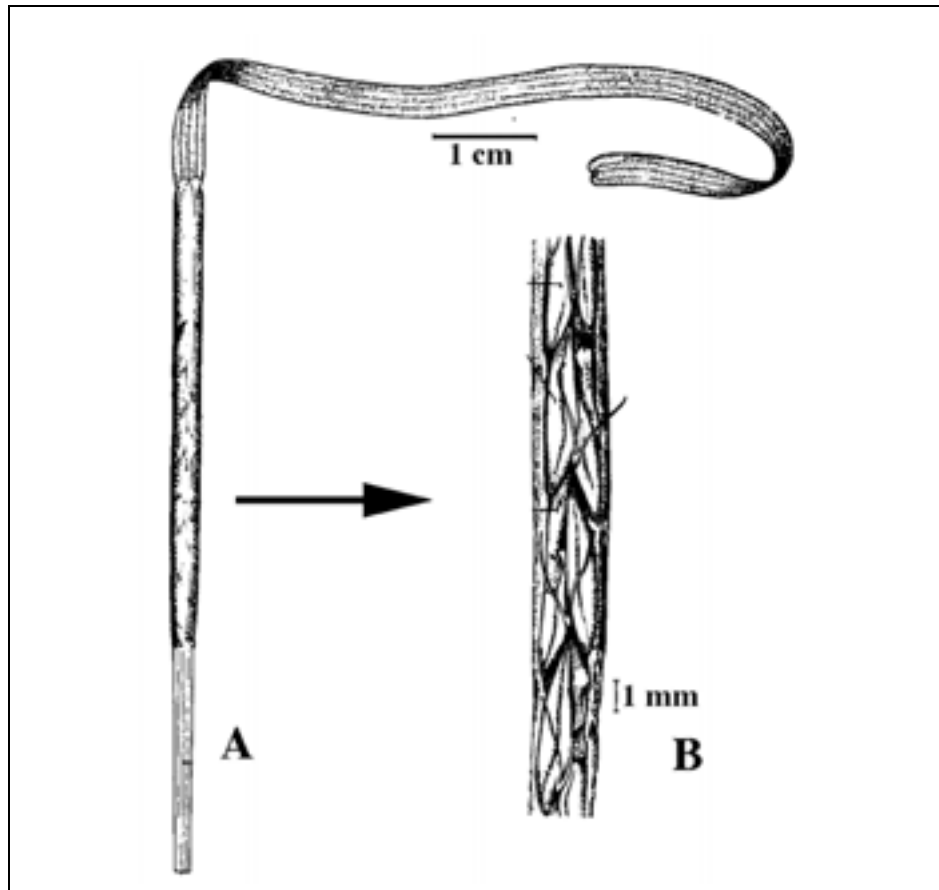


Figura 4. Estructuras florales de *Z. marina*. Esquema de la inflorescencia en espádice (A). Detalle de las flores masculinas y femeninas (B). (de Cock, 1980).

Durante la maduración de las semillas se produce el oscurecimiento de la cubierta, la cual se endurece. A continuación, las semillas maduras se desprenden del espádice y caen. En ocasiones, las semillas maduras muestran una tonalidad gris-azulada, procedente del embrión; en otros casos, la cubierta de las semillas es marrón y no deja ver el color azulado de los embriones. Estudios realizados en condiciones controladas sugieren que el proceso global, desde la polinización hasta la maduración de las semillas, ocurre entre 28 y 38 días. Posteriormente, aunque no todas las semillas maduran simultáneamente, la liberación de las semillas sucede en aproximadamente una semana (de Cock, 1980).

Antes de la germinación, las semillas maduras sufren un proceso de dormancia, que en ocasiones puede ser superior a un año (Orth y Moore 1983; Moore *et al.*, 1983). El mantenimiento de la semillas durante periodos similares en condiciones desfavorables para la germinación (alta salinidad y baja temperatura) ha resultado ser positivo en los ensayos de germinación *in vitro*; así, el porcentaje de germinación es superior en semillas en las que se induce la germinación tras unos meses desde la recolección y mantenimiento en dichas condiciones (van Katwijk, MM., *Dpt. Environmental Studies, University of Nijmegen, Holanda*, comunicación personal). En el caso de *Z. marina*, la tasa de germinación aumenta en condiciones de salinidad muy baja (1‰), siendo independiente de la temperatura (Hootsmans *et al.*, 1987).

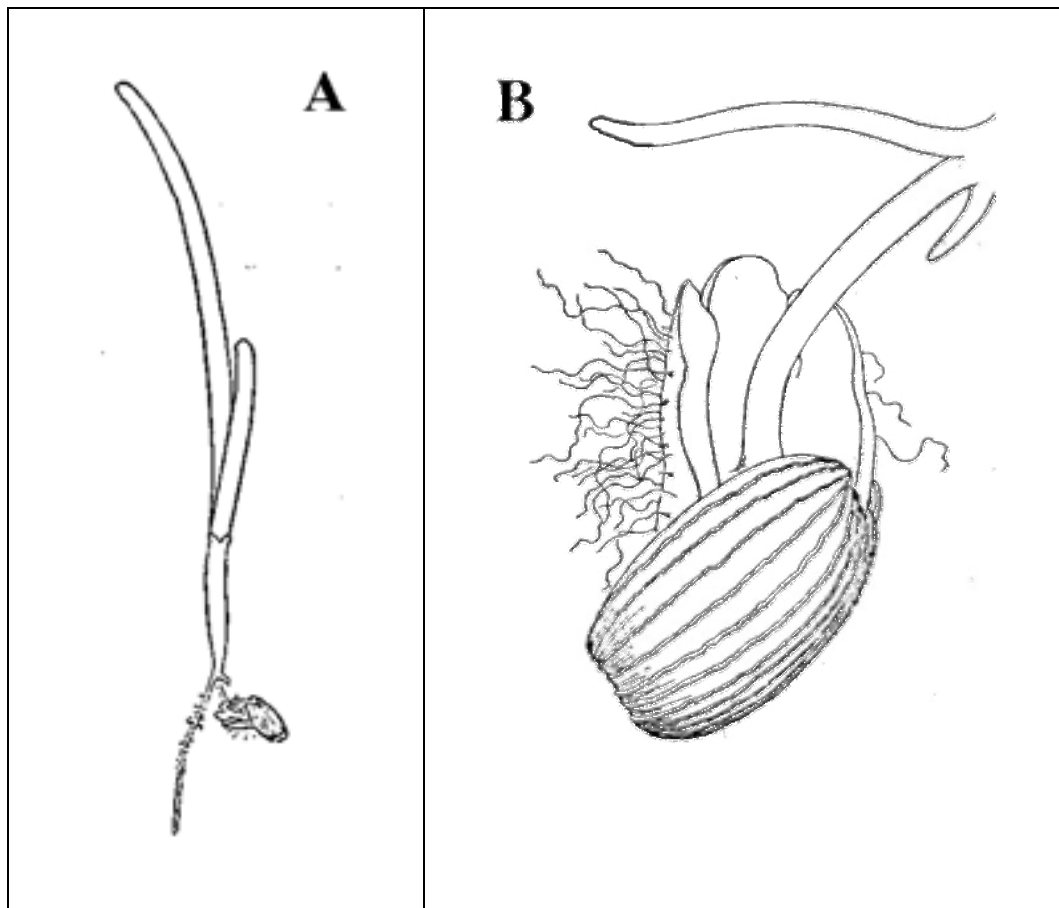


Figura 5. Plántula de *Z. marina*. Esquema de una plántula de 2 meses en la que se observan la primera pareja de hojas y raíces secundarias (A). Detalle del embrión con las primeras raíces secundarias (B). (de Cock, 1980).

La germinación consiste en la apertura de la cubierta y aparición del embrión, que presenta la mencionada tonalidad azul-celeste. En primer lugar, se produce la elongación del ápice caulinar de tonalidad blanca y el desarrollo de numerosos pelos radiculares en la parte externa del embrión. Posteriormente, se forman el primer par de raíces secundarias en la parte basal del epicótilo y las primeras hojas en su parte más distal (Figura 5).

II.1.2 Recolección y mantenimiento de plantas de *Z. marina*

Las plantas se recolectaban en la población de *Z. marina* presente en las costas de Nerja (Málaga). En concreto, se realizaron muestreos, a unos 5 m de profundidad, en la zona de los acantilados de Maro y en la playa de Burriana (Figura 6A). Las plantas recolectadas se trasladaban al laboratorio en neveras portátiles con agua de mar natural. En el laboratorio, se eliminaban los epífitos, así como las hojas y raíces dañadas de las plantas. A continuación, las plantas se depositaban en acuarios con agua de mar natural filtrada (AMN) y el medio se sometía a burbujeo continuo con aire para garantizar su oxigenación. Los acuarios se colocaban en una cámara de cultivo (IBERCEX, modelo V-450B) a 15 ° C y con una irradiancia de 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, bajo fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad (Figura 6B). El medio (AMN) se renovaba cada 3 días, permitiendo prolongar el mantenimiento de las plantas durante unos 3 meses.

Por otra parte, durante la época de reproducción, se recolectaron plantas con tallos que contenían semillas. En julio de 2002, se recogieron en la zona de Maro (Nerja) y, a finales de agosto del mismo año, en el estuario Ems (Figura 7) localizado al NE de Holanda, en *Wadden Sea* (región del mar del Norte que abarca desde el N de Holanda hasta el SO de Dinamarca). Así mismo, en julio de 2003, se volvieron a recoger plantas con semillas en Maro (Nerja). El procedimiento de traslado al laboratorio y mantenimiento de estas plantas fue similar al descrito anteriormente. Los tallos con semillas se mantenían a 15 °C con fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, en acuarios con agua de mar natural y aireación continua, cuyo medio se renovaba cada 3 días. Tras

aproximadamente dos semanas, las semillas maduras se desprendían del tallo, siendo recogidas del fondo del acuario y almacenadas en grupos de 10-15 semillas en tubos Falcon de 15 mL, con AMN, en oscuridad y a 4 °C.

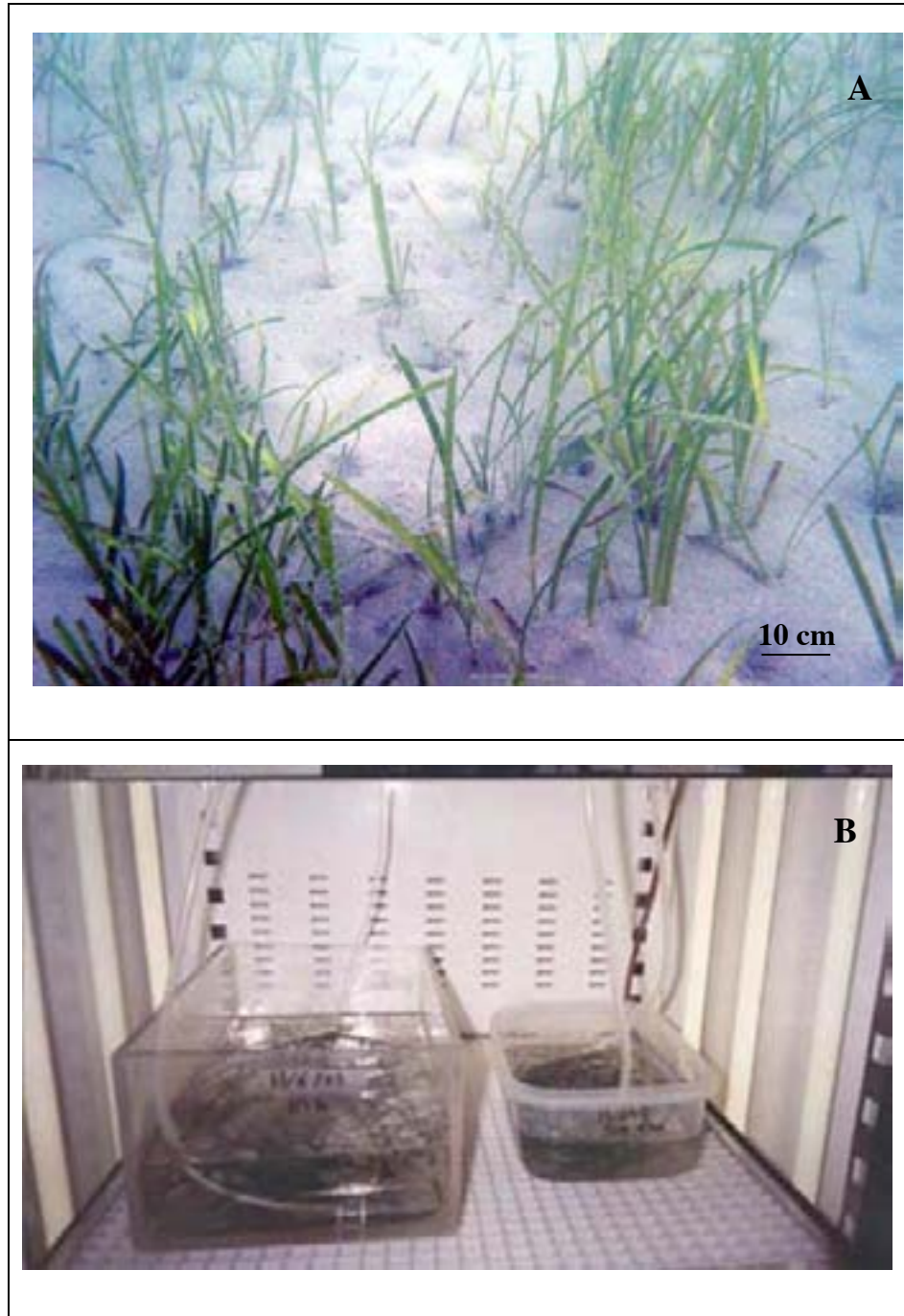


Figura 6. Recolección y mantenimiento de plantas de *Z. marina*. Pradera de *Z. marina* en la zona de Burriana (Nerja). Fotografía submarina: *Club Buceo Costa Nerja*, julio de 2004 (A). Mantenimiento de *Z. marina* en laboratorio (B).



Figura 7. Recolección de plantas con semillas de *Z. marina*. Población de *Z. marina* localizada en el estuario Ems, NE de Holanda (agosto de 2002).

II.1.3 Germinación de semillas y cultivo de plántulas de *Z. marina*

Las semillas maduras se germinaron en presencia de luz a 20 °C en agua destilada. En un máximo de 3 días, tras la ruptura de la cubierta, aparecía el embrión, que se transfería secuencialmente a AMN diluida, de diferente salinidad (0,1; 1 y 10 ‰), permaneciendo 24 h en cada medio. Tras esta adaptación progresiva, los embriones se mantenían en AMN (35 ‰), a 15 °C y con fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad. Después de aproximadamente un mes, las plántulas desarrollaban las primeras hojas y raíces secundarias. Las plántulas se cultivaban en AMN individualmente en tubos de cultivo de vidrio de 50 mL, renovando el medio cada 3 días.

El porcentaje de germinación en agua destilada se calculó a partir del número de semillas germinadas después de 3 días en agua destilada, referido al número de semillas transferidas inicialmente. Por otra parte, el porcentaje de supervivencia se determinó a partir del número de semillas germinadas que dieron lugar a plántulas con raíces y hojas tras un mes de cultivo en AMN, referido al número de semillas germinadas.

II.2. Electrofisiología

El estudio de los procesos fisiológicos que generan flujos eléctricos a través de las membranas celulares se denomina *Electrofisiología*. Esta técnica permite la medida del potencial de membrana (E_m) de forma directa, insertando un electrodo de diámetro pequeño (microelectrodo) en el interior celular (Felle, 1981). Para que la punta del microelectrodo atravesase la membrana plasmática sin alterar el funcionamiento de la célula, el diámetro de su punta debe ser pequeño, en torno a $0,5 \mu\text{m}$, permitiendo que, una vez perforada la membrana, ésta se selle alrededor del microelectrodo. La medida del E_m se obtiene como la diferencia de potencial eléctrico entre el microelectrodo insertado en la célula y un electrodo de referencia situado en el medio externo.

Además de proporcionar la medida en continuo del E_m en células intactas, el uso de microelectrodos selectivos para iones permite realizar medidas de la actividad iónica intracelular de un ión concreto (Felle, 1993; Miller *et al.*, 2001). Así mismo, la sofisticación de los aparatos que detectan los flujos eléctricos, junto con la posibilidad de adherir un electrodo a la superficie de la membrana de un protoplasto, mediante la técnica denominada *patch-clamp*, permite medir la corriente asociada al flujo de iones a través de una pequeña superficie de membrana (*patch*) sellada al microelectrodo o registrar el paso de corriente a través de todo el plasmalema (Sakmann y Neher, 1983; Aidley y Stanfield, 1996; Ward, 1997).

II.2.1 Medida de potencial de membrana: fabricación de microelectrodos simples

La medida de E_m se realizó tanto en células del mesófilo foliar como en células epidérmicas de la raíz. En el caso de hojas, se cortaban secciones de unos 2 cm desde la parte apical. Para eliminar parcialmente epidermis y poder acceder al mesófilo, la sección de hoja se cortaba longitudinalmente con un bisturí. Uno de los trozos obtenidos se fijaba por los extremos con parafina fundida a una cámara de perfusión, la cual presentaba un volumen útil de aproximadamente 1,5 mL. En cuanto a las raíces, se fijaban secciones de raíces secundarias de unos 2 cm de longitud desde la zona apical, sin necesidad de realizar ningún corte adicional.

La cámara de perfusión con el tejido fijado se colocaba en la platina de un microscopio (Leitz, laborlux 2) y se conectaba a un sistema de tubos, que permiten hacer fluir el medio de ensayo desde un matraz situado por encima del microscopio (Figura 8). El medio cae impulsado por gravedad, con un flujo regulable, que se mantenía constante a 10 mL min^{-1} . El exceso de medio se retiraba mediante una pipeta *Pasteur* conectada a una bomba de succión. El flujo continuo de medio aseguraba la termostatación y el mantenimiento de la composición, tanto iónica como gaseosa, del medio de ensayo en contacto con el tejido. Para la aplicación de un tratamiento determinado, se accionaba una llave de paso de dos vías que permitía el cambio de medio de ensayo sin alteraciones de flujo (Figura 8).

Antes de llevar a cabo cualquier medida, el tejido fijado a la cámara de perfusión se dejaba en flujo continuo del medio de ensayo de 5 a 30 min, con objeto de que se recuperase de la manipulación a la que había sido sometido durante la fijación y para que se adaptase al medio de ensayo.

La medida de potenciales de membrana se realizaba, según la técnica descrita por Felle (1981), introduciendo en la célula un microelectrodo de vidrio

con un diámetro de punta de entre 0,2 y 0,5 μm . El microelectrodo se rellenaba previamente con una solución 500 mM KCl para permitir la conducción de la corriente eléctrica a través del mismo. Además de este microelectrodo, el electrodo de referencia o “tierra”, de diámetro de punta mayor (del orden de mm) también se rellenaba con 500 mM KCl, pero solidificado con agar al 3 % (p/v) para evitar que el electrodo se vaciara. El electrodo de referencia se situaba en el medio externo. La diferencia de potencial eléctrico entre ambos electrodos, que corresponde al valor de E_m (Ammann, 1986; Hille 1992), se midió a través de un electrómetro diferencial de alta impedancia, World Precision Instruments (WPI, Modelo FD 223). El electrómetro recoge y amplifica la señal eléctrica de los electrodos, la cual se registraba en continuo en un registrador de papel de 4 canales, Kontron Electronics W+W, modelo 540 (Figura 8).

Los microelectrodos se fabricaron a partir de capilares de vidrio de borosilicato cuyo diámetro interno es de $0,75 \pm 0,05$ mm y el externo de $1,5 \pm 0,05$ mm (Hilgenberg, nº1103203). Además, los capilares de vidrio presentan un filamento interno sólido de 0,2 mm de diámetro, cuya función es facilitar el llenado de los microelectrodos con el electrolito (Ammann, 1986). Los microelectrodos se fabricaron estirando capilares de vidrio de una longitud aproximada de 5 cm en un *puller* vertical (David Kopf Instruments, modelo 700-C). El *puller* consta de un filamento enrollado que rodea al capilar de vidrio en la zona donde se forma la punta del microelectrodo. Al conectar el *puller*, la corriente que circula por el filamento hace que éste alcance una temperatura predeterminada, que puede regularse. Así, al calentar el capilar de vidrio, éste se vuelve plástico. Por acción del peso del núcleo de un solenoide, situado en la base del *puller*, el capilar se estira paulatinamente hasta que la acción de un electroimán completa el proceso de estiramiento, rompiendo el capilar en dos partes con puntas similares. La longitud y el diámetro de ambas puntas depende tanto de la temperatura que alcanza el filamento, como de la duración del estiramiento.

Para su utilización en la medida de potenciales de membrana, los microelectrodos se rellenaban con el electrolito (500 mM KCl) y se colocaban en un porta electrodos o *holder* que contiene una base de Ag-AgCl, permitiendo así el paso de la corriente desde el microelectrodo hasta una sonda conectada al electrómetro (Figura 8). A su vez, la sonda se colocaba en un macromanipulador eléctrico (Narishige MN-188) que, mediante una palanca o *joy-stick*, permite el movimiento de la sonda, del orden de μm hasta cm, en las tres direcciones del espacio. El macromanipulador permitía aproximar el microelectrodo al tejido fijado a la cámara de perfusión. Posteriormente, para introducir la punta del microelectrodo en una célula concreta, se utilizó un micromanipulador de presión relleno de aceite (Narishige, MO-109), que permite el movimiento en una sola dirección. La precisión del micromanipulador es de un movimiento máximo de 500 μm por cada vuelta completa de la rueda que acciona el mecanismo, lo que permite un avance mínimo del microelectrodo de pocas micras (Figura 8).

Los electrodos de referencia se fabricaban a partir de microelectrodos, ya usados, a los que se les rompía la punta y se rellenaban con 500 mM KCl solidificado con agar al 3%. De la misma manera que en el caso de los microelectrodos de medida, se insertaban en un porta electrodos que se conectaba al electrómetro. El porta electrodos se fijaba a un cabezal móvil que permitía situar el electrodo de referencia en contacto con el medio que bañaba al tejido (Figura 8).

Todo el sistema de engranajes de los macromanipuladores y micromanipuladores está acoplado al microscopio, que se coloca, junto a los micromanipuladores y soportes, sobre una mesa especial (Figura 8). Dicha mesa posee un tablero flotante para evitar las vibraciones y se aloja dentro de una *Caja de Faraday*, dispositivo que consiste en una cubierta metálica conectada a la toma de tierra del electrómetro. La *Caja de Faraday* sirve para eliminar las interferencias de campos electromagnéticos en la medida de diferencia de potencial eléctrico (Khuri *et al.*, 1974).

Cuando la punta de ambos microelectrodos (el de referencia y el de medida) están en contacto con el medio de ensayo, la diferencia de potencial eléctrico entre ambos debe ser 0 mV. Sin embargo, normalmente se observa una pequeña diferencia de potencial, que se denomina *potencial de punta*, originada por la mayor resistencia al paso de la corriente de la punta del microelectrodo de medida con respecto al electrodo de referencia. El valor de dicho potencial no debe ser menor de - 10 mV (Ammann, 1986).

Para obtener la medida del E_m de una célula concreta, en primer lugar se enfocaba con el microscopio, usando el objetivo de 10 aumentos. A continuación, bajo el microscopio, accionando el macromanipulador se colocaba la punta del microelectrodo a escasas micras de la célula seleccionada, en el mismo plano de enfoque que dicha célula (Figura 9). Finalmente, se introducía el microelectrodo girando el micromanipulador hasta que en el electrómetro se recibía la señal eléctrica, la cual indicaba que el microelectrodo había atravesado la membrana plasmática de la célula. Una vez que se alcanzaba un valor estable de E_m se procedía con el experimento.



Figura 8. Componentes de un puesto de electrofisiología. Detalle de accesorios del microscopio, cámara de perfusión y microelectrodos.

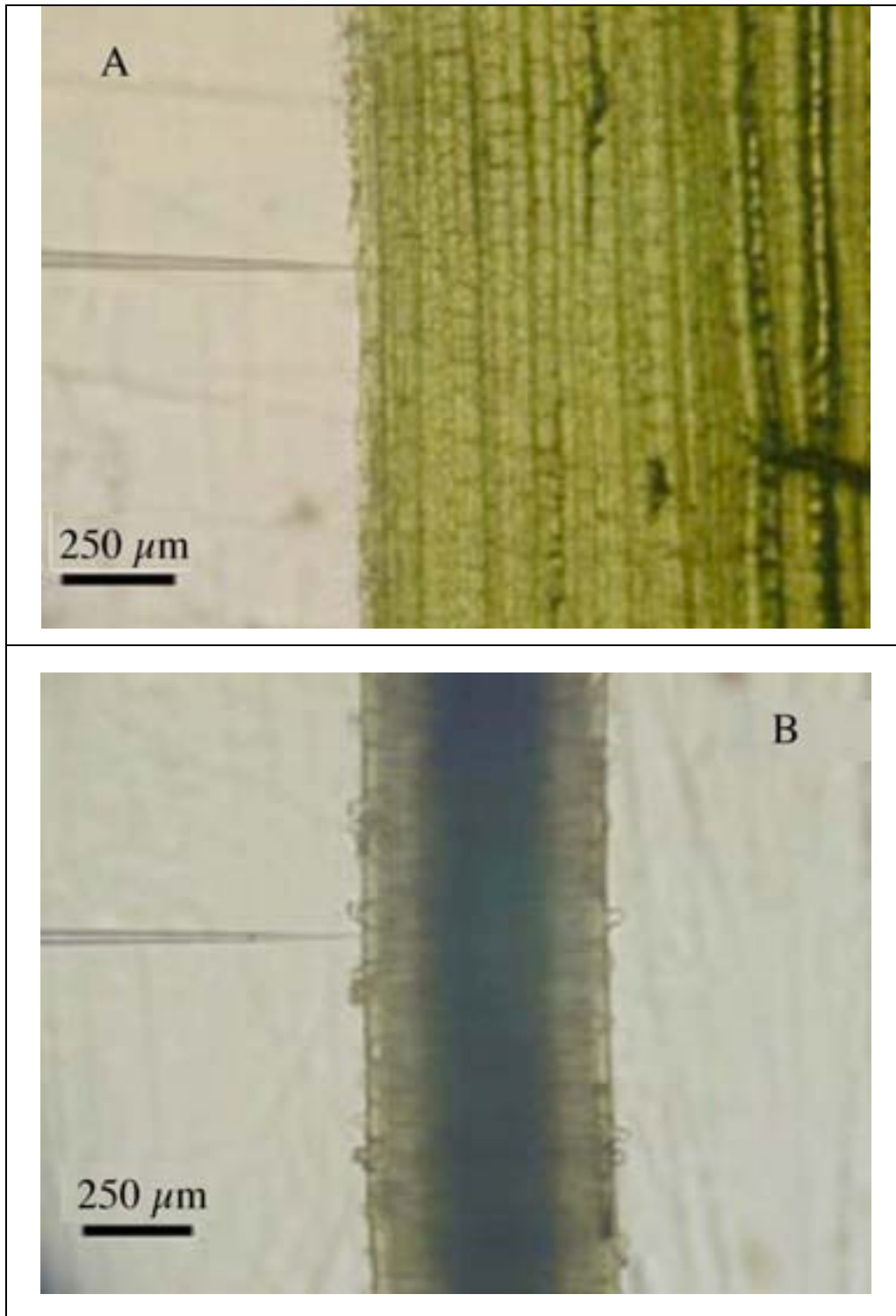


Figura 9. Microelectrodos introducidos en células del mesófilo foliar y de la epidermis radicular de *Z. marina*. Sección de hoja con la epidermis parcialmente eliminada: el microelectrodo se introduce bajo la epidermis y la punta se inserta en una célula del mesófilo (A). Zona apical de una raíz secundaria, el microelectrodo se introduce en una célula de la epidermis (B). Fotografías al microscopio óptico (100 aumentos).

II.2.2 Medida de actividad iónica intracelular: fabricación de microelectrodos selectivos para iones.

Los microelectrodos selectivos para un ión permiten la medida de la diferencia de potencial generada por la actividad de dicho ión en presencia de otros iones (Ammann, 1986). Frente a otras metodologías, tales como la resonancia magnética nuclear (RNM), el uso de microelectrodos selectivos proporciona la medida en continuo de la actividad intracelular de un ión en células intactas (Ammann, 1986; Felle y Bertl, 1986; Felle, 1993; Felle, 1994; Walker *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 2001; Carden *et al.*, 2003). No obstante, la aplicación de esta técnica debe satisfacer una serie de requisitos que garanticen la fiabilidad de las medidas (Felle y Bertl, 1986):

1. El compuesto selectivo (sensor) no debe alterar la actividad del ión que se mide.
2. El uso del sensor no debe alterar el metabolismo celular.
3. La calibración del sensor debe tener en cuenta sólo asunciones demostrables.
4. El método debe discriminar entre compartimentos.

La medida de la actividad iónica intracelular requiere, a su vez, la medida simultánea del E_m . Así, los microelectrodos selectivos para iones suelen fabricarse a partir de capilares dobles de vidrio de borosilicato. Una de las barras se rellena solamente con un electrolito, como en el caso de los electrodos simples (apartado II.2.1); mientras que la otra barra del capilar contiene, además del electrolito, un sensor selectivo para el ión cuya actividad se desea medir (Figura 10). Cada una de las barras del microelectrodo doble se conectan al electrómetro y cuando el microelectrodo doble se introduce en una célula, el electrómetro registrará dos señales diferentes. Así, la barra del microelectrodo que sólo contiene el electrolito mide el E_m (señal B) y la barra que alberga el sensor mide la suma del E_m más la diferencia de potencial debida a la actividad del ión para el que es selectivo (señal A). Por tanto, la diferencia de las dos señales (A-B), que también es registrada por

el electrómetro, es la diferencia de potencial eléctrico de dicho ión. Para que esta diferencia de potencial para un ión concreto pueda ser establecida, es necesario que el electrolito en contacto con el sensor contenga dicho ión. Así, según se explica en los apartados siguientes, cuando la punta del microelectrodo selectivo se introduce en una solución con una actividad determinada del ión para el que es selectivo, se transmite una señal eléctrica proporcional a la diferencia entre la actividad del ión entre el exterior (solución) y el interior del microelectrodo, la cual puede ser calibrada frente a concentraciones externas conocidas del ión para el que la resina es selectiva.

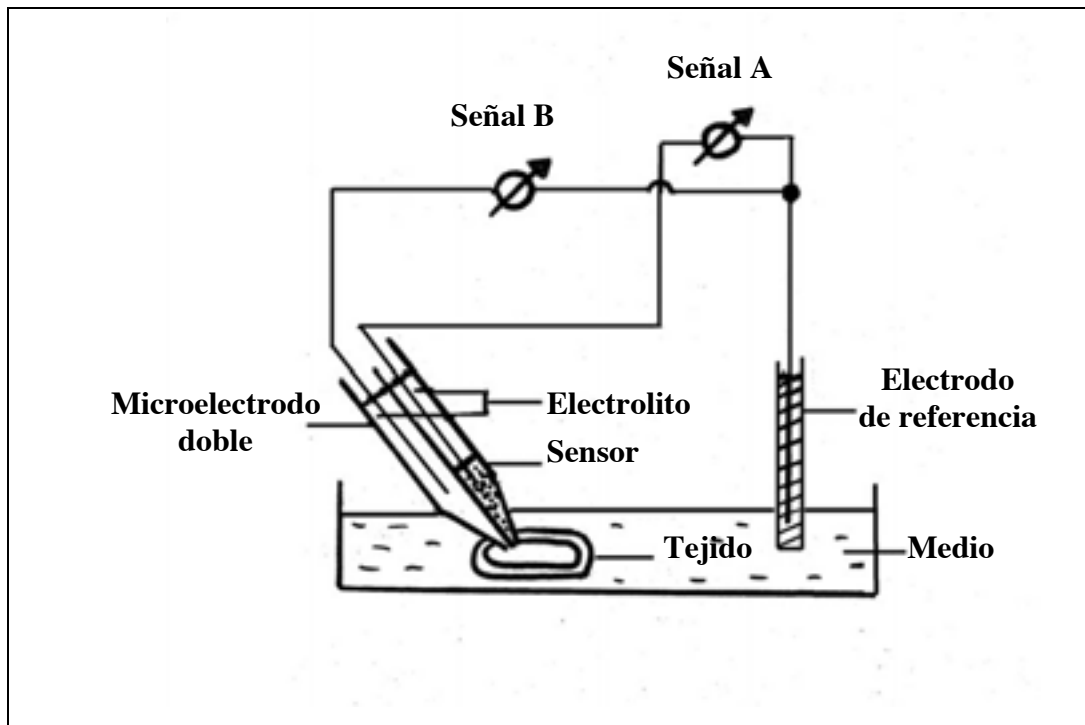


Figura 10. Esquema de la medida con microelectrodos selectivos para iones. El microelectrodo de medida es doble, una de las barras contiene, además del electrolito, el sensor selectivo para el ión. El electrodo de referencia se sitúa en el medio de ensayo. La señal B corresponde al E_m y la señal A es la suma del E_m y la diferencia de potencial eléctrico generada por el ión entre el interior celular y el electrolito que rellena el microelectrodo.

II.2.2.1 Tratamiento de los capilares de vidrio: silanización

La fabricación de microelectrodos se realizó a partir de capilares de vidrio de doble barra cuyos diámetros externos eran 1,5 y 0,75 mm y los internos 0,87 y 0,35 mm, respectivamente (Hilgenberg, nº 1109104). Ambas barras poseen un filamento interno sólido que facilita el llenado de las mismas. Los capilares se estiraban en un *puller* horizontal (Narishige, modelo PD-5). Para ello, se cortaba una longitud aproximada de 12 cm del capilar doble y se fijaba en el *puller*. Del mismo modo que el *puller* vertical, el horizontal consta de un filamento enrollado que permite calentar el capilar de vidrio hasta una temperatura predeterminada. Una vez caliente, el capilar se giraba sobre sí mismo 180°, se estiraba lentamente y finalmente se rompía en dos partes con puntas similares. El diámetro de dichas puntas depende de la temperatura alcanzada por el filamento, de la duración del estiramiento y de la fuerza con la que se produce la rotura. Una vez fabricados los microelectrodos dobles, se cortaba la barra de menor diámetro para evitar la mezcla de los contenidos de ambas barras durante su llenado.

Posteriormente, los microelectrodos se colocaban en una estufa (P-Selecta, modelo 208) a 180 °C durante 30 minutos para deshidratarlos por completo. Estando aún calientes, se añadían unas gotas de dimetil-dicloro-silano (DDS, Fluka nº 40136) disuelto en benceno al 0,1% (v/v), manteniéndose en la estufa a 180 °C durante 1 hora más. Tras este proceso de *silanización*, los microelectrodos se depositaban en un cristizador con gel de sílice en su interior hasta su enfriamiento (Felle y Bertl, 1986; Ballesteros *et al.*, 1998a; Fernández *et al.*, 1999).

Una vez fríos, se procedía con el llenado de la barra del microelectrodo con el sensor, para ello era necesario mezclar la resina selectiva para el ión con una solución de cloruro de polivinilo (PVC, Fluka nº 81392) disuelto en tetrahidrofurano (THF, Fluka nº 87369) al 1,5 % (p/v).

II.2.2.2 Microelectrodos de H⁺: medida del pH citoplasmático

Los microelectrodos selectivos para H⁺ se fabricaron siguiendo el protocolo descrito en Fernández *et al.* (1999). La resina selectiva para H⁺ se preparó a partir del cóctel comercial de Fluka n° 95297, mezclado con la solución de PVC disuelto en THF (1,5 % p/v) en una proporción 1:1. El cóctel para H⁺ consiste en una mezcla del 6 % (p/p) del ionóforo tipo II para hidrógeno (4 - nonadecil piridina, ETH 1907, Fluka n° 95295), 93 % (p/p) de 2-nitrofenil octil eter (o-NPOE) y 1% (p/p) de tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio (Fluka n° 60591).

La sensibilidad del ionóforo para detectar un ión “j” que pudiera interferir en la medida del ión “i” viene determinada por su coeficiente de selectividad (K_{ij}^{Pot}). Para resinas selectivas ideales los K_{ij}^{Pot} para otros iones deben ser próximos a cero (Ammann, 1986); un valor menor que 1 indica una preferencia mayor por el ión principal “i” en relación con el ión que interfiere “j” (Ammann, 1986). Los logaritmos del coeficiente de selectividad para el ionóforo de H⁺ utilizado se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Logaritmos de los coeficientes de selectividad H⁺-Na⁺ y H⁺-K⁺ de la resina utilizada en los microelectrodos de H⁺ (Ammann, 1986).

$\log K_{HNa}^{Pot}$	- 9.6
$\log K_{HK}^{Pot}$	- 8.8

En ambos casos, el coeficiente de selectividad que se obtiene es extremadamente pequeño, de manera que la presencia de Na⁺ o K⁺ no tiene un efecto significativo sobre la medida de H⁺.

La señal esperada del cóctel para H^+ utilizado es $57,1 \pm 0,8$ mV por unidad de pH y el rango práctico de medida se sitúa entre pH 2 y pH 9. La resistencia eléctrica cuando el diámetro de la punta del microelectrodo es de $1 \mu m$, es de unos $4 \times 10^{10} \Omega$ y el tiempo de respuesta es de unos 0,6 s.

La mezcla formada por el cóctel para H^+ y la solución de PVC se introducía en el interior de la barra de mayor diámetro del microelectrodo silanizado, con ayuda de una aguja *Microfil* de 67 mm de longitud, 0,16 mm de diámetro externo y 0,1 mm de diámetro interno (WPI, referencia: MF34G-5) que permite acceder hasta el final del microelectrodo. Se rellenaban aproximadamente 3 mm de la punta del microelectrodo, el cual se mantenía durante 24 h en posición vertical dentro de un cristizador con gel de sílice, permitiendo así, que tras la evaporación del THF, la resina se adsorbiese a las paredes internas de la barra del microelectrodo sin que quedasen burbujas de aire.

Justo antes de realizar la medida, ambas barras del microelectrodo se rellenaban con el electrolito que permite la transmisión de la señal eléctrica al electrómetro. Así, la barra de menor diámetro se rellenaba con el mismo electrolito usado en los microelectrodos simples (500 mM KCl), mientras que la barra del microelectrodo que contenía la resina selectiva para H^+ se rellenaba con una solución de 500 mM KCl tamponada con 100 mM MES-Bis Tris Propano, pH 4,3. Una vez rellenas, la barra de mayor grosor se insertaba en un porta electrodos de la misma manera que en el caso de los microelectrodos simples (apartado II.2.1) y se conectaba con la sonda A del electrómetro. Por otra parte, en la barra de menor diámetro del microelectrodo se introducía un hilo de plata clorurado (WPI, AGT IO100), sellando la base con cera. Por el otro extremo, el hilo de plata estaba conectado, a su vez, a otro portaelectrodos; así mismo, la parte expuesta al aire del hilo de plata estaba recubierta por teflón, que permite su aislamiento. Finalmente, este segundo portaelectrodos se conectaba a la sonda B del electrómetro (Figura 11).

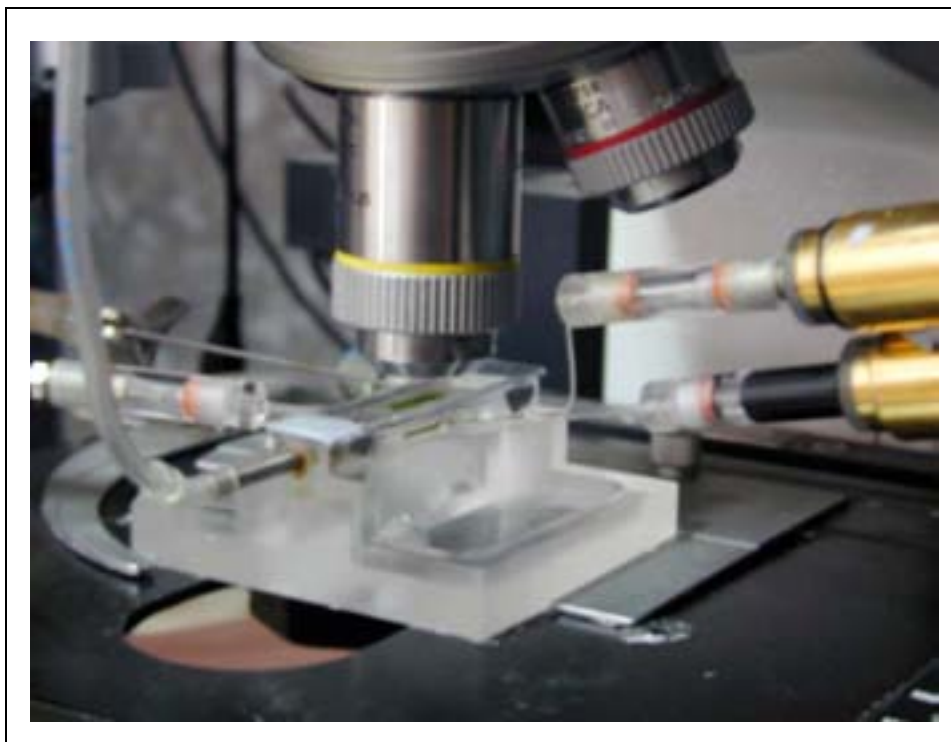


Figura 11. Microelectrodo doble conectado a las sondas A y B del electrómetro. La punta del microelectrodo doble, así como la del electrodo de referencia, localizado a la izquierda de la imagen, se sitúa en el interior de la cámara de perfusión.

Al igual que en el caso de la medida con microelectrodos simples, una vez conectado el electrodo de referencia o tierra, el electrómetro recibía la señal. En el caso de los microelectrodos dobles son dos señales diferentes, procedentes de cada una de las sondas a las que se conecta cada barra del microelectrodo, y cuya diferencia (señal A – señal B) es la diferencia de potencial eléctrico para los H^+ entre el medio externo y el electrolito. Para calcular el valor del pH de la solución en contacto con el microelectrodo, dicha diferencia se calibraba con soluciones tamponadas a distintos pH antes y después de utilizar los microelectrodos. Rutinariamente, se utilizaron soluciones de tampón fosfato a pH: 5,3; 6,3; 7,3 y 8,3. Antes del proceso de calibración, los microelectrodos se sumergían en una solución de pH 4,3 durante unos 30 min.

Al variar el pH de la solución en contacto con la punta del microelectrodo de H^+ , la señal emitida por éste (E) viene determinada, en mV, por la expresión:

$$E = E_0 - SpH_e \quad (\text{ecuación 5})$$

donde E_0 es el término independiente y S es la pendiente del ajuste lineal de la señal emitida por el electrodo en función de cada valor de pH externo.

Las medidas de pH citoplasmático con microelectrodos de H^+ se realizaron tanto en células del mesófilo foliar como en células epidérmicas de la raíz, usando el mismo sistema y procedimiento descrito en el apartado II.2.1. En este caso, sin embargo, el potencial de punta del microelectrodo selectivo para H^+ viene determinado por la diferencia entre el pH del medio y el de la solución electrolito (pH 4,3).

La señal eléctrica de cada una de las barras del microelectrodo se amplificaba usando el mismo electrómetro de alta impedancia descrito en el apartado II.2.1, conectado al registrador, en el que simultáneamente se recogían las medidas de cada una de las sondas (sonda A y sonda B), así como la diferencia entre las dos ($A - B$) que corresponde con la medida de pH citoplasmático (Figura 12).

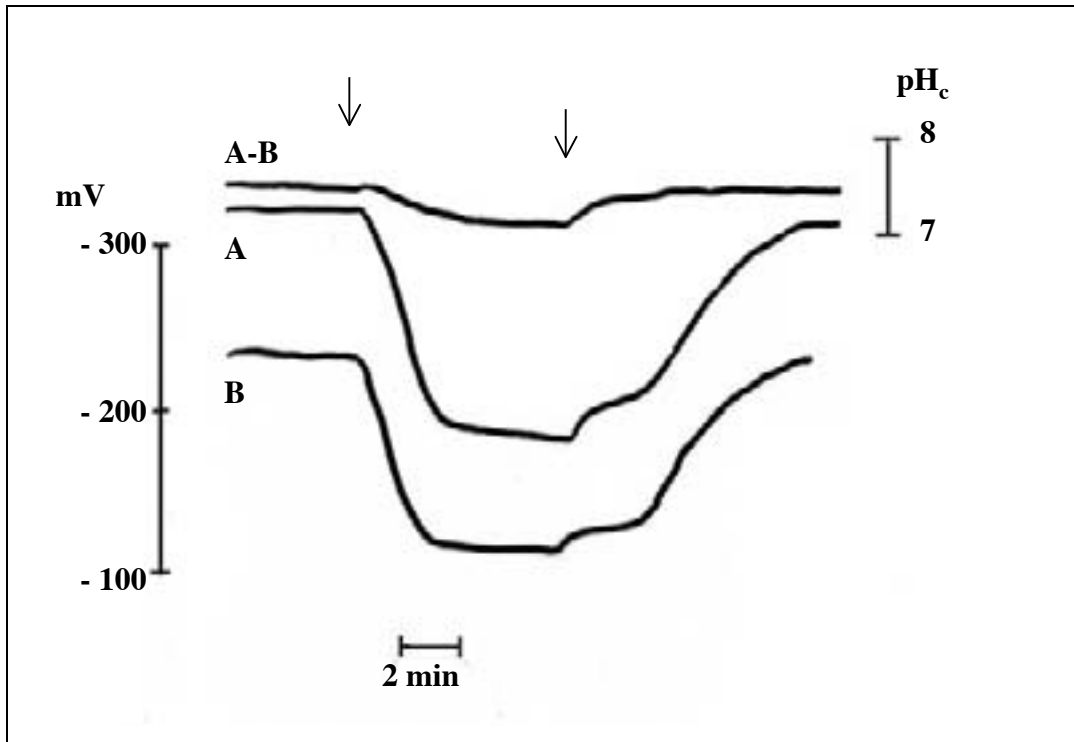


Figura 12. Ejemplo de la medida con microelectrodos selectivos para H^+ . Los tres trazos simultáneos muestran las señales de un microelectrodo selectivo para H^+ insertado en una célula del rizoide de *Riccia fluitans* L. La señal A corresponde a la barra del microelectrodo que contiene el electrolito y el sensor para H^+ . La señal B, correspondiente a la barra del microelectrodo que sólo contiene el electrolito, es el E_m . Finalmente, la diferencia de ambas señales (A-B) determina el pH citoplasmático (pH_c). Las flechas indican el momento de la adición y retirada del medio de ensayo, respectivamente, de 100 mM NaCN (tomado de Felle y Bertl, 1981).

II.2.2.3 Microelectrodos de Na^+ : medida de actividades de Na^+

Los microelectrodos selectivos para Na^+ se fabricaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior para microelectrodos selectivos para H^+ (Fernández *et al.*, 1999) con pequeñas modificaciones (Carden *et al.*, 2001). La resina selectiva de Na^+ se preparó a partir del cóctel comercial de Fluka nº 71176, mezclado con la solución de PVC disuelto en THF (1,5 % p/v) en una proporción 1:6 (v/v). El cóctel para Na^+ contiene (en peso): 10 % de ionóforo para Na^+ ETH 227 (N,N',N'-triheptil-N,N',N'-trimetil-4,4',4'-propilidinetris(3-oxabutiramida),

Fluka n° 71732), 89,5 % de 2-nitrofenil octil eter (o-NPOE, Fluka n° 73732) y 0,5 % de tetrafenil borato de sodio (Fluka n° 72018).

El principal ión que interfiere en la medida de Na⁺ con microelectrodos de Na⁺ es el K⁺, siendo el coeficiente de selectividad del ionóforo de Na⁺ utilizado respecto a K⁺ del orden de milésimas ($K_{NaK}^{Pot} \Delta 0,005$; Carden *et al.*, 2001). Por tanto, puesto que la presencia de K⁺ podría interferir en la medida de Na⁺, se recomienda que la calibración de los microelectrodos de Na⁺ se haga en presencia de concentraciones fisiológicas de K⁺ (Carden *et al.*, 2001).

Los microelectrodos de Na⁺ se calibraron por el método de disoluciones mezcladas que contenían NaCl en un rango de 1 a 500 mM, en presencia de 96 mM KCl y tamponadas a pH 7,3 (10 mM MOPS-Bis Tris Propano). La señal emitida por el microelectrodo de Na⁺ (E) viene determinada, en mV, por el potencial de Nernst para el Na⁺ (ecuación 6):

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[Na^+]_e}{[Na^+]_i} \quad (\text{ecuación 6})$$

donde R es la constante de los gases (8,31 J K⁻¹ mol⁻¹), T es la temperatura absoluta, z es la carga (+1), F la constante de Faraday (96,5 J mol⁻¹ mV⁻¹) y los subíndices “e”, “i” se refieren a la concentración de Na⁺ en la solución de calibración y en el electrolito (interior del microelectrodo), respectivamente. Por ser fija la concentración de Na⁺ del electrolito (500 mM NaCl) la ecuación anterior puede describirse como:

$$E = E_0 - S \log [Na^+]_e \quad (\text{ecuación 7})$$

donde E_0 es el potencial del electrodo cuando la $[Na^+]_e = 1$ M y S es la pendiente en mV por cambio en un orden de magnitud de la concentración externa de Na⁺ (1 unidad de pNa).

La señal eléctrica esperada para el sensor de Na⁺ que se utilizó es $53 \pm 2,5$ mV por unidad de pNa en un rango de concentraciones 1-100 mM NaCl, siendo su límite de detección próximo a 3 mM Na⁺ (Ammann, 1986)

Al igual que en el caso de los microelectrodos selectivos para H⁺, la mezcla formada por el cóctel para Na⁺ y la solución de PVC se introducía en el interior de la barra de mayor diámetro del microelectrodo silanizado, con ayuda de una aguja *Microfil* similar a la utilizada en para los microelectrodos de H⁺ (WPI, referencia: MF34G-5). Se rellenaban aproximadamente 3 mm de la punta del microelectrodo, el cual se mantenía durante 24 h en posición vertical dentro de un cristizador con gel de sílice; permitiendo así, que tras la evaporación del THF, la resina se adsorbiese a las paredes internas de la barra del microelectrodo, eliminándose las burbujas de aire generadas durante el llenado.

Justo antes de usar el microelectrodo, se procedía con el llenado de cada una de las barras con el electrolito. La barra que contiene la resina se rellenaba con 500 mM NaCl, y se insertaba en un porta electrodos que se conectaba a la sonda A del electrómetro. Por otra parte, la barra de menor diámetro se rellenaba con 500 mM KCl y se conectaba al canal B del electrómetro a través de un hilo de Ag clorurado en los extremos y recubierto de teflón en la zona en contacto con el aire (Figura 11). Tras conectar el electrodo de referencia, la diferencia entre las dos señales (señal A - señal B) que se registra en el electrómetro corresponde a la diferencia de potencial eléctrico para Na⁺. Dicha diferencia se calibraba, antes y después de utilizar los microelectrodos, con diferentes soluciones de NaCl en un fondo de KCl. Antes de usarlos, los microelectrodos se sumergían durante unos 30 minutos en una solución de 500 mM NaCl y posteriormente se calibraban. Rutinariamente se usaron soluciones de 0,1, 1, 10, 25, 50, 100 y 500 mM NaCl en presencia de 96 mM KCl, concentración que da lugar a una actividad de K⁺ próxima a la esperada en el citoplasma de células vegetales (Carden *et al.*, 2001). El llenado de las barras con distinto electrolito (500 mM de KCl o NaCl) no generó ninguna variación en el potencial de punta de las barras del microelectrodo en ausencia de sensor.

De la misma forma que en el caso de la medida de pH citoplasmático, la señal eléctrica de cada una de las barras del microelectrodo selectivo para Na^+ se transmite al registrador, en el que simultáneamente se recogen las medidas de cada una de las sondas (sonda A y sonda B), así como la diferencia entre las dos ($A - B$), a partir de la cual se obtiene el valor de actividad de Na^+ de la solución en contacto con el microelectrodo. El potencial de punta del microelectrodo de Na^+ viene determinado por el potencial eléctrico generado por la diferencia de concentración de Na^+ entre el medio y el electrolito (500 mM NaCl).

Las medidas de concentración citoplasmática de Na^+ se desarrollaron en células epidérmicas de la raíz y del mesófilo foliar, utilizando el mismo sistema descrito para la medida de E_m y pH citoplasmático (apartado II.2.1).

La actividad citoplasmática de Na^+ se calculó multiplicando el valor de concentración citoplasmática obtenido por el coeficiente de actividad de Na^+ (α). Dicho coeficiente se obtuvo a partir de la pendiente del ajuste lineal de la actividad iónica correspondiente a cada concentración de Na^+ presente en las soluciones de calibración de los microelectrodos.

II.3 Aislamiento y purificación de vesículas de plasmalema

La membrana plasmática presenta unas características superficiales que la diferencian del resto de membranas intracelulares y le confieren una extremada adsorción al polietilen-glicol (Albertsson, 1971). Así, suelen ser purificadas por separación de fases con mayor rendimiento que por centrifugación en gradiente de densidad (Widell y Larsson, 1981; Lundborg *et al.*, 1981; Larsson, 1984). El método de reparto en dos fases (dextrano y polietilenglicol) garantiza el aislamiento de la membrana plasmática, sellada en forma de vesículas con la cara citoplasmática hacia el exterior, sin demasiada contaminación con otras membranas intracelulares; además, es un método rápido (Larsson, 1984).

El sistema de reparto en dos fases separadas se fundamenta en la mezcla de disoluciones acuosas de dos polímeros, dextrano y polietilenglicol (PEG). La formación de dos fases separadas viene determinada por la proporción de peso de ambos polímeros y es extremadamente dependiente de la temperatura, produciéndose la mezcla de las dos fases por encima de los 4 °C. La fase superior está enriquecida en PEG, mientras que el dextrano se concentra en la fase inferior.

A su vez, la formación de las dos fases se ve favorecida por la presencia de aniones divalentes, tales como fosfato, sulfato, citrato o malato (Larsson, 1984).

La distribución de las membranas celulares (microsomas) a lo largo de las dos fases se obtiene mezclando un tejido homogeneizado con las fases de partición. Tras la mezcla, la fase superior queda enriquecida en vesículas de membrana plasmática (Figura 13). Con objeto de incrementar la pureza del extracto, la fase superior, enriquecida en vesículas de membrana plasmática, puede seguir un segundo proceso de reparto, mezclando dicha fase superior con la fase inferior (rica en dextrano) de un segundo tubo de reparto.

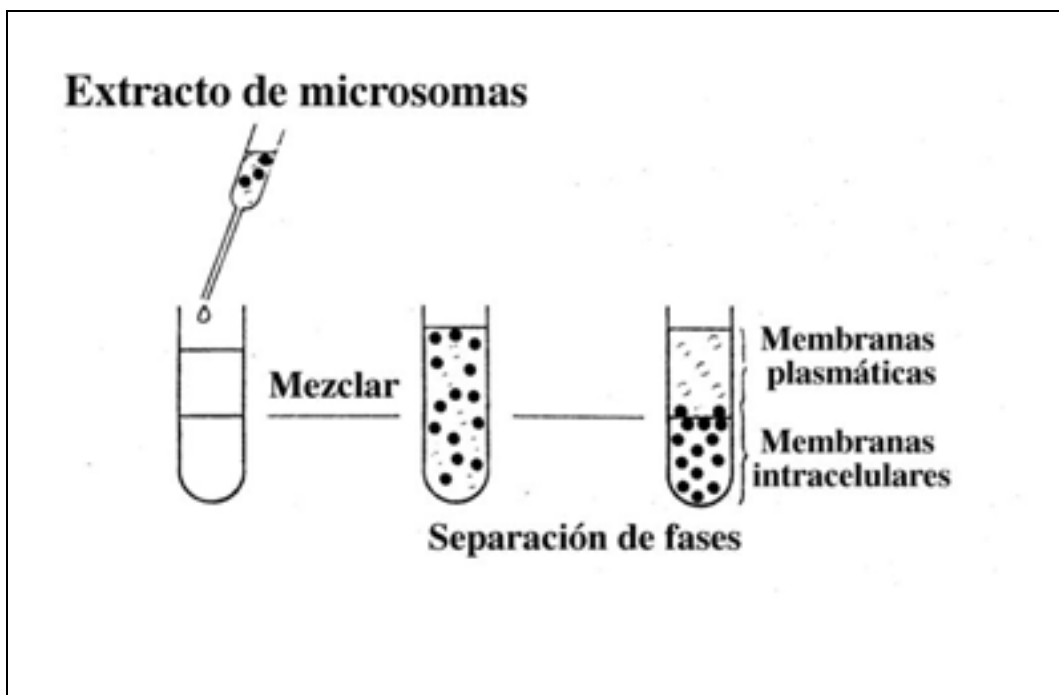


Figura 13. Esquema de la purificación de vesículas de plasmalema. El extracto de microsomas, procedente de la homogeneización, se deposita en un tubo que contiene las dos fases de reparto, la superior rica en PEG y la inferior en dextrano. Tras la mezcla, la fase superior queda enriquecida en vesículas de plasmalema (Larsson, 1984).

II.3.1 Homogeneización de tejidos: obtención de microsomas

La homogeneización de tejidos foliares y radiculares de *Z. marina*, para la posterior purificación de vesículas de plasmalema, se realizó siguiendo el protocolo descrito por Muramatsu *et al.* (2002) para esta planta, con pequeñas modificaciones (Ballesteros *et al.*, 1998b).

Se homogeneizaron de 30 a 80 g de PF de tejido radicular y foliar por separado. Ambos tejidos se separaron, se lavaron con agua destilada, se secaron con papel de filtro en secadora de verduras y se homogenizaron a 4 °C (homogenizador Sorvall Omnimixer) en *tampón de homogeneización*, que se añadía en una proporción 1:4 (p/v).

El *tampón de homogeneización* consistía en una disolución formada por: 250 mM Sorbitol; 25 mM Bis Tris Propano; 2 mM MgCl₂; 2 mM EGTA-Bis Tris Propano (pH 7,5); 0,2 % (p/v) Albúmina bovina libre de ácidos grasos (BSA); 10 % (p/v) Glicerol y 0,5 mM Butilato de hidroxitolueno (BHT). A esta disolución inicial se le añadía, justo antes de ser utilizada: 5 mM Na₂S₂O₅, 1 mM Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 2 mM Ditiotretitol (DTT). Finalmente, se ajustaba el pH a 8 añadiendo unas gotas de ácido sulfúrico concentrado y se añadía, en polvo, Polivinilpirrolidona 40 (PVP 40) al 2,5% (p/v).

Una vez homogeneizado, el tejido se filtraba a través de 4 – 6 capas de gasa y el extracto obtenido se centrifugaba a 8.000 g durante 15 min a 4 °C (centrífuga Sorvall, rotor SS-34 ó SS-60).

El sobrenadante obtenido de la centrifugación anterior, se centrifugaba nuevamente durante 25 min a 150.000 g (centrífuga Beckman, rotor 60 Ti –46.000 rpm ó rotor 70 Ti –45.200 rpm). Tras esta segunda centrifugación, se recogía el *pellet*, que correspondía al conjunto de microsomas, y se resuspendía en *tampón de partición*, para la posterior purificación de vesículas de plasmalema, o en *tampón de conservación* para su almacenamiento. La preparación microsomal

ha de ser usada inmediatamente o almacenarse a -70°C , después de ser congelada en N_2 líquido, para su uso posterior. Para cuantificar el rendimiento de la purificación se tomaba una alícuota (5-10 μL) del extracto, que se usaba posteriormente en la determinación de proteínas.

El *tampón de partición* consistía en una disolución 250 mM Sacarosa con 10 mM KH_2PO_4 a la que se le añadía, justo antes de ser utilizada, 0,1 mM PMSF y se le ajustaba el pH hasta 7,8 con unas gotas de KOH (0,1N).

Por otra parte, el *tampón de conservación* consistía en una disolución formada por: 250 mM Sorbitol; 2 mM MES-Bis Tris Propano (pH 7,5); 1 mM EGTA-Bis Tris Propano (pH 7,5) y 10 % (p/v) Glicerol, a la que se le añadía, justo antes de ser utilizada, 0,1 mM PMSF; 2 mM DTT y 0,2 % (p/v) BSA.

II.3.2 Columnas de reparto: purificación de vesículas de plasmalema

El aislamiento de vesículas de plasmalema a partir de los microsomas de tejido foliar y radicular de *Z. marina* se realizó por reparto en fases separadas en dos pasos sucesivos (Yoshida *et al.*, 1983).

Las fases de reparto se prepararon en tubos *Corex* de 30 mL, añadiendo en peso: 5,6 % (p/p) Dextrano; 5,6% (p/p) PEG; 250 mM Sacarosa; 10 mM tampón fosfato (pH 7,8) y 30 mM NaCl. Finalmente, se añadía agua destilada hasta un peso final de 18 g, en el caso de los tubos para el primer reparto, y hasta 20 g para los del segundo. Se mezclaba por 40 inversiones y se mantenía a 4°C una noche para comprobar la formación de las fases.

El proceso de reparto comenzaba añadiendo 2 mL del extracto de microsomas, resuspendido en *tampón de partición*, a la fase superior del primer tubo, completando hasta 20 g su contenido. Se mezclaba por 40 inversiones y se centrifugaba en rotor basculante a 1.500 g durante 5 min, a 4°C para el establecimiento de las fases. Si el proceso de reparto ocurría adecuadamente, la

fase superior, enriquecida en vesículas de plasmalema, era transparente. Mientras que la zona de la interfase, así como la fase inferior, mostraban una tonalidad verdosa característica de las membranas cloroplastídicas, en el caso de extractos microsomales de tejido foliar, o una tonalidad pardo amarilla, con los extractos de tejido radicular.

El segundo reparto se realizaba cargando aproximadamente el 90 % de la fase superior del primer tubo de reparto sobre la fase inferior del segundo tubo, al que previamente se le retiraba su fase superior. A continuación, se procedía con la mezcla por inversión y la centrifugación en rotor basculante (1.500 g, 5 min) a 4 °C. Tras este segundo reparto, se recogía la fase superior, se diluía en *tampón de lavado* y se centrifugaba a 150.000 g durante 25 min a 4 °C (Sorvall, rotor 60 Ti-46000 rpm), con objeto de eliminar el exceso de PEG.

El *tampón de lavado* consistía en una disolución de 250 mM Sorbitol; 2 mM MES-Bis Tris Propano, pH 7,5; 1 mM EGTA-Bis Tris Propano, pH 7,5 y 10 % (p/v) Glicerol, a la que se le añadía (justo antes de usar) 0,1 mM PMSF y 2 mM DTT.

Por último, el *pellet* obtenido tras la centrifugación del extracto en *tampón de lavado*, enriquecido en vesículas de plasmalema, se resuspendía en *tampón de conservación*. Finalmente, tras retirar una alícuota (5–10 μ L), para la determinación de proteínas, se congelaba en N₂ líquido y se almacenaba a –70 °C.

II.3.2.1 Rendimiento de la purificación de plasmalema: cuantificación de proteínas

El rendimiento del proceso de purificación se cuantificó mediante el cociente entre la cantidad de proteínas presente en el extracto de plasmalema y la cantidad de proteína presente en el extracto de microsomas. La cantidad de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976), basado en la unión entre la proteína y el colorante azul de *Coomasie* en medio ácido. Se utilizó el reactivo

comercial BIO-RAD (Bio-Rad Protein assay; Laboratories GmbH) en proporción 1:4 (v/v) en presencia de Triton X-100 (0,2 % v/v). Transcurridos 5 min se midió la absorbancia a 595 nm. La recta patrón se elaboró con BSA en el rango 5 – 20 mg proteína mL⁻¹.

II.3.3 Determinación del transporte de H⁺ en vesículas de plasmalema

El transporte de H⁺ en vesículas de plasmalema de tejido foliar de *Z. marina* ya había sido caracterizado previamente por otros autores (Muramatsu *et al.*, 2002). Como consecuencia de la actividad H⁺-ATPasa, se establece un gradiente de pH a través de las vesículas de plasmalema, el cual se pone de manifiesto mediante una sonda fluorescente sensible a H⁺. Así, en las vesículas de plasmalema aisladas de tejido foliar y radicular se determinó el transporte de H⁺ usando como sonda 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA; Molecular Probes), la cual se une a la membrana y emite fluorescencia en medio ácido (Blumwald *et al.*, 1987; Ballesteros *et al.*, 1996).

La emisión de fluorescencia de la sonda ACMA, disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO), se cuantificó con un espectrofluorímetro Shimadzu (modelo RF 540), siendo la longitud de onda de excitación de 418 nm y la de emisión de 485 nm. La cuantificación de la actividad transportadora de H⁺ en vesículas de plasmalema (15-30 µg proteínas) se cuantificó en 1 mL de medio de reacción, similar al usado por Muramatsu *et al.* (2002), y que estaba formado por: 10 mM MES-Bis Tris Propano pH 7; 100 mM KCl; 1,5 mM ATP-Bis Tris Propano pH 7; 1 µM BSA; 1 mM DTT; 125 nM Valinomicina y 1 µM ACMA. Tras 10 min de incubación a 26 °C, la reacción se iniciaba por adición de 1,5 mM MgSO₄. En estas condiciones, la actividad de la H⁺-ATPasa provocaba la acumulación de H⁺ en el interior de la vesículas de plasmalema y en consecuencia se establecía un gradiente de pH, entre el interior y el exterior de la vesícula, que se ponía de manifiesto por la extinción gradual de la fluorescencia emitida por la sonda. Finalmente, el gradiente de pH establecido era disipado, y la fluorescencia inicial

recuperada, tras la adición de 10 mM NH_4Cl , pudiendo utilizarse cualquier otro protonóforo (Palmgren, 1990; Ballesteros *et al.*, 1998b; Muramatsu *et al.*, 2002).

II.4. Diseño experimental

II.4.1. Estudio electrofisiológico del transporte de NO_3^- , NH_4^+ y P_i en células del mesófilo foliar y de la epidermis radicular

Puesto que tanto el ión motriz como los iones que se transportan poseen una carga neta, cuando el balance de cargas es distinto de cero, el transporte de nutrientes a través de la membrana plasmática genera una señal eléctrica. Así, el cambio en el E_m (generalmente despolarizaciones, ΔE_m) asociado al movimiento de una cantidad de carga neta a través de la membrana, como consecuencia del transporte de un ión o molécula, puede registrarse mediante la medida en continuo del E_m con un microelectrodo insertado en una célula concreta, sometida a la adición de concentraciones crecientes de un nutriente determinado. De este modo, cuanto mayor sea la cantidad de sustrato que se transporte, mayor será la señal eléctrica que se genere y, por tanto, se registrará una mayor despolarización, pudiendo alcanzar un valor máximo (D_{max}) en el caso de que el transporte se sature. Así mismo, si las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de un sustrato se ajustan al modelo de saturación de Michaelis-Menten, la V_{max} o capacidad máxima del transportador es análoga a la D_{max} (Glass *et al.*, 1992) y la K_m viene determinada por la concentración de sustrato que da lugar a una despolarización cuyo valor es la mitad de la D_{max} . En la Figura 14 se muestra un ejemplo representativo del ajuste al modelo de Michaelis-Menten, de las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de NO_3^- en una célula del mesófilo foliar de *Z. marina* (García-Sánchez *et al.*, 2000).

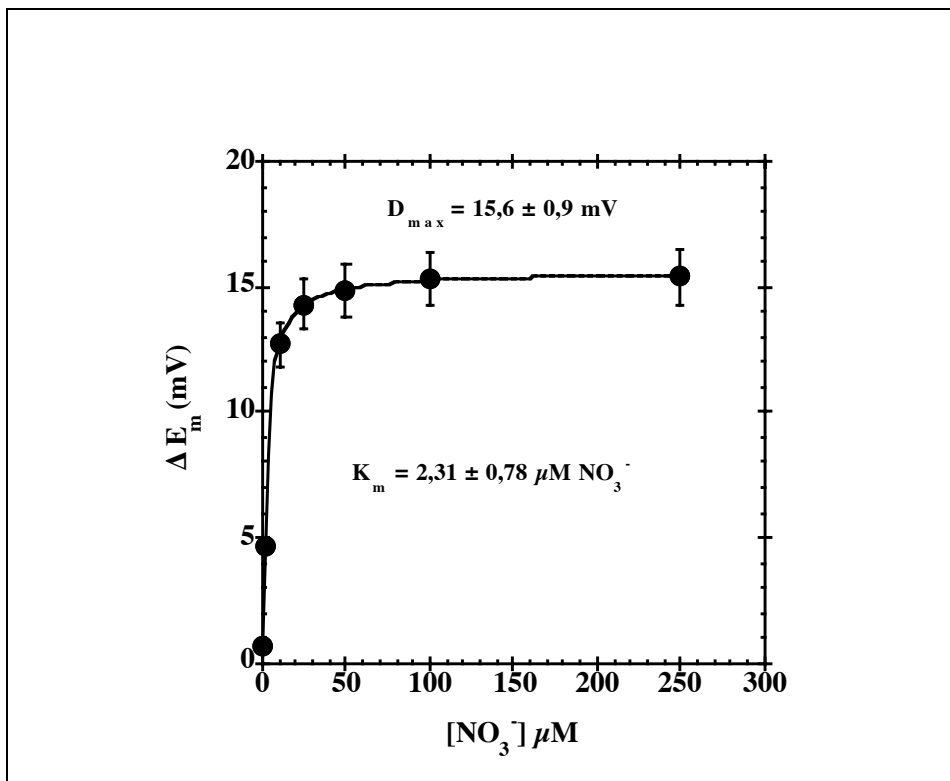


Figura 14. Ejemplo de caracterización electrofisiológica del transporte de NO_3^- . Despolarizaciones de la membrana de una célula del mesófilo foliar de *Z. marina* inducidas por diferentes concentraciones externas de NO_3^- . Se incluyen los parámetros del ajuste de los valores al modelo de Michaelis-Menten (García-Sánchez *et al.*, 2000).

II.4.1.1 Transporte de NO_3^-

Puesto que la caracterización electrofisiológica del transporte de NO_3^- en células del mesófilo foliar de *Z. marina* ya fue realizada por nuestro grupo de investigación (García-Sánchez *et al.*, 2000), el estudio del transporte de NO_3^- en el presente trabajo se desarrolló únicamente en las células epidérmicas de la raíz.

II.4.1.1a **Efecto de la adición de NO_3^- sobre el potencial de membrana**

El análisis del efecto de la adición de NO_3^- sobre el E_m de células epidérmicas de la raíz de *Z. marina* se realizó en raíces de plantas preincubadas,

durante al menos 3 días, en ausencia de N. El medio en el que se preincubaron las plantas fue *agua de mar artificial* (AMA) tamponada a pH 8 con 200 μM NaOH y a la que se le añadía 10 μM NaH_2PO_4 , siendo despreciable la cantidad de Na^+ derivada de la adición de estos componentes al medio. La composición del AMA fue: 500 mM NaCl, 10mM KCl, 12 mM CaCl_2 , 55 mM MgCl_2 y 2 mM NaHCO_3 . El efecto del NO_3^- sobre el E_m de una misma célula se cuantificó añadiendo concentraciones crecientes de NaNO_3 (0,1; 1; 10; 15; 25; 50 y 100 μM) al medio de ensayo, que consistía en AMA, pero tamponada a pH 8 con 10 mM MOPS-Bis Tris Propano. Salvo en aquellos medios de ensayo en los que se especifique, el pH del AMA se ajustó a pH 8 con la concentración de tampones indicada anteriormente. La medida del potencial de membrana se realizó insertando microelectrodos simples en las células epidérmicas de la raíz, según se describe en el apartado II.2.1 (Figura 9B).

Los tampones biológicos utilizados para mantener el pH del medio se eligieron en función de que tamponasen un rango de pH próximo al pH descrito para agua de mar (pH 8; Riley y Chester, 1971) y que no contuviesen sales sódicas. Además, se tuvo en cuenta que los tampones utilizados no tuviesen un efecto inhibitor de la tasa de fotosíntesis o de la respiración de *Z. marina* (Hellbon *et al.*, 2001). Para ello, aunque no se muestra en el capítulo de *Resultados*, se realizó un estudio dosis-respuesta en el que se cuantificó el efecto inhibitor de la adición de concentraciones crecientes de MOPS y Bis Tris Propano, entre otros, sobre la tasa de fotosíntesis de *Z. marina*. Sólo se detectó un efecto inhibitor, en torno al 30 % de la tasa máxima de fotosíntesis, cuando la concentración de tampón añadida era superior a 20 mM.

II.4.1.1b Determinación del ión motriz para el transporte de NO_3^-

Con objeto de determinar el ión motriz para el transporte de NO_3^- en células epidérmicas de la raíz, se realizaron experimentos en los que se disminuía el pH del medio AMA y, por otra parte, se utilizó AMA con diferentes concentraciones de Na^+ . Ambos experimentos se realizaron en raíces de plantas

preincubadas durante 3 días en ausencia de N, en AMA tamponada a pH 8, según se indica en el apartado anterior (II.4.1.1a).

Del mismo modo que en caso anterior, en primer lugar se determinó el efecto de la adición de 100 μM NaNO_3 sobre el E_m en AMA tamponada a pH 8 (10 mM MOPS-Bis Tris Propano). Seguidamente, tras retirar el NaNO_3 , el medio de ensayo se sustituyó por AMA tamponada a pH 6,5 y se volvió a añadir 100 μM NaNO_3 . Este valor de pH se obtuvo variando la proporción MOPS-Bis Tris Propano, siendo la concentración final de tampón en el medio 10 mM.

Por otra parte, se analizó el efecto de la adición de NO_3^- sobre el E_m de células epidérmicas de la raíz en medios con diferente contenido de Na^+ utilizando plantas preincubadas 3 días en ausencia de N. Se utilizaron tres medios de ensayo: AMA con 500 mM Na^+ , AMA libre de Na^+ o AMA que contenía 20 mM Na^+ . El medio de ensayo libre de Na^+ (sorbitol-AMA) consistía en AMA en la que se sustituía el NaCl por una concentración isosmótica de sorbitol (800 mM). Por otra parte, el medio de ensayo que contenía 20 mM Na^+ se obtuvo a partir de sorbitol-AMA a la que se le añadía 20 mM NaCl . Todos los medios se tamponaron a pH 8 (10 mM MOPS-Bis Tris Propano). La osmolaridad de los medios se midió con un osmómetro crioscópico (Gonotec, modelo 030). Las adiciones de NO_3^- se realizaron en forma de KNO_3 para no añadir Na^+ a los medios de ensayo. El efecto de la presencia de diferentes concentraciones de Na^+ sobre las despolarizaciones inducidas por NO_3^- se analizó añadiendo inicialmente 100 μM KNO_3 al medio que bañaba a la célula (AMA, 500 mM NaCl); posteriormente, tras retirar el KNO_3 del medio de ensayo, éste se sustituía por sorbitol-AMA y se volvía a añadir 100 μM KNO_3 . Finalmente, una vez retirado el KNO_3 añadido, el medio de ensayo se cambiaba nuevamente por sorbitol-AMA que contenía 20 mM NaCl y se volvía a añadir 100 μM KNO_3 . Las medidas se realizaron, al igual que en el caso anterior, con microelectrodos simples y en la misma célula.

II.4.1.2 Transporte de NH_4^+

II.4.1.2a *Efecto de la adición de NH_4^+ sobre el potencial de membrana*

El estudio electrofisiológico del transporte de NH_4^+ se realizó en células del mesófilo foliar y en células de la epidermis radicular de plantas incubadas en ausencia de N durante al menos 3 días en AMA tamponada a pH 8 (200 μM NaOH) a la que se le añadía 10 μM P_i . Como en el caso del transporte de NO_3^- , la variación del E_m de una misma célula frente a concentraciones crecientes de NH_4Cl (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 y 500 μM) se midió en AMA tamponada a pH 8 (10 mM MOPS–Bis Tris Propano), usando microelectrodos simples (véase apartado II.2.1; Figura 10).

II.4.1.2b *Determinación del ión motriz para el transporte de NH_4^+*

Al igual que en el caso del transporte de NO_3^- , se realizaron experimentos usando medios de ensayo en los que se disminuía el pH y medios en los que se variaba la concentración de Na^+ . Así, se determinó el efecto sobre el E_m de la adición de NH_4^+ en AMA tamponada a pH 8. Posteriormente, se retiraba el NH_4^+ del medio y éste se sustituía por AMA tamponada a pH 6,5 (10 mM MOPS-Bis Tris Propano). En estas condiciones se volvía a añadir NH_4^+ al medio de ensayo. El cambio en el pH del medio (de 8 a 6,5) no afecta significativamente a la disociación de NH_4^+ , ya que el valor de pK_a para la desprotonación es 9,25; así, tanto a pH 8 como a pH 6,5, la especie mayoritaria de este compuesto en el medio es NH_4^+ (99 %).

Por otra parte, se determinó el efecto de la adición de NH_4^+ sobre el E_m en medios con diferente concentración de Na^+ , utilizando AMA con 500 mM Na^+ , sorbitol-AMA y sorbitol-AMA a la que se le añadía 20 mM Na^+ . Todos los medios se tamponaron a pH 8 (10 mM MOPS-Bis Tris Propano). Al igual que se ha descrito en el apartado II.4.1.1b, el experimento comenzaba añadiendo NH_4^+ en AMA, posteriormente, tras retirar el NH_4^+ añadido, el medio de ensayo se

cambiaba por sorbitol-AMA y se volvía a añadir NH_4^+ . Finalmente, tras retirar el NH_4^+ añadido, se volvía a sustituir el medio de ensayo por sorbitol-AMA que contenía 20 mM Na^+ y se añadía NH_4^+ .

II.4.1.3 Transporte de P_i

II.4.1.3a Efecto de la adición de P_i sobre el potencial de membrana

El efecto de la adición de P_i sobre el E_m se analizó en células del mesófilo foliar y en células de la epidermis radicular de plantas preincubadas sin P_i durante al menos 8 días en AMA tamponada a pH 8 (0,2 mM NaOH), a la que se le añadía 10 μM NaNO_3 . En el caso de raíces, se utilizaron las raíces secundarias de plántulas obtenidas por germinación *in vitro* de semillas (apartado II.1.3), puesto que las raíces secundarias de plantas adultas se necrosaban durante la preincubación.

La medida del potencial de membrana se realizó insertando microelectrodos simples en las células del mesófilo foliar y de la epidermis radicular (apartado II.2.1; Figura 9B) en AMA tamponada a pH 8 (10 mM MOPS-Bis Tris Propano). El efecto del P_i sobre el E_m se cuantificó añadiendo concentraciones crecientes de NaH_2PO_4 (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; μM) al medio de ensayo. Dado que el pK para la disociación de la especie H_2PO_4^- es 7,2 las especies mayoritarias de P_i presentes en el AMA tamponada a pH 8 son H_2PO_4^- (14 %) y HPO_4^{2-} (86 %).

II.4.1.3b Determinación del ión motriz para el transporte de P_i

Con objeto de determinar el ión motriz para el transporte de P_i , se utilizaron medios con diferente contenido de Na^+ y tamponados a pH 8 (10 mM MOPS-Bis Tris Propano), según se describe para el caso del transporte de NO_3^- y NH_4^+ en los apartados II.4.1.1b y II.4.1.2b. En todos los casos, la adición de P_i se realizó en forma de KH_2PO_4 .

II.4.2 Determinación de las tasas netas de incorporación de NO_3^- y P_i

Las tasas netas de incorporación se determinaron a partir de la medida de la desaparición de una cantidad inicial de nutriente, con respecto al tiempo, en medios de ensayo con diferente contenido de Na^+ , donde se incubaban raíces y hojas por separado.

II.4.2.1 Determinación del efecto del Na^+ sobre la tasa de incorporación de NO_3^-

Al igual que en los experimentos de electrofisiología, las tasas de incorporación de NO_3^- se cuantificaron en raíces de plantas preincubadas sin N durante 3 días en AMA, tamponada a pH 8 (200 μM NaOH) y a la que se le añadía 10 μM NaH_2PO_4 . El experimento se llevó a cabo en los mismos medios utilizados en los experimentos de electrofisiología en los que se varió la concentración de Na^+ , es decir: AMA; sorbitol-AMA y sorbitol-AMA con 20 mM NaCl (apartado II.4.1.1b). Las raíces (0,3 – 0,6 g de PF) se incubaron en matraces de 250 mL, mantenidos en agitación continua a 25 °C y que contenían 100 mL de medio de ensayo (Figura 15). Se realizaron 3 réplicas por cada tratamiento. Tras 1 hora de incubación en el medio de ensayo se añadían 100 μM KNO_3 y se tomaban muestras de 1 mL de medio a 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12 y 24 h. El contenido de NO_3^- de cada una de las muestras se determinó por el método colorimétrico de Shinn (1941), basado en la reacción del NO_2^- con N-naftil etilendiamida y sulfanilamida, y cuyo producto presenta una máximo de absorbancia a 550 nm. El contenido de NO_3^- de las muestras viene determinado por la diferencia entre la concentración de NO_2^- de la muestra reducida y la no reducida. La reducción de la muestra se realizó a través de una columna con limaduras de cadmio recubiertas de cobre reducido en una solución tampón 0,2 M NH_4Cl , pH 8,9 (ajustado con un gotas de NaOH 1N). Las tasas de incorporación se estimaron a partir de la pendiente del ajuste lineal del contenido de NO_3^- presente en el medio a lo largo del tiempo de incubación.

II.4.2.2 Determinación del efecto del Na⁺ sobre la tasa de incorporación de P_i

Las tasas de incorporación de P_i se cuantificaron tanto en hojas como en raíces de plantas preincubadas durante 8 días sin P_i en AMA tamponada a pH 8 (200 μN NaOH) y con 10 μM NaNO₃. Del mismo modo que en el apartado anterior, se utilizaron los medios de ensayo con diferente contenido de Na⁺. Así, se incubaron por separado las hojas y raíces (0,3 – 0,6 g Peso Fresco) en matraces de 250 mL con 100 mL de medio, en agitación continua a 25 ° C (Figura 15). Se utilizaron 3 réplicas por cada tratamiento. La composición de los medios de ensayo fue similar a la descrita en el apartado II.4.1.3b, salvo en el agente osmótico utilizado en los medios sin Na⁺. Se utilizó cloruro de colina (500 mM), puesto que la presencia de sorbitol interfería en la determinación de P_i por el método colorimétrico utilizado (Fernández *et al.*, 1985). Al igual que en el caso de los medios con sorbitol, la osmolaridad de todos los medios con cloruro de colina fue similar a la medida en AMA.

Tras 1 hora de incubación de las raíces y hojas por separado en los distintos medios de ensayo (AMA; colina-AMA y colina-AMA con 20 mM NaCl) tamponados a pH 8 (10 mM MOPS-Bis Tris Propano), se añadía 10 μM KH₂PO₄ a cada matraz y se tomaban muestras de 1 mL de medio a 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12 y 24 h. El contenido de P_i de cada muestra se determinó midiendo la absorbancia a 660 nm del producto de reacción de la muestra con oxalato de verde malaquita, en medio ácido (Fernández *et al.*, 1985). Las tasas de incorporación de P_i se calcularon a partir de la pendiente del ajuste lineal del contenido de P_i en el medio con respecto al tiempo.

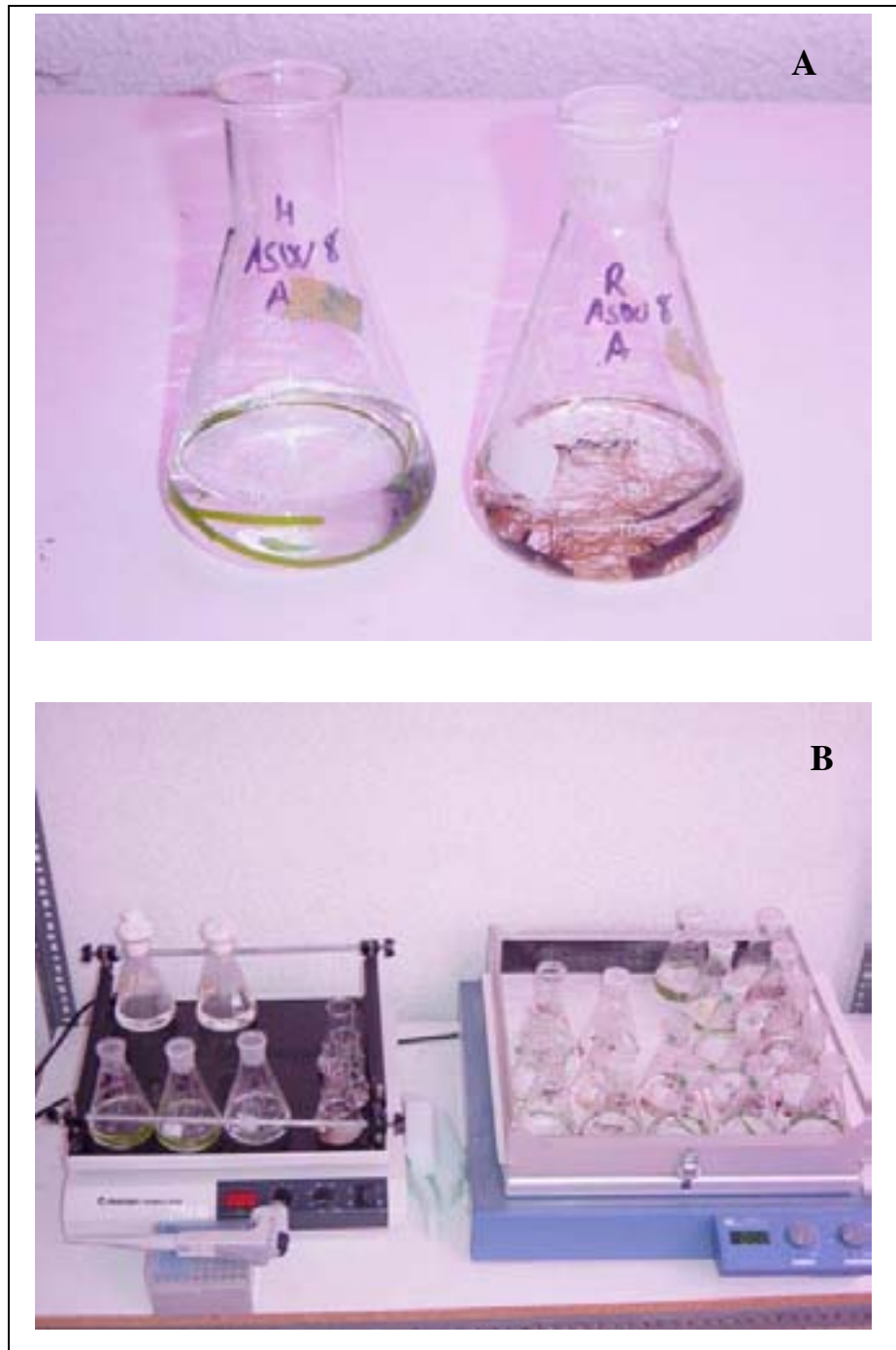


Figura 15. Incubación de raíces y hojas de *Z. marina* en diferentes medios de ensayo. Se incubaron, por separado, raíces y hojas (0,3-0,6 g PF) de plantas preincubadas en ausencia de N o P, en medios con diferente concentración de Na⁺, según se describe en el texto (A). A cada matraz se añadió 100 μ M KNO₃ o 10 μ M KH₂PO₄, según fuese tejido preincubado en ausencia de N o P respectivamente y se sometieron a agitación, tomándose muestras del medio (1 mL) a diferentes tiempos (B).

II.4.3 Estudio de la homeostasis citoplasmática de Na⁺

II.4.3.1 Determinación de la permeabilidad relativa de Na⁺ con respecto a K⁺

El cálculo de la permeabilidad relativa de Na⁺ con respecto a K⁺ se realizó en células de la epidermis radicular mediante el procedimiento empleado en células del mesófilo foliar por Fernández *et al.* (1999).

Dado que las membranas vegetales son más permeables a K⁺ que a cualquier otro ión (Raven, 1984; Véry y Sentenac, 2003), que la concentración externa de Na⁺ (Δ 500 mM Na⁺, en AMN; Riley y Chester, 1971) es superior a la citoplasmática (considerada del orden de 10 a 30 mM; Tester y Davenport, 2003) y asumiendo que la concentración interna de Na⁺ y K⁺ no varía, la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (ecuación 5) puede ser expresada en términos de permeabilidad relativa de Na⁺ con respecto a K⁺ (Fernández *et al.*, 1999):

$$P_{Na^+}/P_{K^+} = \frac{B[K_2^+]_e - A[K_1^+]_e}{A[Na^+]_e - B[Na^+]_e} \quad (\text{ecuación 8})$$

siendo $A = 10^{E_1 / -59}$ y $B = 10^{E_2 / -59}$ y E_1 y E_2 el E_D en función de la concentración de K⁺ externa, $[K_1^+]_e$ y $[K_2^+]_e$, respectivamente.

Las medidas de E_D se realizaron con microelectrodos simples en células epidérmicas de la raíz en AMA simplificada que sólo contenía 500 mM NaCl, 10 mM KCl, 10mM CaCl₂, pH 8 (10 mM MOPS-Bis Tris Propano). Una vez alcanzado un valor estable de E_m , se añadían al medio 1 mM NaCN, inhibidor de la respiración, y 1 mM ácido salicil hidroxámico (SHAM), inhibidor de la respiración resistente a cianuro (Laties, 1982), con objeto de impedir la síntesis de

ATP y despolarizar la membrana hasta su valor de E_D por desactivación de la H^+ -ATPasa (Felle, 1981). En estas condiciones se disminuía la concentración externa inicial de K^+ (10 mM) en dos pasos sucesivos, primero hasta 1 mM KCl y después hasta 0,1 mM KCl, obteniéndose así, el valor de E_D para cada concentración externa de K^+ .

La adición de ambos inhibidores se hizo a partir de disoluciones concentradas (1 M) de los mismos. En el caso de NaCN, la solución concentrada se preparó en agua destilada; sin embargo, puesto que el SHAM no es soluble en agua, la disolución concentrada de este inhibidor se preparó en 2-metoxietanol ($C_3H_8O_2$, Fluka n°: 64720), siendo despreciable la cantidad de metoxietanol añadida al medio de ensayo.

II.4.3.2 Control de las medidas intracelulares de Na^+

Aunque la probabilidad de introducir la punta del microelectrodo en la vacuola es mucho menor que la de que permanezca en el citoplasma (Ammann, 1986), la medida con microelectrodos ión selectivos debe garantizar cual es el compartimento celular que alberga la punta del microelectrodo. El registro simultáneo de la actividad del ión y el E_m permitiría discriminar las medidas citoplasmáticas de las vacuolares, ya que el valor de E_m en plasmalema es unos 20 – 30 mV más negativo que el valor de E_m en tonoplasto (Felle y Bertl, 1986). Sin embargo, la medida del pH intracelular permite discriminar de manera directa la localización de la punta del microelectrodo, ya que el valor de pH citoplasmático se sitúa en torno a 7, mientras que el pH de la vacuola es próximo a 5 (Ammann, 1986; Felle y Bertl, 1986).

Para garantizar que las señales eléctricas de los microelectrodos dobles procedían del citoplasma de las células, se realizaron medidas del pH intracelular con microelectrodos selectivos para H^+ , cuya fabricación y utilización es similar a la de microelectrodos selectivos para Na^+ (apartados II.2.2 y II.2.3). Así, se realizaron medidas del pH intracelular en células de la epidermis radicular, y se

determinó el efecto de la adición de los inhibidores de la respiración celular (1 mM NaCN y 1 mM SHAM) al medio de ensayo, que consistía en AMA tamponada a pH 8.

II.4.3.3 Efecto de la adición de inhibidores sobre la actividad intracelular de Na⁺

El efecto de diferentes inhibidores relacionados con el transporte de Na⁺ se determinó en células epidérmicas de la raíz. Las medidas de la actividad intracelular de Na⁺ se realizaron con microelectrodos dobles, según se describe en el apartado II.2.3. El medio de ensayo fue AMA tamponada a pH 8 con 10 mM MOPS-Bis Tris Propano. En primer lugar, se determinó el efecto de la adición de los inhibidores de la respiración celular utilizados para obtener el E_D , según se describe en el apartado anterior. Así, se añadía al medio de ensayo 1 mM NaCN y 1 mM SHAM y, posteriormente, ambos inhibidores se retiraban del medio.

Por otra parte, se determinó el efecto sobre la actividad intracelular de Na⁺ de la adición al medio de ensayo de 50 μ M monensina, un ionóforo de Na⁺ (Pressman, 1976). La monensina se añadía disuelta en etanol, a partir de una solución concentrada de monensina (500 mM), siendo despreciable la cantidad de etanol añadido al medio. Las medidas se realizaron, como en el caso anterior, en células epidérmicas de la raíz, en AMA tamponada a pH 8 (10 mM MOPS-Bis Tris Propano), utilizando microelectrodos dobles.

Finalmente, se determinó el efecto de la adición de amilorida, un inhibidor del antiporte Na⁺ / H⁺ (Blumwald *et al.*, 1987), sobre la actividad intracelular de Na⁺ en células de la epidermis radicular. La amilorida (200 μ M) se añadió disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma), a partir de una disolución concentrada (200 mM amilorida), siendo despreciable la cantidad final de DMSO en el medio de ensayo. Al igual que con los demás inhibidores testados, las medidas se realizaron en células epidérmicas de la raíz utilizando microelectrodos dobles. El medio de ensayo consistió en AMA tamponada a pH 8 (10 mM MOPS-Bis Tris propano).

II.4.3.4 Efecto de la adición de NO_3^- y P_i sobre la actividad intracelular de Na^+

Según había sido descrito previamente por nuestro grupo de investigación, el transporte de NO_3^- , en células del mesófilo foliar, es dependiente de Na^+ , el cual actúa como ión motriz (García-Sánchez *et al.*, 2000). Sin embargo, se desconoce qué efecto podría tener la incorporación de NO_3^- sobre la actividad intracelular de Na^+ . Así, se determinó el efecto de la adición de NO_3^- y también de P_i (suponiendo que este ión también pudiera ser transportado asociado a Na^+) en la actividad intracelular de Na^+ de células epidérmicas de la raíz.

Para determinar el efecto de la incorporación de NO_3^- sobre la actividad intracelular de Na^+ se utilizaron plántulas preincubadas durante 3 días sin N en AMA tamponada a pH 8 y con $10 \mu\text{M}$ KH_2PO_4 , según se describe en el apartado II.4.1.1. Las medidas se realizaron con microelectrodos dobles selectivos para Na^+ en células de la epidermis radicular, determinándose el efecto de la adición de $50 \mu\text{M}$ KNO_3 al medio de ensayo.

Por otra parte, el efecto de la adición de P_i sobre la actividad intracelular de Na^+ se determinó en células epidérmicas de la raíz de plántulas preincubadas durante 8 días en ausencia de P, utilizando AMA tamponada a pH 8 y con $10 \mu\text{M}$ KNO_3 , según se describe en el apartado II.4.1.3. Como en el caso anterior, las medidas se realizaron con microelectrodos dobles sensibles a Na^+ y el efecto del P_i se determinó añadiendo $10 \mu\text{M}$ KH_2PO_4 .

II.4.3.5 Efecto de la adición de Na^+ sobre el transporte de H^+ en vesículas de plasmalema

Antes de cuantificar el efecto de la adición de Na^+ en el transporte de H^+ de vesículas de plasmalema, se determinó el efecto de la adición de vanadato, un inhibidor de la H^+ -ATPasa de plasmalema (Gilmour *et al.*, 1985) con objeto de establecer si la suspensión de vesículas que habían sido purificadas correspondía a

vesículas de plasmalema. Así, se determinó el gradiente de pH formado en vesículas de membrana (15 - 30 μg proteína) en presencia de 200 μM ó 400 μM Na_3VO_4 , con respecto al gradiente de pH formado en ausencia de dicho inhibidor. Las medidas se realizaron en el medio de reacción descrito en el apartado II.3.3; así como en el mismo medio, en presencia de las concentraciones citadas de vanadato. El gradiente de pH se determinó a partir de la desaparición de la fluorescencia emitida por la sonda ACMA durante los primeros 10 minutos tras añadir 1,5 mM MgCl_2 en cada tratamiento.

El efecto de la presencia de Na^+ sobre el gradiente de pH establecido en las vesículas de plasmalema se determinó añadiendo diferentes concentraciones de Na^+ al medio de reacción, una vez establecido el gradiente de pH. En el caso de que haya actividad antiportadora Na^+ / H^+ , el gradiente de pH disminuirá como consecuencia de la entrada de Na^+ al interior de las vesículas asociada a la salida de H^+ (Barkla *et al.*, 1995; Ballesteros *et al.*, 1997; Venema *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2003). Los ensayos de actividad de antiporte Na^+ / H^+ se realizaron añadiendo Na^+ , en forma de NaCl o Na_2SO_4 (0,1 –100 mM) al medio de reacción. Finalmente, la reacción se paraba mediante la disipación completa del gradiente de pH tras la adición de 10 mM de NH_4Cl . La cuantificación de la actividad de antiporte Na^+/H^+ se realizó midiendo la recuperación de la fluorescencia del medio, en términos de porcentaje, durante el primer minuto tras la adición de cada concentración de Na^+ . La adición de Na^+ se realizó a partir de diferentes soluciones concentradas de NaCl o Na_2SO_4 , añadiendo el mismo volumen al medio de reacción en todos los casos (100 μL de cada solución concentrada).

Por otra parte, se determinó el efecto de la adición de amilorida, un inhibidor del antiporte Na^+ / H^+ , según se describe en el apartado II.4.3.3 sobre el antiporte Na^+ / H^+ en vesículas de plasmalema. Una vez establecido el gradiente de pH tras la adición de 1,5 mM MgCl_2 al mismo medio de reacción descrito en el apartado II.3.3, se añadía 100 mM NaCl y, tras 1 minuto, se adicionaba 200 μM amilorida al medio de reacción.

II.4.3.6 Determinación de los contenidos totales de Na⁺ y K⁺ en tejido radicular y foliar

La determinación del contenido total de Na⁺ y K⁺ se realizó por *espectrometría de absorción atómica*, mediante la cuantificación de la emisión a 589 nm para Na⁺ y a 776,5 nm para K⁺ de la mezcla gaseosa resultante del tratamiento térmico de la muestra. Se utilizaron muestras desecadas de tejido foliar y radicular (0,05 – 0,5 g PF), eliminando el contenido acuoso tras 24 horas de incubación a 110 °C. El análisis de las muestras se realizó en un equipo de absorción atómica marca Perking-Elmer, modelo Analyst 800.

II.5. Tratamiento de los datos

El ajuste de los datos a modelos matemáticos, tanto lineales como de saturación, se realizó con el programa informático *Kaleida Graph 3.08 (Synergy Software)*. Por otra parte se utilizó el programa *MINTEQ2 / PRODEFA2 (Environmental Research Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency)* para calcular las actividades de Na⁺ a partir de los valores de concentración de solutos y pH de las soluciones de calibración (apartado II.2.2.3) presentes en las disoluciones de calibración de los microelectrodos .

Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar (SD). El análisis estadístico de los datos se realizó por Análisis de la Varianza (ANOVA) considerando un límite de confianza (α) de 0,05.

RESULTADOS

III.1. Obtención de plántulas de *Z. marina*

Los tallos con semillas de *Z. marina*, recogidos tanto en el estuario Ems (Holanda) como en la población de Maro (Nerja, Málaga), dieron lugar a semillas maduras, considerando que tal estadio se alcanza una vez que la semilla se desprende del tallo y presenta una cubierta dura, resistente a presión mecánica (Figura 16). Se recolectaron en torno a 600 semillas en total, 70 de las cuales procedían de la población de Málaga.

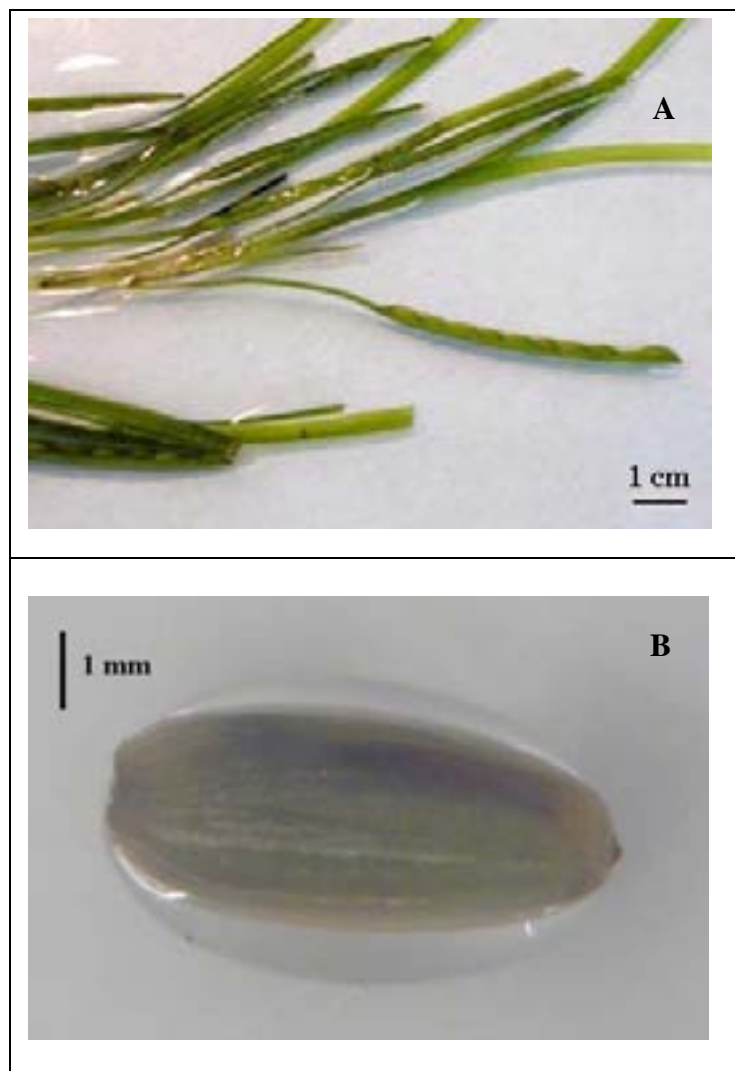


Figura 16. Semillas de *Z. marina*. Fotografía de las semillas presentes en tallos reproductivos (A). Aspecto de una semilla madura (B).

La germinación de las semillas en agua destilada tuvo un rendimiento medio del 55 %, independientemente del origen de las mismas. Tras unas 24 – 72 horas en agua destilada, se produjo la rotura de la cubierta de la semilla, desprendiéndose el embrión (Figura 17A). Dicho embrión se transfería a AMN de salinidad creciente (0,1; 1 y 10 ‰) durante 24 horas, permitiendo así su adaptación progresiva a la salinidad. Posteriormente, los embriones eran cultivados en las mismas condiciones que las plantas adultas (AMN, a 15 °C de temperatura y con fotoperiodo 16 horas luz / 8 horas oscuridad). En estas condiciones, los embriones desarrollaron inicialmente el epicótilo hasta una longitud aproximada de 3 – 5 cm, posteriormente aparecía la primera pareja de hojas y finalmente, tras unas 3 semanas de cultivo, se desarrollaba el primer par de raíces secundarias desde la base del epicótilo (Figura 17B). No obstante, solamente el 10 % de los embriones dio lugar a plántulas con hojas y raíces (Figura 17B).



Figura 17. Obtención *in vitro* de plántulas de *Z. marina*. Semilla germinada en agua destilada (A). Plántula con el primer par de raíces secundarias y hojas tras un mes de cultivo en AMN a 15 °C, con fotoperiodo 16 / 8 luz / osc (B).

Por otra parte, un 8 % de las semillas conservadas en AMN a 4 ° C y en oscuridad germinaron espontáneamente transcurridos unos 5 meses desde el almacenamiento de las semillas. Las plántulas que se desarrollaron a partir de estas semillas germinadas espontáneamente tuvieron un porcentaje de supervivencia mayor que el de las plántulas en las que la germinación fue inducida; aproximadamente un 65 % dio lugar a plántulas con hojas y raíces, prolongándose su cultivo durante un mes.

Transcurrido un mes de cultivo las plántulas eran utilizadas en los experimentos de electrofisiología, de manera que no se dispone de datos sobre la obtención de plantas adultas de *Z. marina* mediante el cultivo *in vitro* de plántulas obtenidas por germinación de semillas. El tiempo máximo de cultivo de algunas plántulas fue de unos tres meses, siendo el tamaño medio de las plántulas de unos 8 cm de longitud.

III.2. Características eléctricas del plasmalema de células de *Z. marina*

III.2.1 Células de la epidermis radicular

Las células epidérmicas de la raíz mostraron un valor de potencial de membrana (E_m) en reposo, tanto en AMN como en AMA, de -153 ± 15 mV ($n = 30$). Además, no se observaron diferencias significativas entre éste y el valor medido en células epidérmicas de la raíz de plántulas obtenidas por germinación *in vitro* a partir de semillas (ANOVA, $\gamma = 0,05$). Así mismo, los valores de E_m fueron similares, tanto en células epidérmicas de la raíz de las plántulas procedentes de semillas recolectadas en Holanda, como de las recogidas en Málaga ($E_m = -145 \pm 15$ mV; $n = 12$).

En la Figura 18 se muestran dos ejemplos representativos de la medida de E_m en una célula epidérmica de la raíz de una planta adulta (Figura 18A) y de una

plántula (Figura 18B). Tras la introducción del microelectrodo, se registró la señal correspondiente al E_m , el cual se estabilizó en torno a -140 mV en ambos casos. Según se muestra, al añadir dos inhibidores de la respiración (1 mM NaCN y 1 mM SHAM) al medio de ensayo, la membrana rápidamente se despolarizó hasta el valor denominado potencial de difusión (E_D). Al retirar dichos inhibidores del medio, el valor del E_m comenzó a recuperar su valor inicial (Figura 18).

Al igual que en el caso del E_m , las diferencias entre los valores medidos de potencial de difusión en células de la raíz de plantas adultas o plántulas no fueron significativas (ANOVA, $\gamma = 0,05$), siendo el valor medio de $E_D = -72 \pm 15$ mV ($n = 17$).

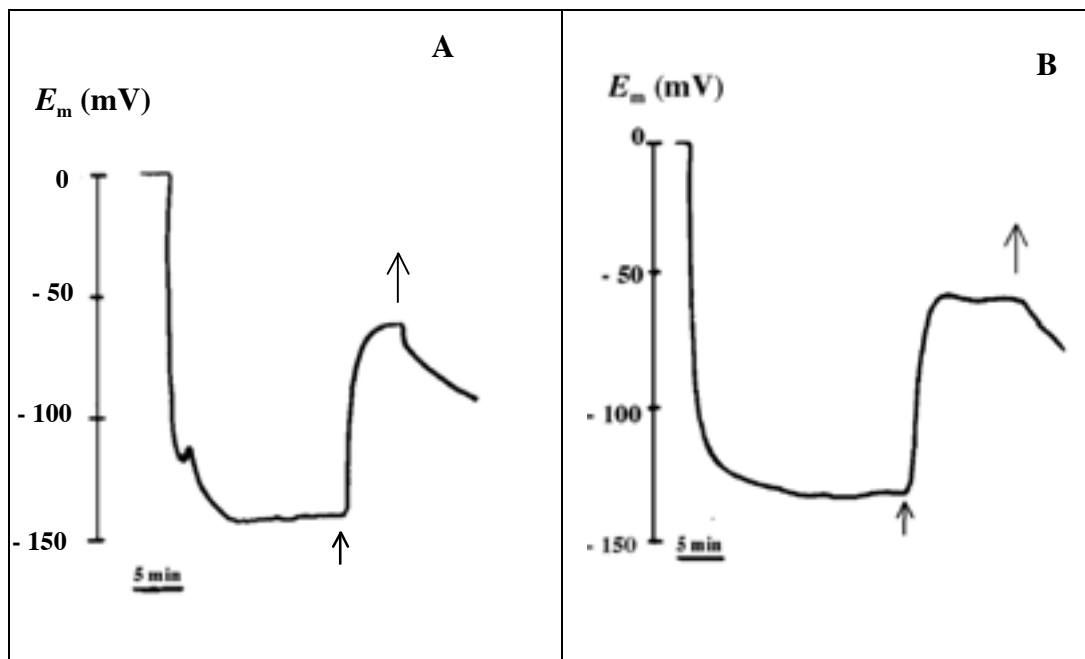


Figura 18. Medida del potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz. Las medidas se realizaron insertando microelectrodos simples en células epidérmicas de la raíz de plantas adultas (A) y plántulas obtenidas por germinación *in vitro* de semillas (B). Las flechas inferiores indican el momento de la adición al medio de ensayo (AMN) de 1 mM NaCN y 1 mM SHAM. Tras alcanzar un valor de potencial estable (E_D), ambos inhibidores se retiraron del medio según señalan las flechas superiores. Los registros corresponden a dos ejemplos representativos de 17 experimentos independientes.

III.2.2 Células del mesófilo foliar

Los valores de E_m medidos en células del mesófilo foliar de plantas adultas y plántulas obtenidas por germinación *in vitro* fueron similares (ANOVA, $\gamma = 0.05$). Así mismo, tampoco se observaron diferencias significativas entre los valores de E_m registrados en AMN o AMA. El valor medio obtenido fue $E_m = -156 \pm 13$ mV ($n = 20$). Del mismo modo que en el caso de las células de la raíz, y según se ha descrito previamente (Fernández *et al.*, 1999), el plasmalema de las células del mesófilo foliar se despolarizó en presencia de 1 mM NaCN y 1 mM SHAM en el medio de ensayo, alcanzando un valor medio de $E_D = -67 \pm 12$ mV, $n = 12$ (Figura 19).

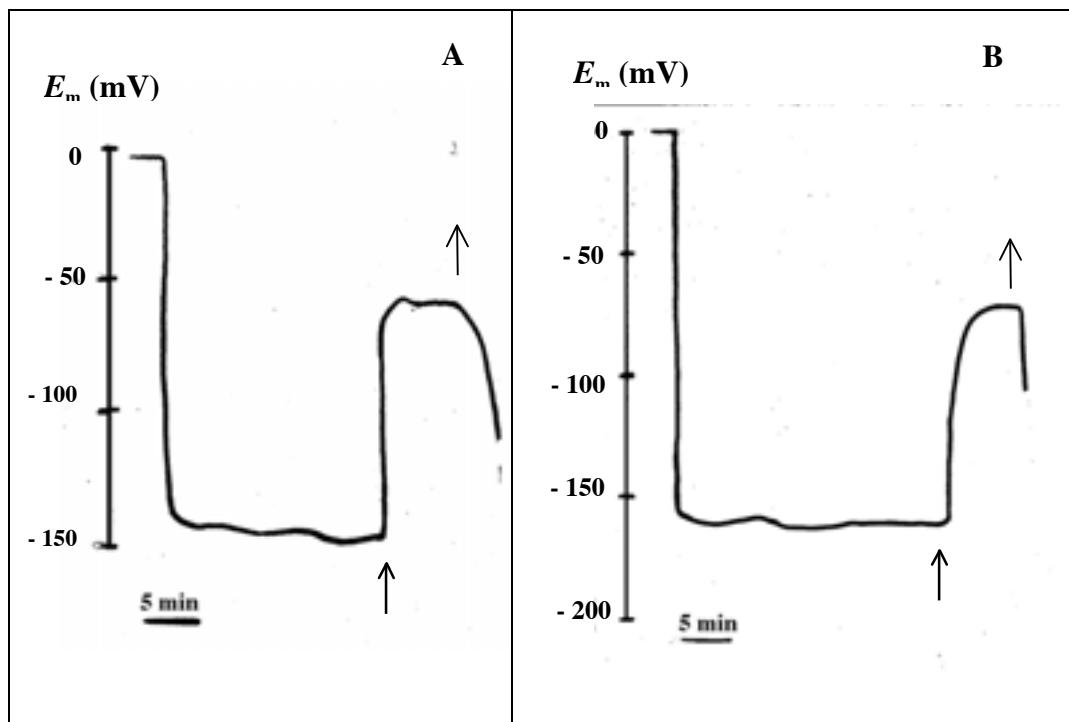


Figura 19. Medidas del potencial de membrana de células del mesófilo foliar. Las medidas se realizaron con microelectrodos simples en hojas de plantas adultas (A) y plántulas obtenidas por germinación *in vitro* de semillas (B). Las flechas inferiores indican el momento de la adición al medio de ensayo (AMN) de 1 mM NaCN y 1 mM SHAM. Tras alcanzar un valor de potencial estable (E_D), ambos inhibidores se retiraron del medio según señalan las flechas superiores. Los registros corresponden a dos experimentos representativos ($n = 12$).

III.3. Estudio electrofisiológico del transporte de NO_3^- , NH_4^+ y P_i

Según se detalla en el presente apartado, la adición de NO_3^- , NH_4^+ o P_i tuvo un efecto significativo sobre el E_m de células del mesófilo foliar o de la epidermis radicular, permitiendo el estudio electrofisiológico del transporte de estos nutrientes. En los apartados siguientes se exponen los resultados del estudio electrofisiológico del transporte de NO_3^- , NH_4^+ o P_i , analizando el efecto sobre el E_m inducido por la adición de diferentes concentraciones de cada uno de estos nutrientes. Así mismo, se muestran los resultados de los experimentos realizados para la determinar el ión motriz del transporte de dichos nutrientes, los cuales se completarán en el apartado III.5.3.5 con los resultados de las medidas con microelectrodos de Na^+ .

III.3.1 Transporte de NO_3^- en células de la epidermis radicular

Puesto que la caracterización electrofisiológica del transporte de NO_3^- en células del mesófilo foliar ya había sido realizada (García-Sánchez *et al.*, 2000), en el presente apartado sólo se exponen los resultados obtenidos en células epidérmicas de la raíz. En todos los casos las medidas de E_m se realizaron con microelectrodos simples en células epidérmicas de la raíz de plantas preincubadas durante 3 días en ausencia de N.

III.3.1.1 Efecto de la adición de NO_3^- sobre el potencial de membrana

La adición de concentraciones crecientes de NO_3^- al medio de ensayo (AMA, pH 8) provocó la rápida despolarización de la membrana de las células epidérmicas de la raíz de plantas preincubadas en ausencia de N (Figura 20). En presencia de concentraciones de NO_3^- , en el rango 0,1 – 100 μM NaNO_3 , la membrana se despolarizaba y, en consecuencia, se registraba un valor de E_m más positivo. La variación o incremento del E_m alcanzaba un valor máximo ($\approx E_m$) tras aproximadamente 1 min desde la adición de cada concentración de NO_3^- . Dicho

valor de E_m , más positivo, se mantenía hasta que se retiraba del medio cada concentración de NO_3^- añadida, restableciéndose el valor inicial de E_m (Figura 20).

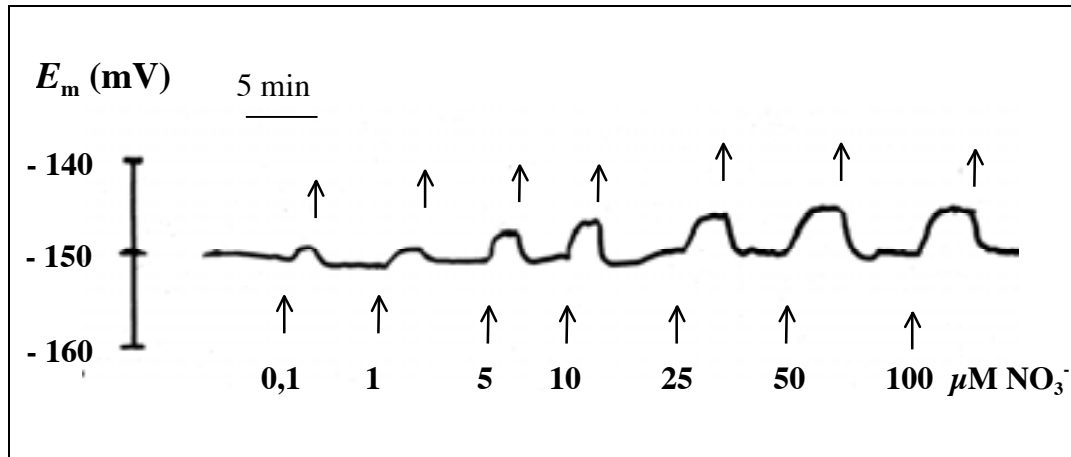


Figura 20. Efecto de la adición de NO_3^- sobre el E_m de una célula epidérmica de la raíz. La medida del E_m se realizó introduciendo un microelectrodo simple en una célula epidérmica de la raíz de una planta preincubada 3 días en ausencia de N. Las flechas inferiores señalan el cambio del medio de ensayo (AMA, pH 8) por AMA a la que se le añadía la cantidad de NaNO_3 indicada. Las flechas superiores muestran el momento en el que se retiraba el NO_3^- del medio. Se muestra un registro representativo de 5 experimentos independientes.

Las despolarizaciones detectadas ($\approx E_m$) oscilaron entre 1 y 10 mV. Los valores se saturaron a partir de $25 \mu\text{M NO}_3^-$, observándose despolarizaciones similares en el rango $25 - 100 \mu\text{M NO}_3^-$. El ajuste de los valores al modelo de Michaelis-Menten (Figura 21) permitió calcular un valor de $K_m = 8,89 \pm 3,9 \mu\text{M NO}_3^-$ y una despolarización máxima (D_{max}) de $7,01 \pm 0,8 \text{ mV}$, siendo el coeficiente de determinación de dicho ajuste $R^2 = 0.89$, $n = 5$.

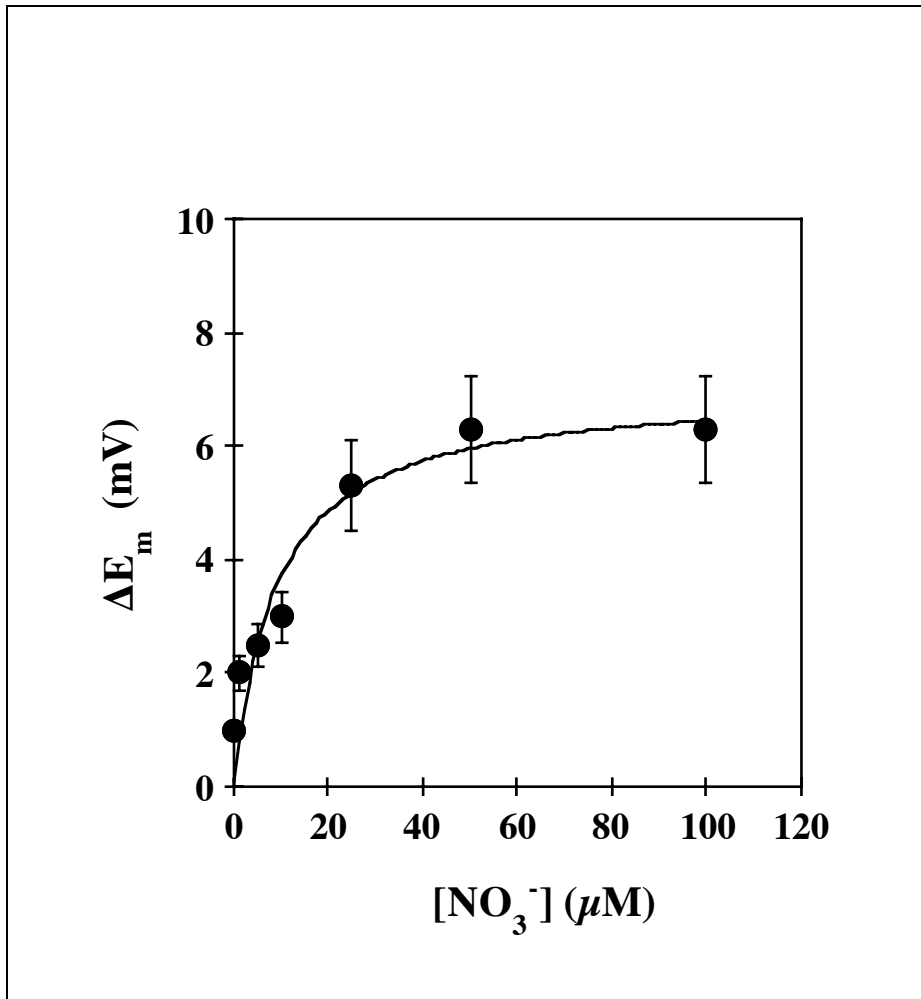


Figura 21. Representación de las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de NO₃⁻. Las despolarizaciones ($\approx E_m$) inducidas en células epidérmicas de la raíz de plantas preincubadas durante 3 días sin N se saturaron con respecto a la concentración de NO₃⁻ añadida al medio de ensayo (AMA, pH 8). Los datos se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten. Los valores corresponden a la media \pm SD (n = 5).

III.3.1.1a Efecto de la acidificación del medio sobre las despolarizaciones producidas por NO₃⁻

En contra de lo esperado para un sistema de transporte dependiente de H⁺, la acidificación del medio de ensayo tuvo un efecto inhibitor sobre las despolarizaciones inducidas por NO₃⁻ en las células epidérmicas de la raíz. Así, las despolarizaciones inducidas tras la adición de 100 µM NO₃⁻ en AMA tamponada a

pH 8 ($\approx E_m = 6 \pm 0,7$ mV; $n = 3$) fueron mayores que la registradas en AMA tamponada a pH 6,5 ($\approx E_m = 1,3 \pm 0,2$ mV; $n = 3$). Las diferencias entre ambas despolarizaciones fueron significativas (ANOVA, $\gamma = 0,05$).

En la Figura 22 se muestra un experimento representativo en el que la adición de $100 \mu\text{M NO}_3^-$ en AMA tamponada a pH 8 provocó una despolarización de 6 mV. Tras eliminar el NO_3^- del medio, el valor de E_m volvió a su valor inicial (-157 mV). Posteriormente, al cambiar el medio de ensayo por AMA tamponada a pH 6,5 se registró una hiperpolarización, es decir, el E_m se hizo paulatinamente más negativo. Transcurridos unos minutos, el valor de E_m en AMA tamponada a pH 6,5 se estabilizó en torno a -165 mV. Al añadir $100 \mu\text{M NO}_3^-$ en estas condiciones, la despolarización registrada fue solamente de 1 mV (Figura 22).

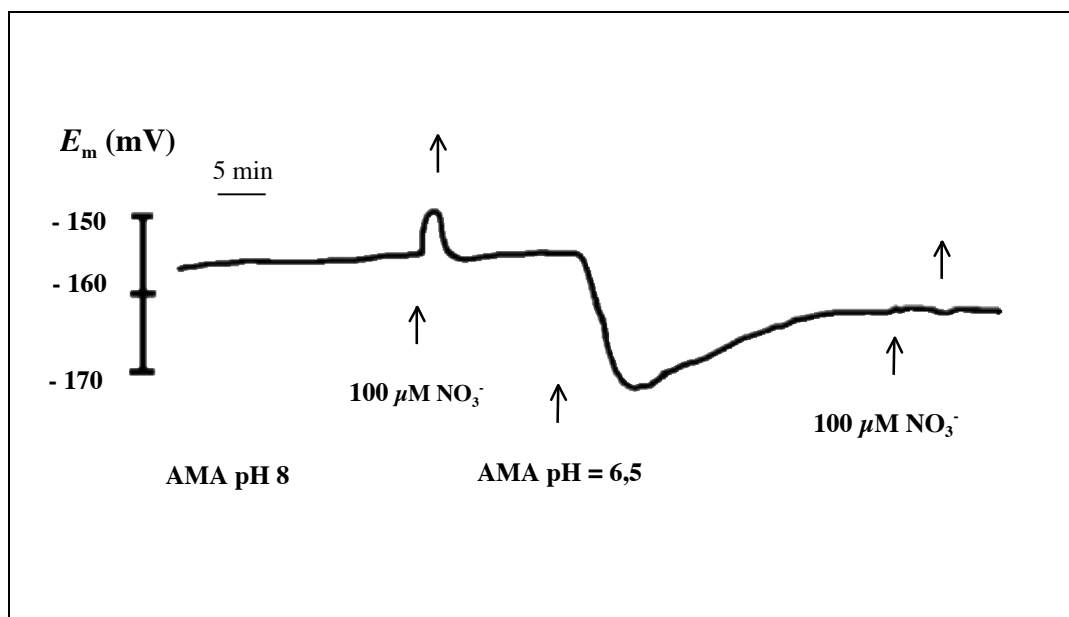


Figura 22. Efecto de la acidificación del medio sobre las despolarizaciones inducidas por NO_3^- . El registro muestra la variación del E_m de una célula epidérmica radicular al añadir $100 \mu\text{M NO}_3^-$ en AMA tamponada a pH 8. Posteriormente, tras retirar el NO_3^- (flecha superior), el medio se cambió por AMA tamponada a pH 6,5 y, una vez alcanzado un valor estable de E_m , se volvió a añadir $100 \mu\text{M NO}_3^-$. El registro corresponde a un experimento representativo ($n = 3$).

III.3.1.1b Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones inducidas por NO_3^-

Las despolarizaciones inducidas por la adición de NO_3^- sólo se observaron cuando el medio de ensayo contenía Na^+ . En la Figura 23 se muestra un experimento representativo en el que la adición de $100 \mu\text{M NO}_3^-$ al medio de ensayo, que contiene 500 mM NaCl (AMA, pH 8) provocó una despolarización de la membrana de 6 mV , que desaparecía al retirar el NO_3^- del medio. Posteriormente, el medio de ensayo se reemplazó por un medio isosmótico, en el cual se sustituyó el NaCl por 800 mM de sorbitol (sorbitol-AMA). En este nuevo medio el valor de E_m se estabilizó en torno a -145 mV . Al añadir $100 \mu\text{M NO}_3^-$ en estas condiciones, no se produjo ninguna alteración del E_m . Finalmente, tras retirar el NO_3^- añadido, el medio de ensayo se sustituyó por un medio similar, sorbitol-AMA con 20 mM NaCl . El valor estable de E_m en este medio fue de -154 mV . Al añadir de nuevo $100 \mu\text{M NO}_3^-$ al medio, se registró una despolarización de la membrana de 5 mV , recuperándose el valor de E_m inicial (-154 mV) tras retirar el NO_3^- (Figura 23).

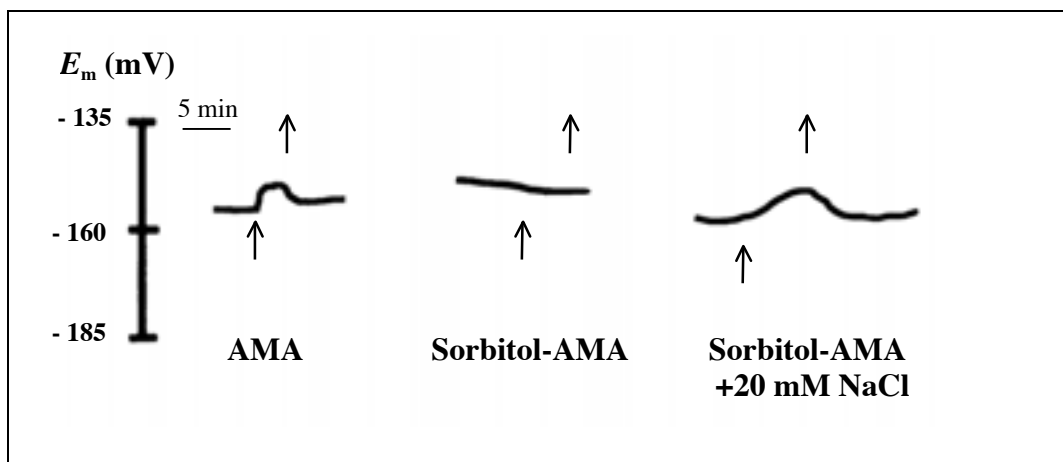


Figura 23. Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones inducidas por NO_3^- . El registro muestra la variación del E_m de una célula epidérmica de la raíz al añadir $100 \mu\text{M KNO}_3$ en medios con diferente contenido de Na^+ (500 , 0 y 20 mM NaCl). Las flechas inferiores indican el momento de la adición de NO_3^- y las superiores señalan el momento de la retirada del mismo. La osmolaridad de los medios con menor concentración de Na^+ se ajustó con $0,8 \text{ M}$ sorbitol, siendo similar a la osmolaridad medida en AMA que contenía 500 mM NaCl . El registro corresponde a un ejemplo representativo ($n = 3$).

El análisis estadístico de los datos mostró que no existen diferencias significativas entre las despolarizaciones observadas en AMA que contiene 500 mM Na⁺ ($\approx E_m = 6 \pm 1$ mV; n = 3) y sorbitol-AMA con 20 mM NaCl ($\approx E_m = 5,3 \pm 0,6$ mV; n = 3). Así mismo, ambas despolarizaciones son significativamente mayores que las registradas en el medio de ensayo que no contiene Na⁺ (sorbitol-AMA), donde la adición de NO₃⁻ no provocó variación significativa del E_m (ANOVA, $\gamma = 0,05$).

III.3.2 Transporte de NH₄⁺

El estudio electrofisiológico del transporte de NH₄⁺ se realizó midiendo con microelectrodos simples el E_m de células del mesófilo foliar y de células de la epidermis radicular de plantas preincubadas durante 3 días en ausencia de N.

III.3.2.1 Efecto de la adición de NH₄⁺ sobre el potencial de membrana de células del mesófilo foliar

La adición de concentraciones micromolares de NH₄⁺ al medio de ensayo (AMA, pH 8) provocó la despolarización del plasmalema de las células del mesófilo foliar, en plantas preincubadas en ausencia de N (Figura 24). Según se muestra en el registro de la figura, la membrana se despolarizó alcanzando una diferencia máxima con respecto al valor de E_m inicial ($\approx E_m$), diferente para cada concentración de NH₄⁺ añadida (0,01 - 500 μ M NH₄Cl). El valor inicial de E_m (-160 mV) se recuperó tras retirar la concentración de NH₄⁺ añadida. Durante el lavado, la membrana se hiperpolarizaba, registrándose momentáneamente valores de E_m más negativos que el valor de potencial inicial. La magnitud de estas hiperpolarizaciones fue de -5 a -10 mV, durante los lavados de concentraciones bajas de NH₄⁺, y en torno a -20 mV, en el caso de concentraciones superiores a 100 μ M NH₄⁺. En ambos casos, transcurridos unos minutos desde la retirada del NH₄⁺, el E_m recuperaba su valor inicial (Figura 24).

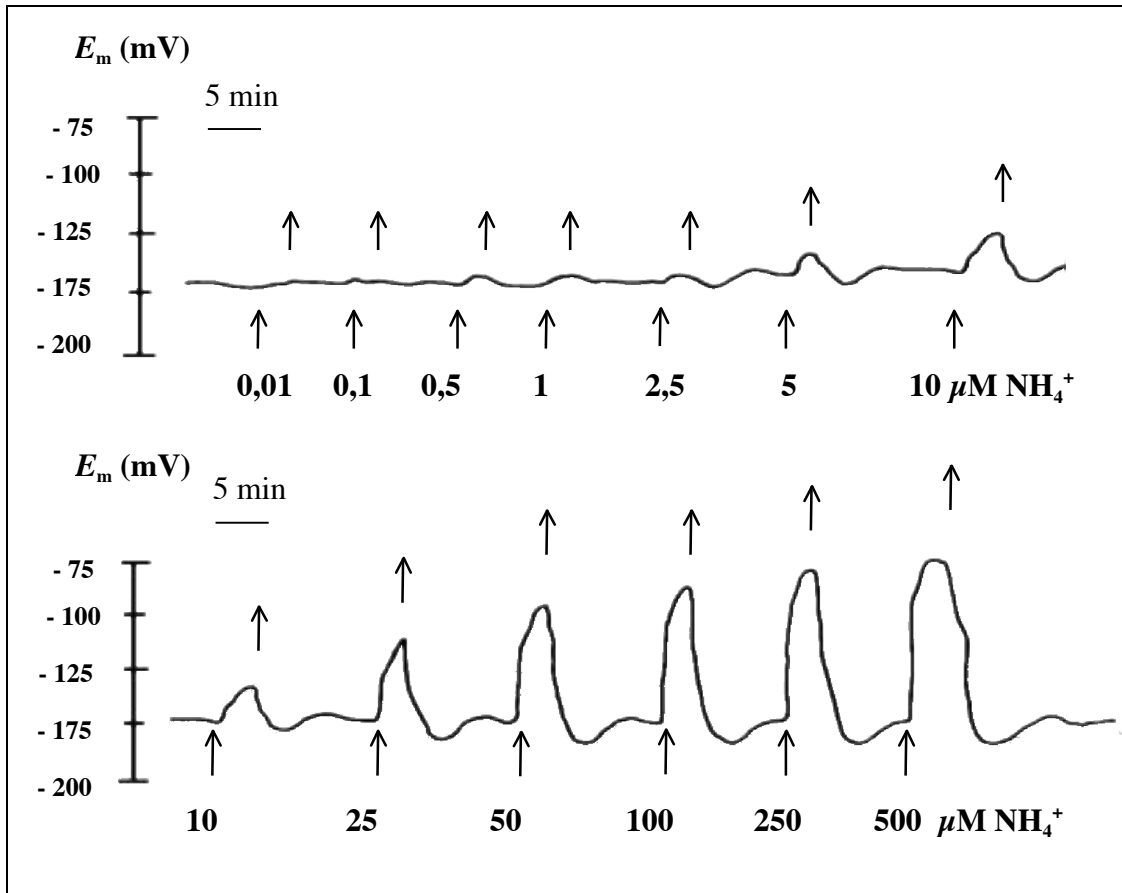


Figura 24. Efecto de la adición de NH_4^+ sobre el E_m de una célula del mesófilo foliar. La medida del E_m se realizó introduciendo un microelectrodo simple en una célula del mesófilo foliar de una planta preincubada durante 3 días en ausencia de N. Las flechas inferiores indican la adición de diferentes concentraciones de NH_4Cl al medio de ensayo (AMA, pH 8). Las flechas superiores señalan el momento de la retirada de NH_4^+ . El registro es un ejemplo representativo de 5 réplicas.

La representación de los valores de $\approx E_m$ frente a la concentración externa de NH_4^+ mostró que dichos valores se saturaron con respecto a la concentración añadida de NH_4^+ , en dos rangos diferentes. La primera saturación se produjo en torno a 10 μM NH_4^+ (Figura 25B) y la siguiente a partir de 50 μM NH_4^+ (Figura 25A). Los valores de K_m y despolarización máxima (D_{max}) para cada rango de concentración se calcularon a partir del ajuste de los datos al modelo de Michaelis-Menten. Así, se obtuvo un valor de $K_m = 2,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$ NH_4^+ y $D_{\text{max}} = 20,3 \pm 3,5 \text{ mV}$ en el rango 0,01 – 10 μM de NH_4^+ y unos valores de $K_m = 23,2 \pm 7,1 \mu\text{M}$ NH_4^+ y $D_{\text{max}} = 108 \pm 8 \text{ mV}$ en el rango 10 – 500 μM NH_4^+ . Los

respectivos coeficientes de determinación (R^2) para cada ajuste fueron 0,90 y 0,92 ($n = 5$).

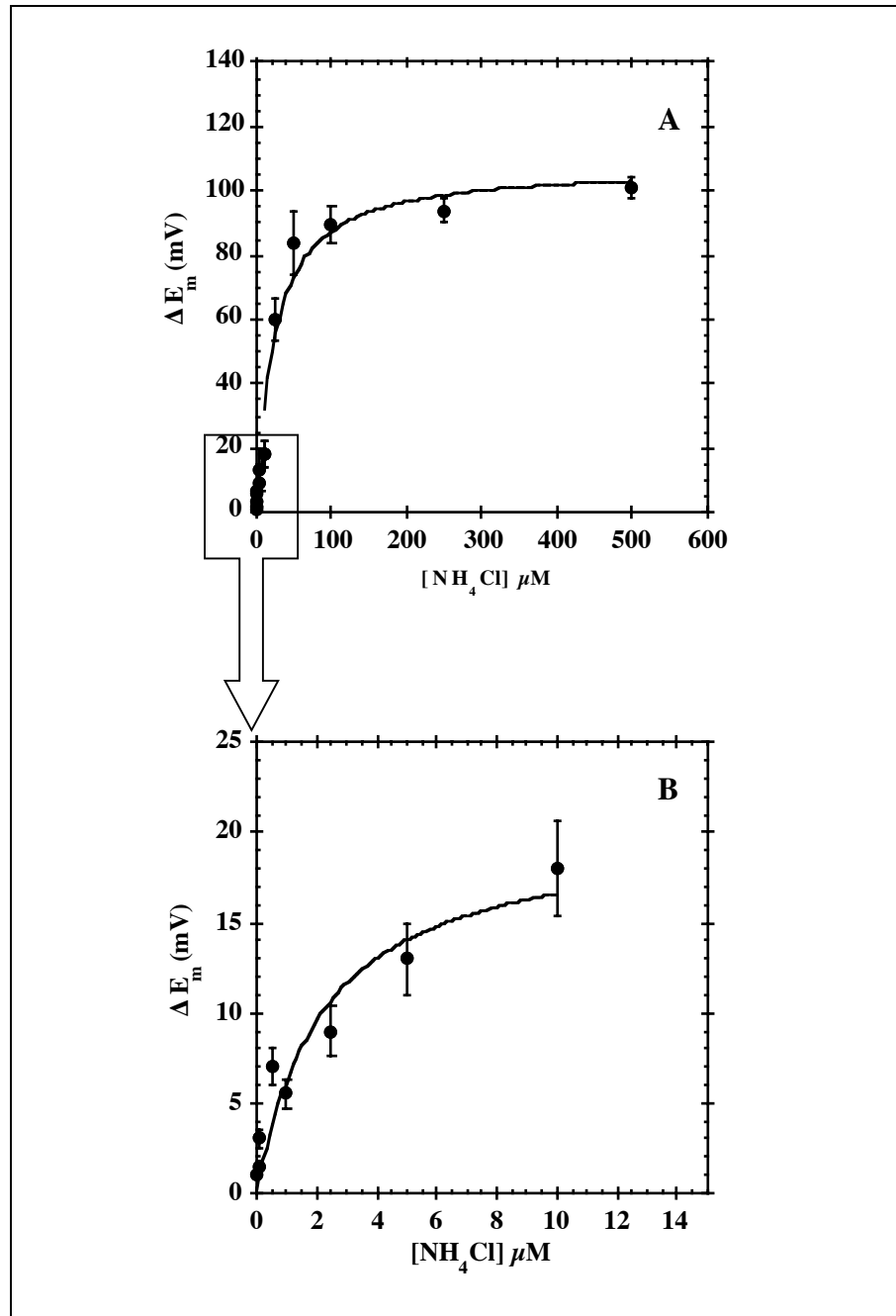


Figura 25. Representación de las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de NH_4^+ en células del mesófilo foliar. Las despolarizaciones ($\approx E_m$) observadas se saturaron en dos rangos de concentraciones externas de NH_4^+ (0,01-10 y 10-500 μM NH_4Cl) y se ajustaron por separado al modelo de Michaelis-Menten (A). En la gráfica B se amplía la escala correspondiente al rango inferior de concentraciones de NH_4^+ . Los datos corresponden a la media \pm SD ($n = 5$).

III.3.2.1a *Efecto de la acidificación del medio sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ en células del mesófilo foliar*

De igual modo que en el caso de NO_3^- y, en contra de lo esperado para un sistema de transporte dependiente de H^+ , la acidificación del medio de ensayo no tuvo un efecto significativo sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ en células del mesófilo foliar (Figura 26).

El registro de la Figura 26 muestra un ejemplo representativo en el que el E_m medido en una célula del mesófilo foliar en AMA tamponada a pH 8 fue próximo a -150 mV. Tras la adición de $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ , se produjo una despolarización máxima de 94 mV, recuperándose el valor inicial de E_m al retirar el NH_4^+ del medio. Posteriormente, el medio se reemplazó por AMA tamponada a pH 6,5, registrándose una hiperpolarización transitoria de la membrana, que alcanzó un valor mínimo de E_m de -185 mV, pero que finalmente se estabilizó en -162 mV. La adición de $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ en estas condiciones provocó una despolarización de 104 mV, recuperándose de nuevo el valor inicial de E_m tras retirar el NH_4^+ del medio (Figura 26).

Puesto que el valor de pK para la especiación de NH_4^+ es 9,25, la concentración de NH_4^+ presente en el medio de ensayo (AMA tamponada a pH 8 y a pH 6,5) era similar, sin que afectase la variación de pH del medio al grado de protonación de NH_4^+ .

El valor medio de las despolarizaciones inducidas por la adición de $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ fue $\approx E_m = 102 \pm 6$ mV y 105 ± 6 mV a pH 8 y 6,5, respectivamente. El análisis estadístico de los datos mostró que las diferencias observadas entre las despolarizaciones inducidas en medios con distinto pH, no fueron significativas (ANOVA $\gamma = 0,05$).

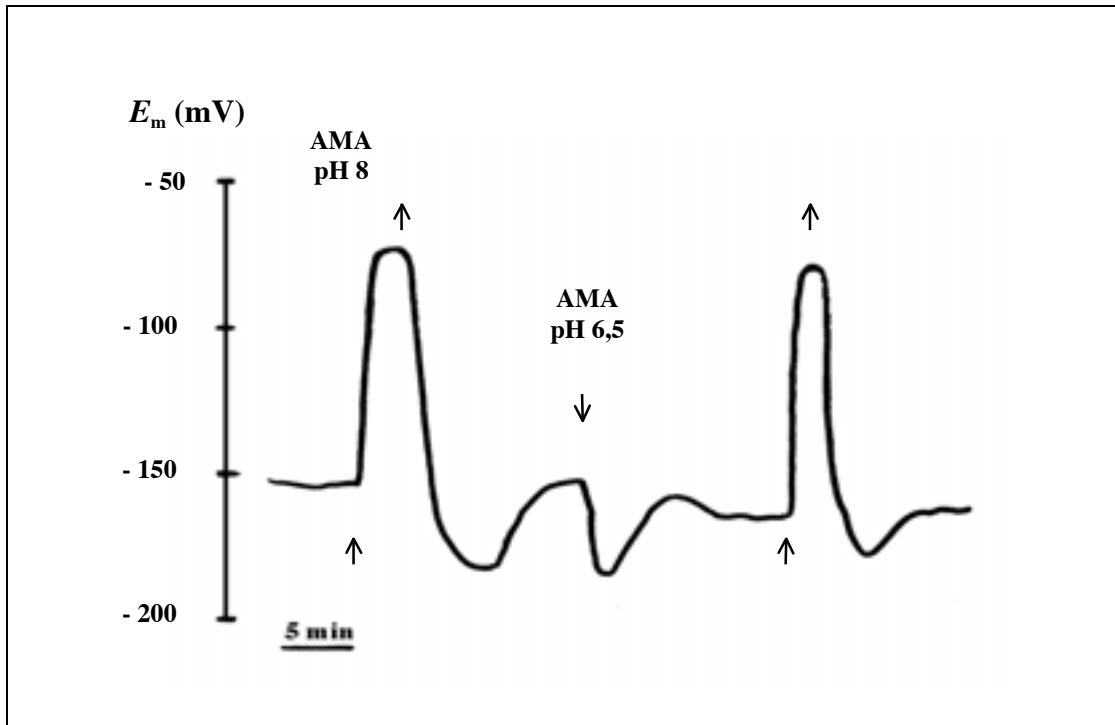


Figura 26. Efecto de la acidificación del medio sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ en células del mesófilo foliar. El registro muestra las variaciones del E_m en una célula del mesófilo foliar al añadir $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ en AMA tamponada a pH 8 y pH 6,5, según se indica. La adición de NH_4^+ se representa mediante las flechas inferiores. Las flechas superiores indican el momento de la retirada de NH_4^+ del medio. El registro es un ejemplo representativo ($n = 3$).

Además de $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ , se comprobó el efecto de la acidificación del medio sobre las despolarizaciones inducidas por concentraciones inferiores de NH_4^+ , y en ningún caso se detectaron diferencias significativas entre las despolarizaciones inducidas por la misma concentración de NH_4^+ a pH 8 y a pH 6,5 (datos no mostrados).

III.3.2.1b Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ en células del mesófilo foliar

Las despolarizaciones inducidas por la adición de NH_4^+ en células del mesófilo foliar fueron similares tanto en presencia, como en ausencia de Na^+ en el medio de ensayo.

La Figura 27 muestra un registro representativo de la medida en continuo del E_m de una célula del mesófilo foliar de una planta incubada durante 3 días en ausencia de N. El medio de ensayo inicial contenía 500 mM Na^+ (AMA, pH 8). Al añadir 100 μM NH_4^+ se produjo una despolarización de 84 mV. Posteriormente, tras retirar el NH_4^+ del medio, se observó una hiperpolarización transitoria de unos -15 mV, recuperándose finalmente el valor inicial de E_m (≈ -160 mV). Después, el medio de ensayo se reemplazó por sorbitol-AMA, lo que provocó una despolarización muy lenta de la membrana, de unos 40 mV, que desapareció paulatinamente, hasta alcanzar finalmente un valor estable de E_m en torno a -160 mV. Al añadir 100 μM NH_4^+ en estas condiciones, se registró una despolarización de 78 mV, recuperándose el valor de E_m tras retirar el NH_4^+ del medio (Figura 27).

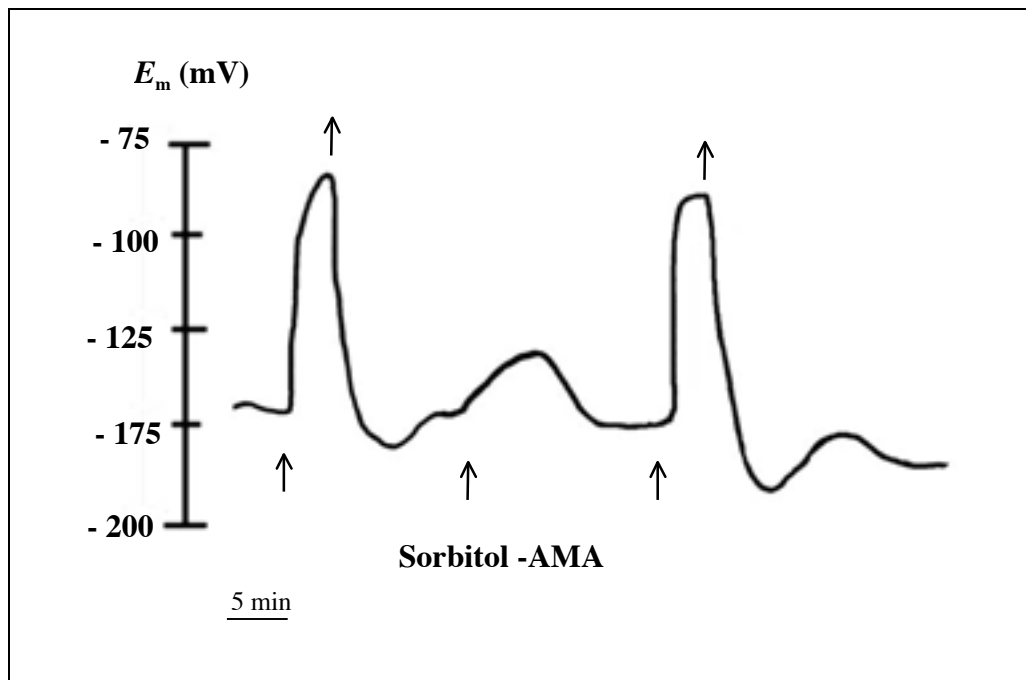


Figura 27. Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones producidas por NH_4^+ . El registro representa la variación del E_m de una célula del mesófilo foliar al añadir 100 μM NH_4^+ (flechas inferiores) en AMA que contenía 500 mM NaCl o en AMA en la que se sustituía el NaCl por sorbitol (sorbitol-AMA) según se señala. Las flechas superiores indican el momento de la retirada de NH_4^+ del medio de ensayo. El registro es un ejemplo representativo ($n = 3$).

El análisis estadístico de los valores determinó que las diferencias entre las despolarizaciones observadas en presencia de 500 mM NaCl ($\approx E_m = 89 \pm 6$ mV; $n = 3$) y las registradas en sorbitol-AMA ($\approx E_m = 82 \pm 9$ mV; $n = 3$) no fueron significativas (ANOVA $\gamma = 0,05$).

III.3.2.2 Efecto de la adición de NH_4^+ sobre el potencial de membrana de células de la epidermis radicular

De la misma forma que en caso de células foliares, la adición de concentraciones micromolares de NH_4^+ provocó la despolarización del plasmalema de células epidérmicas de la raíz de plantas sometidas a deficiencia de N (Figura 28). Al añadir sucesivamente concentraciones crecientes de NH_4^+ (0,01 – 500 $\mu M NH_4^+$) al medio de ensayo (AMA, tamponada a pH 8), la membrana se despolarizó rápidamente hasta un valor determinado ($\approx E_m$), en función de la concentración añadida. Las despolarizaciones oscilaron entre 1 y 30 mV en el rango de concentraciones ensayadas. En todos los casos, al retirar el NH_4^+ del medio, la membrana recuperaba el valor inicial de E_m (-150 mV), sin que se observasen las hiperpolarizaciones registradas en el caso de las células del mesófilo foliar (Figura 28).

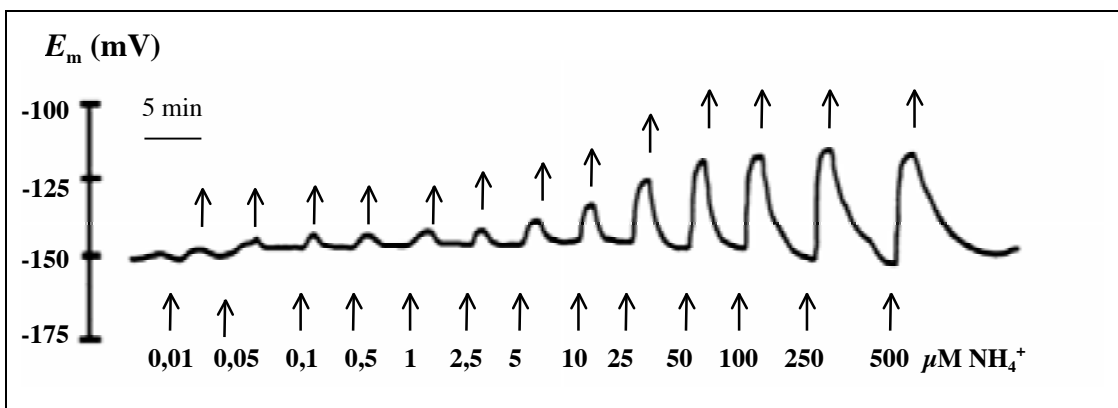


Figura 28. Efecto de la adición de NH_4^+ sobre el E_m de una célula epidérmica de la raíz. La medida se realizó introduciendo un microelectrodo simple en una célula epidérmica de la raíz de una planta preincubada 3 días en ausencia de N. Las flechas inferiores indican el momento de la adición de las concentraciones de NH_4^+ especificadas al medio de ensayo (AMA, pH 8); las flechas superiores representan la retirada de NH_4^+ . El registro muestra un experimento representativo ($n = 5$).

La magnitud de las despolarizaciones ($\approx E_m$) mostró un único rango de saturación con respecto a la concentración de NH_4^+ , a diferencia de lo descrito en las células del mesófilo foliar, donde se observaron dos rangos de saturación diferentes. En el caso de las células epidérmicas de la raíz, la saturación se produjo a partir de $50 \mu\text{M NH}_4^+$ (Figura 29). El ajuste de los valores al modelo de Michaelis-Menten permitió calcular un valor de K_m de $11,2 \pm 1,9 \mu\text{M NH}_4^+$, y de despolarización máxima de $D_{\text{max}} = 30,6 \pm 1,2 \text{ mV}$, para células epidérmicas de la raíz, siendo el coeficiente de determinación del ajuste $R^2 = 0,98$ ($n = 5$).

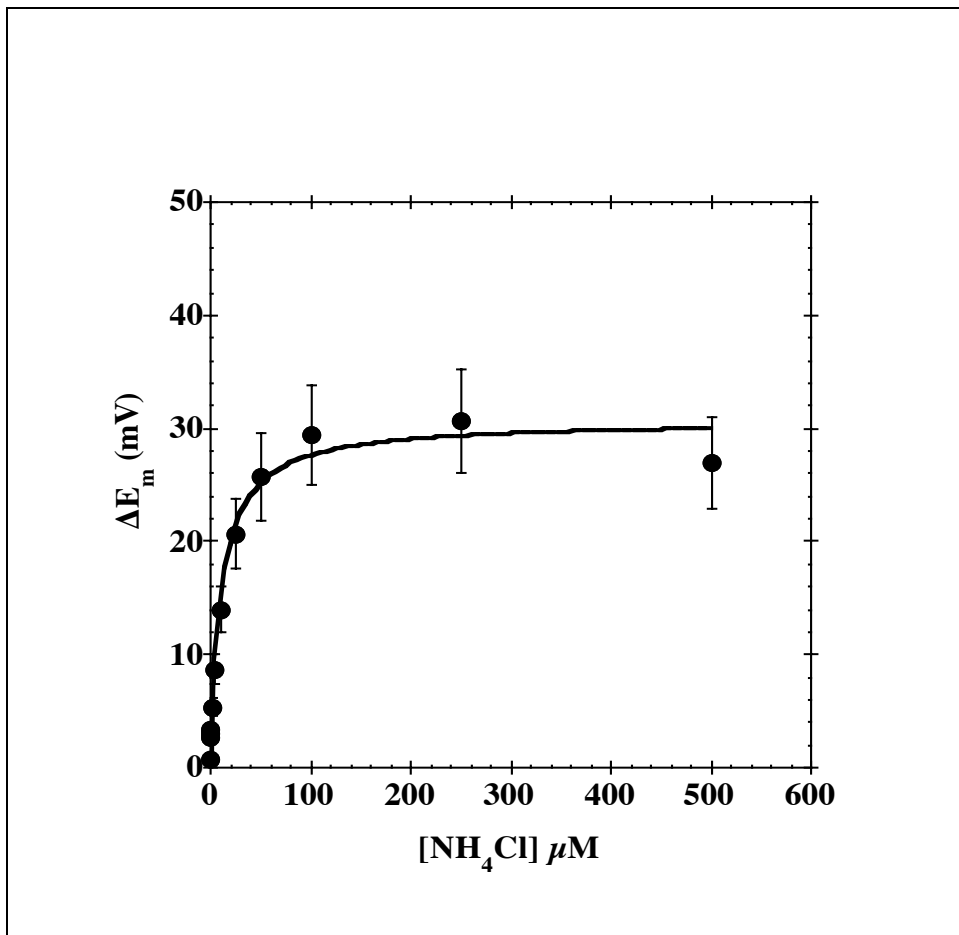


Figura 29. Representación de las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de NH_4^+ en células epidérmicas de la raíz. Los valores, $\approx E_m$, se saturaron con respecto a la concentración de NH_4^+ y se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten, $R^2 = 0,98$. Los datos corresponden a la media \pm SD ($n = 5$).

III.3.2.2a *Efecto de la acidificación del medio sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ en células de la epidermis radicular*

Al igual que se ha observado en el apartado III.3.2.1a, la acidificación del medio de ensayo no tuvo un efecto significativo sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ .

En la Figura 30 se muestra un ejemplo representativo del efecto de la adición de $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ en AMA tamponada a diferentes valores de pH. El medio inicial consistió en AMA tamponada a pH 8, en el que la adición de $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ provocó una despolarización de 25 mV, que desapareció tras retirar el NH_4^+ del medio, recuperándose finalmente el valor inicial de E_m (≈ -165 mV). Posteriormente, el medio de ensayo se sustituyó por AMA tamponada a pH 6,5, registrándose una hiperpolarización inicial y transitoria de la membrana, y transcurridos unos minutos el E_m se estabilizó en un valor de -167 mV. Al añadir $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ en estas condiciones, se registró una despolarización de 20 mV que desapareció al retirar el NH_4^+ del medio (Figura 30).

La diferencias entre la despolarización media observada en células epidérmicas de la raíz tras la adición de $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ en AMA tamponada a pH 8 ($\approx E_m = 28 \pm 5$ mV; $n = 3$), y la registrada a pH 6,5 ($\approx E_m = 23 \pm 3$; $n = 3$) no fueron significativas (ANOVA, $\gamma = 0,05$). Por otra parte, además de comprobar el efecto de la acidificación del medio de ensayo sobre las despolarizaciones inducidas por la adición de $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ , se analizó dicho efecto en las despolarizaciones inducidas por concentraciones inferiores, sin que se detectasen diferencias significativas entre las despolarizaciones inducidas por la misma concentración de NH_4^+ en medios con diferente pH (resultados no mostrados)

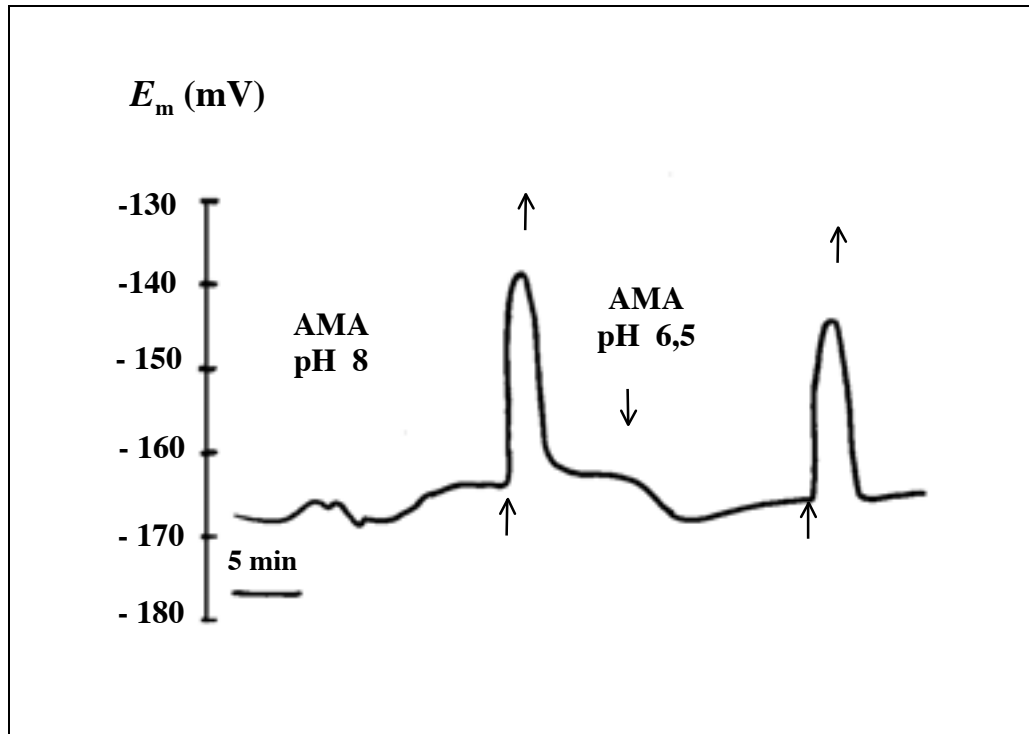


Figura 30. Efecto de la acidificación del medio sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ . El registro muestra las variaciones del E_m en una célula epidérmica de la raíz de una planta preincubada 3 días sin N, al añadir $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ en AMA tamponada a pH 8 y a pH 6,5, según se indica. La adición de NH_4^+ se representa mediante las flechas inferiores, las flechas superiores indican el momento de la retirada del mismo. El registro es un ejemplo de 3 experimentos independientes.

III.3.2.2b Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ en células de la epidermis radicular

Al igual que ocurrió en las células del mesófilo foliar, las despolarizaciones inducidas por la adición de NH_4^+ en células de la epidermis radicular, se observaron tanto en presencia como en ausencia de Na^+ en el medio de ensayo, cuyo pH siempre fue de 8.

En la Figura 31 se muestra un experimento representativo en el que la adición de $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ en AMA (pH 8), que contenía 500 mM NaCl , provocó una despolarización de 30 mV en el plasmalema de una célula de la epidermis radicular. Al retirar el NH_4^+ del medio, el valor de E_m se estabilizó en torno a -166

mV. Posteriormente, al reemplazar el medio de ensayo por sorbitol-AMA (en la cual se sustituyó el NaCl por una concentración isosmótica de sorbitol, 800 mM), la membrana se hiperpolarizó inicialmente, y después alcanzó lentamente un valor estable de E_m en torno a -154 mV. La adición de $100 \mu\text{M NH}_4^+$ en estas condiciones, provocó una despolarización de 22 mV; posteriormente, al retirar el NH_4^+ del medio, el valor de E_m se estabilizó en torno a -160 mV. Finalmente, al sustituir el medio de ensayo por sorbitol-AMA con 20 mM NaCl, no se observaron cambios en el E_m , mientras que la adición de $100 \mu\text{M NH}_4^+$ provocó una despolarización de 23 mV (Figura 31).

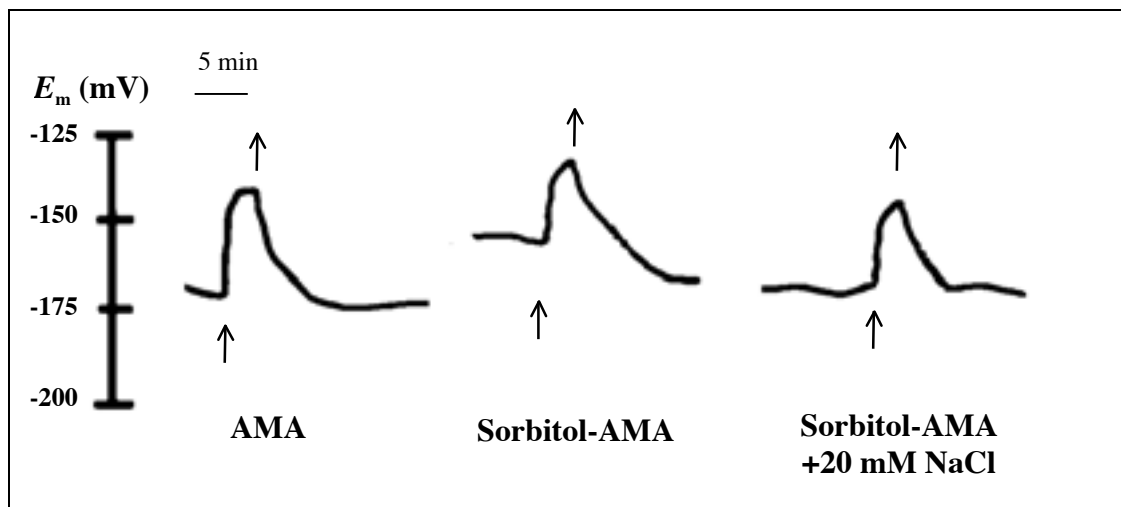


Figura 31. Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ en células de la epidermis radicular. El registro muestra la variación del E_m en una célula epidérmica de la raíz al añadir $100\mu\text{M NH}_4\text{Cl}$ (flechas inferiores) en AMA tamponada a pH 8 pero con diferente contenido de Na^+ (500, 0 y 20 mM NaCl). Las flechas superiores señalan el momento de la retirada del NH_4Cl añadido a cada medio de ensayo. El registro corresponde a un experimento representativo ($n = 3$).

La despolarización media inducida por la adición de $100 \mu\text{M NH}_4^+$ en AMA que contenía 500 mM NaCl fue $\approx E_m = 29,3 \pm 3,2$ mV; $n = 3$. En ausencia de Na^+ (sorbitol-AMA), el valor medio de despolarización observada tras la adición de $100 \mu\text{M NH}_4^+$ fue $\approx E_m = 24 \pm 5$ mV, $n = 3$. Por último, en presencia de sorbitol-AMA a la que se le añadía 20 mM NaCl, las despolarización media fue $\approx E_m = 26 \pm 4$ mV; $n = 3$. Las diferencias observadas entre las despolarizaciones inducidas en presencia de medios con diferente contenido de Na^+ no fueron significativas (ANOVA, $\gamma = 0,05$).

III.3.3 Transporte de P_i

El estudio electrofisiológico del transporte de P_i se realizó en células del mesófilo foliar y de la epidermis radicular de plantas incubadas durante 8 días en ausencia de P. Las medidas del E_m se realizaron con microelectrodos simples. Puesto que la especiación de P_i varía en el rango de pH utilizado en los ensayos de determinación del ión motriz, no se realizó el análisis del efecto de la adición de P_i sobre el E_m en medios tamponados con distinto pH. En todos los casos el medio de ensayo se tamponó a pH 8, siendo las formas de P_i mayoritarias a este pH, $H_2PO_4^-$ (14%) y HPO_4^{2-} (86%).

III.3.3.1 Efecto de la adición de P_i sobre el potencial de membrana de células del mesófilo foliar

La adición de concentraciones micromolares de P_i no provocó un cambio significativo en el E_m de células del mesófilo foliar de plantas incubadas en ausencia de P. Se añadieron diferentes concentraciones de P_i , en el rango 0,1 – 100 μM NaH_2PO_4 , al medio de ensayo (AMA tamponada a pH 8) sin que se observasen despolarizaciones de la membrana de células del mesófilo foliar. Por el contrario, en algunas ocasiones se registraron pequeñas hiperpolarizaciones, del orden de -5 mV. Dichas hiperpolarizaciones no presentaron ningún patrón de comportamiento que permitiese su caracterización de modo similar a como se ha descrito en los apartados referentes a NO_3^- y NH_4^+ (III.3.1 y III.3.2)

III.3.3.2 Efecto de la adición de P_i sobre el potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz

A diferencia de lo descrito en el apartado anterior, la adición de concentraciones micromolares de P_i provocó la despolarización del plasmalema de células epidérmicas de la raíz de plantas incubadas en ausencia de P (Figura 32). En la mayoría de los ensayos se utilizaron plántulas obtenidas por germinación *in vitro* de semillas, ya que en las raíces de plantas adultas no siempre se detectaron

las despolarizaciones mencionadas. Además, durante los 8 días de preincubación en ausencia de P, las raíces de plantas adultas se necrosaban a mayor velocidad que las de las plántulas.

En la Figura 32 se muestra un experimento representativo del efecto de la adición de P_i sobre el E_m de una célula de la epidermis radicular. La adición sucesiva de concentraciones crecientes de P_i al medio de ensayo, en un rango 0,1 – 100 μM NaH_2PO_4 , generó un valor de despolarización de la membrana ($\approx E_m$) determinado en función de cada concentración añadida. Las despolarizaciones observadas variaron entre 1 y 8 mV. Tras el lavado de cada concentración de P_i , el valor de E_m se estabilizó, en todos los casos, en valores próximos al valor registrado inicialmente, próximo a -156 mV (Figura 32).

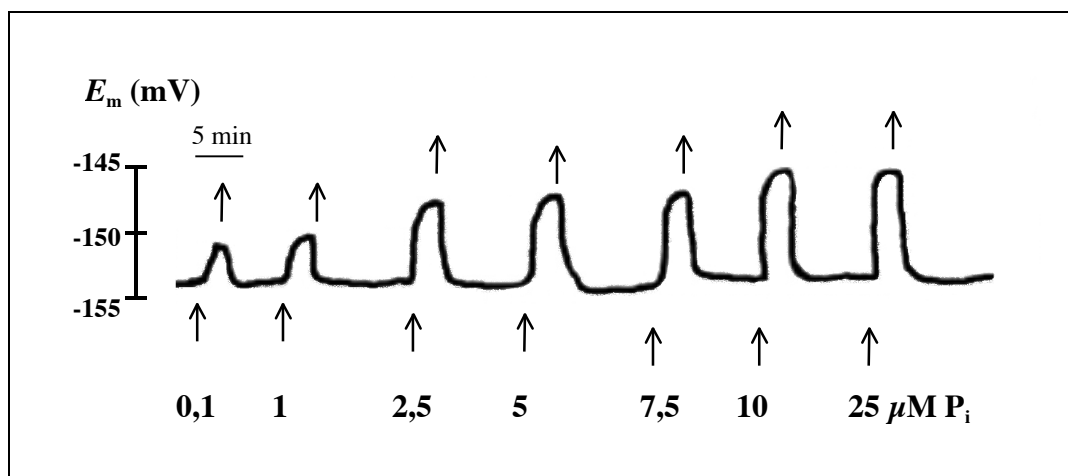


Figura 32. Efecto de la adición de P_i sobre el E_m de una célula epidérmica de la raíz. El registro muestra la variación del E_m de una célula epidérmica de la raíz de una plántula preincubada 8 días en deficiencia de P, en respuesta a la adición de diferentes concentraciones de NaH_2PO_4 (flechas inferiores). La medida se realizó con un microelectrodo simple. Las flechas superiores indican el momento de la retirada de P_i del medio de ensayo (AMA tamponada a pH 8). El registro es un experimento representativo ($n = 5$).

El valor de las despolarizaciones se saturó a partir de $10 \mu\text{M P}_i$ (Figura 33). El ajuste de los valores al modelo de Michaelis-Menten permitió calcular un valor de K_m ($1,5 \pm 0,6 \mu\text{M P}_i$) y una D_{max} de $7,8 \pm 0,8 \text{ mV}$. El coeficiente de determinación del ajuste fue $R^2 = 0,89$ ($n = 5$).

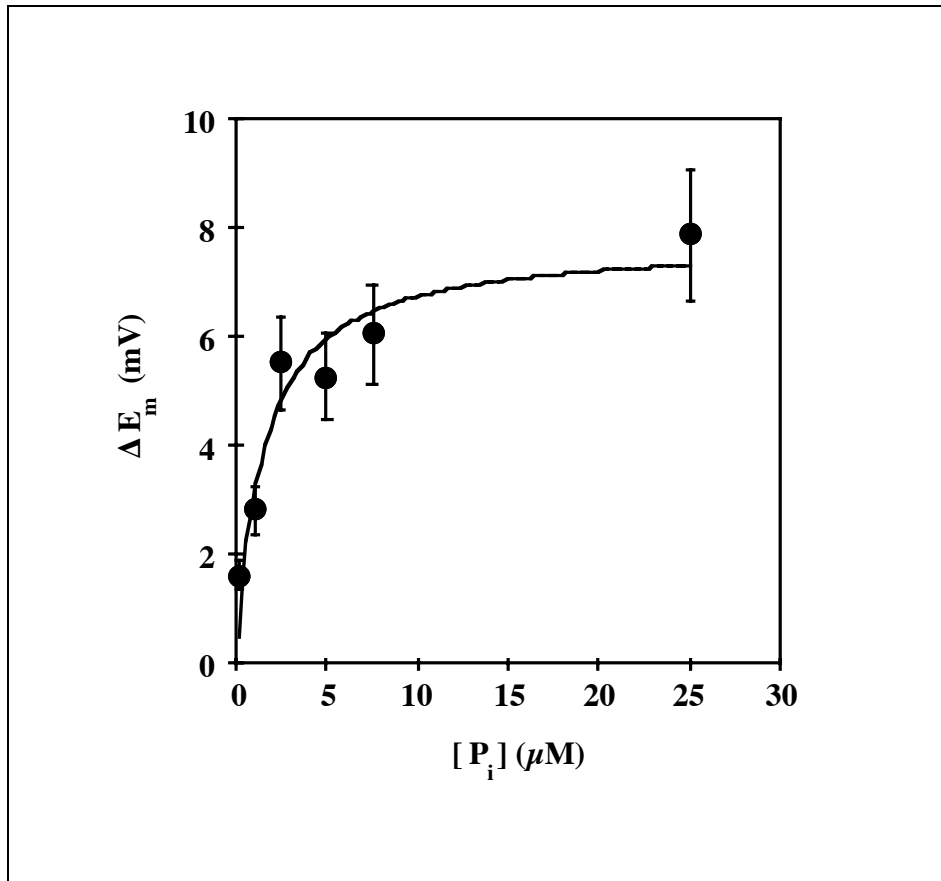


Figura 33. Representación de las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de P_i en células epidérmicas de la raíz. Los valores de despolarización ($\approx E_m$) se saturaron con respecto a la concentración de P_i añadida y se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten. Los datos corresponden a la media \pm SD ($n = 5$).

III.3.3.2a Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones inducidas por P_i en células epidérmicas de la raíz

Las despolarizaciones producidas por la adición de concentraciones de P_i en células epidérmicas de la raíz de plantas preincubadas en ausencia de P, sólo se observaron cuando el medio de ensayo contenía Na^+ .

En la Figura 34 se muestra el registro en continuo del E_m de una célula epidérmica de la raíz de una plántula incubada durante 8 días en ausencia de P. El medio de ensayo inicial fue AMA tamponada a pH 8 que contenía 500 mM NaCl. La adición de 10 μM P_i provocó una despolarización de 8 mV sobre un valor inicial de E_m de -165 mV. Al sustituir el medio de ensayo por un medio similar (sorbitol-AMA), en el que se solamente se reemplazó el NaCl por una concentración isosmótica de sorbitol (800 mM), se produjo una ligera hiperpolarización inicial, que desapareció paulatinamente hasta que el valor de E_m se estabilizó en torno a -157 mV. Al añadir 10 μM P_i en estas condiciones, no se observaron variaciones significativas del E_m . Finalmente, tras retirar el P_i añadido, el medio de ensayo se sustituyó nuevamente por sorbitol-AMA que contenía 20 mM NaCl, siendo el valor de E_m en estas condiciones próximo a -155 mV. Al añadir 10 μM P_i al medio, se registró de nuevo una despolarización de 6 mV. Tras el lavado, el E_m recuperó su valor inicial (Figura 34).

La despolarización media inducida por la adición de 10 μM P_i en AMA que contenía 500 mM Na^+ fue 7 ± 2 mV ($n = 3$), mientras que en ausencia de Na^+ (sorbitol-AMA), la adición de P_i no provocó cambios significativos del E_m . Al añadir 20 mM NaCl al medio libre de Na^+ , la despolarización media registrada tras la adición de 10 μM P_i fue 5 ± 2 mV ($n = 3$). El análisis estadístico de los datos mostró que las diferencias observadas en las despolarizaciones inducidas en presencia de 500 mM NaCl ó 20 mM NaCl no fueron significativas (ANOVA, $\gamma = 0,05$).

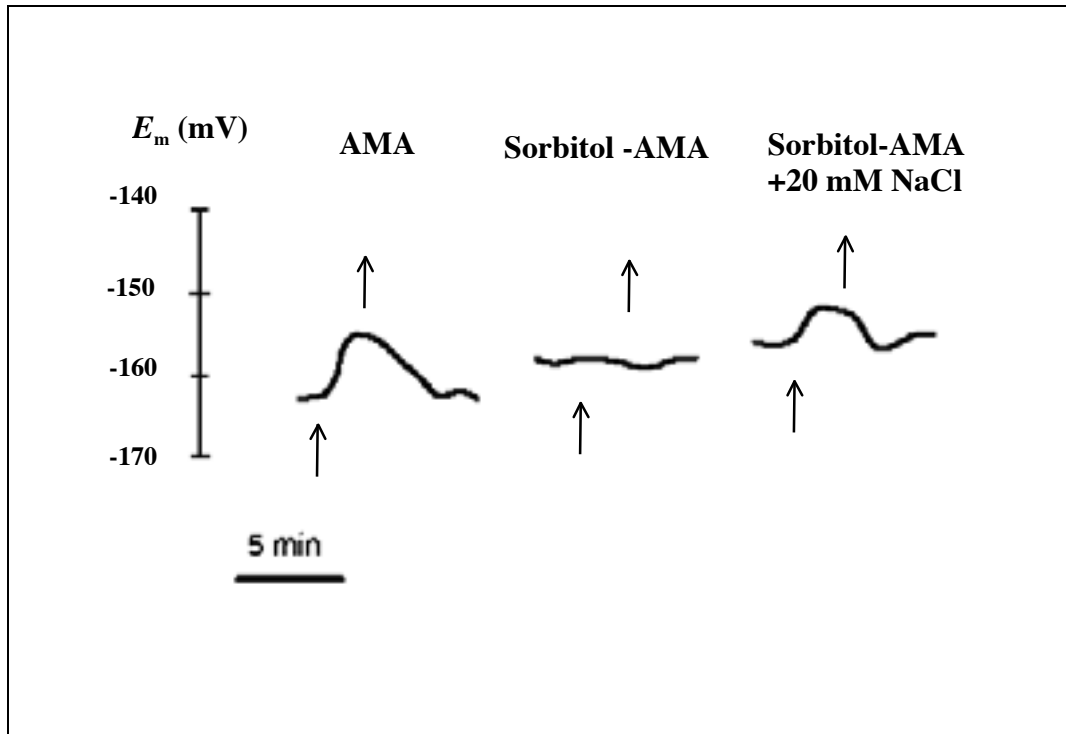


Figura 34. Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones inducidas por P_i en células de la epidermis radicular. El registro muestra la variación del E_m de una célula epidérmica de la raíz al añadir $10 \mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$ en AMA tamponada a pH 8 y con diferente contenido de Na^+ , (500, 0 y 20 mM NaCl). Las flechas inferiores indican el momento de la adición y las superiores la retirada de P_i del medio de ensayo. El registro es un experimento representativo ($n = 3$).

III.4 Efecto del Na^+ sobre las tasas de incorporación de NO_3^- y P_i

Puesto que ni la adición de NO_3^- ni de P_i dieron lugar a despolarizaciones de la membrana en ausencia de Na^+ (apartados III.3.1.1b y III.3.3.2b), se analizó si las tasas de incorporación de estos nutrientes dependían de la presencia de Na^+ en el medio de ensayo. Así, se determinó el efecto del Na^+ sobre las tasas netas de incorporación de NO_3^- en raíces y las tasas netas de incorporación de P_i en raíces y hojas, puesto que las tasas netas de incorporación de NO_3^- en hojas ya habían sido determinadas por un trabajo previo (García-Sánchez *et al.*, 2000).

III.4.1 Efecto del Na^+ sobre la incorporación de NO_3^- por raíces

Las raíces de plantas sometidas a deficiencia de N durante 3 días incorporaron NO_3^- del medio de ensayo con diferente velocidad dependiendo del contenido de Na^+ presente en el medio, siendo mayor en presencia que en ausencia de éste (Figura 35).

Las raíces se incubaron en presencia de $100 \mu\text{M KNO}_3$ en tres medios diferentes: AMA, sorbitol-AMA y sorbitol-AMA a la que se le añadió 20 mM NaCl . El pH de todos los medios de ensayo fue 8. El contenido de NO_3^- disminuyó en todos los tratamientos a lo largo del tiempo (Figura 35). En presencia de 500 mM Na^+ (AMA) el contenido inicial de NO_3^- del medio disminuyó linealmente a lo largo del tiempo, agotándose a las 8 horas de incubación. Por otra parte, en ausencia de Na^+ (sorbitol-AMA) el contenido inicial de NO_3^- disminuyó linealmente, también, durante las primeras 8 horas. Sin embargo, a partir de ese momento, el contenido de NO_3^- del medio no varió significativamente hasta el final del experimento. Finalmente, en presencia de 20 mM Na^+ (sorbitol-AMA que contenía 20 mM NaCl) la concentración externa de NO_3^- también disminuyó linealmente durante las primeras 8 horas de incubación, posteriormente el contenido de NO_3^- en el medio continuó disminuyendo, de manera más rápida, hasta agotarse a las 24 horas de incubación (Figura 35).

Las tasas netas de incorporación de NO_3^- se calcularon a partir de la pendiente de la recta obtenida por el ajuste lineal de los valores de concentración de NO_3^- observados durante las primeras 8 horas (Tabla 2). En presencia de 500 mM NaCl , el valor calculado fue el mayor de los observados en los tres tratamientos. Las diferencias entre las tasas de incorporación de NO_3^- por las raíces en sorbitol-AMA con 20 mM NaCl o sin Na^+ fueron significativas (ANOVA, $\gamma = 0,05$). En ausencia de Na^+ la tasa de incorporación de NO_3^- se inhibió un 87% con respecto al control (AMA con 500 mM NaCl), mientras que en presencia de 20 mM NaCl en el medio de ensayo el porcentaje de inhibición fue de un 73% , con respecto a la tasa de incorporación registrada en presencia de

500 mM NaCl. Sin embargo, como se observa en la Figura 35, la incorporación de NO_3^- fue significativamente mayor entre las 8 y 24 horas de incubación en presencia de 20 mM NaCl que en ausencia de Na^+ .

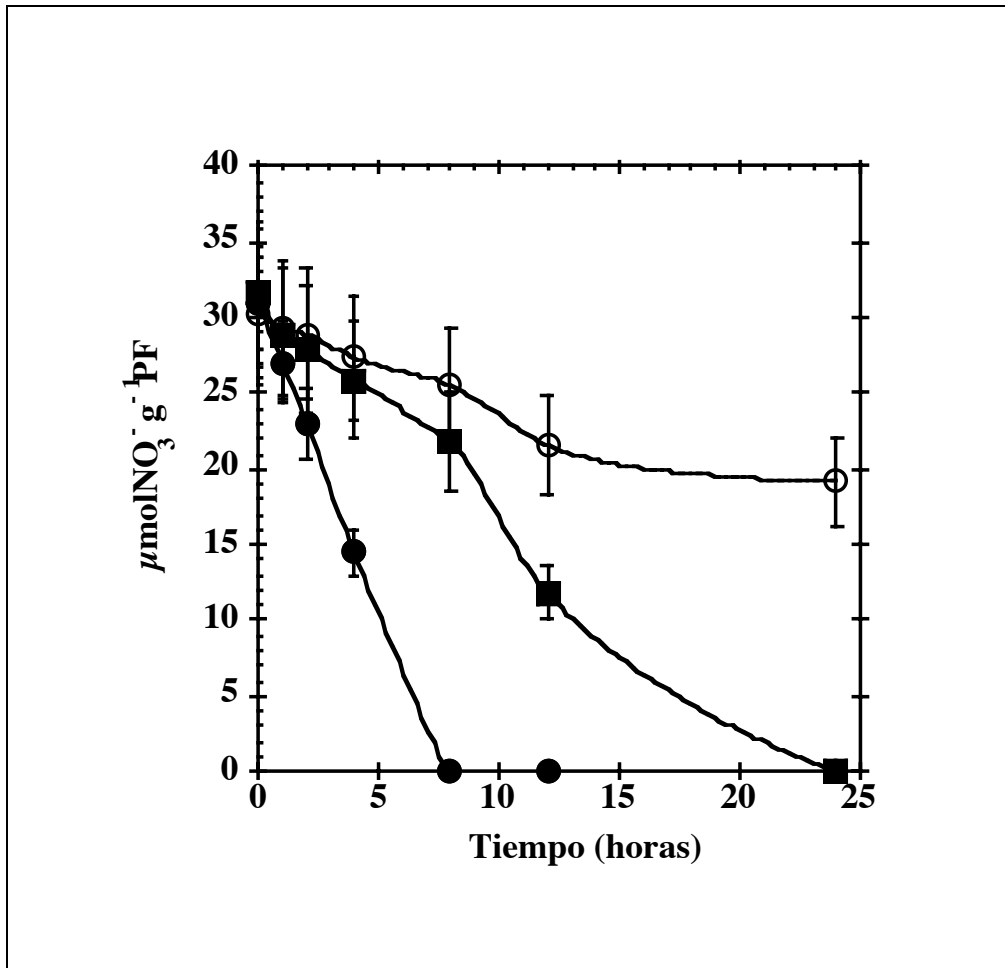


Figura 35. Efecto del Na^+ sobre la incorporación de NO_3^- con respecto al tiempo en raíz. Se incubaron raíces (0,3 – 0,6 g PF) de plantas preincubadas 3 días sin N, en medios tamponados a pH 8 y con diferente contenido de Na^+ : AMA con 500 mM NaCl (■), sorbitol-AMA sin NaCl (○) y sorbitol-AMA que contenía 20 mM NaCl (■). La gráfica representa el contenido de NO_3^- en el medio de ensayo, referido al peso de tejido utilizado ($\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ PF}$) a lo largo del tiempo, tras añadir 100 $\mu\text{M KNO}_3$ al inicio del experimento. Los datos corresponden a la media \pm SD (n = 3).

En el caso de las hojas, las tasas netas de incorporación de NO_3^- , así como su dependencia de la presencia de Na^+ en el medio, se habían determinado previamente por un experimento parecido (García-Sánchez *et al.*, 2000). El efecto del Na^+ descrito para la incorporación de NO_3^- por hojas fue similar al observado

en raíces. Así, la tasa de incorporación de NO_3^- más alta se observó en presencia de 500 mM NaCl en el medio de ensayo. En ausencia de Na^+ , la incorporación de NO_3^- por las hojas se inhibió en un 80 %. Por último, la tasa de incorporación de NO_3^- en presencia de 10 mM NaCl fue un 55 % del valor registrado en presencia de 500 mM NaCl (Tabla 2).

Tabla 2. Tasas netas de incorporación de NO_3^- de raíces y hojas de *Z. marina* en medios con diferente concentración de Na^+ .

Las tasas netas de incorporación en raíces se determinaron en AMA con diferente contenido de Na^+ (AMA con 500 mM Na^+ , sorbitol-AMA y sorbitol-AMA con 20 mM NaCl) incubando raíces y hojas por separado y añadiendo 100 μM KNO_3 al inicio del experimento. El valor de las tasas netas de incorporación se determinó a partir de la pendiente del ajuste lineal del contenido de NO_3^- del medio durante las 8 primeras horas de incubación. Las tasas de hojas fueron obtenidas en un experimento similar (García-Sánchez *et al.*, 2000). Los datos corresponden a la media \pm SD (n = 3).

<i>Tratamiento</i>	Tasas netas de incorporación de NO_3^- ($\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1}\text{PF h}^{-1}$)	
	<i>Raíces</i>	<i>Hojas</i> (García-Sánchez <i>et al.</i> , 2000)
AMA (500 mM Na^+)	3,9 \pm 1,2	0,62 \pm 0,09
Sorbitol- AMA	0,49 \pm 0,1	0,12 \pm 0,001
Sorbitol- AMA + 20 mM* Na^+	1,08 \pm 0,4	0,27 \pm 0,05

* 10 mM Na^+ en García-Sánchez *et al.*, 2000

III.4.2 Efecto del Na^+ sobre la incorporación de P_i por raíces y hojas

Del mismo modo que se ha descrito para NO_3^- , las tasas netas de incorporación de P_i de las raíces y hojas dependieron del contenido de Na^+ presente en el medio de ensayo (Figura 36), siendo mayores en presencia que en ausencia de Na^+ (Tabla 3).

Las tasas netas de incorporación de P_i se determinaron en plantas preincubadas durante 8 días en ausencia de P, tiempo necesario para observar el transporte de P_i mediante técnicas electrofisiológicas (apartado III.3.3.2). Se incubaron raíces y hojas por separado en presencia de $10 \mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$ en tres medios diferentes: AMA que contenía 500 mM NaCl , colina-AMA en la que se sustituyó el NaCl por una concentración isosmótica de cloruro de colina (500 mM) y, finalmente, colina-AMA a la que se le añadió 20 mM NaCl . Todos los medios se tamponaron a $\text{pH } 8$, siendo las especies mayoritarias de P_i presentes a este pH , H_2PO_4^- ($14 \% P_i$) y HPO_4^{2-} ($86 \% P_i$). En este caso se utilizó cloruro de colina como agente osmótico para sustituir al NaCl en los medios de ensayo debido a que la presencia de sorbitol interfería en el método de determinación de P_i utilizado (Fernández et al., 1985).

Según se muestra en la Figura 36A, la concentración de P_i añadida no se agotó en ninguno de los medios en los que se incubaron las raíces durante 24 horas. En presencia de 500 mM NaCl el contenido de P_i del medio disminuyó linealmente durante las 3 primeras horas de incubación. Posteriormente, no se observaron variaciones significativas del contenido de P_i del medio hasta las 24 horas de incubación, cuando el contenido final de P_i había disminuido un 40% con respecto al valor inicial. En ausencia de Na^+ (colina-AMA), el contenido de P_i disminuyó solamente un 2% con respecto al valor inicial en las primeras 3 horas de incubación. Posteriormente, no se registraron cambios significativos del contenido de P_i del medio. Finalmente, en presencia de 20 mM NaCl (colina-AMA a la que se le añade 20 mM NaCl) el contenido de P_i disminuyó linealmente durante las primeras 3 horas de incubación. Hasta las 10 horas de incubación el contenido de P_i del medio se mantuvo en torno a un 92% del valor inicial, finalmente el contenido de P_i disminuyó hasta el 80% al término de la incubación (Figura 36A).

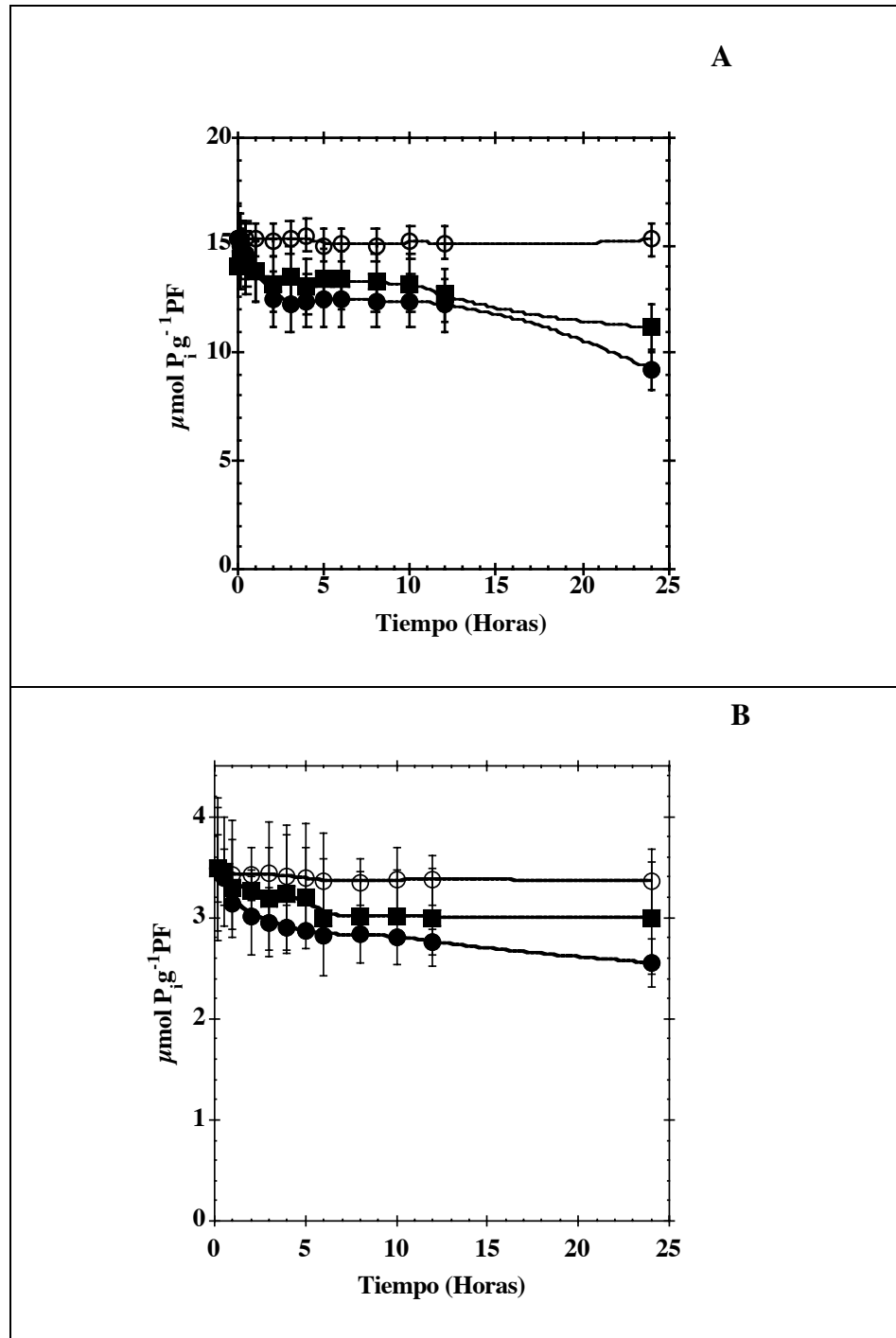


Figura 36. Efecto del Na^+ sobre la incorporación de P_i con respecto al tiempo. Se incubaron raíces y hojas de plantas preincubadas 8 días en ausencia de P en medios tamponados a pH 8 y con diferente contenido de Na^+ : AMA con 500 mM NaCl (■), colina-AMA (○) y colina-AMA que contiene 20 mM NaCl (●). Las gráficas representan el contenido de P_i referido al PF de tejido utilizado ($\mu\text{mol P}_i \text{ g}^{-1} \text{ PF}$) en cada medio de ensayo a lo largo del tiempo, tras añadir $10 \mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$ al inicio del experimento, en los medios que contienen las hojas (A) y las raíces (B). Los datos corresponden a la media \pm SD ($n = 3$).

Aunque las técnicas electrofisiológicas no permitieron caracterizar el transporte de P_i en células del mesófilo foliar (apartado III.3.3.1), las hojas de plantas preincubadas durante 8 días sin P, incorporaron P_i del medio y, además, a distinta velocidad según el contenido de Na^+ presente. No obstante, al igual que en los experimentos realizados con raíces, la concentración de P_i añadida inicialmente al medio no se agotó en ninguno de los tratamientos ensayados durante las 24 horas de incubación (Figura 36B).

En presencia de 500 mM NaCl, el contenido de P_i del medio donde se incubaban las hojas disminuyó linealmente durante las primeras 3 horas de incubación, del mismo modo que se había observado en el caso de raíces. Seguidamente, se registró un cambio de pendiente en la desaparición de P_i , siendo el contenido final, tras 24 horas de incubación, próximo al 74 % del valor inicial. En el caso de las hojas incubadas en ausencia de Na^+ (colina-AMA), el contenido de P_i apenas disminuyó durante las 24 horas de duración del experimento, siendo el contenido final de P_i un 96 % del valor inicial. Finalmente, el contenido de P_i del medio que contenía 20 mM NaCl (colina-AMA a la que se le añadió 20 mM NaCl) disminuyó linealmente durante las primeras 3 horas de incubación, posteriormente el contenido de P_i no varió significativamente, manteniéndose en torno al 86 % del valor inicial hasta el final de la incubación (Figura 36B).

Las tasas netas de incorporación de P_i , tanto en raíces como en hojas, se calcularon mediante el ajuste lineal del contenido de P_i en cada tratamiento durante las primeras 3 horas de incubación. La pendiente de cada recta se muestra en la Tabla 3. El análisis estadístico de los datos mostró que las tasas netas de incorporación de P_i fueron mayores en raíces que en hojas (ANOVA, $\gamma = 0,05$). Así mismo, en ambos casos la incorporación de P_i se inhibió en torno a un 90 % en ausencia de Na^+ . Mientras que la adición de 20 mM NaCl al medio libre de Na^+ supuso la recuperación de casi un 50 % de las tasas observadas en AMA.

Tabla 3. Tasas netas de incorporación de P_i de raíces y hojas de *Z. marina* en medios con diferente concentración de Na^+ .

Las tasas netas de incorporación se determinaron en AMA con diferente contenido de Na^+ . Las plantas se preincubaron durante 8 días en ausencia de P, después se transfirieron hojas y raíces por separado a AMA con 500 mM Na^+ , colina-AMA en la que se sustituyó el contenido de Na^+ por 500 mM cloruro de colina y colina-AMA a la que se le añadió 20 mM Na^+ . Las tasas netas de incorporación se determinaron a partir de la pendiente del ajuste lineal del contenido de P_i del medio durante las 3 primeras horas de incubación, tras añadir 10 μM KH_2PO_4 . Los datos corresponden a la media \pm SD (n = 3).

<i>Tratamiento</i>	Tasa netas de incorporación de P_i ($\mu mol P_i g^{-1}PF h^{-1}$)	
	<i>Raíces</i>	<i>Hojas</i>
AMA (500 mM Na^+)	1,42 \pm 0,44	0,54 \pm 0,09
Colina- AMA	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02
Colina- AMA +20 mM Na^+	0,67 \pm 0,13	0,23 \pm 0,07

III.5 Homeostasis de la concentración citoplasmática de Na^+ en células de *Z. marina*

En este apartado se exponen los resultados obtenidos del estudio de la permeabilidad relativa de Na^+ con respecto a K^+ en el plasmalema de células de la epidermis radicular. Se presentan los contenidos totales de Na^+ y K^+ en tejido foliar y radicular. Así mismo, se muestran los resultados de las medidas de la actividad citoplasmática de Na^+ realizadas con microelectrodos de Na^+ . Y por último, se expone el estudio, mediante técnicas fluorimétricas, del transporte de Na^+ en vesículas de membrana plasmática.

III.5.1 Permeabilidad relativa de Na⁺ respecto a K⁺ en células epidérmicas de la raíz

El plasmalema de células epidérmicas de la raíz mostró una permeabilidad relativa de Na⁺ respecto a K⁺ inferior a la descrita en células del mesófilo foliar (Fernández *et al.*, 1999).

En AMA simplificada compuesta por 500 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM KCl y tamponada a pH 8 (10 mM MOPS-Bis Tris Propano) la adición de 1 mM de NaCN y 1 mM de SHAM provocó la despolarización de la membrana de células epidérmicas de la raíz hasta un valor estable de $E_D = -73 \pm 12$ mV (n = 5). Dicho valor fue altamente dependiente de K⁺ frente a Na⁺, a pesar de que la concentración externa de Na⁺ era 500 mM. Así, el valor de E_D varió en función de la concentración externa de K⁺. Según se observa en la Figura 37, la disminución de la concentración externa de K⁺ de 10 mM a 1 mM KCl provocó un cambio en el E_D , el cual se hizo más negativo ($\approx E_D = -11 \pm 2$ mV; n = 5). A su vez, una segunda disminución de la concentración externa de K⁺ de 1 mM a 0,1 mM KCl provocó nuevamente la disminución del E_D , aunque en este caso el cambio fue menor ($\approx E_D = -3 \pm 1$ mV; n = 5).

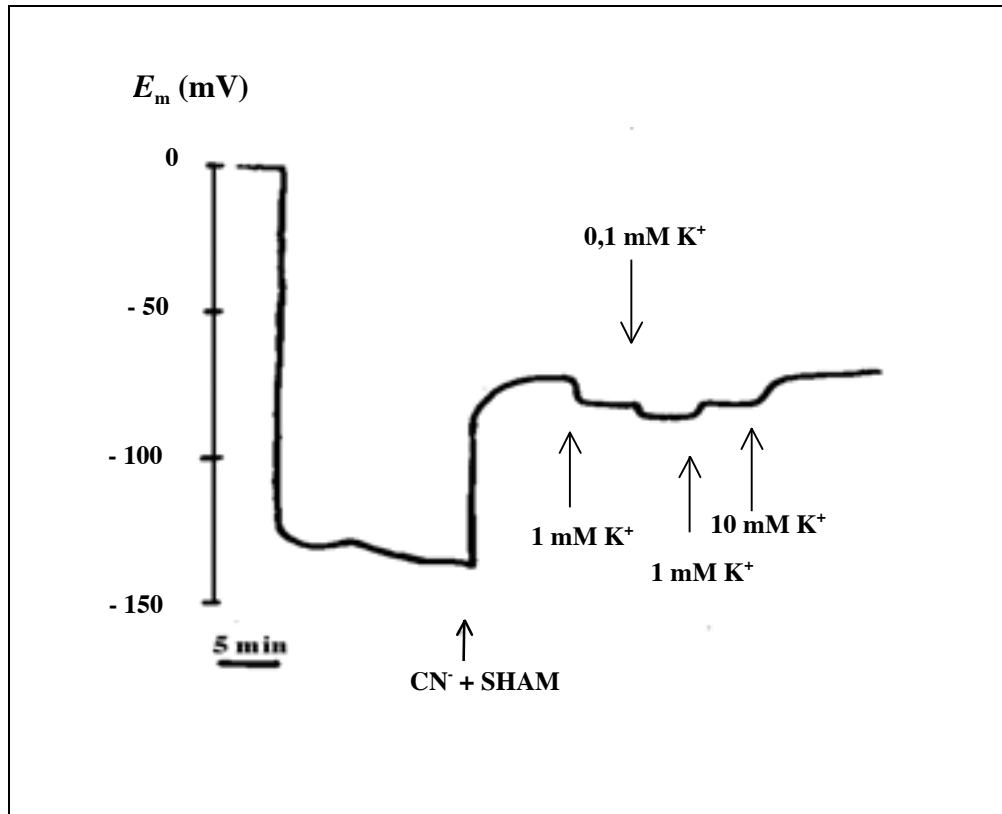


Figura 37. Efecto de la variación de la concentración de externa de K^+ sobre el E_D de una célula epidérmica de la raíz. La medida se realizó insertando un microelectrodo simple en una célula epidérmica de una raíz en AMA que contenía 500 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, tamponada a pH 8 e inicialmente con 10 mM KCl. Una vez alcanzado un valor estable de E_m se añadió 1 mM NaCN y 1 mM SHAM al medio de ensayo que se mantuvo a lo largo del experimento. Posteriormente, se varió la concentración de KCl del medio según se señala. El registro corresponde a un experimento representativo ($n = 5$).

La variación del E_D en función de la concentración externa de K^+ permitió calcular el valor de la permeabilidad relativa de Na^+ con respecto a K^+ del plasmalema de las células epidérmicas de la raíz a partir de la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz modificada (ecuación 8), asumiendo que la concentración citoplasmática de K^+ permanece constante al variar la concentración externa y considerando despreciable la concentración citoplasmática de Na^+ respecto a la concentración externa, 500 mM NaCl, (apartado II.4.3.1).

$$P_{Na^+}/P_{K^+} = \frac{B[K_2^+]_e - A[K_1^+]_e}{A[Na^+]_e - B[Na^+]_e} \quad (\text{ecuación 8})$$

siendo $A = 10^{E_1 / -59}$ y $B = 10^{E_2 / -59}$, donde $E_1 = -73 \pm 12$ mV ($n = 5$) y $E_2 = -83 \pm 6$ mV ($n = 5$). E_1 y E_2 corresponden al valor de E_D observado a cada concentración de K^+ externa, $[K_1^+]_e = 10$ mM y $[K_2^+]_e = 1$ mM.

Sustituyendo estos valores en la ecuación, el valor medio que se obtuvo para la relación P_{Na^+}/P_{K^+} fue de $0,046 \pm 0,003$ ($n = 5$). Este valor indica que la permeabilidad a K^+ es dos órdenes de magnitud superior a la de Na^+ .

En el caso de células del mesófilo foliar, la relación P_{Na^+}/P_{K^+} determinada por un experimento similar, fue de 0,0033 (Fernández *et al.*, 1999). Así, la permeabilidad a Na^+ respecto a la de K^+ en células del mesófilo foliar es incluso menor que la observada en células de la epidermis radicular, siendo la permeabilidad para K^+ tres órdenes de magnitud superior a la de Na^+ .

III.5.2 Contenido total de Na^+ y K^+ en raíces y hojas

En la Tabla 4 se muestra el contenido total de Na^+ y K^+ , expresado en $g\text{kg}^{-1}$ PS de tejido. El contenido total de K^+ no fue significativamente distinto entre ambos tejidos, mientras que la cantidad total de Na^+ medida en raíz casi triplica la cantidad total de Na^+ presente en hoja (ANOVA, $\gamma = 0,05$).

Teniendo en cuenta la diferencia del peso atómico de Na^+ y K^+ , la relación Na^+ / K^+ de ambos tejidos se calculó a partir de los contenidos totales de Na^+ y K^+ expresados en $\text{mol kg}^{-1}\text{PS}$. Así, en hojas la relación Na^+ / K^+ resultante fue $1,23 \pm 0,03$ ($n = 5$); mientras que en raíces, el valor que se obtuvo fue $Na^+ / K^+ = 3,16 \pm 0,07$ ($n = 5$). Por tanto, la relación Na^+ / K^+ es superior en raíces, siendo

significativas las diferencias con respecto a la relación Na^+ / K^+ determinada en hojas (ANOVA, $\gamma = 0,05$).

Tabla 4. Contenido total de Na^+ y K^+ en hoja y raíces de *Z. marina*.

Las medidas se realizaron por espectrometría de absorción atómica utilizando muestras desecadas de hojas y raíces (0,05 - 0,5 g PF). Los valores, expresados en $\text{g kg}^{-1}\text{PS}$, corresponden a la media \pm SD ($n = 5$).

	Na^+ ($\text{g kg}^{-1}\text{PS}$)	K^+ ($\text{g kg}^{-1}\text{PS}$)
Hojas	21,15 \pm 3,9	29,06 \pm 4,7
Raíz	62,9 \pm 11,3	33,7 \pm 5,4

III.5.3 Actividad iónica intracelular de H^+ y Na^+ en células epidérmicas de la raíz y células del mesófilo foliar

La medida con microelectrodos selectivos para iones debe garantizar cuál es el compartimento celular en la que se sitúa la punta del microelectrodo. Así, cuando se introduce un microelectrodo en el interior celular, la punta de éste puede localizarse en el citoplasma o en el lumen de la vacuola, dado el gran tamaño de este orgánulo. Aunque, en la medida con microelectrodos selectivos para iones, se registra simultáneamente el valor de E_m , ello no es garantía suficiente para determinar la localización de la punta del microelectrodo, puesto que dicho valor es unos 10 – 20 mV más negativo en el plasmalema que el valor de E_m del tonoplasto, siendo éste un rango de variación habitual del propio E_m de la membrana plasmática. Sin embargo, la medida del pH intracelular permite discriminar de manera directa la localización de la punta del microelectrodo, ya que el valor de pH citosólico se sitúa en torno a 7, mientras que el pH de la vacuola es próximo a 5 (Felle y Bertl, 1986; Walker *et al.*, 1995).

III.5.3.1 Medida del pH citoplasmático en células de la epidermis radicular

En la Figura 38 se muestra un registro de la medida simultánea del E_m y del pH intracelular en una célula de la epidermis radicular en AMA tamponada a pH 8. La calibración del electrodo se realizó con soluciones de tampón fosfato a diferentes pH (5,3; 6,3; 7,3 y 8,3). El incremento de una unidad de pH en el medio provocó que la señal eléctrica del microelectrodo de H^+ se hiciera más negativa, en torno a 45 mV por cada unidad de pH (Figura 38A).

Tras introducir el microelectrodo en el interior de una célula epidérmica de la raíz, el valor estable de E_m que se registró fue próximo a -140 mV, simultáneamente el valor de pH intracelular medido se situó en torno a 7,37. Este valor de pH indica que la punta del microelectrodo se localizaba en el citoplasma de la célula. En estas condiciones, la adición de 1 mM NaCN y 1 mM SHAM provocó la despolarización de la membrana hasta un valor estable de E_D próximo a -55 mV. Simultáneamente, se registró una acidificación del pH intracelular de 0,13 unidades de pH, siendo el valor de pH citoplasmático de 7,24 en presencia de estos inhibidores de la respiración (Figura 38B).

El valor medio de pH registrado en las células epidérmicas de la raíz fue $7,34 \pm 0,07$ ($n = 3$), lo cual indica que la punta del microelectrodo se localizó en el citoplasma de dichas células. En todos los casos, la adición de 1 mM NaCN y 1 mM SHAM provocó la despolarización del plasmalema acompañada de la disminución del valor de pH_c ($0,10 \pm 0,05$ unidades de pH); sin embargo, como se observa en la Figura 38B, la respuesta del pH estaba retrasada con respecto a la del E_m , dado que el tiempo de respuesta de la barra del microelectrodo que contiene el sensor es menor que el de la barra que sólo contiene electrolito.

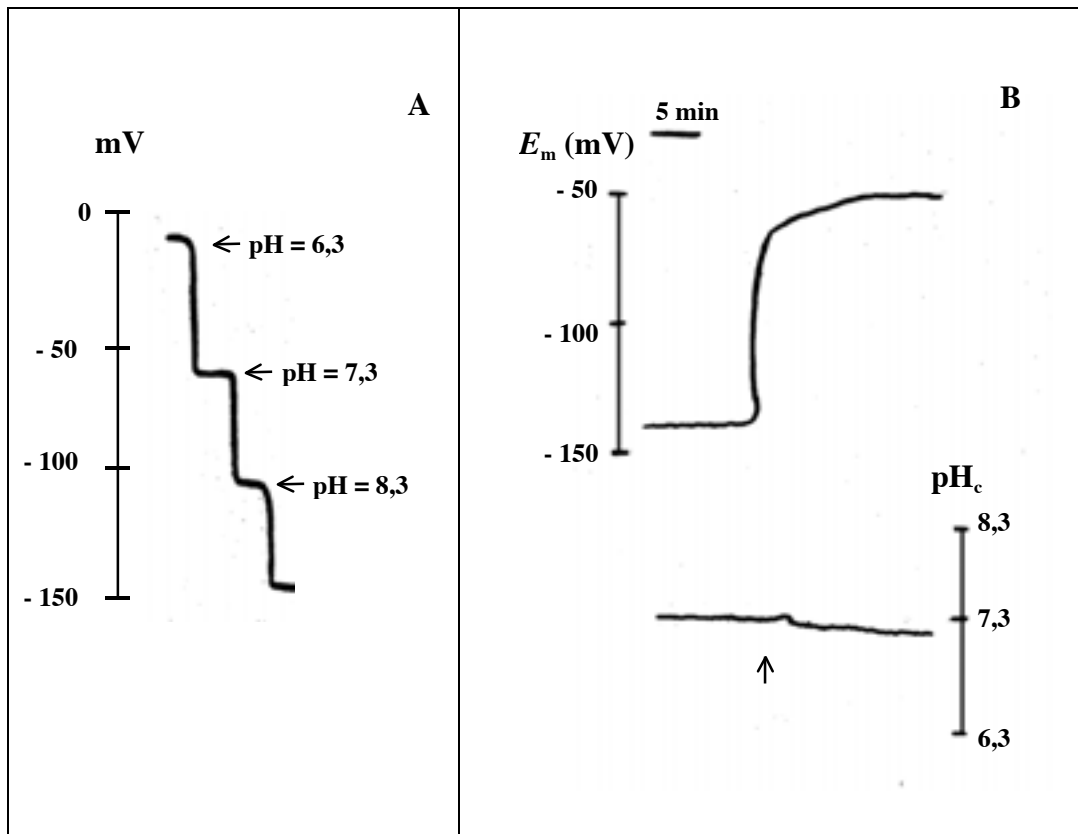


Figura 38. Efecto de la adición de NaCN sobre el pH citoplasmático de una célula de la epidermis radicular. (A) Calibración del microelectrodo de H^+ , las flechas indican el cambio de pH del medio en contacto con el microelectrodo, la pendiente de la curva de calibración fue de 45 mV / unidad de pH. (B) Registro simultáneo del E_m y pH_c de una célula epidérmica de la raíz. La medida se realizó introduciendo el microelectrodo calibrado en A. Tras obtener una señal estable por ambas barras del microelectrodo se añadió al medio de ensayo 1 mM NaCN y 1 mM SHAM (flecha), registrándose una despolarización de la membrana y una leve disminución del pH. Los registros corresponden a un experimento representativo ($n = 3$).

III.5.3.2 Selectividad de los microelectrodos de Na^+

La Figura 39 muestra el registro de la medida de la diferencia de potencial eléctrico de un microelectrodo de Na^+ en contacto con diferentes concentraciones externas de NaCl, y en presencia de 96 mM KCl en todos los casos. Dicha concentración de K^+ se usó rutinariamente en la calibración de los microelectrodos de Na^+ , por ser próxima a la esperada en el citoplasma de las células vegetales (Carden *et al.*, 2001). La señal procedente de ambas barras del microelectrodo fue

próxima a 0 cuando la concentración externa que bañaba al microelectrodo era 500 mM NaCl, ya que coincide con la concentración del electrolito que rellenaba la barra del microelectrodo selectiva para Na⁺. Del mismo modo que se ha descrito en el apartado anterior para los microelectrodos de H⁺, al disminuir la concentración externa de NaCl, se observó que la señal emitida por la barra del microelectrodo que contiene el sensor de Na⁺ se hizo negativa. Así, al disminuir la concentración externa de NaCl a 100 mM, la señal procedente de dicha barra fue de -42 mV, mientras que la señal de la barra del microelectrodo rellena solamente con electrolito no varió de 0 mV (Figura 39). El valor de ambas señales permaneció constante hasta que nuevamente se varió la concentración de Na⁺ externa. Al disminuir dicha concentración hasta 50 mM NaCl la señal de la barra selectiva para Na⁺ fue de -58 mV, mientras que la señal de la barra rellena solamente con el electrolito no cambió (Figura 39A).

Se detectaron variaciones de la diferencia de potencial eléctrico para Na⁺ en el rango 1 – 500 mM NaCl, en presencia de 96 mM KCl. En la Figura 39B se muestra una curva de calibración típica de los microelectrodos de Na⁺, donde se representa la variación del potencial frente al logaritmo negativo del valor de la concentración externa de Na⁺ ($-\log [\text{Na}^+]_e$ o pNa). El ajuste de los datos en la región lineal determinó una variación de 45 ± 8 mV ($n = 4$) por cada unidad de pNa, siendo el límite de detección de 0,1 mM Na⁺.

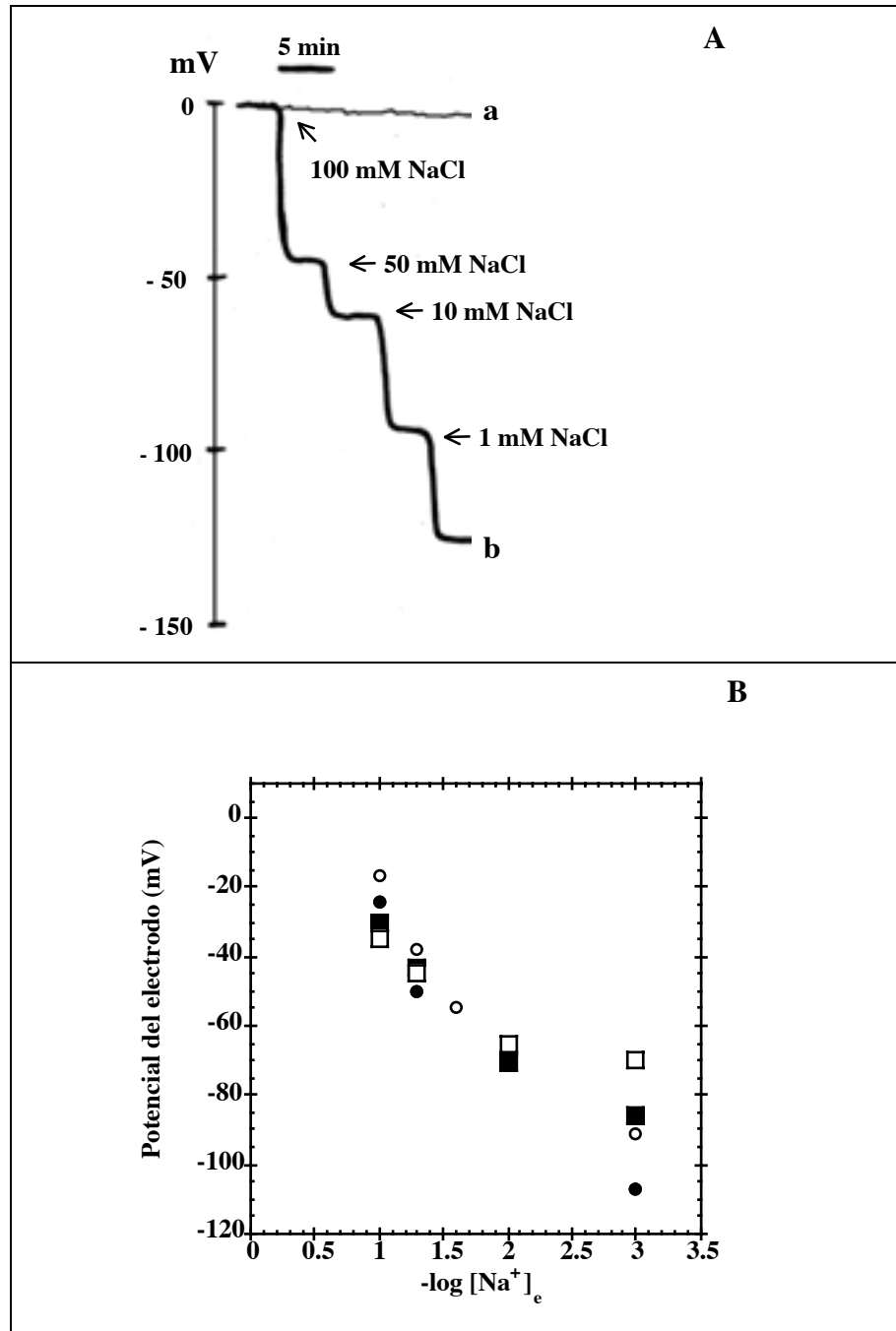


Figura 39. Calibración de un microelectrodo de Na⁺. (A) El registro muestra la señal de las dos barras de un microelectrodo doble. El cambio en la concentración de Na⁺ del medio en contacto con la punta del microelectrodo provoca la variación de la señal emitida por la barra que alberga la resina selectiva para Na⁺ (trazo b), mientras que la señal correspondiente a la barra del microelectrodo rellena con electrolito no varía (trazo a). (B) Representación de las señales obtenidas con diferentes microelectrodos de Na⁺ (n = 4) en función del logaritmo negativo de la concentración externa de Na⁺.

La señal de los microelectrodos de Na^+ sólo varió en respuesta a los cambios de la concentración externa de Na^+ , sin que se detectasen diferencias significativas de la señal registrada al cambiar el pH o la concentración de KCl del medio externo (Figura 40).

Según se muestra en la Figura 40A, las variaciones de la señal del microelectrodo de Na^+ al cambiar la concentración externa de NaCl (en presencia de 96 mM KCl y pH 7) fueron similares a las descritas en el apartado anterior. Sin embargo, al mantener la concentración externa de NaCl en 100 mM y disminuir sucesivamente el pH, en el rango 7 – 4, de la solución que bañaba al microelectrodo de Na^+ , no se detectaron variaciones significativas en la señal del mismo (Figura 40A).

Del mismo modo, la señal de un microelectrodo de Na^+ varió en función de la concentración externa de NaCl, en presencia de 96 mM KCl (Figura 40B) y, sin embargo, no se detectaron cambios en la señal emitida al mantener constante la concentración externa de NaCl (100 mM) y disminuir la concentración externa de KCl en el rango 96 – 1 mM (Figura 40B).

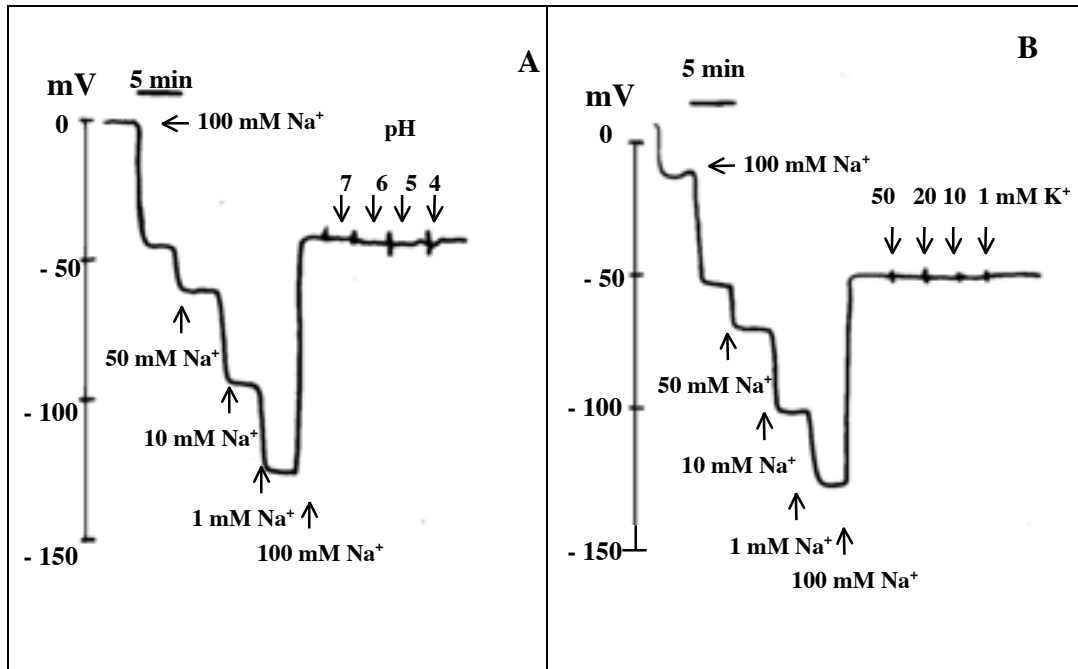


Figura 40. Efecto del pH y KCl sobre la calibración los microelectrodos de Na^+ . Registros obtenidos con microelectrodos selectivos para Na^+ en respuesta al cambio en la concentración de Na^+ (NaCl) del medio. Una vez restaurada la concentración externa de 100 mM NaCl , se varió el pH (A), o la concentración externa de KCl (B) sin que se detectasen cambios en la medida de ambos microelectrodos. Los registros corresponden a un experimento representativo ($n = 3$).

III.5.3.3 Medida de la actividad citoplasmática de Na^+

El coeficiente de actividad de Na^+ (γ) se determinó a partir de la pendiente de la relación lineal obtenida entre las diferentes concentraciones de Na^+ usadas en la calibración de los microelectrodos y sus correspondientes valores de actividad, calculados a partir del programa *MINTEQ2/PRODEFA2* (*Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Athens, Georgia*), teniendo en cuenta la concentración de los iones presentes en las soluciones de calibración. El valor obtenido fue $\gamma = 0,7$; siendo el coeficiente de determinación del ajuste $R^2 = 0,99$ (Figura 41).

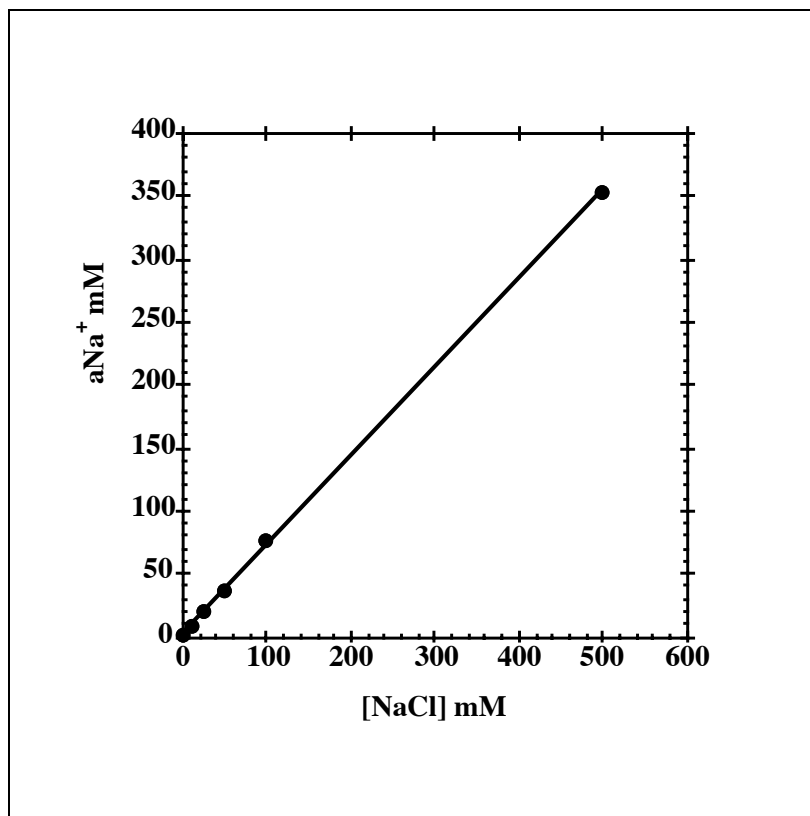


Figura 41. Relación entre la actividad y la concentración de Na⁺. Los valores de actividad de Na⁺ se determinaron para diferentes concentraciones de Na⁺ en una disolución de 96 mM KCl y pH 7,3 (10 mM MOPS-Bis Tris Propano). La pendiente del ajuste lineal fue $\gamma = 0,7$; siendo el coeficiente de determinación $R^2 = 0,99$.

La Figura 42A muestra el registro simultáneo del E_m y de la actividad citoplasmática de Na⁺ (γNa^+_c) de una célula epidérmica de la raíz de *Z. marina* en AMA tamponada a pH 8. Tras introducir el microelectrodo de Na⁺ en el interior celular, el valor estable del E_m se situó en torno a -150 mV, mientras que la actividad citoplasmática de Na⁺ fue $\gamma Na^+_c = 9,4$ mM Na⁺. El valor de γNa^+_c se determinó a partir de la curva de calibración de la señal del microelectrodo (Figura 42B). La pendiente obtenida, en concreto, para esta calibración fue 51,2 mV por unidad de pNa ($R^2 = 0,98$).

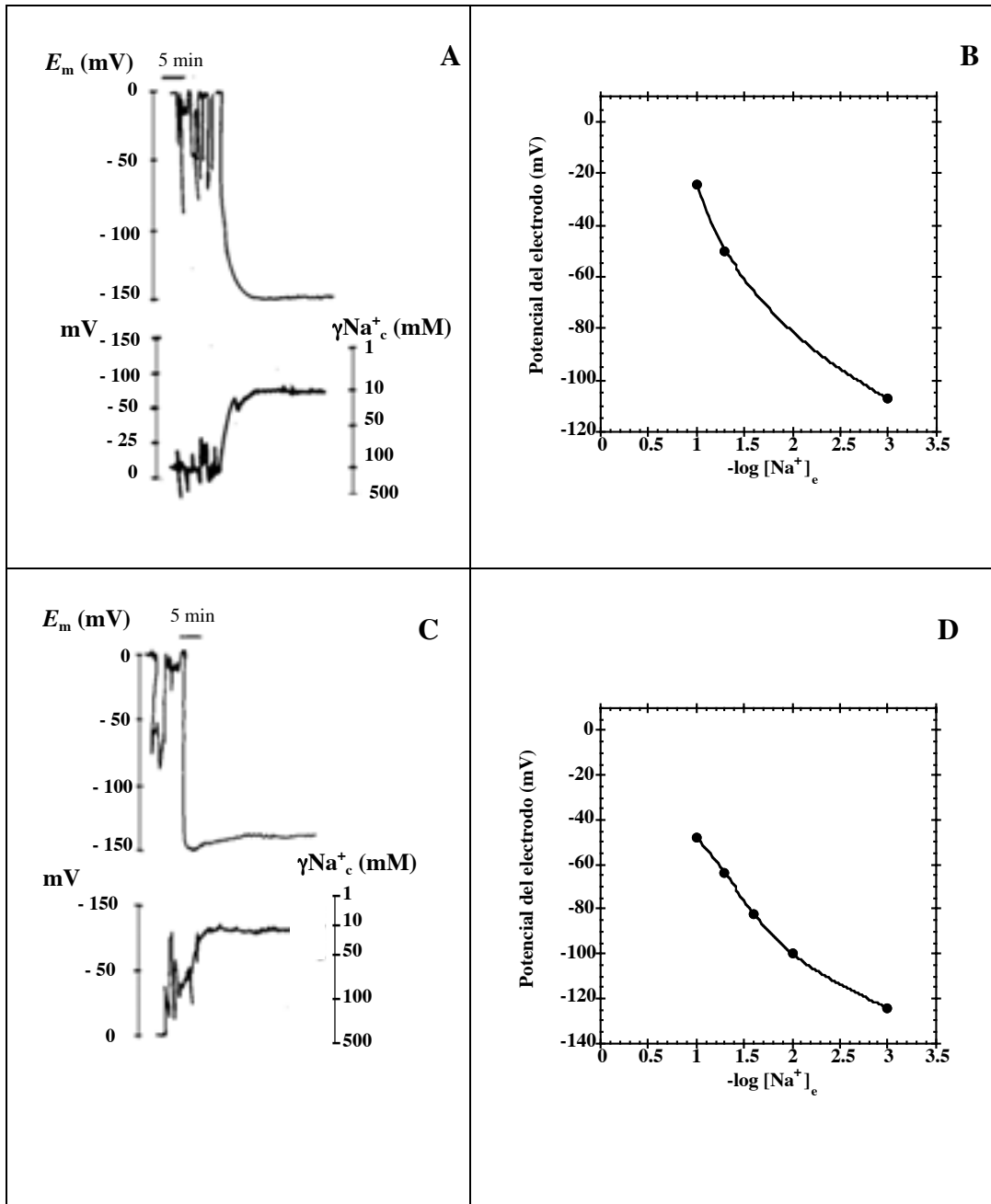


Figura 42. Actividad citoplasmática de Na^+ en células de *Z. marina*. Registro simultáneo del E_m y de la γNa^+_c de una célula epidérmica de la raíz (A) y de una célula del mesófilo foliar (C) de un plántula obtenida por germinación *in vitro* de semillas. Las medidas se realizaron con microelectrodos dobles. La γNa^+_c se determinó a partir de las curvas de calibración obtenidas para cada microelectrodo. Las respectivas pendientes fueron 51,2 mV / unidad de pNa (B) y 42,3 mV / unidad de pNa (D). Los registros corresponden a dos experimentos representativos, $n = 5$.

De manera similar, en la Figura 42C se muestra un registro representativo de la medida de simultánea de E_m y γNa^+_c de una célula del mesófilo foliar en AMA tamponada a pH 8. En este caso, el valor estable de E_m fue próximo a -145 mV, y la γNa^+_c , determinada a partir de la curva de calibración (Figura 42D), se situó en torno a 10,6 mM Na^+ . La pendiente de la curva de calibración fue 42,3 mV por unidad de pNa ($R^2 = 0,98$).

El valor medio de la γNa^+_c observado en células epidérmicas de la raíz fue de $10,7 \pm 3,3$ mM Na^+ ($n = 5$), siendo la media del E_m registrado simultáneamente de -160 ± 9 mV ($n = 5$). Sin embargo, en ocasiones se registraron valores superiores (ANOVA, $\gamma = 0,05$), en torno a 56 ± 30 mM Na^+ ($n = 3$), los cuales estaban asociados a valores de E_m de -130 ± 15 mV ($n = 3$).

Por otra parte, la media de la γNa^+_c registrada en células del mesófilo foliar fue $16,2 \pm 8$ mM Na^+ ($n = 3$), siendo el valor medio de E_m detectado en este caso -150 ± 10 mV ($n = 3$). Aunque el valor de γNa^+_c medido en células foliares es ligeramente superior al obtenido en células epidérmicas de la raíz, las diferencias entre ambos no fueron significativas (ANOVA, $\gamma = 0,05$)

III.5.3.4 Efecto de la adición de inhibidores sobre la actividad citoplasmática de Na^+ en células epidérmicas de la raíz

La presencia de inhibidores de la respiración en el medio de ensayo afectó a la γNa^+_c tanto de células de la epidermis radicular, como del mesófilo foliar. Sin embargo, dicha actividad no se modificó significativamente tras la adición de un inhibidor del antiporte de Na^+ (amilorida) o de un ionóforo para Na^+ y H^+ (monensina)

En la Figura 43 se muestran dos registros representativos del efecto provocado por la adición de 1 mM NaCN y 1 mM de SHAM al medio de ensayo (AMA) en la γNa^+_c de una célula epidérmica de la raíz y una célula del mesófilo foliar, respectivamente. En el caso de la célula radicular, la adición de estos

inhibidores de la respiración provocó la despolarización de la membrana hasta su valor de E_D (-55 mV), registrándose simultáneamente un incremento transitorio de la γNa^+_c , en torno a 0,3 mM Na^+ . Al retirar ambos inhibidores del medio, se recuperó el valor inicial de E_m (-140 mV), así como la γNa^+_c (Figura 43A).

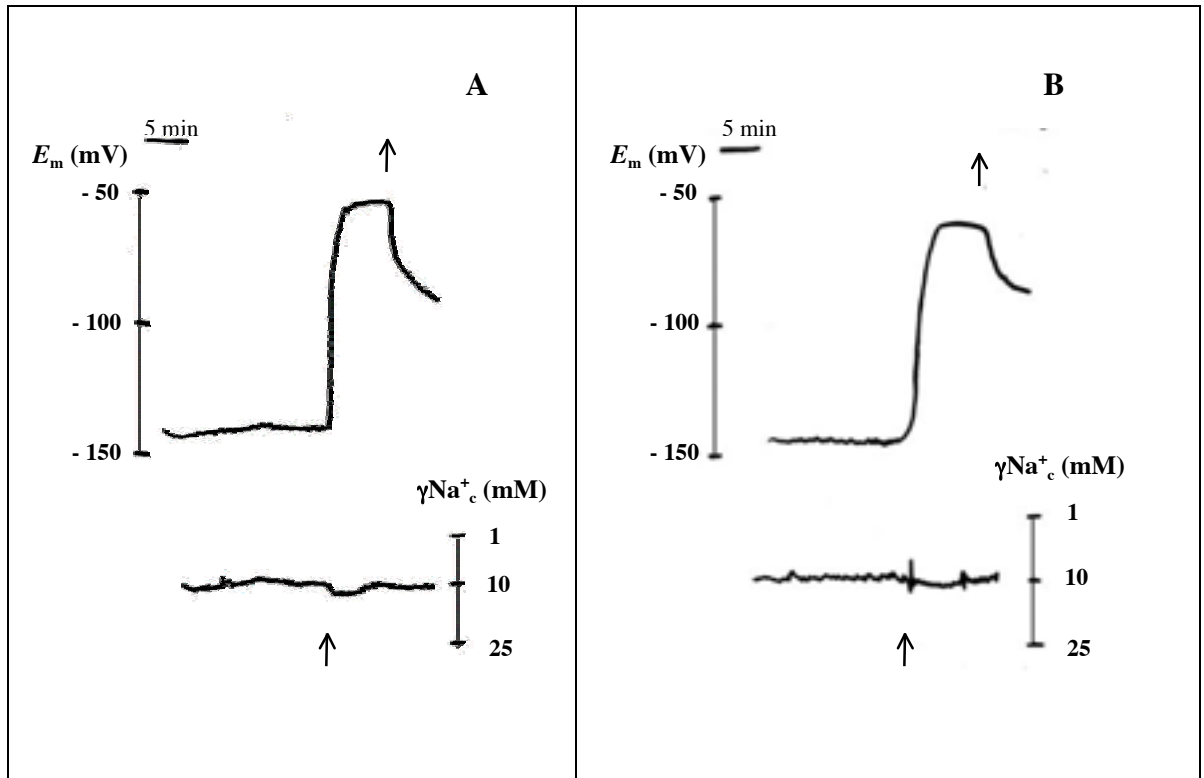


Figura 43. Efecto del NaCN sobre la actividad citoplasmática de Na^+ . Los registros muestran la medida en continuo del E_m y de la γNa^+_c de una célula epidérmica de la raíz (A) y de una célula del mesófilo foliar (B) en AMA. Las flechas inferiores indican el momento de la adición al medio de 1 mM NaCl y 1 mM SHAM, las flechas superiores representan el momento de la retirada de éstos del medio de ensayo. La γNa^+_c (mM) se determinó a partir de las curvas de calibración de los microelectrodos. Los registros corresponden a experimentos representativos, ($n = 3$).

En el caso de la célula del mesófilo foliar el efecto de la adición de 1 mM NaCN y 1 mM de SHAM fue similar al descrito anteriormente. Paralelamente a la despolarización de la membrana hasta un valor de E_D próximo a -60 mV, se observó un incremento de la γNa^+_c de aproximadamente 0,2 mM Na^+ (Figura 43B). Ambas variables recuperaron su valor inicial al retirar los inhibidores del medio de ensayo.

Por otra parte, tanto la adición de monensina, un ionóforo para Na^+ (Pressman, 1976), como la de amilorida, un inhibidor de la actividad antiportadora Na^+ / H^+ (Blumwald *et al.*, 1987) no tuvieron un efecto significativo sobre la γNa_c^+ (Figura 44). Según se muestra en el registro representativo de la Figura 44A, la presencia de $50 \mu\text{M}$ de monensina en el medio de ensayo provocó una pequeña despolarización de la membrana (unos 5 mV); sin embargo, la γNa_c^+ permaneció sin cambios significativos (Figura 44A). Por otra parte, la adición de $200 \mu\text{M}$ de amilorida al medio de ensayo causó una ligera hiperpolarización de la membrana, (en torno a 7 mV), mientras que el valor de γNa_c^+ no varió significativamente. Al retirar la amilorida del medio, el E_m recuperó su valor inicial (Figura 44B).

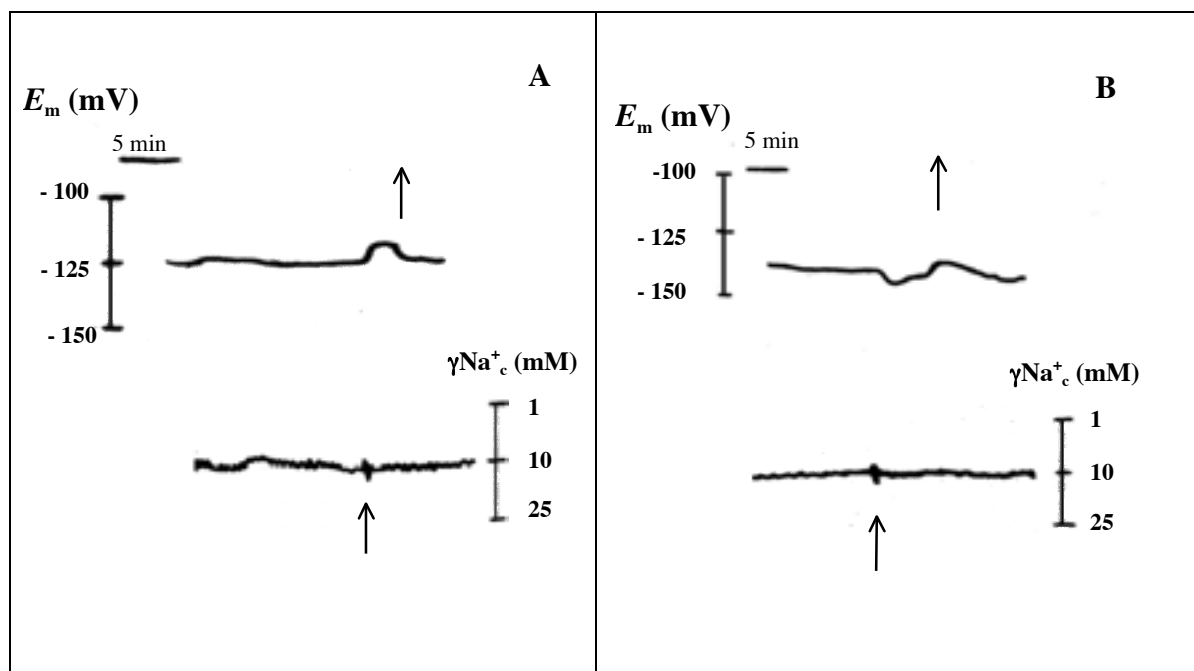


Figura 44. Efecto de la adición de monensina y amilorida sobre la actividad citoplasmática de Na^+ . Los registros corresponden a la medida simultánea del E_m y de la γNa_c^+ en células epidérmicas de la raíz en AMA. Las flechas inferiores indican la adición de $50 \mu\text{M}$ monensina (A) o $200 \mu\text{M}$ amilorida (B) y las superiores su retirada del medio de ensayo. La correspondencia entre la señal en mV y la γNa_c^+ (mM) se obtuvo a partir de las curvas de calibración de los microelectrodos. Los registros corresponden a un experimento representativo ($n=3$).

III.5.3.5 Efecto de la adición de nutrientes sobre la actividad citoplasmática de Na^+ en células epidérmicas de la raíz

La γNa_c^+ en las células epidérmicas de la raíz de plantas incubadas en ausencia de N o en ausencia de P fue similar al valor descrito en los apartados anteriores para células de plantas sin ningún tipo de tratamiento. En la Figura 45 se muestran sendos registros de E_m y γNa_c^+ de células epidérmicas radiculares de plantas incubadas 3 días sin N (Figura 45A) u 8 días en un medio libre de P (Figura 45B).

Según se muestra, la adición de $50 \mu\text{M NO}_3^-$ al medio de ensayo (AMA, tamponada a pH 8) provocó un incremento de la γNa_c^+ de aproximadamente $0,4 \text{ mM Na}^+$, al mismo tiempo que se despolarizaba la membrana unos 8 mV . Al retirar el NO_3^- del medio se recuperaron los valores iniciales de γNa_c^+ ($9,4 \text{ mM Na}^+$) y de E_m (-165 mV) (Figura 45A).

Por otra parte, la adición de $10 \mu\text{M P}_i$ al medio de ensayo (AMA, tamponada a pH 8) causó simultáneamente una despolarización de la membrana de unos 7 mV y un incremento de la γNa_c^+ de $0,6 \text{ mM Na}^+$ (Figura 45B). Tras retirar el P_i del medio de ensayo, tanto el E_m como la γNa_c^+ recuperaron su valor inicial, -153 mV y $10,2 \text{ mM Na}^+$, respectivamente (Figura 45B).

El incremento medio de la γNa_c^+ registrado en células epidérmicas de la raíz tras la adición de $50 \mu\text{M NO}_3^-$ fue $0,42 \pm 0,15 \text{ mM Na}^+$ ($n = 3$). En el caso de P_i , el incremento medio de la γNa_c^+ fue $0,53 \pm 0,13 \text{ mM Na}^+$ ($n = 3$).

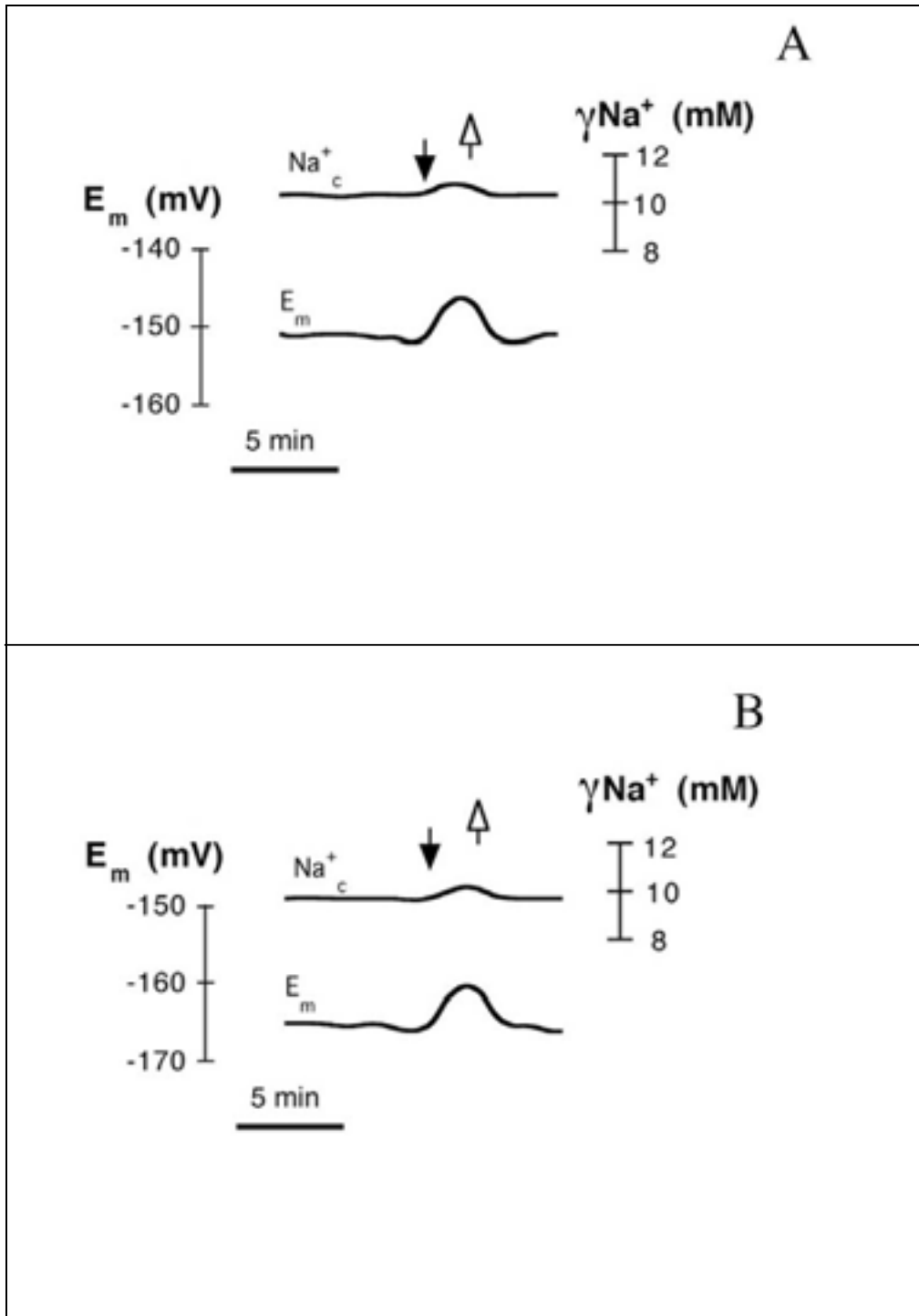


Figura 45. Efecto de la adición de NO_3^- y P_i sobre la actividad citoplasmática de Na^+ . La medida se realizó con microelectrodos dobles en células de la epidermis radicular. Las flechas negras señalan el momento de la adición de $50 \mu\text{M NO}_3^-$ (A) o $10 \mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$ (B); las flechas blancas indican su retirada del medio. La actividad citoplasmática de Na^+ (mM) se determinó a partir de las curvas de calibración de los microelectrodos. Los registros corresponden a un experimento representativo ($n=3$).

III.5.4 Estudio del transporte de Na⁺ en vesículas de plasmalema de células foliares y radiculares

El estudio transporte de Na⁺ a través del plasmalema de células de *Z. marina* se realizó en vesículas de plasmalema purificadas mediante reparto en dos fases, formadas por dextrano y PEG en disolución acuosa, a partir microsomas procedentes de hojas y raíces homogeneizadas (apartado II.3).

III.5.4.1 Rendimiento de la purificación de vesículas de plasmalema

El rendimiento de la purificación de vesículas de plasmalema mediante reparto en fases separadas se determinó a partir del contenido total de proteína del extracto de vesículas de plasmalema con respecto a la cantidad de proteína presente en el extracto de microsomas. El rendimiento de la purificación de vesículas de plasmalema purificadas a partir de 38,7 gPF de tejido foliar fue del 3,98 %, siendo la cantidad total de proteínas presente en la población de vesículas de plasmalema de 760 μ g. Por otra parte, la purificación de vesículas de plasmalema a partir de 25 g PF de tejido radicular tuvo un rendimiento inferior (2,06 %), obteniéndose un total de 80 μ g de proteína en la población de vesículas. La diferencia en la cantidad de proteína total y, por tanto, en la cantidad de vesículas de membrana disponibles de tejido foliar y radicular, restringió el número de experimentos realizados con vesículas de plasmalema de tejido radicular.

III.5.4.2 Transporte de H⁺ en vesículas de plasmalema

Las vesículas de plasmalema útiles para el estudio del transporte mediante técnicas fluorimétricas son aquellas que disponen la “cara citoplasmática” hacia el exterior. Así, en presencia de ATP y a un pH neutro o ligeramente ácido, la adición de Mg²⁺ al medio de reacción permite la acumulación de H⁺ en el interior de la vesículas, como consecuencia de la actividad de la H⁺-ATPasa. En los experimentos siguientes, la formación de este gradiente de pH entre el interior y el

exterior de las vesículas se reveló mediante la extinción de la fluorescencia de la sonda ACMA, específica para H^+ , la cual se une al plasmalema al añadirla al medio de reacción.

La Figura 46 muestra la disminución de la fluorescencia o *quenching* registrado al añadir 1,5 mM $MgCl_2$ al medio de reacción en el que se incubaban las vesículas de plasmalema purificadas a partir de hojas (Figura 46A) o raíces (Figura 46B). La extinción de la fluorescencia fue progresiva en ambos casos; sin embargo, aún teniendo en cuenta que la cantidad de proteínas utilizada en el ensayo fue el doble para hojas que para raíces, en el caso de la vesículas purificadas a partir de hojas el *quenching* registrado fue mucho mayor que en el caso de las vesículas purificadas a partir de tejido radicular (Figura 46).

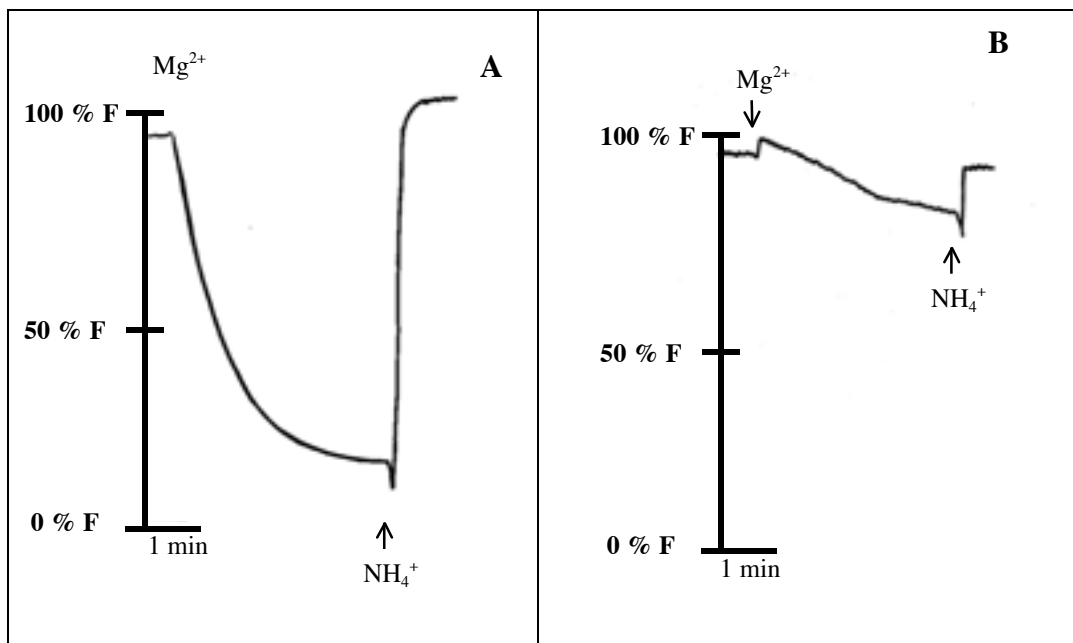


Figura 46. Variación de la fluorescencia relativa, expresada en %, en presencia de Mg^{2+} . Se incubaron vesículas de plasmalema ($30 \mu g$ Prot) de tejido foliar (A) y ($15 \mu g$ Prot) de tejido radicular (B) en 250 mM Sorbitol; 100 mM MES-Bis-Tris Propano pH7; 100 mM KCl; 1,5 mM ATP – Bis Tris Propano pH 7; 1 % BSA; 1mM DTT y $1 \mu M$ ACMA. Tras 10 min de incubación de las vesículas de plasmalema, se añadió 1,5 mM $MgCl_2$ registrándose la extinción progresiva de la fluorescencia emitida por la sonda ACMA sensible a H^+ . Finalmente, tras la adición de 10 mM NH_4Cl se produjo la recuperación de la fluorescencia inicial.

En ambos casos, se observó la recuperación de la fluorescencia inicial tras la adición de 10 mM NH_4Cl al medio de reacción, es decir, la presencia de NH_4^+ provocó la disipación completa del gradiente de pH establecido por la activación de la H^+ -ATPasa (Figura 46).

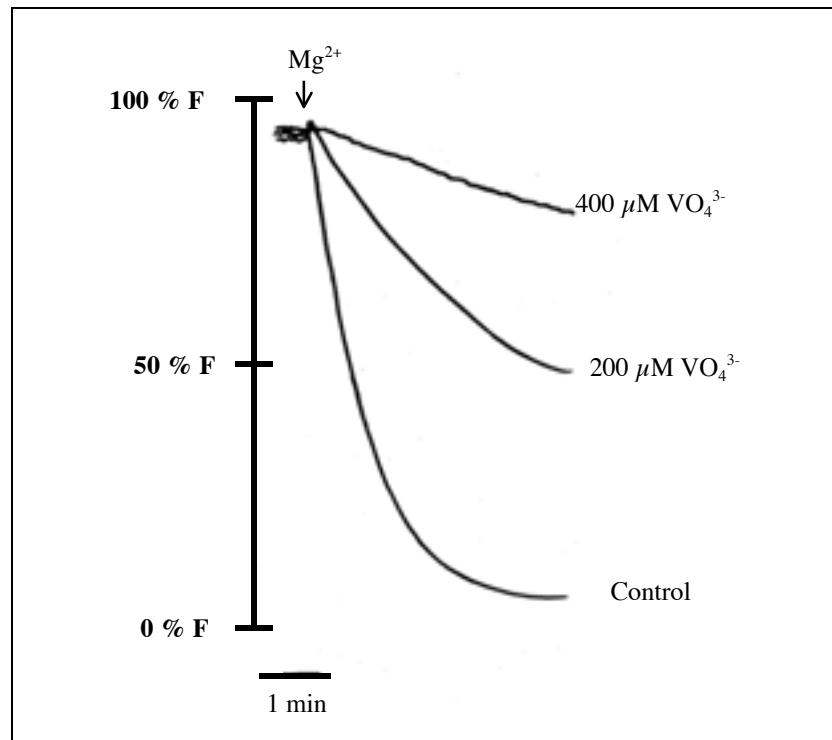


Figura 47. Efecto del vanadato sobre la formación del gradiente de pH en vesículas de plasmalema. Se incubaron vesículas de plasmalema (30 μg Prot) aisladas de tejido foliar en presencia de diferentes concentraciones de Na_3VO_4 durante 10 min. Posteriormente se añadía 1,5 mM MgCl_2 , produciéndose el cambio en la fluorescencia emitida por la sonda ACMA. Cada trazo corresponde a un experimento representativo ($n = 3$).

Con objeto de determinar si la formación del gradiente de pH era consecuencia de la actividad de la H^+ -ATPasa de plasmalema, se realizó el mismo ensayo descrito anteriormente, pero en presencia de diferentes concentraciones de vanadato, un inhibidor de la actividad de la H^+ -ATPasa de plasmalema (Gilmour *et al.*, 1985). Según se muestra en la Figura 47, la disminución de la fluorescencia y, por tanto, el gradiente de pH establecido entre el interior de las vesículas y el

medio, se inhibió en torno a un 44 % en presencia de 200 μM Na_3VO_4 . Así mismo, en presencia de 400 μM Na_3VO_4 , el porcentaje de fluorescencia se inhibió en un 87 % (Figura 47).

III.5.4.3 Antiporte Na^+ / H^+ en vesículas de plasmalema

Una vez establecido el gradiente de pH en vesículas de plasmalema purificadas a partir de hojas, la adición de diferentes concentraciones de NaCl ó Na_2SO_4 al medio de reacción provocó la recuperación de la fluorescencia emitida por la sonda, lo cual indica que disminuyó el gradiente de pH establecido en las vesículas (Figura 48). La disipación del gradiente de pH se explica como consecuencia de la entrada de Na^+ al interior de la vesícula asociada a la salida de H^+ hacia el medio.

Del mismo modo, también se registró la recuperación de la fluorescencia tras la adición de diferentes concentraciones de Na^+ en ensayos realizados con vesículas de plasmalema procedentes de tejido radicular (resultados no mostrados), ello indica que la actividad antiportadora Na^+/H^+ estaría presente también en el plasmalema de células radiculares.

En el caso de vesículas purificadas a partir de hojas, el porcentaje de recuperación de la fluorescencia, y por tanto la magnitud de la disminución del gradiente de pH dependió de la concentración de Na^+ añadida (en el rango 1 – 500 mM Na^+). La disminución del gradiente de pH se registró tanto al añadir Na^+ en forma de NaCl o en forma de Na_2SO_4 , lo cual indica que es el catión (Na^+) y no el anión (Cl^- o SO_4^{2-}) el ión que se transporta (Figura 48).

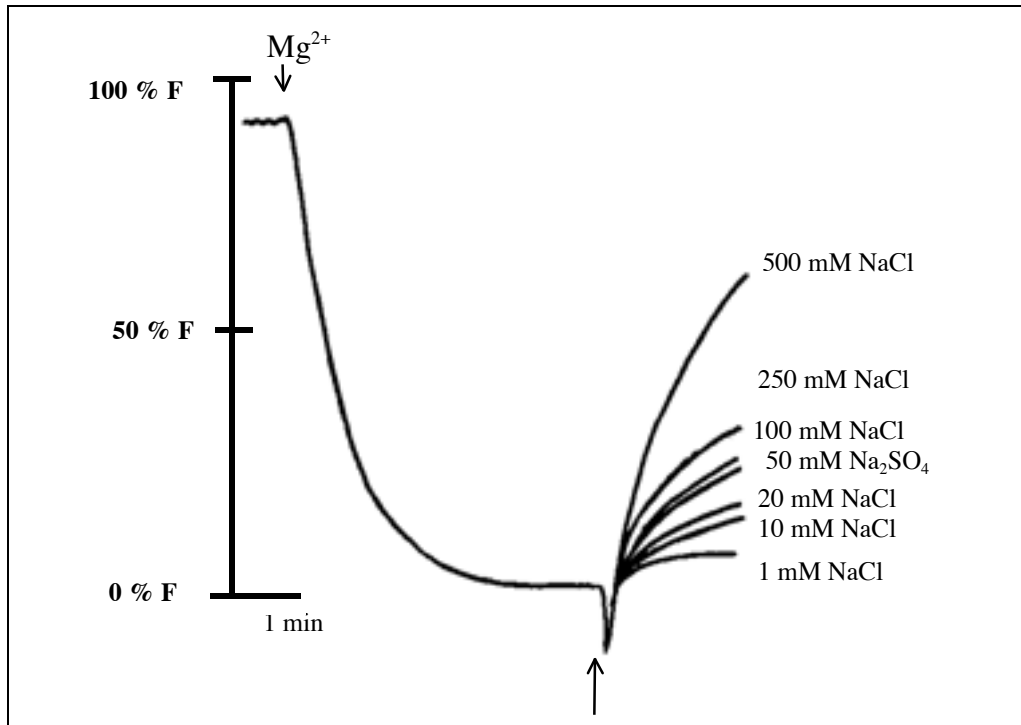


Figura 48. Efecto de la adición de Na^+ sobre el gradiente de H^+ en vesículas de plasmalema. Se incubaron vesículas de plasmalema purificadas de tejido foliar ($30 \mu\text{g}$ prot) durante 10 min. Posteriormente, tras añadir $1,5 \text{ mM}$ MgCl_2 , se detectó una disminución en la fluorescencia del medio (%F). Una vez alcanzado un valor estable de fluorescencia, la flecha indica la adición de diferentes concentraciones de NaCl o Na_2SO_4 . Cada concentración de Na^+ indicada corresponde a un experimento independiente ($n = 3$)

La disipación del gradiente de H^+ , expresado en porcentaje de recuperación de la fluorescencia durante el primer minuto desde la adición de las diferentes concentraciones de Na^+ , y referido a la cantidad de proteína presente en la reacción, ($\approx \%F \text{ mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$) se saturó a partir de 40 mM Na^+ (Figura 49).

El ajuste de los valores de disipación del gradiente de H^+ al modelo de Michaelis-Menten permitió calcular los parámetros del transporte de Na^+ en vesículas de plasmalema obtenidas a partir de tejido foliar. El valor de K_m fue $16,8 \pm 4,4 \text{ mM}$ Na^+ y la actividad máxima de antiporte, expresada en unidades arbitrarias de recuperación de fluorescencia, fue $71,8 \pm 6,6 \approx \%F \text{ mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$. El coeficiente de determinación del ajuste fue $R^2 = 0,97$.

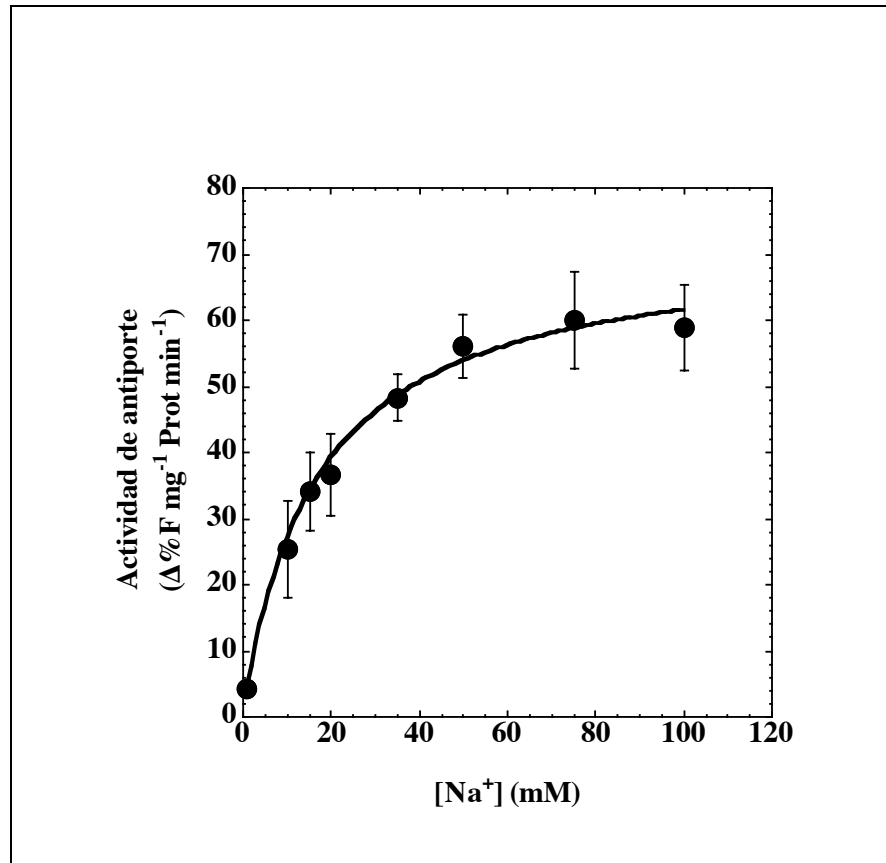


Figura 49. Disipación del gradiente de pH en vesículas de plasmalema en función de la concentración de Na⁺ añadida. La disipación del gradiente de pH se expresa en porcentaje de recuperación de la fluorescencia transcurrido un minuto desde la adición de diferentes concentraciones de Na⁺ ($\approx\%$ F mg⁻¹prot min⁻¹). Los valores se saturaron en el rango 1 – 100 mM NaCl y se ajustaron al modelo de Michaelis–Menten. Los datos corresponden a la media \pm SD (n = 3).

Por último, la adición de 200 μ M amilorida, un inhibidor del antiporte Na⁺/H⁺ de tonoplasto (Blumwald *et al.*, 1987), al medio de reacción no afectó a la disminución del gradiente de pH provocado tras la adición de 100 mM Na⁺ (Figura 50).

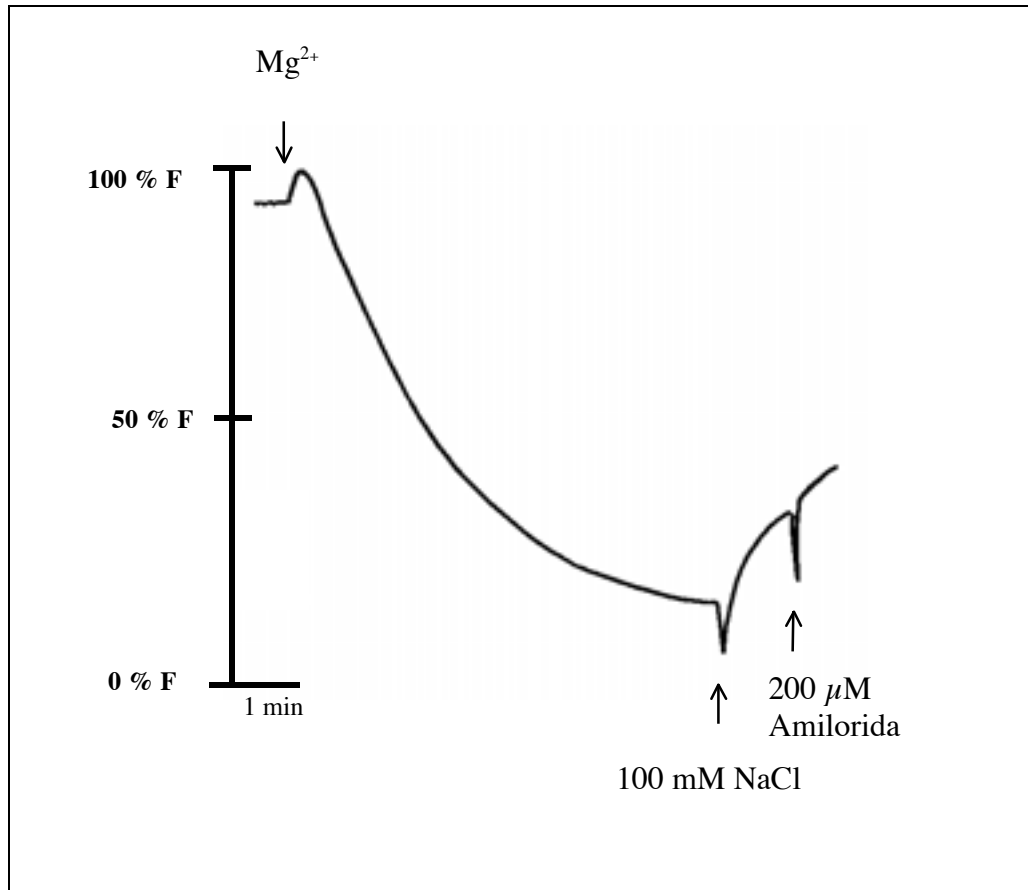


Figura 50. Efecto de la adición de amilorida sobre la disipación del gradiente de pH inducida por Na^+ . Se incubaron vesículas de plasmalema de tejido foliar (30 μg prot) durante 10 min. Posteriormente, tras la adición de 1,5 mM $MgCl_2$ se produjo una disminución de la fluorescencia del medio de ensayo (%F) hasta un nivel estable. Al añadir 100 mM NaCl se observó la recuperación de la fluorescencia, 1 minuto después se añadió amilorida (200 μM). El registro corresponde a un experimento representativo (n = 3).

DISCUSIÓN

IV.1 Germinación y supervivencia de plántulas de *Z. marina*

La salinidad ha sido descrita como el principal factor que afecta a la germinación de las semillas de *Z. marina* en condiciones de laboratorio (Hootsmans *et al.*, 1987; van Lent y Verschuure, 1995; Orth *et al.*, 2000), mientras que en el hábitat natural la salinidad no tiene un efecto significativo sobre la germinación de éstas (Moore *et al.*, 1993; Orth *et al.*, 2000). El porcentaje de germinación de las semillas de *Z. marina* obtenido en agua destilada (55 %; apartado III.1) es similar al descrito por Hootsmans *et al.* (1987), en agua de mar comercial (WIMEX Meeressalz) con una salinidad del 10 ‰, tanto a 20 °C como 30 °C. Sin embargo, estos autores describen un porcentaje de germinación del 100 % tras 22 días de almacenamiento de las semillas en agua de mar comercial ajustada al 1 ‰ de salinidad (Hootsmans *et al.*, 1987). En el caso de *Z. marina* los porcentajes de germinación se calcularon después de 3 días en agua destilada, sin que se observase un aumento en el porcentaje de germinación tras un periodo de tiempo superior.

La inducción de la germinación por condiciones de baja salinidad también ha sido observada en otras especies de angiospermas marinas como *Zostera noltii* Hornemann, donde las tasas de germinación son similares a las descritas para *Z. marina*, siendo máximas al 1 ‰ de salinidad (Hootsmans *et al.*, 1987) o *Zostera capricorni* Ascherson, cuya germinación se favorece en medios de 1-10 ‰ de salinidad (Conachera *et al.*, 1994). Sin embargo, en esta especie la germinación también se produce en medios de mayor salinidad (20, 30 ó 40 ‰) cuando la temperatura es baja (Conachera *et al.*, 1994). No obstante, para otras especies se ha descrito que el proceso de germinación es independiente de la salinidad como en el caso de *Posidonia oceánica* L. (Balestri *et al.*, 1998), *Halodule wrightii* Ascherson o *Syringodium filiforme* Kutzing (McMillan, 1981).

La germinación espontánea observada en las semillas de *Z. marina* que se mantenían a 4 °C en AMN (35 ‰) podría explicarse porque en condiciones naturales estas semillas pueden sufrir un periodo de dormancia, de

aproximadamente un año de duración (Harrison 1991; Orth *et al.*, 2000). Aunque la germinación espontánea se produjo tras un periodo aproximado de 5 meses de almacenamiento de las semillas, las condiciones en las que ocurrió fueron parecidas a las que pudieran encontrarse las semillas en su hábitat natural, es decir, alta salinidad, temperatura baja y oscuridad. Ello coincide con el hecho, mencionado anteriormente, de que el proceso de germinación de *Z. marina*, en condiciones naturales, es independiente de la salinidad (Moore *et al.*, 1993; Orth *et al.*, 2000), así como, no dependiente de la luz (Moore *et al.*, 1993).

Puesto que las condiciones de baja salinidad son difíciles de alcanzar en el ambiente marino, el proceso de germinación independiente de la salinidad, observado en el ambiente natural de las angiospermas marinas, se explica como un mecanismo de adaptación (Orth *et al.*, 2000; Hemminga y Duarte, 2000). Sin embargo, se ha descrito que otros factores, como bajas temperaturas o el enterramiento, podrían inducir la germinación de las semillas en su hábitat natural (Orth *et al.*, 2000). Así, en el caso de *Z. marina*, la germinación se produce después de que las semillas se introduzcan en el sedimento; posteriormente, las plántulas se desarrollan en la superficie del mismo, donde la luz promueve el crecimiento y la expansión de las hojas (Moore *et al.*, 1993).

En este sentido, el desarrollo posterior de las semillas germinadas depende fundamentalmente de la cantidad de luz que les llegue (Orth *et al.*, 2000). Así, se ha descrito que las plántulas de *Z. marina* necesitan en torno a 4 horas de luz, con una irradiancia superior a $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para desarrollarse adecuadamente (Bintz y Nixon, 2001). Dicha energía lumínica se invierte principalmente en el desarrollo de las hojas, mientras que las reservas de la semilla se usan para el crecimiento inicial de las raíces. El desarrollo de las hojas es determinante para la supervivencia posterior de la plántula, ya que las pérdidas de carbono por parte de la respiración celular, que proporciona la energía necesaria para el crecimiento, pueden resultar letales (Hemminga y Duarte, 2000).

El porcentaje de supervivencia de las plántulas de *Z. marina* en AMN (35 ‰ de salinidad) a 15 °C dependió de si la germinación fue inducida o, si por el contrario, se trataba de semillas germinadas espontáneamente en las condiciones de mantenimiento. En el primer caso, el valor obtenido (65 %) fue superior al descrito por Hootsmans *et al.* (1987) en las mismas condiciones (inducción de la germinación en baja salinidad y alta temperatura). Estos autores encontraron que la supervivencia de plántulas de *Z. marina* era altamente dependiente tanto de la salinidad del medio, como de la temperatura; así, las plántulas de *Z. marina* se desarrollaron mejor (32 – 40 % supervivencia) cultivadas en agua de mar comercial, con una salinidad del 20 ‰ y a 10 °C (Hootsmans *et al.*, 1987). Sin embargo, dichas plántulas no crecieron a la salinidad normal de su hábitat natural (30 ‰), al contrario que en los resultados expuestos en la presente memoria, donde las plántulas se adaptaron progresivamente a la salinidad del AMN (35 ‰), mostrando un porcentaje de supervivencia (10 %) que coincide con el descrito de manera general para las angiospermas marinas (Hemminga y Duarte, 2000). Por otra parte, un valor de supervivencia similar al observado en las semillas de *Z. marina* que germinaron espontáneamente (65 %), ha sido descrito en plántulas de *P. oceánica*, obtenidas por germinación *in vitro* de semillas en agua de mar artificial solidificada con agar (Balestri *et al.*, 1998).

La escasa supervivencia de las plántulas pone de manifiesto la importancia de la reproducción vegetativa para el mantenimiento de las praderas que forman estas plantas (Hemminga y Duarte, 2000). De hecho, se ha estimado que un clon de más de 1000 años de *Z. marina* ocupa, aproximadamente, una superficie de media hectárea en el Mar Báltico y contiene más de un millón de tallos (Reusch *et al.*, 1999). Sin embargo, aunque la tasa de supervivencia de las plántulas obtenidas por germinación *in vitro* de semillas es relativamente baja, dichas plántulas proporcionan un modelo excepcional para el estudio del transporte de nutrientes, sobretodo en el tejido radicular. Al tratarse de tejidos jóvenes que han sido cultivados en laboratorio, no manifiestan el deterioro de las plantas adultas recogidas en su ambiente natural.

IV.2. Transporte de NO_3^- , NH_4^+ y P_i en células de la epidermis radicular y del mesófilo foliar de *Z. marina*

El valor altamente negativo del E_m (Δ -150 mV) registrado en el plasmalema de las células de *Z. marina* se debe al funcionamiento de una H^+ -ATPasa como bomba primaria, la cual ha sido caracterizada a nivel molecular (Fukuhara *et al.*, 1996) y electrofisiológico (Fernández *et al.*, 1999) en células foliares. En comparación con plantas vasculares terrestres, la H^+ -ATPasa del plasmalema de *Z. marina* se caracteriza por su tolerancia a NaCl (500 mM NaCl), siendo incluso mayor que la descrita para otras halófitas (Muramatsu *et al.*, 2002). No obstante, presenta un pH óptimo (próximo a pH 6) y una sensibilidad al tratamiento con tripsina similares a lo observado en las H^+ -ATPasas de plantas vasculares terrestres (Muramatsu *et al.*, 2002). La H^+ -ATPasa de *Z. marina* se expresa mayoritariamente en las células epidérmicas de hojas maduras que, a diferencia de las más jóvenes, se encuentran en contacto directo con el medio marino (Fukuhara *et al.*, 1996). Dichas células epidérmicas poseen una morfología especial, típica de las células de transferencia, con una membrana altamente invaginada (Arai *et al.*, 1991; Pak *et al.*, 1995).

IV.2.1 Características eléctricas: permeabilidad de la membrana

Los valores medios de potencial de membrana observados en diferentes tipos celulares oscilan en torno a -150 mV, tanto en AMN como en AMA. A su vez, este valor es similar al observado en células de plantas adultas y en células de plántulas obtenidas por germinación *in vitro* de semillas. El E_m de las células de *Z. marina* es más negativo que el descrito para la mayoría de las algas marinas (Gutknecht y Dainty, 1968; Gradmann y Boyd, 1995), aunque es similar al observado en el alga verde *Acetabularia mediterranea* L. ($E_m = -170$ mV; Gradmann y Bentrup, 1970). Por otra parte, dicho valor es menos negativo que el observado en especies de agua dulce, como el alga *Chara corallina* Klein ex Willd ($E_m \Delta$ -230 mV; Mimura *et al.*, 1998) o la hepática *Riccia fluitans* L. ($E_m \Delta$ -230 mV; Felle, 1981). No obstante, el valor de E_m de las células de *Z. marina* es

similar al descrito típicamente para las plantas vasculares ($E_m \Delta -150$ mV; Maathuis y Sanders, 1999).

Por otra parte, la respuesta del potencial de membrana a la adición de CN⁻ y SHAM es, también, similar en los dos tipos celulares estudiados. Así, ambos inhibidores de la respiración despolarizan la membrana hasta un valor estable, denominado potencial de difusión, cuyo valor había sido descrito previamente en células del mesófilo foliar de *Z. marina* ($E_D = -64 \pm 11$ mV; Fernández *et al.*, 1999). Aunque el valor medio de E_D en las células epidérmicas de la raíz ($E_D = -72 \pm 11$ mV) es ligeramente más negativo que el de las células del mesófilo foliar, las diferencias entre ambos no son significativas. La magnitud de la despolarización del E_m causada por estos inhibidores de la respiración representa el componente metabólico o activo del E_m . El valor que se obtiene en las células de *Z. marina* es próximo a -90 mV, casi 30 mV más negativo que el valor del E_D . Así, la H⁺-ATPasa, descrita como bomba primaria en *Z. marina* (Fukuhara *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 1999), genera la mayor proporción del E_m medido.

El valor de E_D en las células de *Z. marina* es más negativo que el valor del potencial de Nernst para K⁺, definido por la ecuación 3 según la expresión:

$$E_{K^+}^N = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i} \quad (\text{ecuación 9})$$

donde R es la constante de los gases (8,31 J K⁻¹ mol⁻¹), T es la temperatura absoluta, z es la carga del ión (+1), F es la constante de Faraday (96,5 J mol⁻¹ mV⁻¹), y los subíndices “e”, “i” se refieren al exterior y al citoplasma celular, respectivamente.

Asumiendo una concentración externa de K⁺ ($[K^+]_e$) de 10 mM (Riley y Chester, 1971) y considerando una concentración citoplasmática ($[K^+]_i$) de 100 mM (Véry y Sentenac, 2003), el potencial de Nernst para K⁺ en las células de *Z. marina* sería de -59 mV. Así, el valor más negativo de E_D observado en *Z. marina*

(en torno a -70 mV) podría explicarse bien por la restricción a la entrada de Na^+ , presente en una concentración externa superior a la citoplasmática (500 mM frente a 10 mM) o por la salida de Cl^- desde el citoplasma, cuya asimetría de concentración entre el exterior e interior se considera 100 (Sanders, 1994).

En el caso de *R. fluitans*, una hepática de agua dulce, el valor de E_D (-111 mV) es muy próximo al valor de potencial de Nernst para K^+ (-116 mV), en presencia de una concentración externa de 1 mM K^+ y considerando una concentración citoplasmática de 100 mM K^+ (Felle, 1981). Sin embargo, el valor descrito de E_D en *Plantago maritima* L., una variedad capaz de crecer en presencia de 300 mM NaCl, es -80 mV (Maathuis y Prins, 1990), valor menos negativo que el potencial de Nernst para K^+ (-116 mV; considerando las mismas condiciones que en *R. fluitans*). En el caso de *P. maritima*, la permeabilidad relativa de Na^+ respecto a K^+ ($P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+}$) es de 0,58 (Maathuis y Prins, 1990), valor superior al descrito en *R. fluitans* (0,08; Felle, 1981). Así, el valor menos negativo del E_D que el potencial de Nernst para K^+ en *P. maritima* se explica porque en esta especie la entrada de Na^+ hacia el citoplasma debe ser mayor que en *R. fluitans*, según establece la comparación de los valores de permeabilidad a Na^+ de ambas especies.

En el caso de *Z. marina*, considerando un $E_m = -150$ mV, la entrada de Na^+ hacia el citoplasma se produce a favor de gradiente de potencial electroquímico, ya que la concentración externa de Na^+ (500 mM; Riley y Chester, 1971) es muy superior a la medida en el citoplasma de estas células (entre 10 y 20 mM, apartado III.5.3.3). Sin embargo, asumiendo los valores de permeabilidad relativa de Na^+ en las células epidérmicas de la raíz ($P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+} = 0,046$; apartado III.5.1) y en células del mesófilo foliar ($P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+} = 0,003$; Fernández *et al.*, 1999) el E_D medido en estas células de *Z. marina* se podría explicar por la asimetría de cargas generada por la salida de K^+ a favor de gradiente electroquímico y por la restricción a la entrada de Na^+ , generándose así, un exceso de carga negativa ($E_D \Delta -70$ mV) en el citoplasma superior al establecido para K^+ por la ecuación de Nernst ($E_{\text{K}^+}^N = -58$ mV).

Además de generar el E_m , la actividad de las H^+ -ATPasas, ubicuas en el plasmalema de las células vegetales, permite energizar el transporte de nutrientes en dichas células. Su actividad da lugar a un elevado gradiente de potencial electroquímico para los H^+ capaz de impulsar la entrada, en contra de gradiente, de diferentes nutrientes (Maathuis y Sanders, 1999).

Las medidas de E_m en células de *Z. marina* demuestran que la adición tanto de nutrientes aniónicos (NO_3^- y P_i) como catiónicos (NH_4^+) causa la rápida despolarización de la membrana en plantas incubadas en ausencia de dichos nutrientes (Figuras 20, 24, 28 y 32). En el caso de los nutrientes aniónicos, las despolarizaciones registradas indican que la entrada de NO_3^- y P_i está asociada a la entrada simultánea de carga positiva. Mientras que, en el caso de las despolarizaciones inducidas por la adición de NH_4^+ , éstas podrían deberse únicamente a la entrada del catión NH_4^+ .

Por otra parte, los estudios realizados en diferentes medios de ensayo muestran que las despolarizaciones causadas tanto por NO_3^- como por P_i sólo se observan cuando el medio de ensayo contiene Na^+ (Figuras 23 y 34). En el caso de NH_4^+ , por el contrario, las despolarizaciones se observan independientemente de la presencia de Na^+ en el medio (Figuras 27 y 31). Además, la magnitud de las despolarizaciones inducidas por NO_3^- ó NH_4^+ no aumenta a pH 6,5, con respecto a las observadas a pH 8 (Figuras 22, 26 y 30). Por tanto, la carga positiva responsable de las despolarizaciones causadas tras la adición de NO_3^- ó P_i parece ser Na^+ , en vez de H^+ . Así, el elevado gradiente de potencial electroquímico que impulsa la entrada de Na^+ a través del plasmalema de *Z. marina* permitiría el transporte asociado de NO_3^- o P_i .

IV.2.2 Cinéticas de transporte

Las despolarizaciones inducidas por concentraciones micromolares de NO_3^- , NH_4^+ ó P_i se saturaron con respecto a la concentración de cada nutriente (Figuras 21, 25, 29 y 33). Así, el ajuste de los valores de las despolarizaciones

observadas al modelo de saturación de Michaelis-Menten permitió el cálculo de la constante de semisaturación (K_m) y el valor de despolarización máxima (D_{max}), considerada un estimador de la velocidad máxima (V_{max}) del transporte (Glass *et al.*, 1992).

En la Tabla 5 se muestran los parámetros cinéticos del transporte de cada ión estudiado, así como el cociente entre la D_{max} y el valor de K_m , considerado como una estimación de la eficiencia de cada transportador, es decir de la relación V_{max} / K_m (Raven, 1984). Los valores de K_m obtenidos indican que todos los sistemas de transporte se corresponden con sistemas de alta afinidad (Grossman y Takahashi, 2001).

Según se indica, el transporte de NO_3^- en células del mesófilo foliar de *Z. marina* se había caracterizado previamente por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente memoria (García-Sánchez *et al.*, 2000). Así, se determinó que el transporte de NO_3^- en células del mesófilo foliar se producía a través de un sistema de alta afinidad dependiente de Na^+ , el cual se considera ión motriz, con una estequiometría teórica propuesta de $2\text{Na}^+ : 1\text{NO}_3^-$ (García-Sánchez *et al.*, 2000).

En el caso de las células epidérmicas de la raíz, los resultados obtenidos muestran que el transporte de NO_3^- es también de alta afinidad, aunque el valor de K_m es superior al descrito en hojas (García-Sánchez *et al.*, 2000). Por otra parte, todas las despolarizaciones inducidas por la adición de concentraciones micromolares de NO_3^- (0,1 – 100 μM NaNO_3) en el plasmalema de células epidérmicas de la raíz fueron inferiores a 10 mV (Figura 20), mientras que en células del mesófilo foliar las despolarizaciones inducidas por el mismo rango de concentraciones de NO_3^- fueron mayores (García-Sánchez *et al.*, 2000). La diferencia en el valor de D_{max} (Tabla 5) sugiere que el número de transportadores para NO_3^- podría ser menor en células epidérmicas de raíz que en células del mesófilo foliar. Además, la eficiencia del transporte de NO_3^- estimada en raíces sería menor que la estimada en las hojas (Tabla 5)

Tabla 5. Valores de K_m (μM) y D_{max} (mV) del transporte de NO_3^- , NH_4^+ y P_i en células epidérmicas de la raíz y del mesófilo foliar de *Z. marina*.

		NO_3^-	NH_4^+	P_i
Raíz	K_m	$8,89 \pm 3,9 \mu\text{M}$	$11,2 \pm 1,9 \mu\text{M}$	$1,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$
	D_{max}	$7,01 \pm 0,8 \text{ mV}$	$30,6 \pm 1,2 \text{ mV}$	$7,8 \pm 0,8 \text{ mV}$
	D_{max}/K_m	$0,78 \text{ mV } \mu\text{M}^{-1}$	$2,7 \text{ mV } \mu\text{M}^{-1}$	$5,2 \text{ mV } \mu\text{M}^{-1}$
Hoja	K_m	$2,31 \pm 0,78 \mu\text{M}$ <small>(García-Sánchez <i>et al.</i>, 2000)</small>	$2,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$	
			$20,3 \pm 7,1 \mu\text{M}$	
	D_{max}	$15,6 \pm 0,9 \text{ mV}$ <small>(García-Sánchez <i>et al.</i>, 2000)</small>	$23,2 \pm 3,5 \text{ mV}$	
			$108 \pm 8 \text{ mV}$	
	D_{max}/K_m	$6,75 \text{ mV } \mu\text{M}^{-1}$	$11,05 \text{ mV } \mu\text{M}^{-1}$	
			$5,3 \text{ mV } \mu\text{M}^{-1}$	

Los valores de K_m descritos para el transporte de NO_3^- en hojas de *Z. marina* y otras angiospermas marinas (obtenidos por experimentos de incorporación principalmente) oscilan entre $23 \mu\text{M NO}_3^-$ en *Z. marina* (Iizumi y Hattori, 1982); $4,4 - 17 \mu\text{M NO}_3^-$ en *Phyllospadix torreyi* S. Watson (Terrados y Williams, 1997) y $2,2 - 38,5 \mu\text{M NO}_3^-$ en *Thalassia testudinum* Banks ex König (Lee y Dunton, 1999). La ausencia de valores de K_m para el transporte de NO_3^- en tejido radicular en la literatura, se explica porque la mayoría de los autores asumen que la incorporación de NO_3^- se realiza a través de las hojas, ya que la concentración de NO_3^- en la columna de agua es superior a la del sedimento, donde la forma mayoritaria de N es NH_4^+ (Touchette y Burkholder, 2000).

Una compilación de datos referidos al hábitat de las angiospermas marinas muestra que la concentración de NO_3^- en la columna de agua suele ser $2,7 \mu\text{M}$ (Hemminga, 1998). A su vez, en el agua intersticial del sedimento donde se anclan los rizomas, el valor medio de concentración de NO_3^- se considera $3,4 \mu\text{M}$ (Hemminga, 1998; Hemminga y Duarte, 2000). Por otra parte, estudios ecológicos demuestran que el crecimiento de *Z. marina*, en contra de lo observado en otras angiospermas marinas (Lee y Dunton, 1999), se inhibe cuando el medio se enriquece en NO_3^- (de $3,5 - 7 \mu\text{M NO}_3^-$; Touchette y Burkholder, 2000). Sin embargo, si la fuente de NO_3^- es el sedimento, se produce el efecto contrario, es decir, se estimula el crecimiento de *Z. marina* (Touchette y Burkholder, 2000), lo que también se ha comprobado en esta misma especie cuando se ha enriquecido el sedimento en N en condiciones controladas (Peralta *et al.*, 2003).

Si se observan los valores de K_m para NO_3^- en células foliares y radiculares (Tabla 5), el efecto inhibitorio causado por el incremento de la concentración de NO_3^- podría explicarse en términos de adaptación a las condiciones del ambiente marino. *Z. marina* es una angiosperma que procede de la evolución de plantas terrestres que colonizaron el hábitat marino. Así, las concentraciones de NO_3^- que parecen inhibir el crecimiento de *Z. marina* son próximas al valor de K_m descrito para hojas; sin embargo, son inferiores al valor de K_m observado en células radiculares (Tabla 5). De esta forma, el valor de alta afinidad, así como la mayor eficiencia estimada para el transporte de NO_3^- en células del mesófilo foliar de *Z. marina*, podrían considerarse características adecuadas para evolucionar en un medio diluido, pobre en N, como el agua de mar.

En cuanto a lo descrito en raíces de plantas terrestres, Ullrich y Novacky (1990) demostraron que la adición de NO_3^- causaba una rápida despolarización del E_m en pelos radiculares de *Limnium stoloniferum* (G. Mey) Griseb. Al igual que en *Z. marina*, la despolarización es transitoria, recuperándose el valor inicial de E_m . Por otra parte, la adición de NO_3^- tuvo el mismo efecto en células de la raíz de plántulas de maíz (*Zea mays* L.; McClure *et al.*, 1990) y en células de cebada (*Hordeum vulgare* L.; Glass *et al.*, 1992). La magnitud de las despolarizaciones

inducidas por NO_3^- es similar en células epidérmicas de la raíz de *Z. marina* y maíz (McClure *et al.*, 1990), siendo inferior a la observada en cebada (Glass *et al.*, 1992). En cebada, las despolarizaciones en un rango de 10 – 400 $\mu\text{M NO}_3^-$ también se saturaron respecto a la concentración de NO_3^- , siendo $D_{\text{max}} = 38 \text{ mV}$ y el valor de $K_m = 60 \mu\text{M NO}_3^-$. Sin embargo, estas despolarizaciones sólo se observaron tras un pretratamiento con 100 $\mu\text{M NO}_3^-$ durante 18 horas (Glass *et al.*, 1992).

Por otra parte, los valores de K_m tanto en hojas como en raíz de *Z. marina* son muy pequeños, pertenecen al rango descrito en algas marinas (2-13 $\mu\text{M NO}_3^-$; DeBoer, 1985) pero son inferiores a los valores descritos en angiospermas terrestres, donde los valores de K_m se sitúan en el rango 6-20 $\mu\text{M NO}_3^-$ (Crawford y Glass, 1998). Así mismo, en el caso de plantas vasculares se han definido dos sistemas de transporte de alta afinidad de NO_3^- : uno inducible por NO_3^- y otro constitutivo (Glass *et al.*, 2002). En cuanto a lo observado en *Z. marina*, las despolarizaciones inducidas por NO_3^- sólo se producen en plantas incubadas durante al menos 3 días en ausencia de N, sin que se detectase inducción del transporte por pretratamiento con NO_3^- . Por tanto, en esta especie parece que el transportador de NO_3^- aumentaría su expresión en respuesta a deficiencia de N, y no sería inducible por este nutriente.

Los parámetros cinéticos estimados para el transporte de NH_4^+ en células de la epidermis radicular (Tabla 5) se corresponden con la mayor eficiencia descrita para el transporte de esta forma de N frente a la de NO_3^- (Touchette y Burkholder, 2000) Así mismo, la eficiencia del transporte en células del mesófilo foliar es superior a la estimada en células radiculares (Tabla 5). Resultados que coinciden con trabajos clásicos, en los que se determinó la incorporación de NO_3^- y NH_4^+ en raíces y hojas de *Z. marina* y otras angiospermas marinas (Short y McRoy, 1984; Hemminga *et al.*, 1994; Terrados y Williams, 1997). Así, en *Amphibolis antarctica* Sonder y Ascherson la eficiencia del transporte de NH_4^+ es 3 veces mayor en hojas que en raíces (Pedersen *et al.*, 1997). En *T. testudinum* la eficiencia del transporte de NH_4^+ es 10 veces mayor en hojas que en raíces y,

además, la eficiencia del transporte de NH_4^+ duplica a la observada para NO_3^- en hojas (Lee y Dunton, 1999). Por otra parte, en *P. torreyi* la incorporación de NH_4^+ en hojas es superior a la de NO_3^- (Terrados y Williams, 1997), al igual que había sido previamente sugerido en el caso de *Z. marina* (Short y McRoy, 1984). Sin embargo, puesto que los valores de K_m son similares para NH_4^+ y NO_3^- en células de la epidermis radicular y del mesófilo foliar de *Z. marina*, para un rango de concentraciones de NH_4^+ de $0,01 - 10 \mu\text{M NH}_4^+$ (Tabla 5), las diferencias observadas en la eficiencia del transporte de ambos nutrientes se basarían en la velocidad del transporte.

Al igual que en el caso del transporte de NO_3^- , los valores de K_m para NH_4^+ corresponden a valores de alta afinidad (Grossman y Takahashi, 2001). Con respecto a los valores de K_m de otras angiospermas marinas (obtenidos en experimentos de incorporación), los valores observados en células radiculares de *Z. marina* son similares a los descritos en raíz de *Ruppia maritima* L. ($K_m \Delta 2,8 - 12,6 \mu\text{M NH}_4^+$; Thursby y Harlin, 1984), superiores a los encontrados en *A. antarctica* ($K_m = 4,7 \mu\text{M NH}_4^+$; Pedersen *et al.*, 1997) e inferiores a los observados en *T. testudinum* ($K_m > 34 \mu\text{M NH}_4^+$; Lee y Dunton, 1999).

Por otra parte, en tejido foliar, las despolarizaciones inducidas por concentraciones micromolares de NH_4^+ mostraron dos rangos de saturación diferentes (Figura 25). En el primer rango, la saturación ocurre entre $5 - 10 \mu\text{M NH}_4^+$, con un valor de $K_m = 2,1 \pm 1,1 \mu\text{M NH}_4^+$. Por otra parte, entre 50 y $500 \mu\text{M NH}_4^+$ se produce una nueva saturación de las despolarizaciones, con un valor asociado de $K_m = 20,3 \pm 3,5 \mu\text{M NH}_4^+$. El primer rango de saturación podría corresponder con lo que realmente ocurre en el hábitat natural de *Z. marina*, donde las concentraciones de NH_4^+ en el agua son del orden de $3 \mu\text{M NH}_4^+$ (Hemminga y Duarte, 2000). El segundo rango de saturación podría deberse a la reabsorción de NH_4^+ desde el apoplasto. Según se ha descrito, el NH_4^+ sufre un ciclo fútil a través del plasmalema que da lugar a la salida de más de un 80% del NH_4^+ incorporado en el caso de raíces de cebada (Britto *et al.*, 2001). Así, puede que en las células del mesófilo foliar de *Z. marina* la salida de NH_4^+ incremente

localmente su concentración en el apoplasto, pudiendo ser reabsorbido con menor afinidad. Salvo en *R. maritima*, en otras angiospermas marinas no han sido descritos valores tan bajos de K_m como el observado en el primer rango de saturación (Touchette y Burkholder, 2000). No obstante, sí se muestran valores de K_m en torno a $20 \mu\text{M NH}_4^+$ (valor similar al segundo rango de saturación observado en *Z. marina*) en hojas de angiospermas marinas tales como *A. antarctica* ($K_m = 9,5 - 74,3 \mu\text{M NH}_4^+$; Pedersen *et al.*, 1997) ó *P. torreyi* ($K_m = 9,3 - 33,9 \mu\text{M NH}_4^+$; Terrados y Williams, 1997).

En el caso de plantas terrestres, Wang *et al.* (1994) realizaron la caracterización electrofisiológica del transporte de NH_4^+ en raíces de arroz (*Oryza sativa* L.). Estos autores también determinaron que las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ se saturaban con respecto a la concentración añadida, en un rango $2 - 1000 \mu\text{M NH}_4^+$ (Wang *et al.*, 1994). Dicha saturación se observó tanto en plántulas crecidas en presencia de $2 \mu\text{M NH}_4^+$, como en presencia de $100 \mu\text{M NH}_4^+$. Aunque las despolarizaciones máximas (D_{max}) fueron inferiores en el segundo tratamiento ($34,3 \text{ mV}$ frente a 50 mV ; Wang *et al.*, 1994), los valores de K_m resultaron parecidos entre sí ($21,8 \mu\text{M NH}_4^+$ y $35 \mu\text{M NH}_4^+$, respectivamente; Wang *et al.*; 1994). Dichos valores son similares a los descritos en *Lemna gibba* L. (Ullrich *et al.*, 1984) o en raíces de abeto (Kronzucker *et al.*, 1996). Por otra parte, en *Arabidopsis thaliana* L., los valores de K_m para el transporte de NH_4^+ de alta afinidad se sitúan en un rango próximo al observado en raíces y hojas de *Z. marina* ($K_m = 8 - 24 \mu\text{M NH}_4^+$; Howitt y Udvardi, 2000). En comparación con los valores de arroz, las despolarizaciones inducidas por concentraciones similares de NH_4^+ son del mismo orden de magnitud en las células epidérmicas de la raíz de ambas especies, aunque el valor de K_m es más pequeño en *Z. marina*, lo cual sugiere una mayor eficiencia del transporte de esta planta que en arroz.

Del mismo modo que lo observado en el caso del NO_3^- , las despolarizaciones inducidas por la adición de concentraciones micromolares de P_i nunca superaron los 10 mV (Figura 32), siendo el valor de D_{max} similar al obtenido para NO_3^- (Tabla 5). Además, las despolarizaciones inducidas por P_i sólo

fueron observadas en células epidérmicas de la raíz, lo cual sugiere una mayor importancia de las raíces frente a las hojas para el transporte de este nutriente. La D_{\max} inducida por P_i es inferior a los valores registrados en pelos radiculares de *L. stoloniferum* o en células foliares de *L. gibba*, donde las despolarizaciones inducidas por P_i rondan los 60 mV (Ullrich y Novacky, 1990; Ullrich–Eberius *et al.*, 1981). Sin embargo, las concentraciones de P_i utilizadas en los experimentos con *L. stoloniferum* fueron de orden milimolar (1 – 1,8 mM P_i ; Ullrich y Novacky, 1990). Así mismo, el rango de saturación de las despolarizaciones en *L. gibba*, el cual se sitúa entre 50 y 100 μM P_i (Ullrich–Eberius *et al.*, 1981), también es superior al observado en células de la epidermis radicular de *Z. marina*, en las que la saturación de las despolarizaciones se detectó a partir de 10 μM P_i (Figura 33). Además, la adición de concentraciones superiores de P_i (1 mM) no produjo mayores despolarizaciones en células de *Z. marina* (resultados no mostrados). Así, las bajas concentraciones de P_i a las que se satura el transporte podrían ser, una vez más, el reflejo de la adaptación de esta planta al medio marino, donde las concentraciones de P_i suelen ser inferiores a 10 μM (Riley y Chester, 1971).

El valor de K_m obtenido para el transporte de P_i en células de la raíz de *Z. marina* es extraordinariamente pequeño, siendo el menor de los obtenidos para los diferentes nutrientes estudiados (Tabla 5), lo cual indica que la afinidad del transportador de P_i es superior a la de los transportadores de NO_3^- y NH_4^+ . Así, a pesar de que el valor de D_{\max} es del mismo orden que el observado en el transporte de NO_3^- , la eficiencia estimada para el transporte de P_i en células radiculares es superior a la de NO_3^- e incluso mayor que la de NH_4^+ (Tabla 5). En el caso de hojas, en otras angiospermas marinas, como *Thalassia hemprichii* Ascherson, se ha descrito que la eficiencia del transporte de P_i en hojas es casi 5 veces inferior a la de NH_4^+ (Stapel *et al.*, 1996). Sin embargo, la eficiencia del transporte de P_i es comparable a la descrita para NO_3^- en estas especies (Touchette y Burcholder, 2000).

El valor de K_m para P_i en raíz de *Z. marina* pertenece al rango establecido para los transportadores de alta afinidad de P_i en plantas vasculares ($K_m \Delta 10 \mu\text{MP}_i$;

Rae *et al.*, 2003). Dicho valor es incluso inferior al descrito para *L. gibba* ($K_m = 7,3 \mu\text{M P}_i$; Ullirch–Eberius *et al.*, 1981), al determinado en cultivos celulares de *Catharanthus roseus* ($K_m = 2 - 5 \mu\text{M P}_i$; Schmidt *et al.*, 1992) o al descrito en cultivos celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) que expresan un gen del transportador *PTH1* de *Arabidopsis* ($K_m = 3,1 \mu\text{M P}_i$; Mitsukawa *et al.*, 1997). Sin embargo, la K_m para el P_i en raíces de *Z. marina* es próxima al valor descrito en especies de hongos que forman micorrizas, como *Gigaspora margarita* Becker y Hall ($K_m = 1,8 - 3,1 \mu\text{M P}_i$; Thomson *et al.*, 1990) o a la descrita en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard ($K_m = 0,1 - 0,5 \mu\text{M P}_i$; Shimogawara *et al.*, 1999). Con respecto a otras angiospermas marinas, este valor de K_m es inferior al descrito en *Z. noltii* ($K_m = 10 \mu\text{M P}_i$; Pérez-Lloréns y Niell, 1995) o en *T. hemprichii* ($K_m = 7 - 15 \mu\text{M P}_i$; Stapel *et al.*, 1996); ambos valores obtenidos en experimentos de incorporación.

A pesar de que el agua intersticial del sedimento se considera generalmente la fuente principal de nutrientes para las angiospermas marinas (McRoy y McMillan, 1977; Marschner, 1995; Pérez-Lloréns y Niell, 1995), la incorporación de P_i o N (en forma de NO_3^- y/o NH_4^+) a través de las raíces puede verse limitada por la menor capacidad de difusión de estos nutrientes en el sedimento. Así, las raíces no pueden soportar todo el requerimiento nutricional de la planta (Touchette y Burkholder, 2000). Sin embargo, la presencia de mecanismos de transporte de alta afinidad en tejido radicular no puede ser obviada y su contribución a la nutrición general de las angiospermas marinas tampoco, sobretodo en situaciones en las que la concentración de nutrientes en la columna de agua es menor que la presente en el sedimento (Touchette y Burckholder, 2000). De hecho, en *Z. marina* se ha observado un aumento de la biomasa de las raíces en relación con la de hojas en sedimentos pobres en N, contribuyendo a un aumento de la superficie de absorción de las raíces (Peralta *et al.*, 2003). Así mismo, otra situación donde la incorporación de nutrientes a través de la raíz puede ser crucial es en oscuridad, debido a la disminución del transporte en los tejidos foliares, según ha sido descrito para la incorporación de P_i en hojas de *Z. marina* y *Z. noltii* (Hemminga y Duarte, 2000). Por otra parte, la concentración

media de P_i observada en la columna de agua suele ser inferior a la del agua intersticial en el hábitat de las angiospermas marinas, siendo los valores medios $0,35 \mu\text{M } P_i$ y $12 \mu\text{M } P_i$, respectivamente (Hemminga, 1998). Así, la elevada afinidad para el transporte de P_i en células de la epidermis radicular de *Z. marina*, sugiere la importancia de las raíces en el proceso de incorporación de este nutriente por la planta. En este sentido, trabajos clásicos subrayan que los principales órganos involucrados en la incorporación de P_i son las raíces. Una vez incorporado, dicho nutriente es transportado hacia las hojas pudiendo ser liberado a la columna de agua por excreción directa o por descomposición de tejidos senescentes, sobretodo en condiciones de baja salinidad (McRoy *et al.*, 1972; Hill, 1979; Pérez-Lloréns y Niell, 1993).

Aunque hay que tener en cuenta que los experimentos de incorporación de NO_3^- y P_i por las raíces se realizaron en AMA y que por tanto las tasas netas de incorporación en el sustrato real, el sedimento, podrían ser distintas, en el caso de *Z. marina*, las tasas netas de incorporación de NO_3^- y P_i estimadas son mayores en raíces que en hojas; así las tasas de incorporación de NO_3^- por la raíz (Tabla 2) son casi 7 veces superiores a las descritas en hojas (García-Sánchez *et al.*, 2000), poniendo de manifiesto la elevada capacidad de incorporación de N de este tejido, descrita previamente en *Z. marina* (Iizumi y Hattori, 1982; Short y McRoy, 1984; Peralta *et al.*, 2003). Por otra parte, en el caso de P_i , las tasas de incorporación observadas en las raíces son casi del triple en raíces que en hojas (Tabla 3), sugiriendo un comportamiento similar para la incorporación de P_i que el descrito para NO_3^- ; de hecho, en *Z. noltii* se ha observado que, tanto las tasas de incorporación, como el contenido total de P_i , son mayores en las plantas enraizadas en el sedimento que en hojas separadas de la raíz (Pérez-Lloréns y Niell, 1995).

A modo de resumen, los resultados del estudio del transporte de NO_3^- , NH_4^+ y P_i en raíces y hojas de *Z. marina* indican que ambos tejidos incorporan dichos nutrientes a través de sistemas de transporte de alta afinidad. La relación D_{max} / K_m , referida a la eficiencia del transporte, muestra que las hojas son más

eficientes que las raíces para transportar NO_3^- ó NH_4^+ , siendo la eficiencia del transporte de NH_4^+ superior a la de NO_3^- (Tabla 5). Así mismo, la eficiencia del transporte de P_i en raíz es comparable a la obtenida para NO_3^- o NH_4^+ en células foliares (Tabla 5).

IV.2.3 Mecanismos de transporte

Los trabajos realizados en plantas sobre el transporte de NO_3^- coinciden en que las despolarizaciones inducidas por este nutriente se explican por la entrada asociada de H^+ , con una estequiometría $\text{H}^+:\text{NO}_3^-$ mayor de 1 para los H^+ (Ullrich y Novacky, 1990; McClure *et al.*, 1990; Glass *et al.*, 1992). Así, se considera que el transporte activo de NO_3^- estaría energizado por el gradiente de potencial electroquímico para H^+ (Mistrik y Ullrich, 1996).

Por otra parte, el mecanismo que explica el transporte de NH_4^+ de alta afinidad todavía no ha sido aclarado suficientemente en la bibliografía. Trabajos realizados en arroz sugieren dos posibilidades: (1) que la incorporación activa de NH_4^+ se produce a través de una ATPasa específica de NH_4^+ que aún no ha sido descrita; (2) que la incorporación de NH_4^+ ocurre a través de un sistema de cotransporte con H^+ , impulsado por la fuerza H^+ -motriz (Wang *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994). Otros autores sugieren una vía de relación indirecta entre el transporte de NH_4^+ y el gradiente eléctrico para los H^+ , proponiendo que la entrada de NH_4^+ se produce a través de un mecanismo de uniporte en respuesta al gradiente eléctrico generado por la H^+ -ATPasa de plasmalema (Ullrich *et al.*, 1984). Sin que todavía se haya determinado, si existe, la relación entre el transporte de NH_4^+ y la fuerza H^+ -motriz, el transportador de alta afinidad de NH_4^+ (*AtAMT1;1*) identificado en *Arabidopsis* ha sido descrito como un uniporte de NH_4^+ (Howitt y Udvardi, 2000).

En cuanto al P_i , también se considera que su transporte al interior celular en plantas vasculares se produce a través de un mecanismo de simporte con H^+ (Mimura, 1995; Mimura, 2001; Rausch y Bucher, 2002; Smith *et al.*, 2003). Así,

las despolarizaciones descritas en *L. gibba* por Ullrich-Eberius *et al.* (1981) son atribuidas a la entrada simultánea de P_i y H^+ con una estequiometría de cargas favorable a los H^+ . Además, también se ha detectado simultáneamente a la entrada de P_i una acidificación del citoplasma en células de diversas especies como *C. roseus*, *L. stoloniferum* o cebada (Sakano, 1990; Ullrich y Novacky, 1990; Sakano *et al.*, 1992; Mimura *et al.*, 1992). Finalmente, la expresión heteróloga de diferentes genes que codifican para transportadores de P_i ha demostrado la inhibición de la incorporación de P_i en las células que expresan dichos genes tras la adición de protonóforos (Mitsukawa *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998).

Como alternativa al transporte impulsado por el gradiente electroquímico para H^+ , se ha demostrado la existencia de diversos transportadores dependientes de Na^+ en hongos, cianobacterias y algas. Así, por ejemplo, en algunas diatomeas marinas se ha observado el transporte de glucosa, aminoácidos y NO_3^- asociado a Na^+ (Hellebust, 1978; Ress *et al.*, 1980). El transporte de NO_3^- dependiente de Na^+ también ha sido descrito en cianobacterias (Lara *et al.*, 1993). Por otra parte, se han descrito genes que codifican transportadores de P_i dependientes de Na^+ en varias especies de hongos (Versaw y Metzenberg, 1995; Martínez y Persson, 1998; Zvyagilskaya *et al.*, 2001). Así mismo, en el alga verde *Ankistrodesmus braunii* Brunthaler (Ullrich y Glasser, 1982) y otras (Raven, 1984) se ha comprobado que la incorporación de P_i es dependiente de Na^+ . Más recientemente, se ha caracterizado un transportador de P_i de alta afinidad asociado a Na^+ , con una estequiometría aproximada de 6 $Na^+ : 1P_i$, en el alga *C. corallina* (Reid *et al.*, 2000).

Sin embargo, el primer sistema de transporte dependiente de Na^+ descrito en plantas vasculares fue, precisamente, en *Z. marina*. Como ya se ha indicado, el transporte de NO_3^- en células del mesófilo foliar de *Z. marina* se realiza a través de un sistema de transporte de alta afinidad dependiente de Na^+ (García-Sánchez *et al.*, 2000). A su vez, los resultados mostrados en esta memoria indican que este tipo de transportadores, dependientes de Na^+ , son los responsables del transporte de alta afinidad de NO_3^- también en las raíces, así como de P_i en raíces y hojas.

Son varias las evidencias que permiten suponer que *Z. marina* usa el elevado gradiente de potencial electroquímico para Na^+ , que lo empuja hacia el citoplasma, para impulsar el transporte activo de estos dos nutrientes. En primer lugar, las despolarizaciones inducidas, tanto por NO_3^- como por P_i , sólo se observan en medios que contienen Na^+ (Figuras 23 y 34). Además, la actividad citoplasmática de Na^+ aumenta al mismo tiempo que se produce la despolarización inducida por NO_3^- o P_i en células epidérmicas de la raíz (Figura 45). Finalmente, las tasas netas de incorporación de ambos nutrientes se reducen drásticamente en medios carentes de Na^+ con respecto a las tasas observadas en medios con una concentración de Na^+ similar a la del agua de mar (Figuras 35 y 36).

En el caso de los transportadores que usan H^+ como ión motriz, en presencia de un pH ácido se incrementa el gradiente de potencial electroquímico para los H^+ , lo que implicaría un mayor transporte a pH ácidos que a básicos. Así, por ejemplo, ha sido descrita que la alcalinización del medio inhibe el transporte de NO_3^- en hojas de *L. gibba* (Ullrich-Eberius *et al.*, 1981) o en raíces de maíz (McClure *et al.*, 1990), donde se asume que el transporte de NO_3^- es impulsado por H^+ . Sin embargo, los resultados de este tipo de experimentos no son determinantes, ya que el pH puede tener un efecto *per se* sobre los transportadores. Así, por ejemplo, se ha descrito la inhibición completa del transporte de NH_4^+ en raíces de arroz cuando el pH del medio es inferior a 4,5; mientras que dicho transporte no fue afectado por los cambios de pH en el rango de 4,5 hasta 9 (Wang *et al.*, 1993; Howitt y Udvardi, 2000).

En el caso de *Z. marina* no se observó que las despolarizaciones inducidas por NO_3^- o NH_4^+ fuesen mayores en medios con pH ácido (pH = 6,5; Figuras 22, 24 y 30), lo cual está de acuerdo con otras evidencias que indican que los H^+ no son usados como ión motriz para impulsar el transporte de dichos nutrientes en esta especie. Además, puesto que siempre se obtuvieron despolarizaciones menores a pH 6,5 que a pH 8, parece ser que el pH tendría un efecto directo sobre el transportador de NO_3^- y el de NH_4^+ , o sobre la conductancia de la membrana.

Este efecto también ha sido documentado para el transportador de NO_3^- descrito en células del mesófilo foliar de *Z. marina* (García-Sánchez *et al.*, 2000).

En este sentido, la presencia de transportadores dependientes de Na^+ en *Z. marina* podría explicarse como un mecanismo de adaptación a un medio alcalino y de alta concentración de Na^+ como el agua de mar, donde el gradiente de potencial electroquímico que impulsa la entrada de Na^+ hacia el interior celular es superior al que impulsa a los H^+ . El incremento de energía libre ($\Delta G'$) asociado a la entrada de un anión (A) acompañado de n cationes C^+ (H^+ o Na^+) a través de un transportador localizado en la membrana plasmática se calcula a partir de la ecuación 10:

$$-\Delta G' = F(n + z_A)E_m + 59F \log \frac{[\text{C}^+]_c^n [\text{A}^-]_c}{[\text{C}^+]_e^n [\text{A}^-]_e} \quad (\text{ecuación 10})$$

donde $\Delta G'$ es el incremento de energía libre de Gibbs (J mol^{-1}), F es la constante de Faraday ($96,5 \text{ J mol}^{-1} \text{ mV}^{-1}$), z_A se refiere a la carga del anión transportado, y los subíndices “c” y “e” se refieren a la concentración citoplasmática y externa del catión (C^+) o del anión (A^-), respectivamente.

La concentración citoplasmática de NO_3^- se considera menor de 1 mM en plantas acuáticas (Raven, 1984). Por otra parte, medidas más rigurosas usando microelectrodos selectivos para NO_3^- en células epidérmicas de la raíz de cebada muestran una concentración de NO_3^- entre 3 y 5 mM (Walker *et al.*, 1995; van der Leij *et al.*, 1998). Así, la concentración citoplasmática de NO_3^- puede considerarse en torno a 3 mM NO_3^- . El valor de pH medido con microelectrodos de pH en el citoplasma de células del mesófilo foliar (Fernández *et al.*, 1999) y de la epidermis radicular es de 7,3; este valor coincide con el descrito típicamente para el citoplasma de las células vegetales (Felle y Bertl, 1986). El valor medio de la actividad citoplasmática de Na^+ , determinada con microelectrodos de Na^+ en células de la raíz y la hoja de *Z. marina*, es de $10,7 \pm 3,3 \text{ mM Na}^+$ y $16,2 \pm 8 \text{ mM Na}^+$, respectivamente. Estos valores pertenecen al rango de concentraciones descrito en plantas marinas (1- 50 mM Na^+ ; Raven, 1984), siendo próximos a los

valores medidos con microelectrodos de Na^+ en una variedad de cebada tolerante a salinidad (2 – 28 mM Na^+ ; Carden *et al.*, 2003).

Los cálculos del incremento de energía libre para el transporte de $50 \mu\text{M}$ NO_3^- (concentración saturante para el transporte de NO_3^-) muestran que el transporte asociado a Na^+ es más favorable que el asociado a H^+ para una misma estequiometría $\text{Na}^+:\text{NO}_3^-$ o $\text{H}^+:\text{NO}_3^-$ en las células de *Z. marina* (Figura 51). Los cálculos se han realizado asumiendo un E_m de -150 mV (valor medio de E_m en esta especie) y, según se ha considerado anteriormente, una concentración citoplasmática de NO_3^- de 3 mM, un valor de pH citoplasmático de 7,3 y una concentración citoplasmática de Na^+ de 10 mM. Así mismo, los valores de concentración de Na^+ y pH externos considerados corresponden con los descritos para el agua de mar (pH 8 y 500 mM Na^+ ; Riley y Chester, 1971).

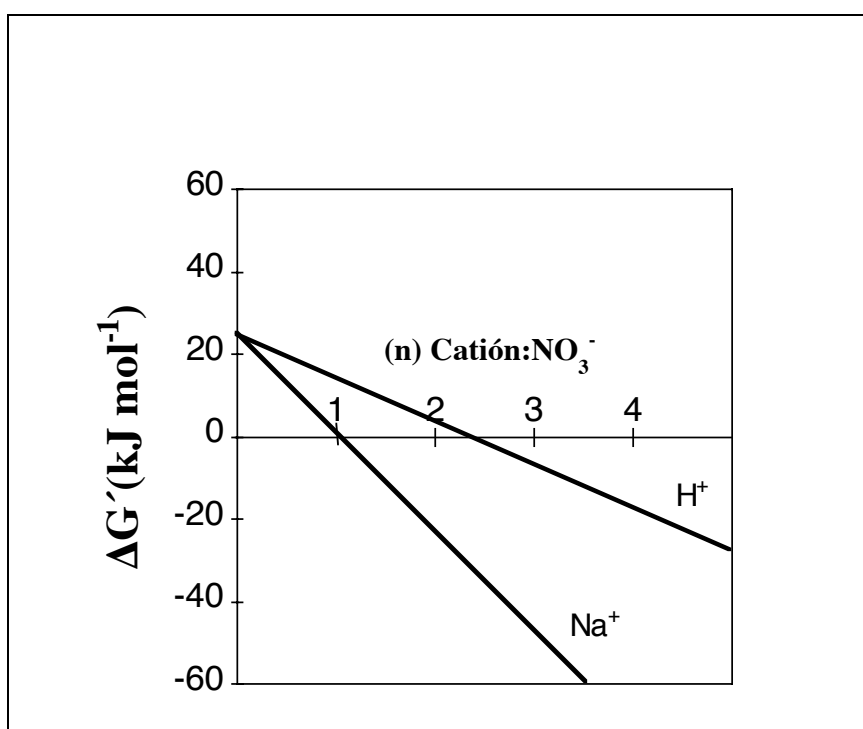


Figura 51. Incremento de energía libre asociada al transporte de NO_3^- . Los valores ($\Delta G'$) se expresan en kJ mol^{-1} . Los cálculos de la estequiometría (n) del transporte de NO_3^- impulsado por los cationes H^+ o Na^+ se realizaron a partir de la ecuación 10, usando los valores discutidos en el texto.

Según se muestra, el incremento de energía libre asociada a una estequiometría de $2\text{Na}^+:\text{NO}_3^-$ es suficiente para que el transporte sea posible

($\Delta G' = -19 \text{ kJ mol}^{-1}$), mientras que se necesita una estequiometría superior a $4\text{H}^+:\text{NO}_3^-$ para obtener un valor similar de $\Delta G'$ (Figura 51).

Del mismo modo, los cálculos de la energía asociada al transporte de P_i también muestran que el transporte asociado a Na^+ es más favorable energéticamente que el asociado a H^+ para una misma estequiometría (Figura 52). La concentración de P_i en el citoplasma de las plantas acuáticas se considera en el rango 1-10 mM (Raven, 1984), así mismo, en plantas terrestres se han descrito valores entre 5 y 10 mM P_i (Mimura, 2001). Los cálculos del incremento de la energía libre asociado al transporte de P_i en células de *Z. marina* se han realizado asumiendo una concentración citoplasmática de 10 mM P_i , y considerando, que al pH citoplasmático (7,3) las formas mayoritarias de P_i son H_2PO_4^- (44% P_i) y HPO_4^{2-} (56 % P_i). Por otra parte, la concentración externa de P_i utilizada en los cálculos fue 10 μM P_i (concentración saturante del transporte de P_i ; Figura 33). Así, considerando el pH del agua de mar (pH 8; Riley y Chester, 1971), las formas mayoritarias de P_i en el exterior son H_2PO_4^- (14% P_i) y HPO_4^{2-} (86% P_i). Finalmente, la concentraciones citoplasmática y externa de Na^+ utilizadas en los cálculos fueron las mismas que para los de NO_3^- , es decir, 10 mM Na^+ y 500 mM Na^+ , respectivamente.

En la Figura 52 se muestra la energía libre asociada tanto al transporte de la forma H_2PO_4^- (Figura 52A), como de la forma HPO_4^{2-} (Figura 52B). En ambos casos, para un mismo valor de incremento de energía libre, la estequiometría del transporte asociado a Na^+ es menor que la del transporte asociado a H^+ . Si la forma de P_i que se transporta es la monovalente (H_2PO_4^-), una estequiometría $2\text{Na}^+:\text{H}_2\text{PO}_4^-$ tiene asociada energía suficiente para el transporte ($\Delta G' = -13 \text{ kJ mol}^{-1}$); mientras que, para un transporte asociado a H^+ , la misma estequiometría ($2\text{H}^+:\text{H}_2\text{PO}_4^-$) no es suficiente para que el transporte pueda tener lugar ($\Delta G' > 0$; Figura 52A). Por otra parte, si la forma en la que se transporta el P_i es la divalente (HPO_4^{2-}), una estequiometría de $3\text{Na}^+:\text{HPO}_4^{2-}$ es suficiente para garantizar el transporte ($\Delta G' = -27 \text{ kJ mol}^{-1}$); mientras que, una estequiometría de $5\text{H}^+:\text{HPO}_4^{2-}$ tiene una energía asociada de sólo -8 kJ mol^{-1} .

Las estequiometrías calculadas para el transporte de NO_3^- o P_i en células de *Z. marina* estarían de acuerdo con las despolarizaciones inducidas por estos nutrientes. Además, puesto que para las estequiometrías asociadas a Na^+ , el balance de cargas neto es +1, podría explicarse que las despolarizaciones inducidas tanto por NO_3^- , como por P_i , sean pequeñas, con unos valores de D_{max} inferiores a 10 mV en el caso de las células epidérmicas de la raíz (Tabla 5) y del orden de 15 mV en el caso del transporte de NO_3^- en células del mesófilo foliar, donde también se ha propuesto una estequiometría de $2\text{Na}^+:\text{NO}_3^-$ (García-Sánchez *et al.*, 2000). Estequiometrías similares, aunque asociadas a H^+ , también han sido sugeridas para el transporte de NO_3^- y P_i en otras plantas. Así, en cultivos celulares de *C. roseus* se propuso una estequiometría de $(1-4)\text{H}^+:\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (Sakano, 1990); en raíces de *L. stoloniferum* y de maíz la estequiometría propuesta fue de $2\text{H}^+:\text{NO}_3^-$ y $2\text{H}^+:\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (Mistrik y Ullrich, 1996). Por otra parte, en el caso de *C. corallina* la estequiometría propuesta es mayor de $6\text{Na}^+:\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (Reid *et al.*, 2000).

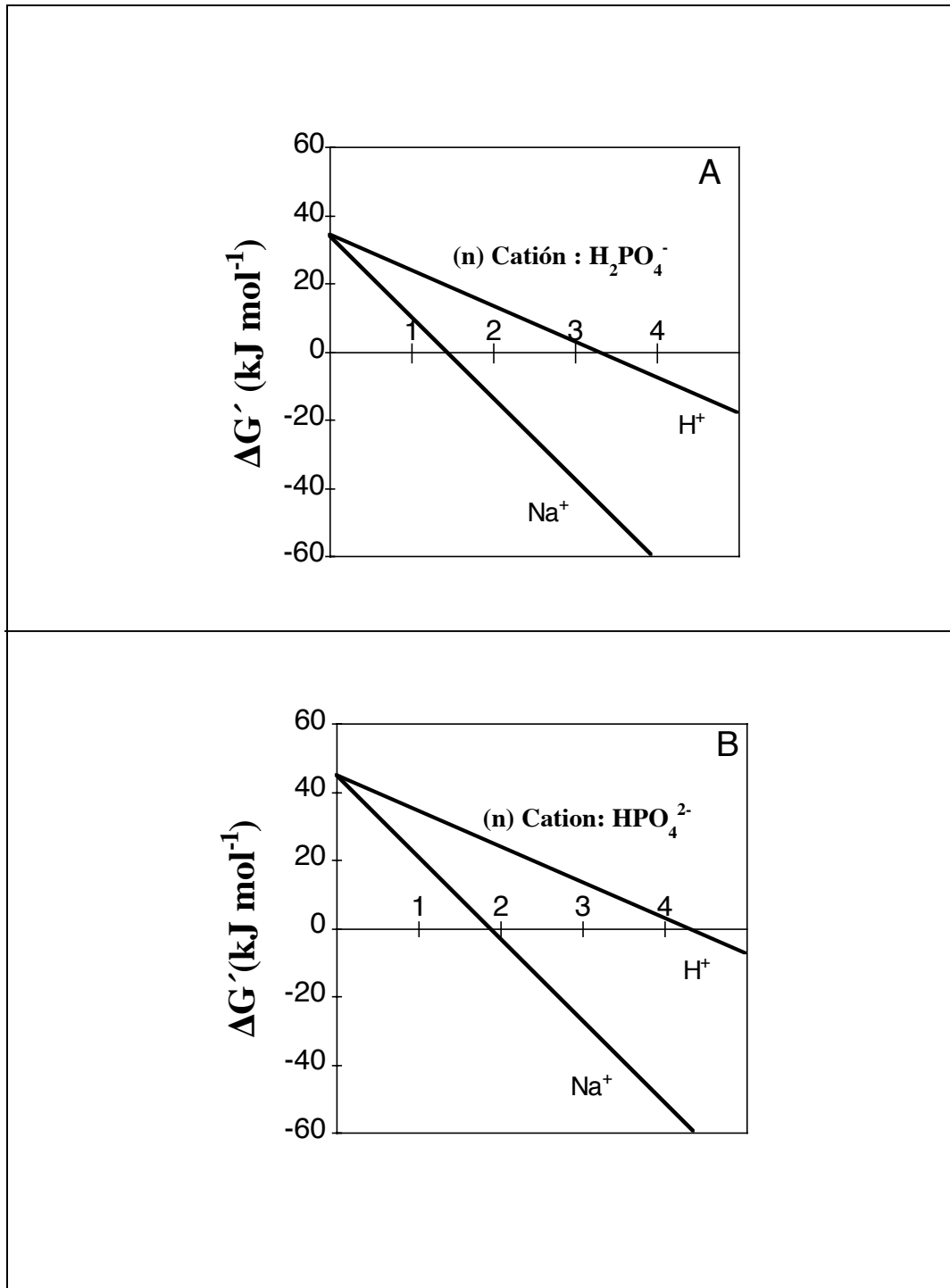


Figura 52. Incremento de energía libre asociada al transporte de P_i . Los valores ($\Delta G'$) se expresan en kJ mol^{-1} . Los cálculos para cada estequiometría (n) del transporte impulsado por H^+ o Na^+ se realizaron tanto para el transporte de H_2PO_4^- (A) como de HPO_4^{2-} (B) a partir de la ecuación 10, usando los valores discutidos en el texto.

En cuanto al mecanismo de transporte de NH_4^+ en células de *Z. marina*, las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ parecen no estar asociadas a la entrada simultánea de otro ión (H^+ o Na^+). Sin embargo, dichas despolarizaciones fueron mayores que las inducidas por las mismas concentraciones de NO_3^- o P_i , registrándose despolarizaciones de hasta 100 mV en el caso de las células del mesófilo foliar (Figura 24). Aunque no se conoce el mecanismo que impulsa el transporte, en el caso de arroz, se ha sugerido que la incorporación de concentraciones inferiores a $42 \mu\text{M}$ NH_4^+ debe energizarse, ya que se produce en contra de gradiente de potencial electroquímico para NH_4^+ (Wang *et al.*, 1994). El gradiente de potencial electroquímico para NH_4^+ , expresado en mV, puede calcularse a partir de la ecuación 3 aplicada a NH_4^+ :

$$-\alpha_{\text{NH}_4^+} / F = z(E_m - E_{\text{NH}_4^+}^N) \quad (\text{ecuación 11})$$

donde z es la carga del NH_4^+ (+1) y $E_{\text{NH}_4^+}^N$ es su potencial de Nernst:

$$E_{\text{NH}_4^+}^N = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{NH}_4^+]_e}{[\text{NH}_4^+]_i} \quad (\text{ecuación 12})$$

donde R es la constante de los gases ($8,31 \text{ J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$), T es la temperatura absoluta, z es +1, F es la constante de Faraday ($96,5 \text{ J mol}^{-1} \text{ mV}^{-1}$) y los subíndices “e” y “c” se refieren a la concentración de NH_4^+ exterior y citoplasmática.

En el caso de *Z. marina*, el E_m es -150 mV y la concentración citoplasmática de NH_4^+ puede considerarse en el rango $1\text{--}20 \text{ mM}$, valores descritos en plantas acuáticas (Raven, 1984; Wells y Miller, 2000) y terrestres crecidas en una concentración externa de NH_4^+ baja (Wang *et al.*, 1993; Krozucker *et al.*, 1999), parecida a la medida en agua de mar ($< 3 \mu\text{M}$ NH_4^+ ; Riley y Chester, 1971). Así, realizando los cálculos, se obtiene que, para una concentración citoplasmática de 20 mM NH_4^+ , valores de concentración externa de NH_4^+ inferiores a $60 \mu\text{M}$ dan como resultado un gradiente de potencial

electroquímico positivo, lo cual implica que el transporte en un rango de concentración inferior a $60\mu\text{M NH}_4^+$ se realiza en contra de gradiente y, por tanto, debe energizarse. Por otra parte, para una concentración citoplasmática de 1 mM NH_4^+ , la necesidad de energizar el transporte sólo sería necesaria para impulsar la entrada de NH_4^+ cuando la concentración externa fuera inferior a $3\mu\text{M NH}_4^+$.

Los experimentos realizados para determinar el posible uso de H^+ o Na^+ como ión motriz para el transporte de NH_4^+ en células de *Z. marina*, no permiten concluir si dicho transporte está asociado a uno de estos iones. En el primer caso, porque las despolarizaciones inducidas por 10 ó $100\mu\text{M NH}_4^+$ no variaron al aumentar el gradiente de potencial electroquímico para los H^+ (apartados III.3.2.1a y III.3.2.2a). En el segundo caso, porque tampoco se observaron variaciones en las despolarizaciones inducidas por dichas concentraciones de NH_4^+ al disminuir el gradiente de potencial electroquímico para Na^+ , (apartados III.3.2.1b y III.3.2.2b) al contrario de lo observado en el caso de NO_3^- y P_i , cuyo transporte se propone acoplado a la entrada de Na^+ . En este sentido, puede que, al igual que se ha descrito para los sistemas de transporte de NH_4^+ de plantas vasculares terrestres, el mecanismo de transporte de NH_4^+ pudiera ser un uniporte que deba energizarse sólo cuando la concentración externa de NH_4^+ es extremadamente baja. Así, en los primeros transportadores de alta afinidad de NH_4^+ aislados en plantas vasculares y pertenecientes a la familia *AMT1* de *Arabidopsis*, se ha descrito que pudieran funcionar como un uniporte de NH_4^+ (Howitt y Udvardi, 2000). Por otra parte, se ha propuesto que la entrada de NH_4^+ se produce a través de canales de K^+ tipo *KAT1* y *AKT1*, que presentan cierta permeabilidad a NH_4^+ (Schachtman *et al.*, 1992; Bertl *et al.*, 1997). Finalmente, también se ha descrito la posibilidad de que las acuaporinas, altamente abundantes en el plasmalema y que pueden transportar pequeños solutos, como glicerol y urea, pudiesen permitir, además, la entrada de NH_3 , cuyo transporte a través de las membranas puede ser relevante en situaciones de alta concentración de NH_4^+ o pH elevado (Howitt y Udvardi, 2000).

IV.3. Homeostasis de Na⁺

Los resultados discutidos en el apartado anterior establecen que la incorporación de dos de los nutrientes más importantes para el crecimiento, NO₃⁻ y P_i, tanto en células del mesófilo foliar como de la epidermis radicular de *Z. marina*, se realiza a través de transportadores dependientes de Na⁺. Ello implica que la concentración citoplasmática de Na⁺ ha de estar estrechamente regulada debido al efecto tóxico de este ión si está presente en elevadas concentraciones en el citoplasma celular (Amtmann y Sanders, 1999; Niu *et al.*, 1995; Rodríguez-Navarro, 2000; Tester y Davenport, 2003).

Aunque algunas especies procariotas poseen una maquinaria metabólica capaz de funcionar en presencia de elevadas concentraciones de Na⁺, sin embargo, no se conoce si tal capacidad ha sido también desarrollada en las especies halófitas eucariotas (Yeo, 1998). Actualmente, las halófitas se clasifican como plantas que limitan la entrada de Na⁺ (desarrollando mecanismos de extrusión activa hacia el exterior o minimizando la permeabilidad a Na⁺) o como halófitas que acumulan Na⁺ en la vacuola. Así, estas plantas poseen la facultad, perdida o insuficiente en glicófitas, de regular la entrada y distribución de Na⁺ y Cl⁻ dentro de la planta (Hasegawa *et al.*, 2000; Rodríguez-Navarro y Serrano, 2001; Tester y Davenport, 2003).

En las células de *Z. marina*, las medidas con microelectrodos de Na⁺ mostraron que la actividad citoplasmática de dicho ión (γNa_c^+) solo varió de manera significativa en presencia de CN⁻ y SHAM (Figura 43), así como al añadir NO₃⁻ o P_i (Figura 45). El incremento de la γNa_c^+ registrado en presencia de los inhibidores de la respiración demuestra que el mantenimiento de dicha γNa_c^+ se debe producir a través de un mecanismo de transporte activo de Na⁺, el cual deja de funcionar cuando disminuye la cantidad de ATP citoplasmático. Dado que las plantas vasculares carecen de Na⁺,K⁺-ATPasas y probablemente también de Na⁺-ATPasas (la búsqueda de bombas de Na⁺, incluso en algunas especies de angiospermas marinas ha resultado, de momento, infructuosa; Garcíadeblas *et al.*, 2001), este transporte activo de Na⁺ se debe producir, probablemente, a través de

antiportadores Na^+/H^+ tales como el transportador *SOS1* descrito en *Arabidopsis* (Shi *et al.*, 2000).

La posible actividad de un antiportador Na^+/H^+ en *Z. marina* había sido inferida inicialmente en el plasmalema de células del mesófilo foliar, donde la adición de amilorida provocaba la hiperpolarización de la membrana (Fernández *et al.*, 1999). Esta hiperpolarización se explicaba porque la amilorida, una sustancia diurética descrita como un inhibidor de los antiportadores Na^+/H^+ (Blumwald *et al.*, 1987; Katz *et al.*, 1994) y de algunos canales catiónicos de células animales (Garty y Benos, 1988), bloquearía tales sistemas (Fernández *et al.*, 1999).

Sin embargo, aunque los resultados de la medida simultánea del E_m y la γNa^+_c en células de la epidermis no mostraron un aumento significativo de la γNa^+_c , paralelo a la hiperpolarización inducida por la adición de amilorida (Figura 44B), la actividad de antiporte Na^+/H^+ ha podido ser detectada, mediante técnicas fluorimétricas, en vesículas de plasmalema de células de *Z. marina*. La adición de Na^+ al medio donde se incubaban las vesículas de plasmalema disipó el gradiente de pH establecido por la actividad de H^+ -ATPasa entre el interior y el exterior de dichas vesículas (Figura 48). Es decir, la entrada de Na^+ en el interior de las vesículas de plasmalema está asociada a la salida de H^+ . Puesto que las vesículas en las que se detecta la formación del gradiente de pH mediante esta técnica son aquellas que exponen su lado citoplasmático hacia el exterior (apartado III.5.4.2), el transporte de Na^+ , en la célula, ocurriría hacia el exterior.

Al igual que ha sido descrito para el antiporte Na^+/H^+ de vesículas de plasmalema de *Arabidopsis* (Qiu *et al.*, 2003), el grado de disipación del gradiente de pH establecido en las vesículas dependió de la concentración de Na^+ añadida, saturándose en el rango 40-100 mM Na^+ (Figura 49). La K_m para la actividad de antiporte Na^+/H^+ fue de $16,8 \pm 4,4$ mM Na^+ en vesículas de plasmalema purificadas a partir de tejido foliar de *Z. marina*. Este valor es ligeramente inferior al descrito en *Arabidopsis* ($K_m = 22,8$ mM Na^+ ; Qiu *et al.*, 2003), donde además, se ha descrito un antiportador Na^+/H^+ de tonoplasto, cuyo valor de K_m es 7 mM

Na^+ (Apse *et al.*, 1999). Considerando unos niveles de Na^+ citoplasmáticos entre 1 y 10 mM Na^+ en *Arabidopsis* (Blumwald, 2000), la mayor afinidad del antiportador de tonoplasto estaría de acuerdo con la hipótesis de que, en *Arabidopsis*, la regulación de la concentración citoplasmática de Na^+ comienza por el secuestro inicial de Na^+ en la vacuola y, cuando esta vía no es suficiente para mantener la homeostasis de Na^+ , se produce la activación de la ruta SOS (Liu y Zhu, 1997; Zhu, 2002), dando lugar a la extrusión de Na^+ a través de plasmalema. En el caso de las células de *Z. marina*, podría ocurrir algo parecido; sin embargo, la diferencia entre la K_m del antiporte Na^+/H^+ de plasmalema y la γNa^+_c es mínima, lo cual podría interpretarse como una mayor eficiencia del plasmalema de las células de *Z. marina* para extruir Na^+ desde el citoplasma. No obstante, sería necesario determinar si este tipo de transportadores también está presente en tonoplasto, al objeto de determinar qué papel desempeña la vacuola en la homeostasis citoplasmática de Na^+ en *Z. marina*.

La actividad de los antiportadores Na^+/H^+ ha sido ampliamente descrita en relación a los transportadores de tipo *NHX*, que se localizan en tonoplasto o en otras membranas intracelulares y cuya función se relaciona con la compartimentalización intracelular de Na^+ , el mantenimiento de la homeostasis de K^+ y con la regulación del pH citoplasmático (Apse *et al.*, 1999; Yokoi *et al.*, 2002; Venema *et al.*, 2002; Apse *et al.*, 2003). Además, se ha descrito que la expresión de algunos de estos transportadores aumenta en respuesta a la salinidad (Shi y Zhu, 2002; Yokoi *et al.*, 2002). Así mismo, la actividad de este tipo de antiportadores también ha sido caracterizada en halófitas como *Salicornia bigelovii* Torr, donde se ha descrito un incremento de la actividad de un antiportador Na^+/H^+ de tonoplasto en respuesta al incremento de NaCl (Parks *et al.*, 2002).

Por otra parte, asumiendo unas condiciones de salinidad parecidas en el sedimento donde se anclan las raíces y en el agua donde se proyectan las hojas de *Z. marina* (Siever *et al.*, 1965), la presencia del antiportador Na^+/H^+ sería necesaria también en las células radiculares. De hecho, aunque no se dispone de

datos suficientes para caracterizar el antiporte Na^+/H^+ en estas células (en términos de K_m y actividad máxima), del mismo modo que se ha descrito en vesículas de plasmalema purificadas a partir de hojas, la disipación del gradiente de pH tras la adición de Na^+ también fue detectada en vesículas de plasmalema purificadas a partir de tejido radicular (resultados no mostrados).

Los datos obtenidos con vesículas de plasmalema de tejido foliar de *Z. marina* apuntan a que la actividad de antiporte Na^+/H^+ podría deberse a un antiportador de tipo *SOS1*, ya que al igual que ha sido descrito para *Arabidopsis* (Qiu *et al.*, 2003) la adición de amilorida no inhibió el transporte de Na^+ (Figura 50). Este tipo de antiportadores no posee el dominio de unión a amilorida (Shi *et al.*, 2000), de manera que su actividad se mantiene en presencia de esta droga diurética (Qiu *et al.*, 2003). *SOS1*, que se expresa tanto en hojas como en raíces de *Arabidopsis*, codifica un antiportador Na^+/H^+ cuya actividad ha sido descrita como electroneutra, es decir, que intercambiaría sólo un ión H^+ por un ión Na^+ (Qiu *et al.*, 2003; Tester y Davenport, 2003). No obstante, calculando el gradiente de potencial electroquímico (ecuación 3) al que están sometidos ambos iones en las células de *Z. marina* ($E_m = -150$ mV, $\text{pH}_e = 8$, $[\text{Na}^+]_e = 500$ mM, $\text{pH}_c = 7.3$ y $[\text{Na}^+]_c \Delta 10$ mM) serían necesarios entre 2 y 3 iones H^+ para que la extrusión de un ión Na^+ fuese termodinámicamente posible.

Las medidas de γNa^+_c en células de *Z. marina* muestran unos valores comprendidos entre 7 y 25 mM Na^+ , rango similar al descrito para plantas vasculares terrestres crecidas en concentraciones inferiores a 200 mM NaCl (Carden *et al.*, 2003; Tester y Davenport, 2003). Este valor de actividad citoplasmática de Na^+ (similar al de glicófitos) aún viviendo en un medio mucho más rico en Na^+ , podría explicarse, además de por la extrusión activa de Na^+ desde el plasmalema, porque la entrada de Na^+ hacia el citoplasma de las células de *Z. marina* está restringida, según demuestran los valores de permeabilidad relativa de Na^+ respecto a K^+ ($P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+}$) discutidos anteriormente (apartado IV.2.1).

Existen diferentes evidencias de que la tolerancia a salinidad en glicófitas está ligada principalmente a la regulación de la entrada de Na^+ , más que a la

extrusión activa del mismo (Amtmann y Sanders, 1999; Tester y Davenport, 2003). En plantas vasculares terrestres, se han propuesto distintos candidatos como sistemas de transporte a través de los cuales se produce la entrada de Na⁺ extracelular, destacando especialmente los NSCCs (canales catiónicos no selectivos; Tyerman y Skerrett, 1999; Demidchik *et al.*, 2002; Tester y Davenport, 2003) y los transportadores de K⁺ de alta afinidad (*HKT*), identificados en distintas especies y caracterizados en sistemas heterólogos como simportes Na⁺/K⁺ o simplemente como transportadores de Na⁺ (Fairbairn *et al.*, 2000; Hayes *et al.*, 2001; Rus *et al.*, 2002; Garciadeblas *et al.*, 2003). Así mismo, la entrada de Na⁺ también se podría realizar a través de transportadores como la proteína *LCT1* de trigo (*Triticum aestivum* L.) que media también el transporte de Ca²⁺ y Cd²⁺ en levaduras (Clemens *et al.*, 1998); canales rectificadores de entrada (IRCs), aunque su permeabilidad relativa a Na⁺ respecto a K⁺ es muy baja (P_{Na^+}/P_{K^+} en el rango 0,02-0,07; Amtmann y Sanders, 1999); canales rectificadores de salida (ORCs), que son más permeables a Na⁺ que los anteriores (P_{Na^+}/P_{K^+} en el rango 0,008-1; Amtmann y Sanders, 1999) y finalmente, los canales independientes de voltaje (VICs), cuya selectividad entre Na⁺ y K⁺ es mínima y que han sido descritos como la principal vía de entrada de Na⁺ en situaciones de elevada salinidad (Amtmann y Sanders, 1999; White, 1999; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001).

En el caso concreto de las angiospermas marinas se han caracterizado los canales iónicos presentes en protoplastos de células foliares de *Zostera muelleri* Irmisch ex Ascherson (Garril *et al.*, 1994) y recientemente, los presentes en protoplastos (también de origen foliar) de *P. oceánica* (Carpaneto *et al.*, 2004). Ambos estudios coinciden en la identificación de corrientes iónicas debidas a la presencia de canales rectificadores de salida (ORCs) y canales rectificadores de entrada (IRCs); además, en *P. oceánica* se han identificado corrientes poco selectivas para iones, atribuidas a la presencia de canales iónicos no selectivos dependientes de voltaje (NSC). Sin embargo, mientras que en *Z. muelleri* se describe que los ORCs muestran una permeabilidad seis veces mayor para K⁺ sobre Na⁺, comparable con la descrita para los canales rectificadores de salida de K⁺ de glicófitas (Garril *et al.*, 1994); en el caso de *P. oceánica*, la corriente

mediada por los ORCs es altamente selectiva para K^+ , siendo tales canales impermeables a Na^+ , Li^+ y Cs^+ (Carpaneto *et al.*, 2004). De este modo, la entrada de Na^+ en *P. oceánica* quedaría restringida a los canales no selectivos dependientes de voltaje (Carpaneto *et al.*, 2004).

Puesto que los índices de permeabilidad P_{Na^+}/P_{K^+} en células foliares y radiculares de *Z. marina*, calculados a partir de la ecuación de Goldman-Hoggin-Katz son similares al índice P_{Na^+}/P_{K^+} descrito para canales con una alta selectividad para K^+ respecto a Na^+ (Amtmann y Sanders, 1999), la entrada de Na^+ a través del plasmalema de *Z. marina* podría ocurrir análogamente a como se ha descrito en *P. oceanica* a través de canales no selectivos dependientes de voltaje (Carpaneto *et al.*, 2004).

Finalmente, la mayor permeabilidad relativa de Na^+ respecto a K^+ observada en células epidérmicas radiculares se corresponde con un mayor contenido total de Na^+ medido en raíces ($62,9 \pm 11,3 \text{ gNa}^+ \text{ kg}^{-1}\text{PS}$) con respecto al determinado en hojas ($21,2 \pm 3,9 \text{ gNa}^+ \text{ kg}^{-1}\text{PS}$). Así mismo, la relación de los contenidos totales de Na^+ y K^+ (expresados en $\text{mol kg}^{-1}\text{PS}$) es también superior en raíces ($Na^+/K^+ = 3,16 \pm 0,07$) en comparación con la de hojas ($Na^+/K^+ = 1,23 \pm 0,03$). El valor observado en hojas es similar al descrito para este tejido también en *Z. marina* por Muramatsu *et al.* (2002); así mismo, la razón de contenidos totales (Na^+/K^+) tanto de hojas como de raíces de *Z. marina*, es superior a la observada en arroz, donde se obtuvo una relación $Na^+/K^+ = 0,04$ (Muramatsu *et al.*, 2002).

Puesto que el ión más abundante en el citoplasma de las células vegetales es K^+ (Very y Sentenac, 2003), teniendo en cuenta que la actividad citoplasmática de Na^+ (tanto en células del mesófilo foliar como de la epidermis radicular de *Z. marina*) es próxima a 10 mM Na^+ , y considerando una actividad citoplasmática en torno a 100 mM K^+ , valores de la relación Na^+/K^+ superiores a 1 (como los observados en *Z. marina*) sugieren que el exceso de Na^+ debe acumularse en la vacuola. Así, al igual que ocurre para la extrusión de Na^+ a través del plasmalema, el transporte de Na^+ hacia el lumen también se produce en contra de gradiente

electroquímico. Infiriéndose nuevamente la existencia de un sistema de transporte activo, probablemente similar a los antiportadores Na^+/H^+ del tipo *NHX* descritos en *Arabidopsis* y otras especies (Tester y Davenport, 2003; Venema et al., 2003; Zhu, 2003). Este antiportador usaría el gradiente de potencial electroquímico para H^+ , generado por las H^+ -ATPasas y H^+ -PP_iasas de el tonoplasto y dirigido hacia el citoplasma, para impulsar la acumulación de Na^+ en la vacuola. Este hipotético secuestro de Na^+ en la vacuola de las células de *Z. marina* se corresponde, además, con la presencia mayoritaria de iones Na^+ en la vacuola con respecto al citoplasma determinada mediante microanálisis de rayos X en diferentes tipos celulares de *Z. marina* (Ye y Zhao, 2003).

IV.4. Modelo general de la energetización del plasmalema de *Z. marina*

Las diversas evidencias fisiológicas descritas a lo largo de la presente memoria, así como en los diferentes trabajos relacionados con el transporte iónico a través del plasmalema de *Z. marina* (Pak et al., 1995; Fukuhara et al., 1996; Fernández et al., 1999; García-Sánchez et al., 2000; Muramatsu et al., 2002) sugieren los esquemas presentados en la Figura 53, donde se representan los diversos sistemas de transporte comentados, la estequiometría teórica calculada para cada uno de ellos, así como la magnitud del gradiente de potencial electroquímico para H^+ y Na^+ en el plasmalema de las células del mesófilo foliar y de la epidermis radicular de *Z. marina*. En ambos tipos celulares, el plasmalema presenta una permeabilidad restringida a Na^+ respecto a K^+ , el gradiente electroquímico para Na^+ es mayor que el de H^+ , así, los transportadores de NO_3^- y P_i utilizan Na^+ como ión motriz para impulsar el transporte de alta afinidad; sin embargo, el gradiente electroquímico para H^+ se usa para impulsar el transporte de Cl^- (García-Sánchez et al., 1997). En cuanto al transporte de NH_4^+ , tanto en células del mesófilo foliar como de la epidermis radicular, se produce a través de sistemas de alta afinidad, sin que se haya demostrado la utilización de Na^+ o H^+ como ión motriz.

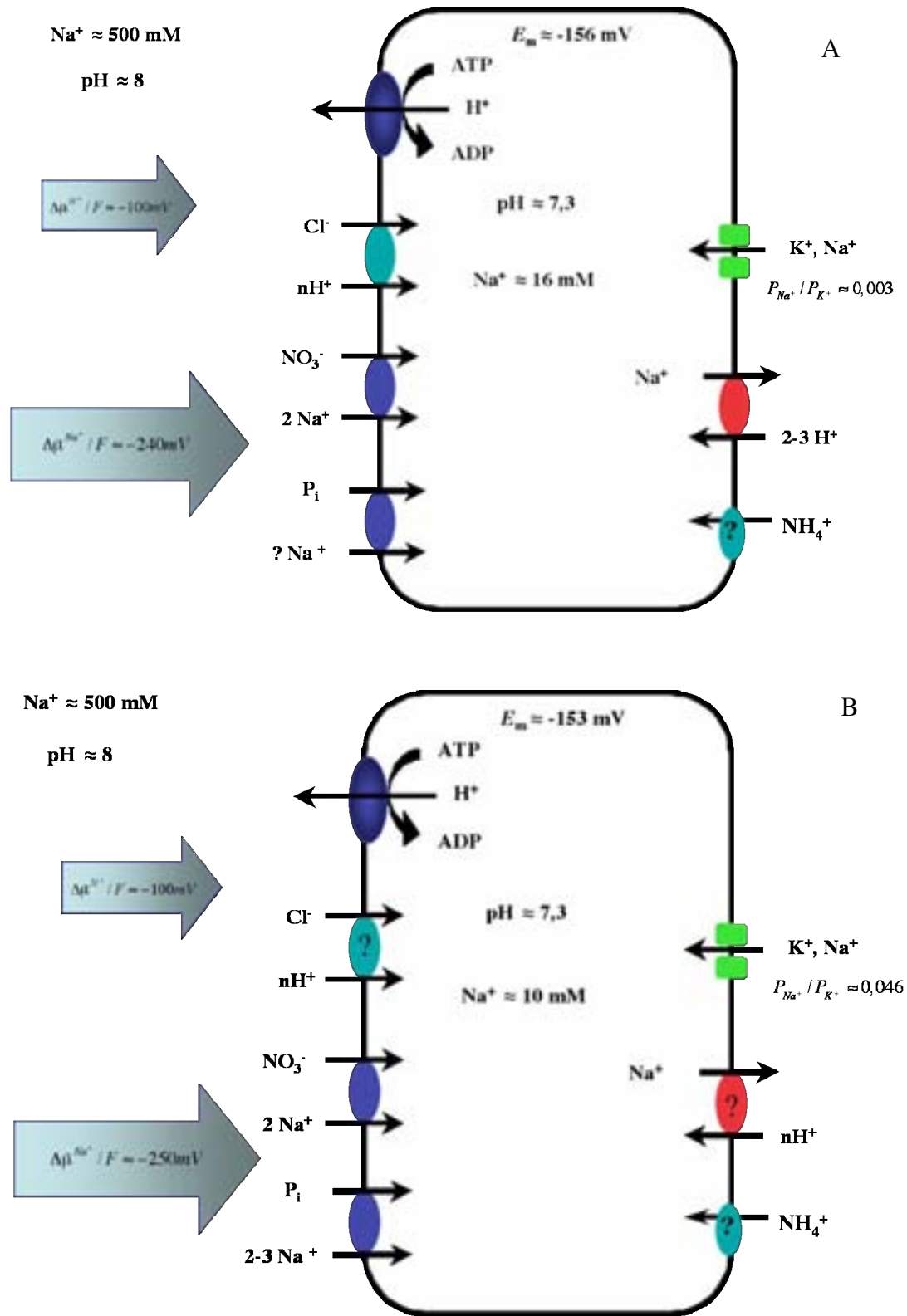


Figura 53. Esquema de los sistemas de transporte caracterizados en plasmalema de células del mesófilo foliar (A) y de la epidermis radicular (B) de *Z. marina*.

CONCLUSIONES

V. Conclusiones

1. En células epidérmicas de la raíz de *Zostera marina* el transporte de NO_3^- se produce a través de un sistema de alta afinidad, dependiente de Na^+ y se induce por deficiencia de N.
2. El transporte de P_i en células de la epidermis radicular también se produce a través de un sistema de alta afinidad, dependiente de Na^+ y se induce por deficiencia de P.
3. La actividad citoplasmática de Na^+ en células del mesófilo foliar y de la epidermis radicular de *Zostera marina* es similar a la descrita en glicófitos. El transporte de NO_3^- y P_i provoca un aumento observable y transitorio de la actividad citoplasmática de Na^+ en células de la epidermis radicular.
4. El transporte de NH_4^+ en células epidérmicas de la raíz y del mesófilo foliar se produce a través de sistemas de alta afinidad. Las células del mesófilo foliar muestran dos rangos de saturación diferentes. En ningún caso, se ha observado dependencia de Na^+ , ni de H^+ , para el transporte de NH_4^+ en células de *Zostera marina*.
5. Tanto la afinidad del transporte, como las despolarizaciones máximas inducidas por NO_3^- y NH_4^+ son mayores en células del mesófilo foliar que en células de la epidermis radicular de *Zostera marina*. Sin embargo, no se observan despolarizaciones inducidas por P_i en células del mesófilo foliar.
6. Se han caracterizado dos mecanismos de regulación de la homeostasis citoplasmática de Na^+ en *Zostera marina*. En primer lugar, la permeabilidad restringida de la membrana a Na^+ respecto a K^+ . El segundo mecanismo identificado se corresponde con la extrusión de Na^+ desde el citoplasma a través de un sistema de antiporte con H^+ .

BIBLIOGRAFÍA

- Aidley DJ., Stanfield PR. 1996. *Ion channels. Molecules in action*. Cambridge University Press.
- Albertsson PA. 1971. *Partition of cell particles and macromolecules*. 2nd Edition. Wiley, New York.
- Alcoverro T., Manzanera M., Romero J. 2000. Nutrient mass-balance of the seagrass *Possidonia oceanica*. The importance of nutrient retranslocation. *Marine Ecology Progress Series* 194: 13-21.
- Ammann, D. 1986. *Ion-selective microelectrodes. Principles, design and applications*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.
- Amtmann A., Sanders D. 1999. Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research* 29: 75-112.
- Anderson JA., Huprikar SS., Kochian LV., Lucas WJ., Gaber RF. 1992. Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89: 3736-3740.
- Apse MP., Aharon GS., Snedden WA., Blumwald E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.
- Apse MP., Sottosanto JB., Blumwald E. 2003. Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of *AtNHX1*, the *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *Plant Journal* 36: 229-239.
- Arai M., Pak JY., Nomura K., Nitta T. 1991. Seawater-resistant, non-spherical protoplasts from seagrass leaves. *Physiologia Plantarum* 83: 551-559.
- Assmann SM. 1993. Signal transduction in guard cells. *Annual Review in Cell Biology* 9: 345-375.
- Balestri E., Piazzini L., Cinelli F. 1998. In vitro germination and seedling development of *Posidonia oceanica*. *Aquatic Botany* 60: 83-93.
- Ballesteros E., Blumwald E., Donaire JP., Belver A. 1997. Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress.

Physiologia Plantarum 99: 328-334.

Ballesteros E., Donaire JP., Belver A. 1996. Effects of salt stress on H⁺-ATPase and H⁺-Ppase activities of tonoplast enriched vesicles isolates from sunflower roots.

Physiologia Plantarum 97: 259-268.

Ballesteros, D., García-Sánchez MJ., Heredia MA., Felle H., Fernández JA. 1998a. Inorganic carbon acquisition in *Riccia fluitans* L. *Journal of Experimental Botany* 49: 1741-1747.

Ballesteros E., Kerkeb B., Donaire JP., Belver A. 1998b. Effects of salt stress on H⁺-ATPase activity of plasma membrane-enriched vesicles isolated from sunflower roots. *Plant Science* 134: 181-190.

Barkla BJ., Pantoja O. 1996. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 159-184.

Barkla BJ., Zingarelli L., Blumwald E., Smith JA. 1995. Tonoplast Na⁺/H⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiology* 109: 549-556.

Barrajón A., Moreno D., Pérez-Llorens JL. 2004. Distribución en Andalucía. En: Luque ÁA. Templado J. (Coords.) *Praderas y bosques marinos de Andalucía*, pp 157-158. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla, 336 pp

Benito B., Rodríguez-Navarro A. 2003. Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* 36: 382-389.

Bertl A., Reid JD., Sentenac H., Slayman CL. 1997. Functional comparison of plant inward-rectifier channels expressed in yeast. *Journal of Environmental Botany* 48: 405-413.

Bintz JC., Nixon SW. 2001. Responses of eelgrass *Zostera marina* seedlings to reduced light. *Marine Ecology Progress Series* 223: 133-141.

Blumwald E. 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology*. 12: 431-434

- Blumwald E., Cragoe EJ., Poole RJ. 1987. Inhibition of Na⁺ / H⁺ antiport activity in sugar beet tonoplast by analogs of amiloride. *Plant Physiology* 85: 30-33.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72: 248-254.
- Britto DT., Siddiqi MY., Glass DM., Kronzucker HJ. 2001. Futile transmembrane NH₄⁺ cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 4255-4258.
- Buch-Pedersen MJ., Palmgren MG. 2003. Mechanism of proton transport by plant plasma membrane proton ATPases. *Journal of Plant Research* 116: 507-515.
- Carden D, Walker D. Flowers TJ, Miller AJ. 2003. Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance. *Plant Physiology* 131, 676-683.
- Carden DE., Diamond D., Miller AJ. 2001. An improve Na⁺-selective microelectrodes for intracellular measurements in plant cells. *Journal of Experimental Botany* 52: 1353-1359.
- Carpaneto A., Cantu AM., Busch H, Gambale F. 1997. Ion channels in the vacuole of the seagrass *Posidonia oceanica*. *FEBS Letters* 412: 236-240.
- Carpaneto A., Naso A., Paganetto A., Cornara L., Pesce E-R., Gambale F. 2004. Properties of ion channels in the protoplast of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Plant, Cell and Environment* 27: 279-292.
- Chrispeels MJ., Crawford NM., Schroeder J. 1999. Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *The Plant Cell* 11, 661-675.
- Clarkson DT. 1987. Ionic Relations. En: Wilkins MB. *Advanced Plant Physiology*. Longman Group. London.
- Clemens S., Antosiewicz DM., Ward JM., Schachtman DP., Schroeder JI. 1998. The plant cDNA LCT1 mediate the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95: 1204-12048.
- Conachera CA., Poiner IR., Butler J., Pun S., Tree DJ. 1994. Germination, storage and

- viability testing of seeds of *Zostera capricorni* Aschers. *Aquatic Botany* 59: 139-155.
- Crawford NM., Glass ADM. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *TRENDS in Plant Science* 3: 389-395.
- Davies JM., Rea PA., Sanders D. 1990. Vacuolar proton-pumping pyrophosphatase in *Beta vulgaris* shows vectorial activation by potassium. *FEBS Letter* 278, 66-68.
- de Cock., AWAM. 1980. Flowering, pollination and fruitering in *Zostera marina* L. *Aquatic Botany* 9: 201-220.
- DeBoer JA. 1985. Nutrients. En: CS. Lobban, PJ. Harrison, JJ. Duncan, eds, *The Physiological Ecology of Seaweeds*. Cambridge University Press, New York, pp 356-392.
- Demidchick V., Davenport RJ., Tester M. 2002. Nonselective cation channels in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 67-107.
- den Hartog C. 1970 *The Seagrasses of the World*. North-Holland Publishing Company. Amsterdam, London 1970.
- Epstein E., Rains DW., Elzan OE. 1963. Resolution of dual mechanism of potassium absorption by *Barley* roots. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* 49: 648-692.
- Evans DE., Willians LE. 1998. P-type calcium ATPases in higher plants-biochemical, molecular and functional properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 1376, 1-25.
- Fairbairn DJ., Liu W., Schachtman DP., Gomez-Gallego S., Day S., Teasdale RD. 2000. Characterisation of two distinct HKT1-like potassium transporters from *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Molecular Biology* 43:515-525.
- Felle H., Bertl A. 1986. The fabrication of H⁺-selective liquid membrane microelectrodes for use in plant cells. *Journal of Experimental Botany*. 37: 1416-1428.
- Felle H. 1981. A study of the current-voltage relationships of electrogenic and passive membrane elements in *Riccia fluitans*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 646: 151-160.
- Felle, H. 1987. Proton transport and pH control in *Sinapis alba* root hairs: a study carried

- out with double-barrelled pH micro electrodes. *Journal of Experimental Botany* 38: 340-354
- Felle H. 1993. Ion-selective microelectrodes: their use and importance in modern plant cell biology. *Botanica Acta* 106: 5-12.
- Felle H. 1994. The H⁺/Cl⁻ symporter in root-hair cells of *Sinapis alba*. An electrophysiological study using ion-selective microelectrodes. *Plant Physiology* 106: 1131-1136
- Fernández JA., García-Sánchez MJ., Felle H. 1999. Physiological evidence from a proton pump at the plasma membrane of the marine angiosperm *Zostera marina* L. *Journal of Experimental Botany* 50: 1763-1768.
- Fernández JA., Maldonado JM. 2000. Absorción y Transporte de Nutrientes Minerales. En: J. Azcón-Bieto, M. Talón *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Eds. Interamericana McGraw-Hill EUB Madrid.
- Forde BG. 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 219-236
- Fukuhara T., Pak JY., Ohwaki Y., Tsujimura H., Nitta T. 1996. Tissue-specific expression of the gene for a putative plasma membrane H⁺-ATPase in a seagrass. *Plant Physiology* 110: 35-42.
- Garciadeblas B, Benito B, Rodríguez-Navarro A. 2001. Plant cells express several calcium ATPases but apparently no sodium ATPase. *Plant and Soil* 235, 181-192.
- Garciadeblas B., Senn ME., Bañuelos MA., Rodríguez-Navarro A. 2003. Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *The Plant Journal* 34: 788-801.
- García-Sánchez MJ., Sanders D., Amtmann A. 1997. Chloride transport at the plasma membrane of the marine higher plant *Zostera marina* L. En: *Plant Transport Group Workshop. Society for Experimental Biology*. Abstracts of Contributions S10. Glasgow, Gran Bretaña.
- García-Sánchez MJ., Paz Jaime M., Ramos A., Sanders D., Fernández JA. 2000. Sodium-dependent nitrate transport at the plasma membrane of leaf cells of the marine high plant *Zosera marina* L *Plant Physiology* 122, 879-885.

- Garrill A, Tyerman SD, Findlay GP. 1994. Ion channels in the plasma membrane of protoplast from the halophytic angiosperm *Zostera muelleri*. *Journal of Membrane Biology* 142: 381-393.
- Garty H., Benos DJ., 1988. Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-bockable Na⁺ channel. *Physiology Review* 68: 309-373.
- Gassmann W., Rubio F., Schroeder JJ. 1996. Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *The Plant Journal* 10: 869-882.
- Gilmour DJ., Kaaden R., Gimmler H. 1985. Vanadate inhibition of ATPases of *Dunaliella parva* in vitro and in vivo. *Journal of Plant Physiology* 118: 111-126.
- Glass ADM., Britto DT., Kaiser BN., Kighorn JR, Kronzucker J., Kumar A., Okamoto M., Rawat S., Siddiqi MY., Unkles SE., Vidmar JJ. 2002. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 855-864.
- Glass ADM., Shaff J., Kochian LV. 1992. Studies of the uptake of nitrate in barley. IV Electrophysiology. *Plant Physiology* 99: 456-463.
- Gradmann D., Tittor J., Goldfarb V. 1982. Electronic Cl⁻ pump in *Acetabularia philos*. *Trans. R. Soc. London Ser B* 299: 447-457
- Gradmann D., Bentrup WF. 1970. Light-induced membrane potential changes and rectification in *Acetabularia*. *Naturwissenschaften* 57: 46-47.
- Gradmann D., Boyd CM. 1995. Membrane voltage of marine phytoplankton, measured in the diatom *Coscodiscus radiatus*. *Marine Biology* 123: 645-650.
- Grossman A., Takahashi H. 2001. Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 163-210
- Gutknecht J., Dainty J. 1968. Ionic relations of marine algae. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 6: 163-200.
- Harrison PG. 1991. Mechanisms of seed dormancy in an annual population of *Zostera marina* (eelgrass) from the Netherlands. *Canadian Journal of Botany* 69: 1972-1976.

- Hasegawa PM., Bressan RA., Zhu JK., Bohnert HJ. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.
- Hassidim M., Baum Y., Lerner HR., Reinhold L. 1990. Na⁺ / H⁺ and K⁺ / H⁺ antiport in root membrane vesicles isolated from the halophyte *Atriplex* and glycophyte cotton. *Plant Physiology* 94: 1795-1801.
- Hayes DE., Smith FA., Walker A. 2001. High-affinity potassium transport into wheat roots involves sodium - a role for HKT1? *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 643-652.
- Hellblom F, Beer S, Axelsson L, 2001. A buffer sensitive inorganic carbon utilisation system in *Zostera marina*. *Aquatic Botany* 69: 55-62.
- Hellblom F, Björk M. 1999. Photosynthetic responses in *Zostera marina* to decreasing salinity, inorganic carbon content and osmolality. *Aquatic Botany* 65: 97-104.
- Hellblom F, Beer Sven, Björk M and Axelsson L 2001. A buffer sensitive inorganic carbon utilisation system in *Zostera marina*. *Aquatic Botany* 69: 55-62.
- Hellebust JA. 1978. Uptake of organic substrates by *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae): effects of ions, ionophores and metabolic and inhibitors. *Journal of Phycology* 14, 79-83.
- Hemminga MA. 1998. The root/rhizome system of seagrasses: an asset and burden. *Journal of Sea Research* 39: 183-96.
- Hemminga MA, Duarte C. M 2000. *Seagrass Ecology*. Cambridge University Press.
- Hemminga MA., Koutstaal BP., van Soelen J y Merks AGA. 1994. The nitrogen supply to intertidal eelgrass (*Zostera marina*). *Marine Biology* 118: 223-227.
- Hendrich R., Schroeder J. 1989. The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 539-569.
- Hill BH. 1979. Uptake and release of nutrients by aquatic macrophytes. *Aquatic Botany* 7: 87-93.
- Hille B. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2nd Edition. Sinauer Associates

- Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Hootsmans MJM, Vermaat JE, van Vierseen W. 1987. Seed-bank development, germination and early seedling survival of two seagrass species from the Netherlands: *Zostera marina* L. and *Zostera noltii* Hornem. *Aquatic Botany*, 28: 275-285.
- Hope AB. 1971. *Ion transport and membranes. A biophysical outline*. London, Baltimore: Butterworths and University Park Press.
- Howitt SM., Udvardi MK. 2000. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 152-170.
- Iizumi H., Hattori A. 1982. Growth and organic production of eelgrass (*Zostera marina* L) in temperate waters of the Pacific coast of Japan. III. Kinetics of nitrogen uptake. *Aquatic Botany* 12: 245-256.
- Invers O, Pérz M, Romero J. 1999. Bicarbonate utilization in seagrass photosynthesis. Role of carbonic-anhydrase in *Posidonia oceanica* (L) Delile and *Cymodocea nodosa* (Ucria). *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 235: 125-133.
- Jiang X-Y, Rodriguez-Rosales MP, Belver A, Venema K. 2004. Identificación y caracterización de sistemas de antiporte catión/protón de tomate y su implicación en la tolerancia a salinidad. Libro de Resúmenes VII Reunión de Biología Molecular de las Plantas. Benalmádena-Costa (España).
- Katz A., Kleyman TR., Pick U. 1994. Utilization of amiloride analogs for characterization and labelling of the plasma membrane Na⁺ / H⁺ antiporter from *Dunaliella salina*. *Biochemistry* 33: 2389-2393.
- Khuri, R.N., Bogharian, K.K. & Agulian, S.K. 1974. Intracellular bicarbonate in single skeletal muscle fibers. *Pflügers Arch.*, 349:285-94.
- Kiegle EA., Bisson MA. 1996. Plasma membrane Na⁺ transport in a salt-tolerant carophyte. Isotopic fluxes, electrophysiology, and thermodynamics in plants adapted to saltwater and freshwater. *Plant Physiology* 11: 1191-1197.
- Kochian LV. 2000. Molecular physiology of mineral nutrient acquisition, transport, and utilization. En *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. B. Buchanan, W.

- Guissem, R. Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists.
- Kronzucker HJ., Siddiqi MY., Glass ADM., Kirk GJD. 1999. Nitrate and ammonium synergism in rice. A subcellular flux analysis. *Plant Physiology* 119: 1041-1045
- Kronzucker HJ., Siddiqi MY., Glass ADM. 1996. Kinetics of NH_4^+ influx in spruce. *Plant Physiology* 110: 773-779.
- Kühn C., Barker L., Bürkle L., Frommer WB. 1999. Update on sucrose transport in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 50: 935-953.
- Kuo J., McComb AJ. 1989. Seagrass taxonomy, structure and development. En: AWD Larkum AJ McComb & SA Sherpeerd *Biology of Seagrasses* ed. Elsevier. Amsterdam.
- Lalonde S., Wipf D., Frommer WB. 2004 Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annual Review of Plant Biology* 55: 341-372.
- Lara C., Rodríguez R., Guerrero MG. 1993. Sodium dependent nitrate transport and energetic in cyanobacteria. *Journal of Phycology* 29, 389-395.
- Larsson C. 1984. *Modern Methods of Plants Analysis*. New Series Volume I. Cell Components. Edited by H. F. Linkens and J. F. Jackson. Springer-Verlag. New York.
- Lass B., Ullrich-Eberius. 1984. Evidence for proton/sulfate cotransport and its kinetics in *Lemna gibba* G1. *Planta* 161: 53-60.
- Laties GC. 1982. The cyanide resistant, alternative path in higher plant respiration *Annual Review of Plant Physiology* 33: 519 – 555.
- Lee KS., Dunton KH. 1999. Inorganic nitrogen acquisition in the seagrass *Thalassia testudinum*: development of a whole-plant nitrogen budget. *Limnology and Oceanography* 44: 1204-1215.
- Liu H., Trieu AT., Blaylock LA., Harrison MJ. 1998. Cloning and characterisation of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Molecular Plant Microbe Interact* 11, 14-22

- Liu J. Zhu JK. 1997. An *Arabidopsis* mutant requirement for potassium nutrition and salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 14960-14964.
- Lundborg T., Sandelius AS., Larsson C. 1981. Distribution of ATPases in wheat root membranes separated by phases partition. *Physiologia Plantarum* 52: 89-95.
- Maathuis FJ., Verlin D., Smith A., Sanders D., Fernández JA., Walker NA. 1996. The physiological relevance of Na⁺-coupled K⁺-transport. *Plant Physiology* 112: 281-289.
- Maathuis FJM., Sanders D. 1992. Plant membrane transport. *Current Opinion in Cell Biology* 4, 661-669.
- Maathuis FJM., Sanders D. 1999. Plasma membrane transport in context – making sense out of complexity. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 236-243.
- Maathuis FJM., Amtmann a. 1999. K⁺ nutrient and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Annals of Botany* 84: 123-133.
- Maathuis FJM., Prins HBA. 1990. Electrophysiological membrane characteristics of the salt tolerant *Plantago maritima* and the sensitive *Plantago media*. *Plant and Soil* 123: 233-238
- Marschner H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd Edition. Academic Press. London. UK.
- Martínez P., Persson B 1998. Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular General Genetics* 258, 628-639.
- Martinioa E., Klein M., Geisler M., Bovet L., Forestier C., Kolukisaoglu Ü., Müller-Röber B., Schutz B. 2002. Multifunctional of plant ABC transporter-more than just detoxifiers. *Planta* 214, 345-355.
- Martinoia E., Massonneau A., Frange N. 2000. Transport processes of solutes across the vacuolar membranes of higher plants. *Plant and Cell Physiology* 41, 1175-1186.
- McClure PR., Kochian LV., Spanswich RMJ., Shaff J. 1990. Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on the membrane potentials.

- Plant Physiology* 76: 913-917.
- McMillan C. 1981. Seed reserves and seed germination for two seagrasses *Halodule wrightii* and *Syringodium filiforme* from the Western Atlantic. *Aquatic Botany* 11: 279-296.
- McRoy CP., Barsdate RJ., Nerbert M. 1972. Phosphorus cycling in an eelgrass (*Zostera marina*) ecosystem. *Limnology and Oceanography* 17: 58-67.
- McRoy CP., McMillan C. 1977. Production ecology and physiology of seagrasses. En: *Seagrass Ecosystems: A Scientific Perspective*. Eds. McRoy & Helfferich. Marcel Dekker. New York.
- Miller AJ., Cookson SJ., Smith SJ., Wells DM. 2001. The use of microelectrodes to investigate compartmentation and the transport of metabolised inorganic ions in plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 541-549.
- Mimura T. 1995 Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. *Plant Cell and Environment* 36: 1-7.
- Mimura T. 2001. Physiological control of phosphate uptake and phosphate homeostasis in barley leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 653-658.
- Mimura T., Reid RJ., Smith FA. 1998. Control of phosphate transport across the plasma membrane of *Chara corallina*. *Journal of Experimental Botany* 49: 13-19.
- Mimura T., Yin ZH., Wirth E., Dietz KJ. 1992. Phosphate transport and apoplasmic phosphate homeostasis in barley leaves. *Plant and Cell Physiology* 33: 563-568.
- Mistrik I., Ullrich CI. 1996. Mechanism of anion uptake in plants roots: quantitative evaluation of $H^+/H_2PO_4^-$ stoichiometries. *Plant Physiology and Biochemistry* 34: 629-636.
- Mitsukawa N., Okumura S., Shiarano Y., Sato S., Harashima S., Shibata D. 1997. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 94: 7098-7102.
- Moore KA., Orth RJ., Nowak JF 1993. Environmental regulation of seed germination in *Zostera marina* L. (eelgrass) in Chesapeake Bay: effects of light, oxygen and

- sediment burial. *Aquatic Botany* 45: 79-91.
- Muramatsu Y., Harada A., Ohwaki Y., Kasahara Y., Takagi S., Fukuhara T. 2002. Salt-tolerance ATPase activity in the plasma membrane of the marine angiosperm *Zostera marina* L. *Plant and Cell Physiology* 43: 1137-1145.
- Niu X., Bressan RA., Hasegawa PM., Pardo, JM. 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology* 109: 735-742.
- Nobel PS. 1983. *Biophysical Plant Physiology and Ecology*. WH. Freeman and Company. San Francisco.
- Orth RJ., Moore KA. 1983 Seed germination and seedling growth of *Zostera marina* L. (eelgrass) in the Chesapeake Bay. *Aquatic Botany* 15: 117-131.
- Orth RJ., Harwell MC., Bailey EM., Bartholomew A., Jawad JT., Lombana AV., Moore KA., Rhode JM., Woods HE. 2000. A review of issues in seagrass seed dormancy and germination: implications for conservation and restoration. *Marine Ecology Progress Series* 200: 277-288.
- Pak JY., Fukuhara T., Nitta T. 1995. Discrete subcellular localization of membrane-bound ATPase activity in marine angiosperm and marine algae. *Planta* 196: 15-22.
- Palmgren MG. 1990. An H⁺-ATPase assay: Proton pumping and ATPase activity determined in the same sample. *Plant Physiology* 94: 882-886.
- Palmgren MG. 2001. Plant plasma membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 817-845.
- Pardo JM. 2004. Integración de la homeostasis de sodio y potasio. *X Simposio Ibérico de Nutrição Mineral das Plantas*. Livro de Resumos. Lisboa.
- Parks GE., Dietrich MA., Schumaker K. 2002. Increased vacuolar Na⁺/H⁺ exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany* 53: 1055-1065.
- Pedersen MF., Paling EI., Walker DI. 1997. Nitrogen uptake and allocation in the seagrass *Amphibolis antarctica*. *Aquatic Botany* 56: 105-117.

- Peralta G., Bouma TJ., van Soelen J., Pérez-Lloréns JL., Hernández I. 2003. On the use of sediment fertilization for seagrass restoration: a mesocosm study on *Zostera marina* L. *Aquatic Botany* 75: 95-110
- Pérez-Llorens JL. 2004. Distribución y requerimientos ecológicos. Características morfológicas. En: Luque ÁA. Templado J. (Coords.) *Praderas y bosques marinos de Andalucía*, pp 157-158. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla, 336 pp
- Pérez-Llórens JL., Niell FX. 1995. Short-term phosphate uptake kinetics in *Zostera noltii* Hornem.: a comparison between excised leaves and sediment-rooted plants. *Hidrobiología* 297: 17-27.
- Pérez-Lloréns JL., Niell FX. 1993. Efecto de la salinidad en la liberación foliar de fosfato por la fanerógama acuática *Zostera noltii* Hornem. De las marismas del Río Palmones (Cádiz). *Limnética* 9: 29-35
- Pressman BC. 1976 Biological applications of ionophores. *Annual Review of Biochemistry* 45: 501-530.
- Qiu QS., Barkla BJ., Vera-Estrella R., Zhu JK., Schumaker KS. 2003 Na⁺/H⁺ exchange activity at the plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132: 1041-1052.
- Qiu QS., Guo Y., Dietrich MA., Schumaker KS., Zhu JK. 2002. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99: 8437-8441.
- Rae AL., Jarey JM., Mudge SR., Smith FW. 2003. Characterization of two phosphate transporters from barley; evidence for diverse function and kinetic properties among members of the Pht1 family. *Plant Molecular Biology* 53: 27-36.
- Rausch C., Bucher M. 2002. Molecular mechanism of phosphate transport in plants. *Planta* 216: 23-37
- Raven JA. 1984. Energetics and Transport in Aquatic Plants. MBL Lectures in Biology Vol. 4. Alan R. Iss, New York.
- Rea PA., Poole RJ. 1993. Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. *Annual Review of*

- Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44, 157-180.
- Rea PA., Sanders D. 1987. Tonoplast energization: Two H⁺ pumps, one membrane. *Plant Physiology* 71, 131-141.
- Rees TA., Cresswell RC., Syrett PJ. 1980. Sodium-dependent uptake of nitrate and urea by marine diatom. *Biochim Biophys Acta* 596, 141-144.
- Reid RJ., Mimura T., Ohsumi Y., Walker NA., Smith FA. 2000. Phosphate uptake in *Chara*: membrane transport via Na/Pi cotransport. *Plant and Cell Environment* 23, 223-228.
- Reusch TBH., Broström C., Stam WT., Olsen JL. 1999. An ancient eelgrass clone in the Baltic. *Marine Ecology Progress Series* 183: 301-304
- Riley JP, Chester R. 1971. *Introduction to Marine Chemistry*. Academic Press, London.
- Roberts JKM. 1990. Observation of uridine triphosphate; glucose 1 phosphate uridylyltransferase activity in maize root tips by saturation transfer 31P-NMR. Estimation of cytoplasmic PPI. *Biochimica et Biophysica Acta* 105, 29-36
- Rodriguez-Navarro A. 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469: 1-30.
- Rodríguez-Navarro A., Quintero FJ., Garcíadeblas B. 1994. Na⁺-ATPases and Na⁺/H⁺ antiporters in fungi. *Biochimica et Biophysica Acta* 1187: 203-205.
- Rubio F, Gassmann W, Schroeder JI. 1995. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science*. 270: 1600-1663.
- Rubio F, Gassmann W, Schroeder JI. 1996. High-affinity potassium uptake in plants. *Science* 273: 977-979.
- Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A., Reddy M., Lee BH., Matsumoto TK., Koiwa H., Zhu J-K., Bressan RA., Hasegawa PM. 2001. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98: 14150-14155.
- Sakano K. 1990. Proton/phosphate stoichiometry in uptake of inorganic phosphate by cultured cells of *Catharantus roseus* (L.) G-Don. *Plant Physiology* 93: 479-483.

- Sakano K., Yazaki Y., Mimura T. 1992. Cytoplasmic acidification induced by organic phosphate uptake in suspension cultured *Catarranthus roseus* cells- Measurements with fluorescent pH indicator and P-31 nuclear-magnetic-resonance. *Plant Physiology* 99: 672-680.
- Sakmann B., Neher E. (eds.). 1983). *Single-channel recording*. Plenum Press, New York.
- Sanders D. 1994. Proton-coupled chloride transport in plant cells. En: *Electrogenic Cl transporters in Biological Membranes. Advances in Comparative and Environmental Physiology, Vol 19* (ed GA Gerenser). Springer-Verlag, Berlin.
- Sanders D., Bethke P. 2000. Membrane transport. En *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. B. Buchanan, W. Guissem, R. Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists.
- Schäffner AR. 1998. Aquaporin function, structure and expression: Are there more surprises to surface in water relations? *Planta* 204: 131-139.
- Schachtman DP., Schroeder JI., Lucas WI., Anderson JA., Gaber RF. 1992. Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA. *Science* 258: 1654-1658.
- Schmidt ME. Heim S., Wylegalla C., Helmbrecht C., Wagner KG. 1992. Characterization of phosphate uptake by suspension cultured *Catharranthus roseus* cells. *Journal of Plant Physiology* 140: 179-184.
- Schroeder JI. 1995. Anion channels as central mechanisms for signal transduction in guard cells and putative functions in roots for plant-soil interactions. *Plant Molecular Biology* 28: 353-361.
- Sentenac H., Bonneaud N., Minet M., Lacroute F., Salmon JM., Gaymard F., Gignon C. 1992. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256: 663-665.
- Serrano R., Rodríguez-Navarro A. 2001. Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 399-404.
- Serrano 1993. Structure, function and regulation of plasma membrane H⁺-ATPase. *FEBS Letter* 325, 108-111.

- Serrano R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annual Review of Plant Physiology* 40, 61-94.
- Shi H., Ishitani M., Kim Cs., Zhu JK. 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encode a putative Na⁺ / H⁺ antiporter. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* 97: 6896-6901
- Shi H., Zhu J-K. 2002. Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and ABA. *Plant Molecular Biology* 50: 543-550.
- Shimogawara K., Wykoff D., Grossman AR., Usuda H. 1999. Isolation and characterization of mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* unable to acclimate to phosphate limitation. *Plant Physiology* 120: 685-693.
- Shin JA. 1941. *Protocol Hand Book of Sea-Water Analysis*. Ind.Eng. Lhem. (Anal Edition) 13:33 In: Strickland, JDH &Parson, T.R.A.
- Shono M., Hara Y., Wada M., Fujii T. 1996. A sodium pump in the plasma membrane of the marine alga *Heterosigma akashiwo*. *Plant and Cell Physiology*. 37: 385-388.
- Short FT., McRoy CP 1984. Nitrogen uptake by leaves and roots of the seagrass *Zostera marina* L. *Botanica Maritima* 27, 41-57
- Siever R., Beck KC., Berner RA. 1965. Composition of interstitial waters of modern sediments. *Journal of Geology* 73: 39-73.
- Smith FA., Walker NA. 1989. Transport of potassium in *Chara australis* I. A symport with sodium. *Journal of Membrane Biology* 77: 123-137.
- Smith FW., Mudge SR., Rage AL., Glassop D. 2003 Phosphate transport in plants. *Plant and Soil* 248: 71-73.
- Spanswick RM. 1981. Electrogenic ion pumps. *Annual Review of Plant Physiology* 32: 267-289.
- Stapel J., Aarts TL., van Duynhoven BHM., de Groot JD., van den Hoogen PHW., Hemminga MA. 1996. Nutrient uptake by leaves and roots of the seagrass *Thalassia hemprichii* in the Spermonde Archipelago, Indonesia. *Marine Ecology Progress Series* 134: 195-206.
- Strasburguer E. 1994. *Tratado de Botánica*. Ediciones Omega,S.A., Barcelona.

- Sussman, M.R. 1994. Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 45:211-34
- Sze H., Li HX., Palmgren MG. 1999. Energetization of plant cell membranes by H⁺ - pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *The Plant Cell* 11: 677-689.
- Szyroki A., Ivashikina N., Dietrich P., Roelfsema MRG., Ache P., Reintanz B., Deeken R., Godde M., Felle H., Steinmeyer R., Palme K., Hendrich R. 2001. KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 2917-2971.
- Taiz L., Zeiger E. 1998. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland Massachusetts.
- Takahashi H., Watanabe-Takahashi A., Smith FW., Blake-Kalff M., Hawkesford MJ., Saito K. 2000. The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 23: 171-182.
- Terrados J., Williams SL. 1997. Leaf versus root nitrogen uptake by the surfgrass *Phyllospadix torreyi*. *Marine Ecology Progress Series* 149: 267-277.
- Tester M., Davenport R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503-527.
- Thomson BD., Clarkson DT., Brain P. 1990. Kinetics of phosphorus uptake by the germ-tubes of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *New Phytology* 116: 647-653.
- Thursby GB., Harlin MM. 1982. Leaf-root interaction in the uptake of ammonia by *Zostera marina*. *Marine Biology* 72: 109-112.
- Touchette BW., Burkholder JM. 2000. Review of nitrogen and phosphorus metabolism in seagrasses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 250: 133-167.
- Tyerman SD. 1989. Solute and water relationship of seagrasses. En: Larkum AWD, McComb AJ, Shepherd SA, eds. *Biology of Seagrasses*. Amsterdam: Elsevier Science Publications.
- Tyerman SD. 1992. Anion channels in plants. *Annual Review of Plant Physiology and*

- Plant Molecular Biology* 43: 351-373.
- Tyerman SD, Skerrett IK. 1999. Root ion channels and salinity. *Scientia Horticulturae* 78: 175-232.
- Ullrich CI, Novacky A. 1990. Extra- and intracellular pH and membrane potential changes induced by K^+ , Cl^- , $H_2PO_4^-$ and NO_3^- uptake and fusicoccin in root hairs of *Limnobium stoloniferum*. *Plant Physiology* 96, 1561-1567.
- Ullrich WR, Glaser E. 1982. Sodium-phosphate cotransport in the green alga *Ankistrodesmus braunii*. *Plant Science Letters* 27, 155-162.
- Ullrich WR., Larsson M., Larsson CM., Lesch S., Novacky A. 1984. Ammonium uptake in *Lemna gibba* G1, related membrane potential changes, and inhibition of anion uptake. *Physiologia Plantarum* 61: 369-376.
- Ullrich-Eberius CI, Novacky A, Fischer E, Lüttge U. 1981. Relationship between energy-dependent phosphate uptake and the electrical membrane potential in *Lemna gibba* G1. *Plant Physiology* 67, 797-801.
- Ullrich-Eberius CI, Sanz A, Novacky AJ. 1989. Evaluation of arsenate and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. *Journal of Experimental Botany* 40, 119-128.
- van der Leij M., Smith SJ., Miller AJ. 1998. Remobilisation of vacuolar stored nitrate in barley root cells. *Planta* 205: 64-72.
- van Katwijk MM., Schmitz GHW., Gasseling AP., van Avesaath PH. 1999. Effects of salinity and nutrient load and their interaction on *Zostera marina*. *Marine Ecology Progress Series* 190: 155-165.
- van Lent F., Verschuure JM. 1995. Comparative study on populations of *Zostera marina* L. (eelgrass); experimental germination and growth. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 185: 77-91.
- Venema K., Belver A., Marín-Manzano MC., Rodríguez-Rosales MP., Donaire JP. 2003. A novel intracellular K^+/H^+ antiporter related to Na^+/H^+ antiporters is important for K^+ ion homeostasis in plants. *Journal of Biological Chemistry* 278: 22453-22459.

- Venema K., Quintero FJ., Pardo JM., Donaire JP. 2002. The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *Journal of Biological Chemistry* 227: 2413-2418.
- Vermaat JE, Verhagen FCA, Lindenburg D. 2000. Contrasting responses in two populations of *Zostera noltii* Hornem to experimental photoperiod manipulation at two salinities. *Aquatic Botany* 67: 179-189.
- Versaw W, Metzenberg R. 1995. Repressible cation-phosphate symporters in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 92, 3884-3887.
- Véry AA., Sentenac H. 2003. Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 54: 575-603.
- Vidmar JJ, Schjoerring JK, Touraine B, Glass ADM. 1999. Regulation of the *hvst1* gene encoding a high-affinity sulphate transporter from *Hordeum vulgare*. *Plant Molecular Biology* 40: 883-892.
- Walker DJ, Smith SJ and Miller AJ. 1995. Simultaneous measurement of intracellular pH and K or NO₃⁻ in barley root cells using triple-barreled, ions selective microelectrodes. *Plant Physiology* 108: 743-751.
- Walker NA, Sanders D. 1991. Sodium-coupled solute transport in charophyte algae: a general mechanism for transport energisation in plant cells?. *Planta* 185: 443-445.
- Walker NA. 1994. Sodium-coupled symports in the plasma membrane of plant cells. *In* MR Blatt, RA Leigh, D Sanders, eds, *Membrane Transport in Plant and Fungi: Molecular Mechanisms and control*, Society for Experimental Biology symposium XLVIII. The company of biologist, Cambridge, UK.
- Wang MY., Glass ADM., Shaff JE., Kochian LV. 1994. Ammonium uptake by rice roots. III. Electrophysiology. *Plant physiology* 104: 899-906.
- Wang MY., Siddiqui MY., Ruth TJ., Glass ADM. 1993. Ammonium uptake by rice roots. II Kinetics of ¹³NH₄⁺ influx across the plasmalemma. *Plant Physiology* 103:1259-1267.
- Wang T-B., Gassmann W., Rubio F., Schroeder JI., Glass ADM. 1998. Rapid up-regulation of *HKT1*, a high-affinity potassium transporter gene, in roots of barley

- and wheat following withdrawal of potassium. *Plant Physiology* 118: 651-659
- Ward JM., Hirschi KD., Sze H. 2003. Plants pass the salt. *TRENDS in Plant Science* 8: 200-201.
- Ward JM. 1997. Patch-clamping and other molecular approaches for the study of plasma membrane transporters demystified. *Plant Physiology* 114: 1151-1159
- Ward JM., Pei Z-M., Schroeder JI. 1995. Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell* 7: 833-844.
- Weig A., Deswarte C., Chispeels MJ. 1997. The major intrinsic protein family of *Aabidopsis* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiology*. 114: 1347-1357.
- Wells DM., Miller AJ 2000. Intracellular measurements of ammonium in *Chara corallina* using-selective microelectrodes. *Plant and Soil* 221: 103-106.
- White PJ, Broadley MR. 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* 92, 487-511.
- White PJ. 1999. The molecular mechanism of sodium influx to root cells. *Trends in Plant Sciences* 4: 245-246.
- Widell S., Larsson C. 1981. Separation of presumptive plasma membranes from mitochondria by partition in an aqueous polymer two-phases system. *Physiologia Plantarum* 51: 368-374.
- Williams LE., Miller AJ. 2001. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogen solutes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 659-688.
- Wu Z, Liang F, Hong B, Young JC, Sussman MR, Harper JF, Sze H. 2002. An endoplasmic reticulum-bound $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ pump, ECA1, supports plant growth and confers tolerance to Mn^{2+} stress. *Plant Physiology* 130, 128-137.
- Ye CJ., Zhao KF. 2003. Osmotically active compounds and their localization in the marine halophyte eelgrass. *Biologia Plantarum* 46: 137-140.
- Yeo A. 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany* 49: 915-929.

- Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruíz MT, Bressan RA, Hasegawa PM and Pardo JM. 2002. Diofferential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *The plant Journal* 30: 529-539.
- Yoshida S., Uemura M., Niki T., Sakai A., Gusta LV. 1983. Partition of membranes particles in aqueous two-polymer phase system and its practical use for purification of plasma membranes from plants. *Plant Physiology* 72: 105-114.
- Zhu JK 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sciences* 6: 66-71.
- Zhu JK. 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124: 941-948.
- Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247-273.
- Zhu J-K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 441-445
- Zimmermann S, Ehrhardt T, Plesch G, Müller-Röber B. 1999. Ion channels in plant signalling. *Cell and Molecular Life Sciences* 55: 183-203.
- Zimmermann S, Sentenac H. 1999. Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 477-482.
- Zvyagilskaya R, Parchomenko O, Abramova N, Allard P, Panaretakis T, Pattison-Granberg J, Persson BL. 2001. Proton- and sodium-coupled phosphate transport systems and energy status of *Yarrowia lipolytica* cells in acidic and alkaline conditions. *Journal of Membrane Biology* 183, 39-50.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de diferentes sistemas de transporte presentes en membranas vegetales.	18
Figura 2. Esquema de los procesos de transporte de Na ⁺ relacionados con la tolerancia a salinidad de plantas vasculares.	22
Figura 3. Esquema de la morfología general de las angiospermas marinas.	33
Figura 4. Estructuras florales de <i>Z. marina</i> .	35
Figura 5. Plántula de <i>Z. marina</i> .	36
Figura 6. Recolección y mantenimiento de plantas de <i>Z. marina</i> .	38
Figura 7. Recolección de plantas con semillas de <i>Z. marina</i> .	39
Figura 8. Componentes de un puesto de electrofisiología.	45
Figura 9. Microelectrodos introducidos en células del mesófilo foliar y de la epidermis radicular de <i>Z. marina</i> .	46
Figura 10. Esquema de la medida con microelectrodos selectivos para iones	48
Figura 11. Microelectrodo doble conectado a las sondas A y B del electrómetro.	52
Figura 12. Ejemplo de la medida con microelectrodos selectivos para H ⁺	54
Figura 13. Esquema de la purificación de vesículas de plasmalema.	58
Figura 14. Ejemplo de caracterización electrofisiológica del transporte de NO ₃ ⁻	64
Figura 15. Incubación de raíces y hojas de <i>Z. marina</i> en diferentes medios de ensayo.	71
Figura 16. Semillas de <i>Z. marina</i> .	81
Figura 17. Obtención <i>in vitro</i> de plántulas de <i>Z. marina</i> .	82
Figura 18. Medida del potencial de membrana de células epidérmicas de la raíz.	84

Figura 19. Medidas del potencial de membrana de células del mesófilo foliar	85
Figura 20. Efecto de la adición de NO_3^- sobre el E_m de una célula epidérmica de la raíz.	87
Figura 21. Representación de las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de NO_3^- .	88
Figura 22. Efecto de la acidificación del medio sobre las despolarizaciones inducidas por NO_3^- .	89
Figura 23. Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones inducidas por NO_3^-	90
Figura 24. Efecto de la adición de NH_4^+ sobre el E_m de una célula del mesófilo foliar.	92
Figura 25. Representación de las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de NH_4^+ en células del mesófilo foliar.	93
Figura 26. Efecto de la acidificación del medio sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ en células del mesófilo foliar.	95
Figura 27. Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones producidas por NH_4^+ .	96
Figura 28. Efecto de la adición de NH_4^+ sobre el E_m de una célula epidérmica de la raíz.	97
Figura 29. Representación de las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de NH_4^+ en células epidérmicas de la raíz.	98
Figura 30. Efecto de la acidificación sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ .	100
Figura 31. Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones inducidas por NH_4^+ en células de la epidermis radicular.	101
Figura 32. Efecto de la adición de P_i sobre el E_m de una célula epidérmica de la raíz.	103
Figura 33. Representación de las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de P_i en células epidérmicas de la raíz	104
Figura 34. Efecto del Na^+ sobre las despolarizaciones inducidas por P_i	

en células de la epidermis radicular.	106
Figura 35. Efecto del Na^+ sobre la incorporación de NO_3^- con respecto al tiempo en raíz.	108
Figura 36. Efecto del Na^+ sobre la incorporación de P_i con respecto al tiempo.	111
Figura 37. Efecto de la variación de la concentración de externa de K^+ sobre el E_D de una célula epidérmica de la raíz.	115
Figura 38. Efecto de la adición de NaCN sobre el pH citoplasmático de una célula de la epidermis radicular	119
Figura 39. Calibración de un microelectrodo de Na^+ .	121
Figura 40. Efecto del pH y KCl sobre la calibración los microelectrodos de Na^+ .	123
Figura 41. Relación entre la actividad y la concentración de Na^+ .	124
Figura 42. Actividad citoplasmática de Na^+ en células de <i>Z. marina</i> .	125
Figura 43. Efecto del NaCN sobre la actividad citoplasmática de Na^+ .	127
Figura 44. Efecto de la adición de monensina y amilorida sobre la actividad citoplasmática de Na^+ .	128
Figura 45. Efecto de la adición de NO_3^- y P_i sobre la actividad citoplasmática de Na^+ .	130
Figura 46. Variación de la fluorescencia relativa, expresada en %, en presencia de Mg^{2+} .	132
Figura 47. Efecto del vanadato sobre la formación del gradiente de pH en vesículas de plasmalema.	133
Figura 48. Efecto de la adición de Na^+ sobre el gradiente de H^+ en vesículas de plasmalema.	135
Figura 49. Disipación del gradiente de pH en vesículas de plasmalema en función de la concentración de Na^+ añadida.	136
Figura 50. Efecto de adición de la amilorida sobre la disipación del gradiente de pH inducida por Na^+ .	137

Figura 51. Incremento de energía libre asociada al transporte de NO_3^- .	161
Figura 52. Incremento de energía libre asociada al transporte de P_i .	164
Figura 53. Esquema de los sistemas de transporte caracterizados en plasmalema de células del mesófilo foliar y de la epidermis radicular de <i>Z. marina</i> .	174

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Logaritmos de los coeficientes de selectividad H^+ - Na^+ y H^+ - K^+ de la resina utilizada en los microelectrodos de H^+	50
Tabla 2. Tasas netas de incorporación de NO_3^- de raíces y hojas de <i>Z. marina</i> en medios con diferente concentración de Na^+ .	109
Tabla 3. Tasas netas de incorporación de P_i de raíces y hojas de <i>Z. marina</i> en medios con diferente concentración de Na^+ .	113
Tabla 4. Contenido total de Na^+ y K^+ en hoja y raíces de <i>Z. marina</i> .	117
Tabla 5. Valores de K_m (μM) y D_{max} (mV) del transporte de NO_3^- , NH_4^+ y P_i en células epidérmicas de la raíz y del mesófilo foliar de <i>Z. marina</i> .	149

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Potencial electroquímico	5
Ecuación 2. Gradiente de potencial electroquímico	6
Ecuación 3. Potencial de Nernst	6
Ecuación 4. Ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz	10
Ecuación 5. Calibración de la resina de H ⁺	53
Ecuación 6. Potencial de Nernst para Na ⁺	55
Ecuación 7. Calibración de la resina de Na ⁺	55
Ecuación 8. Permeabilidad relativa de Na ⁺ con respecto a K ⁺	72
Ecuación 9. Potencial de Nernst para K ⁺	145
Ecuación 10. Incremento de energía libre de Gibbs	160
Ecuación 11. Gradiente de potencial electroquímico para NH ₄ ⁺	165
Ecuación 12. Potencial de Nernst para NH ₄ ⁺	165

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
DPTO. BIOLOGÍA VEGETAL
FISIOLOGÍA VEGETAL