

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**FACULTAT DE BIOLOGIA**

**Departament de Biologia Vegetal**

ATPasa DE PLASMALEMA DE PLANTAS DE ARROZ: CARACTERIZACION Y EFECTO DEL CADMIO Y NIQUEL SOBRE SU ACTIVIDAD. RELACIONES CON LA COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA



Memoria que presenta

Roc Ros Palau

para optar al grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Valencia, Julio de 1991

UMI Number: U607676

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607676

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

D<sup>a</sup> Isabel Picazo González, Profesora Titular de Biología Vegetal en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València,

CERTIFICA: que D. Roc Ros Palau, Licenciado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral que lleva por título: " ATPasa de plasmalema de plantas de arroz: Caracterización y Efecto del Cadmio y Niquel sobre su actividad. Relaciones con la Composición Lipídica de la Membrana", trabajo que ha sido subvencionado con una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

Y para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firmo el presente certificado en Burjassot, a 15 de Julio de 1991.



Fdo. Isabel Picazo González



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS SOCIALES

C. D. U. R. 18776J3

N.º REG. 1453

Fecha 16.6.92

SIGNATUR: TD 417

BIBLIOTECA

C. D. U. R. 18776J3.

30 ans.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a la directora de esta Tesis, Dra. Isabel Picazo González, con quien me inicié en el mundo de la investigación, por su apoyo, orientación y ayuda.

En segundo lugar, al colectivo de personas de Long Ashton Research Station, en particular al Dr. David T. Cooke por su inestimable colaboración en todo momento durante mi estancia en Bristol (Inglaterra). Al Dr. Juan Segura por el interés incondicional mostrado en mi trabajo y porque ha sido para mi un colega. A la Dra. Amparo Sanz, por sus sabios consejos.

Al departamento de Química Analítica de la Universitat de València, especialmente al Dr. Angel Morales, con cuya colaboración se pudieron realizar las medidas de niveles endógenos de metales pesados.

Al servicio de Microscopía Electrónica, concretamente a Agustín Tato que hizo posible el aprendizaje de las técnicas de microscopía con resultados satisfactorios en un corto espacio de tiempo.

Al Dr. Ramón Carreres (IVIA, Sueca) por la cesión de las semillas con que se ha realizado este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Angeles, Maribel y José Luis, especialmente a la Dra. Carmen Martínez y a Lola (que pronto será Doctora) por haberme brindado su apoyo y amistad en todo momento y con los que he pasado momentos muy agradables. A Teresa por los miles de fotocopias y por los múltiples viajes a secretaría bajo el sol.

Finalmente, a mi familia y amigos, que no pertenecen a este mundo, pero que me han animado continuamente para que siguiese adelante, y sin cuyo estímulo este trabajo no habría sido posible.

A mis padres  
A Laura, Cayetano e Isabel

## ABREVIATURAS

- ACMA : 9-amino 6-cloro metoxiacridina
- AGR : tasa de crecimiento absoluto
- BI : sumatorio de porcentaje de cada ácido graso por el número de dobles enlaces
- BSA: albúmina del suero bovino
- C16:18: relación entre los ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono.
- Cd 5DR : plantas tratadas 5 días con cadmio 0.5 mM y recuperadas 5 días en medio control
- Cd 5DT : plantas tratadas 5 días con cadmio 0.5 mM
- Cd 10DR: plantas tratadas 5 días con cadmio 0.5 mM y recuperadas 10 días en medio control
- Cd 10DT: plantas tratadas 10 días con cadmio 0.5 mM
- DPH : 1,6-difenil-1,3,5,-hexatrieno
- DR : días de recuperación tras el tratamiento con metales
- DT : días de tratamiento con metales pesados
- EE: error estándar
- EGTA : ácido etilenglicol bis-(β-aminoetil éter) N,N,N',N'-tetraacético
- G-6-P : glucosa-6-fosfato
- Hepes : ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinaetansulfónico
- I<sub>3</sub> : fase inferior
- M: fracción microsomal
- Mes : ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
- MP : membrana plasmática
- NADPH-CCR : NADPH-citocromo c reductasa
- Ni 5DR : plantas tratadas 5 días con níquel y recuperadas 5 días en medio control
- Ni 5DT : plantas tratadas 5 días con níquel 0.5 mM
- Ni 10DR : plantas tratadas 5 días con níquel 0.5 mM y recuperadas 10 días en medio control
- Ni 10DT : plantas tratadas 10 días con níquel 0.5 mM
- p/p: Peso/Peso
- PA : ácido fosfatídico
- PC : fosfatidilcolina
- PE : fosfatidiletanolamina
- PF: peso fresco
- PG : fosfatidilglicerol
- PI : fosfatidilinositol

PL : fosfolípidos  
PNPP : p-nitrofenilfosfato  
PP<sub>i</sub> : pirofosfato  
PS : fosfatidilserina  
PS : peso seco  
PVP : polivinilpirrolidona  
S<sub>3</sub> : fase superior  
SDS : dodecíl sulfato sódico  
THF : Tetrahidrofurano  
Tricina : N-Tris(hidroximetil)-metil-glicina  
Tris : Tris(hidroximetil)aminometano  
v/v: Volumen/Volumen

# INDICE DE CAPITULOS

Página

<b>JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....</b>	<b>2</b>
---------------------------------------	----------

## **INTRODUCCION**

### **1. LA MEMBRANA PLASMATICA DE LOS VEGETALES**

1.1. Estructura y propiedades.....	6
1.2. Composición lipídica.....	7
1.3. Composición polipeptídica.....	8
1.4. Funciones.....	9

### **2. H<sup>+</sup>-ATPasa DE PLASMALEMA DE VEGETALES**

2.1. Características generales.....	9
2.2. Funciones.....	11
2.3. Estructura y mecanismo de acoplamiento.....	12
2.4. Regulación.....	13

### **3. LOS METALES PESADOS EN LAS PLANTAS**

3.1. Toxicidad y resistencia.....	16
3.2. Metales pesados y membrana plasmática.....	17

## **MATERIAL Y METODOS**

<b>1. MATERIAL VEGETAL.....</b>	<b>20</b>
<b>2. CULTIVO Y TRATAMIENTO DE LAS PLANTAS</b>	
2.1. Cultivo.....	20

2.2. Tratamiento con xenobióticos.....	21
2.2.1. Tratamiento <i>in vivo</i> .....	21
2.2.2. Tratamiento de la ATPasa <i>in vitro</i> con Ni y Cd.....	22
3. AISLAMIENTO DE VESICULAS DE MEMBRANA .....	
3.1. Extracción de la fracción microsomal.....	22
3.2. Aislamiento de vesículas de membrana plasmática .....	24
4. ANALISIS ENZIMATICOS	
4.1. Actividad ATPasa.....	25
4.2. Actividad IDPasa y Citocromo c reductasa.....	27
5. MICROSCOPIA ELECTRONICA.....	27
6. DETERMINACION DE NIVELES ENDOGENOS DE Cd Y NI	
6.1. Contenido de Cd y Ni en planta entera.....	29
6.2. Contenido de Cd y Ni en vesículas de plasmalema.....	30
7. ANALISIS DE ESTEROLES	
7.1. Preparación de las muestras.....	30
7.2. Análisis de esteroides.....	31
8. ANALISIS DE FOSFOLIPIDOS	
8.1. Preparación de las muestras.....	32
8.2. Separación de los fosfolípidos.....	32
8.3. Análisis de los ésteres de los ácidos grasos.....	33
9. DETERMINACION DE LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA.....	34
10. BOMBEO DE PROTONES.....	35
11. PROTEINAS.....	35

12. ANALISIS ESTADISTICO.....36

**RESULTADOS**

1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA MEMBRANA PLASMATICA.....38

2. PROPIEDADES DE LA ATPasa DE MEMBRANA PLASMATICA

    2.1. Estimulación por cloruro potásico.....41

    2.2. Dependencia del ATP.....45

    2.3. Dependencia del pH.....45

    2.4. Especificidad de sustrato y de iones.....49

    2.5. Inhibidores..... 52

3. EFECTO DEL Cd Y Ni SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa DE PLASMALEMA DE TALLOS Y RAICES DE ARROZ

    3.1. Experimentos *in vivo* ..... 58

    3.2. Experimentos *in vitro* .....58

4. NIVELES ENDOGENOS DE Cd Y Ni

    4.1. Niveles de Cd..... 61

    4.2. Niveles de Ni..... 64

5. EXPERIMENTOS DE TRATAMIENTO Y RECUPERACION CON Cd Y Ni

    5.1. Efecto del Cd y Ni sobre la tasa de crecimiento y sobre la relación Peso Seco: Peso Fresco..... 66

    5.2. Efecto del Cd y Ni sobre la actividad ATPasa, composición y propiedades de la membrana plasmática..... 66

5.2.1. Actividad hidrolítica de la ATPasa y bombeo de protones.....	66
5.2.2. Contenido proteico y lipídico de la membrana plasmática.....	69
5.2.2.1. Esteroles de la membrana plasmática.....	69
5.2.2.2. Fosfolípidos de la membrana plasmática.....	74
5.2.3. Fluidez de la membrana plasmática.....	78
6. EFECTO DEL MCPA, KETOTRIAZOLY CARBARIL SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa Y CONTENIDO LIPIDICO DE LA MEMBRANA PLASMATICA.....	78
<b>DISCUSION</b>	
1. CARACTERIZACION DE LA ATPasa DE PLASMALEMA DE RAICES DE ARROZ.....	83
2. LIPIDOS DE LA MEMBRANA PLASMATICA DE TALLOS DE ARROZ.....	87
3. EFECTO DE LOS XENOBIOTICOS SOBRE LA ATPasa Y SOBRE LA COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA PLASMATICA.....	88
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>100</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>104</b>
<b>APENDICE I.....</b>	<b>120</b>

## JUSTIFICACION Y OBJETIVOS



## JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

El aumento creciente de los niveles de metales pesados en aguas y suelos como consecuencia de la actividad antropogénica y el uso sistemático de productos fitosanitarios en los cultivos, está provocando desequilibrios en los ecosistemas. Los programas conducentes a la solución de este problema requieren necesariamente un conocimiento previo del mecanismo de acción de estos agentes sobre los seres vivos, y particularmente sobre las plantas, por constituir el primer eslabón de la cadena trófica.

En este trabajo hemos utilizado plantas de arroz, cultivo tradicional ampliamente extendido en el País Valenciano y de gran importancia en la alimentación humana. La mayor parte del arroz de nuestra Comunidad (16.000 hectáreas) crece en las riberas del lago Albufera, siendo irrigado por sus aguas. Este lago recibe gran cantidad de aportes de aguas residuales procedentes de zonas urbanas, así como de la industria y de la agricultura, habiéndose detectado, en agua y sedimento, niveles importantes de metales pesados y productos fitosanitarios.

En nuestros experimentos hemos utilizado los metales cadmio y níquel, y los pesticidas MCPA, Carbaril y *p*-Ketotriazol. Los metales Cd y Ni han sido detectados en aguas de la Albufera y se sabe que excesos de ambos elementos producen efectos tóxicos sobre las plantas. El níquel reduce el crecimiento de las plantas a concentraciones relativamente bajas y se le considera muy tóxico para numerosas especies. El Cd, además de ejercer un efecto tóxico sobre los vegetales, ha sido considerado como un poderoso agente mutagénico, carcinogénico y teratogénico en animales, pudiendo resultar altamente perjudicial para el hombre. Como ejemplo podemos citar la enfermedad Itai-Itai causada por la entrada de Cd vía plantas en la cadena alimentaria. En

cuanto a los pesticidas, se seleccionaron el insecticida Carbaril y el herbicida MCPA por ser muy utilizados en el cultivo del arroz en esta Comunidad. Por último, el  $\gamma$ -Ketotriazol fue elegido por constituir un herbicida experimental que inhibe específicamente la ruta biosintética de los esteroides por lo que ha sido empleado en experimentos similares a los que pretendíamos llevar a cabo.

Hasta la fecha, se han realizado distintas aproximaciones al estudio del efecto de los xenobióticos en las plantas. Por ejemplo, estudios sobre absorción y bioacumulación o sobre alteraciones estructurales y morfológicas. Asimismo, se han estudiado los efectos de los xenobióticos sobre determinados procesos fisiológicos como fotosíntesis, respiración o actividades enzimáticas específicas. En este trabajo hemos estudiado el efecto de los xenobióticos sobre la composición y propiedades de la membrana plasmática así como sobre su actividad ATPasa por dos razones fundamentales:

- La membrana plasmática es la barrera permeable más externa de las células vegetales y por tanto la primera en detectar los cambios del medio ambiente.

- La ATPasa ha sido descrita como una enzima clave que controla numerosas funciones de vital importancia para la planta, habiendo sido recientemente relacionada con la adaptación a las condiciones ambientales.

El modelo experimental utilizado ha sido vesículas de membrana, las cuales presentan diversas ventajas:

- Carecen de constituyentes citoplásmicos y por tanto sus actividades metabólicas quedan reducidas a las enzimas asociadas a la propia membrana. Esto permite estudiar la regulación directa de las enzimas por parámetros físicos o químicos.

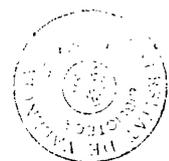
- Catalizan el transporte de solutos con propiedades comparables a las de las células intactas, tales como tasas de transporte, regulación y

de las células intactas, tales como tasas de transporte, regulación y especificidad.

De acuerdo con todo lo expuesto, los objetivos concretos de este trabajo han sido:

- 1) Caracterización de la ATPasa de plasmalema de raíces de arroz: estimulación por cationes, efecto de inhibidores, determinación de los parámetros cinéticos, especificidad de sustrato y pH óptimo.
- 2) Estudio de las interacciones de la ATPasa con su medio acuoso mediante la modificación de las condiciones de ensayo.
- 3) Estudio del efecto y modo de acción de los xenobióticos anteriormente mencionados sobre la ATPasa de tallos y raíces de arroz.
- 4) Determinación de la composición y propiedades de la membrana plasmática así como de los cambios producidos tras los tratamientos con xenobióticos.
- 5) Estudio del posible papel regulador de la actividad ATPasa por lípidos, y de las relaciones entre crecimiento, ATPasa y adaptaciones a condiciones de estrés.

# INTRODUCCION



# 1. LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LOS VEGETALES

## 1.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

Todas las membranas biológicas, incluida la membrana plasmática (MP) y las membranas internas de las células eucarióticas, tienen una estructura general común: se trata de agrupaciones de moléculas lipídicas y proteicas unidas fundamentalmente por interacciones no covalentes. Las moléculas lipídicas, dispuestas en forma de una doble capa continua, constituyen la estructura básica de la membrana. Debido a su fluidez, los lípidos que forman esta bicapa pueden difundir rápidamente dentro de su propia monocapa, aunque rara vez pasan de una monocapa a otra. Igualmente, las proteínas pueden difundir libremente en el plano de la membrana. No obstante, las células pueden restringir la movilidad lateral de determinadas proteínas trabándolas a otras macromoléculas de la cara externa o citoplasmática. Dependiendo de su solubilidad en la fase lipídica, las proteínas pueden atravesar la bicapa o situarse a uno u otro lado de la misma estableciendo enlaces covalentes con cadenas de ácidos grasos o interacciones no covalentes con proteínas transmembrana (Alberts, 1986). Las regiones apolares de las proteínas interactúan con las regiones hidrófobas de la bicapa lipídica, mientras que las regiones polares o cargadas lo hacen con las cabezas polares lipídicas en la superficie de la bicapa (Genis, 1989). La MP de vegetales también contiene carbohidratos, que se unen covalentemente a las proteínas periféricas y a algunas de las moléculas lipídicas de la monocapa externa (Alberts, 1986).

Las proporciones entre los distintos componentes de la membrana no están claras. Los análisis realizados en hojas de cebada y espinaca muestran

que sus membranas contienen, respectivamente, un 30 % y un 40 % (p/p) de proteínas. (Kjellbom y Larsson, 1984). El 60-70 % restante se repartiría entre lípidos y carbohidratos.

Los estudios de las propiedades de la MP de plantas han mostrado una densidad entre 1.13-1.18 g cm<sup>-3</sup> (Quail, 1979), un grosor entre 9-11 nm (Morré y Bracker, 1976) y una carga superficial negativa a pH neutro, cuyo valor varía en las distintas especies (Møller et al., 1984) y órganos de la misma especie (Körner et al., 1985). Dicha carga origina un potencial de superficie negativo que puede modificar el pH óptimo y la K<sub>m</sub> aparente de las enzimas de membrana que requieren sustratos cargados (Edman et al., 1985).

## 1.2. COMPOSICION LIPIDICA

El conocimiento de la composición lipídica de la membrana es importante, entre otras razones, porque la actividad de las proteínas integrales depende en gran medida de las propiedades de la bicapa (Carruthers y Melchior, 1986).

Los lípidos más abundantes en la MP de las especies vegetales estudiados son fosfolípidos, esteroides y glucolípidos. La mayor parte de los esteroides aparecen en forma libre, constituyendo un porcentaje importante de los lípidos totales. Así, en raíces de cebada llegan a representar el 57 % molar de los lípidos totales (Rochester et al., 1987 a). El sitosterol, el campesterol y el estigmasterol son normalmente los más abundantes (Uemura y Yoshida, 1986; Lynch y Steponkus, 1987), aunque en algunas especies el colesterol es el componente principal (Burden et al., 1987).

El glucolípido más importante es el glucocerebrósido, pero también aparecen cantidades pequeñas de monogalactosil-diácil-glicerol y

dígalactosil-díacil-glicerol (Rochester et al. 1987 a,b; Yoshida y Uemura, 1986).

En cuanto a los fosfolípidos, PE y PC son los dominantes, aunque también se han detectado cantidades variables de PA, PG, PI y PS (Lynch y Stenpokus, 1987; Yoshida y Uemura, 1986). Los ácidos grasos más abundantes son el palmítico (16:0), linoléico (18:2) y linolénico (18:3) (White et al., 1990; Rochester et al., 1987 b).

### 1.3. COMPOSICION POLIPEPTIDICA

Las electroforesis unidimensionales de extractos de MP muestran alrededor de 50 bandas polipeptídicas, algunas de las cuales se tiñen con concavalina A indicando su naturaleza glucoproteica (Grimes y Breidenbach, 1987). En electroforesis en geles bidimensionales se ha observado un número mucho mayor de bandas polipeptídicas (Uemura y Yoshida, 1985) pero únicamente algunas han sido identificadas. Entre ellas se encuentra la H<sup>+</sup>-ATPasa de 100 kD (Serrano, 1984 a), la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de 140 kD (Briars et al., 1989), un posible transportador de glucosa de 42 kD (Gallet et al., 1989), el receptor de fusicoccina, que consta de dos polipéptidos de 30 y 31 kD respectivamente (de Boer et al., 1989) y calmodulina de 18 kD (Collinge y Trewavas, 1989).

Del total de proteínas, se cree que un 80 % serían intrínsecas y solamente un 20 % periféricas, situándose fundamentalmente en la cara citoplásmica de la membrana (Kejlilbom et al., 1989).

## 1.4. FUNCIONES

La MP constituye una barrera lipídica relativamente impermeable al paso de la mayoría de las moléculas hidrosolubles. A su vez, proporciona una matriz para las proteínas transportadoras. La combinación de la barrera lipídica y de los transportadores selectivos de iones permite a la célula acumular elementos esenciales y excluir iones tóxicos manteniendo un medio intracelular relativamente constante.

Además de estar implicada en la absorción y extrusión de solutos, la MP interviene en la síntesis de pared celular (Delmer, 1990), en la unión y respuesta a hormonas (Gilroy y Trewavas, 1990), en la interacción con simbiontes (Brewin, 1990) y patógenos (Kauss, 1990) y en la adaptación a bajas temperaturas (Uemura y Yoshida, 1984 b; Steponkus et al., 1990). Por todo ello, la composición química de la MP de las plantas se encuentra en un estado dinámico de respuesta a factores ambientales, enfermedades y procesos de desarrollo (Yoshida y Uemura, 1984).

## 2. H<sup>+</sup>-ATPasa DE PLASMALEMA DE VEGETALES

### 2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los primeros trabajos que demostraron la existencia de una ATPasa con características propias asociada a la MP de vegetales fueron realizados por Hodges y col. en 1972. Estos autores relacionaron la actividad de la enzima con la energización del transporte de iones. Desde entonces, se han conseguido importantes avances en el estudio de la estructura, mecanismo y funciones de la enzima. Así, se ha demostrado el acoplamiento entre hidrólisis de ATP y

transporte utilizando vesículas de membrana y liposomas (Sze, 1984, Serrano 1983). Además, se ha obtenido una detallada caracterización bioquímica de la enzima en varias especies (De Michelis y Spanswich, 1986; Giannini y Briskin, 1989) y, recientemente, se ha clonado el gen de la ATPasa y deducida su secuencia de aminoácidos (Pardo y Serrano, 1989).

La H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP es una ATPasa de tipo P (o E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub>) como la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa de animales, la K<sup>+</sup>-ATPasa de bacterias, la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de retículo sarcoplásmico, la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de la MP o la H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa de la mucosa gástrica (Palmgren, 1990). Todas ellas se caracterizan por formar un intermediario fosforilado durante el ciclo catalítico. Las electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS de extractos de ATPasa de MP han demostrado que está formada por un polipéptido de peso molecular 100.000 (Serrano, 1984 a,b) que constituye la subunidad catalítica mínima capaz de hidrolizar ATP, aunque en condiciones naturales podría encontrarse formando estructuras oligoméricas (Briskin, 1990). Este polipéptido posee un residuo de aspártico al que se une el P<sub>i</sub> terminal del ATP durante el ciclo catalítico, formándose el intermediario fosforilado (Briskin y Leonard, 1982).

Mediante estudios cinéticos realizados con extractos de ATPasa parcialmente purificada se ha demostrado que su sustrato es el complejo Mg-ATP (Cocucci y Marré, 1984 ; Bennett et al., 1985). Este sustrato da cinéticas hiperbólicas con valores de K<sub>m</sub> entre 0.3 y 0.7 mM (Serrano, 1990). No obstante, cuando se ensaya la actividad de la enzima en vesículas de membrana, estos valores pueden ser mayores (Gibrat et al., 1985). La alta especificidad por el ATP como sustrato es una característica de la H<sup>+</sup>-ATPasa de plasmalema. La actividad de la enzima con otros di, trinucleótidos o monoésteres fosfato es menor del 10 % (Cocucci y Marré, 1984).

La ATPasa de la MP es inhibida por ortovanadato (que interfiere en la formación del intermediario fosforilado), pero es insensible a azida (inhibidor

de la ATPasa mitocondrial), nitrato (inhibidor de la ATPasa tonoplástica) y molibdato (Inhibidor de la fosfatasa ácida). También se han determinado otros inhibidores de la ATPasa, entre ellos los compuestos de cobre y de mercurio, lo que confirma la presencia en la enzima de grupos sulfhidrilo esenciales, como ya se había sugerido por los efectos protectores del ditioneitol durante la purificación (Serrano, 1990). La actividad basal  $Mg^{2+}$ -ATPasa es estimulada por cationes monovalentes ( $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $NH_4^+$ ), siendo el potasio generalmente el más efectivo. No obstante, el grado de estimulación de los distintos cationes e incluso la selectividad de los mismos varía según los autores (Gibrat et al., 1985; Sze, 1985; Memon, 1987; Harada et al., 1990). Los aniones no parecen afectar a la actividad de la enzima, que es óptima a un pH entre 6.0 y 6.5 (Sze, 1985; Harada et al., 1989).

## 2.2. FUNCIONES

La  $H^+$ -ATPasa de la MP proporciona la maquinaria proteica que permite el acoplamiento entre la hidrólisis de ATP y el transporte de  $H^+$ , generando un gradiente electroquímico a través de la membrana. La energía potencial conservada en este gradiente de protones se acopla al movimiento de solutos mediante sistemas de transporte secundario (Briskin, 1990). Además, se cree que la ATPasa juega un papel fundamental en diversos procesos fisiológicos a nivel celular e incluso a nivel de órgano que incluyen crecimiento, desarrollo y adaptaciones a las condiciones ambientales (Briskin, 1990; Serrano, 1989; Brauer y Tu, 1989).

La ATPasa puede controlar el crecimiento celular regulando la absorción de nutrientes, la turgencia y la actividad de enzimas dependientes del pH citoplasmático (Serrano, 1989). Además, según la teoría del crecimiento ácido, se requiere la acidificación del medio externo para

desencadenar una serie de procesos conducentes a la elongación celular (Rayle y Cleland, 1977).

A nivel de órgano, la absorción de nutrientes inorgánicos en el xilema, la carga en el floema y los cambios de turgencia responsables de los movimientos estomáticos y de los pulvínulos parecen depender de procesos de transporte activo controlados por la ATPasa (Lüttge y Higinbotham, 1979; Zeiger, 1983).

Por último, también se ha sugerido la participación de la bomba de protones en el desarrollo de polaridad en la células y órganos en crecimiento (Jaffe, 1981).

### 2.3. ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACOPLAMIENTO

Los conocimientos actuales sobre la ATPasa a nivel molecular son escasos, por lo que los modelos propuestos sobre su estructura y mecanismo se han basado en otras ATPasas de su misma familia mucho mejor estudiadas.

Serrano (1989,1990) ha propuesto un modelo estructural según el cual, la ATPasa está constituida por ocho o nueve segmentos hidrofóbicos que atraviesan la membrana, mientras que la mayor parte de las regiones hidrofílicas, donde se sitúan los dominios funcionales, se disponen en la cara citoplasmática. La enzima constaría de un dominio con actividad quinasa, de un dominio con actividad fosfatasa y de un dominio de transducción que acoplaría la hidrólisis de ATP al transporte de protones. Además, la ATPasa contendría un canal de H<sup>+</sup> constituido por seis segmentos hidrofóbicos dispuestos atravesando la membrana. El dominio de transducción, que contiene el residuo de aspártico que se fosforila durante el ciclo catalítico, se situaría en la abertura del canal de protones que da al lado citoplásmico.

El acoplamiento entre hidrólisis de ATP y transporte de H<sup>+</sup> implica un cambio conformacional de la enzima (Serrano, 1989,1990; Briskin 1990). Así, se supone que la ATPasa presenta dos estados conformacionales (E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>) que se alternan durante el ciclo catalítico. En la conformación E<sub>1</sub> es activo el dominio de la quinasa y el canal, abierto a la cara del citoplasma, presenta gran afinidad por los protones. En la conformación E<sub>2</sub>, es activo el dominio de la fosfatasa y el canal queda abierto al exterior celular con baja afinidad por los protones. La unión de un protón a la enzima (E<sub>1</sub>) induciría la actividad quinasa (o viceversa) produciéndose la fosforilación del residuo de aspártico en el dominio de transducción. Esto provoca el cambio conformacional de la enzima (E<sub>2</sub>) induciéndose la actividad fosfatasa y liberándose un protón al exterior celular. Tras la defosforilación del intermediario se produciría de nuevo un cambio conformacional reiniciándose el ciclo catalítico.

#### 2.4. REGULACION

No se conocen con exactitud el mecanismo o mecanismos que regulan la H<sup>+</sup>-ATPasa. Puesto que la enzima está implicada en numerosas funciones de vital importancia para la planta, se cree que puede estar controlada por diversos factores extrínsecos (luz, hormonas, medio externo) así como por mecanismos intrínsecos (Serrano , 1989; Palmgren, 1990; Briskin, 1990).

Entre los factores extrínsecos, el efecto del medio (pH, concentración de iones) sobre la actividad de la enzima es de particular interés en el plasmalema de raíces, ya que está expuesto a la variación de los iones en el suelo y es el responsable de la absorción de todos los elementos minerales en la planta (Marschner, 1983).

Se han sugerido varios posibles mecanismos de regulación intrínseca como control génico, modificaciones covalentes de la enzima mediante fosforilación con proteína-quinasa o proteólisis limitada y regulación no covalente con proteínas activadoras e inhibidoras (Palmgren, 1990). También se han descrito como candidatos de la regulación de la ATPasa los estados de oligomerización de la enzima (Briskin, 1990) y la modulación por el entorno lipídico (Cooke y Burden, 1990).

En relación a los lípidos, se han realizado diversos tipos de experimentos que apoyan su participación en la regulación de la ATPasa de la MP. El primer tipo de experimentos procede de estudios de reconstitución de preparaciones de ATPasa en vesículas sintéticas. Se ha observado que todas las preparaciones de enzima purificadas requieren fosfolípidos para presentar una actividad óptima, aunque el grado de estimulación y especificidad es variable. Por ejemplo, la ATPasa de rábano fue activa cuando se reconstituyó con PI pero no con PE o PC (Coccuci y Marré, 1984), mientras que la ATPasa de plántulas de *Vigna radiata* se activó con PC, PS y PG pero no con PI o PE (Kasamo y Nouchi, 1987). En avena, todos los fosfolípidos activaron a la ATPasa reconstituida, aunque la actividad fue mayor con fosfolípidos neutros que con ácidos (Serrano et al., 1988). No se sabe si las discrepancias encontradas en los requerimientos lipídicos de la ATPasa se deben al distinto origen de la enzima (Kasamo y Nouchi, 1987) o, por el contrario, las preferencias dependen del tipo de ensayo empleado para conseguir la interacción lípido-proteína (Brauer y Tu, 1989). Recientemente, se ha observado que la presencia de esteroides en los liposomas también modifica la actividad de la enzima (Grandmougin et al., 1989 a).

Un segundo tipo de experimentos se ha realizado modificando la composición lipídica de vesículas de membrana nativas, bien con la adición exógena de lípidos (Palmgren et al., 1988; Palmgren y Sommarin, 1989; Memon

et al., 1989; Cooke et al., 1990 a), bien con la eliminación parcial de éstos mediante surfactantes (Sandstrom y Cleland, 1989 a). El tercer tipo de experimentos ha consistido en la alteración de la composición lipídica de la MP tratando las plantas con pesticidas o reguladores del crecimiento que modifican específicamente la biosíntesis lipídica (Cooke et al., 1989). En ambos casos se han observado alteraciones de la actividad ATPasa.

Por tanto, parece posible una intervención de los lípidos en la regulación de la ATPasa, aunque su complejo metabolismo no permite por el momento, explicar una respuesta rápida de la enzima.

Se han propuesto dos hipótesis para explicar la regulación por lípidos de la ATPasa. La primera, postula un mecanismo indirecto vía cambios en la fluidez de la membrana ( Douglas y Walker, 1984). La segunda, descrita por Simmonds y col. (1982) explica la regulación de la ATPasa mediante interacciones directas lípido-proteína. Estos autores propusieron la "hipótesis Anular", según la cual los fosfolípidos se unen a los sitios anulares de la enzima (interfase lípido/proteína) y los esteroides a los no anulares (interfase proteína/proteína). Los esteroides inactivan la ATPasa mediante la unión a los sitios anulares, desplazando a los fosfolípidos. Las cadenas de los ácidos grasos de los fosfolípidos unidos a los sitios anulares pueden interaccionar con los sitios no-anulares solamente si poseen la longitud adecuada. Esta interacción determinaría la actividad de la enzima vía cambios conformacionales. El descubrimiento reciente de que el grado de saturación y la longitud de las cadenas de los ácidos grasos de los fosfolípidos influyen en la actividad de la ATPasa ( Palmgren y Sommarin, 1989; Kasamo, 1990) junto con la presencia de esteroides estrechamente asociados a la enzima (Sandstrom y Cleland, 1989 a) apoyarían esta hipótesis.

### 3. LOS METALES PESADOS EN LAS PLANTAS

#### 3.1. TOXICIDAD Y RESISTENCIA

Todas las plantas responden ante aumentos de la concentración de metales pesados en su ambiente. La naturaleza, dirección y magnitud de esta respuesta dependerá de la sensibilidad del individuo, de la intensidad (concentración y duración) de la exposición, del tipo de metal y de la forma en que esté presente (Baker y Walker, 1989 a).

Normalmente, los metales se acumulan en la planta a concentraciones superiores a las del medio y, dentro de ella, la raíz es el órgano de máxima acumulación (Barceló y Poschenrieder, 1989).

Entre los síntomas asociados a la toxicidad por los metales pesados aparecen generalmente, la clorosis y la reducción del crecimiento (Foy et al., 1978). A nivel molecular, los iones metálicos pueden producir la toxicidad por distintos mecanismos:

- Desplazando los iones metálicos esenciales de las biomoléculas.
- Bloqueando grupos funcionales esenciales de biomoléculas, incluyendo enzimas y polinucleótidos.
- Modificando la conformación activa de las moléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos.
- Desorganizando la integridad de las moléculas.
- Modificando otros agentes biológicos activos.

Resulta por tanto evidente que los metales pesados pueden influir en una gran variedad de reacciones y procesos fisiológicos en las plantas. Así por ejemplo, se ha demostrado que el Cd puede alterar procesos como la fotosíntesis ( Welgel, 1985; Becerril et al., 1988), la respiración (Lee et al.,

1976; Lamoreaux y Chaney, 1978) o las relaciones hídricas (Poschenrieder et al., 1989). La toxicidad por Ni ha sido menos estudiada, aunque se sabe que puede modificar la absorción de elementos minerales (Bollard, 1983), la extrusión de protones (Cocucci y Morgutti, 1986) o la fotosíntesis (Morgutti et al., 1984).

En cuanto a los mecanismos de resistencia, las plantas se defienden frente a los metales pesados, bien evitando su entrada, o bien volviéndose resistentes al elemento tóxico en el interior celular por diversos procesos como la exclusión del metal pesado del metabolismo o la tolerancia a su presencia mediante inmovilización o inactivación interna (Barceló y Poschenrieder, 1989). Las investigaciones sobre resistencia se han centrado, principalmente, en el estudio de complejos de unión a los metales, especialmente péptidos y proteínas, que los inactivan o inmovilizan en el interior celular (Tomsett y Thurman, 1988). Aunque se ha implicado a las fitoquelatinas en el mecanismo de resistencia al Cd, existen escasas evidencias que indiquen la participación de un sistema quelante interno en la resistencia al Ni (Verkleij y Schat, 1989). Sin embargo, se ha postulado que la resistencia al Ni está relacionada con la reducción de la absorción (Whoolhouse, 1983).

### 3.2. METALES PESADOS Y MEMBRANA PLASMÁTICA

Cualquiera que sea el efecto de los metales pesados sobre el metabolismo celular, éstos van a entrar en contacto con la membrana plasmática, pudiendo dañar su integridad (De Filippis, 1979) e interactuar con sus enzimas asociadas (van Assche y Clijsters, 1990). Además, los iones metálicos pueden atravesar la membrana y ejercer sus efectos tóxicos en el citoplasma. Así, la permeabilidad de la MP va a influir sobre la toxicidad de

los metales en los sistemas biológicos (Simkiss y Tailor, 1989). De hecho, los cambios en la estructura y composición de la membrana pueden afectar tanto la difusión pasiva como el transporte activo de los compuestos (Raison, 1980). En este sentido, Verkleij y Shat (1989) han sugerido que los cambios en la composición de la membrana podrían estar implicados en la resistencia a los metales pesados.

Por otra parte, el bombeo activo de metales desde el interior al exterior celular también se ha descrito como posible mecanismo de resistencia (Tomsett y Thurman, 1988). En este caso la H<sup>+</sup>-ATPasa podría estar implicada en el proceso de detoxificación.

A pesar del interés que presenta el estudio de las interacciones de los metales a nivel de membrana, los trabajos realizados hasta la fecha son escasos. Lindberg y Wingstrand (1985) observaron que la aplicación *in vitro* de Cd inhibía la actividad de la ATPasa. Otros autores han estudiado el efecto del Cd (Kennedy y Gonsalves, 1987) y Ni (Morgutti et al., 1984; Cocucci y Morgutti, 1986) sobre la extrusión de protones en tejido radicular. No se ha encontrado bibliografía sobre el efecto de estos metales en fracciones de plasmalema aisladas de plantas tratadas *in vivo*. No obstante, este tipo de estudios se ha realizado en plantas sometidas a otras condiciones de estrés como bajas temperaturas (Uemura y Yoshida, 1986), estrés salino (Douglas y Walker, 1984) o tratamiento con pesticidas y reguladores del crecimiento (Cooke et al., 1989).

## **MATERIAL Y METODOS**

## 1. MATERIAL VEGETAL

El trabajo experimental correspondiente a esta Tesis se ha realizado con plantas de arroz (*Oryza sativa* subespecie *comunis* L.) de la variedad Bahía. Las semillas fueron suministradas por el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, sección del arroz (IVIA, Sueca).

## 2. CULTIVO Y TRATAMIENTO DE LAS PLANTAS

### 2.1. CULTIVO

En los experimentos de caracterización de la ATPasa se partió de raíces de siete días crecidas en oscuridad a 30° C. La germinación y el crecimiento de las semillas se realizó en recipientes de plástico cerrados, en cuyo interior se habían depositado cuatro capas de papel de filtro humedecidas con agua destilada. En estos recipientes, se sembraron las semillas previamente esterilizadas con hipoclorito cálcico al 2 % durante 20 minutos. Las raíces crecidas después de siete días de incubación se utilizaron para la obtención de vesículas de membrana.

En los experimentos restantes, se utilizaron tallos y/o raíces de plantas crecidas en cultivo hidropónico. Las semillas se esterilizaron con hipoclorito sódico al 2 % y se sembraron sobre rejillas de acero inoxidable suspendidas en recipientes de plástico de 5 l que contenían la solución nutritiva constantemente aireada. La composición de la solución nutritiva fue la siguiente: KCl 1 mM, KNO<sub>3</sub> 3 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O 1 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 1mM, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.75 mM, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 2.4 mM, Fe-EDDHA (Sequestrene) 3 mg/l,

MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O 1 μM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 3 μM, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 0.1 μM, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.1 μM y (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4H<sub>2</sub>O 0.03 μM. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 30° C y 70 % de humedad relativa durante el día y a 25° C y 90 % de humedad relativa durante la noche, bajo un fotoperiodo de 16 horas y una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 30 μE cm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. La germinación de las semillas se llevó a cabo en oscuridad total durante los cinco primeros días.

En los experimentos de tratamiento y recuperación, las plantas crecieron en invernadero y fueron irradiadas con luz suplementaria para simular un fotoperiodo mínimo de 16 horas. Todas las demás condiciones fueron las mismas que para las plantas cultivadas en cámara de crecimiento.

## 2.2. TRATAMIENTO CON XENOBIOTICOS

### 2.2.1. TRATAMIENTOS *IN VIVO*

Los tratamientos *in vivo* se realizaron adicionando a la solución nutritiva donde crecían plantas de 6 días de edad los siguientes xenobióticos:

- Varias concentraciones de los metales pesados Cd (0.01, 0.1, 0,5 mM) y Ni (0.1, 0.5, 1 mM).
- MCPA (ácido [(4-cloro-o-tolil)oxi] acético) 1.4 μM.
- *p*-ketotriazol (1-[2-metoxifenil]-4,4-dimetil-1-(1,2,4-triazol-1-il) - 1-penten-3-ona) 0.5 μM.
- Carbaril (1-naftil metilcarbamato) 10 μM.

La duración del tratamiento varió entre 5 y 10 días. Algunas de las

plantas tratadas durante 5 días con Ni o Cd fueron recuperadas durante 5 ó 10 días en soluciones nutritivas nuevas sin metal pesado. Del mismo modo se renovó la solución nutritiva en sus controles respectivos.

Los tallos y/o raíces de las plantas control, tratadas y recuperadas fueron recogidos e inmediatamente utilizados para la obtención de vesículas de membrana.

### 2.2.2. TRATAMIENTO DE LA ATPasa *IN VITRO* CON NIQUEL Y CADMIO

En los tratamientos realizados a extractos de vesículas de MP obtenidos de plantas control se utilizaron diversas concentraciones de Cd o Ni (0.01, 0.1, 0.5 y 1 mM)

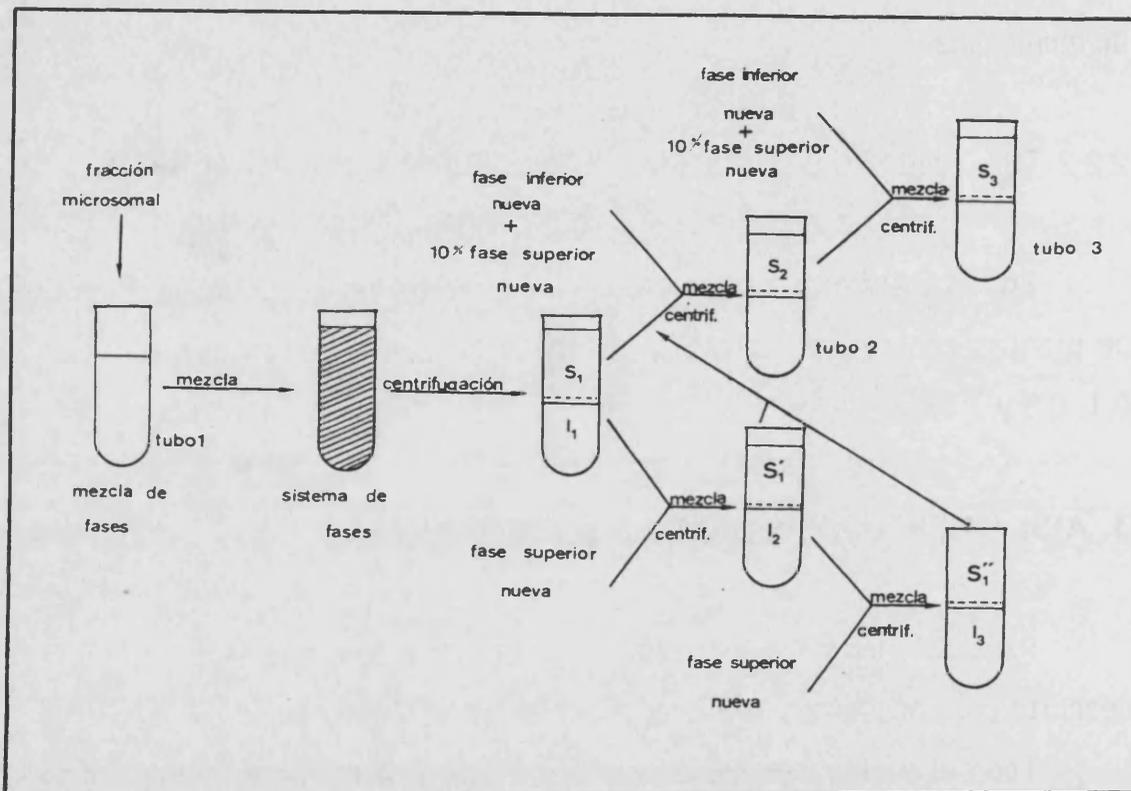
## 3. AISLAMIENTO DE VESICULAS DE MEMBRANA

Para obtener y separar las fracciones de membrana se siguió el método descrito por Larsson en 1985 con algunas modificaciones.

Todo el proceso se realizó a temperatura de 4° C. Las soluciones fueron preparadas con agua destilada desionizada.

### 3.1. EXTRACCION DE LA FRACCION MICROSOMAL

Entre 25 y 30 g de material vegetal fueron troceados e infiltrados, durante 7 minutos, en un volumen de 100 ml de medio de homogeneización que contenía sacarosa 0.5 M, ácido ascórbico 5 mM, cisteína 3.6 mM y 0.6% (p/p) de PVP (10 KDa) en HEPES-KOH 50 mM, pH 7.6. La infiltración se realizó en un matraz kitasato con ayuda de una bomba de vacío. Posteriormente, se



**Figura 1.** Procedimiento de aislamiento de vesículas de plasmalema en un sistema acuoso de dos fases poliméricas (Dextrano y Polietilenglicol). Se añade la fracción microsomal suspendida en un medio adecuado a la mezcla de fases, obteniéndose el sistema de fases ( $S_1$ , fracción superior;  $I_1$ , fracción inferior). Tras una serie de purificaciones se obtienen las fracciones finales  $S_3$  e  $I_3$ .

homogeneizó el material con un triturador Lomi G-2 cuatro veces a máxima velocidad durante 20 segundos cada una.

El homogenado se filtró a través de una tela de muselina y se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se centrifugó a 50.000 g durante 40 minutos, para conseguir un precipitado compuesto principalmente de membranas celulares que constituyó la fracción microsomal (M). El sedimento se resuspendió con la ayuda de un pincel en un volumen total de 10 ml que contenía sacarosa 0.33 M, KCl 3 mM y Hepes-KOH 5 mM, pH 7.6. De los 10 ml, uno se almacenó a -23° C hasta su uso y el resto se utilizó para obtener vesículas de plasmalema y de membranas internas.

### 3.2. AISLAMIENTO DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA

Las vesículas de MP se obtuvieron por separación de la fracción microsomal en un sistema acuoso de dos fases poliméricas (Dextrano T500 y Polietilenglicol 3350), (Figura 1). La composición óptima del sistema de fases para el aislamiento de vesículas de plasmalema de arroz fue determinada en trabajos previos (Ros, 1988).

Se añadieron 9 g de fracción microsomal a un tubo de centrifuga de policarbonato que contenía 27 g de mezcla de fases para obtener 36 g de sistema de fases con una composición final de Dextrano T500 6.2 % (p/p), Polietilenglicol 3350 6.2 % (p/p), sacarosa 0.33 M, KCl 3 mM y Hepes-KOH 5 mM, pH 7.6. El contenido del tubo se mezcló, mediante varias inversiones, y se centrifugó a 1.500 g durante 3 minutos para acelerar la separación de los polímeros en dos fases. A continuación, y para conseguir una mayor pureza de las fracciones, se reextrajeron las dos fases mediante un procedimiento en tres pasos (Larsson et al., 1987) como se indica en la figura 1, obteniéndose

finalmente las fracciones superior ( $S_3$ ) e inferior ( $I_3$ ) ricas en plasmalema y membranas internas respectivamente.

$S_3$  e  $I_3$  se diluyeron con medio de resuspensión (sacarosa 0.33 M, KCl 3 mM, mercaptoetanol 4 mM en Hepes-KOH 5 mM, pH 7.6) y se procedió al lavado de los polímeros mediante centrifugación a 100.000 g durante una hora. Tras la resuspensión, las dos fracciones se lavaron de nuevo por centrifugación a 100.000 g durante una hora.

Por último, los sedimentos se resuspendieron en medio de resuspensión en un volumen final de 4 ml y se almacenaron en pequeñas alícuotas a  $-23^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

En los experimentos de tratamiento con pesticidas y metales pesados se introdujeron modificaciones al procedimiento descrito anteriormente. En ellos, se partió de 7 g de material vegetal y se resuspendió la fracción microsomal en 3 ml, de los cuales se añadieron 3 g a 9 g de mezcla de fases para formar 12 g de sistema de fases. Finalmente, sólo se recogió la fracción rica en plasmalema ( $S_3$ ) que se lavó a 100.000 g durante 30 minutos. El sedimento se resuspendió en 1 ml de medio de resuspensión y se almacenó a  $-23^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## **4. ANALISIS ENZIMATICOS**

### **4.1. ACTIVIDAD ATPasa**

La actividad  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa se ensayó en un volumen final de 225  $\mu\text{l}$  que contenía los extractos celulares y el medio de reacción formado por  $\text{MgSO}_4$  3 mM, ATP (sal sódica) 3 mM, sacarosa 75 mM,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0.7 mM, Triton X-100 0.01 % y Mes-Tris 50 mM, pH 6.5. La actividad  $\text{K}^+$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa, un presumible

marcador de la MP, se ensayó en el mismo medio que la  $Mg^{2+}$ -ATPasa, pero en presencia de KCl 50 mM. En el caso de la actividad  $Cl^{-}$ - $Mg^{2+}$ -ATPasa, un marcador del tonoplasto, el tampón del medio de reacción fue Tricina-Tris 50 mM, pH 8.0.

La reacción enzimática se inició con la adición del extracto de vesículas de membrana (entre 1 y 2  $\mu$ g de proteína para  $S_3$  y entre 20 y 40  $\mu$ g para  $I_3$  y M) y se llevó a cabo a 37° C. A menos que se especifique, la reacción se paró a los 30 minutos de iniciada añadiendo 500  $\mu$ l de SDS 10 %.

La hidrólisis de ATP se determinó midiendo la cantidad de fosfato inorgánico presente en el medio según el método de Ames (1966) para lo que se añadieron al medio de reacción 600  $\mu$ l de solución colorimétrica formada por ácido ascórbico 10 % y molibdato amónico 0.42 % en ácido sulfúrico 1 N en proporción 1:7. Tras 45 minutos de incubación a 37° C se paró la reacción bajando la temperatura hasta 4° C en baño de hielo y se midió la absorbancia a 820 nm.

En cada ensayo se prepararon los correspondientes estándar con 0.025  $\mu$ moles de  $P_i$  y blancos de la misma manera que los tubos a determinar, pero se les añadió 500  $\mu$ l de SDS 10 % antes del extracto para impedir la reacción.

Determinados ensayos de actividad  $K^{+}$ - $Mg^{2+}$ -ATPasa se realizaron en medios de reacción con algunas modificaciones respecto al descrito previamente. Las modificaciones incluyeron adiciones de azida sódica 1 mM,  $KNO_3$  50 mM,  $CaCl_2$  3 mM, ortovanadato sódico 0.1 mM, nucleótidos difosfato, nucleótidos trifosfato, varias concentraciones de sales,  $MgSO_4$  y ATP, y tampones como se describe en las tablas y figuras correspondientes.

## 4.2. ACTIVIDAD IDPasa y CITOCROMO C REDUCTASA

La actividad IDPasa latente, marcador del aparato de Golgi, se ensayó según el método de Chanson y col. (1984) modificado por Stall y col. (1987).

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 225  $\mu$ l, que además de los extractos de vesículas de membrana (entre 10 y 30  $\mu$ g de proteínas), contenía IDP 2.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 2.5 mM, KCl 50 mM y Mes-Tris 50 mM, pH 6.9.

La actividad de la enzima se determinó midiendo la diferencia de fosfato inorgánico liberado (Ames, 1966) en presencia o ausencia de 0.1% de Triton X-100 después de 20 minutos a 37 ° C. Como en el caso de la ATPasa se prepararon los correspondientes blancos y estándar.

La actividad citocromo c reductasa NADPH dependiente, resistente a antimicina A, utilizada como marcador de retículo endoplásmico, se midió en las fracciones de membrana según el método descrito por Lord (1973) con algunas modificaciones. El medio de ensayo contenía en un volumen final de 1 ml, NADPH 0.2 mM, citocromo c 0.02 mM, KCN 10 mM, antimicina A 4  $\mu$ M y tampón fosfato 50 mM a pH 7.2. La reacción se inició con la adición de 37  $\mu$ l de extracto de membranas y se siguió la reducción del citocromo c a 550 nm. Se emplearon controles a los que se les añadió la enzima previamente hervida.

## 5. MICROSCOPIA ELECTRONICA

Se siguió el método descrito por Yoshida y col. (1983) con algunas modificaciones.

Fracciones de vesículas de membrana fueron fijadas con una solución de glutaraldehído 3 % (v/v) en medio de resuspensión (Hepes-KOH 5 mM, sacarosa 0.33 M, KCl 3 mM a pH 7.6) durante una hora a 4° C y durante una hora a 21° C

(proporción muestra:disolución fijadora, 1:7). Las fracciones fijadas se recogieron por centrifugación a 50.000 g durante 40 minutos y se lavaron con solución de resuspensión a 4° C (60 minutos). Posteriormente, se fijaron con tetróxido de osmio 1 % (v/v) en Hepes-KOH 5 mM, sacarosa 0.33 M, KCl 3 mM a la misma temperatura durante dos horas y se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol a temperatura ambiente. Los sedimentos deshidratados se trataron con óxido de propileno al 100 % durante una hora a temperatura ambiente, compuesto que es soluble en etanol y a su vez en la epoxi-resina (Araldita). Para facilitar la penetración de la resina epoxi se embebió el material objeto de nuestro estudio en concentraciones crecientes de Araldita:

A.- Araldita I: óxido de propileno (proporción 1:3, 1:1, 3:1) durante una hora en cada caso a temperatura ambiente.

B.- Araldita I durante 24 horas a 60° C.

C.- Araldita II durante 48 horas a 60° C.

La Araldita I está compuesta por 5 ml del componente A/M, 5 ml del componente B y 0.15 ml del componente D. La Araldita II consta de Araldita I mas 0.4 ml de un acelerador de la polimerización ( componente C).

En el paso C se obtuvieron bloques endurecidos de resina-epoxi con los que procedimos a la realización de cortes ultrafinos en el ultramicrotomo. Las secciones de 600-700 Å fueron blanqueadas con ácido periódico al 1 % durante 15 minutos a temperatura ambiente y teñidas con silicotungstato sódico 1 %, ácido clorhídrico 10 % (v/v) durante 10 minutos a 37° C según el método descrito por Roland (1978). Seguidamente se lavaron con agua destilada dos veces durante 2 minutos y se visualizaron con el microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL, JEM 100S.

## 6. DETERMINACION DE NIVELES ENDOGENOS DE CADMIO Y NIQUEL

### 6.1. CONTENIDO DE CADMIO Y NIQUEL EN PLANTA ENTERA

El análisis del contenido en metales pesados se realizó según Morales y col. (1990).

El material vegetal (tallos o raíces) se lavó con agua destilada y se desecó a 60° C durante 48 horas. Se transfirieron 100 mg de material seco, triturado con un triturador de tejidos (Pulverisette, Fritsch) hasta pasar por un tamiz de 0.5 mm, a reactores de Teflón de 125 ml donde se añadió 1 ml de ácido nítrico (65 %, v/v), 1 ml de agua oxigenada (30 %) y dos gotas de alcohol isoamílico. Los reactores se cerraron herméticamente y se mantuvieron durante 5 minutos en microondas a 500 W de potencia. Tras diluir adecuadamente, se procedió a la medida de los niveles endógenos de Cd y Ni utilizando un espectrómetro de absorción atómica Perkin-Elmer, modelo 5000, equipado con lámparas de cátodo hueco monoelementales de Cd y Ni, y lámpara de deuterio como corrector de fondo. Las condiciones de medida utilizadas fueron las siguientes:

	<u>Cadmio</u>	<u>Niquel</u>
Longitud de onda	228.8	232.0
Rendija	0.7	0.2
Tipo de llama	Oxidante	Oxidante
Intensidad lámpara	6 mA	12 mA
Técnica	AA-BG <sup>1</sup>	AA-BG

---

<sup>1</sup>AA-BG: absorción atómica con corrector de fondo.

En todos los casos se utilizó una llama de aire-acetileno, bola de impacto y un tiempo de integración de 0.5 segundos. Los patrones se prepararon a partir de disoluciones patrón de 1.000 ppm en medio nítrico (mismo porcentaje que en las muestras) mediante diluciones adecuadas con los siguientes intervalos de concentración para cada elemento:

Cd (ppm) 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6

Ni (ppm) 0.5, 1, 2, 3, 4

## 6.2. CONTENIDO DE CADMIO Y NIQUEL EN VESICULAS DE PLASMALEMA

La medida de los niveles de metales en las vesículas de plasmalema se realizó mediante Análisis por Inyección en Flujo (FIA) utilizando un "loop" de 200  $\mu$ l a través del cual se inoculó la muestra, convenientemente diluida, a la llama.

El aparato y las condiciones de medida fueron las mismas que las descritas en el apartado anterior.

## 7. ANALISIS DE ESTEROLES

El análisis de esteroides se realizó de acuerdo con Burden y col. (1987).

### 7.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Se añadieron 200  $\mu$ l de extracto a un tubo Pyrex de cristal de 10 ml junto con 2.5 ml de KOH 5 % en etanol 80 % (v/v) y 10  $\mu$ l de  $\beta$ -colestanol (1 mg/ml) como estándar interno. El tubo se calentó en un "termo-block" a 80° C durante 3 minutos. Tras enfriar, se añadieron 10 ml de hexano (grado HPLC)

y 5 ml de agua agitando suavemente hasta mezclar el contenido del tubo. Cuando las dos fases (hexano:agua) quedaron separadas, se transfirió la fase superior de hexano a otro tubo (tubo 2) que contenía 0.1 g de sulfato sódico para secar el solvente. El tubo inicial se reextrajo añadiendo 10 ml de hexano, que tras agitación y separación de fases, fueron transferidos al tubo 2. A continuación se pasó el contenido del tubo 2 a matraces apropiados donde se evaporó el hexano usando un rotavapor con una temperatura del baño de 80° C. El residuo obtenido se disolvió en 2 ml de hexano y se transfirió a viales, donde el solvente fue evaporado en un concentrador de vacío (Savant, USA). Los derivados acetilados de los esteroides se prepararon añadiendo 50 µl de anhídrido acético (ANALAR) y 50 µl de piridina (ANALAR). Trancurridas al menos tres horas, los solventes se evaporaron con nitrógeno y el residuo se redisolvió en 50 µl de acetato de etilo (grado HPLC).

## 7.2. ANALISIS DE LOS ESTEROLES

Los acetatos de esteroides se analizaron por cromatografía gas-líquido usando una columna capilar SE-52 (25 m x 0.25 mm ID) en un cromatógrafo de gases, modelo Varian 3700, equipado con un detector de ionización de llama. El gas transportador fue hidrógeno (0.75 kg cm<sup>-2</sup>) y se utilizó un programa de temperaturas de 120 a 260° C, aumentando 5° C por minuto. La temperatura de inyección fue de 250° C y la del detector 350° C. La salida de los esteroides se produjo cuando el sistema alcanzó la máxima temperatura. Los datos obtenidos fueron analizados por ordenador utilizando el programa "Smarterm". La identidad de los esteroides se obtuvo por comparación de los tiempos de retención relativos con patrones conocidos y por identificación en un espectrómetro de masas (Hewlett-Packard 5970).

## 8. ANALISIS DE FOSFOLIPIDOS

### 8.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Se empleó el método descrito por Cooke y col. (1989). En un tubo Eppendorf se añadieron 0.25 ml del extracto de plasmalema más 0.75 ml de cloroformo:metanol (1:2, v/v). Seguidamente, se agitó la muestra, se añadieron 0.25 ml de cloroformo, se agitó de nuevo y se centrifugó a 10.000 g durante 6 minutos en una centrífuga de mesa. La fase superior de cloroformo y la interfase fueron eliminadas y el solvente evaporado con Nitrógeno. El residuo se resuspendió con 0.2 ml de propan-2-ol:hexano:agua (54:40:6, v/v).

### 8.2. SEPARACION DE LOS FOSFOLIPIDOS

Los fosfolípidos fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE) se separaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según el método de Patton y col. (1982).

Se inyectaron 50 $\mu$ l del extracto lipídico en un HPLC (Varion Vista 5500) dotado de una columna de sílice (250 X 4.6 mm, Econosphere, Altech Associates/Applied Science Limited). El eluyente utilizado fue hexano:propan-2-ol:etanol:tampón fosfato 25 mM, pH 7.0:ácido acético glacial (367:490:100:62:0.7, v/v) y su flujo de 1.5 ml minuto<sup>-1</sup>. La presencia de los fosfolípidos se detectó a una longitud de onda de 205 nm y fue registrada en un ordenador acoplado al HPLC. La identificación de los picos se obtuvo mediante comparación de tiempos de retención con patrones conocidos y mediante la adición de los patrones a las muestras y comparación posterior.

Las distintas fracciones fueron recogidas en tubos Pirex de 10 ml donde se añadieron 20 µl de metil heptadecanoato (0.1 mg/ml) como estándar interno. Seguidamente, el solvente se evaporó con Nitrógeno a 40° C y se añadieron 2 ml de 2,2' dímetoxi-propano 5% (v/v) en metóxido sódico 0.5 N disuelto en metanol. Tras 10 minutos a 40° C se dejó enfriar la solución, se añadieron 2 ml de hexano y 1 ml de agua agitando seguidamente. La fase superior de hexano, que contenía los ésteres de los ácidos grasos provenientes de los fosfolípidos hidrolizados, se transfirió a viales de cristal de 1 ml. El hexano fue evaporado en un concentrador con vacío (Savant, USA) y el residuo disuelto en 25 µl de acetato de etilo. Las muestras se almacenaron a 4° C hasta que se utilizaron para el análisis de ácidos grasos.

### 8.3. ANALISIS DE LOS ESTERES DE LOS ACIDOS GRASOS

El contenido en ácidos grasos se analizó por cromatografía gas-líquido usando una columna capilar (RSL 500 BP, 25 m x 0.25 mm ID) incluida en un cromatógrafo de gases (Varian modelo 3700) equipado con un detector de ionización de llama, y acoplado a un ordenador con el mismo programa de análisis de datos que el descrito para esteroides. El gas transportador fue helio (0.75 Kg cm<sup>-2</sup>) y el programa de temperaturas utilizado fue de 170 a 200° C, aumentando 2° C por minuto. La temperatura de inyección fue 240° C y la del detector 300° C. El contenido en fosfolípidos se expresó como cantidad de ácidos grasos (C16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3) encontrados en las fracciones PE, PC, PS y PI (Apéndice I). Los ácidos grasos se identificaron por comparación de los tiempos de retención relativos con los de patrones.

## 9. DETERMINACION DE LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA

La fluidez de la MP se determinó por fluorescencia polarizada en estado estacionario (Cooke et al., 1990 b) utilizando un espectrofluorímetro (Perkin-Elmer LS5) al que se acopló un polarizador.

Las determinaciones de fluidez se realizaron en un volumen final de 1 ml que contenía los extractos de MP (convenientemente diluidos para dar una concentración de proteínas de 150 µg/ml), KCl 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 5 mM, EGTA 0.1 mM y Hepes-KOH 40 mM, pH 7.0. A este medio se le añadieron 0.5 µl de 1,6-difenil-1,3,5 hexatrieno (DPH) 1 mM (compuesto fluorescente) en tetrahidrofurano (THF). Se prepararon blancos a los que se les añadió 0.5 µl de THF sin DPH. El exceso de THF se evaporó con Nitrógeno. Se incubaron blancos y muestras tratadas durante una hora a 25° C, tras lo cual se midió la emisión de fluorescencia a 430 nm con excitación a 360 nm. La fluorescencia polarizada (P) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$P = \frac{I_{VV} - I_{VH} G}{I_{VV} + I_{VH} G}$$

donde: I, intensidad de fluorescencia

G, factor de corrección =  $I_{HV}/I_{HH}$

Los subíndices V (vertical) y H (horizontal) se refieren a la posición de los polarizadores en los haces de excitación y emisión. Si se sitúan en primer lugar se refieren al haz de excitación y en segundo lugar al de emisión.

## 10. BOMBEO DE PROTONES

El bombeo de protones se determinó midiendo los cambios en la emisión de fluorescencia del compuesto fluorescente ACMA. Se añadieron vesículas de MP (200 µg de proteína), previamente sometidas a tres ciclos de congelación-descongelación (de -20° C hasta +20° C), a una cubeta que contenía KNO<sub>3</sub> 25 mM, ACMA 1 µM, ATP-Tris 5 mM, BTP-Mes 20 mM, pH 6.5 en un volumen final de 1.98 ml. La cubeta se colocó en un espectrofluorímetro (Perkin-Elmer LS5) donde se mantuvo a 30° C con agitación constante.

La reacción se inició con la adición de 20 µl de MgCl<sub>2</sub> 0.5 M. Los cambios en la emisión de fluorescencia a 485 nm al excitar a 415 nm se registraron en un registrador Bryans, ajustado a una velocidad de 30 cm hora<sup>-1</sup>. La tasa de transporte de H<sup>+</sup> en estado estacionario (R<sub>0</sub>) se calculó según la siguiente ecuación:

$$R_0 = K \Delta F$$

donde, K: tasa constante de formación del gradiente de pH.

ΔF: diferencia entre la emisión de fluorescencia inicial y en el estado estacionario.

## 11. PROTEINAS

Las proteínas se determinaron según el método de Bradford (1976) modificado por Read y col. (1981). A 100 µl de muestra, convenientemente diluida, se le añadieron 3 ml de medio de determinación que contenía 25 mg de

Coomassie Brilliant Blue G-250 disueltos en 12.5 ml de etanol 95 % (v/v) y 20 ml de ácido fosfórico 85 % (v/v) aforados a 250 ml con agua. Transcurridos 5 minutos, se determinó la absorbancia a 595 nm. La curva patrón se elaboró utilizando concentraciones crecientes de seroalbúmina bovina (desde  $4 \times 10^{-3}$  hasta  $2 \times 10^{-2}$  mg BSA/ml).

En los experimentos de tratamiento y recuperación, los patrones se prepararon con tiroglobulina.

## 12. ANALISIS DE LOS DATOS

La significación de los resultados se determinó sometiendo los datos a un análisis de la varianza (CLR ANOVA). La variación entre las medias de los datos se analizó mediante el test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación se fijó para  $P < 0.05$ .

Las curvas hiperbólicas se ajustaron a cinéticas de Michaelis-Menten mediante análisis de regresión no lineal por mínimos cuadrados (Ralston, 1983).

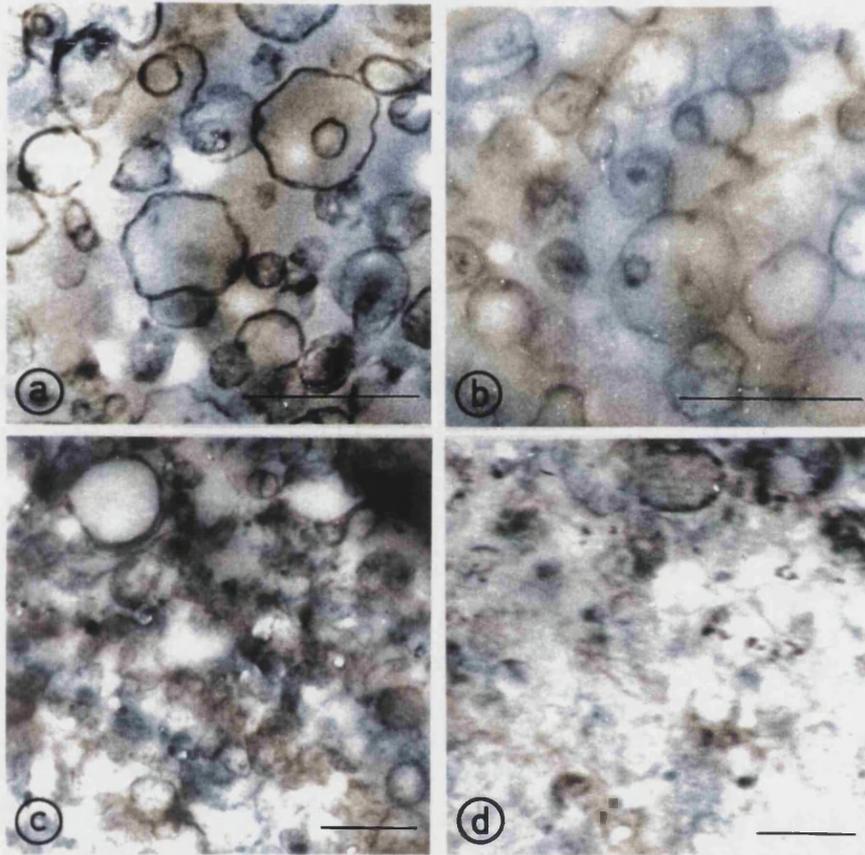
A menos que se especifique, los valores representados en tablas y figuras son la media de al menos tres experimentos realizados con preparaciones de membrana distintas.

## **RESULTADOS**

## 1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA MEMBRANA PLASMATICA

En la tabla 1 se muestran las características generales de la fracción microsomal (M) y de las fases superior ( $S_3$ ) e inferior ( $I_3$ ), obtenidas durante el proceso de aislamiento de vesículas de plasmalema. Aproximadamente el 4 % del contenido proteico de la fracción microsomal se recogió en  $S_3$ . En esta fase, la riqueza en vesículas de MP fue semejante a la encontrada en otros estudios, donde se utilizó el método de separación en fases para obtener vesículas de MP de gran pureza (Larsson, 1985; Blum et al., 1988). Así por ejemplo, la actividad específica de la  $K^+-Mg^{2+}$ -ATPasa, descrita como un marcador de la MP, se enriqueció en  $S_3$  aproximadamente 4 veces con respecto a la fracción microsomal y fue más de 10 veces mayor que en  $I_3$ . Además, la actividad  $K^+-Mg^{2+}$ -ATPasa sensible al vanadato (inhibidor de la ATPasa de MP) se incrementó aproximadamente 5 veces con respecto a la fracción microsomal y fue más de 18 veces mayor que en  $I_3$ . La contaminación por tonoplasto y mitocondrias, estimada como la actividad  $Cl^-$ - $Mg^{2+}$ -ATPasa, inhibida por nitrato + azida fue solamente del 2 % en  $S_3$ , mientras que en  $I_3$  esta actividad constituyó el 71 % del total. También fue confirmada la ausencia en  $S_3$  de membranas procedentes del aparato de Golgi y tonoplasto, por la falta de actividad pirofosfatasa, como puede observarse en la tabla 2 donde se presentan los resultados obtenidos al ensayar distintos sustratos.

Por último, como ya se puso de manifiesto en trabajos previos (Ros, 1988), la tinción con silicotungstato sódico, descrita como selectiva para la



**Figura 2.** Vesículas de membrana de raíces de arroz. Microfotografías de secciones de las fracciones S<sub>3</sub> (a y b) e I<sub>3</sub> (c y d); a y c, preparaciones tratadas con silicotunstato sódico. b y d, controles no tratados. Longitud de la barra: 1 µm.

**Tabla 1.** Proteínas (mg) y actividades específicas [ $\mu\text{mol (mg proteína)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ] de enzimas marcadoras en fracciones de membrana microsomal (M), plasmática (S<sub>3</sub>) e intracelular (I<sub>3</sub>) obtenidas de raíces de arroz. Las enzimas se ensayaron como se describe en Material y Métodos excepto que las reacciones de la ATPasa y de la IDPasa se llevaron a cabo durante 45 minutos; donde fue requerido se incluyeron las siguientes modificaciones y/o adiciones al medio de reacción: ortovanadato 0.1 mM, azida 1 mM, nitrato 50 mM, y Tricina-Tris 50 mM a pH 8.0. Los valores representan las medias  $\pm$  E. E. Entre paréntesis se muestran los porcentajes de actividad con respecto a la K<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPasa.

PARAMETRO	FRACCIONES		
	M	S <sub>3</sub>	I <sub>3</sub>
PROTEINAS	28 $\pm$ 5	1.1 $\pm$ 0.1	6.0 $\pm$ 0.8
K <sup>+</sup> ,Mg <sup>2+</sup> -ATPasa	20 $\pm$ 1 (100)	79 $\pm$ 9 (100)	7.7 $\pm$ 0.1 (100)
Cl <sup>-</sup> , Mg <sup>2+</sup> -ATPasa (sensible a azida+nitrato)	8.3 $\pm$ 0.2 (42)	1.8 $\pm$ 0.2 (2)	5.5 $\pm$ 0.6 (71)
K <sup>+</sup> ,Mg <sup>2+</sup> -ATPasa (sensible a vanadato)	7.9 $\pm$ 0.03 (40)	42 $\pm$ 1 (53)	2.3 $\pm$ 0.1 (30)
CCR	0.55 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.03
IDPasa	3.5 $\pm$ 0.6	2.8 $\pm$ 0.5	3.3 $\pm$ 0.7

MP de vegetales (Roland, 1978), mostró que en secciones obtenidas de S<sub>3</sub> aparecían estructuras cerradas, la mayor parte de ellas teñidas positivamente (Figura 2a). En cambio, en las secciones de I<sub>3</sub> aparecieron teñidas pocas vesículas, presumiblemente de origen plasmático (Figura 2 c).

Las actividades específicas NADPH-citocromo c reductasa (CCR) insensible a antimicina y la IDPasa latente no aumentaron ni en S<sub>3</sub> ni en I<sub>3</sub>, comparadas con la fracción microsomal (Tabla 1). Aunque la mayor parte de la actividad CCR se encuentra en el retículo endoplásmico, esta enzima no es un marcador absoluto (Larsson, 1985; Møller y Lin, 1986; Robinson et al., 1988) y podría estar presente en la MP de arroz, como ya se ha demostrado para trigo (Lundborg et al., 1981). Asimismo, la actividad IDPasa latente no puede considerarse un marcador absoluto para el aparato de Golgi (Robinson et al., 1988). En nuestro caso, se demostró que la velocidad de hidrólisis de IDP por la ATPasa fue de un 2 - 4 % con respecto a la velocidad de hidrólisis de ATP (Tabla 2).

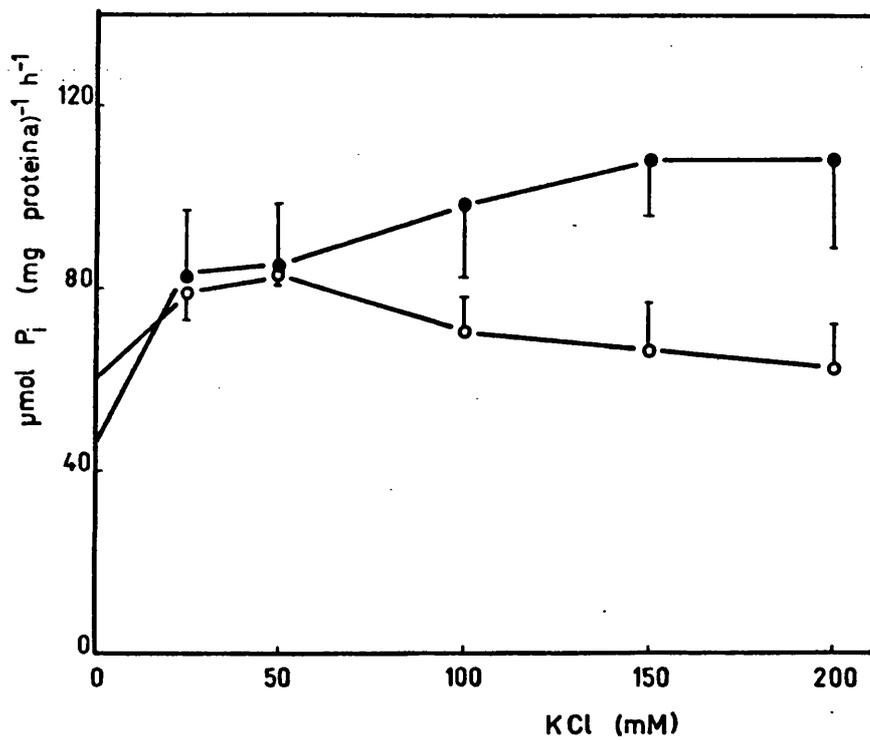
## **2. PROPIEDADES DE LA ATPasa DE MEMBRANA PLASMÁTICA**

### **2.1. ESTIMULACION POR CLORURO POTÁSICO**

Se estudió la estimulación por KCl de la ATPasa en un rango amplio de concentraciones (0-200 mM) a pH 6.0 y 6.5 (Figura 3). La concentración óptima de KCl a pH 6.5 se situó entre 25 - 50 mM, concentraciones que se corresponden con las usadas en la mayoría de los trabajos sobre la ATPasa de MP. Sin embargo, a pH 6.0 los requerimientos de KCl fueron mucho mayores, siendo 150 mM la concentración óptima. Así, a pH 6.0 la actividad ATPasa en presencia de 50 mM de KCl fue solamente el 79 % de la medida con 150 mM. En

**Tabla 2.** Especificidad por el sustrato de la ATPasa de MP de raíces de arroz. Al medio de ensayo se añadieron MgSO<sub>4</sub> 3 mM, sustrato 3 mM y KCl 150 mM a pH 6.0, o bien MgSO<sub>4</sub> 7 mM, sustrato 7 mM y KCl 50 mM a pH 6.5. Los datos se refieren al porcentaje de hidrólisis con respecto al control. Las actividades específicas para el ATP son 69 y 90 [ $\mu\text{mol P}_i$  (mg proteína)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] a pH 6.0 y 6.5 respectivamente. Los valores representan la media, n=2.

SUSTRATO ENSAYADO	pH 6.0	pH 6.5
	ATP	100
CTP	0	5
UTP	0	6
ITP	0	4
CDP	0	2
UDP	2	5
IDP	2	4
GDP	3	2
PP <sub>i</sub>	0	0
PNPP	1	2
G-6-P	0	0



**Figura 3.** Estimulación de la ATPasa de la MP por varias concentraciones de KCl (0-200 mM) a pH 6.0 (●) y 6.5 (○). La actividad ATPasa se ensayó en el medio descrito en Material y Métodos más 1 mM de azida sódica. Las barras verticales representan el EE.

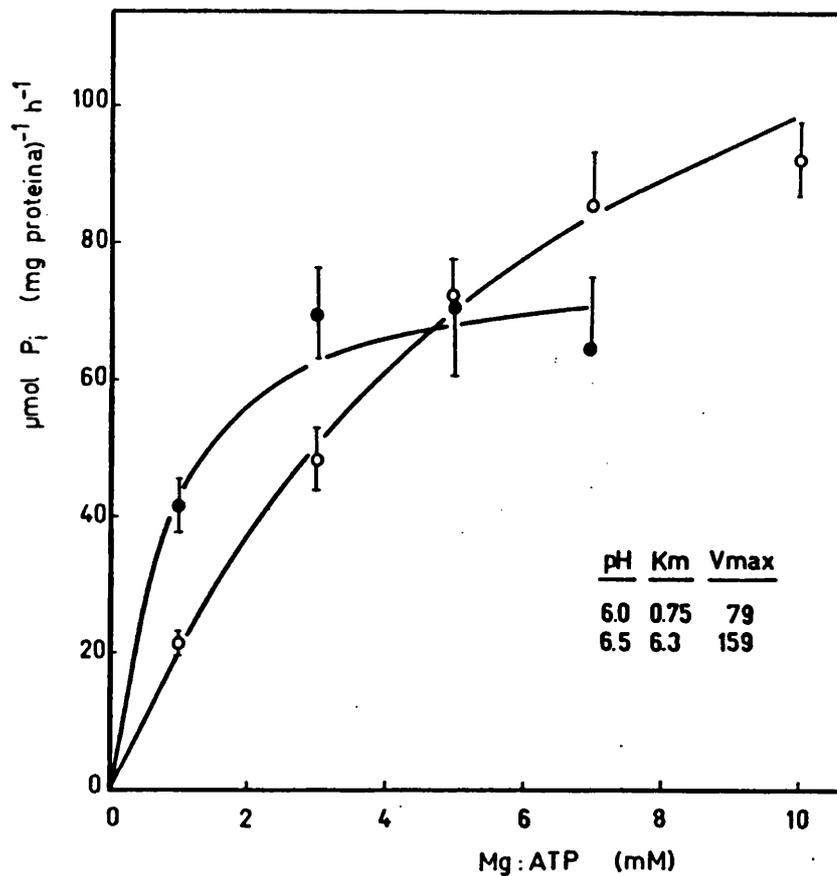


Figura 4. Actividad  $K^+$ - $Mg^{2+}$ -ATPasa en presencia de concentraciones equimolares crecientes de Mg y ATP a pH 6.0 (●) y 6.5 (○). El ensayo se realizó en el medio descrito en la figura 3 pero con una concentración de KCl constante de 100 mM. Las unidades para la  $K_m$  y la  $V_{max}$  son mM y  $[\mu\text{mol (mg proteína)}^{-1} \text{ h}^{-1}]$  respectivamente. Las barras verticales representan el EE.

cambio, a pH 6.5 esta actividad enzimática fue un 25 % superior con 50 mM que con 150 mM de KCl.

## 2.2 DEPENDENCIA DEL ATP

Los parámetros cinéticos para el ATP se determinaron variando equimolarmente las concentraciones de ATP y Mg a pH 6.0 y 6.5 (Figura 4). La concentración de KCl se mantuvo constante a 100 mM para ambos pHs. Aunque las dos curvas obtenidas se ajustaron a cinéticas de Michaelis-Menten, las constantes cinéticas fueron muy distintas. Así, la  $K_m$  fue 8 veces y la  $V_{max}$  2 veces mayor a pH 6.5 que a pH 6.0.

Debido a las diferencias detectadas, tanto en los requerimientos de ATP como de KCl a los dos pHs estudiados, los experimentos descritos a continuación se realizaron en dos medios de reacción distintos: uno de ellos contenía 7 mM de  $MgSO_4$ , 7 mM de ATP y 50 mM de KCl; el otro contenía 3 mM de  $MgSO_4$ , 3 mM de ATP y 150 mM de KCl.

## 2.3. DEPENDENCIA DEL pH

Al estudiar el efecto de la variación del pH sobre la actividad ATPasa de nuestras preparaciones (Figura 5) se comprobó que en presencia de  $MgSO_4$  3 mM, ATP 3 mM y de KCl 150 mM el pH óptimo fue de 6.0. Sin embargo, en un medio que contenía 7 mM de  $MgSO_4$ , 7 mM de ATP y 50 mM de KCl se encontró que el pH óptimo era 6.5.

Con el fin de determinar de una manera más precisa los efectos del KCl y del pH sobre la actividad ATPasa, se realizó un estudio cinético en presencia de 50 y 150 mM de KCl a pH 6.0 y 6.5 (Figura 6). Al utilizar concentraciones equimolares de Mg y ATP, la disminución de la concentración de KCl redujo la

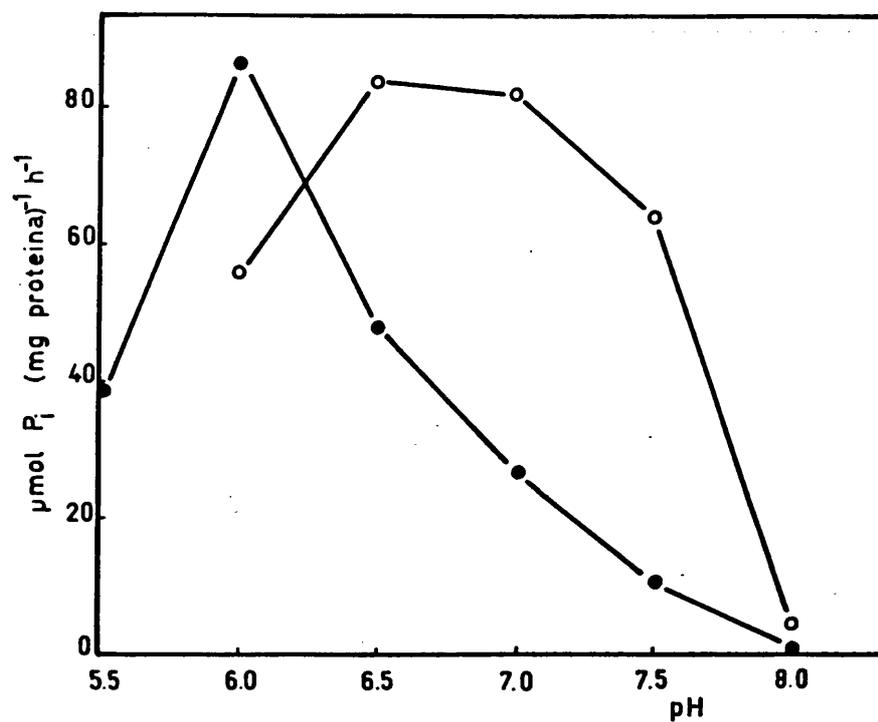
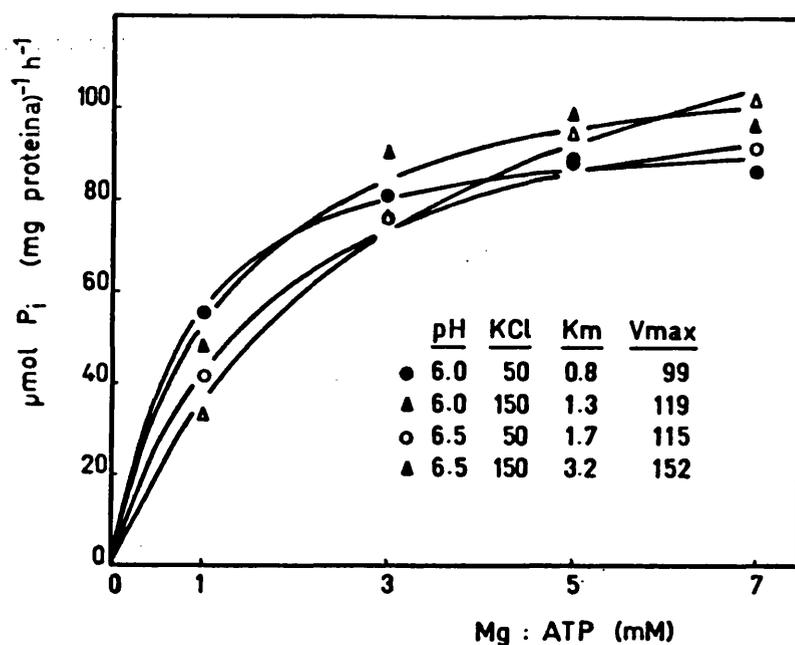
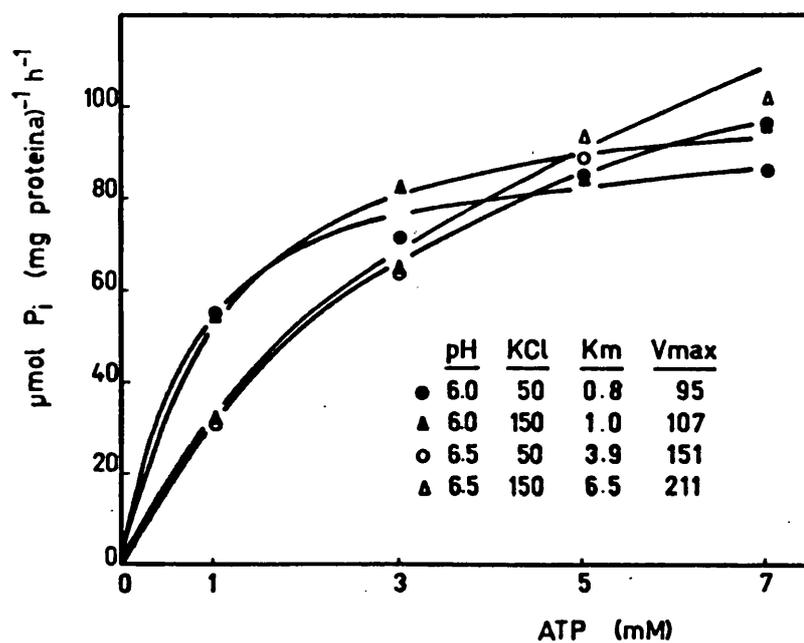


Figura 5. Efecto del pH sobre la actividad  $\text{K}^+\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPasa}$  de la fracción de MP. Al medio de ensayo se añadieron 3 mM de Mg, 3 mM de ATP y 150 mM de KCl (●) o bien 7 mM de Mg, 7 mM de ATP y 50 mM de KCl (○). En todos los casos el medio contenía 1mM de azida. Los tampones usados fueron: Mes-Tris 50 mM (pH 5.5-6.5), Hepes-KOH (pH 7.0), y Tricina-Tris (pH 7.5-8.0).



**Figura 6.** Actividad ATPasa de la MP en presencia de concentraciones equimolares crecientes de ATP y Mg con 50 mM (círculos) y 150 mM (triángulos) de KCl a pH 6.0 (lentos) y 6.5 (vacíos). Los ensayos se realizaron en el medio descrito en la figura 3. Las unidades para la  $K_m$  y la  $V_{max}$  son mM y  $[\mu\text{mol (mg proteína)}^{-1} \text{ h}^{-1}]$  respectivamente.



**Figura 7.** Actividad ATPasa de la MP en presencia de varias concentraciones de ATP con 50 mM (círculos) y 150 mM (triángulos) de KCl a pH 6.0 (llenos) y 6.5 (vacíos). Los ensayos se realizaron en el medio descrito en la figura 3. Se emplearon concentraciones variables de Mg en cada caso para dar un exceso de 10 mM sobre la concentración de ATP. Las unidades de la Km y la Vmax son mM y  $[\mu\text{mol (mg proteína)}^{-1} \text{h}^{-1}]$  respectivamente.

$K_m$  y la  $V_{max}$  a los dos pHs. Bajo las mismas condiciones, un cambio del pH de 6.0 a 6.5 aumentó estos dos parámetros cinéticos.

Cuando se introdujo un exceso constante de 10 mM de Mg sobre la concentración de ATP en el medio de reacción, para evitar las posibles interferencias producidas por el ATP libre (Bennett et al., 1985), los resultados obtenidos fueron similares (Figura 7). No obstante, fue potenciado el efecto del pH sobre los parámetros cinéticos. De esta forma, ambos parámetros aumentaron a pH 6.5, sobre todo la  $K_m$  que llegó a sextuplicar su valor.

En todos los casos, pudo observarse una correlación positiva entre los valores de  $V_{max}$  y de la  $K_m$ .

#### 2.4. ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO Y DE IONES

La especificidad de la ATPasa se estudió sustituyendo en el medio de reacción el ATP por otros posibles sustratos. La ATPasa de MP de raíces de arroz fue muy específica para el ATP a los dos pHs ensayados, 6.0 y 6.5 (Tabla 2). La actividad fosfatasa (PNPP) fue prácticamente inexistente y tampoco fue detectada la hidrólisis de Glucosa-6-fosfato y pirofosfato. En los casos restantes, la actividad fue siempre menor del 7 % comparada con la detectada en presencia de ATP.

Respecto a la especificidad iónica, fue significativamente distinta en función del tipo de medio (Tabla 3). Así, mientras que a pH 6.0 la ATPasa fue estimulada igualmente por todos los cationes monovalentes ensayados, a pH 6.5 la enzima presentó especificidad por  $K^+$  y  $Rb^+$ .

El efecto de los cationes divalentes dependió tanto del medio donde se ensayaron como del tipo de catión (Tabla 3). Por ejemplo, el  $Ca^{2+}$  y el  $Ni^{2+}$  inhibieron la actividad ATPasa a los dos pHs. La inhibición por  $Ca^{2+}$  fue la más

**Tabla 3.** Efecto de los cationes sobre la actividad ATPasa de MP de raíces de arroz. La actividad se ensayó como se describe en la tabla 2. Los cationes monovalentes se añadieron en una concentración de 150 mM a pH 6.0 ó 50 mM a pH 6.5 y los divalentes en una concentración final de 3 mM. Los datos representan porcentajes de actividad con respecto a los controles. Las actividades de los controles son 91 y 71 [ $\mu\text{mol P}_i$  (mg proteína) $^{-1}$  h $^{-1}$ ] a pH 6.0 y 6.5 respectivamente.

SAL ENSAYADA	pH 6.0	pH 6.5
	KCl (CONTROL)	100
RbCl	103	98
NaCl	91	86*
LiCl	95	84*
Ca Cl <sub>2</sub>	13*	20*
MgCl <sub>2</sub>	82*	95
NiCl <sub>2</sub>	53*	88*

\*, significativamente distinto del control.

**Tabla 4.** Efecto de 30 mM de Mg sobre la actividad K<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPasa de MP de raíces de arroz en presencia de concentraciones crecientes de ATP a pH 6.0 y 6.5. La actividad se ensayó en el medio descrito en la figura 3, pero con una concentración constante de KCl de 50 mM. Los datos representan el porcentaje de actividad con respecto a controles con concentraciones equimolares de Mg y ATP.

[ATP]	pH 6.0	pH 6.5
1 mM	122 *	76 *
3 mM	128 *	82 *
5 mM	126 *	95
7 mM	135 *	105 *

\*, significativamente distinto del control.

acusada, reduciendo la actividad enzimática hasta en un 80 % o más con respecto a la detectada en los controles con K<sup>+</sup>. Por el contrario, el Mg<sup>2+</sup> estimuló la actividad ATPasa a pH 6.5 de forma similar al K<sup>+</sup> y Rb<sup>+</sup>, siendo esta activación menor y significativamente distinta a la del control a pH 6.0.

El distinto efecto del Mg<sup>2+</sup> sobre la ATPasa no pareció depender solamente del pH del medio sino también de la presencia de potasio y de la concentración de ATP. Como puede verse en la Tabla 4, donde se presentan los resultados obtenidos en presencia de KCl y a distintas concentraciones de ATP, el Mg estimuló la actividad ATPasa a todas las concentraciones de ATP ensayadas a pH 6.0. Sin embargo, a pH 6.5 el Mg<sup>2+</sup> inhibió la actividad enzimática a bajas concentraciones de ATP y solamente la activó a concentraciones elevadas (7mM de ATP).

## 2.5. INHIBIDORES

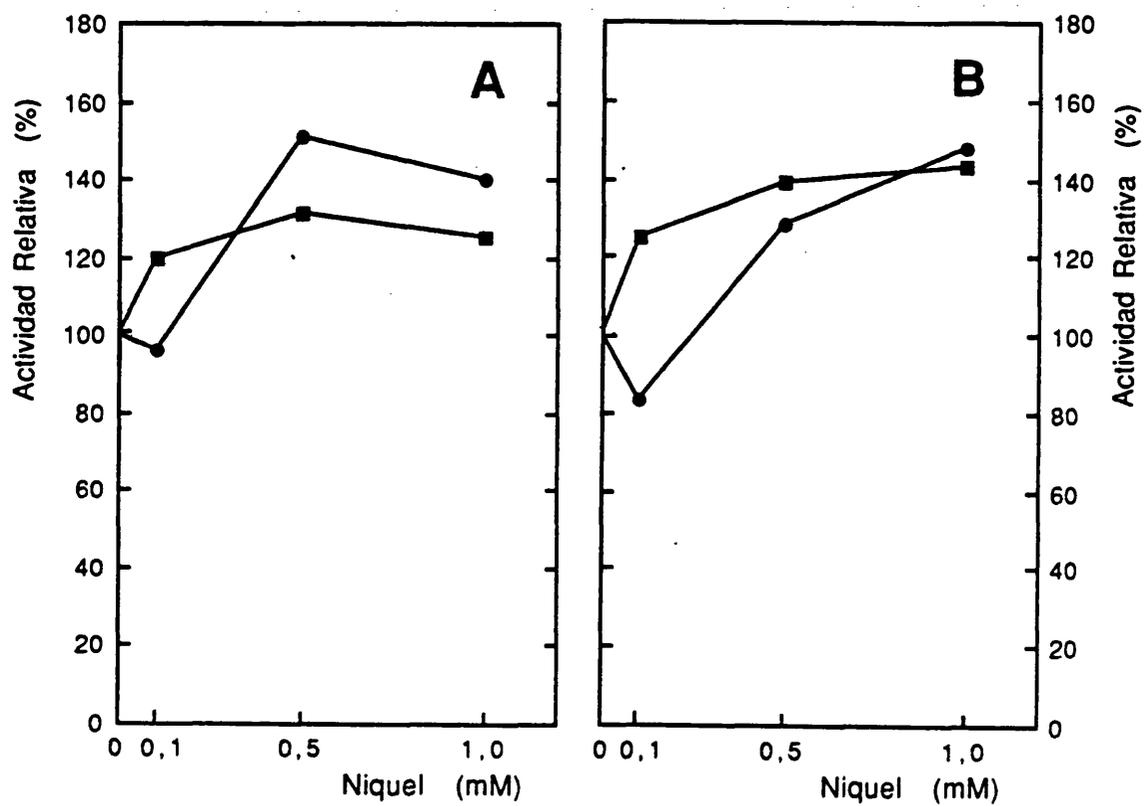
En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos al añadir al medio de reacción inhibidores como azida, nitrato, ortovanadato o Ca, comprobándose que el patrón de inhibición fue el mismo a los dos pHs ensayados. La actividad K<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPasa no se vio afectada ni por azida (inhibidor de la ATPasa mitocondrial), ni por nitrato (inhibidor de la ATPasa tonoplástica) pero sí por ortovanadato y Ca, descritos como inhibidores de la ATPasa de MP.

## 3. EFECTO DEL NIQUEL Y CADMIO SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa DE PLASMALEMA DE TALLOS Y RAICES DE ARROZ

En este apartado, se examinó el efecto que produce la aplicación *in vivo* e *in vitro* de varias concentraciones de Cd y Ni sobre la actividad ATPasa de la MP de tallos y raíces de arroz.

**Tabla 5.** Efecto de distintos inhibidores sobre la ATPasa de MP de raíces de arroz. La actividad enzimática se ensayó como se describe en la tabla 2. Los inhibidores se incluyeron en el medio según se indica. Los datos representan porcentaje de actividad con respecto a los controles. Las actividades específicas de los controles son 75 y 72 [ $\mu\text{mol (mg proteína)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ] a pH 6.0 y 6.5 respectivamente.

TRATAMIENTO	pH 6.0	pH 6.5
CONTROL	100	100
AZIDA (1 mM)	109	110
NITRATO (1mM)	96	96
ORTOVANADATO (0.1 mM)	51	38
CaCl <sub>2</sub> (3 mM)	15	19



**Figura 8.** Efecto de varias concentraciones de Ni sobre la actividad Mg<sup>2+</sup> (A) y K<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup> (B) ATPasa de la MP de tallos de arroz. Los tratamientos se realizaron *in vivo* durante 5 (cuadrados) o 10 (círculos) días. El ensayo enzimático se realizó en el medio descrito en material y métodos más 1 mM de azida. Los datos representan porcentajes de actividad con respecto a los controles.

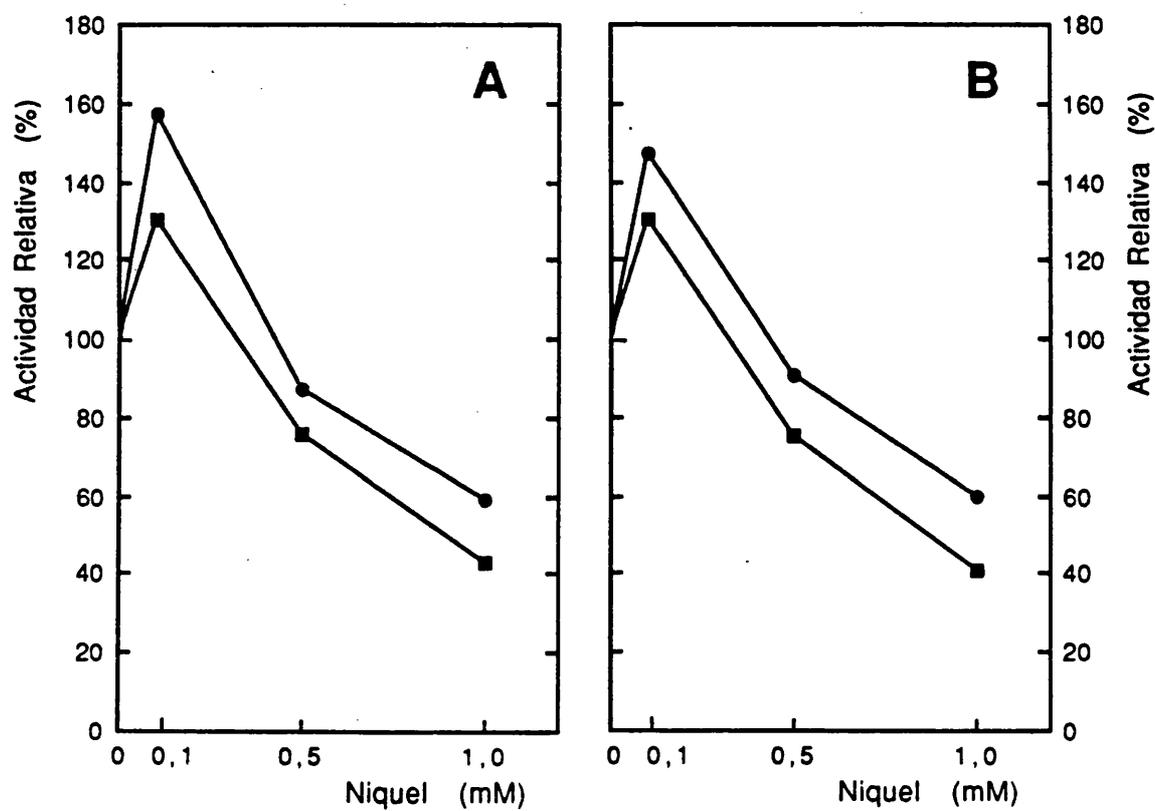
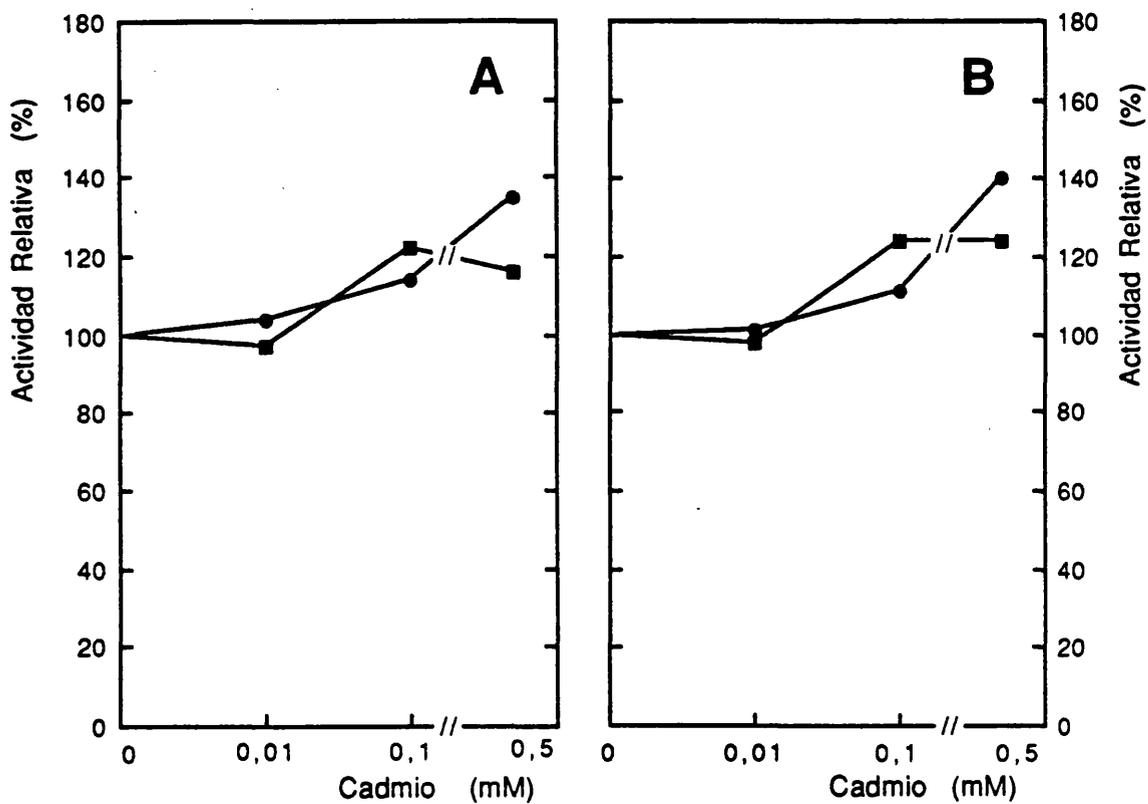


Figura 9. Efecto de varias concentraciones de Ni sobre la actividad Mg<sup>2+</sup> (A) y K<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup> (B) ATPasa de la MP de raíces de arroz. Los tratamientos se realizaron *in vivo* durante 5 (cuadrados) o 10 (círculos) días. El ensayo enzimático se realizó como se describe en la figura 8. Los datos representan porcentajes de actividad con respecto a los controles.



**Figura 10.** Efecto de varias concentraciones de Cd sobre la actividad Mg<sup>2+</sup> (A) y K<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup> (B) ATPasa de la MP de tallos de arroz. Los tratamientos se realizaron *in vivo* durante 5 (cuadrados) o 10 (círculos) días. El ensayo enzimático se realizó como se describe en la figura 8. Los datos representan porcentajes de actividad con respecto a los controles.

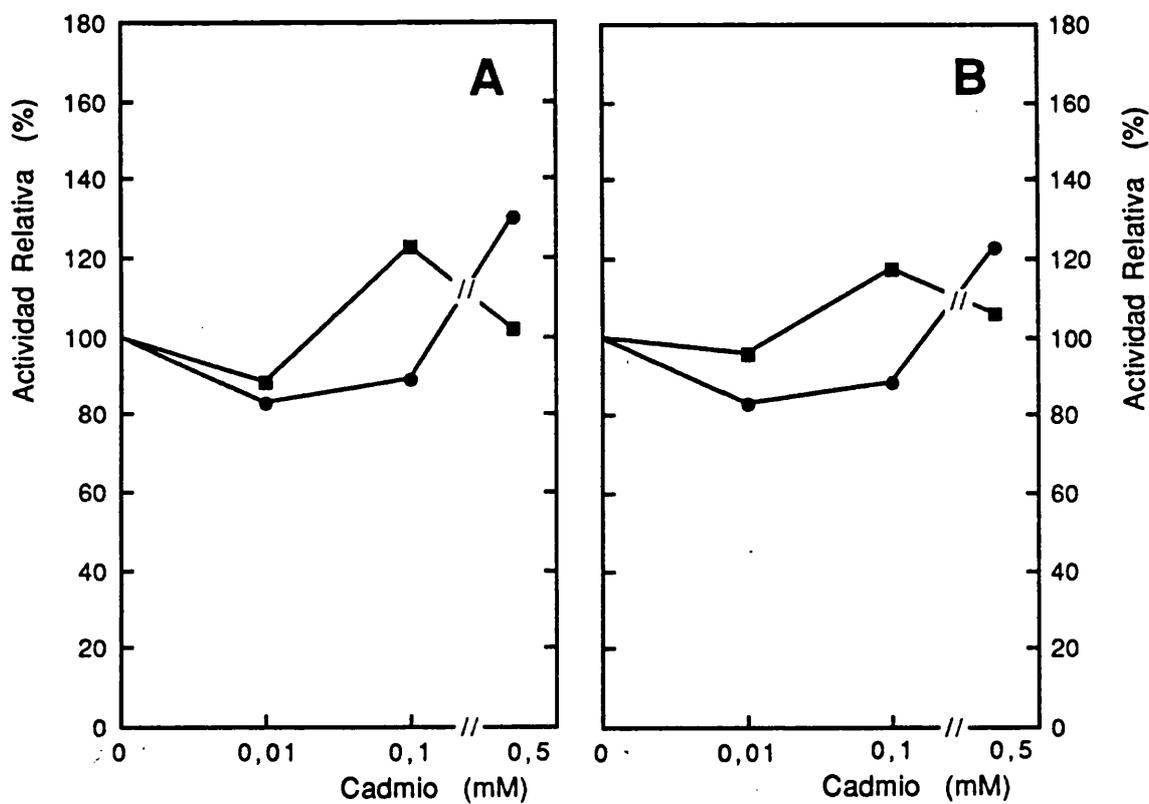


Figura 11. Efecto de varias concentraciones de Cd sobre la actividad Mg<sup>2+</sup> (A) y K<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup>(B) ATPasa de la MP de raíces de arroz. Los tratamientos se realizaron *in vivo* durante 5 (cuadrados) o 10 (círculos) días. El ensayo enzimático se realizó como se describe en la figura 8. Los datos representan porcentajes de actividad con respecto a los controles.

### 3.1. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

La presencia de Ni en la solución nutritiva donde crecía el arroz afectó drásticamente las actividades  $Mg^{2+}$  y  $K^{+}-Mg^{2+}$ -ATPasa de vesículas de MP procedentes de tallos (Figura 8 A y B). Ambas actividades aumentaron significativamente tras el tratamiento de las plantas con concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 mM durante 5 días o con 0.5 y 1 mM durante 10 días. En cambio, la actividad ATPasa de plasmalema de raíces fue estimulada o inhibida dependiendo de la concentración de Ni en la solución nutritiva (Figura 9 A y B). Así, 0.1 mM incrementó significativamente la actividad ATPasa mientras que 0.5 y 1 mM la inhibieron después de 5 días de tratamiento. La misma tendencia se observó a los 10 días de tratamiento aunque solamente Ni 1 mM inhibió significativamente la actividad de la enzima.

Aunque de menor magnitud, el efecto del Cd sobre la ATPasa de tallos fue similar al del Ni (Figura 10 A y B). Así, solamente en plantas tratadas con Cd 0.5 mM durante 10 días pudo determinarse un aumento significativo de la actividad ATPasa. En raíces, no se observó una tendencia clara, y en ningún caso se produjeron variaciones significativas de la actividad de la enzima (Figura 11 A y B).

El efecto *in vivo* del Ni y Cd sobre la ATPasa no fue significativamente afectado por la presencia de K en el medio de reacción (Figuras 8,9,10 y 11, A y B).

### 3.2. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

A diferencia de los resultados obtenidos *in vivo*, la aplicación *in vitro* de Cd o Ni inhibió la actividad ATPasa de MP tanto de tallos como de raíces (Figuras 12 y 13, A y B). El Cd inhibió significativamente las actividades  $Mg^{2+}$  y  $K^{+}-Mg^{2+}$  de la ATPasa de tallos y raíces a partir de una concentración final

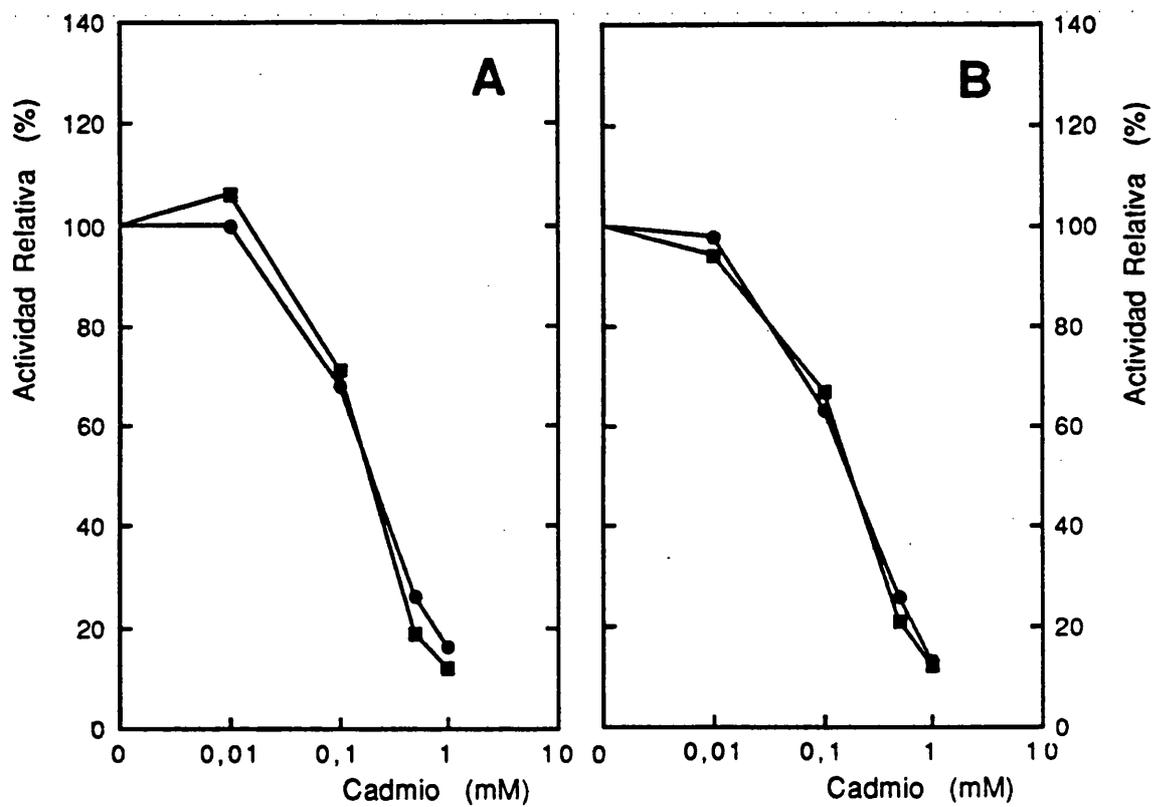


Figura 12. Efecto de la aplicación *in vitro* de varias concentraciones de Cd sobre la actividad Mg<sup>2+</sup> (círculos) y K<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup> (cuadrados) ATPasa de MP de tallos (A) y raíces (B) de arroz. El ensayo se realizó como se describe en la figura 8. Los datos representan porcentaje de actividad con respecto a los controles.

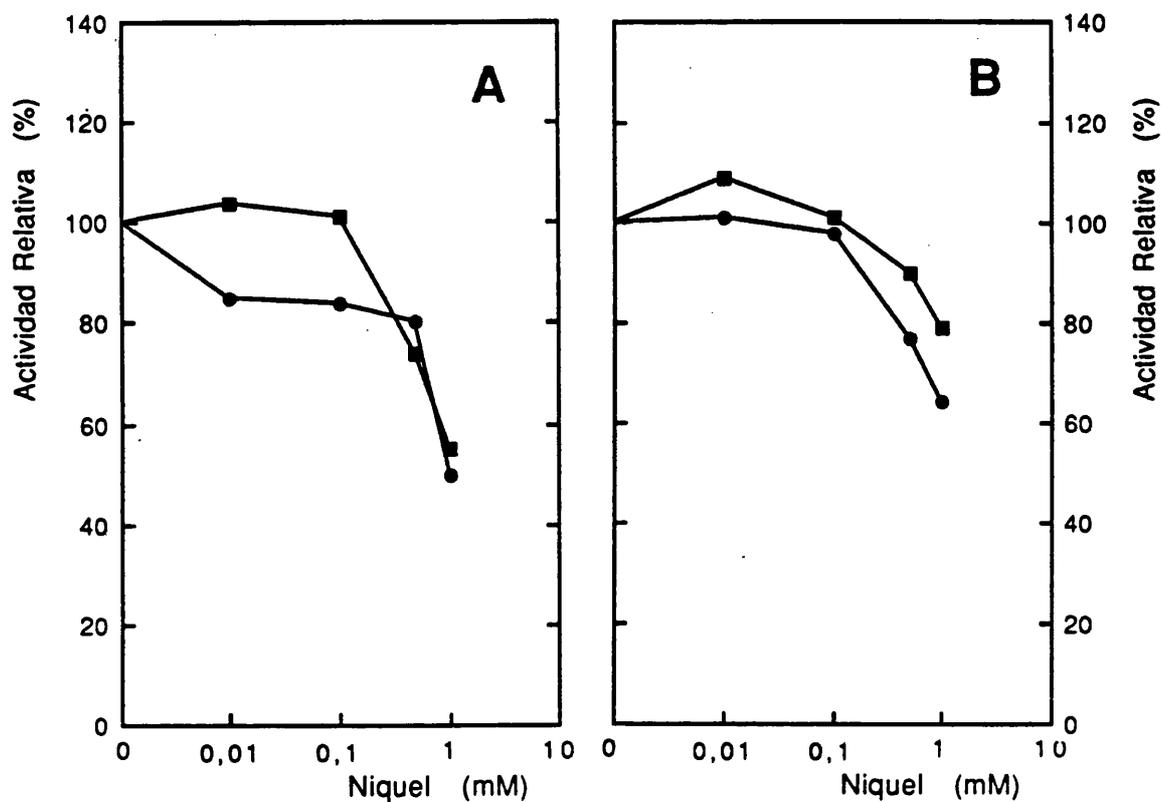


Figura 13. Efecto de la aplicación *in vitro* de varias concentraciones de Ni sobre la actividad Mg<sup>2+</sup> (círculos) y K<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup> (cuadrados) ATPasa de la MP de tallos (A) y raíces (B) de arroz. El ensayo se realizó como se describe en la figura 8. Los datos representan porcentaje de actividad con respecto a los controles.

en el medio de reacción de 0.1mM (Figura12, A y B). La concentración de Ni requerida para modificar la actividad de la enzima fue mayor que la de Cd, siendo de 0.5 mM para raíces y de 1 mM para tallos (Figura 13, A y B).

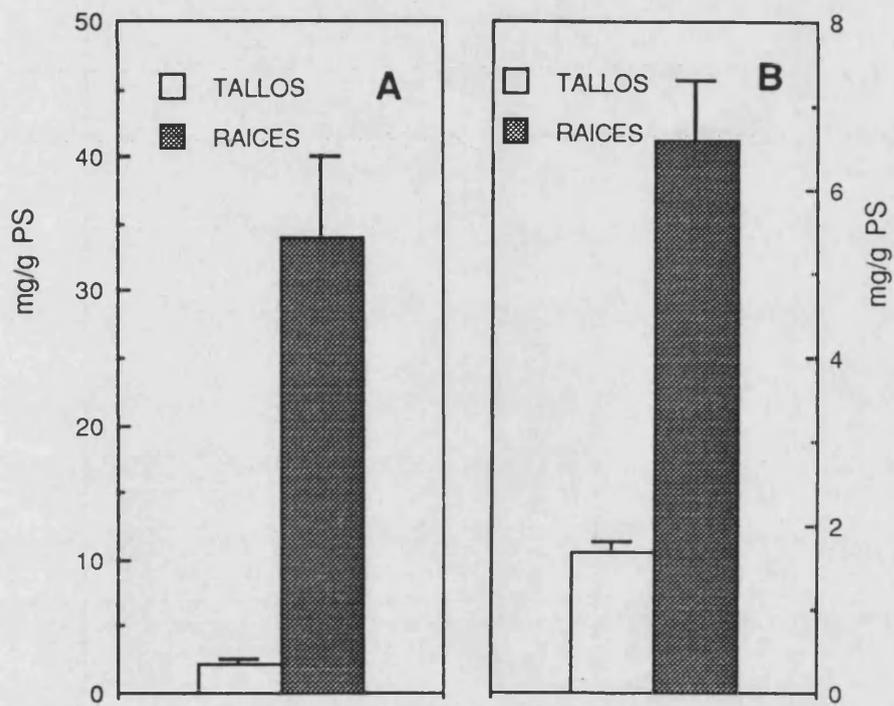
Asimismo, se observó que la presencia de potasio en el medio de reacción atenuó la inhibición producida por el Ni en raíces (Figura 13 B), como lo evidencia el hecho de que la actividad  $Mg^{2+}$ -ATPasa fuese inhibida por Ni 0.5 y 1 mM mientras que la  $K^{+}$ - $Mg^{2+}$ -ATPasa solamente se inhibió significativamente con 1 mM. Tales efectos no pudieron determinarse con Cd.

#### **4. NIVELES ENDOGENOS DE CADMIO Y NIQUEL**

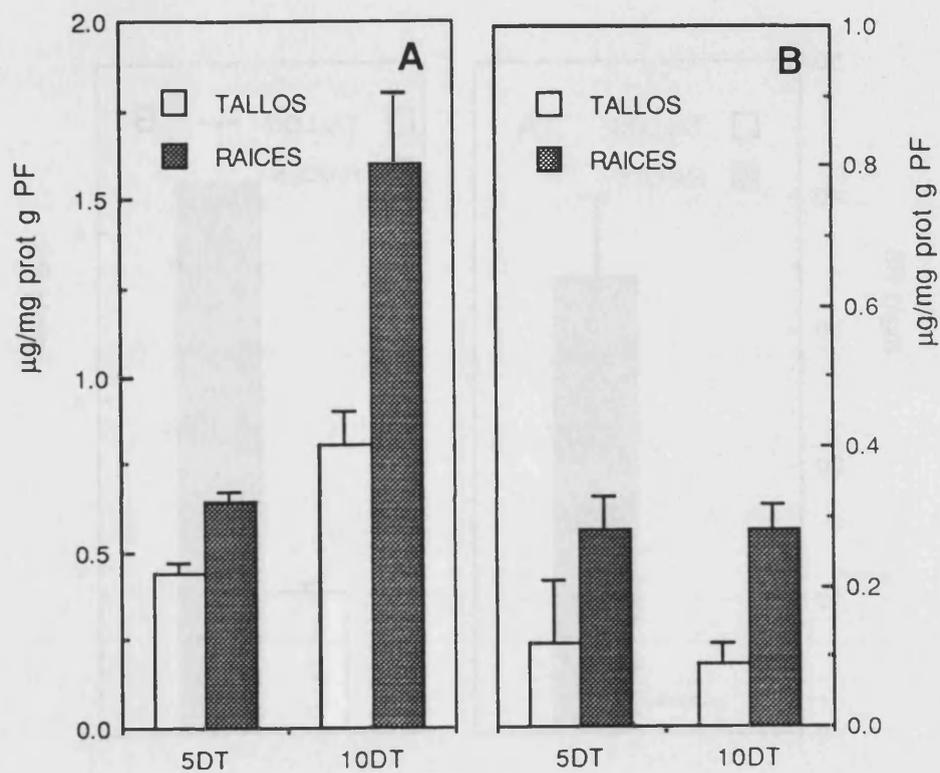
Se determinaron los contenidos endógenos de Cd y Ni en tallos, raíces y vesículas de MP de plantas control y tratadas con estos metales (0.5 mM) durante 5 y/o 10 días.

##### **4.1. NIVELES DE CADMIO**

Las plantas de arroz acumularon enormes cantidades de Cd, sobre todo en las raíces. Así, a los 10 días de tratamiento la distribución del Cd en la planta fue del orden de 15 veces mayor en las raíces que en los tallos (Figura 14 A). En el mismo sentido, el contenido en Cd fue mayor en las vesículas de MP obtenidas de raíces que en las obtenidas a partir de tallos (Figura 15 A). Este contenido se incrementó tras aumentar de 5 a 10 días el tiempo de exposición de las plantas al Cd, tanto en las vesículas de tallos como de raíces.



**Figura 14.** Contenido endógeno de Cd (A) y Ni (B) en tallos y raíces de plantas de arroz tratadas durante 10 días con 0.5 mM del metal. Los valores [mg (g PS)<sup>-1</sup>] determinados en plantas control son: 0.03 de Cd y 0.004 de Ni en tallos; 0.35 de Cd y 0.08 de Ni en raíces.



**Figura 15.** Contenido de Cd (A) y Ni (B) en vesículas de MP obtenidas de tallos y raíces de plantas tratadas durante 5 o 10 días con 0.5 mM del metal. Los valores de Cd [ $\mu\text{g} (\text{mg proteína})^{-1} \text{g PF}^{-1}$ ] determinados en plantas control son menores de 0.01 para tallos y de 0.04 para raíces; los de Ni son menores de 0.04 para tallos y raíces.

## 4.2. NIVELES DE NIQUEL

El Ni también se distribuyó asimétricamente en la planta. Su contenido fue aproximadamente 4 veces mayor en las raíces que en los tallos (Figura 14 B). Igualmente, esta distribución asimétrica se mantuvo en las vesículas obtenidas de raíces y tallos (Figura 15 B). Sin embargo, y a diferencia de las plantas tratadas con Cd, no se observó un incremento de los niveles endógenos tras aumentar el tiempo de exposición de las plantas al metal de 5 a 10 días.

En todos los casos los niveles de Cd fueron mayores que los de Ni.

## 5. EXPERIMENTOS DE TRATAMIENTO Y RECUPERACION CON CADMIO Y NIQUEL

A la vista de los resultados anteriormente presentados, se llevaron a cabo nuevos experimentos que permitieron profundizar en el estudio de la acción del Cd y Ni sobre la ATPasa y su membrana asociada, así como la posible reversibilidad del efecto al eliminar los tratamientos. Los experimentos se realizaron únicamente con tallos de plantas de arroz y utilizando concentraciones de Ni o Cd de 0.5 mM, que como ya hemos visto producían alteraciones fisiológicas importantes. Los tratamientos tuvieron una duración de 5 (Cd 5DT, Ni 5DT) o 10 (Cd 10DT, Ni 10DT) días. Posteriormente, algunas plantas tratadas durante 5 días fueron colocadas en medios libres de metales durante otros 5 (Cd 5DR, Ni 5DR) o 10 (Cd 10DR, Ni 10DR) días.

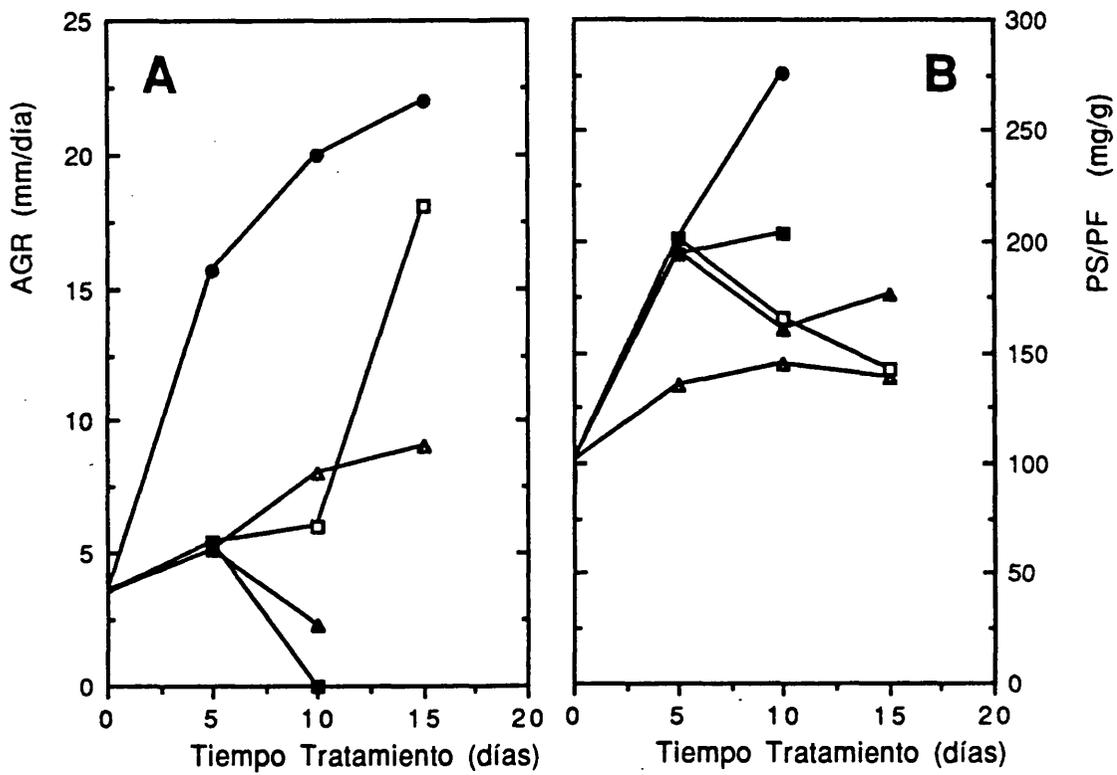


Figura 16. AGR (A) y relación Peso Seco: Peso Fresco (B) de tallos de plantas de arroz tratadas con Cd 0.5 mM (▲) y recuperadas (△); tratadas con Ni 0.5 mM (■) y recuperadas (□); y de plantas control (●).

## 5.1. EFECTO DEL CADMIO Y NIQUEL SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO Y SOBRE LA RELACION PESO SECO:PESO FRESCO

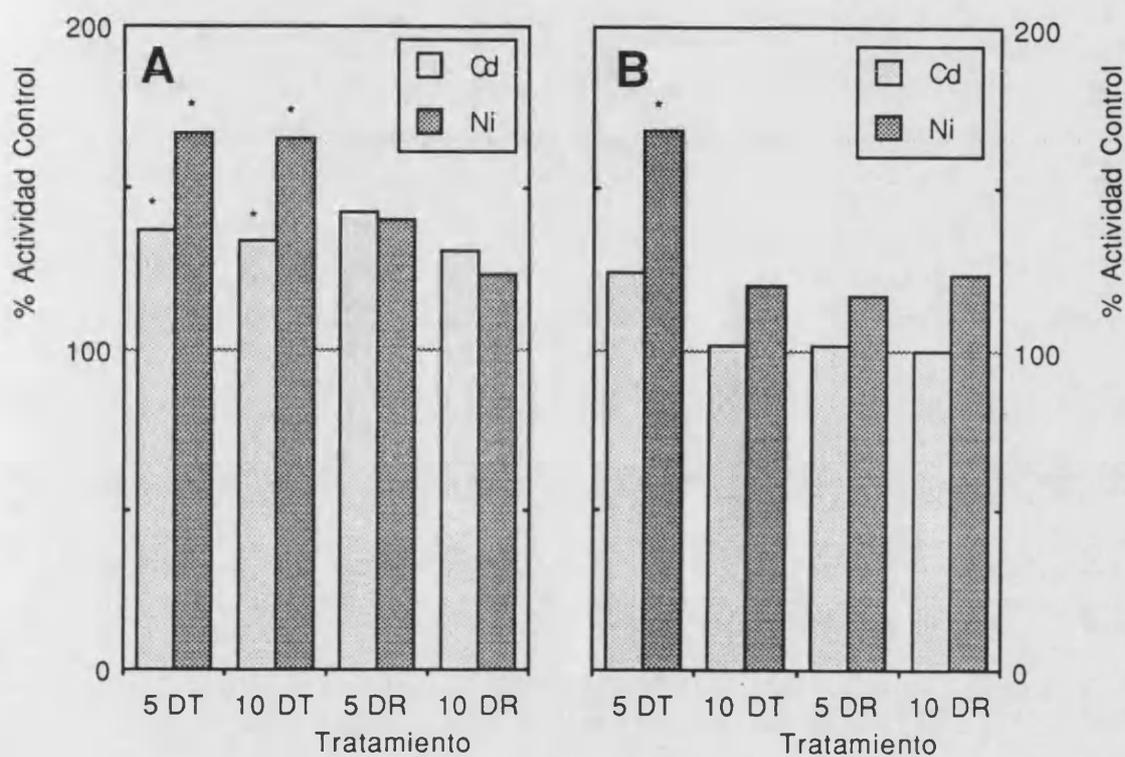
La tasa de crecimiento absoluto de la longitud del tallo (AGR) fue drásticamente reducida tras la adición de Ni o Cd al medio de cultivo, siendo cero en Ni 10DT (Figura 16 A). La relación peso seco:peso fresco aumentó con respecto a los controles alrededor de un 45 % en Cd 5DT, 41 % en Cd 10DT, 48 % en Ni 5DT y 90 % en Ni 10DT (Figura 16 B). Como puede verse, el efecto del Ni sobre estos parámetros fue mayor que el del Cd. No obstante, al eliminar los metales pesados de la solución nutritiva se observó una recuperación de los dos parámetros, acercando sus valores a los de los controles. La recuperación fue particularmente importante en Ni 10DR.

## 5.2. EFECTO DEL CADMIO Y NIQUEL SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa, COMPOSICION Y PROPIEDADES DE LA MEMBRANA PLASMATICA

### 5.2.1. ACTIVIDAD HIDROLITICA DE LA ATPasa Y BOMBEO DE PROTONES

Al tratar las plantas de arroz durante 5 ó 10 días con Ni, la actividad hidrolítica de la ATPasa de la MP de tallos aumentó significativamente un 66 % y un 67 % respectivamente en relación a la de los controles (Figura 17 A). En los experimentos de recuperación, la actividad de la enzima disminuyó progresivamente con respecto a las plantas tratadas y no fue significativamente distinta a la de los controles.

El Cd también activó significativamente la hidrólisis de ATP un 37 % y un 34 % a los 5 y 10 días de tratamiento respectivamente (Figura 17 A). En la recuperación posterior durante 5 ó 10 días en un medio sin Cd, los valores absolutos de la actividad ATPasa fueron menores que en las plantas tratadas ( $131 \mu\text{mol P}_i (\text{mg proteína})^{-1} \text{h}^{-1}$ ) en Cd 10DT frente a 112 en Cd 10DR). Pero



**Figura 17.** Porcentaje de actividad específica (A) y total (B) de la Mg-ATPasa de la MP de tallos de Cd y Ni 5DT, 10DT, 5DR y 10DR con respecto a plantas control. La actividad enzimática se ensayó en un medio como se describe en Material y Métodos más 1 mM de azida. Los valores de los controles de 5DT, 10DT, 5DR, y 10DT son 102, 98, 96 y 87 [ $\mu\text{mol P}_i$  (mg proteína) $^{-1}$  h $^{-1}$ ] en A, y 4.2, 5.8, 6.5 y 5.7 [ $\mu\text{mol P}_i$  (g peso fresco) $^{-1}$  h $^{-1}$ ] en B.

**Tabla 6.** Tasa de transporte de H<sup>+</sup> en estado estacionario (R<sub>0</sub>, [ $\Delta$ H<sup>+</sup> (mg prot)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>] y relación entre transporte y actividad hidrolítica de la ATPasa en vesículas de MP de Cd y Ni 10DT, 10DR y plantas control.

TRATAMIENTO		R <sub>0</sub>	R <sub>0</sub> / Act. específica
10DT	Control	27	0.28
	Cd	21	0.16
	Ni	22	0.14
10DR	Control	32	0.37
	Cd	20	0.18
	Ni	21	0.19

\*, significativamente distinto del control.

también se produjo una disminución en el tiempo del valor absoluto de la actividad enzimática en plantas control con lo que el porcentaje de activación fue similar en plantas tratadas y recuperadas. No obstante la mayor variabilidad encontrada en los experimentos de recuperación no permitió detectar diferencias significativas con los controles.

La actividad Mg-ATPasa total solamente fue significativamente mayor a los controles en Ni 5DT (Figura 17 B).

El bombeo de protones fue expresado como tasa de transporte de H<sup>+</sup> en estado estacionario (Tabla 6). Este parámetro no fue afectado significativamente por los tratamientos aunque, contrariamente a la hidrólisis de ATP, se observó una tendencia a disminuir. Así, la relación R<sub>0</sub>:actividad ATPasa siempre fue mayor en las plantas control que en las tratadas con Cd o Ni, incluso tras los experimentos de recuperación (Tabla 6).

## 5.2.2. CONTENIDO PROTEICO Y LIPIDICO DE LA MEMBRANA PLASMATICA

Como pauta general, el contenido ( $\mu\text{g}$  por g de peso fresco) en esteroides, proteínas y fosfolípidos de las vesículas aisladas de plantas tratadas fue menor que el de las plantas control correspondientes (Tabla 7). Este hecho se debió, posiblemente, a una disminución en términos absolutos de la cantidad de material de membrana aislado a partir de plantas tratadas, puesto que no varió la relación entre contenido lipídico y proteico (Tabla 7).

### 5.2.2.1. ESTEROLES DE LA MEMBRANA PLASMATICA

Los resultados del contenido de esteroides se muestran en la tabla 8. Como puede observarse, los esteroides más abundantes en la MP de tallos de arroz fueron estigmasterol, sitosterol y campesterol, representando más del 90 % del total. También se determinaron colesterol y  $\Delta^5$ -avenosterol pero

**Tabla 7.** Contenido en proteínas, esteroides y fosfolípidos ( $\mu\text{g/g}$  PF) en vesículas de plasmalema de tallos de arroz procedentes de plantas control, tratadas con Cd y Ni y recuperadas. Los datos son la media  $\pm$  EE.

TRATAMIENTO		PROTEINAS	ESTEROLES	FOSFOLIPIDOS	RELACION PROT/LIPIDOS
SDT	Control	40 $\pm$ 5	6.8 $\pm$ 1.5	21 $\pm$ 3	1.44 $\pm$ 0.07
	Cd	37 $\pm$ 6	5.5 $\pm$ 1.5	20 $\pm$ 3	1.5 $\pm$ 0.1
	Ni	41 $\pm$ 6	5.6 $\pm$ 1.1	22.9 $\pm$ 1.4	1.4 $\pm$ 0.2
10DT	Control	55 $\pm$ 3	8 $\pm$ 2	34 $\pm$ 4	1.4 $\pm$ 0.2
	Cd	32 $\pm$ 2	3.9 $\pm$ 1.3	21.6 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.1
	Ni	37 $\pm$ 6	4.4 $\pm$ 1.5	21.8 $\pm$ 1.4	1.32 $\pm$ 0.05
5DR	Control	67 $\pm$ 3	9.2 $\pm$ 0.5	22 $\pm$ 4	2.2 $\pm$ 0.1
	Cd	48 $\pm$ 3	6.4 $\pm$ 0.3	15 $\pm$ 4	2.2 $\pm$ 0.1
	Ni	57 $\pm$ 2	7.9 $\pm$ 1.0	20.5 $\pm$ 1.3	2.0 $\pm$ 0.1
10DR	Control	69 $\pm$ 8	10 $\pm$ 2	30 $\pm$ 3	1.73 $\pm$ 0.1
	Cd	55 $\pm$ 5	8 $\pm$ 1	22 $\pm$ 2	1.9 $\pm$ 0.4
	Ni	65 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2	25 $\pm$ 5	1.8 $\pm$ 0.2

**Tabla 8.** Esteroles de la MP de tallos de arroz obtenidos de plantas control y de Cd y Ni 5DT, 10DT, 5DR y 10DR. Los datos representan el porcentaje de cada esterol sobre el total.

TRATAMIENTO	5DT			10DT			5DR			10DR		
	CONTROL	Cd	Ni	CONTROL	Cd	Ni	CONTROL	Cd	Ni	CONTROL	Cd	Ni
COLESTEROL	4.7	4.8	4.5	1.6	1.7	1.8	3.6	3.6	3.2	3.2	3.0	2.6
CAMPESTEROL	22	24*	18*	22	19	14*	22	22	17*	25	21*	20*
ESTIGMASTEROL	36	40*	41*	38	39	37	38	41	39	38	43*	42*
SITOSTEROL	34	31*	35	35	40	46*	33	33	38*	32	33	35
$\Delta^5$ -AVENOSTEROL	3.5	0.2*	1.0*	3.7	0.6*	1.2*	3.3	0.3*	2.8	2.2	-	0.8
TOTAL ( $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ )	165	146	143	158	131	116	138	135	141	146	153	136

\*, significativamente distinto del control.

siempre en porcentaje menor del 5 % del total.

Los tratamientos con metales pesados modificaron el porcentaje de esteroides en la MP con respecto al de los controles (Tabla 8). Así, el campesterol disminuyó significativamente un 18 % y un 36% en Ni 5DT y 10DT respectivamente. El  $\Delta^5$ -avenosterol también fue reducido significativamente en los dos tratamientos (aproximadamente un 70 %). Se observó una tendencia del sitosterol a aumentar en 5DT, que fue significativa en 10DT (33 %). Estigmasterol solamente fue modificado en 5DT. El porcentaje de colesterol y las cantidades totales (en relación al contenido proteico) no fueron distintas a los controles en ningún caso.

En los experimentos de recuperación, el porcentaje de campesterol, que se había reducido tras el tratamiento, aumentó aproximadamente un 21% en Ni 5DR y un 43 % en Ni 10DR con respecto a Ni 10DT, aunque todavía fue significativamente menor al del control (Tabla 8). El sitosterol, que había aumentado en las plantas tratadas, disminuyó un 17 % en 5DR con respecto a 10DT, y en 10DR, disminuyó un 24 % con respecto a 10DT no siendo significativamente distinto del control. No se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de  $\Delta^5$ -avenosterol. Sin embargo, el de estigmasterol aumentó en 10DR significativamente con respecto a las plantas control y a 10DT.

El tratamiento con Cd también modificó los porcentajes en esteroides con respecto a los controles (Tabla 8). En Cd 5DT, se observó un aumento significativo de campesterol (9 %) y estigmasterol (11 %) y además una reducción de los porcentajes de  $\Delta^5$ -avenosterol (94 %) y sitosterol (9%). En Cd 10DT, aunque solamente  $\Delta^5$ -avenosterol se redujo significativamente (83 %), pudo observarse una tendencia a la reducción de campesterol y al incremento de sitosterol, como en las plantas tratadas con Ni.

En los experimentos de recuperación se observaron cambios significativos en los porcentajes de  $\Delta^5$ -avenosterol en 5DR y de campesterol

**Tabla 9.** Fosfolípidos, longitud (C16:18) e índice de insaturación (BI) de las cadenas de ácidos grasos de fracciones de MP de tallos de arroz obtenidas de plantas control y de Cd y Ni 5DT, 10DT, 5DR y 10DR. Los valores de los PL representan el porcentaje sobre el total.

TRATAMIENTO	5 DT			10 DT			5 DR			10 DR		
	CONTROL	Cd	Ni	CONTROL	Cd	Ni	CONTROL	Cd	Ni	CONTROL	Cd	Ni
PE	32	31	34	31	29	29	36	36	32	37	34	37
PC	47	45	46	39	38	36	46	45	50	50	48	47
PS	9	13	9	20	22	23	8	7	7	5	6	5
PI	12	11	11	10	11	12	10	12	11	9	12	11
TOTAL ( $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ )	537	553	580	629	678	608	320	322	364	437	412	369
BI	90	85	88	121	105*	103*	109	93	104	123	112	110
C16:18	0.96	1.03	0.91	0.64	0.78*	0.73*	0.72	1.02	0.86	0.67	0.74	0.73
RELACION MOLAR ESTEROL/PL	0.59	0.51	0.47	0.48	0.37	0.37	0.83	0.80	0.70	0.64	0.71	0.71

BI, sumatorio del porcentaje de cada ácido graso por el número de dobles enlaces. C16:18, Relación entre los ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono de los fosfolípidos. \*, significativamente distinto del control.

en 10DR. Además, como en el caso de la recuperación del Ni, el porcentaje de estigmasterol aumentó significativamente en 10DR.

#### 5.2.2.2. FOSFOLÍPIDOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Los fosfolípidos (PL) del plasmalema se expresaron como cantidades totales, porcentaje de cada PL y relación de la longitud (C16:18) e índice de insaturación (BI) de las cadenas de sus ácidos grasos (Tablas 9, 10 y 11).

Los PL más abundantes en la MP de tallos de arroz fueron fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC), representando en los controles entre un 70 y un 87 % de total (Tabla 9). También pudieron identificarse fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI), que llegaron a constituir hasta un 30 % del total en el control de plantas tratadas 10 días.

Los tratamientos con Cd o Ni no produjeron diferencias ni en las cantidades totales (por mg de proteína) ni en el porcentaje de cada PL. Sin embargo, se apreció una reducción global de la longitud de las cadenas (mayor relación C16:18) y del índice de insaturación (menor BI) de sus ácidos grasos en Ni y Cd 10DT (Tabla 9). El estudio individual de estos dos últimos parámetros en cada uno de los fosfolípidos, mostró una disminución significativa del índice de insaturación en las fracciones de PC de Cd y Ni 10DT y de PE de Cd 10DR (Tabla 10), mientras que la longitud de las cadenas solamente se redujo significativamente en la fracción de PE de Cd 10DR (Tabla 11).

Por último, la relación molar esteroides:fosfolípidos también se vio modificada por el tratamiento con metales pesados, siendo menor en Cd y Ni 5DT, 10DT y 5DR pero mayor en Cd y Ni 10DR (Tabla 9).

**Tabla 10.** Índice de insaturación (BI) de los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de la MP de tallos de plantas control y de Cd y Ni 5DT, 10DT, 5DR y 10DR.

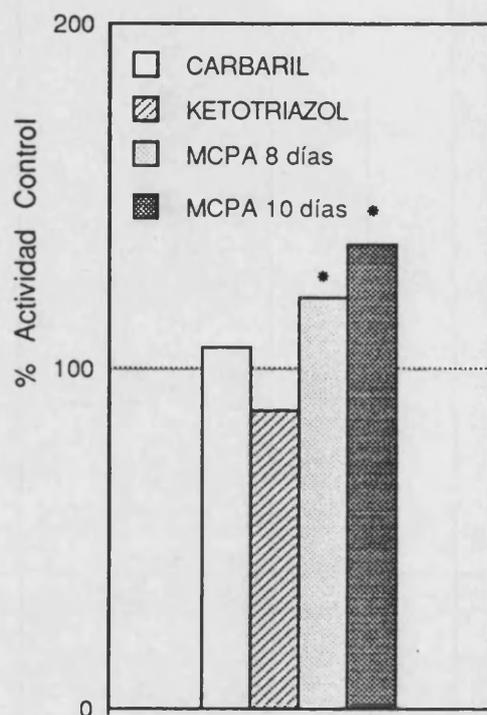
TRATAMIENTO	5DT			10DT			5DR			10DR		
	CONTROL	Cd	Ni	CONTROL	Cd	Ni	CONTROL	Cd	Ni	CONTROL	Cd	Ni
PE	108	107	100	134	120	117	121	98	116	130	122*	129
PC	98	99	104	130	120*	114*	118	113	115	133	125	118
PS	35	27	18	118	97	92	63	34	44	60	47	39
PI	51	35	38	65	50	57	66	54	54	73	66	51

BI, sumatorio del porcentaje de cada ácido graso por el número de dobles enlaces. \*, significativamente distinto del control.

**Tabla 11.** Relación entre la longitud de las cadenas (C16: 18) de los ácidos grasos de los fosfolípidos presentes en la MP de tallos de arroz obtenidos de plantas control y de Cd y Ni 5DT, 10DT, 5DR y 10DR.

TRATAMIENTO	5DT			10DT			5DR			10DR		
	CONTROL	Cd	Ni	CONTROL	Cd	Ni	CONTROL	Cd	Ni	CONTROL	Cd	Ni
PE	0.71	0.69	0.81	0.56	0.70	0.64	0.67	1.1	0.72	0.63	0.68*	0.60
PC	0.92	0.86	0.67	0.55	0.64	0.63	0.60	0.73	0.70	0.58	0.59	0.63
PS	1.9	2.7	2.7	0.66	0.84	0.90	1.3	2.4	2.3	1.2	2.4	2.2
PI	1.7	2.3	2.1	1.5	1.4	1.3	1.3	1.8	1.8	1.2	1.6	1.7

\*, significativamente distinto del control.



**Figura 18.** Efecto de aplicaciones *in vivo* de Carbaril 10  $\mu\text{M}$ ,  $\gamma$ -Ketotriazol 0.5  $\mu\text{M}$  (8 días) y MCPA 1.4  $\mu\text{M}$  durante 8 o 10 días sobre la actividad Mg-ATPasa de la MP de tallos. La reacción enzimática se llevó a cabo en un medio de reacción como se describe en la figura 17. Los datos representan % de actividad respecto a plantas controles.

### 5.2.3. FLUIDEZ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

La fluidez de la membrana no fue significativamente diferente en plantas control y tratadas (Tabla 12), aunque sí que se observó una tendencia a disminuir en las tratadas (a mayor valor de P, menor fluidez).

**Tabla 12.** Fluidez de las vesículas de MP de tallos de Cd y Ni 10DT y plantas controles. Los valores de P (fluorescencia polarizada) representan la media ; n=2.

CONTROL	CADMIO	NIQUEL
0.339	0.366	0.358
*, significativamente distinto del control.		

### 6. EFECTO DEL MCPA , KETOTRIAZOL Y CARBARIL SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa Y CONTENIDO LIPÍDICO DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Además de los metales pesados se estudió el efecto de los herbicidas MCPA y  $\gamma$ -Ketotriazol, y del insecticida Carbaril sobre la actividad ATPasa de la MP.

No obstante, de todos los tratamientos realizados solamente el MCPA aplicado durante 10 días activó significativamente la ATPasa (Figura 18).

En la tabla 13 se muestra la composición de esteroides en la MP de plantas tratadas y control. Tanto en las plantas tratadas durante 8 ó 10 días

**Tabla 13.** Esteroles de la MP de tallos procedentes de plantas control y tratadas durante 8 y/o 10 días con Carbaril 10  $\mu\text{M}$ , Ketotriazol 0.5  $\mu\text{M}$  o MCPA 1.4  $\mu\text{M}$ .

TRATAMIENTO	8 DIAS				10 DIAS	
	CONTROL	KETOTRIAZOL	CARBARIL	MCPA	CONTROL	MCPA
COLESTEROL	4	3	3	3	1.6	1.8
CAMPESTEROL	22	20	21	21	21	19
14- $\alpha$ -METIL $\Delta^8$ -COLESTANOL	-	7	-	-	-	-
ESTIGMASTEROL	36	34	36	35	36	35
OBTUSIFOLIOL	-	3.2	-	-	-	-
DIHIDROOBTUSIFOLIOL	-	4	-	-	-	-
SITOSTEROL	34	27*	35	38	37	41
$\Delta^5$ -AVENOSTEROL	5.0	1.6*	5.2	2.1*	4.2	2.4*
TOTAL ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot)	79	69	86	96	160	195

\* , significativamente distinto del control

con MCPA como con  $\nu$ -ketotriazol el porcentaje de  $\Delta^5$ -avenosterol disminuyó drásticamente. En las plantas tratadas con MCPA el sitosterol tendió a aumentar. Por el contrario disminuyó su porcentaje significativamente en plantas tratadas con  $\nu$ -ketotriazol. Además se identificaron 14- $\alpha$ -metil esteroides, fundamentalmente el 14- $\alpha$ -metil  $\Delta^8$ -colestanol, los cuales no se detectaron en las plantas restantes.

Por último, también se produjo una reducción significativa de la longitud de las cadenas de los ácidos grasos de PC procedente de plantas tratadas 10 días con MCPA (Tabla 14). El índice de insaturación de las cadenas no fue significativamente modificado por ningún tratamiento (Tabla 15).

El Carbaril, no alteró significativamente ninguno de los parámetros determinados (Figura 18; Tablas 13, 14 y 15).

**Tabla 14.** Relación entre la longitud de las cadenas (C 16:18) de los ácidos grasos de las fracciones PE y PC de la MP de tallos de plantas control y tratadas durante 8 y/o 10 días con Carbaril 10  $\mu\text{M}$ , ketotriazol 0.5  $\mu\text{M}$  y MCPA 1.4  $\mu\text{M}$ .

TRATAMIENTO	8 DIAS				10 DIAS	
	CONTROL	KETOTRIAZOL	CARBARIL	MCPA	CONTROL	MCPA
PE	0.62	0.77	0.70	0.80	0.52	0.62
PC	0.53	0.67	0.50	0.62	0.53	0.64*

\*, significativamente distinto del control.

**Tabla 15.** Índice de insaturación (BI) de los ácidos grasos de las fracciones PE y PC de la MP de tallos de plantas de arroz control y tratados durante 8 y/o 10 días con Carbaril 10  $\mu\text{M}$ , Ketotriazol 0.5  $\mu\text{M}$  y MCPA 1.4  $\mu\text{M}$ .

TRATAMIENTO	8 DIAS				10 DIAS	
	CONTROL	KETOTRIAZOL	CARBARIL	MCPA	CONTROL	MCPA
PE	128	119	118	117	133	131
PC	130	112	130	126	131	123

BI, sumatorio del porcentaje de cada ácido graso por el número de dobles enlaces. \*, significativamente distinto del control.

## **DISCUSSION**

## **I. CARACTERIZACION DE LA ATPasa DE PLASMALEMA DE RAICES DE ARROZ**

Partiendo de fracciones ricas en vesículas de MP ( $S_3$ ) se han estudiado las propiedades y características de la ATPasa de plasmalema de raíces de arroz. La pureza de las fracciones de plasmalema empleadas fue demostrada por el incremento de la actividad ATPasa sensible al vanadato (5 veces mayor que en la fracción microsomal), (Tabla 1), por la tinción de la mayoría de las vesículas con silicotunstato sódico (Figura 2) y por la ausencia de contaminación por marcadores de otras membranas (Tablas 1 y 2).

Las características de la ATPasa de raíces de arroz estudiadas por nosotros, no coinciden plenamente con las descritas en la literatura para otras especies. Así, la mayoría de los estudios describen un pH óptimo para actividad  $K^+-Mg^{2+}$ -ATPasa de 6.5 (Sommarin et al., 1985; Sandstrom et al., 1987; Blum et al., 1988). En otros, la ATPasa parece poseer un pH óptimo de 6.0 (Larsson et al., 1984; Robinson et al., 1988). No obstante, en todos estos estudios las concentraciones de ATP y KCl utilizadas en el medio de reacción fueron similares (aproximadamente ATP 3 mM y KCl 50 mM). Sin embargo, se ha descrito un efecto estimulante distinto del KCl sobre la ATPasa dependiendo de la fuerza iónica (Gibrat et al., 1985) y del pH del medio (Palmgren et al., 1988). En este sentido, en nuestras preparaciones de MP observamos dos picos de actividad  $K^+-Mg^{2+}$ -ATPasa a pH 6.0 y 6.5 (Figura 5) con grandes diferencias en los requerimientos de ATP y KCl, así como en los parámetros cinéticos (Figuras 3 y 4). La escasa hidrólisis encontrada con la utilización de los distintos sustratos fosforilados (Tabla 2) y la presencia de

molibdato sódico - inhibidor de las fosfatasas ácidas- en el medio de reacción elimina la posibilidad de contaminación por fosfatasas inespecíficas o pirofosfatasas (Larsson, 1985; Blum et al., 1988).

Con el fin de caracterizar los dos picos de actividad ATPasa determinados a pH 6.0 y 6.5, se estudió el efecto de iones e inhibidores, y la especificidad por el sustrato. Ambas actividades fueron inhibidas por ortovanadato y  $\text{Ca}^{2+}$ , descritos como inhibidores de la ATPasa de la MP (Widell y Larsson 1990; Bérczi et al., 1989) (Tabla 5), pero no por inhibidores de las membranas mitocondriales (azida) o tonoplásticas (nitrito) (Widell y Larsson, 1990). Además, las dos actividades enzimáticas fueron estimuladas por cationes y mostraron una elevada especificidad por el ATP (Tablas 2 y 3), siendo todas estas características típicas de la ATPasa de MP.

Estos resultados sugieren la presencia en las vesículas de MP de arroz de una ATPasa, cuyas características son afectadas drásticamente por el medio. El efecto de las condiciones de ensayo en las propiedades de las enzimas asociadas a membrana ya ha sido descrito por otros autores (Edman et al., 1985; Giannini y Briskin, 1989). En 1989, Giannini y Briskin, observaron que la concentración de KCl afectaba la  $K_m$  de la ATPasa de MP de *Beta vulgaris*. Igualmente, Gibrat y col. (1985) mostraron que KCl estimulaba la actividad ATPasa de la MP de raíces de *Zea mays* modificando la  $K_m$  y la  $V_{max}$ . Similarmente, nosotros observamos que la concentración de KCl y el pH modificaron los parámetros cinéticos de la ATPasa de la MP de raíces de arroz en presencia de concentraciones equimolares de Mg y ATP en el medio (Figura 6). Estas modificaciones no parecen deberse a interferencias del ATP libre sobre el equilibrio Mg-ATP, puesto que se obtuvieron resultados similares en presencia de un exceso de  $\text{Mg}^{2+}$  (Figura 7). Por otra parte, también debe descartarse la posible interferencia del  $\text{P}_i$  y del AMP, ya que prácticamente no inhiben la actividad ATPasa (Bennett et al., 1985). Además, el efecto inhibitor

del ADP sobre la enzima parece ser competitivo (Bennett et al., 1985) por lo que, en este caso, la  $V_{max}$  no debería cambiar.

Se sabe que las membranas biológicas presentan un potencial de superficie negativo a pH neutro, el cual depende tanto del número de cargas negativas de la superficie de las membranas como de la concentración y tipo de cationes presentes en la solución donde se encuentran. Este potencial de superficie afecta la  $K_m$  aparente e incluso la  $V_{max}$  de las enzimas de membrana que requieren sustratos cargados (Møller y Lundborg, 1985). Por ello, los dos picos de actividad ATPasa detectados en nuestras preparaciones podrían ser explicadas por interacciones electrostáticas. Puesto que el Mg-ATP está cargado negativamente a pH 6.0-6.5, los cationes facilitarían la accesibilidad del sustrato a la enzima al reducir el potencial de membrana (Gibrat et al., 1985). Sin embargo, pudimos encontrar que con el aumento de la concentración de KCl se obtuvieron mayores  $K_m$  aparentes para el ATP en todos los casos. Además no solamente se determinaron cambios en la  $K_m$  sino también en la  $V_{max}$  (Figuras 6 y 7).

El efecto complejo del  $Mg^{2+}$ , que es un cofactor de la enzima, también debe tenerse en cuenta. De Michelis y col. (1988) comprobaron que el Mg modificaba la sensibilidad de la ATPasa de la MP de *Raphanus sativus* a la fusicoccina, Triton X-100 y a la temperatura. En nuestros experimentos, se observó que Mg 30 mM en presencia de KCl, estimuló la actividad ATPasa a pH 6.0 a todas las concentraciones de ATP ensayadas, pero a pH 6.5 estimuló o inhibió la actividad de la enzima en función de la concentración de ATP presente en el medio (Tabla 4). En ausencia de KCl en el medio de ensayo, la activación por  $Mg^{2+}$  fue mayor a pH 6.5 que a pH 6.0.

Todos estos resultados evidencian las complejas interacciones que existen entre el medio de ensayo y la ATPasa asociada a la MP. Las

condiciones del medio podrían provocar cambios conformacionales en la enzima e interferir en la reacción enzima-sustrato, originando una mayor o menor afinidad del sustrato por la enzima. En este sentido, se han postulado múltiples estados conformacionales de la enzima asociados con la catálisis (Briskin, 1986), los cuales podrían estar inducidos por K o Mg (Briskin, 1988 a, b; Briskin, 1990).

En las interacciones ATPasa-medio de reacción también podrían estar implicados los lípidos asociados a la enzima. Se ha demostrado que algunas proteínas de membrana están sometidas al campo eléctrico producido por las cargas de los lípidos que las rodean (Gibrat y Grignon, 1982). De esta forma, los cationes monovalentes estimularían la ATPasa interaccionando electrostáticamente con los lípidos cargados adyacentes a la misma. Así, los cambios en las propiedades electrostáticas de la membrana inducidos por la composición de metabolitos en el medio podrían constituir un mecanismo regulador de esta enzima, controlando su actividad mediante modificaciones de su  $K_m$ . Según este mecanismo, la activación de la enzima por iones podría ser explicada sin necesidad de postular sitios específicos de unión a la proteína para las diferentes especies iónicas (Ahrens, 1981). Una prueba a favor de esta hipótesis sería la inespecificidad mostrada por los cationes monovalentes a pH 6.0 (Tabla 3). No obstante, no hay que descartar una acción directa de algunos iones ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ) sobre la actividad de la ATPasa como han sugerido algunos autores (Serrano, 1990; Briskin, 1990).

## 2. LIPIDOS DE LA MEMBRANA PLASMATICA DE TALLOS DE ARROZ

La utilización reciente de nuevas técnicas de aislamiento de vesículas de plasmalema ha permitido determinar con un grado importante de exactitud la composición lipídica del plasmalema, ya que las preparaciones de MP obtenidas por gradiente de densidad contenían cantidades variables de otras membranas intracelulares (Sandstrom y Cleland, 1989 b).

El análisis de los esteroides de la MP de tallos de arroz mostró que los más abundantes fueron estigmasterol, sitosterol y campesterol, aunque también se determinaron colesterol y  $\Delta^5$ -avenosterol (Tabla 8). De los fosfolípidos identificados, los mayoritarios fueron PC y PE, encontrándose PI y PS en cantidades menores (Tabla 9). Estos resultados coinciden, en general, con los obtenidos en raíces de maíz (Grandmougin et al., 1989 b), hojas de cebada (Rochester et al., 1987 b) u hojas de centeno (Lynch y Steponkus, 1987). No obstante, los estudios realizados parecen indicar la existencia de una gran variabilidad en la composición lipídica de la MP, no sólo entre especies sino también entre los distintos órganos de la misma planta (Sandstrom y Cleland 1989 b; Rochester et al., 1987 a). Esta variabilidad incluye diferencias cualitativas y cuantitativas tanto en los esteroides como en los fosfolípidos. Además, un mismo tejido puede presentar distinta composición en función de la edad y del estado nutricional de la planta (Brown y Dupont, 1989; Bottacin et al., 1990). Así por ejemplo, pudimos observar modificaciones en los porcentajes de algunos lípidos en los distintos controles, fundamentalmente de PS, que podrían ser explicadas por alguna de las causas apuntadas anteriormente.

Según lo expuesto, se podría pensar que las enzimas embebidas en la MP se hallarían en ambientes lipídicos muy distintos. Sin embargo, las características de la membrana están determinadas por las interacciones de

todos los componentes de la bicapa (Carruthers y Melchior, 1986) y además también existe la posibilidad de formación de microambientes lipídicos alrededor de la enzima (Edidin, 1981), por lo que las diferencias serían menores de lo que podría sugerir el análisis de la composición lipídica.

### **3. EFECTO DE LOS XENOBIOTICOS SOBRE LA ATPasa Y SOBRE LA COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA PLASMATICA**

Los metales pesados Cd y Ni modificaron de distinta manera la actividad ATPasa de plasmalema de arroz, dependiendo del órgano de procedencia de la enzima y del tipo de ensayo realizado. En los experimentos *in vivo*, ambos metales aumentaron la actividad ATPasa de la MP de tallos (Figuras 8 y 10), siendo la activación dependiente de la concentración. Sin embargo, cuando se estudió el efecto de los metales sobre la ATPasa de la MP de las raíces, no se observó una tendencia clara como en tallos. Mientras el tratamiento con Cd no modificó significativamente la actividad ATPasa de raíces, el Ni estimuló la enzima cuando se aplicó a bajas concentraciones (0.1 mM) y la inhibió a concentraciones mayores ( Figuras 9 y 11).

Con el fin de determinar si el efecto de los metales sobre la ATPasa era directo o indirecto, procedimos a estudiar su efecto *in vitro*. En estos experimentos se observó una inhibición clara de la actividad ATPasa tras la exposición de las vesículas a Cd o Ni (Figuras 12 y 13). Este efecto fue dependiente de la concentración de metal, independiente del origen de las vesículas y se vió afectado, en algunos casos, por la presencia de potasio en el medio de reacción.

La inhibición por Cd<sup>2+</sup> de la actividad ATPasa *in vitro* ha sido relacionada con la capacidad de los cationes divalentes para formar un complejo con el ATP ( Lindberg y Wingstrand, 1985). De igual modo, el Ni<sup>2+</sup>

también podría formar un complejo Ni-ATP, disminuyendo la concentración del sustrato de la ATPasa (Mg-ATP) en el medio y por tanto influyendo negativamente en la actividad de la enzima. Este mecanismo podría explicar, al menos en parte, la inhibición producida por el Cd y Ni *in vitro*. Otro posible mecanismo implicaría la interacción de los metales con los grupos -SH de la ATPasa (Van Assche y Clijsters, 1990), lo que causaría cambios conformaciones en la enzima y con ello su inhibición. Debido a las características de los dos metales, estas interacciones son mucho más probables con Cd que con Ni, por lo que la mayor inhibición producida por el Cd podría deberse a esta causa. Por último, los cationes Cd<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup> podrían también unirse a los fosfolípidos de la membrana que a su vez influirían sobre la actividad de la ATPasa (Sundaralingam y Jensen, 1965).

Podríamos asumir, por tanto, que los efectos directos de los metales sobre la ATPasa, su sustrato o sobre los fosfolípidos son los responsables de la inhibición observada *in vitro*. Sin embargo, la activación de la ATPasa determinada en algunos experimentos *in vivo* no puede explicarse mediante los mismos mecanismos descritos anteriormente, sugiriendo que otro modo de acción distinto, posiblemente indirecto, podría estar implicado en la regulación de su actividad.

Con respecto a los niveles de Cd y Ni en las plantas tratadas, se encontró que las raíces presentaban un contenido mayor que los tallos y que el Cd se acumuló mucho más que el Ni, sobre todo en raíces. Estos resultados corroboran los numerosos estudios sobre acumulación y absorción de Cd en plantas de arroz, los cuales han puesto de manifiesto la gran avidez que posee esta planta por el tóxico (Honma y Hirata, 1984).

La diferente distribución de metales en tallos y raíces ha sido observada por diversos autores (Hara y Sonoda, 1979; Barceló et al., 1986; Becerril et al., 1989). Algunos de ellos la han considerado como una

estrategia de tolerancia a los metales tóxicos. La tolerancia en determinadas especies vegetales, especialmente monocotiledóneas, podría estar asociada con la estimulación de la acumulación de metales en raíces y la restricción de su transporte hacia el tallo (Baker y Walker, 1989 b). En este sentido, Honma e Hirata (1984) observaron que las raíces de arroz presentaban mayor afinidad por el Cd que por el Zn, sobre todo a concentraciones bajas en el medio, aunque las cantidades de Zn transportadas a los tallos fueron mucho mayores que las de Cd. Por otra parte, Dabin y col. (1978) pusieron de manifiesto la gran capacidad de fijación de Cd que poseían las paredes celulares de raíces de arroz en presencia de altas concentraciones en el medio, por lo que la distinta concentración de metales (fundamentalmente Cd) en tallos y raíces podría deberse a la unión de los metales a las paredes celulares de raíces y no a una restricción del transporte hacia el tallo. Finalmente, otro posible mecanismo de resistencia encontrado en nuestras plantas, podría estar relacionado con la aparición de una capa mucilaginoso alrededor de las raíces que, liberada por las células de la caliptra y de la epidermis, retendría los iones metálicos en la rizosfera (Horst et al., 1982).

A nivel de vesículas, no se ha encontrado bibliografía que nos permita compararla con nuestros resultados. Es interesante destacar el bajo contenido en metales detectado en las mismas, a pesar de la elevada acumulación encontrada en la planta entera (Figuras 14 y 15). No obstante, las vesículas obtenidas de raíces siempre mostraron un mayor contenido en dichos metales que las vesículas de tallos, manteniéndose así la asimetría encontrada a nivel de la planta. Asimismo, los niveles detectados de Cd fueron mayores que los de Ni. Por tanto, no parece existir una relación directa entre niveles endógenos de Ni y Cd y actividad ATPasa de plasmalema *in vivo*, puesto que la mayor activación de la enzima se observó en vesículas con el menor contenido en metales, es decir, en vesículas de tallos tratados con Ni

(Figura 15). Estos resultados apoyan las sugerencias apuntadas anteriormente en relación a un mecanismo de acción indirecto de los metales sobre la ATPasa cuando se aplican *in vivo*.

Dado que los lípidos están implicados en la regulación de las enzimas de membrana, se procedió a la realización de determinaciones de la actividad ATPasa junto con medidas de los lípidos de la MP en plantas control, tratadas y recuperadas a distintos tiempos. Además, se realizó un seguimiento del estado de las plantas a lo largo de los experimentos que permitió relacionar los cambios de crecimiento y estado de la planta con la actividad ATPasa.

El tratamiento de plantas de arroz con Ni o Cd 0.5 mM afectó drásticamente al crecimiento del tallo y a la relación PS/PF (Figura 16). No obstante, estas plantas mostraron una gran capacidad de recuperación, particularmente del tratamiento con Ni, puesto que ambos parámetros alcanzaron los valores de las plantas control tras crecer durante 10 días en un medio sin metal pesado.

Los cambios de crecimiento producidos por los metales pesados fueron asociados con aumentos de la actividad ATPasa, especialmente la actividad específica (Figura 17 A). Al igual que el crecimiento, las plantas tratadas con Ni fueron las más afectadas, pero las que más rápidamente recuperaron los valores control. La actividad ATPasa total no fue alterada tan drásticamente como la específica (Figura 17 A y B). Esta diferencia puede ser explicada más por una disminución en las cantidades totales de material de membrana aislado a partir de plantas tratadas que por una disminución específica del contenido en ATPasa, puesto que se encontró la misma relación entre el contenido proteico y lipídico en todos los casos (Tabla 7). Así, el efecto estimulante de los metales sobre la ATPasa fue solapado, en parte, por la menor cantidad de material aislado y solamente en Ni 5DT, donde no se redujo el contenido total de membranas, se mantuvo la activación de la enzima.

El estrés inducido por Cd y Ni también modificó la composición lipídica de la MP. Los esteroides más afectados fueron campesterol, sitosterol y  $\Delta^5$ -avenosterol (Tabla 8). El estigmasterol también se vio modificado en algunos casos. No pudieron observarse modificaciones del porcentaje de colesterol en las plantas tratadas con respecto a los controles. Esta diferente acción de los metales sobre los esteroides podría deberse a un efecto selectivo sobre su biosíntesis, ya que el colesterol, parece encontrarse en la ruta biosintética muy alejado del resto de los esteroides determinados.

Cambios en los lípidos de la MP similares a los descritos fueron encontrados por Uemura y Yoshida (1984) durante el proceso de adaptación a bajas temperaturas de plántulas de centeno. Igualmente, la modificación de la composición lipídica de la MP podría estar relacionada con un mecanismo de resistencia a los metales pesados, bien modificando la permeabilidad de la membrana, bien alterando las actividades de las enzimas implicadas en el transporte de iones (Verkley y Schat, 1989).

Aunque por el momento se desconoce el papel que pueden desempeñar los esteroides en la regulación de las enzimas de membrana, algunos estudios recientes han indicado la influencia de estos lípidos en la actividad de la ATPasa de la MP (Grandmougin et al., 1989 a; Sandstrom y Cleland, 1989 a; Cooke y Burden, 1990). En este sentido, Douglas y Walker (1984) detectaron una relación inversa entre el cociente esteroides:fosfolípidos y la actividad  $K^+$ - $Mg^{2+}$ -ATPasa en fracciones de la MP de raíces de tres especies distintas del género *Citrus*. El cambio en dicho cociente se debió a un incremento del contenido en esteroides, por lo que concluyeron que la disminución en la actividad de la enzima era debida a la menor fluidez de la membrana (aunque no se determinó este parámetro).

En nuestros experimentos, también pudimos asociar una disminución del cociente esteroides:fosfolípidos con un aumento de la actividad ATPasa

(Tabla 12, Figura 17). Sin embargo, no fue posible encontrar una relación entre fluidez y actividad ATPasa (Tabla 10, Figura 17 ). Otros autores tampoco han podido encontrar esta relación. Así por ejemplo, East y col. (1984) observaron que era más importante la estructura de los fosfolípidos en la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa de retículo sarcoplasmico (ATPasa de tipo P) que la fluidez. Carruthers y Melchior (1986) relacionaron la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa de retículo sarcoplásmico con la longitud de las cadenas y el grado de insaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos, no observando correlación alguna entre actividad de la enzima y fluidez. Por tanto, la regulación de la ATPasa de la MP no parece deberse, al menos únicamente, a los cambios de fluidez de la membrana.

En 1982, Simmonds y col. mostraron que el colesterol podía estimular o inhibir la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa de retículo sarcoplásmico dependiendo de las especies de fosfolípidos presentes en el medio, por lo que postularon la "hipótesis Anular". Esta hipótesis explica la regulación de las enzimas de membrana mediante uniones directas lípido-proteína. Así, cambios en las proporciones de las especies moleculares presentes en las membranas podrían regular de forma directa la actividad de la ATPasa. En este sentido, Sandstrom y Cleland (1989 a) sugirieron que los esteroides podrían preservar la configuración de la enzima y modular las interacciones entre ésta y los fosfolípidos.

En nuestro trabajo, el cambio común a todos los tratamientos realizados con metales pesados que provocaron activación de la ATPasa, fue la disminución en  $\Delta^5$ -avenosterol (Tabla 8). Además los tratamientos con Ni siempre fueron acompañados por un aumento de sitosterol y una disminución de campesterol. La misma tendencia se observó en Cd 10DT. En los experimentos de recuperación se observó una reversión de la mayoría de estos cambios junto con un aumento del porcentaje de estigmasterol. Por otra parte,

en los tratamientos con MCPA y Ketotriazol también se produjo una reducción del porcentaje de  $\Delta^5$ -avenosterol (Tabla 13), aunque solamente el MCPA activó la ATPasa (Figura 18). No obstante, el Ketotriazol, inhibidor específico de la ruta biosintética de los esteroides, produjo la aparición de esteroides nuevos no presentes en los controles y además una reducción del sitosterol (Tabla 13).

De todos estos resultados podría inferirse la participación del campesterol, sitosterol, estigmasterol y  $\Delta^5$ -avenosterol en la regulación de la ATPasa de la MP en tallos de arroz. Sin embargo, dado que se produjeron otros cambios en la membrana que podrían estar igualmente implicados en esta regulación, resulta difícil atribuir a un determinado esteroide una función específica. Además, según la "hipótesis Anular", el efecto de los esteroides depende, en gran parte, del resto de especies moleculares presentes en la bicapa lipídica.

En la interacción ATPasa-fosfolípido podrían estar implicadas las cabezas polares de los fosfolípidos (Kasamo y Nouchi, 1987; Serrano et al., 1988) y la longitud y grado de insaturación de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos (Kasamo, 1990; Palmgren y Sommarin, 1989).

Aunque en nuestros experimentos no pudimos detectar diferencias en las cabezas polares de los fosfolípidos, sí pudo observarse una disminución global de la longitud de las cadenas y del grado de insaturación de sus ácidos grasos en Ni y Cd 10DT (Tabla 9). En este sentido, Kasamo (1990) observó que la activación por PC de la ATPasa parcialmente solubilizada de cultivos celulares de arroz disminuía con el aumento de la longitud de las cadenas y con el grado de insaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos. De forma similar, PC, que constituye el fosfolípido mayoritario de la MP de arroz, presentó una disminución del grado de insaturación de sus ácidos grasos en Cd y Ni 10DT (Tabla 10). Por tanto, la longitud de las cadenas y grado de

insaturación de los ácidos grasos también podrían estar implicados en la regulación de la ATPasa de MP de tallos de arroz. No obstante, como ya apuntamos anteriormente, es difícil atribuir a una especie molecular una función concreta, entre otras razones porque probablemente el efecto regulador de las enzimas de membrana sea el resultado de múltiples interacciones y no de acciones específicas. Según esto, las enzimas podrían ser funcionales dentro de unos rangos de lípidos determinados, reduciéndose así el costo que supondría un control estricto de todas las funciones de la membrana.

A diferencia de la actividad hidrolítica, el bombeo de protones en las vesículas de MP no fue modificado significativamente por el tratamiento con metales pesados (Tabla 6). Pudo observarse una tendencia a disminuir pero en ningún caso un aumento. Estos resultados pueden compararse, en parte, con los de otros autores, aunque no utilizaron vesículas en sus experimentos sino tejido radicular. Morgutti y col. (1984), utilizando segmentos de raíces de maíz, observaron que la presencia de Ni en el medio de incubación estimulaba en pocos minutos la tasa de extrusión de protones con la consiguiente acidificación del medio. Sin embargo, a los 180 minutos de incubación el Ni produjo el efecto opuesto. Kennedy y Gonsalves (1987) encontraron igualmente que en raíces de maíz expuestas a concentraciones de Cd mayores de 50  $\mu\text{M}$  se inhibió la extrusión de protones a los 75 minutos. En ninguno de estos dos experimentos se determinó la actividad hidrolítica de la ATPasa.

El efecto diferente de Cd y Ni sobre el bombeo de protones y sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa observado en nuestras preparaciones puede deberse a varias causas:

A) Distintos requerimientos lipídicos para la hidrólisis de ATP y para el transporte de  $\text{H}^+$ . En este sentido, Xie y col. (1986) comprobaron que PS activó la hidrólisis de ATP en vesículas cubiertas con clatrina pero no el transporte

de protones. Grandmougin y col. (1989 a) observaron que la adición de esteroides a extractos de ATPasa parcialmente solubilizada y reconstituida en liposomas inhibía menos la hidrólisis de ATP (10-20 %) que el bombeo de protones (40-70 %). En otros casos, el bombeo de protones se activó más que la hidrólisis de ATP. Así, Palmgren y Sommarin (1989) mostraron que lisoPC estimulaba el bombeo de protones en vesículas de avena un 80 % mientras que la hidrólisis de ATP sólo fue estimulada un 25 %.

Se ha demostrado que la estequiometría de la ATP sintasa depende de la composición de la membrana (Michelangeli et al., 1989). Por ejemplo, Van Walraven y col. (1990) observaron que la estequiometría  $H^+/ATP$  de la ATPasa de Cianobacterias y de cloroplasto de espinacas era distinta cuando se ensayaba en las membranas nativas respectivas, pero si ambas se reconstituían en membranas con la misma composición lipídica, la estequiometría era idéntica. Este mecanismo podría ser utilizado por las enzimas para aumentar o disminuir la relación  $H^+/ATP$  en respuesta al medio (Palmgren, 1990). Así, el ambiente lipídico de la ATPasa podría causar cambios estructurales en la enzima que modificasen su estequiometría.

B) Es posible que tanto la hidrólisis de ATP como el transporte de protones se activase en las plantas tratadas con metales, pero que además el flujo pasivo de  $H^+$  hacia el interior celular se viese aumentado con la consiguiente reducción del gradiente creado. Brauer y col. (1988) encontraron que la incubación de vesículas de membrana de maíz a una temperatura entre 0 y 4° C durante 24 horas, reducía su capacidad formadora de gradiente de  $H^+$ . La disminución del gradiente de protones coincidió con pérdidas en el contenido lipídico de la membrana, que fueron asociadas a un aumento de su permeabilidad a los iones. Sin embargo, no se encontró una modificación de la actividad hidrolítica de la ATPasa. De forma similar, De Filippis (1978) observó que la exposición de cultivos celulares de *Chlorella* durante una hora

a Cd o Ni 0.1 mM modificó la permeabilidad de sus membranas al potasio. Por el contrario, otros autores no encontraron daños en la membranas ni, por tanto, modificaciones de su permeabilidad tras el tratamiento con Cadmio (Strickland, 1979).

También se ha demostrado que las plantas pueden reaccionar ante las modificaciones de la permeabilidad de las membranas causadas por los agentes tóxicos. Por ejemplo, Zwiazek y Shay (1988) estudiaron el efecto de la aplicación de fluoruro de sodio sobre la composición lipídica y la permeabilidad de la membrana de *Pinus banksiana* durante dos semanas, observando cambios en la permeabilidad durante la primera semana de tratamiento. Tales cambios se asociaron con modificaciones de la composición lipídica. Sin embargo, estas modificaciones desaparecieron a las

dos semanas de exposición al tóxico, no pudiéndose determinar diferencias ni en la permeabilidad ni en la composición lipídica de las membranas.

Así pues, parece evidente que los metales son capaces de modificar la permeabilidad de la membrana y por tanto disipar el gradiente de H<sup>+</sup>. Pero quedaría por explicar la estimulación de la actividad hidrolítica de la enzima. Aunque en principio se relacionó la disipación del gradiente de H<sup>+</sup> con una consiguiente activación de la ATPasa (Churchill et al., 1983), estudios más recientes no observan tal efecto (Gibrat et al., 1989). Por otra parte, si los metales actuaran sólo a nivel de la permeabilidad de la membrana, y puesto que el gradiente de H<sup>+</sup> fue igualmente afectado e incluso más por Cd que por Ni (Tabla 6), la activación de la hidrólisis de ATP por Cd debería ser similar o mayor que la producida por Ni. Sin embargo, se observó lo contrario (Figura 17). Además, nuestros ensayos de actividad hidrolítica se realizaron en presencia de Triton X-100, el cual permeabiliza las membranas impidiendo la formación del gradiente de protones. Por tanto, no parece que la disipación

del gradiente pueda explicar, al menos por sí solo, la activación de la hidrólisis de ATP por Cd y Ni.

C) Disipación del gradiente de H<sup>+</sup> en procesos de transporte. El gradiente de H<sup>+</sup> formado en plantas tratadas con metales pesados podría estar siendo utilizado más activamente en procesos de transporte. A este respecto, la resistencia al Cd en bacterias se ha relacionado con el mantenimiento de niveles intracelulares bajos del tóxico, mediante el bombeo activo del ion al exterior celular (Silver et al., 1989). El mecanismo responsable del flujo de Cd fue descrito como una ATPasa electroneutra con una estequiometría Cd<sup>2+</sup>/2H<sup>+</sup>.

En resumen, podemos decir que es probable que el tratamiento con metales pesados modifique las relaciones entre hidrólisis de ATP y bombeo de protones, bien a través de un desacoplamiento de ambos procesos o bien por la utilización del gradiente en procesos de transporte como un mecanismo de adaptación al estrés.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo se desprenden las conclusiones siguientes:

1.- Con el método de aislamiento de vesículas de membrana plasmática por separación en un sistema acuoso de dos fases poliméricas, se han conseguido fracciones de plasmalema con un alto grado de pureza, como lo demuestra el incremento (cinco veces) de la actividad ATPasa sensible al vanadato, la tinción selectiva con silicotunstato sódico y la ausencia de contaminación por marcadores de otras membranas.

2.- El estudio de las características de la H<sup>+</sup>-ATPasa en vesículas de plasmalema de arroz demuestra que su actividad depende, en gran medida, de la composición del medio de ensayo y por tanto, pone de manifiesto la necesidad de utilizar condiciones idénticas en estudios comparativos. Así, la variación del pH y de la concentración de cloruro potásico en el medio de reacción produce modificaciones importantes de los parámetros cinéticos de la enzima. Del mismo modo, el magnesio muestra un efecto complejo sobre la ATPasa. El efecto de estos iones puede deberse a una interacción directa ión-ATPasa o bien a un mecanismo indirecto vía lípidos que la rodean. Las interacciones electrostáticas a nivel de membrana pueden influir sobre los lípidos polares y estos a su vez modificar la actividad de la ATPasa, constituyendo un posible mecanismo de regulación de esta importante enzima vegetal.

3.- El análisis lipídico de las vesículas de plasmalema de tallos de arroz muestra una composición similar a la descrita en otras especies vegetales, siendo el estigmasterol, sitosterol y campesterol los esteroides más abundantes y detectándose cantidades menores de colesterol y  $\Delta^5$ -avenosterol. La fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina constituyen la mayor fracción de los fosfolípidos, aunque fosfatidiserina y fosfatidilinositol también están presentes.

4.- Las plantas de arroz son drásticamente afectadas por el tratamiento con cadmio o níquel como lo demuestra la inhibición de su crecimiento y el incremento de la relación Peso seco:Peso fresco. No obstante, con la eliminación de los metales del medio de cultivo se consigue la reversión de sus efectos tóxicos, especialmente en las plantas tratadas con níquel que recuperan de nuevo la tasa de crecimiento de los controles.

5.- La medida de los niveles endógenos de cadmio y níquel en plantas de arroz tratadas con estos metales confirma que ambos se acumulan preferentemente en raíces. Esta asimetría también se mantiene a nivel de vesículas. Los niveles de cadmio detectados son muy elevados, corroborando así la descripción del arroz como planta con gran avidez por este elemento.

6.- Los tratamientos *in vivo* con cadmio o níquel demuestran que su efecto sobre la H<sup>+</sup>-ATPasa depende del órgano de procedencia de la enzima. En raíces no se observa un efecto claro. Sin embargo, en tallos puede determinarse una activación de la enzima dependiente de la concentración del metal. Dado el distinto efecto de los metales observado en los experimentos *in vitro*, donde siempre inhiben a la ATPasa, y dada la falta de correlación existente entre

contenido endógeno de cadmio o níquel en vesículas y activación de la enzima, se postula un mecanismo indirecto para el efecto de estos metales *in vivo*.

7.- La activación de la ATPasa de la membrana plasmática de tallos de arroz tras el tratamiento con cadmio 0.5 mM, níquel 0.5 mM o con MCPA 1.5  $\mu$ M está asociada con modificaciones de la composición lipídica de la membrana. Estas modificaciones incluyen alteraciones en las proporciones de esteroides y en la longitud y grado de insaturación de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos. La mayoría de estos cambios se invierten en los experimentos de recuperación, en los cuales también se consiguen niveles de actividad enzimática comparables a los controles. Se sugiere que los cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática pueden ser los responsables de la modificación de su actividad.

8.- Finalmente, la actividad hidrolítica y el bombeo de protones no son afectados de la misma forma por los tratamientos con los metales pesados. Estos resultados podrían explicarse asumiendo que el gradiente de protones se disipa más rápidamente en plantas tratadas o que los metales producen un desacoplamiento entre ambos procesos.

## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- Ahrens, M. L. (1981). Electrostatic control by lipids upon the membrane-bound  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ . *Biochim. Biophys. Acta*, 642: 252-266.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1986). La membrana plasmática. En: *Biología molecular de la célula*. Pp. 269-302. Omega. Barcelona.
- Ames, B. N. (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.*, 8: 115-118.
- Baker, A. J. M., Walker, P. L. (1989 a). Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 1: 7-17.
- Baker, J. M., Walker, P. L. (1989 b). Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. En: *Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects*. (A. J., Shawn, ed), pp. 155-178. CRC press Inc. Boca Raton, Florida.
- Barceló, J., Poschenrieder, CH. (1989). Estrés vegetal inducido por metales pesados. *Investigación y Ciencia*, 154: 54-63.
- Barceló, J., Cabot, C., Poschenrieder, CH. (1986). Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender). II. Effect of Cd on endogenous abscisic acid levels. *J. Plant. Physiol.*, 125: 27-34.
- Becerril, J. M., Muñoz-Rueda, A., Aparicio-Tejo, P., González-Murua, C. (1988). The effect of cadmium and lead on photosynthetic electron transport in clover and lucerne. *Plant Physiol. Biochem.*, 26: 357-363.

- Becerril, J. M., González-Murua C., Muñoz-Rueda, A., De Felipe M. R. (1989). Changes induced by cadmium and lead in gas exchange and water relations of clover and lucerne. *Plant. Physiol. Biochem.*, 27: 913-918.
- Bennett, A. B., O'Neill, S. D., Eilmann, M., Spanswick, R. M. (1985). H<sup>+</sup>-ATPase activity from storage tissue of *Beta vulgaris*. III. Modulation of ATPase activity by reaction substrates and products. *Plant. Physiol.*, 78: 495-499.
- Bérczi, A., Larsson, C., Widell, S., Møller, I. M. (1989). On the presence of inside-out plasma membrane vesicles and vanadate inhibited K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase in microsomal fractions from wheat and maize roots. *Physiol. Plant.*, 77: 12-19.
- Blum, W., Key, G., Weiler, E. W. (1988). ATPase activity in plasmalemma-rich vesicles isolated by aqueous two-phase partitioning from *Vicia faba* mesophyll and epidermis: characterization and influence of abscisic acid and fusicoccin. *Physiol. Plant.*, 72: 279-287.
- Bollard, E. G. (1983). Involvement of unusual elements in plant growth and nutrition. En : *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series (A. Läuchli, R. L. Bielecki, eds)*, Vol. 15 B, pp. 695-744. Springer-Verlag, Berlin.
- Bottacin, S., Saccomani, M., Ferrari, G. (1990). Sterol content and efficiency of ion uptake by roots of maize genotypes. *Plant Soil.*, 123: 181-183.
- Bradford, M. H. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Brauer, D., Tu, S-I. (1989) Phospholipid requirements of the vanadate-sensitive ATPase from maize roots evaluated by two methods. *Plant Physiol.*, 89: 867-874.
- Brauer, D., Hsu, A-F, Tu, S. I. (1988). Factors associated with the instability of nitrate-insensitive proton transport by maize root microsomes. *Plant. Physiol.*, 87: 598-602.

- Brewin, N. J. (1990). The role of the plant plasma membrane in symbiosis. En: The plant plasma membrane. Structure, function and molecular biology. (C. Larsson, I. M., Møller, eds), pp. 351-375. Springer-Verlag, Berlin.
- Briars, S. A., Kessler, F., Evans, D. E. (1989). The calmodulin stimulated ATPase of maize coleoptiles is a 140.000 Mr polypeptide. *Planta*, 176: 283-285.
- Briskin, D. P. (1986). Intermediate reaction states of the red beet plasma membrane ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 248: 106-115.
- Briskin, D. P. (1988 a). Chemical equivalence of phosphoenzyme reaction states in the catalytic mechanism of the red beet (*Beta vulgaris* L.) plasma membrane ATPase. *Plant Physiol.*, 88: 77-83.
- Briskin, D. P. (1988 b). Phosphorylation and dephosphorylation reactions of the red beet plasma membrane ATPase studied in the transient state. *Plant Physiol.*, 88: 84-91.
- Briskin, D. P. (1990). The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of higher plant cells: biochemistry and transport function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1019: 95-109.
- Briskin, D. P., Leonard, R. T. (1982). Partial characterization of a phosphorylated intermediate associated with the plasma membrane ATPase of corn roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6922-6926.
- Brown, D. J., Dupont, F. M. (1989). Lipid composition of plasma membranes and endomembranes prepared from roots of barley (*Hordeum vulgare* L.). Effect of salt. *Plant Physiol.*, 90: 955-961.
- Burden, R. S., Cooke, D. T., White, P. J., James, C. S., (1987). Effects of the growth retardant tetcyclacis on the sterol composition of oat (*Avena sativa*). *Plant Growth Regulation*, 5: 207-217.
- Carruthers, A., Melchior, D.L. (1986) How bilayer lipids affect membrane protein activity. *TIBS*, 11: 331-335.

- Cocucci, M. C., Marré, E. (1984). Lysophosphatidylcholine-activated, vanadate inhibited,  $Mg^{2+}$ -ATPase from radish microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 771: 42-52.
- Cocucci, S. M., Morgutti, S. (1986). Stimulation of proton extrusion by  $K^+$  and divalent cations ( $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) in maize root segments. *Physiol. Plant.*, 68: 497-501.
- Collinge, M., Trewavas, A. J. (1989). The location of calmodulin in the pea plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 264: 8865-8872.
- Cooke, D.T., Burden, R.S. (1990). Lipid modulation of plasma membrane-bound ATPases. *Physiol. Plant.*, 78: 153-159.
- Cooke, D. T., Burden, R. S., Clarkson, D. T., James, C. S. (1989). Xenobiotic-induced changes in membrane lipid composition: Effect on plasma-membrane ATPases. En: Mechanism and regulation of transport processes. (R. K. Atkin, D. R. Clifford, eds.). British Plant Growth Regulator Group. Monográfico 18, pp. 41-53.
- Cooke, D. T., Burden, R. S., Clarkson, D. T., James, C. S. (1990 a). The influence of sterols on the specific activity of the plasma membrane ( $Mg^{2+}$ ) and ( $Mg^{2+}$ - $K^+$ ) ATPases of oat and rye shoots. *Physiol. Plant.*, 79: A 89.
- Cooke, D.T., Munkonge, F.M., Burden, R.S., James, C.S. (1990 b) Fluidity and lipid composition of oat and rye shoot plasma membrane: Effect of sterol perturbation by xenobiotics. *Biochim. Biophys. Acta*, 106: 156-162.
- Chanson, A., Mc Naughton, E., Taiz, L. (1984). Evidence for a KCl-stimulated,  $Mg^{2+}$ -ATPase on the Golgi of corn coleoptiles. *Plant Physiol.*, 76: 498-507.
- Churchill, K. A., Holloway, B., Sze, H. (1983). Separation of two types of electrogenic  $H^+$  pumping ATPases from oat roots. *Plant. Physiol.*, 73: 921-928.
- Dabin, P., Marafante, E. Mousny, J. M., Myttenaere, C. (1978). Absorption, distribution and binding of cadmium and zinc in irrigated rice plants. *Plant Soil*, 50: 329-341.

- de Boer, A. H., Watson, B. A., Cleland, R. E. (1989). Purification and identification of the fusicoccin binding protein from oat root plasma membrane. *Plant Physiol.*, 89: 250-259.
- De Filippis, L. F. (1979). The effect of heavy metal compounds on the permeability of *Chlorella* cells. *Z. Pflanzenphysiol.*, 92: 39-49.
- De Michelis, M. I., Spanswick, R. M. (1986). H<sup>+</sup> pumping driven by the vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol.*, 81: 542-547.
- De Michelis, M. I., Olivari, C., Pugliarello, M. C., Rasi-Caldogno, F. (1988). Effect of Mg<sup>2+</sup>, Triton X-100 and temperature on basal and FC-stimulated plasma membrane ATPase activity. *Plant Sci.*, 54: 117-124.
- Delmer, D. P. (1990). Role of plasma membrane in cellulose synthesis. En: *The plant plasma membrane: Structure, function and molecular biology.* (C. Larsson, I. M. Møller, eds.). Pp. 256-268. Springer-Verlag, Berlin.
- Douglas, T. J., Walker, R. R. (1984). Phospholipids, free sterols and adenosine triphosphatase of plasma-membrane enriched preparations from roots of *citrus* genotypes differing in chloride exclusion ability. *Physiol. Plant.*, 62: 51-58.
- East, J. M., Jones, O. T., Simmonds, A. C., Lee, A. G. (1984). Membrane fluidity is not an important physiological regulator of the (Ca<sup>2+</sup> -Mg<sup>2+</sup>) dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 259: 8070-8071.
- Edidin, M., (1981). Molecular motions and membrane organization and function. En: *membrane structure* (J. B., Finean, R. M., Mitchell, eds). Pp. 37-82. Elsevier, Amsterdam.
- Edman, K., Ericson, I., Møller, I. M. (1985). The regulation of exogenous NAD(P)H oxidation in spinach (*Spinacia oleracea*) leaf mitochondria by pH and cations. *Biochem. J.*, 232: 471-477.
- Foy, C. D., Chaney, R. L., White, M. C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 29: 511-566.

- Gallet, O., Lemoine, R., Larsson, C., Delrot, S. (1989). The sucrose carrier of the plant plasma membrane. I. Differential affinity labeling. *Biochim. Biophys. Acta*, 978: 56-64.
- Genis, R. B. (1989). Composition of membranes. En: *Biomembranes*. (C. R. Cantor, ed). Pp. 20-33. Springer-Verlag, New York.
- Giannini, J. L., Briskin, D. P. (1987). Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. A comparative study of ion effects on  $\Delta\text{pH}$  and  $\Delta\psi$ . *Plant Physiol.*, 84: 613-618.
- Giannini, J. L., Briskin, D. P. (1989). The effect of assay composition, detergent solubilization and reconstitution on red beet (*Beta vulgaris* L.) plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase kinetic properties. *Plant Sci.*, 60: 189-193.
- Gibrat, R., Grignon, C. (1982). Effect of pH on the surface charge density of plant membranes. Comparison of microsomes and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 692: 462-468.
- Gibrat, R., Grouzis, J. P., Rigaud, J., Grignon C. (1985). Electrostatic characteristics of corn root plasmalemma: effect on the  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 816: 349-357.
- Gibrat, R., Grouzis, J. P., Rigaud, J., Galtier, N., Grignon, C. (1989). Electrostatic analysis of effects of ions on the inhibition of corn root plasma membrane  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase by the bivalent orthovanadate. *Biochim. Biophys. Acta*, 979: 46-52.
- Gilroy, S., Trewavas, A. (1990). Signal sensing and signal transduction across the plasma membrane. En: *The plant plasma membrane. Structure function and molecular biology*. (C. Larsson, I. M., Møller, eds). Pp. 203-232. Springer-Verlag, Berlin.
- Grandmougin, A., Benveniste, P., Hartmann, M. A. (1989 a). Effect of sterols on reconstituted plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase from maize roots. En: *Plant Membrane Transport: The current position*. (J. Dainty, M. I. de Michelis, E. Marré, F. Rasi-Caldogno, eds). Pp. 111-112. Elsevier, Amsterdam.

- Grandmougin, A., Bouvier-Nave, P., Ullmann, P., Benveniste, P., Hartmann, M. A. (1989 b). Cyclopropyl sterol and phospholipid composition of membrane fractions from maize roots treated with fenpropimorph. *Plant Physiol.*, 90: 591-597.
- Grimes, H. D., Breidenbach, R. W. (1987). Plant plasma membrane proteins. Immunological characterization of a major 75 kilodalton protein group. *Plant Physiol.*, 85: 1048-1054.
- Hara, T., Sonoda, Y. (1979). Comparison of the toxicity of heavy metals to cabbage growth. *Plant Soil*, 51: 127-133.
- Harada, H., Wakiuchi, N., Oji, Y., Shiga, H. (1990). Properties of the vanadate-sensitive ATPase of the plasma membrane vesicles from rice roots. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 36: 545-553.
- Hodges, T. K., Leonard, R. T., Bracker, C. E., Keenan, T.W. (1972). Purification of an ion-stimulated ATPase from plant roots: association with plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 3307-3311.
- Honma, Y., Hirata, H. (1984). Kinetics of cadmium and zinc absorption by rice seedling roots. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 30: 527-532.
- Horst, W. J., Wagner, A., Marscher, H. (1982). Mucilage protects meristems from aluminium injury. *Z. Pflanzenphysiol.*, 105: 435-444.
- Jaffe, L. F. (1981). The role of ionic currents in establishing developmental patterns. *Phil. Trans. R. Soc. London B*, 295: 553-66.
- Kasamo, K. (1990) Mechanism for the activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from rice (*Oryza sativa* L.) culture cells by molecular species of a phospholipid. *Plant Physiol.*, 93:1049-1052.
- Kasamo, K., Nouchi, I. (1987) The role of phospholipids in plasma membrane ATPase activity in *Vigna radiata* L. (Mung bean) roots and hypocotyls. *Plant Physiol.*, 83: 323-328.
- Kauss, H. (1990). Role of the plasma membrane in host-pathogen interactions. En: *The plant plasma membrane. Structure, function and molecular biology.* (C. Larsson, I. M., Møller, eds). Pp. 320-350 Springer-Verlag, Berlin.

- Kennedy, C. D., Gonsalves, F. A. N. (1987). The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and H<sup>+</sup> efflux of excised roots. *J. Exp. Bot.*, 38: 800-817.
- Kjellbom, P., Larsson, C. (1984). Preparation and polypeptide composition of chlorophyll-free plasma membranes from leaves of light-grown spinach and barley. *Physiol. Plant.*, 62: 501-509.
- Kjellbom, P., Larsson, C., Rochester, C. P., Anderson, B. (1989). Integral and peripheral proteins of the spinach leaf plasma membrane. *Plant Physiol. Biochem.*, 27: 1-6.
- Körner, L. E., Kjellbom, P., Larsson, C., Møller, I. M. (1985). Surface properties of right-side-out plasma membrane vesicles isolated from barley roots and leaves. *Plant Physiol.*, 79: 72-79.
- Lamoreaux, R. J., Chaney W. R. (1978). The effect of cadmium on net photosynthesis, transpiration and dark respiration of excised silver maple leaves. *Physiol. Plant.*, 43: 231-236.
- Larsson, C. (1985). Plasma membranes. En: *Modern methods of plant analysis. New Series* (H. F. Linskens, J. F. Jackson, eds). Vol. 1, pp. 85-104. Springer-Verlag, Berlin.
- Larsson, C., Kjellbom, P., Widell, S., Lundborg, T. (1984). Sidedness of plant plasma membrane vesicles purified by phase partitioning in aqueous two-phase system. *FEBS Lett.*, 171: 271-276.
- Larsson, C., Widell, S., Kjellbom, P. (1987). Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods Enzymol.*, 148: 558-568.
- Lee, K. G., Cunningham, B. A., Paulsen, G. M., Liang, G. H., Moore, R. B. (1976). Effect of cadmium on respiration rate and activity of several enzymes in soybean seedlings. *Physiol. Plant.*, 36: 4-6.
- Lindberg, S., Wingstrand, G. (1985). Mechanism for Cd<sup>2+</sup> inhibition of (K<sup>+</sup> + Mg<sup>2+</sup>) ATPase activity and K<sup>+</sup> (<sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>) uptake join roots of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant.*, 63: 181-186.

- Lord, J. M. (1973). Endoplasmic reticulum and ribosomes. En: Isolation of membranes and organelles from plant cells (A. L. Moore, J. L. Hall, eds). Pp. 119-134. Academic Press, London.
- Lüttge, U., Higinbotham, N. (1979). Transport in plants. Springer-Verlag, New York.
- Lundborg, T., Widell, S., Larsson, C. (1981). Distribution of ATPases in wheat root membranes separated by phase partition. *Physiol. Plant.*, 52: 89-95.
- Lynch, D. V., Steponkus, P. L. (1987). Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv. Puma). *Plant Physiol.*, 83: 761-767.
- Marschner, H. (1983). General introduction to the mineral nutrition of plants. En: Encyclopedia of plant physiology. New Series (A. Laüchli, R.L. Bielecki, eds), Vol. 15 A, pp. 5-60. Springer-Berlag, Berlin.
- Memon, A. R. (1987). Characterization of plasma membrane bound cation-stimulated ATPase isolated from the roots of *Cucumis sativus*. *Can. J. Bot.*, 66: 1470-1473.
- Memon, A. R., Chen, Q., Boss, W. F. (1989). Inositol phospholipids activate plasma membrane ATPase in plants. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 3: 1295-1301.
- Michelangeli, F., East, J. M., Lee, A. G. (1989). Structural effects on the interactions of sterols with the  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1025: 99-108.
- Møller, I. M., Lundborg, T. (1985). Electrostatic surface properties of plasmalemma vesicles from oat and wheat roots. Ion binding and screening investigated by 9-aminoacridine fluorescence. *Planta*, 164: 354-361.
- Møller, I. M., Lin, W. (1986). Membrane-bound NAD(P)H dehydrogenase in higher plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 37: 309-334.

- Møller, I. M., Lundborg, T., Bérczi, A. (1984). The negative surface charge density of plasmalemma vesicles from wheat and oat roots. *FEBS Lett.*, 167: 181-185.
- Morales Rubio, A., Salvador Carreño, A., De la Guardia Cirugeda, M. (1990). Flame atomic absorption spectrometric determination of iron, nickel, cobalt and molybdenum in petroleum industry catalysts after microwave oven digestion. *Anal. Chim. Acta*, 235: 405-411.
- Morgutti, S., Sacchi, A., Cocucci, S. (1984). Effects of Ni<sup>2+</sup> on proton extrusion, dark CO<sub>2</sub> fixation and malate synthesis in maize roots. *Physiol. Plant.*, 60: 70-74.
- Morré, D. J., Bracker, C. E. (1976). Ultrastructural alteration of plant plasma membranes induced by auxin and calcium ions. *Plant Physiol.*, 58: 544-547.
- Palmgren, M. G. (1990). Regulation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Modification of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity by lysophospholipids. Tesis Doctoral. University of Lund, Lund.
- Palmgren, M. G., Sommarin, M. (1989). Lysophosphatidylcholine stimulates ATP dependent proton accumulation in isolated oat root plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.*, 90: 1009-1014.
- Palmgren, M. G., Sommarin, M., Ulvskov, P., Jørgensen P.L. (1988). Modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from oat roots by lysophosphatidylcholine, free fatty acids and phospholipase A<sub>2</sub>. *Physiol. Plant.*, 74:11-19.
- Pardo, J. M., Serrano, R. (1989). Structure of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene from the plant *Arabidopsis thaliana* *J. Biol. Chem.*, 264: 8557-8562.
- Paton, G. M., Fasulo, J. M., Robins, S. J. (1982). Separation of phospholipids by high-performance liquid chromatography. *J. Lipid Research*, 23:190-196.
- Poschenrieder, CH., Gunsé, B., Barceló, J. (1989). Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol.*, 90: 1365-1371.

- Quail, P. H. (1979). Plant cell fractionation. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 30: 425-484.
- Raison, J. K. (1980). Membrane lipids: structure and function. En: *The biochemistry of plants*. (P. K. Stumpf, ed). Vol. 4. pp. 57-83. Academic Press, New York.
- Ralston, M. (1983). Derivative-free nonlinear regression. En: *BMDP statistical software* (W. J. Dixon, ed.) pp. 305-314. University of California Press: Berkeley.
- Rayle, D. L., Cleland, R. (1977). Control of plant cell enlargement by hydrogen ion. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 11: 187-214.
- Read, S. M., Northcote, D. M., (1981). Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Brilliant Blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.*, 116: 53-64.
- Robinson, C., Larsson, C., Buckhout, T. J. (1988). Identification of a calmodulin-stimulated ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) ATPase in a plasma membrane fraction isolated from maize (*Zea mays*) leaves. *Physiol. Plant.*, 72: 177-184.
- Rochester, C. P., Kjellbom, P., Larsson, C. (1987a). Lipid composition of plasma membranes from barley leaves and roots, spinach leaves and cauliflower inflorescences. *Physiol. Plant.*, 71: 257-263.
- Rochester, C. P., Kjellbom, P., Andersson, B., Larsson, C. (1987b). Lipid composition of plasma membranes isolated from light-grown barley (*Hordeum vulgare*) leaves: identification of cerebroside as a major component. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2: 385-391.
- Roland, J. C. (1978). General preparation and staining of thin sections. En: *electron microscopy and cytochemistry of plant cells* (J. L. Hall, ed.). Pp. 1-62. Elsevier, North Holland. Inc. New York.
- Ros, R. (1988). Aislamiento y purificación de vesículas de plasmalema de raíces de arroz (*Oryza sativa* L. subespecie *comunis*). Tesis de Licenciatura. Universitat de València. València.

- Sandstrom, R. P., Cleland, R. E. (1989 a). Selective delipidation of the plasma membrane by surfactants. Enrichment of sterols and activation of ATPase. *Plant Physiol.*, 90: 1524-1531.
- Sandstrom, R. P., Cleland, R. E., (1989 b). Comparison of the lipid composition of oat root and coleoptile plasma membranes. Lack of short-term change in response to auxin. *Plant Physiol.* 90, 1207-1213.
- Sandstrom, R. P., de Boer, A. H., Lomax, T. L., Cleland, R. E. (1987). Latency of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in vesicles isolated by aqueous phase partitioning. Increase substrate accessibility or enzyme activation. *Plant Physiol.*, 85: 693-698.
- Serrano, R. (1983). Purification and reconstitution of the proton-pumping ATPase of fungal and plant plasma membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 227: 1-8.
- Serrano, R. (1984 a). Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 23: 87-126.
- Serrano, R. (1984 b). Purification of the proton pumping ATPase from plant plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 121: 735-740.
- Serrano, R. (1989). Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40: 61-94.
- Serrano, R. (1990). Plasma membrane ATPase. En: *The plant plasma membrane. Structure, function and molecular biology.* (C. Larsson and I. M. Møller, eds). Pp. 127-153. Springer-Verlag, Berlin.
- Serrano, R., Montesinos, C., Sánchez, J. (1988). Lipid requirements of the plasma membrane ATPase from oat roots and yeast. *Plant Sci.*, 56: 117-122.
- Silver, S., Nucifora, G., Chu, L., Misra, T. K. (1989). Bacterial resistance ATPases: primary pumps for exporting toxic cations and anions. *TIBS*, 14: 76-80.
- Simkiss, K., Tallor, M. G. (1989). Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms. *CRC Critical Rev. Aquat. Sci.*, 1: 173-188.

- Simmonds, A. C., East, J. M., Jones, O. T., Rooney, E. K., McWhirter, J., Lee, A. G. (1982). Annular and non-annular binding sites on the (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 693: 398-406.
- Sommarin, M., Lundborg, T., Kylin, A. (1985). Comparison of K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, ATPases in purified plasmalemma from wheat and oat. Substrate specificities and effects of pH, temperature and inhibitors. *Physiol. Plant.*, 65: 27-32.
- Staal, M., Hommels, C., Kuiper, D. (1987). Characterization of the plasmalemma ATPase activity from roots of *Plantago major* ssp. *pleiosperma* purified by the two-phase partitioning method. *Physiol. Plant.*, 70: 461-466.
- Steponkus, P. L., Lynch, D. V., Uemumura, M. (1990). The influence of cold acclimation on the lipid composition and cryobehaviour of the plasma membrane of isolated rye protoplasts. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 326: 571-583.
- Strickland, R. C., Chaney, W. R., Lamoreaux, R. J. (1979). Cadmium uptake by *Pinus resinosa* Ait. pollen and the effect on cation release and membrane permeability. *Plant. Physiol.*, 64: 366-370.
- Sundaralingam, M., Jensen, L. M. (1965). Crystal and molecular structure of a phospholipid component: L- $\alpha$ -glycerophosphorylcholine cadmium chloride trihydrate. *Science*, 150: 1035-1036.
- Sze, H. (1984). H<sup>+</sup> translocating ATPases of the plasma membrane and tonoplast of plant cells. *Physiol. Plant.*, 61: 683-691.
- Sze, H. (1985). H<sup>+</sup> translocating ATPase: advances using membrane vesicles. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 36: 175-208.
- Tomsett, A. B., Thurman, D. A. (1988). Molecular biology of metal tolerances of plants. *Plant Cell Environ.*, 11: 383-394.
- Uemura, M., Yoshida, S. (1984). Involvement of plasma membrane alterations in cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv. Puma). *Plant Physiol.*, 75: 818-826.

- Uemura, M., Yoshida, S. (1985). Comparisons of plasma membranes from shoots and roots of winter rye (*Secale cereale* L. cv. Puma): Polypeptide composition, ATPase activity and specific naphthylphthalamic acid binding capacity. *Plant Cell Physiol.*, 26: 35-46.
- Uemura, M., Yoshida, S. (1986). Studies on freezing injury in plant cells. III Protein and lipid changes in the plasma membranes of Jerusalem artichoke tubers during a lethal freezing *in vivo*. *Plant Physiol.*, 80: 187-195.
- Van Assche, F., Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell Environ.*, 13: 195-206.
- van Walraven, H. S., Scholts, M. J. C., Koppenaar, F., Bakels, R. H. A., Krab, K. (1990). Dependence of the proton translocation stoichiometry of cyanobacterial and chloroplast H<sup>+</sup>-ATP synthase on the membrane composition. *Biochim. Biophys. Acta*, 1015: 425-434.
- Verkleij, J. A. C., Schat, H. (1989). Mechanism of metal tolerance in higher plants. En: *Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects*. (A. J. Shawn, ed). Pp. 179-194. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Weigel, H. J. (1985). The effect of Cd<sup>2+</sup> on photosynthetic reactions of mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant.*, 63: 192-200.
- White, P. J., Cooke, D. T., Earnshaw, M. J., Clarkson, D. T., Burden, R. S. (1990). Does plant growth temperature modulate the membrane composition and ATPase activities of tonoplast and plasma membrane fractions from rye roots?. *Phytochemistry.*, 29: 3385-3393.
- Widell, S., Larsson, C. (1990). A critical evaluation of markers used in plasma membranes purification. En: *The plant plasma membrane. Structure function and molecular biology*. (C. Larsson and I. M. Møller eds). Pp. 127-153. Springer-Verlag, Berlin.
- Woolhouse, H. V. (1983). Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. En: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, (O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, H. Ziegler, eds). Vol. 12, pp. 245-300. Springer-Verlag, Berlin.

- Xie, X-S., Tsai, S-J., Stones, D. K. (1986) Lipid requirements for reconstitution of the proton-translocating complex of clathrin-coated vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 8913-8917.
- Yoshida, S., Uemura, M. (1984). Protein and lipid composition of isolated plasma membranes from orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) and changes during cold acclimation. Plant Physiol., 75: 31-37.
- Yoshida, S., Uemura, M. (1986). Lipid composition of plasma membranes and tonoplasts isolated from etiolated seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). Plant. Physiol., 82: 807-812.
- Yoshida, S., Uemura, M., Niki, T., Sakai, A., Gusa, L. V. (1983). Partition of membrane particles in aqueous two-polymer phase system and its practical use for purification of plasma membranes from plants. Plant Physiol., 72: 105-114.
- Zeiger, E. (1983). The biology of stomatal guard cells. Annu. Rev. Plant Physiol., 34: 441-475.
- Zwiazek, J. J., Shay, J. M. (1988). The effects of sodium fluoride on cytoplasmic leakage and the lipid and fatty composition of jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings. Can. J. Bot., 66: 535-541.

## **APENDICE I**

En las tablas siguientes se muestran los porcentajes de los distintos ácidos grasos presentes en las fracciones PE, PC, PS y PI de la MP de tallos de arroz procedentes de plantas control, tratadas con Cd o Ni 0.5 mM y de plantas recuperadas.

TRATAMIENTO DURANTE 5 DIAS

	CONTROL				CADMIO				NIQUEL			
	PE	PC	PS	PI	PE	PC	PS	PI	PE	PC	PS	PI
16:0	33.3	34	44	46	33	35	55	50	36	31	61	48
16:1	8.1	14	21	16	7.8	12	16	18	8.3	9.2	11	19
18:0	9.9	9.5	27	20	10	10.1	23.7	22.6	8.8	9	25	20.1
18:1	6.4	9.5	4	5	7	9.5	-	4	9	15.1	-	7.3
18:2	33.2	26	5	7.5	33.7	25	4	4	29	28	4	6
18:3	9.2	7.7	-	5	8.5	8.9	1	2	8	7.7	-	-
Total	170	254	45	68	177	250	65	61	202	263	51	65

( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )

TRATAMIENTO DURANTE 10 DIAS

	CONTROL				CADMIO				NIQUEL			
	PE	PC	PS	PI	PE	PC	PS	PI	PE	PC	PS	PI
16:0	32	34	34	41	35.9	35.5	35.6	42.4	34	34.9	35.3	40.9
16:1	2.6	2	5	18	5	3	10	16	5	3	11	16
18:0	4.1	4.8	10	17	6.5	7.2	13	22	6.4	6.9	13	21
18:1	3.5	6.9	5.5	5	2	6.2	5.1	6.5	7.8	11	10	7
18:2	42	37.5	30	15	38	33.1	26	11	37	32	23	12
18:3	14.8	15.5	15.7	4.1	12.5	14.6	10.1	2.4	10.3	12	8	3
Total	197	244	127	61	198	259	148	75	177	214	145	72

( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )

### RECUPERACION DURANTE 5 DIAS

	CONTROL				CADMIO				NIQUEL			
	PE	PC	PS	PI	PE	PC	PS	PI	PE	PC	PS	PI
16:0	36	32.7	40	44.3	36.1	32.8	45	45	34.3	32.4	42	44.9
16:1	4	4.5	15	12	16	9.3	10.9	19.4	7.5	9	25	19
18:0	6.4	10	21.5	16.4	8.5	8.8	30	18	6.5	7.2	24	19
18:1	4.3	8.1	5	7	6	7.1	5	5	5.6	7.6	-	4
18:2	34.6	29	12.6	13.8	25	29.3	9	9.9	35.6	32	7	8
18:3	14.6	15.4	6.2	6.2	9	12.6	-	3	10.4	11.3	1	5
Total	115	147	22	34	116	159	25	50	117	181	27	39

( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )

### RECUPERACION DURANTE 10 DIAS

	CONTROL				CADMIO				NIQUEL			
	PE	PC	PS	PI	PE	PC	PS	PI	PE	PC	PS	PI
16:0	35.3	32.1	48	46.0	36.3	31.6	49	51	33.8	33	62	55
16:1	3.4	4.4	6	9.2	4.3	5.4	9	9	3.7	5.9	3	7
18:0	4.5	5.4	21.3	14.4	5.6	6.9	25	13	4.7	7.5	20.0	16.8
18:1	3.9	6.5	-	5.8	3.5	6.7	-	2.5	3.8	7.5	-	2
18:2	36.0	32.9	20	16.0	37.0	35.2	13.6	17.2	40.9	35.3	9	10
18:3	16.9	18.7	4	8.6	13.4	14.3	3.6	6.7	13.1	11.3	6	9
Total	161	217	20	39	139	199	23	50	139	174	35	44

( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,  
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. Roc Ros Palau

la calificación de Apto Cum laude

Valencia, a 7 de Octubre de 1991

El Secretario,

El Presidente

