

ATPasa de la membrana plasmática de las plantas

The plasma membrane ATPase of plants

MOYA, J. M. y AGÜÍ, I.

Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Granada. 18071 Granada. España.

RESUMEN

La ATPasa de la membrana plasmática juega un papel central en la fisiología de las plantas. El gradiente de H^+ generado por este enzima controla dos procesos básicos: el pH intra y extracelular y la absorción activa de nutrientes a través del plasmalema, los cuales a su vez son responsables del crecimiento celular. En este artículo se discuten igualmente otros aspectos fisiológicos y bioquímicos relacionados con la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática, tales como cinética e inhibidores específicos de la actividad enzimática, estructura y mecanismo de acción de las (E-P) ATPasas, regulación de la actividad bombeadora de H^+ y relaciones evolutivas con otras ATPasas presentes en las diferentes membranas biológicas.

Palabras claves: ATPasa. Membrana plasmática.

ABSTRACT

The plasma membrane (PM) H^+ -ATPase plays a central role in plant physiology. The H^+ gradient generated by this enzyme controls two basic processes: intracellular and extracellular pH and active transport of nutrients across the plasmalemma, which in turn are responsible for cell growth. In this review, other physiological and biochemical aspects related with the PM H^+ -ATPase are discussed, such as the kinetic analysis and specific inhibitors of the ATPase activity, structure and mechanism of (E-P)ATPases, regulation of the H^+ pump and evolutionary relationships with other ATPases present in different biological membranes.

Key words: ATPase. Plasma membrane.

Recibido: 4-7-95.

Aceptado: 28-11-95.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:1; 5-15]

INTRODUCCIÓN

La Teoría Quimiosmótica desarrollada por Mitchell (22) para explicar la transducción energética en mitocondrias y cloroplastos, alertó a los bioquímicos de la importancia del gradiente de H^+ en la transferencia energética efectuada a nivel de otras membranas biológicas. Casi una década después de que Mitchell emitiera esta afirmación, las reacciones químicas correspondientes a las oxidaciones biológicas seguían siendo consideradas conceptualmente diferentes de los procesos fisiológicos relacionados con el transporte de iones y control del pH. Así, mientras un grupo de científicos postulaba la existencia de reacciones de óxido-reducción y reacciones de deshidratación que conducen a la formación de ATP, otros investigadores proponían la existencia de flujos iónicos, dependientes de la capacidad de adsorción de iones por los componentes citoplasmáticos y de los mecanismos de transporte activo. De hecho, la única conexión que se estableció entre ambas hipótesis fue considerar el ATP como la moneda metabólica transferible desde las reacciones bioenergéticas a las de transporte iónico. Sin embargo, a raíz de la hipótesis de Mitchell, se determinó que la finalidad esencial de los sistemas bioenergéticos es almacenar energía, creando una diferencia de potencial electroquímico de H^+ , que puede ser utilizada en la síntesis de ATP y/o en el transporte iónico.

Los estudios efectuados en relación con la existencia y caracterización de los sistemas de bombeo de H^+ en las membranas vegetales (43), han determinado que, en general, las bombas de H^+ sean consideradas sinónimos de H^+ -ATPasas. Sin embargo, se han encontrado otras bombas de H^+ que no se corresponden con ATPasas y que también podrían generar la fuerza motriz protónica necesaria para el transporte de nutrientes, como son las H^+ -pirofosfatasa (H^+ -PPasas) y los sistemas redox. Por consiguiente, los sistemas primarios de transporte electrogénico de H^+ de las membranas de células vegetales serían los siguientes:

H^+ -ATPasas: bombas de H^+ dependientes de la hidrólisis de ATP. Están localizadas en plasmalema y tonoplasto, así como en membranas de mitocondrias y cloroplastos.

Sistemas redox: bombas de H^+ dependientes de NAD(P)H asociadas a procesos de óxido-reducción. Se localizan en el plasmalema, membranas de mitocondrias y cloroplastos.

H^+ -PPasas: bombas de H^+ dependientes de la hidrólisis de pirofosfatos. Están localizadas en el tonoplasto, membranas de mitocondrias y cloroplastos.

A continuación pasamos a estudiar la H^+ -ATPasa del plasmalema, principal responsable de la extrusión de H^+ al medio externo, hasta el punto de considerarse que cualquier otra alternativa, como el sistema redox, no resulta significativa desde un punto de vista fisiológico (43, 44, 49).

DESCUBRIMIENTO Y RELACIONES EVOLUTIVAS

La existencia de bombas de H^+ , dependientes de ATP, en la membrana plasmática se puso de manifiesto gracias a los trabajos fisiológicos sobre transporte activo (31) y a los estudios electrofisiológicos, basados en medidas de potencial eléctrico a través de la membrana plasmática de células de algas (48). El trabajo pionero de Hodges y col. (12) representa el primer paso hacia la caracterización molecular de esta proteína. Estos autores indicaron que en la membrana plasmática parcialmente purificada de células de raíz existía una ATPasa estimulada por K^+ que era diferente de la ATPasa de cloroplastos y mitocondrias. Posteriormente, la actividad bombeadora de H^+ del enzima fue demostrada en vesículas de membranas aisladas (49), así como en liposomas reconstituidos que contenían ATPasa parcialmente purificada (42).

Las diferentes ATPasas identificadas en las membranas biológicas se han clasificado en dos grandes grupos: **(E-P) ATPasas** y **(F_0 - F_1)ATPasas**, que difieren en sus características bioquímicas y estructurales. La H^+ -ATPasa de membrana plasmática de hongos y plantas se incluyen dentro de las (E-P)-ATPasas, siendo el único sistema de este grupo que, al igual que las (F_0 - F_1)ATPasas, sólo extruyen H^+ . Por el contrario, la H^+ -ATPasa del tonoplasto pertenece, junto a las ATPasas de mitocondrias y tilacoides, al grupo de las (F_0 - F_1)ATPasas (29).

Se ha establecido un origen evolutivo diferente para las (E-P)ATPasas y (F_0 - F_1)ATPasas. De acuerdo con Serrano (45) todas las (E-P)ATPasas procederían de una bomba ancestral común: una $H^+(?)/K^+$ -ATPasa, que posteriormente perdería el cotransporte de K^+ al desarrollarse las H^+ -ATPasas de membrana plasmática de hongos y plantas. La especialización del intercambio Na^+/K^+ representa una característica distintiva de la ATPasa de la membrana plasmática de animales, probablemente relacionado con las condiciones de vida en el mar (alto contenido en Na^+). Por último, la sustitución del intercambio Na^+/K^+ por Ca^{++}/H^+ fue un importante y complicado paso evolutivo para alcanzar una eficiente homeostasis relacionada con el Ca^{++} .

ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACCIÓN

El modelo de la estructura transmembranaria de la H^+ -ATPasa, propuesta por Serrano (45), indica que la mayor parte de las regiones hidrofílicas del enzima están orientadas hacia el lado citoplasmático de la membrana, mientras que sólo una pequeña proporción de la cadena polipeptídica está expuesta hacia el lado externo. El polipéptido presenta ocho regiones hidrofóbicas, constituidas por unos 20 aminoácidos, que atraviesan la membrana, las cuales pueden constituir canales transmembranarios. En el enzima existen siete tramos, a los

que se denomina "regiones conservadas", en los que la secuencia de aminoácidos es común con el resto de las (E-P)ATPasas. La región conservada que contiene el intermediario fosforilado estaría localizada en la apertura citoplasmática del canal, en una posición ideal para acoplar el transporte de H^+ con la hidrólisis del ATP. Las regiones conservadas 4-7 constituyen el "dominio de la kinasa" y están involucradas en la unión del ATP y formación de intermediarios fosforilados. Las regiones 1 y 2 constituyen el "dominio de la fosfatasa", que cataliza la hidrólisis de intermediarios fosforilados.

El mecanismo de acción descrito para las (E-P)ATPasas (45) se basa en que estos enzimas pueden presentar dos conformaciones que alternan durante el ciclo catalítico. En la conformación E_1 sólo está activado el dominio de la kinasa y el centro activo liga a los H^+ con gran afinidad en el lado citoplasmático de la membrana. En la conformación E_2 sólo el dominio de la fosfatasa es activo y el centro que liga al H^+ en la entrada del canal queda orientado hacia el lado externo de la membrana, presentando una baja afinidad por el H^+ . Por tanto, para que el enzima complete su ciclo catalítico debe haber una alternancia de ambas conformaciones y de esta forma dirige el bombeo de H^+ . El cambio conformacional parece estar ligado a la fosforilación de la región conservada 3; ya que, al estar localizada en la entrada del canal, un cambio conformacional concertado puede modificar tanto la afinidad y la orientación del canal como los dominios de la fosfatasa y de la kinasa.

Recientemente se ha establecido que el C-terminal de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática constituye un "dominio autoinhibidor". La eliminación de esta constricción trae como consecuencia la activación del bombeo de H^+ a través de la membrana. La interacción inhibidora entre este dominio autoinhibidor y el lugar catalítico parece estar modulada por diferentes mecanismos: unión de moléculas efectoras, fosforilación, control a nivel genético o proteólisis parcial con liberación de un segmento terminal de 7 KDa (25).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, no cabe esperar que la actividad de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática en células vivas esté dirigida por un mecanismo simple; por el contrario, parece más probable que las señales de los factores de crecimiento de las plantas puedan ser traducidas a la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática a través de mecanismos diferentes, los cuales puedan modular la actividad del enzima.

CINÉTICA E INHIBIDORES ENZIMÁTICOS

El sustrato específico de la H^+ -ATPasa es el Mg-ATP (3). En presencia de este sustrato se obtiene una cinética hiperbólica con valores de K_m comprendidos entre 0.3 y 0.7 mM, en la que un exceso de Mg libre, ATP, ADP y P_i actúan como inhibidores. Aunque el Mg^{++} es probablemente el cofactor fisiológico de

que se denomina "regiones conservadas", en los que la secuencia de aminoácidos es común con el resto de las (E-P)ATPasas. La región conservada que contiene el intermediario fosforilado estaría localizada en la apertura citoplasmática del canal, en una posición ideal para acoplar el transporte de H^+ con la hidrólisis del ATP. Las regiones conservadas 4-7 constituyen el "dominio de la kinasa" y están involucradas en la unión del ATP y formación de intermediarios fosforilados. Las regiones 1 y 2 constituyen el "dominio de la fosfatasa", que cataliza la hidrólisis de intermediarios fosforilados.

El mecanismo de acción descrito para las (E-P)ATPasas (45) se basa en que estos enzimas pueden presentar dos conformaciones que alternan durante el ciclo catalítico. En la conformación E_1 sólo está activado el dominio de la kinasa y el centro activo liga a los H^+ con gran afinidad en el lado citoplasmático de la membrana. En la conformación E_2 sólo el dominio de la fosfatasa es activo y el centro que liga al H^+ en la entrada del canal queda orientado hacia el lado externo de la membrana, presentando una baja afinidad por el H^+ . Por tanto, para que el enzima complete su ciclo catalítico debe haber una alternancia de ambas conformaciones y de esta forma dirige el bombeo de H^+ . El cambio conformacional parece estar ligado a la fosforilación de la región conservada 3; ya que, al estar localizada en la entrada del canal, un cambio conformacional concertado puede modificar tanto la afinidad y la orientación del canal como los dominios de la fosfatasa y de la kinasa.

Recientemente se ha establecido que el C-terminal de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática constituye un "dominio autoinhibidor". La eliminación de esta constricción trae como consecuencia la activación del bombeo de H^+ a través de la membrana. La interacción inhibidora entre este dominio autoinhibidor y el lugar catalítico parece estar modulada por diferentes mecanismos: unión de moléculas efectoras, fosforilación, control a nivel genético o proteólisis parcial con liberación de un segmento terminal de 7 KDa (25).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, no cabe esperar que la actividad de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática en células vivas esté dirigida por un mecanismo simple; por el contrario, parece más probable que las señales de los factores de crecimiento de las plantas puedan ser traducidas a la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática a través de mecanismos diferentes, los cuales puedan modular la actividad del enzima.

CINÉTICA E INHIBIDORES ENZIMÁTICOS

El sustrato específico de la H^+ -ATPasa es el Mg-ATP (3). En presencia de este sustrato se obtiene una cinética hiperbólica con valores de K_m comprendidos entre 0.3 y 0.7 mM, en la que un exceso de Mg libre, ATP, ADP y P_i actúan como inhibidores. Aunque el Mg^{++} es probablemente el cofactor fisiológico de

la H^+ -ATPasa, puede ser reemplazado por Mn^{++} , Co^{++} o Zn^{++} (10). El Ca^{++} no muestra actividad, aunque en presencia de Mg^{++} una concentración de 0.2 a 0.4 mM de Ca^{++} produce un 50% de inhibición (15). El K^+ es un activador moderado de la ATPasa de membrana plasmática, presentando a pH ácido una cierta especificidad: ($K^+ \geq Rb^+ \geq Na^+ \geq Li^+$), que no se detecta a pH fisiológico (1). El máximo de actividad del enzima H^+ -ATPasa se obtiene a $38^\circ C$, mientras que a $30^\circ C$ ésta se reduce en un 50% (6). En relación con la estequiometría H^+/ATP se han descrito valores comprendido entre 0.8 y 1.0 (4, 43).

Entre los inhibidores de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática figuran los siguientes:

SO_4Cu y mercuriales. Inhibidores inespecíficos de ATPasas de membrana plasmática, mitocondrial y vacuolar. Su acción se debe al bloqueo de los grupos sulfhidrilos del centro activo del enzima.

Vanadato. Inhibidor general de fosfohidrolasas que forman intermediarios fosforilados, es también inhibidor de fosfatasa ácidas. Es un inhibidor efectivo de la ATPasa de membrana plasmática, aunque presenta algunos inconvenientes: es de penetración lenta en células intactas; el metabolismo celular lo reduce a vanadil (forma no activa) y, por último, en función del pH y la concentración tiene tendencia a formar compuestos de coordinación superior.

Eritrosina B. Inhibidor efectivo de la ATPasa de membrana plasmática in vitro e in vivo, así como de la ATPasa vacuolar.

DCCD (diciclohexilcarbodimida). Actúa a nivel de la hidrólisis del ATP impidiendo la fosforilación del enzima. También puede afectar las propiedades de permeabilidad de la membrana plasmática. La inhibición de la ATPasa de membrana plasmática se debe a la reacción covalente del compuesto con el enzima en un lugar que no corresponde con el centro activo, ya que el $Mg-ATP$ no protege frente al inhibidor.

DES (Dietilestilbestrol). Inhibe tanto la ATPasa de membrana plasmática como la mitocondrial y vacuolar. Actúa impidiendo la hidrólisis del ATP y la fosforilación del enzima, así como alterando la permeabilidad de la membrana plasmática.

La identificación de ATPasa de plasmalema en fracciones microsomales, e incluso en membrana plasmática purificada, es difícil por la existencia en el homogenado de una gran diversidad de enzimas capaces de hidrolizar ATP. Hasta el momento, no se conocen inhibidores específicos de la ATPasa de la membrana plasmática, por lo que sólo una combinación de varios inhibidores puede constituir un ensayo suficientemente específico del enzima (45).

Regulación de la actividad H^+ -ATPasa

El papel clave atribuido a la H^+ -ATPasa en el metabolismo ha llevado a considerar que la actividad de este enzima estaría modulada por todos los factores que controlan o alteran la fisiología de las plantas, tales como la luz, el turgor celular, las fitohormonas y fitotoxinas, así como los daños mecánicos y los tratamientos térmicos (44).

La inducción de la apertura del estoma por **la luz** está basada en la estimulación de la bomba de H^+ de las células de guarda, lo que determina una absorción masiva de K^+ y aumento del turgor. La disminución del **turgor celular** produce un estímulo del bombeo de H^+ , lo que parece ser un hecho clave en la osmorregulación. Como en el caso de las células de guarda, la absorción de K^+ se activa de forma secundaria, lo que determina un aumento del turgor.

Prácticamente todas las hormonas vegetales interaccionan con el bombeo de H^+ . Las auxinas activan el enzima H^+ -ATPasa de plasmalema en las zonas de crecimiento de la parte aérea, promoviendo la elongación celular; mientras que las citoquininas activan el bombeo en los cotiledones. El ácido abscísico inhibe el bombeo de H^+ en diferentes partes de la planta: en las células oclusivas (induciendo el cierre del estoma), en las semillas en germinación (inhibiendo el proceso germinativo), y en las raíces (inhibiendo la carga del xilema).

Por último, tanto la fusicoccina como la siringomicina, **fitotoxinas** producidas por microorganismos patógenos, activan el bombeo de H^+ de todos los tejidos vegetales, probablemente a través de un efecto directo sobre la actividad H^+ -ATPasa del plasmalema; mientras que los daños mecánicos y los tratamientos térmicos (altas y bajas temperaturas) lo inhiben.

El mecanismo de regulación de la H^+ -ATPasa por estos factores no ha sido aún elucidado. Se ha especulado si las variaciones en el bombeo de H^+ son el reflejo de una modulación a nivel de la cantidad del enzima H^+ -ATPasa o de su actividad. Sin embargo, la rápida respuesta de la mayoría de los efectores *sugiere que el mecanismo de acción más probable sería la modificación de la actividad del enzima.*

Se ha postulado que la actividad H^+ -ATPasa estaría regulada por proteínas kinasas y por lisofosfolípidos.

Regulación por proteínas kinasas. La regulación por proteínas kinasas constituye el mecanismo regulador más frecuente en eucariotas (14). La cuestión que se plantea es establecer la naturaleza de la proteína kinasa y de los mensajeros intracelulares que activan estas proteínas kinasas, los cuales serían generados por los factores externos anteriormente indicados. A diferencia de lo que sucede en levaduras, el mensajero intracelular que regula la actividad fisiológica de las proteínas kinasas de las plantas no es el cAMP (32). Por tanto,

la naturaleza de los mensajeros intracelulares que activan las proteínas kinasas está por dilucidar.

Entre los posibles activadores de las proteínas kinasas en plantas superiores figuran los siguientes:

La concentración de Ca^{++} intracelular. El mecanismo de regulación del Ca^{++} sería el siguiente: un incremento del Ca^{++} intracelular, como el producido en respuesta a los choques térmicos y mecánicos (35), determinaría un incremento de la fosforilación de la H^{+} -ATPasa, lo que provocaría una inhibición de este enzima. Por el contrario, la auxina y la luz, al disminuir el nivel de Ca^{++} intracelular (11), eliminarían la fosforilación inhibitoria de la ATPasa producida por proteínas kinasas dependientes de Ca^{++} (40).

La acidificación citosólica. El hecho de que tanto la auxina como la fusicoccina provoquen una acidificación citosólica (5), seguido de la activación de la ATPasa de la membrana plasmática y del crecimiento celular (37), ha permitido concluir que la acidificación podría ser el primer mensajero intracelular que interviene en la activación de la H^{+} -ATPasa. La secuencia de hechos desencadenada por la acidificación podría ser el resultado de la activación de una proteína kinasa; a este respecto, es sugerente el hecho de que se haya encontrado una proteína kinasa ligada a la membrana plasmática con un pH óptimo ácido (40).

El metabolismo del fosfatidilinositol de plasmalema. Se ha establecido que tanto la luz (21, 23) como la auxinas (8) activan la fosfolipasa C, induciendo rápidos cambios en el nivel de metabolitos de los fosfatidilinositol (inositol trifosfato y diacilglicerol), los cuales parecen estar implicados en la transducción de señales para la regulación de la H^{+} -ATPasa. Concretamente, el diacilglicerol es un potente activador de la proteína kinasa C en plantas (39), las cuales, a través de una hipotética fosforilación de la H^{+} -ATPasa, activarían el bombeo de H^{+} .

Regulación por lisofosfolípidos. Los lisofosfolípidos (detergentes naturales que se forman por la acción de las fosfolipasas sobre los fosfolípidos) son activadores altamente específicos de la H^{+} -ATPasa de la membrana plasmática (26). El hecho de que las auxinas activen la fosfolipasa A y que esta fosfolipasa se haya encontrado en membrana plasmática (27), sugiere que estas hormonas podrían actuar sobre la H^{+} -ATPasa de la membrana plasmática a través de los lisofosfolípidos.

Existen pruebas concluyentes de que el efecto estimulante de los lisofosfolípidos no está relacionado con sus propiedades como detergente, ya que se ha comprobado que a concentraciones micromolares los lisofosfolípidos estimulan el bombeo de H^{+} en vesículas de plasmalema de raíces de avena, sin que por ello se afecte la permeabilidad pasiva de la membrana a los H^{+} (26). El efecto de los

lisofosfolípidos podría ser directo, provocando un cambio conformacional que desplazaría el dominio inhibidor de la H^+ -ATPasa, o indirecto, a través de su acción sobre otras proteínas; por ejemplo, una proteína kinasa estimulada por lípidos (24).

PAPEL FISIOLÓGICO

La H^+ -ATPasa de la membrana plasmática juega un papel central en la fisiología de las plantas. El gradiente de H^+ generado por este enzima controla dos mecanismos básicos: el pH intra y extracelular y el transporte activo de nutrientes a través del plasmalema, los cuales a su vez dirigen otros procesos fisiológicos. Así, la H^+ -ATPasa está implicada en la elongación celular (9, 34)); carga de nutrientes inorgánicos a nivel del xilema de la raíz (18); carga de nutrientes orgánicos en el floema (2), y finalmente los cambios de turgor responsables de la apertura y cierre de los estomas (52).

Control del pH. Se ha propuesto que la H^+ -ATPasa, mediante la extrusión de H^+ , controla directamente el pH intra y extracelular, constituyendo lo que se denomina "pH stat biofísico" (47). Por otra parte, la síntesis y utilización de málico en las plantas constituye el sistema "pH stat bioquímico", que actúa de forma coordinada con el bombeo de H^+ (7). El control del pH se realizaría mediante el siguiente mecanismo: la alcalinización del citoplasma provoca una activación del enzima PEPcarboxilasa, que cataliza la carboxilación de fosfoenolpirúvico (ácido débil) transformándolo en oxalacético, el cual a su vez pasa a malato (ácido fuerte) por acción del enzima malato deshidrogenasa, lo que determina un aumento en la relación $NADP^+/NADPH$. La disociación de este ácido fuerte hace que el pH citoplasmático vuelva a equilibrarse. Por otra parte, la acidificación del citoplasma activa el enzima málico dependiente de $NADP^+$, lo que determina que el malato se descarboxile y se obtenga piruvato, CO_2 y $NADPH$; de esta forma se neutraliza un grupo carboxílico y el pH se mantiene constante.

Sin embargo, el hecho de que el pH citoplasmático permanezca constante con diferentes actividades de la bomba (36) ha puesto en duda que la H^+ -ATPasa sea responsable del control directo del pH citoplasmático.

Transporte de nutrientes. En la actualidad se considera que el transporte activo primario en plantas superiores se realiza fundamentalmente mediante H^+ -ATPasas (44, 45, 49), que dirigen la extrusión de H^+ desde el citoplasma hacia el exterior, a través del plasmalema, o hacia la vacuola, a través del tonoplasto. La actuación de estas bombas trae como consecuencia una diferencia de potencial eléctrico a nivel del plasmalema y del tonoplasto, así como una diferencia de pH en los principales compartimentos celulares, aproximadamente neutro en

el citoplasma y ácido en la vacuola. La extrusión de H^+ se utiliza fundamentalmente para impulsar y regular la velocidad de transporte de diferentes solutos inorgánicos (cationes y aniones) y orgánicos (azúcares, aminoácidos, reguladores del crecimiento), mediante sistemas de transporte secundario. El influjo de cationes al citoplasma ocurriría en respuesta a la diferencia de potencial eléctrico generada por el eflujo electrogénico de H^+ (sistema "uniport"). El influjo de aniones y solutos orgánicos se produciría mediante un transporte simultáneo de H^+ y aniones (sistema "symport"), mientras que el eflujo de cationes estaría acoplado a la entrada de H^+ (sistema "antiport").

La relación entre la H^+ -ATPasa y el transporte de K^+ ha sido especialmente estudiada. Las primeras propuestas de que la ATPasa de la membrana plasmática estaría directamente implicada en el transporte activo de K^+ (13, 17) no fueron confirmadas cuando el enzima fue purificado y reconstituido en liposomas (43). Esto llevó a la conclusión de que el transporte de K^+ se realizaba, probablemente, mediante un sistema diferente dirigido por el potencial eléctrico de membrana generado por la actividad H^+ -ATPasa. A este respecto se ha demostrado que en la membrana plasmática de plantas existen canales selectivos de K^+ (41), los cuales son activados por la hiperpolarización de la membrana. Se ha sugerido que la ATPasa estaría íntimamente relacionada con estos canales, hasta el punto de que dichos canales podrían formar parte de la propia ATPasa, aunque esta posibilidad deberá ser confirmada mediante trabajos bioquímicos y genéticos (44).

El transporte de cationes divalentes (Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} , Zn^{++}) se produce a favor del gradiente de potencial electroquímico (30), facilitado por transportadores específicos que actuarían sin necesidad de un acoplamiento directo con la energía metabólica (17). La concentración de estos iones en el interior de la célula podría estar controlada por bombas de eflujo que extruirían iones hacia el apoplasto. Así, el Ca^{++} entraría pasivamente en las células, manteniéndose constante la concentración citoplasmáticas de este ión mediante una extrusión activa, a través del plasmalema, dirigida por sistemas "antiport" Ca^{++}/H^+ (33). Igualmente, se ha sugerido la existencia de sistemas de eflujo activo de Na^+ en la membrana plasmática de células radiculares (46).

La **absorción de aniones** (NO_3^- , $H_2PO_4^-$ y $SO_4^{=}$) se realizaría mediante sistemas "simport" H^+ /aniones (16, 50, 51). La actuación de estos sistemas, cuya estequiometría sería igual o superior a 1 para el sistema H^+/NO_3^- (20) y de 2 a 4 para el sistema $H^+/H_2PO_4^-$ (38, 51), provocaría la posterior activación de la extrusión de H^+ como consecuencia de la disipación del potencial de membrana y/o acidificación citoplasmática.

Los estudios de inmunocitocalización de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática en plantas superiores (28) han permitido establecer que, a nivel de la raíz, la H^+ -ATPasa está concentrada en la zona periférica y en el cilindro central, incluyendo endodermis y células vasculares. Este hecho está de acuerdo con la hipótesis que propone la existencia de un doble bombeo en el proceso de

absorción y transporte radial de iones a través de la raíz, el cual se produciría por absorción activa a nivel de la epidermis, transporte vía simplasto a través del córtex y eflujo activo en las células próximas al xilema.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ANTHON, G. E.; SPANSWICK, R. M. (1986). *Plant physiol.* **81**: 1080-1085.
- (2) BAKER, D. A. (1978). *New Phytol.* **81**: 485-497.
- (3) BENNET, A. B.; O'NEILL, S. D.; EILMAN, M.; SPANSWICK, R.M. (1985). *Plant Physiol.* **78**: 495-499.
- (4) BRAUER, D.; TU, S. I.; HSU, A. F.; THOMAS, C. (1989). *Plant Physiol.* **89**: 464-471.
- (5) BRUMMER, B.; BERTEL, A.; POTRYKUS, I.; FELLE, H.; PARISH, R. W. (1985). *FEBS Lett.* **189**: 109-114.
- (6) COCUCCI, M. C.; MARRÉ, E. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* **771**: 42-52.
- (7) DAVIS, D. D. (1973). *Symp. Soc. Exp. Biol.* **27**: 513-533.
- (8) ETTLINGER, C.; LEHLE, L. (1988). *Nature* **331**: 176-178.
- (9) HAGER, A.; MOSER, I. (1985). *Planta* **163**: 391-400.
- (10) HARADA, H.; WAKIUCHI, N.; OJI, Y.; SHIGA, H. (1990). *Soil Sci. Plant Nutr.* **36**(4): 545-553.
- (11) HEPLER, P. K.; WAYNE, R. O. (1985). *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**: 397-439.
- (12) HODGES, T. K.; LEONARD, R. T.; BRACKER, C. E.; KEENAN, T. W. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 3307-3311.
- (13) HODGES, T. K. (1976). "Encyclopedia of Plant Physiology". Eds. U. Luttge, M. G. Pitman, Vol. 2 (A): 260-283. Springer-Verlag. Berlin.
- (14) HUNTER, T. (1987). *Cell* **50**: 823-829.
- (15) KASAMO, K. (1986). *Plant Physiol.* **80**: 818-824.
- (16) LASS, B.; ULLRICH-EBERIUS, C. I. (1984). *Planta* **161**: 53-60.
- (17) LEONARD, R. T. (1984). "Advances in Plant Nutrition", Vol. 1. Eds. P. B. Tinker y A. Läuchli; pp. 209-240. Praeger Scientific, New York.
- (18) LUTTGE, U.; HIGINBOTHAM, N. (1979). "Transport in Plants". Springer-Verlag. Berlin.
- (19) MARRÉ, E.; BALLARIN-DENTI, A. (1985). *J. of Bioenergetics and Biomembranes* **17**: 1-21.
- (20) McCLURE, P. R.; KOCHIAN, L. V.; SPANSWICK, R. M.; SHAFF, J. E. (1990). *Plant Physiol.* **93**: 281-289.
- (21) MEMON, A. R.; BOSS, W. F. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**: 14817-14821.
- (22) MITCHELL, P. (1961). *Nature* **191**: 144-148.
- (23) MORSE, M. J.; CRAIN, R. C.; SATTER, R. L. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7075-7078.
- (24) OISHI, K.; RAYNOR, R. L.; CHARP, P. A.; KUO, J. F. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**: 6865-6871.
- (25) PALMGREN, M. G. (1991). *Physiol. Plant.* **83**: 314-323.
- (26) PALMGREN, M. G.; SOMMARIN, M. (1989). *Plant Physiol.* **90**: 1009-1014.
- (27) PALMGREN, M. G.; SOMMARIN, M.; ULVSKOV, P.; JØRGENSEN, P. L. (1988). *Physiol. Plant.* **74**: 11-19.
- (28) PARETS-SOLER, A.; PARDO, J. M.; SERRANO, R. (1990). *Plant Physiol.* **93**: 1654-1658.