

00591



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Instituto de Biotecnología



Estudio del tipo y propiedades de los canales iónicos
presentes en raíces de frijol *Phaseolus vulgaris* L.

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas

Presentada por:

MIBB Daniel Balleza Mejía

Asesores:

Dr. Froylán Miguel Gómez-Lagunas.
M. en C. Carmen Quinto Hernández.

Cuernavaca, Mor. Febrero 2005.

m. 341168



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Agradecimientos

Principalmente a Froylán-Gómez L. y a Carmen Quinto H. por todo lo que me permitieron aprender durante mis estudios de Doctorado.

A los miembros de mi comité tutorial: Alberto Darszon I., Ricardo Félix G., Iván Ortega B., Omar Pantoja A., Arturo Ponce B., Federico Sánchez R.

A los miembros del laboratorio CQ y FS.

Asimismo a todos los que de alguna manera contribuyeron con discusiones y/o comentarios a este trabajo: Carmen Beltrán, Guillermo Krötzsch, Daniel Sánchez, Marco Villanueva.

Al CONACyT (Beca 94079) y a la UNAM.

A mi padre y a la memoria de mi abuelo

El pasado es estático y perpetuo, tiene un toque de eternidad, como una pintura o una escultura de bronce o mármol. No lo afectan las tormentas ni las convulsiones del presente, conserva su dignidad y su sosiego e inspira al espíritu perturbado a refugiarse en sus catacumbas abovedadas. En el pasado hay paz y seguridad, en él se puede percibir incluso un aire espiritual... Quién habla de su fascinación por el pasado, habla en realidad de su amor a la vida. El presente no es más que un momento fugaz, efímero; aunque su riqueza lo haga parecer eterno. Cuando se ama la vida, se ama al pasado, pues las imágenes que pueblan la memoria no son sino impresiones de lo que fue... Porque si nos plantamos frente a la Antigüedad y la contemplamos con la seria intención de formarnos en ella, tendremos la sensación de convertirnos en seres humanos por vez primera...

Ἑκτωρ δ' ἀπράξας λάαν φέρεν, ὅς ῥα πυλάων
εστῆκει πρόσθε προμνός παχύς, αὐτάρ ὑπερθεν
δέξυς ἔην τῶ δ' οὐ' κε δῦ' ἀνέρες δήμου ἀρίστῳ
ρ' ἠϊθίως ἐπ' ἄμαξας ἀπ' οὐδεοχ δαλίσειαν,
οἰοὶ νῦν βροτοῖσις' ὃ δε μιν ῥέα πάλλε καὶ οἶος ἔϊ

Héctor cogió entonces una roca
de ancha base y aguda punta
que había delante de la puerta
y que dos de los más óptimos hombres del
pueblo,
tales como son hoy, con dificultad hubieran
podido cargarla en un carro;
pero aquél la blandía fácilmente. 11

ὃ δ' ἄρ' Ἑκτορε φαίδιμος Ἑκτωρ
νοκτί βοή ἀτάλαντος ὕπνια· λάμπε δ' εὖ χαλκῷ
εμερδαλέω, τὸν ἔεστο περί χροῖ', δοιά δε' χερσὶ
δοῦρ' ἔχευ' οὐ' κεν τίς μιν εὐρύκακεν ἀντιβολήσας
νόσφι θεῶν ὄτ' ἐάλτο πύλας' πυρὶ δ' ὅσσε δεδῆει.

y el esclarecido Héctor, que por su aspecto a la
rápida noche semejaba,
saltó al interior: el bronce relucía de un modo
terrible en torno de su cuerpo,
y en la mano llevaba dos lanzas.
Nada a no ser un Dios, hubiera podido salirle al
encuentro
y detenerle cuando traspuso la puerta.
Sus ojos ardían como el fuego.

Homero, *Iliada* XII-460.

Sobre la sal húmeda de sangre y mar
Miraba Andrómana el rojo campo de Troya.
Lloraba pensando en lo que vendría después de esa noche,
Como en la que Penélope tejía su llanto,
Infinito y frágil.
Su plegaria constante buscaba respuestas en el cielo
Que sin Dioses se ahogaba...
¿Cómo Zeus Padre permitió esto?
Preguntaba Andrómana en silencio,
Rodando sus lágrimas sobre las armas de Héctor.
Eran sus lágrimas la salvación de Troya,
Que ya sin Dioses era libre...

...tras él subió Peucestas con el escudo sagrado, escudo que Alejandro había tomado del Paladión de Troya y cuidaba que le precediera en todos los combates [...] Alejandro se hacía perfectamente visible tanto por el esplendor de sus armas como por su insigne audacia...
Arriano, *Anábasis de Alejandro* VI-9.

Estudiadme, lector, si encontráis satisfacción en mí, es porque la paciencia para esta profesión se encuentra en muy pocos, sólo en aquellos que desean componer las cosas de nuevo. Venid, oh, hombres, a ver los prodigios de la naturaleza que revelaran estos estudios.
Leonardo, *Códice Madrid* I-6r.

Sería feliz, posiblemente uno de los hombres más felices si este demonio no se hubiese establecido en mi espíritu... Que así sea, sólo hay heridas para mí. No esperes ninguna felicidad de fuera, eres tú quién debe crear todo en tí mismo; sólo en tu mundo ideal encontrarás la felicidad. No puedo buscar un punto de apoyo más que en lo más íntimo de mí ser; en el exterior no hay absolutamente ninguno para mí...
Beethoven - 1810.

Any living cell carries with it the experiences of a billion years of experimentation by its ancestors. You cannot expect to explain so wise an old bird in a few simple words.
M. Delbrück - 1949 (A Physicist Looks at Biology).

La memoria è la parte più nobile dell'essere umano. Senza memoria non c'è identità e non c'è nemmeno alcuna coscienza di esistere.
La memoria es la parte más noble del ser humano.
Sin la memoria no hay identidad y no hay ninguna conciencia de existir.
V. Massimo - 1999.



INDICE

RESUMEN	7
Summary	7
INTRODUCCIÓN	8
<i>Estructura y función de la raíz en las plantas</i>	8
<i>La membrana plasmática</i>	9
<i>Transportadores y canales iónicos</i>	11
<i>Canales iónicos y señalización intracelular en plantas</i>	12
<i>Métodos para el estudio de los canales iónicos en plantas</i>	13
<i>Interacción Leguminosa-Rhizobium</i>	19
<i>i. Antecedentes relevantes</i>	20
<i>ii. Definición del Problema. Justificación del Proyecto de Investigación</i>	24
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
<i>Material Vegetal y Condiciones de Crecimiento</i>	25
<i>Aislamiento de Membranas</i>	25
<i>Ensayos enzimáticos</i>	27
<i>Bicapas Lipídicas Planas y Reconstitución de Canales Iónicos</i>	27
<i>Registro de Canales Unitarios y Análisis de Datos</i>	30
RESULTADOS	31
<i>Aislamiento de vesículas de membrana plasmática</i>	31
<i>Registros unitarios de un canal permeable a cloro de raíces de frijol</i>	31
<i>Registros unitarios de un canal catiónico de raíces de frijol</i>	43
<i>Registros de otros canales iónicos</i>	55
DISCUSIÓN y CONCLUSIONES	56
PERSPECTIVAS	69
ANEXO [<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 307: 114-118]	70
BIBLIOGRAFÍA	76

RESUMEN

En el presente trabajo de Tesis, se estudiaron canales iónicos presentes en fracciones poco enriquecidas (~ 55 %) en membranas plasmáticas de las raíces del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante su reconstitución en bicapas lipídicas planas. Registramos mediante fijación de voltaje y a nivel de canal unitario al menos dos tipos de canales con diferentes características. El primero de ellos es un canal de alta conductancia (293 pS), permeable a cloro (*Maxi-Cl*). Este canal es dependiente de voltaje, no permite el flujo de cationes mono- y divalentes (K^+ , Na^+ y Ca^{+2}) y farmacológicamente es inhibido de manera reversible con concentraciones micromolares de Zn^{+2} . El análisis de este canal sugiere que pudiera no pertenecer a la familia de los canales tipo CIC aunque también presenta dos niveles de conductancia (O1/O2). Por otra parte, de manera más frecuente y en las mismas condiciones iónicas estudiamos un canal catiónico poco selectivo con una conductancia unitaria de 213 pS. A cada voltaje el canal muestra principalmente un nivel de conductancia con una relación de permeabilidades P_{Na^+}/P_{K^+} de 0.78. Cuando se reemplaza una solución de KCl por una solución equimolar de NaCl, se observa un descenso en la P_o y la conductancia unitaria disminuye a 170 pS. Encontramos que perfundiendo una solución con cantidades equimolares de sodio y potasio (150/150mM) la conductancia observada es de 191 pS. Asimismo, la conductancia del canal en presencia de NH_4^+ es de 238 pS con una $P_{NH_4^+}/P_{K^+}$ de 0.86. Por otra parte, concluimos que la permeabilidad al calcio fue muy baja. Nuestros resultados contribuyen con una primera descripción y caracterización del tipo de canales iónicos presentes en las raíces del frijol y establecen un antecedente para estudios posteriores sobre los canales iónicos que pudieran participar en la interacción de esta planta con su microsimbionte *Rhizobium etli*.

Summary

In this work, the characterization of two ion channels from partially enriched plasma membranes (~ 55 %) purified from common bean roots (*Phaseolus vulgaris* L.), was carried out by means of their reconstitution in planar lipidic bilayers. These studies were performed under voltage-clamp conditions at a single channel level. The first studied channel, is a channel of high conductance (293 pS) permeable to chloride (*Maxi-Cl*), it is voltage-dependent and has two levels of conductance (O1/O2). The Cl-channel is not permeable to cations, such as K^+ , Na^+ and Ca^{+2} . The channel is reversibly inhibited at micromolar concentrations of Zn^{+2} . The analysis of this channel suggests that it may not belong to the CIC family. On the other hand, a second channel that was observed more frequently was analyzed under the same ionic conditions as the one described above. This is a nonselective cation channel (NSCCs) with a single conductance of 213 pS. The P_{Na^+}/P_{K^+} permeability ratio is 0.78. When a solution of KCl is replaced by an equimolar solution of NaCl, a lower open probability is observed and the unitary conductance decreases to 170 pS. Under equimolar quantities of sodium and potassium (150/150mM), the conductance observed is 191 pS. Likewise, we find a unitary conductance of 238 pS in the presence of NH_4^+ , with a $P_{NH_4^+}/P_{K^+}$ of 0.86. On the other hand, the calcium permeability was negligible. Our results contribute with a first description and characterization of what type of ion channels are present in the roots of the bean, and they establish a precedent for subsequent studies on ionic channels that might participate in the interaction of this plant with their microsymbiont *Rhizobium etli*.

INTRODUCCIÓN

Estructura y Función de la raíz en las plantas. La raíz es la parte subterránea de la planta, gracias a la cual se mantiene fija y puede absorber el agua y las sales minerales disueltas en la rizósfera. Es una estructura vegetal compleja formada por varios tipos de células. Cada tipo celular está especializado para una función específica. Las células epidérmicas y corticales forman el cuerpo de la raíz y participan en el intercambio iónico entre la rizósfera y las células vasculares. Estas células regulan la liberación de iones hacia los vasos del xilema para su transporte hacia las partes aéreas de la planta (Buchanan, *et al.* 2000). Debido a que cada tipo de célula necesita transportar diferentes iones, la membrana plasmática posee diferentes propiedades de transporte. De esta manera, las propiedades biofísicas de los canales iónicos deben visualizarse en el contexto del tipo de célula y su función. La absorción del agua se efectúa por medio de los pelos radicales (**figura 1**). Cada pelo es una célula epidérmica modificada con una prolongación de hasta 1.5 mm de longitud (Dittmer *et al.* 1949). Los pelos radicales crecen justo detrás de la pequeña región de elongación cercana a la punta de la raíz.

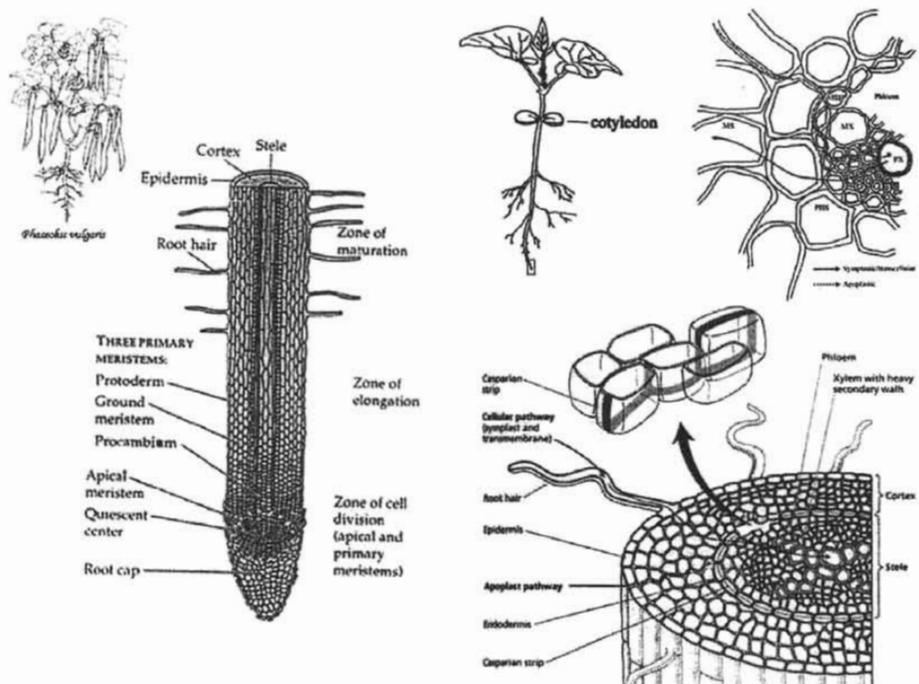


Figura 1. Estructura de la raíz vegetal. El agua y las sales minerales son absorbidas principalmente por los pelos radicales. El transporte culmina en el tejido vascular, al centro del estele siguiendo dos rutas diferentes. La ruta simplástica es transmembranal e implica transporte a través del citosol de las células vivas. En la ruta apoplástica el movimiento se da a través de las paredes celulares hasta la banda de Caspary. (Modificado de Salisbury y Ross, 1992).

Evolutivamente, las plantas han resuelto el problema de la absorción de agua y sales minerales del suelo produciendo grandes sistemas de raíces. La forma cilíndrica y filamentosa de las mismas tiene gran importancia para la absorción de agua y solutos, ya que así se facilita la exploración de grandes volúmenes de suelo.

La Membrana Plasmática. Toda célula se encuentra rodeada por una membrana que la separa de su ambiente y le permite el intercambio selectivo de diversas sustancias. La estructura fisicoquímica de la membrana plasmática o plasmalema- forma una barrera que permite el paso de ciertas sustancias e impide el de otras. Las membranas plasmáticas de toda célula tienen la misma estructura básica: están compuestas por una bicapa de fosfolípidos, que son la mayor clase de lípidos de membrana. Los lípidos de membrana son moléculas anfipáticas que se encuentran organizados en una bicapa continua de aproximadamente 5 nm de grosor que envuelve y define los límites de cada célula. Asimismo, las membranas contienen proteínas asociadas que pueden ser integrales (cuando cruzan ambas capas de la bicapa) o periféricas (cuando sólo se asocian a una de las dos capas). Estos componentes se mantienen asociados mediante interacciones no covalentes. Las membranas son dinámicas, es decir, son estructuras fluidas que permiten el movimiento de los componentes (lípidos y proteínas) en un solo plano de la membrana. Esta estructura constituye el llamado modelo del "mosaico fluido" (figura 2). Además, todas las membranas son asimétricas, la composición y actividades enzimáticas de cada lado son diferentes (Stryer *et al.* 1995).

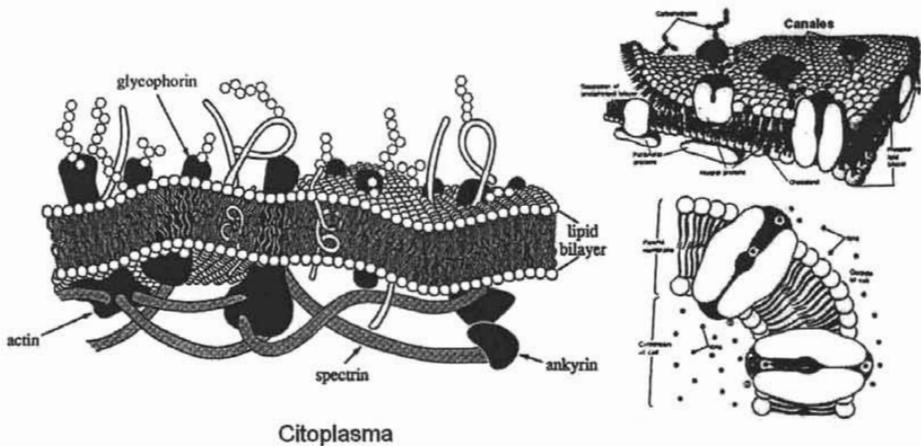


Figura 2. Estructura de las membranas biológicas. La bicapa lipídica (lipid bilayer) incluye fosfolípidos (phospholipids), esteroides (sterols) y proteínas periféricas e integrales, algunas con función de transporte, como los canales iónicos. Ciertas proteínas presentan hacia el exterior de la célula diversos azúcares (carbohydrates), mientras que muchas proteínas periféricas y también integrales en la cara interna de la membrana se encuentran en contacto con proteínas del citoesqueleto como la actina (actin). (Modificado de Randall, 1998).

La membrana como un circuito R-C. Ciertas proteínas de transporte (canales iónicos, bombas, cotransportadores), facilitan el flujo de ciertas moléculas pero no de otras. Esto tiene como consecuencia que a través de la membrana se formen gradientes electroquímicos. La suma de una barrera impermeable al paso de iones (la bicapa lipídica) y la presencia de moléculas con función de transporte de iones puede modelarse como un circuito eléctrico básico compuesto por una resistencia (R), constituida por los canales iónicos además de otros transportadores y por otra parte formada por un capacitor (C), que es consecuencia de una membrana dieléctrica separando cargas y generando una diferencia de potencial eléctrico (figura 3).

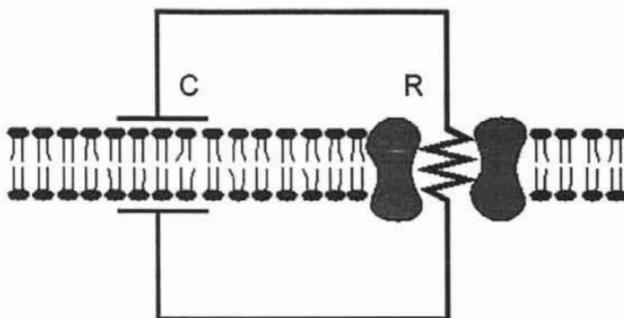


Figura 3. Circuito R-C equivalente de la membrana. La bicapa lipídica funciona como un capacitor y los canales iónicos como la resistencia del mismo circuito.

La capacitancia (C) es una medida de la diferencia de potencial (V) que se produce al haber una separación de carga (Q) a través de un dieléctrico, en este caso la membrana.

$$C = Q/V$$

ec. 1

La unidad de la capacitancia es el faradio (F = coulomb/volt). En la **Tabla I** se muestran las capacitancias específicas por unidad de área de diferentes membranas.

Tabla I
Valores de la capacitancia específica para distintos tipos de sistemas modelo comparados con membranas biológicas

Capacitancia específica	Referencia
Membranas Biológicas $1.0 \mu\text{F} / \text{cm}^2$	Hille (2001)
Bicapas Lipídicas Negras $0.6 \pm 0.2 \mu\text{F} / \text{cm}^2$	Este trabajo ¹
Bicapas libres de solvente $0.9 \pm 0.1 \mu\text{F} / \text{cm}^2$	Montal y Muller (1972)

¹ Bicapas lipídicas artificiales compuestas de difitanoil-fosfatidilcolina (DPPC)

Transportadores y Canales Iónicos. Todo organismo percibe señales del medio ambiente, tanto estímulos físicos como señales químicas. Esto es posible gracias a ciertos mecanismos moleculares donde participan receptores específicos y cascadas de señalización que culminan con la modificación de la actividad celular o la regulación de genes específicos. Finalmente esto se traduce en la respuesta biológica del organismo a su ambiente. Los canales iónicos se encuentran en todos los tipos celulares, siendo particularmente importantes en aquellas células que son excitables (como las neuronas). En células vegetales, actualmente se sabe que iones como H^+ , Na^+ y Ca^{+2} son constantemente transportados al exterior de la célula y adicionalmente, iones como K^+ , NH_4^+ , NO_3^- , Cl^- , SO_4^{-2} , PO_4^{+3} , los azúcares y ciertos aminoácidos son acumulados en el citoplasma (Ward, 1997). Estos iones son transportados mediante acarreadores, bombas primarias y canales iónicos. Los canales iónicos son moléculas que forman un poro que comunica simultáneamente ambos lados de la membrana, siendo selectivos al paso de ciertos iones y además cuentan con mecanismos que controlan su actividad (**figura 4**). La selectividad depende de la presencia de sitios de reconocimiento para los iones localizados en la estructura tridimensional de la proteína. Por otra parte, los canales iónicos son regulados de diferentes maneras y esta capacidad reside en cambios conformacionales que responden a determinados estímulos, como lo son ciertos ligandos o un cambio en el voltaje membranar, después de los cuales los canales se abren o se cierran (Hille, 2001). En cuanto a la modulación de la actividad de los canales iónicos, se han descrito canales dependientes de voltaje, dependientes de ligando (GMPc, AMPc, ADPRc, ATP, Ca^{+2} , etc.), sensibles a estímulos mecánicos, pH, fosforilación, temperatura, etc. Los canales iónicos son capaces de permitir el flujo pasivo de 10^6 - 10^8 iones/segundo, creando corrientes eléctricas con magnitud de picoamperios (Maathuis, 1997). Tal propiedad se conoce como conductancia unitaria (Hille, 2001). Finalmente, los canales iónicos tienen la capacidad de abrirse y cerrarse (*gating*) de manera regulada para permitir o evitar el flujo iónico (Tester, 1990; Maathuis *et al.* 1997). Los flujos a través de canales iónicos son responsables -entre otros procesos- de los potenciales de acción en células excitables (Tester, 1990). Las células vegetales contienen diversos tipos de canales iónicos, algunos de los cuales participan en la generación de potenciales de acción.

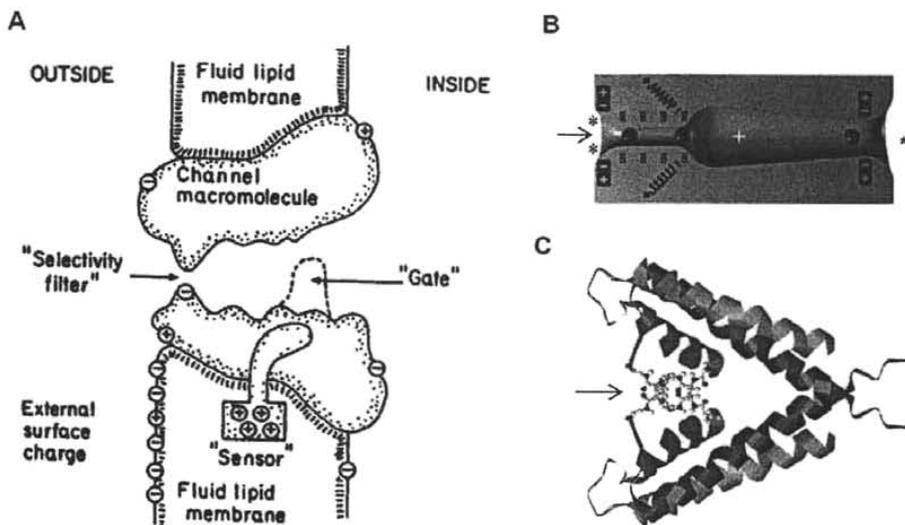


Figura 4. Canales iónicos. (A) Se muestran esquematizados los principales elementos en la estructura-función de estas proteínas. (B) Modelo propuesto del poro de un canal selectivo a K⁺ mostrando el filtro de selectividad (→), los vestíbulos interno (-), externo (-) y la cavidad central (+). (C) Estructura cristalográfica obtenida para el canal de K⁺ KcsA (Hille, B., 2001).

Canales iónicos y Señalización Intracelular en plantas. Como quedó explicado arriba, los canales iónicos se activan en respuesta a diversos estímulos. En las células vegetales –tanto como en cualquier tipo celular-, algunos de estos estímulos afectan la probabilidad de apertura de una fracción determinada de algún tipo particular de canal, dando como resultado un cambio en la corriente iónica a través de la membrana que podría tener dos consecuencias fisiológicas importantes: (1) alterar momentáneamente la concentración de algún ion determinado y (2) cambiar el potencial de membrana (V_m). Ambas consecuencias podrían participar en la transducción de señales a nivel intracelular. La transducción de señales o señalización intracelular se puede entender como una serie de respuestas moleculares encadenadas y secuenciales donde a partir de una señal externa determinada, la célula responde fisiológicamente.

En este contexto, el fenómeno más estudiado en plantas es el control del movimiento de las células guarda para cerrar el estoma de las hojas. El ácido abscísico (ABA) es una molécula endógena capaz de reducir la pérdida de agua cerrando los estomas y controlando así la transpiración en el cuerpo vegetal. En respuesta al estrés hídrico, la biosíntesis de esta fito-hormona se incrementa y se acumula en las células guarda. Esto tiene como consecuencia que dichas células pierdan agua y turgencia, así como que se lleven a cabo diversos influjos y eflujos de iones causando el cierre del estoma (Desikan, *et al.* 2004). Ahora bien, todavía no se conoce el posible receptor del ABA pero se ha descrito una compleja red de vías de señalización intracelular que culminan con el cerrado del estoma. Estas

incluyen la activación de canales iónicos (*v.gr.* canales de K^+ , Ca^{+2} y aniónicos) (Ward *et al.* 1994) y la síntesis de otras moléculas (*v.gr.* ADPRc e IP_3), lo cual eleva las concentraciones intracelulares de calcio (Hunt y Gray, 2001). Asimismo, se han observado como respuesta al ABA: fosforilación reversible de proteínas, activación de proteínas G, modulación en el metabolismo de ARN, cambios en los niveles de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico (Desikan, *et al.* 2004, Schroeder, *et al.* 2001).

Sin embargo, además del fenómeno de cerrado estomatal, se han estudiado otras respuestas de señalización donde se sabe que participan canales iónicos. Una de tales repuestas es la interacción simbiótica Leguminosa-*Rhizobia* de la que se hablará más adelante; otras son las respuesta en el desarrollo vegetal a la luz y la respuesta a estímulos mecánicos. De esta forma, hasta ahora, los canales iónicos mejor caracterizados en plantas son los canales de K^+ y de manera más particular se ha establecido claramente que participan en fenómenos como los de expansión celular, movimiento, crecimiento, asimilación de K^+ , transporte de cationes del xilema al simplasto y viceversa, regulación del voltaje membranal, liberación de solutos, cierre estomatal y osmoregulación (Para revisión *ver* Maathuis, *et al.* 1997; Cherel, 2004). Además de este tipo de canales, en plantas se han caracterizado canales permeables a Ca^{+2} , Cl^- Na^+ , iones orgánicos y acuaporinas; la importancia de todos ellos se encuentra en que participan en diversos procesos biológicos. Sin embargo, el ion más estudiado como segundo mensajero y parte muy importante en la transducción de señales en plantas es el calcio. Se sabe que los cambios en el Ca^{+2} libre intracelular controlan mecanismos de transducción de señales en células vegetales (Johannes *et al.* 1991; para una revisión, Brownlee, 2003). Dado que la activación de canales de Ca^{+2} puede resultar en la entrada masiva de calcio a la célula y así generar cambios importantes en las concentraciones de este cation y otros segundos mensajeros, se piensa que los canales de calcio son un blanco importante en la percepción de señales y los procesos de transducción de señales (Poovaiah y Reddy, 1993, Brownlee, 2003, Yang y Poovaiah, 2003).

Métodos para el estudio de los canales iónicos en plantas. La estructura de una célula vegetal típica consta de una pared celular que da forma a la célula. Esta pared está compuesta principalmente de celulosa pero también se encuentran proteínas y otros polisacáridos en ella. La presencia de la pared celular ha dificultado el estudio de los canales iónicos utilizando técnicas convencionales de registro electrofisiológico como el *patch-clamp*. No obstante, se han diseñado estrategias experimentales para digerir la pared celular y extraer un protoplasto en donde se registra la actividad de los canales iónicos directamente (Hedrich, 1995); sin embargo, estos métodos no son viables en todos los tipos de células vegetales. Debido a esta complicación, se ha intentado estudiar algunos canales iónicos vegetales por métodos alternativos. Uno de los más ampliamente utilizados consiste en la reconstitución de canales iónicos en membranas modelo.

Las técnicas de reconstitución en membranas modelo han permitido caracterizar diversos canales iónicos de células vegetales. Los primeros estudios

(Tester y Blatt, 1989; Tester, *et al.* 1990) emplearon las bicapas lipídicas planas (BLPs) para estudiar los canales de K^+ de las membranas tilacoidales de espinaca (*Spinacea oleracia* L.), de tonoplasto (*ver* Tikhonova, 1998) y membrana plasmática. También se han descrito diversos canales de K^+ en las membranas plasmáticas de raíces de centeno (*Secale cereale* L.) (White y Tester, 1992). En esta planta también se ha estudiado un canal catiónico dependiente de voltaje de alta conductancia (el así llamado canal maxi-catiónico) (White, 1993). En trigo (*Triticum aestivum* L.), se caracterizó por vez primera un canal selectivo a calcio en una preparación de vesículas de membrana plasmática de raíces utilizando BLP (Piñeros y Tester, 1995). Estos ejemplos ilustran la utilidad de los sistemas modelo en el estudio de canales iónicos de origen vegetal. Sin embargo, se sabe poco acerca de las propiedades moleculares de los mismos y su función *in vivo*.

Estas técnicas se basan en el reensamblaje funcional de los componentes moleculares de un sistema membranal biológico (los canales iónicos) en un sistema membranal modelo (una bicapa lipídica artificial), lo que permite controlar experimentalmente los elementos que participan en dicho sistema. La reconstitución de canales iónicos en estas membranas modelo permiten manipular tanto la composición de las soluciones a cada lado de la misma como su composición lipídica. Esto aporta información valiosa acerca de la interacción molecular de los componentes que participan en determinada función. Por tanto, la reconstitución es una herramienta para poder aislar, en forma activa, canales iónicos cuyas propiedades biofísicas se desean estudiar. Ahora, se detallan las técnicas más utilizadas con el fin de establecer su gran utilidad en el estudio de los canales iónicos como alternativa experimental al uso del *patch-clamp*.

Bicapas lipídicas negras. A principio de los '60s se introdujeron las llamadas bicapas negras o BLPs por Mueller y colaboradores (1962). Este tipo de sistema modelo ha contribuido de manera decisiva en el conocimiento de las propiedades de permeabilidad pasiva de las membranas biológicas y han sido de gran utilidad para el estudio de diversos tipos de canales iónicos tanto en células animales como en células vegetales (Álvarez, *et al.* 1985). Las BLPs se forman cubriendo (pintando) con fosfolípidos un orificio típicamente de 100 a 300 μm de diámetro que separa dos compartimentos (*cis* y *trans*) donde se adicionan soluciones iónicas determinadas (**figura 5**). La naturaleza anfipática de los lípidos les permite interactuar con las soluciones acuosas formando espontáneamente bicapas lipídicas que consisten de capas dobles de lípidos en un ambiente hidrofílico. La región hidrofóbica interior de la bicapa (3-5 nm de ancho) forma una barrera de alta energía para el paso de iones, por tanto el transporte a través de las bicapas requiere de la presencia de proteínas integrales con función de transporte. Las bicapas se pueden formar con un solo tipo de fosfolípido o con una mezcla de varios de estos. Dicha composición de fosfolípidos de la bicapa puede influir en la incorporación de los canales iónicos o las propiedades del canal reconstituido. La primera etapa en cualquier experimento de reconstitución de canales iónicos es la formación de una BLP estable.

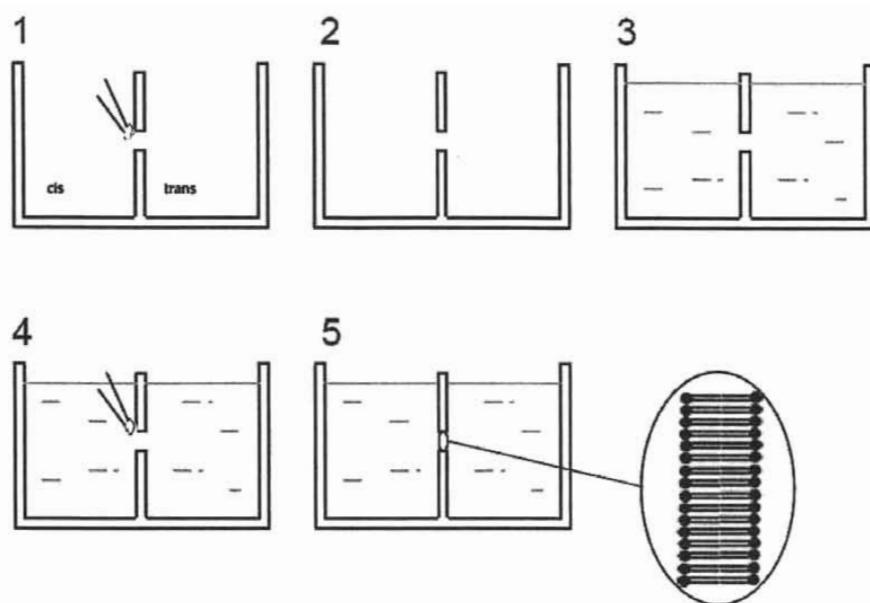


Figura 5. Procedimiento para la formación de bicapas negras. Etapas en la preparación: pretratamiento del orificio con fosfolípidos (1-2), llenado con las soluciones experimentales (3), pintado con fosfolípidos (4) y formación de la bicapa (5) (ver texto para detalles).

Las cámaras de registro para las bicapas se limpian en el orificio con hexadecano o triglicéridos alrededor del poro (Schindler, 1980). Una vez formada la bicapa, se mide experimentalmente la capacidad eléctrica de la misma (ver Tabla I). La capacitancia final de una BLP óptima, debe ser de aproximadamente $0.4-0.6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Por otra parte, estas membranas típicamente tienen resistencias superiores a $10^8 \Omega/\text{cm}^2$ (Álvarez, *et al.* 1985), por lo que una bicapa lipídica útil deberá tener una corriente de fuga de menos de 1pA a un potencial de $\pm 100 \text{mV}$.

Ahora bien, la inserción de los canales iónicos en las bicapas lipídicas puede realizarse: (a) mediante la incorporación directa de canales iónicos purificados adicionando una alícuota de la muestra en la solución deseada a uno de los lados de la bicapa (por convención, el lado *cis*) o (b) utilizando vesículas de membranas nativas purificadas de tejidos vegetales.

La fusión de una vesícula con una bicapa inicia con un estado de prefusión, en donde la vesícula nativa se asocia con la bicapa artificial. La siguiente fase, la fusión propiamente dicha, es inducida con un flujo de agua en respuesta a un gradiente osmótico establecido previamente a ambos lados de la bicapa. Finalmente, la reconstitución de las proteínas se estabiliza en una estructura análoga a la membrana original en donde la orientación de las moléculas depende

de su orientación en la vesícula (Cohen, *et al.* 1980). Para determinar la orientación de un canal iónico es posible emplear agonistas o bloqueadores sitio-específicos, debido a que los canales iónicos son usualmente proteínas asimétricas en términos de su estructura y función.

La fusión de vesículas a una bicapa plana se favorece por: (1) un gradiente osmótico a través de la bicapa lipídica que favorezca la interacción vesícula-bicapa, fusionando las dos membranas, (2) fosfolípidos cargados negativamente en la bicapa y (3) la presencia de Ca^{+2} en el compartimento en donde se agregan las vesículas (*cis*) para facilitar la atracción entre los fosfolípidos. La presencia de Ca^{+2} contribuye a incrementar la frecuencia de fusión de las vesículas con la membrana (Miller, 1986). Sin embargo el factor más importante parece ser el gradiente osmótico (Darszon, 1986; Cohen, *et al.* 1980). Es posible monitorear el número de eventos de fusión utilizando vesículas conteniendo colorantes (p. ej. carboxifluoresceína) y cuantificando ópticamente la concentración de este colorante al otro lado de la bicapa (*trans*) (Zimmerberg, *et al.* 1980; Miller, 1986).

Bicapas libres de solvente por aposición de monocapas. Montal y Muller (1972) diseñaron un método con el cual se forman membranas virtualmente libres de solvente. Su trabajo fue motivado en parte debido al uso de dispersiones de fosfolípidos en solventes orgánicos "no fisiológicos". En el método de Montal y Muller, dos monocapas saturadas de lípidos se dispersan en una interfase aire-agua en dos soluciones separadas por una pared hidrofóbica delgada (10 - 25 μm p. ej. teflón) (**figura 6**). Al inicio, el nivel de las interfases está por debajo de la apertura que se forma entre dos septos de teflón (500 - 1000 μm). Posteriormente, una solución lipídica de la composición deseada se dispersa en un solvente volátil como *n*-pentano o cloroformo y una pequeña porción de esta dispersión se coloca en la superficie de la solución. Después de 5 a 10 minutos, cuando el solvente se haya evaporado, una bicapa lipídica se forma por aposición de las dos monocapas mediante el aumento en el nivel de cada solución electrolítica de manera que cubren el orificio y se forma una bicapa "libre" de solvente. Para lograr mayor estabilidad membranal, la apertura es frecuentemente pretratada con escualeno o hexadecano/pentano (0.5% v/v), de ahí la denominación de "virtualmente libres" de solvente. La capacitancia de membranas formadas por aposición de monocapas tienen valores específicos de $0.9 \pm 0.1 \mu\text{F cm}^2$. Este valor es casi dos veces más grande que la capacitancia de las bicapas planas formadas a partir de lípidos en solventes hidrocarbónicos y prácticamente idénticos a los valores típicos para las membranas celulares (Montal y Muller, 1972).

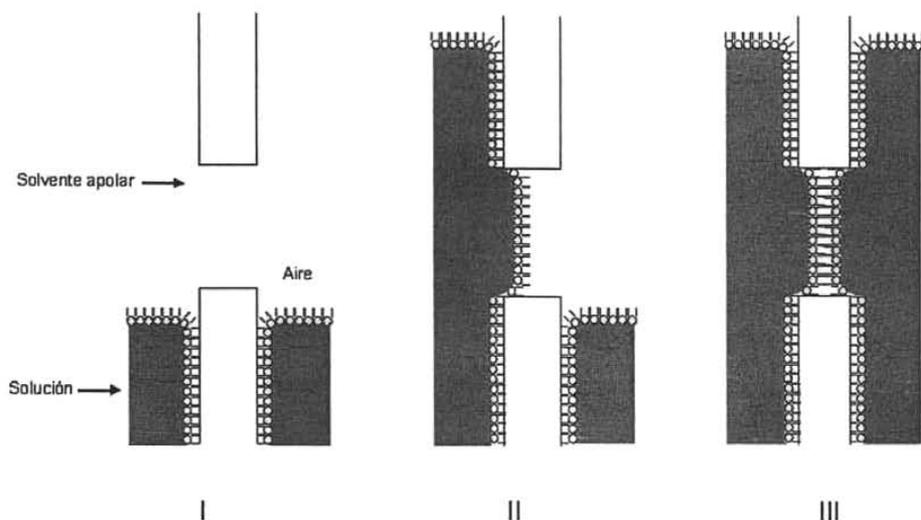


Figura 6. Procedimiento para la formación de bicapas por aposición de monocapas. Pretatamiento (I), monocapa 1 (II) y monocapa 2 (III) (ver texto para detalles).

Con esta técnica es posible usar orificios más pequeños que los utilizados en bicapas planas (diámetro $< 100 \mu\text{m}$). La reducción en el área de la bicapa incrementa su estabilidad mecánica y el ruido eléctrico disminuye. Sin embargo, el inconveniente potencial del uso de orificios pequeños es que se reduce la probabilidad de incorporación de los canales iónicos. La ventaja de esta técnica es la posibilidad de formación de bicapas asimétricas mediante aposición de dos monocapas de diferente composición.

Bicapas en la punta de una micropipeta. Con el desarrollo de la técnica de *patch-clamp*, un tercer método de formación de bicapas artificiales fue introducido con la formación de bicapas en la punta de una micropipeta (Coronado y Latorre, 1983) (figura 7). La manera de hacer estas membranas consiste en dispersar una monocapa de fosfolípidos en una interface aire-agua en un recipiente con la solución deseada. Posteriormente se sumerge y extrae la micropipeta, formándose espontáneamente una bicapa en la punta de esta. La monocapa original se forma de manera espontánea con dispersiones de lípidos en solventes volátiles o bien suspensiones de vesículas y más aún, se puede reinsertar la micropipeta en otra solución con otro tipo de fosfolípidos formando la monocapa y controlar así la composición de fosfolípidos a cada lado de la bicapa.

Este método alternativo tiene las ventajas de que la bicapa final tiene un área de superficie pequeña, además de estar libre de solvente. En lo que respecta a la incorporación de los canales iónicos, estos pueden ser transferidos directamente a la bicapa durante el ensamblaje de las monocapas en la punta de la pipeta. Debido a la pequeña área de membrana utilizada en este método, la

resolución temporal y la relación señal-ruido es mucho mejor que empleando las BLP, sin embargo la probabilidad de incorporación de canales es baja por el área reducida de la membrana (Darszon, 1986).

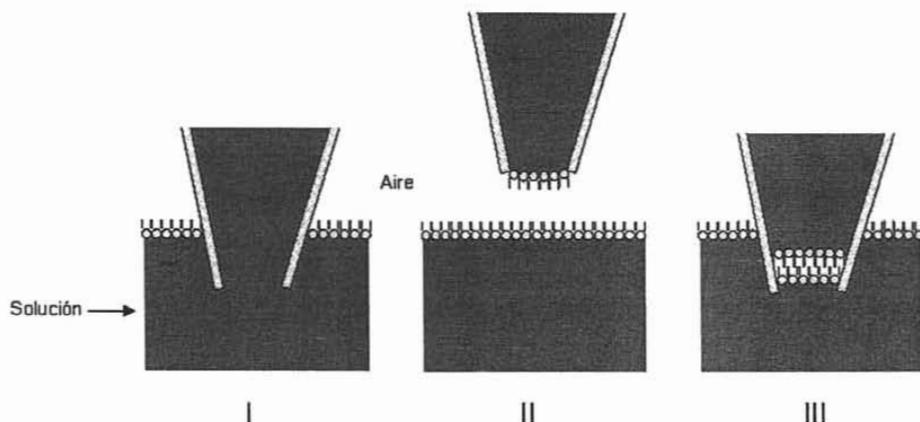


Figura 7. Procedimiento para la formación de bicapas en la punta de una micropipeta. Formación de una monocapa (I), extracción de la pipeta con formación de monocapa en la punta (II) y reinmersión (III) (ver texto para detalles).

Reconstitución de Canales Iónicos en Liposomas. Otro enfoque experimental ocasionalmente usado para el registro de canales iónicos es el *patch-clamp* en proteoliposomas (figura 8). Las vesículas aisladas de membranas nativas son demasiado pequeñas para realizarles *patch-clamp* (0.1 - 1 μm de diámetro promedio). Estas vesículas se fusionan en liposomas y se realiza el *patch-clamp* directamente a los proteoliposomas. Para la obtención de estos se requiere el congelamiento y descongelamiento o la deshidratación y rehidratación de las vesículas membranales. Tank y Miller (1983) implementaron congelamiento con nitrógeno líquido y descongelamiento en hielo o a temperatura ambiente. Realizando estos cambios de temperatura sucesivamente, los proteoliposomas se fusionan entre si formando estructuras grandes viables para realizar *patch-clamp*. Usando este método, es posible obtener estructuras multilamelares con diámetros de 30 a 50 μm . La formación y remoción de cristales de hielo causa la ruptura y resello de los liposomas. Por otra parte, Criado y Keller (1987) diseñaron un método alternativo para la formación de estos liposomas híbridos. Este consiste en reconstituir proteínas de membrana en vesículas unilamelares pequeñas en presencia de lípidos exógenos y su tamaño se va incrementando mediante deshidrataciones y rehidrataciones sucesivas. Las fluctuaciones en la corriente unitaria por los canales iónicos incorporados en estos liposomas híbridos se monitorean mediante las técnicas convencionales de *patch-clamp*.

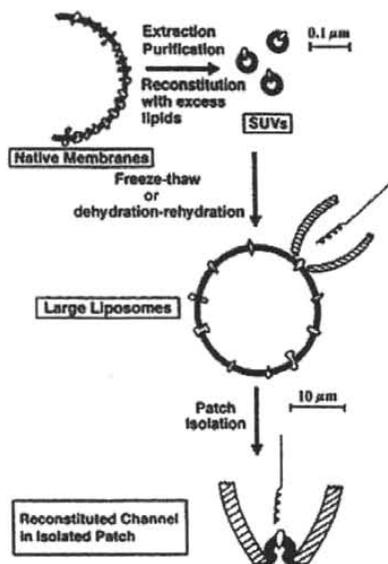


Figura 8. Reconstitución de canales iónicos en liposomas a partir de vesículas membranales (SUVs) (Tomado de Tank y Miller, 1983). Ver texto para los detalles.

Interacción Leguminosa-Rhizobium. Una vez discutidos los métodos de estudio de canales iónicos utilizando membranas modelo, se hablará a continuación sobre la interacción Leguminosa-Rhizobium, la cual constituye el interés general del laboratorio. La relación simbiótica establecida entre las plantas leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium* es muy específica. Los "rhizobia" (géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Sinorhizobium*) son capaces de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en ciertas plantas leguminosas y se ha postulado recientemente que en los procesos de comunicación entre ambas partes podrían estar participando fenómenos eléctricos mediados por canales iónicos (Assmann, 1995). Los factores de nodulación (FNs) son las principales moléculas señal sintetizadas y secretadas por las bacterias y que provocan diversas respuestas en la planta como preámbulo a la formación del nódulo: curvatura y deformación de los pelos radicales; en presencia de las bacterias, formación de tubos infectivos; reactivación del ciclo celular, inducción de la formación del primordio nodular y otras respuestas que son consideradas "simbióticas" (figura 9) (Fisher y Long, 1992; Kijne, 1992; van Rhijn y Vanderleyden, 1995; Dénarié, et al., 1996; Hirsch et al. 2001; D'Haeze y Holsters, 2002).

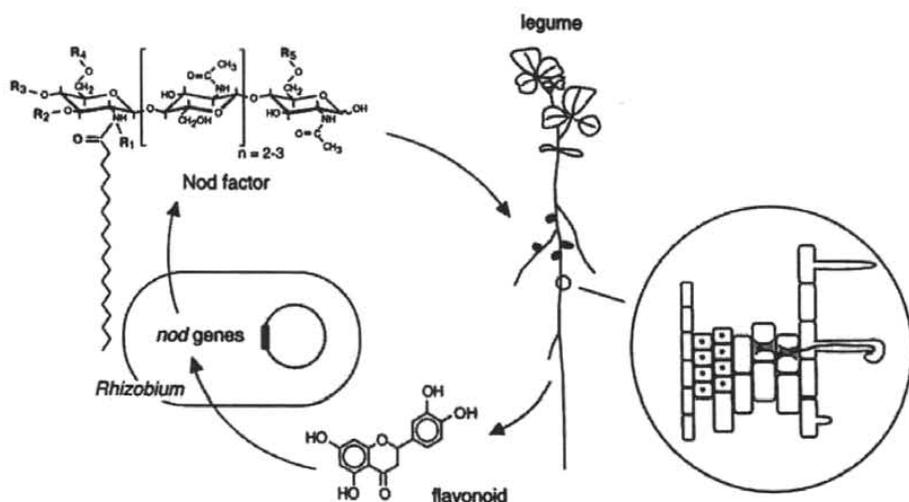


Figura 9. Intercambio de señales en la interacción Leguminosa-*Rhizobium*. Los flavonoides secretados por las raíces de las leguminosas activan los genes *nod* en *Rhizobium* y estos genes se encargan de la síntesis y secreción de factores Nod que inducen diferentes respuestas morfológicas en las raíces (círculo), culminando con la formación de nódulos en los que el N_2 se reduce por los bacteroides simbiotes. Tomado de M. Schultze y A. Kondrosi (1998). Ver texto para los detalles.

i. Antecedentes relevantes.

La señalización eléctrica y los canales iónicos que participan en los procesos de comunicación que inician la formación del nódulo es un campo relativamente nuevo. El trabajo pionero en esta área es el de Ehrhardt, *et al.* (1992), quien utilizando microelectrodos demostró que a concentraciones nanomolares del factor de nodulación de *S. meliloti*, NodRm-IV(S), se provoca la depolarización de la membrana plasmática en pelos radicales de alfalfa. Poco después, dos estudios simultáneos profundizaron la primera descripción de Ehrhardt y cols.: Kurkdjian (1995) reportó que los pelos radicales de alfalfa responden de manera distinta a los FNs según su estado de desarrollo. Además, determinó que la respuesta eléctrica de la membrana depende de la concentración de FNs, teniendo su mayor efecto utilizando 10^{-8} a 10^{-7} M y estableció que un segundo tratamiento con FNs también depolariza la membrana pero a menor amplitud (desensibilización). En este trabajo, se sugiere que los efectos despolarizantes de los FNs específicos pudieran ser el resultado concertado de la activación de canales y bombas iónicas. Por otra parte, Felle (1995) describió también el fenómeno de desensibilización por el segundo tratamiento con FNs y además reportó que las células epidérmicas responden también a los FNs.

Asimismo, reforzó la noción de que la especificidad estructural del factor Nod es importante en la efectividad de esta respuesta. Por otro lado, Felle (1996) describió que hay una ligera alcalinización citosólica (pHc) de pelos radicales de alfalfa como respuesta a los FNs específicos. Este cambio se mantiene durante la repolarización y se demuestra que la depolarización es un fenómeno transitorio, mientras que la alcalinización es persistente. Se propone que el pHc es uno de los elementos que participan en la transducción de señales en respuesta a los FNs específicos.

El fenómeno de depolarización de la membrana plasmática planteó nuevas interrogantes acerca del papel de los iones en las vías de transducción de señales que pudieran participar en la respuesta vegetal a los FNs. Se ha demostrado (Ehrhardt, *et al.* 1996) que los FNs específicos para alfalfa son capaces de provocar fluctuaciones en los niveles de Ca^{+2} intracelular en pelos radicales y que estos cambios son más prominentes en la zona proximal del núcleo. Se propone entonces que el Ca^{+2} actúa como segundo mensajero en plantas leguminosas. Posteriormente, (Gehring, 1997) describió incrementos de 250 a 2000 nM de Ca^{+2} libre en pelos radicales de *Vigna unguiculata* como respuesta a FNs de *Rhizobium* sp. NGR234; también demostró que los mayores cambios ocurren en la zona apical del pelo y que las células epidérmicas son capaces de responder de manera similar, incrementando su $[\text{Ca}^{+2}]_i$ de 170 a 1250 nM. Sin embargo, no demostró la fuente de Ca^{+2} pero ha sugerido que éste es importado del exterior celular y/o de compartimentos citoplásmicos. A este respecto, se ha demostrado que existe una relación entre las variaciones de $[\text{Ca}^{+2}]_i$ y el flujo de Ca^{+2} en la punta de pelos radicales de *Phaseolus vulgaris*, después del tratamiento con FNs específicos. Este incremento puede elevarse hasta niveles de 1200-1800 nM en los ápices de pelos radicales de frijol expuestos a FNs específicos (Cárdenas, *et al.* 1998). De estos resultados se ha propuesto que el incremento en las concentraciones de Ca^{+2} intracelular a nivel del ápice de los pelos radicales podría ser el resultado del flujo de iones de Ca^{+2} principalmente en esa región, vía canales permeables a Ca^{+2} .

El fenómeno de oscilaciones intracelulares de calcio como respuesta de los FNs se ha denominado *calcium spiking* y se ha sugerido la participación de canales de calcio de reservorios internos del pelo radical, de tal manera que al activarse estos canales, permitirían el flujo pasivo de iones Ca^{+2} hacia el citosol y cuando se cierran, se reactiva alguna vía de reasimilación del calcio en tales reservorios intracelulares (Ehrhardt, *et al.* 1996). Este modelo ha sido respaldado con estudios farmacológicos donde utilizando dosis micromolares de cafeína y 2-Aminoetoxidifenilborato (2-APB, moduladores de canales de calcio tipo receptores de IP_3 operados por ligandos intracelulares) además de ácido ciclopiazónico (CPA, un inhibidor de ATPasas de calcio tipo II) se han obtenido inhibiciones en la respuesta oscilatoria del Ca^{+2} intracelular, sugiriendo la participación de canales de calcio y bombas en la misma (Engstrom, *et al.* 2002). Asimismo, se ha sugerido que el *calcium spiking* y los flujos de calcio son respuestas independientes que podrían estar sobrelapadas (para una revisión, ver Giles, *et al.* 2004). Se sugiere (Pingret, *et al.*, 1998) que el Ca^{+2} actúa como segundo mensajero y que

posiblemente se activa la vía de fosfoinosítidos después de la aplicación de los FNs. Se propone que la elevación en los niveles de Ca^{+2} se debe a un influjo extracelular y/o a liberación de Ca^{+2} de compartimientos intracelulares (v.gr. la vacuola).

En 1998, se propuso un modelo que explica los cambios en las concentraciones intracelulares de diferentes iones, como respuesta a los FNs (Felle, *et al.*, 1998): Cuando los FNs interactúan con su receptor vegetal se activan canales permeables a Ca^{+2} . El influjo de Ca^{+2} podría activar canales aniónicos (p. ej. canales permeables a Cl^-) y depolarizar así la membrana plasmática. Por otra parte, canales de K^+ podrían modular este efecto y repolarizar la membrana. Estos acontecimientos desencadenarían simultáneamente cascadas regulatorias que culminarían con la expresión de genes que participan en la organogénesis del nódulo (figura 10). Por otra parte, se ha estudiado el efecto de las enzimas que degradan pared celular y su interferencia con estas respuestas de señalización (Carden y Felle, 2002).

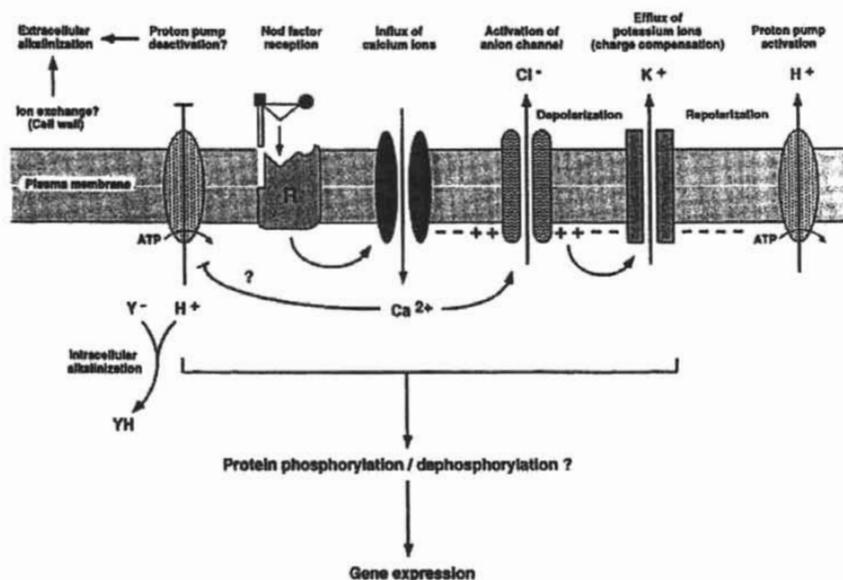


Figura 10. Modelo hipotético de las primeras etapas durante la señalización por FNs. (Tomado de Felle, H.H. *et al.* 1998).

En la **figura 11** se muestra un modelo en el cual se observan las primeras etapas durante la señalización por los FNs en pelos radicales, destacando el papel de los receptores recientemente conocidos. Como se dijo, las primeras respuestas son principalmente flujos iónicos y oscilaciones en los niveles de calcio intracelular. Los receptores para los FNs pertenecen a la familia de receptores tipo cinasa LYK y NORK, codificados por los genes *nfp* y *dmi12* respectivamente (Stracke, *et al.* 2002; Endre, *et al.* 2002; Limpens, *et al.* 2003; Charron, *et al.* 2004). LYK tiene dominios extracelulares tipo LysM que reconocen lipoquitooligosacáridos (Cullimore y Dénarié, 2003; Radutoiu *et al.* 2003). Según Radutoiu *et al.* 2003, el complejo de los receptores para FNs está compuesto por dos miembros de la familia LYK. Por otra parte, se ha propuesto que la proteína DMI1 podría participar en transporte iónico, dada su homología con canales catiónicos dependientes de ligando (Ané *et al.* 2004).

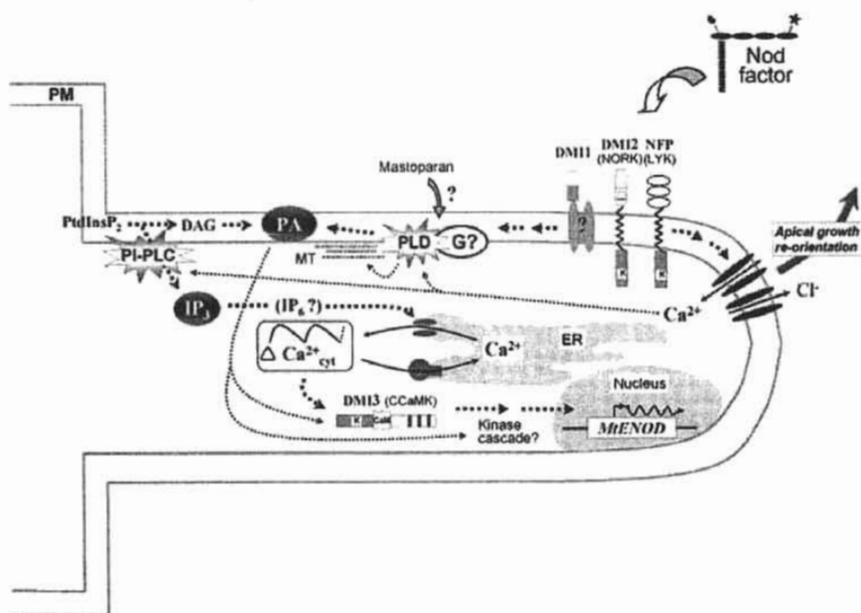


Figura 11. Modelo propuesto para la percepción de las señales de nodulación (FNs) en los pelos radicales. Los factores son percibidos por los receptores-cinasa LYK y NORK. Esta percepción repercute en cambios iónicos mediante activación de canales permeables a calcio y cloro en la membrana plasmática. Estas respuestas continúan con la señalización por fosfolípidos $PIP_2 \rightarrow$ diacilglicerol (DAG) e IP_3 . La consecuencia final sería la activación de genes de nodulinas tempranas como ENOD. Tomado de Charron, *et al.* (2004).

ii. Definición del Problema. Justificación del Proyecto de Investigación.

Los factores de nodulación son las moléculas señal requeridas para la inducción del programa de desarrollo del nódulo (Dénairé, *et al.*, 1996). Por lo tanto, durante la interacción simbiótica entre *Rhizobium* y leguminosas, la acción de los FNs en las plantas hospederas debe involucrar vías de transducción de señales que controlan los procesos de organogénesis del nódulo. Como quedó dicho, los mecanismos por los cuales las plantas perciben y transducen estas señales han sido estudiadas en detalle. Con el objetivo de incrementar nuestro conocimiento de tales procesos y considerando que los canales iónicos en plantas superiores participan en las etapas tempranas de transducción de señales (Ward, *et al.*, 1995) resulta de gran interés el estudio y caracterización del tipo de canales iónicos que pudieran participar en la respuesta simbiótica entre *Rhizobium etli* y *Phaseolus vulgaris*. Aunque se ha sugerido que los flujos iónicos son parte de la señalización por FNs (Bush, 1995; Ward, *et al.*, 1995) y se han detectado flujos iónicos en pelos radicales como respuesta a estas moléculas (Felle, *et al.*, 1998), se han estudiado muy poco los canales iónicos que participan en tales procesos. La información que se obtenga sobre el tipo y propiedades de estos canales, utilizando técnicas electrofisiológicas contribuirá al conocimiento de cómo es regulada la actividad de los mismos en respuesta a señales específicas.

OBJETIVOS

Se ha propuesto que los canales iónicos están participando en la respuesta temprana de los pelos radicales de frijol, en respuesta a los factores de nodulación. Sin embargo, esta hipótesis no ha podido ser demostrada o eliminada por completo. Usando un enfoque de estudio utilizando bicapas planas, aunque no es la técnica más directa para lograrlo, nos da un primer acercamiento al estudio de los canales iónicos en las raíces de frijol.

Los principales objetivos del presente trabajo son:

Describir los tipos de canales iónicos presentes en membranas plasmáticas de raíces de *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa, mediante su registro electrofisiológico en bicapas lipídicas planas. Para ello se plantea obtener una preparación de membranas plasmáticas de raíces de frijol e incorporar estas vesículas en bicapas lipídicas planas y caracterizar las propiedades biofísicas de los canales iónicos reconstituídos (su dependencia de voltaje, conductancia unitaria, selectividad iónica, farmacología).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal y Condiciones de Crecimiento

Se esterilizaron semillas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa mediante inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) al 20% durante 5 min y se lavaron con etanol por 1 min. Las semillas esterilizadas fueron germinadas en charolas de aluminio con papel filtro esterilizado y húmedo.

Aislamiento de Membranas

Durante este estudio se utilizaron dos diferentes métodos de purificación de membranas plasmáticas:

- (i) centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa y
- (ii) partición en dos fases poliméricas acuosas.

Ambos métodos se inician obteniendo un homogenizado de las raíces del frijol de la manera siguiente: después de 4-5 días de la germinación, se cortaron 50 g de raíces completas (5-7 cm) y se homogenizaron en frío con una licuadora en un medio con: manitol 250 mM, EGTA 5 mM, glicerol 10%, PVP-10 000 soluble 5%, KCl 1 mM y Trizma base 30 mM, pH 8. Esta solución cuenta además con un cocktail de inhibidores de proteasas: PMSF 1 mM, MgSO₄ 5mM, K₂S₂O₅ 26 mM, Dibucaina 0.25 mM, Benzamidina 0.1 mM, ácido ε-aminocaproico 1mM. El uso de estos inhibidores asegura que no sean degradadas las proteínas y en sentido específico, la función de los canales iónicos. El homogenizado se filtró a través de gasa clínica y se centrifugó a 20 000 g con tubos para un rotor JA-20 (Beckman Instruments) durante 20 min. Con esta primera centrifugación se elimina el concentrado que consiste principalmente de paredes celulares y núcleos celulares completos. El sobrenadante (suspensión microsomal) se colecta y se centrifuga nuevamente a 100 000 g por una hora en un rotor TY 55.2 o 60 Ti (Beckman Instruments) con la finalidad de concentrar los microsomas (vesículas de membranas diversas). Ahora se descarta el sobrenadante y se resuspende el concentrado microsomal, homogeneizando con un pistilo estéril de vidrio esmerilado (Kimax) de 5 ml, suavemente sin hacer burbujas y en frío. Los microsomas así resuspendidos se transfieren a tubos donde se procede a la separación de las membranas:

(i) para el primer método, la homogenización se realiza en un volumen de 9 ml de medio de suspensión sin burbujas (Tris-MES 6 mM, Glicerol 10%, manitol 250 mM, DTT 2 mM, KCl 1 mM, pH 8.0). Posteriormente, se transfiere este mini-homogeneizado en gradientes discontinuos de sacarosa previamente preparados: sacarosa 16% (w/w) sobre una fase de 9 ml de sacarosa 32% (w/w) y ésta sobre una tercera fase de 9 ml de sacarosa 38% (w/w). Una vez dispuesto cada gradiente de concentración, se procedió a una centrifugación a 23 000 rpm (2 h a 4°C) utilizando un rotor SW28 (Beckman Instruments). Las membranas plasmáticas se concentraron en la interfase (32/38%) y se removieron con una

pipeta Pasteur. Estas membranas se lavaron diluyendolas en medio de suspensión (1 a 10 volúmenes) y se reconcentraron finalmente con una centrifugación a 45 000 g durante 1 hora. Se diluyó el concentrado final en 500-1000 μ l del mismo medio de suspensión. Estas vesículas se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C en alícuotas de 50-100 μ l para ser utilizadas posteriormente en los experimentos con bicapas planas. Este método se aplicó con algunas modificaciones según Vera-Estrella *et al.* (1999).

(ii) para el segundo método, el concentrado microsomal se homogeneizó de manera similar pero este se resuspendió en una solución conteniendo manitol 250 mM, glicerol 10%, KCl 1 mM y Tris-MES 6 mM, pH 8 y se transfirieron 9 g a 27 g del sistema de dos fases. La composición de las dos fases para la separación de las membranas plasmáticas fue de Dextran T-500 5.8% (w/w), PEG 3350 5.8% (w/w) en KCl 5 mM, HEPES-BTP 5 mM, Glucosa 500 mM pH 8. Se mezcló con suavidad y se centrifugó a 1 000 g por 4-5 minutos utilizando un rotor de columpio SW28 (Beckman Instruments) con el fin de facilitar la separación de las 2 fases. La fase superior (rica en PEG) se colectó y se mezcló nuevamente con una fase inferior recién preparada (Dextran), repitiendo este procedimiento hasta 3 veces con la finalidad de enriquecer la preparación de membranas. La fase final (U3) se diluyó en un volumen (1:10) de la solución siguiente: Glucosa 500 mM, HEPES-BTP 20 mM pH 7.4. Finalmente se centrifugó por dos horas a 90 000 g con un rotor Ti 60 (Beckman Instruments) concentrando así las membranas plasmáticas. El último concentrado se resuspendió en 1 ml de Glucosa 500 mM, HEPES-BTP 20 mM, pH 7.4 y se dividieron alícuotas de 10-50 μ l, congelando de inmediato en N_2 líquido. Este método se aplicó con base en el reportado por Davenport y Tester (2000) para raíces de trigo (*Triticum aestivum*). Con el fin de mantener los canales iónicos funcionales, tanto en este método como en el anterior se incluyeron en las soluciones de suspensión finales el cocktail COMPLETE de inhibidores de serín-cisteín- y metaloproteasas para extractos de células vegetales, siguiendo las instrucciones del proveedor (Boehringer-Roche). Con este método se obtienen preferencialmente vesículas orientadas con el exterior hacia fuera (Larsson *et al.*, 1984). Este método fue desarrollado originalmente por Albertsson, P.A. (1958) y su fundamento principal es que las membranas nativas presentan diferentes cargas de superficie según su origen (membrana plasmática, tonoplasto, mitocondrias). Para el empleo de este método es necesario preparar cada solución con mucho cuidado debido a que las concentraciones finales de cada polímero determinan el grado de pureza en la obtención final de membranas plasmáticas. Dado que la preparación de membranas de frijol no fue muy pura, revisamos la literatura tratando de encontrar un método más eficiente y aplicándolo. Widell *et al.* (1982) utilizó una composición bifásica que se compone de 6.3% (w/w) Dextran T-500 y 6.3% (w/w) PEG 4000, 0.25 M sacarosa, 5 mM de buffer de fosfatos, pH 7.8. Otro estudio, esta vez en maíz (*Zea mays* L.) reporta que la preparación del sistema bifásico de entre 5.5 – 6.5% (w/w) es óptima para la obtención de 80-90% de enriquecimiento de membranas plasmáticas (Shimogawara y Usuda, 1993). Para el caso de plantas dicotiledóneas, la más cercanamente relacionada con el frijol es una variedad de haba (*Vigna radiata*)

donde se utilizó un sistema dextran/PEG al 6.2% (Takeda y Kasamo, 2002). En tales casos, para aplicar estos métodos ajustamos las concentraciones de los dos polímeros siguiendo el reporte de Hodges y Mills (1986) mostradas en la Tabla II.

Tabla II^a
Soluciones Stock y procedimiento para preparar el sistema polimérico bifásico

Soluciones Stock	Concentraciones finales deseadas (% w/w) de dextran y PEG (g)					
	5.8	5.9	6.0	6.1	6.2	6.3
1. 20% (w/w) Dextran T500	1.16	1.18	1.20	1.22	1.24	1.26
2. 40% (w/w) PEG 3350	0.58	0.59	0.60	0.61	0.62	0.63

^a Modificada de Hodges y Mills (1986).

Ensayos enzimáticos

Se probaron diferentes enzimas como marcadores de membranas: ATPasa-P sensible a vanadato (100 μM Na_3VO_4) a pH 6.5 (O'Neill, y Spanswick, 1984) (membrana plasmática), ATPasa-V sensible a NO_3^- (50 mM KNO_3) (O'Neill *et al.* 1983) (tonoplasto), ATPasa- $\text{F}_0\text{-F}_1$ sensible a NaN_3 (500 μM) (Randall, *et al.* 1985) y citocromo oxidasa (García-Soto, J. *et al.* 1988) (mitocondria). El grado de pureza de la preparación se estimó entonces mediante el enriquecimiento de estas tres actividades en la fracción final obtenida para la realización de nuestros experimentos.

El fosfato inorgánico liberado (*P_i*) por la actividad hidrolítica de las ATPasas se cuantificó empleando el método de Ames (1966). La reacción se efectuó en un volumen de 200 μl de medio de reacción (MgSO_4 6 mM, KCl 50 mM, MES-BTP 30 mM pH 6.5, Na_2MoO_4 1 mM, ATP-BTP 3 mM pH 6.5) y agregando de 5 a 10 μg de proteína. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el empleo de la técnica de Bradford (1976). Una vez teniendo esta mezcla, se incubó 30 minutos a 37°C y se detiene la reacción agregando 800 μl de solución Ames recién preparada (ácido ascórbico 10% y 0.42% de $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ en H_2SO_4 [1:6] [v/v]), incubando durante 30 minutos a 37°C. La cuantificación final del fosfato liberado se realiza calibrando primero una curva de fosfatos con una solución de KH_2PO_4 y posteriormente leyendo en un espectrofotómetro a una λ de 820 nm.

Bicapas Lipídicas Planas y Reconstitución de Canales Iónicos

Las bicapas lipídicas planas se pintaron en el orificio de 0.3 mm en una cubeta de estireno con una dispersión de diftaoil-fosfatidilcolina al 20% en *n*-decano (dyphiPC, Avanti Polar Lipids, Pelham, Ala., USA). Para lograr formar una bicapa nueva cada vez se utilizó un pistilo de plástico o vidrio pasado por etanol y embebido en lípidos recién descongelados. De esta manera se acercó la punta del

pistilo al orificio y se pasaba varias veces hasta que se formaba la bicapa. La capacitancia membranal de las bicapas se monitoreó constantemente. La incorporación de los canales iónicos se consiguió adicionando las vesículas obtenidas a la cubeta conectada a la tierra de referencia (lado *cis*, ver figura 12). Una vez que se detectó actividad de canales iónicos, se evitó mayor número de incorporaciones mediante la perfusión de la solución en el lado *cis* con 10 volúmenes de la solución experimental.

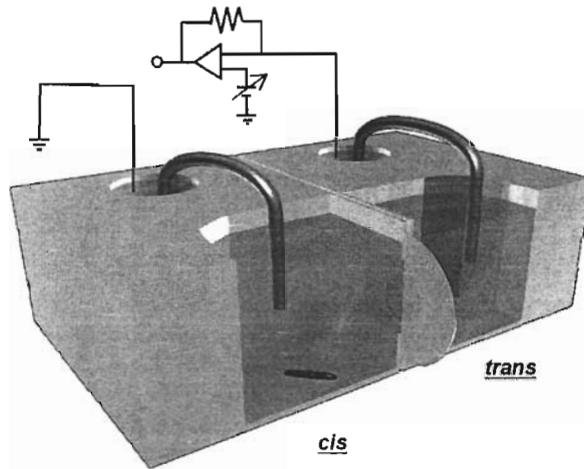


Figura 12. Cámara de registro para bicapas planas. La solución *cis* (4 ml) está conectada a la tierra en nuestro set de registro, aquí es donde se adicionan las vesículas membranales y se prefunden las soluciones experimentales. El sistema cuenta con un miniagitador magnético. La solución *trans* (4 ml) está conectada al cabezal del amplificador operacional. Ambas soluciones están conectadas mediante puentes de agar-KCl 2 M a una solución de KCl 2 M.

A partir de las vesículas de membrana plasmática obtenidas, se efectuaron 250 experimentos de reconstitución en bicapas lipídicas planas, según el método de Mueller, y cols. (1962). De estos experimentos, solamente 100 fueron considerados completos y 25 constituyen los resultados aquí presentados (~2 200 segundos de registros de canales unitarios analizados). Las soluciones de registro más utilizadas se denominarán *cisK* (300mM KCl, 10mM CaCl₂ en *cis* y 150mM KCl, 1mM CaCl₂ en *trans*) o *cisNa* (300mM NaCl, 10mM CaCl₂ en *cis* y 150mM KCl, 1mM CaCl₂ en *trans*). Cada una de estas soluciones se ajustó a pH 7.2 con HEPES 10 mM. Con este sistema de registro se llenaron las cubetas con 4 ml de cada solución correspondiente. Una vez obtenida una bicapa estable (con una $R \sim 10^8 \Omega/\text{cm}^2$) y cuantificada la capacitancia membranal ($\sim 0.6 \pm 0.2 \mu\text{F} / \text{cm}^2$) se procedió a adicionar en el lado *cis* 1 - 10 μl (5-100 μg proteína/ml) de la solución con las vesículas membranales, siguiendo los métodos reportados (Miller, 1986; Darszon, 1986; Cohen, *et al.* 1980).

Una vez obtenida una fusión apropiada, se observa un salto en la corriente registrada en el osciloscopio si es que la(s) vesícula(s) fusionadas portaban canales iónicos que permitan el flujo de iones entre uno y otro lado de la membrana y por tanto una corriente cuantificable. Sin embargo, esta es otra etapa en donde se descartaron muchos experimentos debido a que la mayoría de los fenómenos de fusión muchas veces desestabilizan o rompen la membrana preformada. Si por el contrario la fusión era óptima y se obtenía un registro unitario con saltos discretos en la corriente, entonces se tenía evidencia de la reconstitución de un canal iónico y se efectuaron los experimentos (**figura 13**). Si la bicapa conservó su estabilidad y capacitancia originales, se procedió a la caracterización de la actividad del canal iónico reconstituido, su permeabilidad a diferentes iones γ_0 su farmacología.

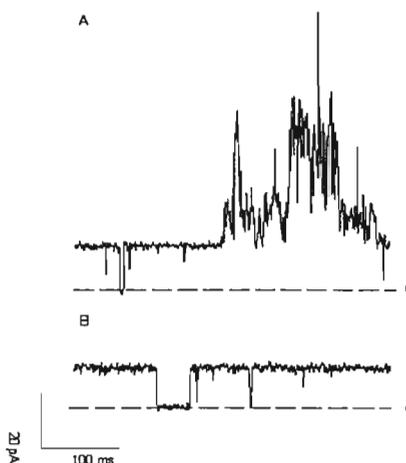


Figura 13. Ejemplos de dos registros obtenidos independientemente durante los experimentos de reconstitución en bicapas planas. En (A) se observa un registro inestable debido probablemente a posteriores incorporaciones de canales iónicos. En (B) se observa un registro estable de canal unitario con saltos discretos en la corriente. El estado cerrado (c) se muestra con una línea. Trazos a +60 mV.

Registro de Canales Unitarios y Análisis de Datos

Las corrientes fueron registradas con un amplificador Axopatch 1-D (Axon Instruments, Foster City, CA, USA), conectado al lado *trans* de la bicapa mediante un puente salino de KCl 2M-agar. El lado *cis* (el lado donde se adicionan las vesículas) se encuentra conectado a tierra. Los registros unitarios se grabaron directamente de la salida del amplificador (Scaled Output) hacia la videograbadora mediante un convertidor digital VR-10B (Instrutech Corp., USA) y se monitorearon en el osciloscopio. Los registros fueron filtrados a 20kHz y se digitalizaron a 50 KHz (20 μ s por punto). El análisis de los trazos se efectuó con el programa PCLAMP 8.0. La selectividad para cationes monovalentes se determinó en condiciones bi-iónicas substituyendo K⁺ por Na⁺ o NH₄⁺ en la solución *cis*. La relación de permeabilidad P_{cat}/P_K se calculó utilizando la ecuación de Goldman:

$$P_X/P_K = ([K^+ trans]/[X^+ cis]) \exp^{(E_{rev}F/RT)} \quad \text{ec. 2}$$

donde P_{cat} y P_K representan las permeabilidades para cationes de prueba y para el K⁺ respectivamente, R , T y F tienen los valores conocidos. A una temperatura de 25°C, el valor de este coeficiente es de 25.69 mV. Las conductancias relativas se calcularon midiendo la pendiente de las relaciones I-V para los cationes de prueba (γ_{cat}) y normalizando el valor de su pendiente con el obtenido con K⁺ en la solución *cis*.

RESULTADOS

Aislamiento de vesículas de membrana plasmática. Las vesículas membranales se purificaron principalmente siguiendo el método reportado por Davenport, *et al.* (2000). El efecto de inhibidores específicos sobre la actividad de las diferentes ATPasas y *cyt-c* oxidasa en la preparación se muestran en la **Tabla III**.

Tabla III
Actividades de ATPasas en las diferentes fracciones membranales

Fracciones Membranales	Total	$\mu\text{molPi/mg/h}$ (% enriq.)		
		Inhibición con 100 μM Van	Inhibición con 50mM NO ₃	Inhibición con 0.5mM NaN ₃
Microsomas	32.4 \pm 3.4	22.5 \pm 2.5	25.7 \pm 3.2	30.3 \pm 2.6
MP (U3)	17.8 \pm 4.5	8.3 \pm 2.8 (~53.4)	10.7 \pm 3.2 (~39.9)	17.4 \pm 3.3 (~2.2)
<i>Cyt-c oxidasa (nmol/mg/min)*</i>				
	Prot. (mg)	Basal	+NaN ₃ (10 mM)	(% enriq.)
Microsomas	6.65 \pm 0.4	113.3 \pm 2.1	48.2 \pm 1.4	
MP (U3)	0.28 \pm 0.1	3.4 \pm 0.1	3.32 \pm 0.0	(~2.35)

n = 3

U3: Fracción superior del gradiente bifásico Dextrán-PEG (ver Materiales y Métodos).

* Cuantificación según, J. García-Soto, *et al.* Biochim. Biophys. Acta (1988). 994: 1–12.

Registros unitarios de un canal permeable a cloro de raíces de frijol. Uno de los canales observados con mayor frecuencia correspondió a un canal permeable a cloro. La **figura 14** muestra registros unitarios de este canal a 0 y +40 mV, donde la probabilidad de apertura (P_o , ver abajo) es muy elevada. A 0 mV la corriente es positiva, lo cual puede ser resultado de un flujo pasivo de cationes desde el lado *trans* hacia el *cis* o bien, por el paso de aniones en la dirección contraria (*cis* hacia *trans*). Considerando la composición de las soluciones experimentales (*cis*:K:*trans*:K), la polaridad de la corriente indica que a un potencial de 0 mV el flujo es aniónico (Cl⁻) desde *cis* hacia *trans*. Esto demuestra que el canal incorporado es permeable a iones Cl⁻.

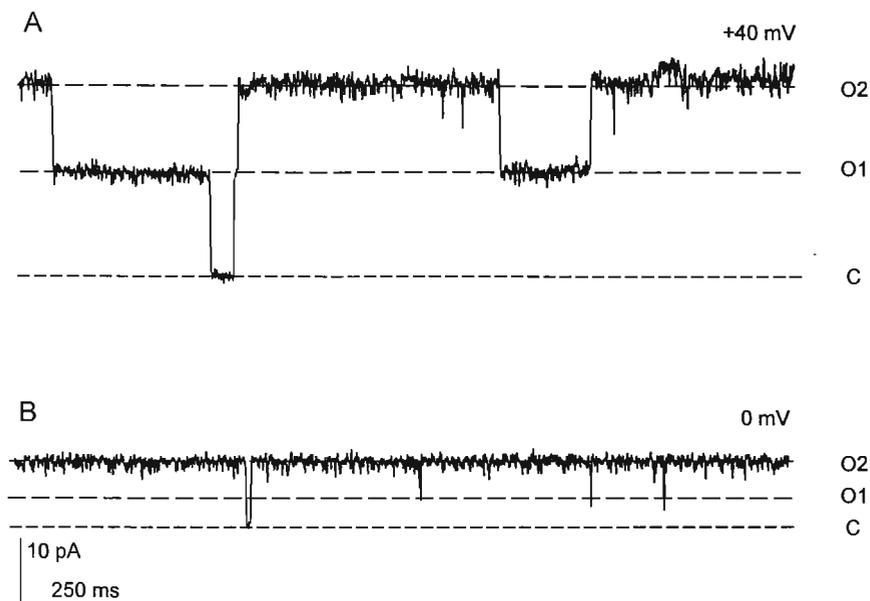


Figura 14. Trazos a dos diferentes potenciales del canal de cloro incorporado en bicapas planas. (A) Corriente observada a +40 mV (ver Materiales y Métodos). Se observan fluctuaciones entre dos subestados de alta conductancia llamados o1 y o2 y un estado cerrado (c). (B) corriente a 0 mV. Condiciones de registro: *cis* (mM): 300 KCl, 10 CaCl₂ y *trans* (mM): 150 KCl, 1 CaCl₂. Se amortiguó con 10 Hepes, a pH 7.2 en ambos lados. Los trazos están filtrados a 20 kHz.

La corriente a través de este canal fluctúa entre tres subestados principales: **C** (cerrado), **O1** (subestado abierto de baja conductancia; $\gamma = 293$ pS) y **O2** (subestado abierto de alta conductancia; $\gamma = 570$ pS). Sin embargo, el canal permanece cerrado casi todo el tiempo a voltajes negativos (**figura 15A**). Estos resultados son más evidentes cuando se observan en conjunto los histogramas de amplitud a cada voltaje (**figura 15B**). Asimismo, para descartar que estos registros correspondieran a 2 canales incorporados con la misma conductancia, presentamos en la **figura 16** trazos a +20 mV en la solución *cisNa* donde se observa claramente que a este voltaje las transiciones preferencialmente son entre el estado C y el O1, sin embargo se presentan transiciones al estado O2 a partir de O1 e incluso desde C. Adicionalmente, se puede observar una característica común en este canal y es que presenta períodos de tiempo muy largos de inactividad.

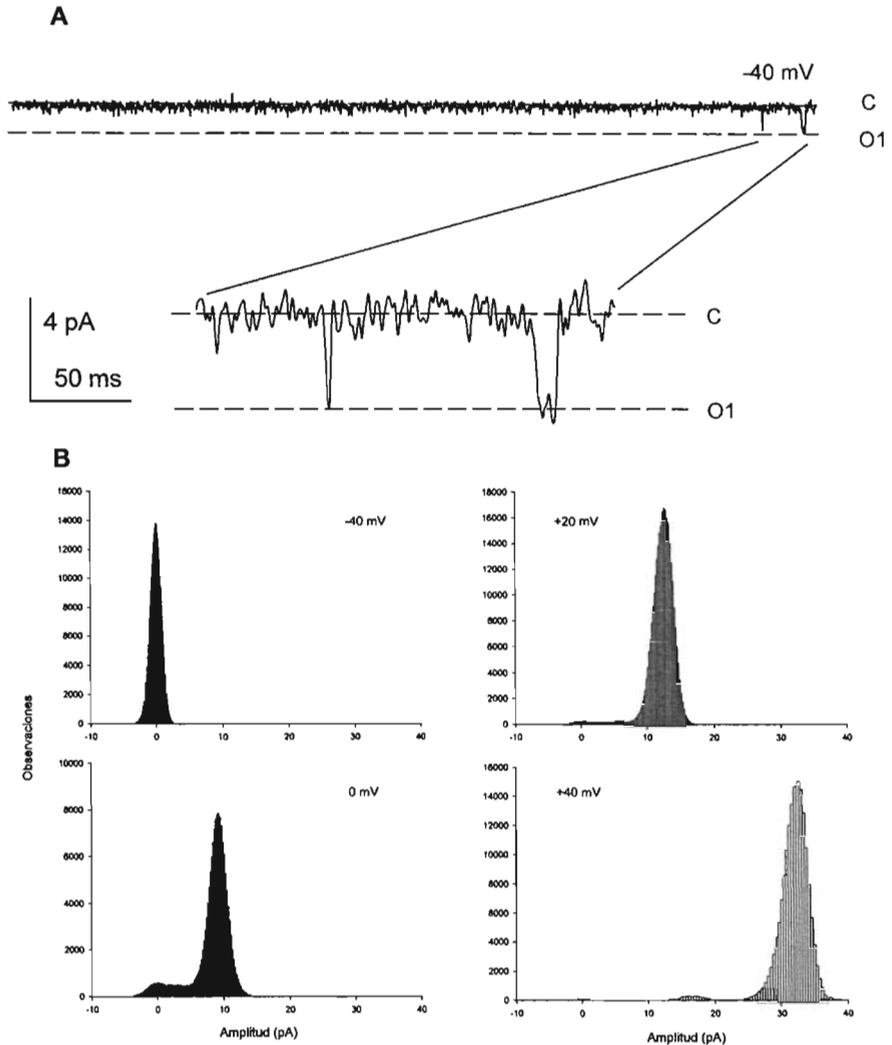


Figura 15. (A) Trazos a -40 mV del canal de cloro incorporado en bicapas planas. La mayor parte del tiempo, el canal se encuentra cerrado (c). Las aperturas al nivel O1 son muy raras. Condiciones como en la figura 14. El panel inferior muestra una amplificación del trazo para observar con mayor claridad las transiciones al subestado O1. **(B)** Histogramas de amplitud de todos los puntos a los voltajes señalados, correspondientes al canal aniónico en la solución control (*cisK*).

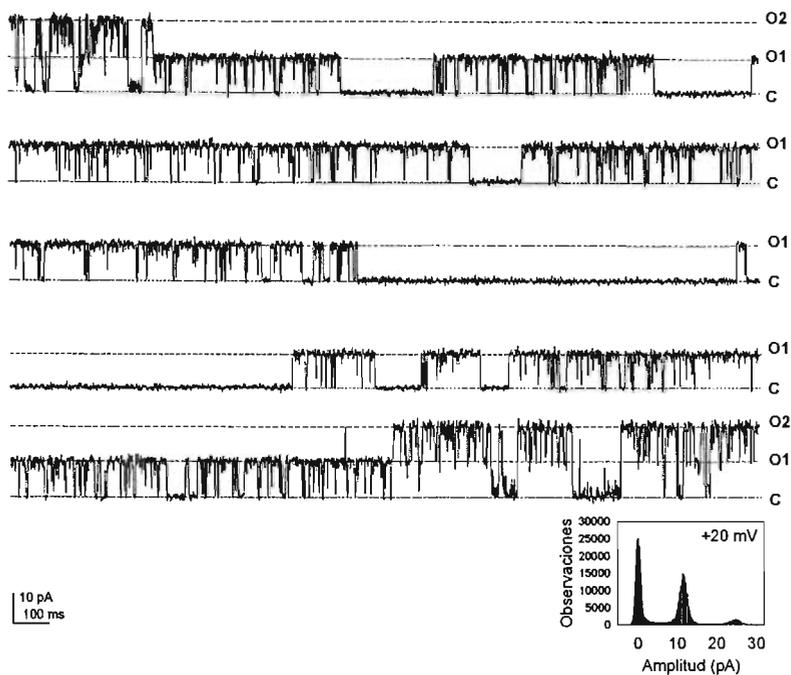


Figura 16. Trazos a +20 mV del canal de cloro incorporado en bicapas planas. La mayor parte del tiempo, el canal se encuentra en el subestado O1. Las aperturas al nivel O2 son menos frecuentes. El canal presenta también períodos de tiempo muy largos (hasta > 1 seg) de inactividad (subestado C). Estas características se presentaron tanto en soluciones *cisK* como *cisNa*. El panel inferior muestra el histograma de amplitud de todos los puntos al voltaje señalado, correspondientes a registros del canal en la solución *cisNa*.

Considerando las condiciones iónicas originales (*cisK:transK*) y una vez digitalizados los resultados de 5 experimentos, se pudo elaborar una curva de la relación corriente-voltaje donde el valor del potencial en el que la corriente vale cero (potencial de equilibrio electroquímico) es cercano al valor calculado mediante la ecuación de Nernst para el cloro:

$$E_{Cl} = RT/F \ln (Cl)_{trans}/(Cl)_{cis} \quad \text{ec. 3}$$

Este valor es de -19.5 mV y corresponde muy cercanamente al potencial observado experimentalmente para O1 de -23.2 mV para la condición (*cisK:transK*). Para confirmar tal resultado, se efectuaron perfusiones del lado *cis*, sustituyendo el cation K^+ por Na^+ (*cisNa:transK*) y se trazó una nueva curva de relación corriente voltaje (curva *I/V*) en la cual se observa que con el ajuste utilizando mínimos cuadrados se obtiene un potencial de equilibrio de -18.2 mV (figura 17), el cual también es cercano al potencial de equilibrio del cloro. Con esto se demuestra que el canal reconstituido excluye el paso de cationes monovalentes (K^+ , Na^+ , $E_{K^+} = +17.81$ mV) y divalentes (Ca^{+2} , $E_{Ca^{+2}} = +29.58$ mV), permitiendo el flujo selectivo de cloro en las condiciones ensayadas.

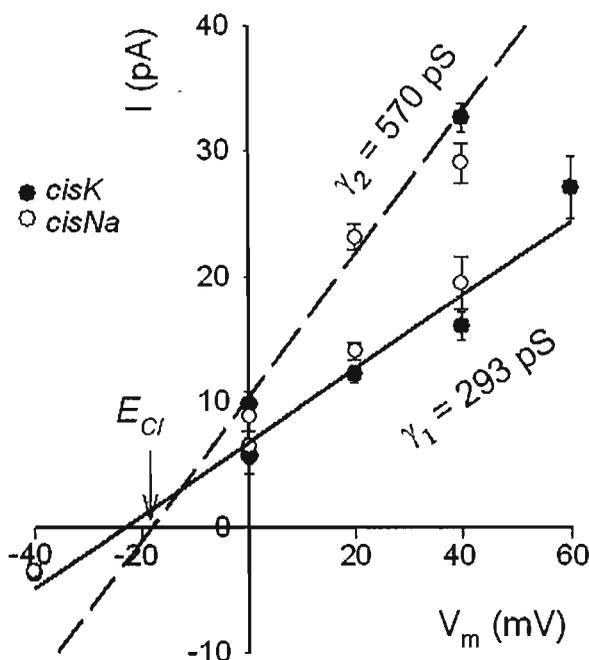


Figura 17. Relación corriente-voltaje en las dos condiciones iónicas estudiadas: solución *cis*, 300 mM KCl (\bullet , $n = 5$) ó NaCl 300 mM (\circ , $n = 4$). La flecha indica el valor teórico del potencial de Nernst para el cloro ($E_{Cl^-} = -19.5$ mV). Independientemente del cation principal en *cis*, el canal presenta dos subestados de alta conductancia: 293 pS (O1, línea continua) y 570 pS (O2, línea discontinua). Los ajustes son para ambas condiciones (*cisK* y *cisNa*).

Otra característica estudiada en este canal es su dependencia al voltaje y su probabilidad de apertura elevada a potenciales positivos. Analizando los trazos a los diferentes voltajes aplicados, se observa que este canal principalmente permanece activo a potenciales > 0 mV y que a potenciales < 0 mV las aperturas son muy breves y dispersas durante el registro. Como se muestra (**figura 18**), la probabilidad de encontrar este canal abierto a potenciales > 0 mV fluctúa entre 0.7 y 0.85. Por otra parte, se analizó la dependencia de voltaje de la probabilidad de apertura para los dos subestados O1 y O2. En 3 experimentos independientes se observaron fluctuaciones entre los subestados C y O1 durante 60 seg. Se observa que a 0 y +20 mV es más probable encontrar al canal en O2 pero a +40 mV esto se invierte, encontrando al canal preferentemente en O1 (**figura 19**). La P_o a voltajes negativos es prácticamente 0, por lo que no se incluyó en este análisis.

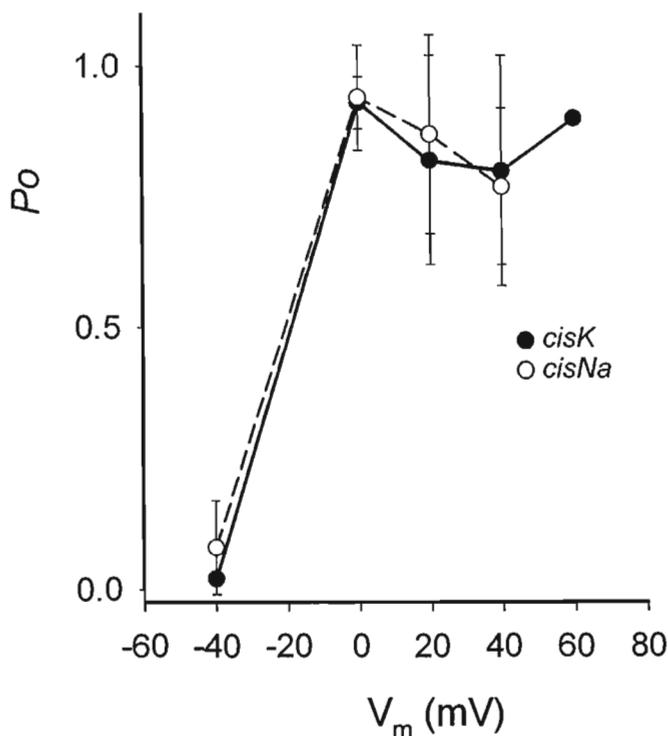


Figura 18. Probabilidad de apertura (P_o) como función del potencial aplicado; la P_o se determinó como la fracción del tiempo durante el cual el canal permanece abierto al potencial indicado. Las curvas correspondientes a experimentos en soluciones *cisK* y *cisNa* prácticamente sobrelapan.

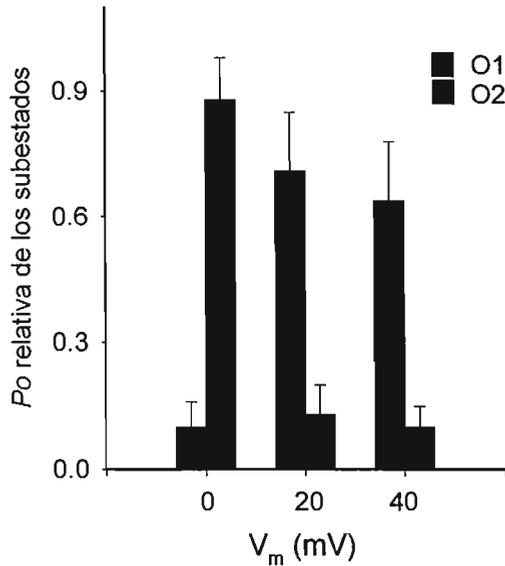


Figura 19. Distribución relativa de los subestados de conductancia a diferentes voltajes. Los subestados O1 y O2. A voltajes de 0 mV el canal se encuentra preferencialmente en O2, mientras que a +20 y +40 mV, se encuentra en O1.

Analizando los registros en los que se presentó el subestado O1, se calcularon las distribuciones de tiempos de permanencia entre el estado O1 y el C. Los resultados de este análisis se muestran en la **figura 20**, donde la distribución de los tiempos de permanencia en el subestado O1 se ajusta bien a una suma de dos exponenciales. Por otra parte, la distribución de los tiempos de permanencia en el subestado C también se ajusta a la suma de dos exponenciales. De esta manera, este canal fluctúa entre dos estados cinéticos O1, donde uno de ellos es muy largo en tiempo ($\tau = 19 \pm 0.2$ ms) y el otro más corto ($\tau = 1.6 \pm 0.3$ ms) con transiciones al subestado C que pueden ser muy breves ($\tau = 0.5 \pm 0.2$ ms) o mas largas ($\tau = 4.8 \pm 2.5$ ms).

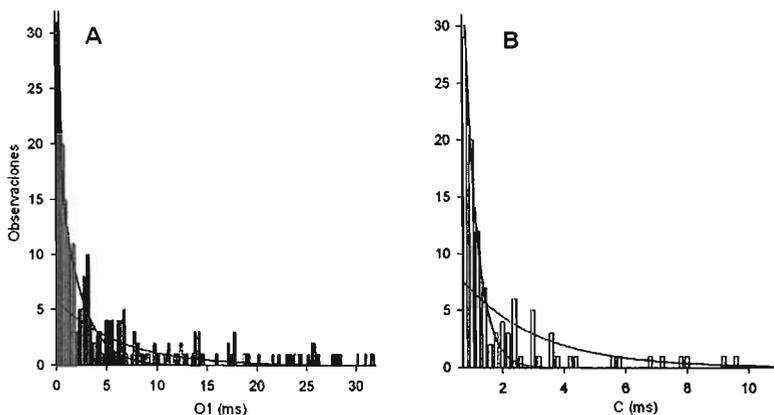


Figura 20. Distribución de los tiempos de permanencia en los estados cerrado (C) y abierto (O1). (A) Distribución del subestado O1. El ajuste de los datos se realizó mediante la suma de 2 exponenciales decrecientes (líneas) con las constantes de tiempo siguientes: $\tau_1 = 1.6$ ms y $\tau_2 = 19$ ms; los valores de amplitud para cada exponencial fueron: $A_1 = 6$ y $A_2 = 101$ eventos. (B) Distribución de los tiempos de permanencia en el subestado cerrado. Aquí también los datos se ajustaron a la suma de dos exponenciales negativas con $\tau_1 = 0.5$ ms y $\tau_2 = 4.8$ ms; amplitudes $A_1 = 8$ y $A_2 = 43$ eventos. Estos histogramas se obtuvieron de un registro de 1-min a +20 mV en la solución de registro control; 300 mM KCl (*cis*); 150 mM KCl (*trans*).

Adicionalmente, observamos que la actividad de este canal presenta fluctuaciones de corriente con dos modos de *gating* a un mismo potencial. En la **figura 21** se observa que a 0 mV el canal puede presentar una cinética con elevada probabilidad de apertura y con cierres muy breves o mas largos (*ver arriba*) pero por otro lado, se observaron también trazos que presentaban *flickering* (parpadeo). Este tipo de registro fue raro y se presentó solamente en 2 experimentos, por lo que no fue analizado a fondo y solamente se muestran trazos representativos y los histogramas de amplitud correspondientes. Por otra parte y considerando la elevada conductancia de este canal, se realizaron experimentos en los cuales se intentó cambiar el anión permeable cloro por otros iones más grandes: gluconato, nitrato y malato para estudiar la permeabilidad a otros aniones. Desafortunadamente, ninguno de estos experimentos se realizó con éxito y no se tienen datos al respecto.

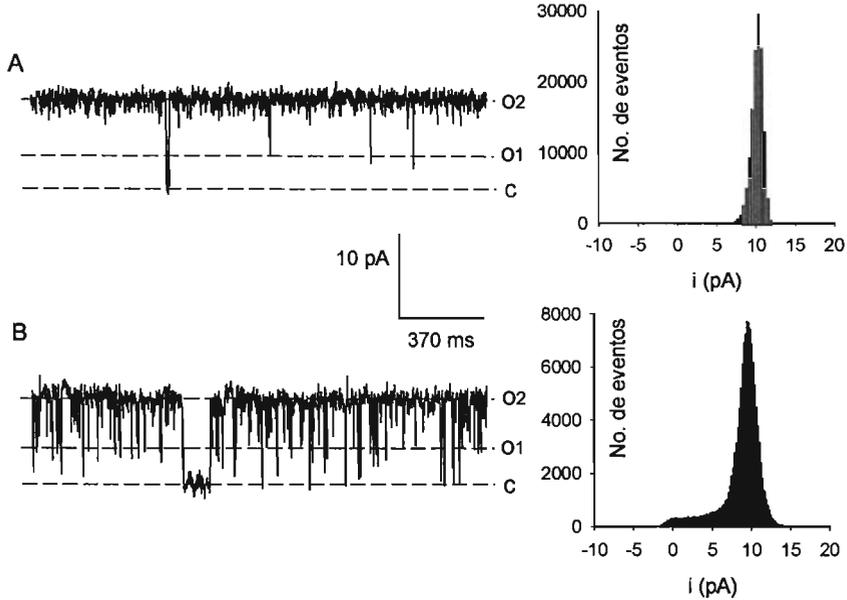


Figura 21. Dos diferentes comportamientos cinéticos del canal de cloro incorporado en bicapas planas. (A) Corriente unitaria a 0 mV donde se observan pocas transiciones entre los subestados O2, O1 y C. (B) Corriente unitaria a 0 mV donde se observa *flickering* y múltiples transiciones entre los tres subestados. En ambos casos se muestran los histogramas de amplitud. Condiciones experimentales: *cisK-transK* (ver figura 14). Filtrado, 20 kHz.

Possible binomial distribution of the substates. El modelo dimérico del canal CIC-0 de *Torpedo marmorata* indica que el canal es un complejo proteico formado por dos "protocanales" idénticos y físicamente independientes, de tal manera que el canal fluctúa entre dos estados abiertos (U, M) y uno cerrado (D), ajustándose su distribución binomialmente. Incluso la estructura tridimensional para este tipo de canales ya se conoce (Dutzler *et al.* 2002, para revisión ver Maduke *et al.* 2000). Teniendo esto en mente, analizamos la distribución de los subestados y el posible ajuste binomial del modelo del *gating* dimérico (Miller, 1982). La **Tabla IV** muestra la distribución de las fluctuaciones de cada subestado a diferentes voltajes. De estos resultados se puede observar que los subestados no se distribuyen binomialmente:

$$f_C = (1-p)^2 \quad f_{O1} = 2p(1-p) \quad f_{O2} = p^2$$

donde f es la frecuencia de los 3 subestados (C, O1, O2) y p es la probabilidad de encontrar el canal en alguno de los 2 subestados abiertos (O1, O2) y se define como $p = (f_{O1} + 2f_{O2})/2$. Por tanto el modelo dimérico probado en los canales de la familia CIC no se aplica para este canal.

Tabla IV
Análisis de las fluctuaciones entre los subestados O1 y O2

Potencial aplicado Valores medidos	C	Subestado O1	O2
0 mV			
<i>f</i>	0.00377	0.00143	0.99480
<i>I</i> (pA)	0	6.3	10.6
+20 mV			
<i>f</i>	0.01139	0.98860	0.00000
<i>I</i> (pA)	0	14.8	28.3
+40 mV			
<i>f</i>	0.00618 (0.148)	0.75676 (0.473)	0.23706 (0.379)
<i>I</i> (pA)	0	17.1	33.0

Esta tabla presenta un análisis de los datos de canal unitario a tres diferentes voltajes experimentales. El registro unitario correspondiente a +40 mV, (K:K; pH 7.2) fue sometido a un análisis estadístico debido a que presenta transiciones claras entre los dos subestados O1 y O2. La probabilidad del estado abierto del canal (*p*) se midió a partir de las frecuencias (*f*) de los subestados según la expresión: $p = (f_{O1} + 2f_{O2})/2$. Este valor se utilizó para calcular las frecuencias de los subestados predichas por la distribución binomial (valores en negritas).

Inhibición con iones Zn⁺². Farmacológicamente los canales aniónicos pueden inhibirse con diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos, tales como el DIDS (Ac. 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico), SITS (Ac. 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico), 9-AC (Ac. Antraceno-9-carboxílico), Ac. niflúmico, iones metálicos como el Zn⁺² y el Cd⁺² (Jentsch, *et al.* 2002). Para estudiar el posible efecto inhibitorio de este ion (zinc), se utilizó una concentración de 100 μM de ZnCl₂ primero en *cis* y luego en *trans*. Se observa inhibición completa en la actividad de este canal cuando tiene zinc a ambos lados de la bicapa (**figura 22**), sin detectar transiciones durante los 60 seg. que duró el registro. Este efecto es reversible ya que el lavado con la solución original (*cisK*) permitió la recuperación del 80% de la corriente original. Los histogramas de amplitud muestran con mayor claridad el efecto observado durante este experimento (**figura 23**).

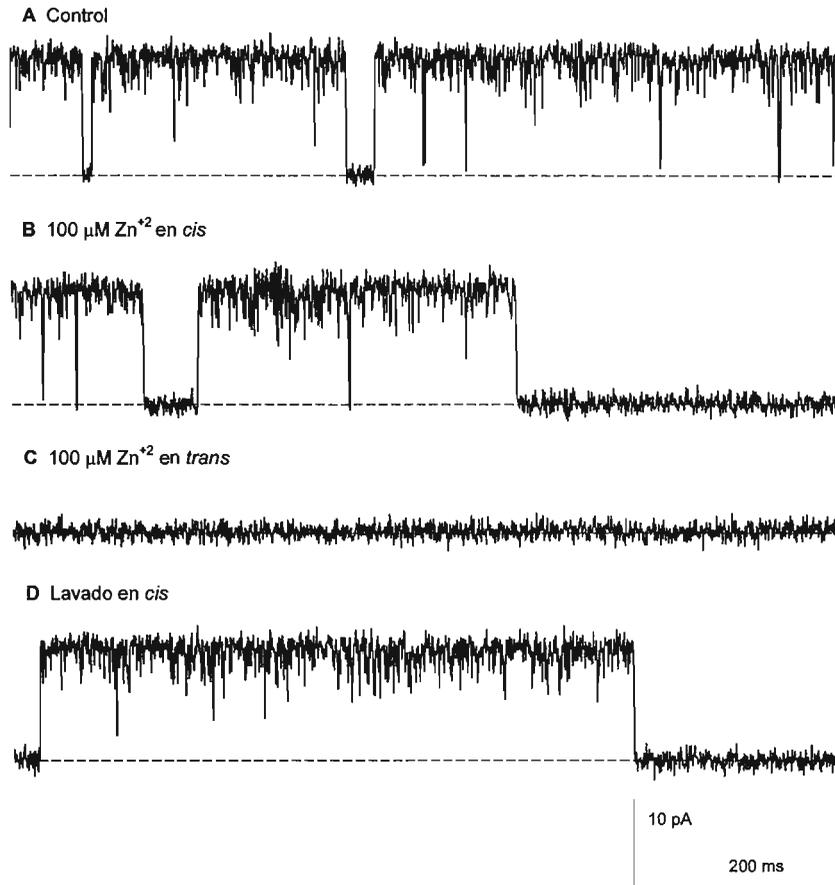


Figura 22. Inhibición del canal de cloro por Zn^{+2} . (A) Corrientes control a +20 mV. (B) Aplicación de $ZnCl_2$ a una concentración de 100 μM en el lado *cis*. En presencia de Zn^{+2} , el canal reduce su P_o . (C) Aplicación de $ZnCl_2$ 100 μM en el lado *trans*, el canal reduce su P_o a 0. (D) Recuperación de la corriente después del lavado de la solución en *cis*. Condiciones experimentales: *cisK-transK*.

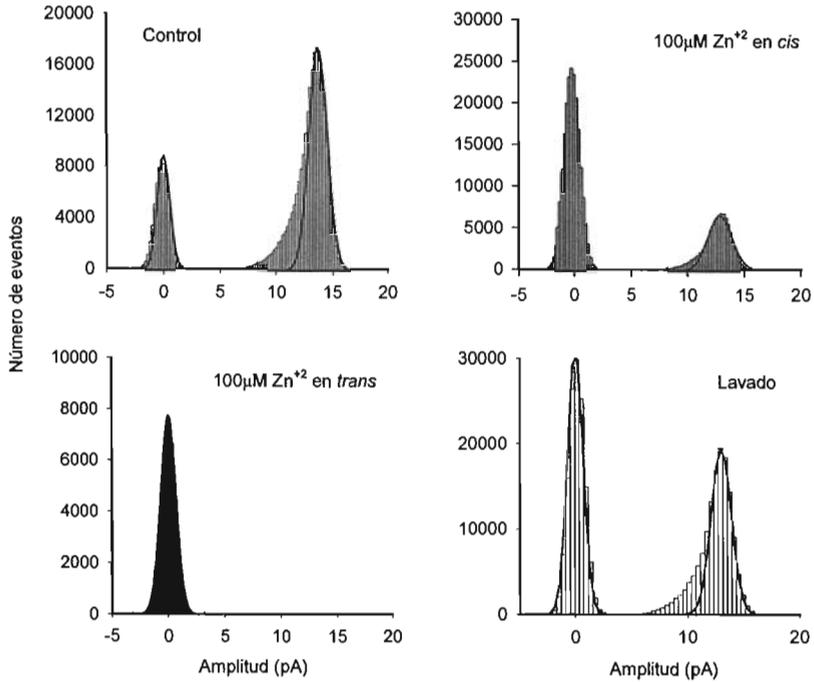
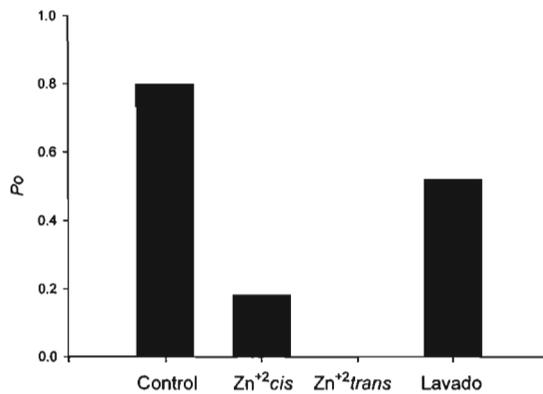
A**B**

Figura 23. (A) Histogramas de amplitud que muestran la inhibición por zinc sobre el canal aniónico y la reversibilidad de su efecto. **(B)** Probabilidad de apertura del canal en las cuatro condiciones estudiadas.

Registros unitarios de canales catiónicos de raíces de frijol. Además del canal de cloro previamente descrito (Balleza, *et al.* 2003), se obtuvieron registros correspondientes a un canal catiónico. Las condiciones iónicas utilizadas fueron las mismas (*ver* Materiales y Métodos) debido a que el objetivo inicial era seguir estudiando el canal de cloro. En el caso de este canal catiónico dependiente de voltaje, los registros se caracterizan por presentar transiciones a un solo nivel de conductancia. Es permeable a K^+ , Na^+ y NH_4^+ ; lo que implica que es un canal catiónico poco selectivo. Además, se probó su sensibilidad al bloqueador de canales de potasio TEA, sin observar efecto significativo de bloqueo en este canal.

El registro unitario de este canal se muestra en la **figura 24**. Como se dijo, este canal es dependiente de voltaje y las transiciones se observan a voltajes negativos. Considerando tales condiciones iónicas, los trazos observados a 0 mV, indican un flujo de cationes desde el lado *cis* hacia el *trans*. El canal presenta un solo nivel de conductancia (~213 pS) aunque muy rara vez se observan transiciones a un segundo nivel, preferentemente a voltajes negativos elevados (*v.gr.* -60 mV) ($n = 14$). En la **figura 25** se muestran los histogramas de amplitud correspondientes a este canal en algunos voltajes representativos. En las condiciones experimentales originales (*cisK:transK*, KCl 300 mM: KCl 150 mM) el potencial de equilibrio para el ion potasio (E_K^+) tiene un valor de +17.8 mV y este valor es cercano al potencial reverso observado en nuestros experimentos (~16.96 mV) (**figura 26**). Sin embargo, analizando la probabilidad de apertura (P_o) de este canal a potenciales positivos, se observan transiciones extremadamente escasas con una $P_o \sim 0.0$ (*ver* abajo) por lo que no se consideraron en los ajustes. Estos datos se pueden observar más adelante en la **Tabla V**. La probabilidad de apertura en presencia de soluciones de potasio se muestra en la **figura 27**.

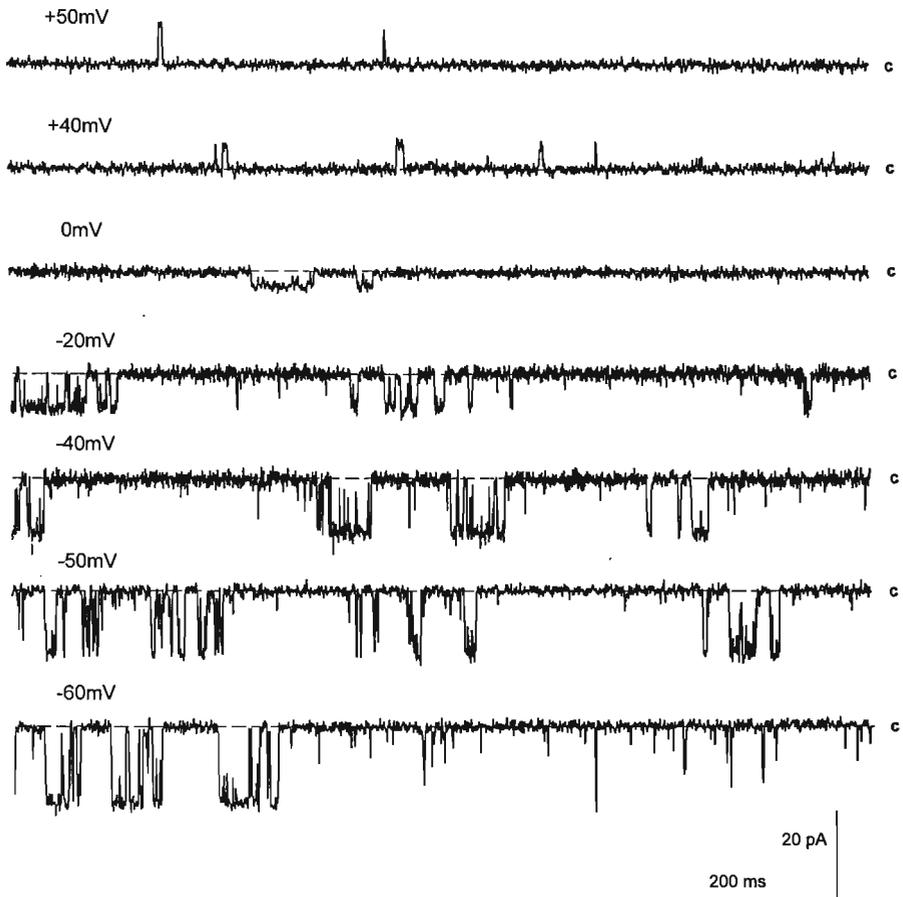


Figura 24. Registro unitario de un canal catiónico incorporado en bicapas lipídicas en las condiciones (*cisK:transK*), se muestran trazos a los potenciales indicados. Las líneas punteadas representan el estado cerrado del canal. Condiciones de registro *cisK*, *cis* (mM): 300 KCl, 10 CaCl₂ y *transK* (mM): 150 KCl, 1 CaCl₂. Se amortiguó con 10 Hepes, a pH 7.2, en ambos lados. Los trazos están filtrados a 20 kHz.

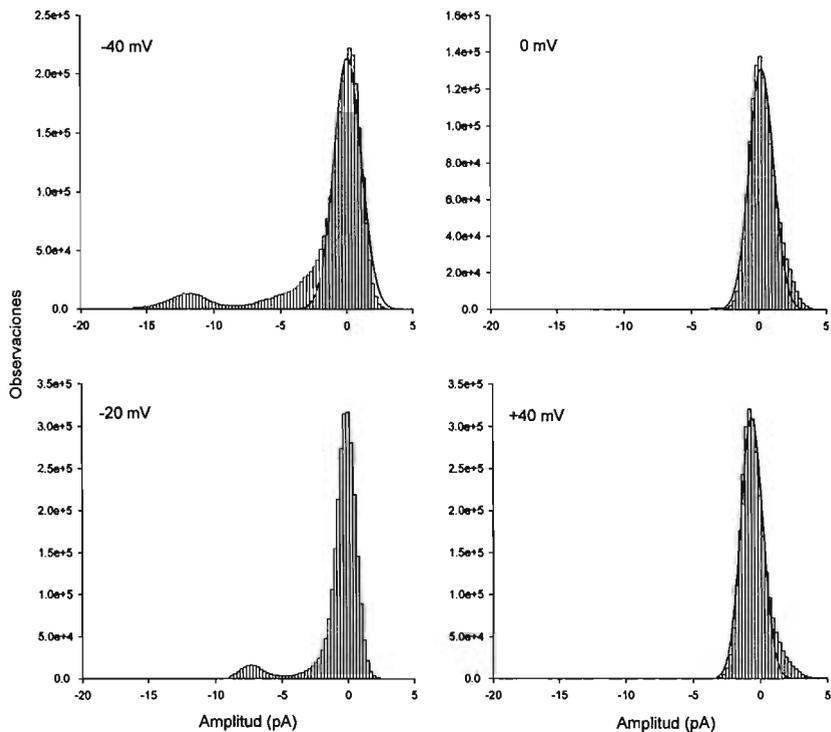


Figura 25. Histogramas de amplitud que muestran las distribuciones de los picos de amplitud en cuatro voltajes diferentes correspondientes al canal catiónico incorporado en bicapas lipídicas. Condiciones: (*cisK:transK*).

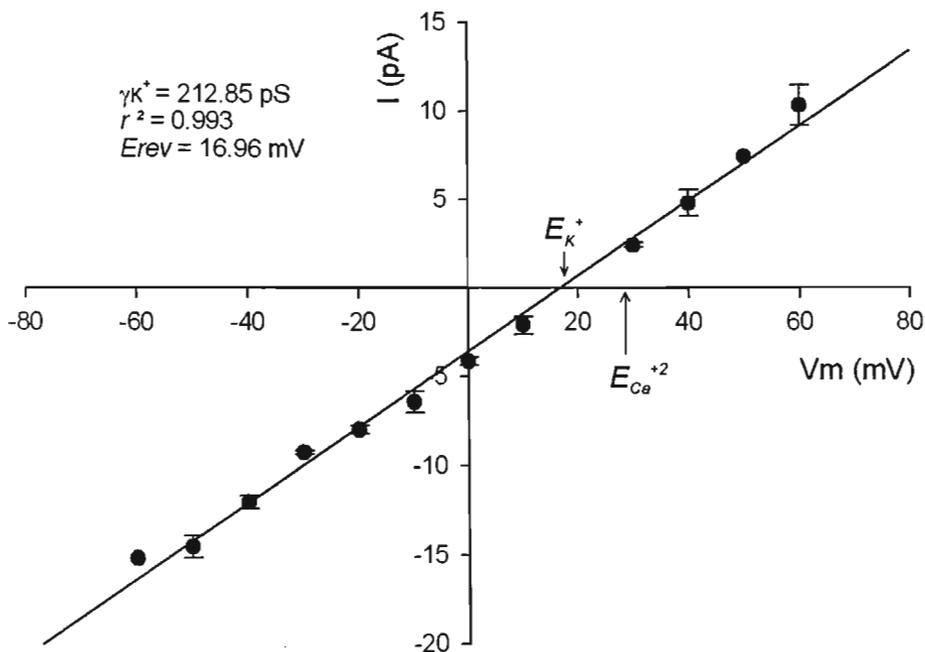


Figura 26. Relación corriente-voltaje (experimentos, $n = 14$). Condiciones: (*cisK:transK*). La gráfica presenta un ajuste con mínimos cuadrados considerando los puntos a cada voltaje empleado. El potencial de inversión tiene un valor de 16.96 mV. Se muestran los potenciales de inversión de los cationes presentes.

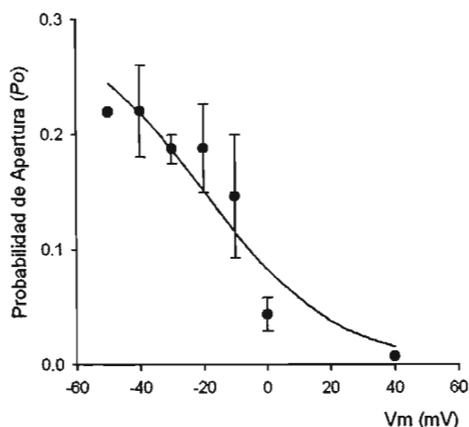


Figura 27. Probabilidad de apertura (\pm e.s.m.) del canal catiónico en presencia de soluciones de control de potasio (*cisK*). El ajuste con la ecuación de Boltzmann: $P_o = P_{max}/(1+\exp(-z(V_{1/2}-V_m)F/RT))$ tiene una $P_{max} = 0.3$, $V_{1/2} = -20$ mV y $z = 1.2$.

Tabla V
Valores de potenciales reversos y conductancias unitarias
para el canal catiónico en BLPs

Ion	Erev (mV)	γ (pS)	r^2
K ⁺ ^a	16.96	213	0.993
Na ⁺ ^b	10.70	170	0.997
NH ₄ ⁺ ^b	13.47	238	0.985
Na ⁺ / K ⁺ ^c	12.63	191	0.960

^a (Datos: desde -60 a +60 mV)

^b (Datos: desde -60 a -10 mV)

^c (cis: 150mM NaCl – 150mM KCl)

Permeabilidad a diversos cationes. Debido a que este canal presenta una probabilidad de apertura muy baja y que en condiciones bi-iónicas a voltajes positivos prácticamente no hay transiciones, consideramos para los ajustes con mínimos cuadrados de la relación I/V solamente los puntos a potenciales negativos hasta -10 mV (ver figura 30). Con tales consideraciones, ajustamos las curvas I/V y se calcularon las relaciones de permeabilidad y conductancia para cada uno de los cationes probados. La primera etapa de la caracterización de este canal consistió entonces en calcular su conductancia unitaria en presencia de soluciones control de potasio (*cisK:transK*). Como ya se dijo, en tales condiciones el potencial de inversión tiene un valor de 16.96 mV, muy similar al potencial de Nernst del K⁺ (17.8 mV) y la conductancia unitaria resultante es de 213 pS.

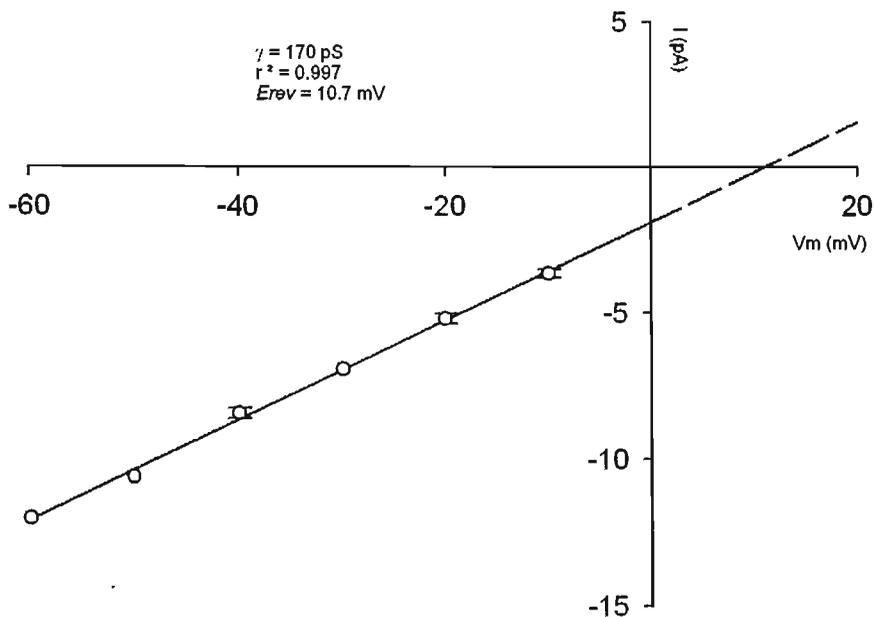


Figura 28. Relación corriente-voltaje (experimentos, $n = 6$). Condiciones: (*cisNa:transK*). Se consideraron únicamente los puntos de mayor P_o (-60 a -10 mV). La conductancia de este canal en estas condiciones es de 170 pS. Más adelante, en la figura 30 se pueden observar las curvas correspondientes a las diferentes condiciones experimentales comparadas entre sí.

La siguiente etapa en la caracterización de este canal consistió en experimentos de perfusión en el lado *cis* con una solución equimolar de NaCl y así trabajamos en condiciones bi-iónicas (*cisNa:transK*, 300:150 mM). En tales condiciones se observan aperturas a un solo nivel, un desplazamiento de ~ 7 mV en el potencial reverso de la curva I/V hacia la izquierda y una reducción en la conductancia unitaria que en estas condiciones es de 170 pS (**figura 28**). Esto indica que el canal permite el flujo de K^+ y de Na^+ pero en condiciones bi-iónicas es menos permeable a este último. La relación de permeabilidades $P_{Na^+}:P_{K^+}$ es de 0.78 y la relación de conductancias $\gamma_{Na^+}:\gamma_{K^+}$ es de 0.80 (*ver tabla VI*). La probabilidad de apertura en presencia de Na^+ es de 0.12 ± 0.2 a -20 mV (experimentos, $n = 6$). En otra serie de experimentos, el cation sustituido fue NH_4^+ y siguiendo el mismo razonamiento, la conductancia unitaria calculada fue de 238 pS (**figura 29**), la relación de permeabilidad $P_{NH_4^+}:P_{K^+}$ tiene un valor de 0.86 y la relación de conductancias $\gamma_{NH_4^+}:\gamma_{K^+}$ es de 1.1 (*ver tabla VI*). La probabilidad de apertura en presencia de este cation desciende a un valor de 0.08 al mismo potencial de -20 mV.

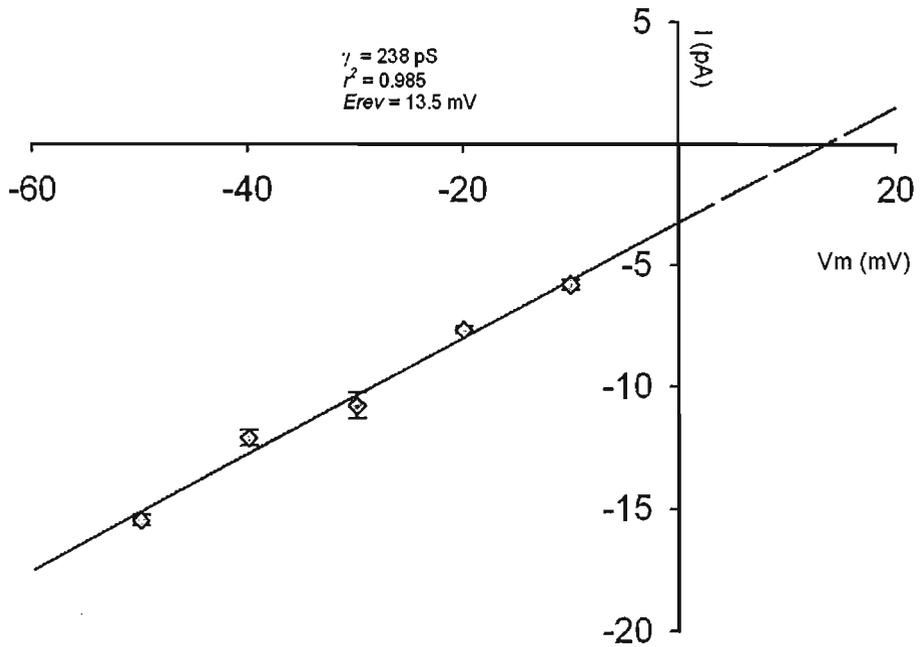
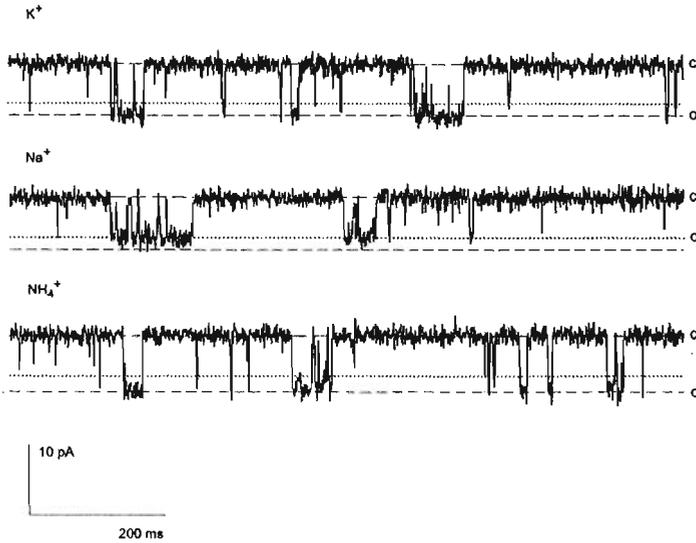


Figura 29. Relación corriente-voltaje. Condiciones: (*cisNH₄transK*). El ajuste con mínimos cuadrados considera los puntos de mayor P_o (-50 a -10 mV) ($r^2 = 0.985$) (238 pS).

A



B

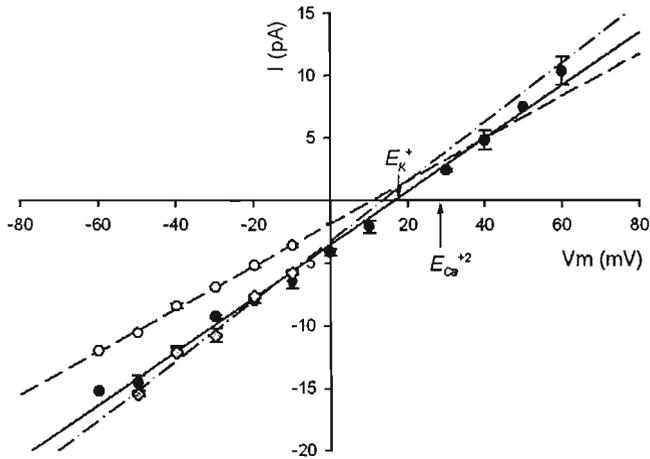


Figura 30. (A) Registros de canal unitario para el canal catiónico en tres condiciones diferentes; soluciones control (*cisK;transK,-*) y las dos condiciones bi-iónicas (*cisNa;transK,* ... y *cisNH₄;transK,* --). El potencial de membrana es de -20 mV para cada trazo y corresponden a la misma bicapa. Estos registros ilustran la amplitud de la corriente en cada condición. Las líneas se incluyen para visualizar el cambio en la amplitud de la corriente en cada condición. Las aperturas del canal son inflexiones hacia abajo del trazo (cerrado, c). (B) Relación corriente voltaje para las tres condiciones estudiadas. Se muestran las gráficas con ajustes desde -60 mV hasta $+60$ mV para las soluciones de K^+ (\bullet) y desde -60 hasta $+10$ mV para las condiciones bi-iónicas Na^+ (\circ) y NH_4^+ (\diamond). Condiciones de registro, *cis*: Cation-Cl 300 mM, $CaCl_2$ 10 mM; *trans*: KCl 150 mM, $CaCl_2$ 1 mM. Para los valores de conductancias, véase Tabla V.

De esta manera, observamos permeabilidad para los tres cationes probados, K^+ , Na^+ , NH_4^+ . La **figura 30** muestra trazos de canal unitario en las condiciones anteriores, comparando la amplitud de las transiciones entre cada condición. Asimismo, se intentó estudiar la permeabilidad a otros cationes como Ca^{+2} , Li^+ y Rb^+ pero no fue posible obtener registros estables para analizarlos, sin embargo incluimos algunos trazos parciales de estos experimentos (**figura 31**). En cuanto a la permeabilidad a Ca^{+2} , dado que el potencial de inversión en soluciones *cisK* y el potencial de Nernst para el ion K^+ son casi idénticos (ver figura 26), concluimos que la permeabilidad a este ion divalente es prácticamente despreciable.

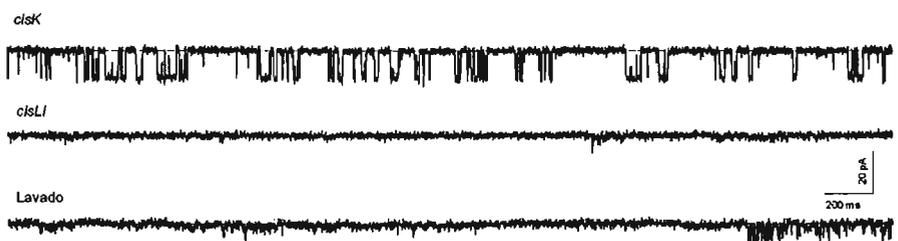


Figura 31. Algunos trazos correspondientes a experimentos no concluidos con LiCl 300 mM. Filtraje, 20 kHz.

Ion	Radio iónico (Å)	γ (pS)	P_X/P_K	γ_X/γ_K	θ^a
K^+	1.38	213	1	1	0
Na^+	1.02	170	0.78	0.80	0.02
NH_4^+ ^b	1.50	238	0.86	1.10	0.24

^a Diferencia entre la relación de conductancia y la de permeabilidad.

^b Radio equivalente (Hille y Schwarz, 1978)

Sin embargo, experimentos en condiciones asimétricas si tuvieron éxito. Empleamos una solución equimolar NaCl - KCl (150 mM de cada sal en *cis*) y aplicando el mismo tipo de análisis, observamos que el potencial reverso es de +12.63 mV, de lo cual se obtiene una conductancia unitaria de 191 pS, un valor intermedio entre las condiciones *cisNa* (170 pS) y *cisK* (213 pS). La curva *I/V* correspondiente se muestra en la **figura 32**.

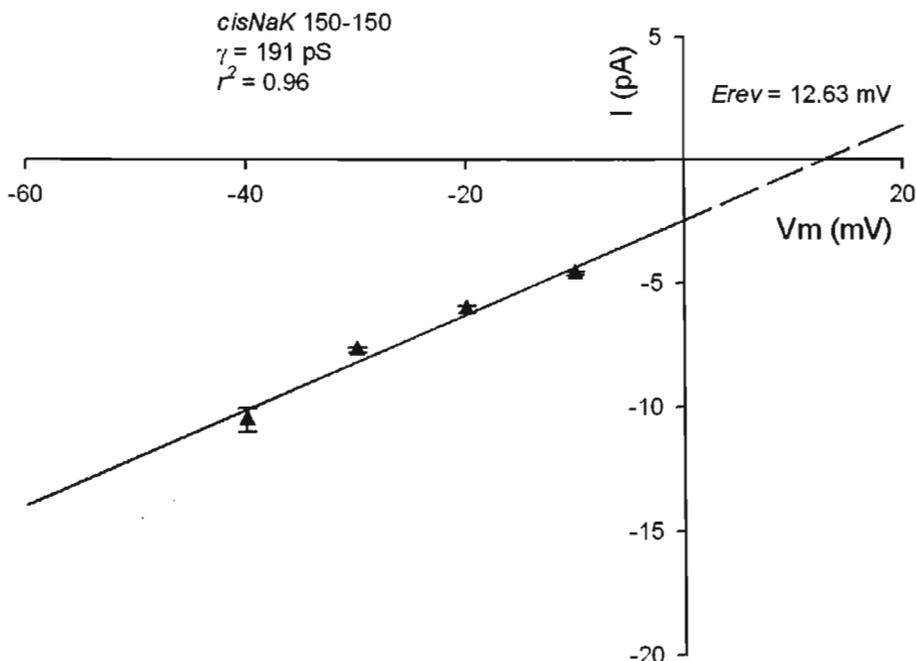


Figura 32. Relación corriente voltaje para la condición *cisNaK* 150-150. La conductancia unitaria (191 pS) se encuentra intermedia entre las obtenidas en soluciones *cisK* (KCl 300 mM) y *cisNa* (NaCl 300 mM).

Como parte de nuestro análisis, en la **figura 33** se muestran graficadas las relaciones de permeabilidad como función del radio iónico de cada especie probada (en Å) para el canal catiónico aquí descrito. Comparativamente hemos incluido el perfil que presenta un canal selectivo a potasio (tipo *Kv*) y uno catiónico dependiente de nucleótidos cíclicos. Estos datos fueron tomados de Hille, 2001.

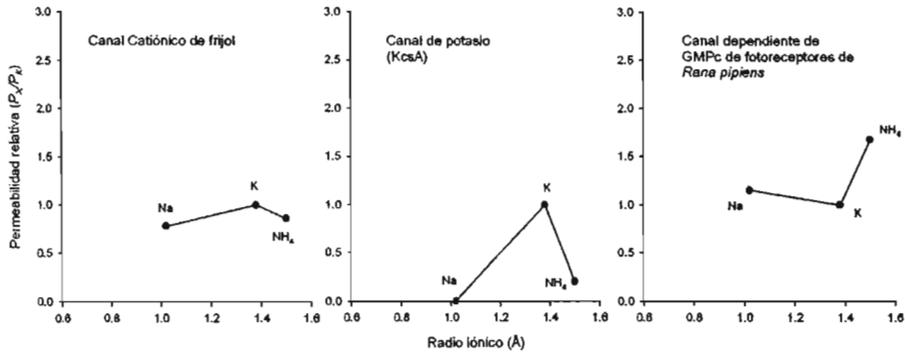


Figura 33. Relación de las permeabilidades relativas para diferentes cationes como función de los radios iónicos correspondientes. El panel de la izquierda muestra las relaciones de permeabilidad relativa encontradas para el canal catiónico aquí descrito. El panel central muestra las relaciones para un canal selectivo a potasio y a la extrema derecha se observa el perfil correspondiente a un canal catiónico dependiente de nucleótidos cíclicos. Las dos últimas gráficas se basan en (LeMasurier, et al. 2001) y (Furman y Tanaka, 1990) respectivamente.

Farmacología. El ion tetraetilamonio (TEA) es un bloqueador típico de canales de potasio y se utiliza ampliamente como prueba molecular en estudios de bloqueo de canales de K^+ (Hille, 2001). Se sabe que el ion TEA tiene la forma de un tetraedro con las dimensiones de un ion potasio hidratado y actúa bloqueando el poro en ambos lados de estos canales, evitando así el flujo de iones K^+ a través de ellos (Armstrong y Binstock, 1965). Probamos el efecto que tiene este bloqueador en el canal catiónico a una concentración de 2 mM *cis:trans*. Sin embargo no se obtuvieron resultados concluyentes.

Registros de otros canales iónicos. Hasta aquí se han mostrado los resultados principales de este trabajo de Tesis, la gran mayoría de los experimentos realizados (> 60%) constituyeron experimentos incompletos, fallidos o registros de otros canales diferentes a los aquí reportados. Dada su poca frecuencia de observación, no fue posible realizar un análisis estadístico completo de los mismos; sin embargo, se presentan en la **figura 34** y **35** -como ejemplo- algunos trazos de dichos registros de otros canales.

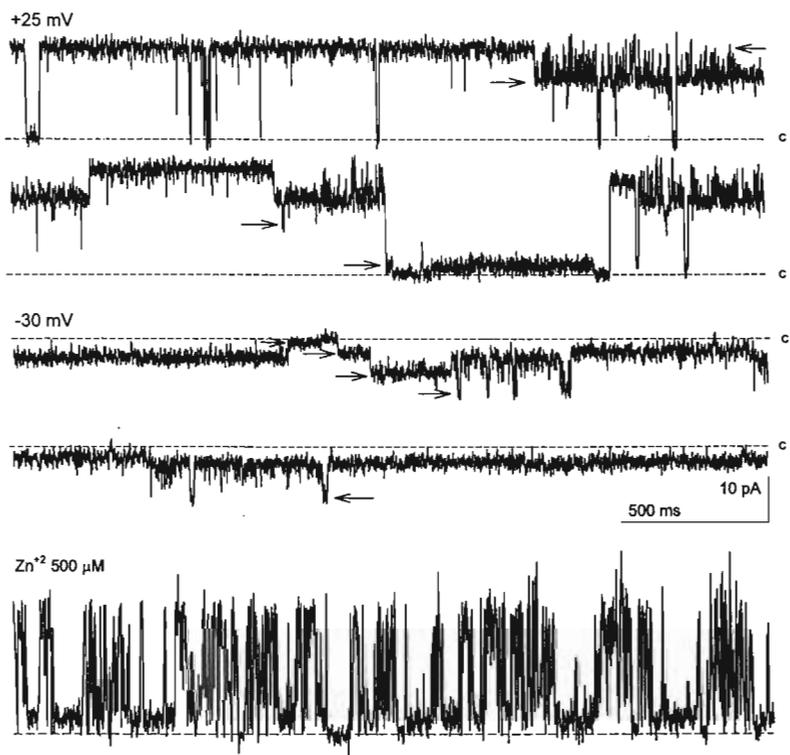


Figura 34. Registro de un canal iónico incorporado solamente una vez con un trazo muy característico donde se observan transiciones a varios niveles de corriente (→) en las condiciones: *cisNa:transK*. Se probó el efecto del Zn²⁺ (500 μM) al mismo voltaje positivo y se observó parpadeo en la corriente. Las líneas punteadas representan el estado cerrado. Filtraje, 20 kHz.

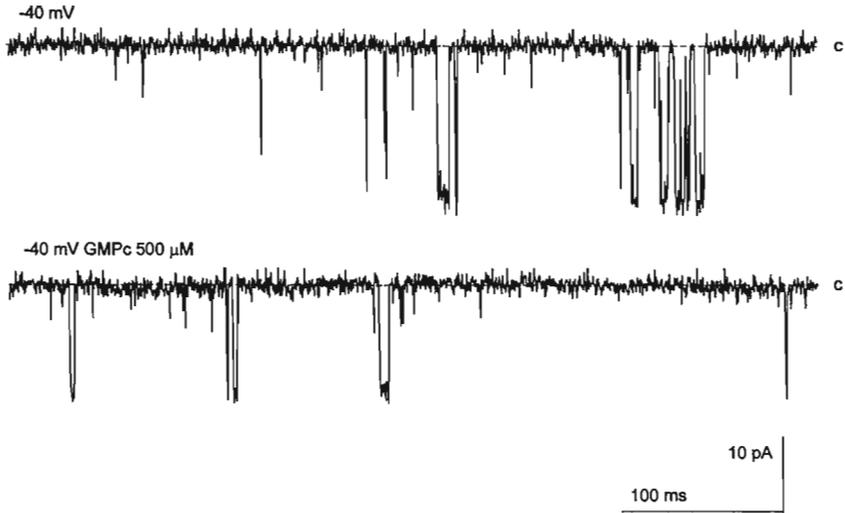


Figura 35. Canal catiónico de muy baja probabilidad de apertura ($\sim 2 \times 10^{-4}$ a -40 mV) al cual se le aplicaron $500 \mu\text{M}$ de GMPc sin observar efecto en su activación. Este canal es diferente al estudiado aquí con mayor detalle; condiciones *cisK:transK*. Las líneas punteadas representan el estado cerrado. Se muestran los voltajes aplicados. Filtraje, 20 kHz.

DISCUSION y CONCLUSIONES

En nuestro laboratorio estamos muy interesados en el estudio de las primeras etapas durante la interacción *Rhizobium etli* - frijol. Como se mencionó, las primeras respuestas a la invasión bacteriana suponen activación de canales iónicos en la membrana de los pelos radicales y células epidérmicas de esta planta. Como un primer acercamiento al estudio del tipo de canales presentes en estas raíces, el interés primordial para la realización de esta Tesis fue estudiar los canales iónicos reconstituidos en bicapas planas para obtener la información básica del tipo de canales iónicos que se encuentran en esta planta y estudiarlos a nivel unitario.

Para el estudio de los canales iónicos se han empleado principalmente dos técnicas: el registro electrofisiológico en microáreas de membrana "patch-clamp" y la reconstitución de canales iónicos en bicapas lipídicas artificiales. En este trabajo se empleó la segunda de estas técnicas por dos razones importantes: (1) la obtención de protoplastos a partir de pelos radicales de frijol no es fácil y (2) el tratamiento enzimático para degradar la pared celular puede alterar la función de los canales iónicos que deseamos estudiar.

El estudio de los canales iónicos con la técnica de bicapas planas también tiene inconvenientes y el principal es quizá que los canales son estudiados en un sistema artificial y poco se puede concluir en cuanto al papel en la fisiología de la raíz. Sin embargo esta técnica es actualmente muy utilizada (White y Tester 1994). Sin embargo, este tipo de estudios debe de complementarse con los de las corrientes en protoplastos de tal manera que los posibles elementos reguladores de la célula se encuentren prácticamente intactos.

La reconstitución es un método para detectar la actividad de los canales iónicos después de destruir la integridad de la membrana plasmática. Sin embargo la eficiencia de la incorporación de los canales iónicos es baja. La frecuencia en la obtención de registros estables con un solo tipo de canal incorporado (canal unitario) fue menor al ~10% en todos los experimentos realizados. Debido a estos inconvenientes técnicos, la reconstitución repetida de un mismo tipo de canal iónico idéntico a experimentos anteriores fue poco observada. Sin embargo, la obtención de varios registros similares a partir de diferentes preparaciones membranales es buena evidencia de la presencia de un tipo de canal iónico en la membrana plasmática.

La variedad de registros observados es un indicativo de la diversidad de los canales iónicos presentes en las raíces del frijol. Por otro lado, solo se pueden estudiar con cierto detalle los canales que se incorporaban de forma frecuente. Esta diversidad puede explicarse de tres maneras: (i) La membrana plasmática tiene una gran variedad de canales iónicos, (ii) la diversidad puede ser causada por cambios en la estructura molecular de los canales después de su reconstitución. Se sabe que la reconstitución puede alterar los diferentes estados de agregación de las subunidades que integran los canales iónicos y como

consecuencia se observan diferentes conductancias para un mismo tipo de canal (Klughammer, *et al.* 1992) y (iii) la contaminación de la preparación membranal con otros sistemas endomembranales como el tonoplasto.

A juzgar por las actividades enzimáticas de las fracciones membranales obtenidas, las vesículas de membrana fusionadas pueden estar contaminadas principalmente por vesículas de tonoplasto, por lo cual es probable que un ~ 40% de los registros correspondan a canales de este origen. Los resultados presentados en cuanto a la purificación de las vesículas de membrana indican que el paso final donde se separan las membranas plasmáticas de la preparación microsomal es poco eficiente en las condiciones empleadas. Esto puede deberse a diferentes razones: el pH de las soluciones, la concentración de KCl empleada en cada etapa de purificación la composición de polímeros Dextrán/Polietilenglicol utilizadas e incluso la temperatura (Larsson, 1985; Persson y Jergil 1992).

Ahora bien, dado el poco enriquecimiento obtenido por nosotros (~55% para membranas plasmáticas, MPs) y la elevada contaminación con tonoplasto, se debe mencionar que fue difícil obtener una preparación pura de MPs. En cuanto a las membranas de mitocondria, encontramos una baja contaminación. Se sabe que las membranas mitocondriales tienen densidades ligeramente mayores ($1.18 - 1.22 \text{ gcm}^{-3}$) a las de MPs ($1.14 - 1.17 \text{ gcm}^{-3}$). Esta característica facilitaría la preparación de MPs utilizando el método de sacarosa pero se sabe que es mejor utilizar el sistema de dos fases (Hodges y Mills, 1986).

Hodges y Mills en 1986 compararon ambos métodos en un intento de establecer cual es mejor para obtener MPs. La separación de membranas utilizando gradientes discontinuos de sacarosa se basa en los tamaños y densidades diferentes de los tipos membranales de la célula; el sistema polimérico bifásico se fundamenta en las propiedades de superficie, cargas de las membranas y parcialmente de acuerdo a las propiedades hidrofílicas/hidrofóbicas de sus superficies externas. Para el empleo de este método es necesario determinar exactamente cuales son las concentraciones de polímeros (PEG y Dextran), así como las de las sales utilizadas.

Un canal de cloro en raíces de frijol.

El primer canal iónico que caracterizamos aquí es permeable a cloro. Los registros correspondientes a este canal son muy característicos y como se puede observar en la sección de resultados, son transiciones positivas de gran duración a voltajes por arriba de 0 mV, mientras que a voltajes negativos las transiciones son muy raras y breves. Dadas las condiciones experimentales de inicio (*cisK:transK*), el voltaje más importante para establecer primeramente la identidad del canal es el voltaje 0 mV, ya que en esta condición solamente el gradiente electroquímico del ion permeable facilita su difusión pasiva desde el lado *cis* (300 mM KCl) hacia el lado *trans* (150 mM KCl). Posteriormente aplicando diferentes voltajes positivos y negativos, se obtuvieron curvas I/V para el cálculo del potencial de equilibrio del ion cloro. Estos primeros resultados confirmaron la selectividad al

cloro para este canal, debido a que el E_{Cl} y el E_{rev} experimental son muy parecidos (-23.2 vs. -19.5 mV respectivamente). Para obtener una curva I/V más detallada sería necesario obtener puntos más cercanos en el voltaje, cada 5 ó 10 mV en lugar de cada 20 mV. Sin embargo, durante los experimentos podía ocurrir cualquier cosa que rompiera la bicapa y arruinar así los escasos experimentos de reconstitución exitosa, por lo que el objetivo inicial era completar rápidamente curvas I/V con voltajes espaciados. Por otra parte su selectividad a cloro queda manifiesta cuando se perfunde la solución de KCl en *cis* por una equimolar de NaCl en *trans*, en tales condiciones no se observa una diferencia significativa en el potencial de inversión, lo que nos indica la permeabilidad del anión.

La elevada probabilidad de apertura de este canal nos indica que en tales condiciones se encuentra abierto casi siempre y su tránsito en dos subestados se explica analizando los trazos más largos que obtuvimos. En estos experimentos observamos que las transiciones entre dos subestados son dependientes de voltaje y que se dan fluctuaciones desde O2 hasta C (cerrado). Asimismo, una característica común de este canal es que presenta cierres muy prolongados en el tiempo (hasta segundos de duración) y cuando regresa a su estado de alta actividad, las transiciones vuelven a fluctuar entre O1 y O2 dependiendo del voltaje aplicado.

Este canal encontrado por nosotros presenta una conductancia unitaria de 293 pS (O1), la cual es alta comparada con las reportadas para algunos otros canales aniónicos vegetales como el GCAC1 (llamado recientemente tipo-R), encontrado en los protoplastos de células guarda de haba (*Vicia faba*) (Keller, 1989, Hedrich, *et al.* 1990), con una conductancia unitaria de 39 pS (en 100mM de KCl). En células guarda, se han encontrado dos tipos de canales aniónicos (tipo-R y tipo-S). El tipo-R se caracteriza por presentar una cinética de activación e inactivación muy rápidas, que causan una depolarización transitoria, mientras que el tipo-S tiene una cinética de activación lenta y sostenida que produce una depolarización larga (Ward, *et al.* 1995). Por otra parte, el canal tipo-S de haba tiene una conductancia unitaria de 33 ± 8 pS. Este canal es bloqueado fuertemente con NPPB y con IAA-94 pero el DIDS y el $ZnCl_2$ no tienen un efecto significativo en este canal (Schwartz *et al.* 1995). En protoplastos de células guarda de *V. faba* se han descrito conductancias de 18, 36 y 52 pS, así como pequeñas conductancias (<10 pS) que corresponden a canales tipo-S en estas células. Los estudios de permeabilidad indican que el canal tipo-S es permeable a diferentes aniones: $NO_3^- > Br^- > F^- \sim Cl^- \sim I^- >$ malato (Schmidt y Schroeder, 1994). Además de estos dos canales, se ha descrito un canal aniónico activado por estímulos mecánicos (*stretch-activated*) en membranas plasmáticas de células guarda de *V. faba* L., cuya conductancia unitaria es de 27 pS (Cosgrove y Hedrich, 1991).

Es interesante comparar el canal que más se parece al que encontramos aquí. Este canal fue descrito en células en suspensión de *Amaranthus tricolor* y presenta una alta conductancia en comparación a los canales anteriores: 200 pS. Es activado por hiperpolarización y su secuencia de permeabilidades es: $NO_3^- > Cl^- > K^+ >$ aspartato (Terry, *et al.* 1991). Por otra parte, no hay muchos reportes de

canales aniónicos descritos en raíces de plantas. Sin embargo, en protoplastos del xilema parenquimatoso de raíces de cebada (*Hordeum vulgare*) se ha descrito una conductancia específica a aniones que presenta una cinética de *gating* lenta, una conductancia unitaria de 77 pS (114mM Cl⁻ externo) y un tiempo de apertura media de 1s, la relación de permeabilidades ($P_{Cl} : P_K$) fue de 3.2 y también es permeable a nitrato (Wegner y Rascke, 1994). Estos autores proponen que la función de tales canales aniónicos es similar al eflujo de sales durante el cerrado estomatal (Schmidt y Schroeder, 1994). De esta manera, proponen la liberación de sales desde las células vegetales del parénquima de raíz hacia el apoplasto y su liberación a los vasos del xilema y su transporte al tallo. Resulta interesante saber si el canal descrito por nosotros es también permeable a otros aniones grandes.

La conductancia del canal descrito aquí es alta, sin embargo existen reportes donde se describen canales de alta conductancia en plantas, llamados "*maxi-cation channels*", los cuales han sido encontrados en la membrana plasmática de las raíces de centeno (*Secale cereale* L.). Estos canales son permeables a cationes monovalentes y divalentes, con conductancias unitarias de 451pS (100 mM KCl) (White, 1993). Por otra parte, la función de "*maxi-Cl⁻ channels*" no ha sido estudiada en plantas y en sistemas animales se sabe muy poco también. Se han descrito varios canales de cloro de alta conductancia en diferentes tipos de células animales y vegetales con conductancias unitarias entre 250 y 430 pS con selectividades bajas entre diferentes aniones orgánicos y cloro (para revisión: Nilius y Droogmans, 2003). Un canal con una conductancia de ~400 pS es activado por hinchamiento osmótico en las células y es sensible a Gd³⁺. Estos canales de elevadas conductancias permiten el flujo de moléculas grandes, como el ATP ($P_{ATP}/P_{Cl} \sim 0.09$) y se proponen como vías de flujo para el ATP inducido por cambios osmóticos (Sabirov, *et al.* 2001).

Se ha demostrado que en células ciliares epiteliales pigmentadas de bovino se encuentra un canal de cloro de alta conductancia (cerca a los 300 pS), dependiente de voltaje y que presenta múltiples niveles de subconductancia y es bloqueado por SITS (Mitchell *et al.* 1997). Este canal presenta transiciones tipo *flickering* que también han sido observadas en otros canales de cloro de alta conductancia. La observación que hicimos del canal de cloro en raíces de frijol indica que este canal presenta de igual manera, al menos dos diferentes estados cinéticos.

Farmacológicamente, en este trabajo reportamos un efecto inhibitorio reversible del Zn⁺² en el canal de cloro encontrado en las raíces del frijol. Algunos metales de transición como el Zn⁺², Cd⁺², La⁺³ y el Gd⁺³ son utilizados como bloqueadores de canales aniónicos. La forma en que actúan es que se unen firmemente a grupos residuos de cisteínas o histidinas en la superficie de la proteína y posiblemente dentro del poro (Jentsch *et al.* 2002). Estos cationes también pueden coordinar pequeños aniones para formar complejos iónicos que pueden bloquear el poro. Sin embargo, se ha demostrado que el Zn⁺² o el Cd⁺² inhiben los canales tipo ClC-0 llevándolos a un estado de inactivación y no por

obstrucción del poro(s), si no por la coordinación del catión con residuos de cisteína en la proteína (Kürz *et al.* 1997).

Establecer la función del canal de cloro en las raíces del frijol no es tarea fácil. Sin embargo proponemos que puede participar en el control de la turgencia celular, así como en el transporte de aniones orgánicos. Se sabe que la función de los canales de cloro es muy diversa y que participan en la homeostasis iónica, en la regulación del volúmen celular, en el transporte transepitelial y en la regulación de la excitabilidad eléctrica en células animales (Jentsch *et al.* 2002). Estos canales pueden conducir además otros aniones (*p. ej.* I^- y NO_3^-). Particularmente en plantas se ha determinado que canales de cloro podrían participar en la regulación del contenido de nitrato (Geelen *et al.* 2002). El *gating* de estos canales depende del voltaje membranal, del hinchamiento de la célula, de la unión de moléculas señal y otros iones (Ca^{+2} , pH, aniones) y del estado de fosforilación de la proteína (Jentsch *et al.* 2002). Para regular su volúmen, las células transportan diversos iones y osmolitos cuyos transportadores se activan cuando la célula se encuentra turgente o contraída. Estos cambios osmóticos inducen activación de conductancias aniónicas características, llamadas $I_{Cl\text{-swell}}$ en células animales (Nilius *et al.* 1996). Estos canales regularmente permiten el flujo de osmolitos. En plantas, se sabe que los flujos de Cl^- son necesarios para el crecimiento del tubo polínico y en la regulación del volúmen o la presión de turgencia celulares (Zonia, 2002). El eflujo de cloro puede estar acoplado a otros acontecimientos celulares que se activen respondiendo a los cambios en turgencia y estos pueden ser por ejemplo canales de calcio sensitivos a estímulos mecánicos (Hedrich, *et al.*, 1990) y otros canales de cloro mecano-sensibles (Cosgrove, y Hedrich, 1991). La acción coordinada de estos tipos de canales puede contribuir al control fino del balance osmótico celular ante condiciones extracelulares variables. En este contexto, se ha propuesto un papel regulatorio del citoesqueleto de actina sobre canales aniónicos en células animales. Mills y colaboradores (1994) han propuesto que el hinchamiento celular activa un mecanoreceptor en membrana plasmática (MSR) que a su vez activa fosfolipasa-C (PLC) vía proteínas-G. La activación de la PLC incrementaría la concentración de diacil-glicerol (DAG), lo cual estimula la fosfocinasa-C (PKC). La fosforilación mediada por PKC depolimerizaría actina-F, lo cual activaría *maxi*-canales de cloro (**figura 36**).

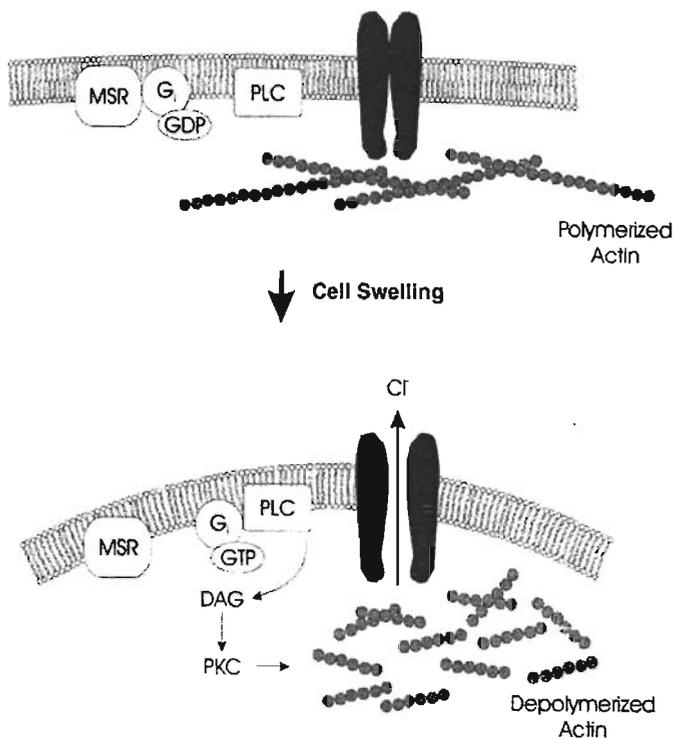


Figura 36. Modelo en células animales para la activación de canales de cloro por hinchamiento celular. Este hinchamiento activa receptores MSR que a su vez activan PLC vía proteínas-G. Se incrementa la concentración de DAG y se activa la PKC. PKC favorece la depolymerización de filamentos de actina y se activan *maxi*-canales de cloro. Tomado de: Mills, *et al.* (1994).

Por otra parte, los flujos de aniones son los primeros componentes de las respuestas celulares a señales específicas en las cascadas de señalización (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.* 1999). Como se sabe, el modelo más estudiado es el de las células guarda, donde la luz activa la H^+ -ATPasa de membrana plasmática, lo cual hiperpolariza la membrana (Schroeder *et al.* 2001) y resulta en un recambio de K^+ y/o de Cl^- . El H_2O entra a la célula a favor del potencial osmótico y el estoma se abre. Este proceso es revertido por la inhibición de la H^+ -ATPasa y la apertura de canales de cloro que depolarizan la membrana y se activan canales de K^+ que sacan potasio de la célula y el volumen celular disminuye (Schroeder, y Hedrich, 1989; Ward *et al.*, 1995).

El control del volumen celular en plantas es determinante. Como se ha mencionado, los pelos radicales participan en el intercambio de nutrientes, el anclaje al suelo y la interacción con microorganismos. Durante el desarrollo de los pelos radicales, se han observado cambios en el pH citosólico y de la pared

celular (Bibikova, *et al.* 1998). Asimismo se han descrito influjos de calcio que son necesarios para el crecimiento de estas células (Bibikova, *et al.* 1997). No se sabe si en estos cambios de volumen participan canales de cloro pero en células animales es interesante observar que los canales de cloro que actúan en respuesta a cambios de volumen celular son de elevada conductancia (~290-400 pS) (Mitchell, *et al.* 1997, Sabirov, *et al.* 2001). Nuevamente, es interesante preguntarse si el canal de cloro descrito aquí podría participar en tales fenómenos. En cuanto a otros reportes de canales aniónicos en frijol común, la información es muy poca y corresponden a canales diferentes al aquí reportado (Abrecht, *et al.* 2000; Zhang, *et al.* 2002).

Un canal catiónico en raíces de frijol.

Por otra parte, en este trabajo encontramos y caracterizamos también un canal catiónico dependiente de voltaje cuya principal característica es que su poca selectividad a cationes monovalentes la cual permite el flujo de potasio, sodio y amonio. De la misma manera que con el canal anterior, el razonamiento primero fue establecer la dirección de las transiciones a 0 mV, que en este caso son negativas y corresponden a flujos de cationes (en las soluciones control, K⁺) de *cis* a *trans*. De manera diferente al canal de cloro, este canal presenta una *P_o* muy baja.

La conductancia unitaria es también alta (213 pS) cuando las condiciones iónicas son KCl 300 mM: KCl 150 mM (*cisK:transK*). La probabilidad de apertura máxima de este canal en estas condiciones es de ~0.25 a -40mV. Esto último y dada la baja selectividad entre cationes monovalentes, resulta interesante considerarlo para experimentos posteriores donde se pueda probar el posible efecto de nucleótidos cíclicos (*v.gr.* GMPc) en la probabilidad de apertura de este canal, debido a que estos canales son también poco selectivos a cationes (Hille, 2001). Además, por otra parte resulta interesante plantear la posible regulación por calcio de este canal para lo cual se podría estudiar su funcionamiento en soluciones sin calcio.

Como quedó dicho, este canal es también permeable a sodio y amonio; cuando la condición es NaCl 300 mM: KCl 150 mM (*cisNa:transK*), se observa un decremento en la conductancia: 170 pS. El hecho de observar una disminución en la conductancia unitaria con una perfusión del cation permeante (K⁺ > Na⁺), sugiere que este canal es más permeable al ion K⁺ en comparación con el ion Na⁺ y esto se ve corroborado con la relación de permeabilidades observada ($P_{Na}/P_K = 0.78$). Ahora bien, al realizar el cálculo de la relación de conductancias, se obtiene un valor de $\gamma_{Na}/\gamma_K = 0.80$. Esto indica que la relación es: $\gamma_{Na}/\gamma_K \geq P_{Na}/P_K$. Asimismo, en algunos experimentos, utilizando una solución equimolar de Na⁺ y K⁺; NaCl 150 mM – KCl 150 mM (*cisNaK 150-150*), observamos una conductancia ligeramente menor (191 pS) a la observada en soluciones de potasio. En los experimentos con amonio, se realizaron perfusiones en las cuales se cambió la solución *cisK* por *cisNH₄*. El resultado fue que la conductancia es mayor incluso a la del potasio (238 pS). La relación de permeabilidades y conductancias (*ver Tabla VI*) indica que $\gamma_{NH_4}/\gamma_K > P_{NH_4}/P_K$.

¿Cómo se da la permeación de estos iones a través del poro en este canal catiónico? Según nuestros resultados, las relaciones de permeabilidad y conductancia son diferentes y dependen del tipo de ion. La permeabilidad de un ion a través del poro depende de la afinidad que tiene este hacia algún sitio del mismo poro y por tanto, la capacidad que tiene de entrar al poro. Por otro lado, la conductancia es un reflejo de la capacidad que tiene el ion para atravesar todo el poro y producir una corriente (Hille, 2001). En los experimentos realizados en este trabajo, observamos que tanto para Na^+ como para NH_4^+ , las relaciones de conductancia ($\gamma_{\text{cat}}/\gamma_{\text{K}^+}$) fueron mayores a las relaciones de permeabilidad ($P_{\text{cat}}/P_{\text{K}^+}$). Sin embargo es necesario mencionar que comparativamente la diferencia fue mayor entre $\gamma_{\text{NH}_4^+}/\gamma_{\text{K}^+}$ y $P_{\text{NH}_4^+}/P_{\text{K}^+}$ (diferencia $\delta = 0.24$) que entre $\gamma_{\text{Na}^+}/\gamma_{\text{K}^+}$ y $P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+}$ (diferencia $\delta = 0.02$). En este caso, los iones en cuestión Na^+ y NH_4^+ , comparativamente fluyen más rápido a través del poro respecto al tiempo que les tomaría entrar en el mismo al interactúan con el(los) sitio(s) de diferente afinidad. Siguiendo este razonamiento, se puede sugerir que dada la elevada conductancia al amonio, este ion fluye más rápido que el potasio y el sodio respectivamente. Por otro lado, cuando las permeabilidades y conductancias relativas tienen valores similares, se interpreta que hay independencia entre el movimiento del ion dentro del poro y su desacople del sitio de afinidad en el mismo (Hille y Schwarz, 1978).

La secuencia de permeabilidades que encontramos para este canal catiónico en *P. vulgaris* ($\text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+$) es muy similar al reportado para un canal no selectivo de cationes en membrana plasmática de raíces de *Arabidopsis* (Demidchik y Tester, 2002). En *Arabidopsis* la secuencia de permeabilidad es: K^+ (1.49) $>$ NH_4^+ (1.24) $>$ Rb^+ (1.15) $>$ Cs^+ (1.1) \geq Na^+ (1.0) $>$ Li^+ (0.73) $>$ TEA^+ (0.47). Asimismo, esta secuencia se parece a la descrita para un canal de raíces de centeno (*Secale cereale*) caracterizado en bicapas planas, con valores de: K^+ (1.36) $=$ Rb^+ (1.36) $>$ Cs^+ (1.17) $>$ Na^+ (1.0) \approx Li^+ (0.97) $>$ TEA^+ (0.41) (White y Tester, 1992). Por otra parte, en este canal de centeno, la permeabilidad al ion NH_4^+ fue estudiada posteriormente (White, 1996) y resulta ser de $P_{\text{NH}_4^+}/P_{\text{K}^+}$ 0.95 en soluciones de 3 mM de amonio pero se incrementa hasta 1.89 a 300 mM. En un canal poco selectivo en raíces de trigo, (*Triticum aestivum*) la secuencia reportada es de: NH_4^+ (2.06) $>$ Rb^+ (1.38) $>$ K^+ (1.23) \approx Cs^+ (1.18) $>$ Na^+ (1.00) $>$ Li^+ (0.83) $>$ TEA^+ (0.20) (Davenport y Tester, 2000). Resulta interesante que, como se puede ver en la **Tabla VII**, las secuencias de permeabilidad para los tres cationes probados (K^+ , NH_4^+ y Na^+) en este trabajo son más parecidos a los valores encontrados en otra planta dicotiledónea (*A. thaliana*) respecto a la permeabilidad al amonio en comparación a las monocotiledóneas centeno y trigo. Sin embargo, descartamos que el canal estudiado en frijol sea del mismo tipo que el de *Arabidopsis* porque la conductancia unitaria es muy diferente: 7.5 pS en CaCl_2 5mM y NaCl 100 mM (*A. thaliana*) en comparación con 170 pS en soluciones *cisNa* (*P. vulgaris*); además de que la *Po* es también diferente: $Po \approx 0.6$ (-40 mV) y al reducir el calcio externo se incrementa significativamente el número de canales abiertos, de tal forma que se ha reportado bloqueo por calcio en el canal de *Arabidopsis* ($\text{K}_{1/2} \approx 0.1$ mM) (Demidchik y Tester, 2002). Estos autores han sugerido que este canal participa en la entrada de sodio a la célula y en general

como como una vía de asimilación de nutrientes minerales de baja afinidad. Su papel en frijol podría ser similar. De la misma forma, es interesante notar también que la permeabilidad al sodio es menor en los cuatro canales estudiados.

Tabla VII
Relaciones de permeabilidad para canales catiónicos en diferentes plantas

	<i>P. vulgaris</i>	<i>A. thaliana</i> ^a	<i>S. cereale</i> ^b	<i>T. aestivum</i> ^d
K ⁺	1.28	1.49	1.36	1.23
NH ₄ ⁺	1.10	1.24	2.57^c	2.06
Na ⁺	1.00	1.00	1.00	1.00

^a Demidchik V. y Tester M. 2002. Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* 128(2): 379-87.

^b White PJ, Tester M. 1992. Potassium channels from the plasma membrane of rye roots characterized following incorporation into planar lipid bilayers. *Planta* 186: 188-202.

^c White PJ. 1996. The Permeation of Ammonium through a Voltage-independent K⁺ Channel in the Plasma Membrane of Rye Roots. *J. Membrane Biol.* 152, 89-99. Nota: P_{NH_4}/P_K máxima es de 1.89 en 300 mM.

^d Davenport and Tester. 2000. A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiol.* 122(3):823-34.

En diversos estudios en plantas, los canales NSCC o parecidos presentan ligeras diferencias en sus selectividades a diferentes cationes. Casi todos los canales estudiados son similarmente permeables a K⁺, Rb⁺, Na⁺, NH₄⁺ y Cs⁺ pero por otro lado los cationes divalentes, el ion Li⁺ y el TEA⁺ son menos permeables al estudiarlos en un amplio espectro de condiciones iónicas (ver Davenport y Tester, 2000).

La conductancia al potasio del canal descrito aquí es alta, sin embargo existen reportes donde se describen canales de alta conductancia en plantas, llamados "*maxi-cation channels*", los cuales han sido encontrados en la membrana plasmática de las raíces de centeno (*Secale cereale* L.). Estos canales son permeables a cationes monovalentes y divalentes, con conductancias unitarias de 451 pS (100 mM KCl), 278 pS (100 mM NaCl) y 135 pS (100 mM CaCl₂) (White, 1993). Sin embargo la *Po* de este canal es prácticamente de 1.0 mientras que el canal de frijol presenta una *Po* muy baja (~0.3) a voltajes negativos. Finalmente, el único canal descrito previamente en frijol fue descrito en cotiledones; se activa por depolarización y tiene una secuencia de permeabilidad: K⁺ (1.0) > NH₄⁺ (0.75) ≈ Na (0.72) ≈ Cs⁺ > TEA⁺ (0.6) ≈ colina > Cl⁻. Aunque en este estudio no fueron caracterizadas las propiedades unitarias de dicho canal, se determinó que es una corriente saliente (Zhang et al. 2000). Posteriormente en estas células una corriente entrante muy similar en permeabilidad y activada por depolarización fue caracterizada con dos tipos de conductancias: una con lenta activación cuya

conductancia unitaria determinada por análisis de ruido es de 2.4 pS y la otra de ~25 pS (Zhang et al 2002).

Al igual que con el canal de cloro, establecer la función de este canal catiónico no es tarea fácil. Dada las características de poca selectividad para este canal, comparamos las propiedades de algunos de los canales más parecidos reportados en la literatura y encontramos que existe un grupo de canales llamados NSCC ("*Non Selective Cation Channels*"). En general, estos canales son selectivos a cationes sobre aniones pero su baja permeabilidad a cationes monovalentes es característica. Las relaciones de permeabilidad $K^+ : Na^+$ está en el intervalo de 0.3 a 3.0 (Demidchik et al. 2002). Algunos de estos canales son poco permeables a cationes divalentes y cationes grandes como $Tris^+$, TEA y colina pero algunos son inhibidos por Ca^{+2} . En nuestro caso, probamos TEA como bloqueador pero el escaso efecto del mismo no fue significativo. Son un grupo muy heterogéneo y los valores de conductancia unitaria, dependencia de voltaje, activación, inhibición por calcio y sensibilidad a inhibidores no son diagnósticos para definir al grupo (Demidchik et al. 2002).

Los flujos iónicos en las células de las plantas participan en los movimientos controlados osmóticamente, el vaciado de solutos al xilema, la asimilación de cationes a baja afinidad para nutrición vegetal y la redistribución de solutos intracelulares así como en mecanismos de señalización y regulación del voltaje membranar (Maathuis et al. 1997). Asimismo, se ha propuesto que estos canales participan en el influjo de sodio a la célula y tolerancia al sodio (Demidchik et al. 2002).

El potasio es el catión de mayor abundancia en células vegetales no-halofitas. En la **Tabla VIII** se presentan las concentraciones intra- y extracelulares de los principales iones en plantas. En cuanto al papel de los canales permeables a K^+ y la nutrición mineral, se han descrito conductancias de alta y baja afinidad para su asimilación por las raíces (Maathuis et al. 1997). En el caso del canal catiónico descrito en nuestro trabajo, resulta de gran interés la asimilación de cationes y el transporte hacia el sistema vascular en raíces. En células del parénquima vascular en cebada (*Hordeum vulgare*) se han descrito al menos tres tipos diferentes de canales catiónicos: NORC (canal no-selectivo rectificador saliente) y KORC (canal de K^+ rectificador saliente). Por otra parte, el KIRC (canal de K^+ rectificador entrante) es más selectivo para K^+ (Wegner y Raschke, 1994). Los canales NORC y KORC pueden encontrarse en el mismo tipo de célula y su activación depende de los niveles de Ca^{+2} citosólico y en raíces probablemente participan en el transporte de cationes hacia el xilema vía apoplasto (**figura 37**). Asimismo, tales vías de asimilación de nutrientes minerales vía canales iónicos, están relacionados con la actividad de otros transportadores en la membrana plasmática como acarreadores y bombas de H^+ dependientes de ATP (**figura 38**).

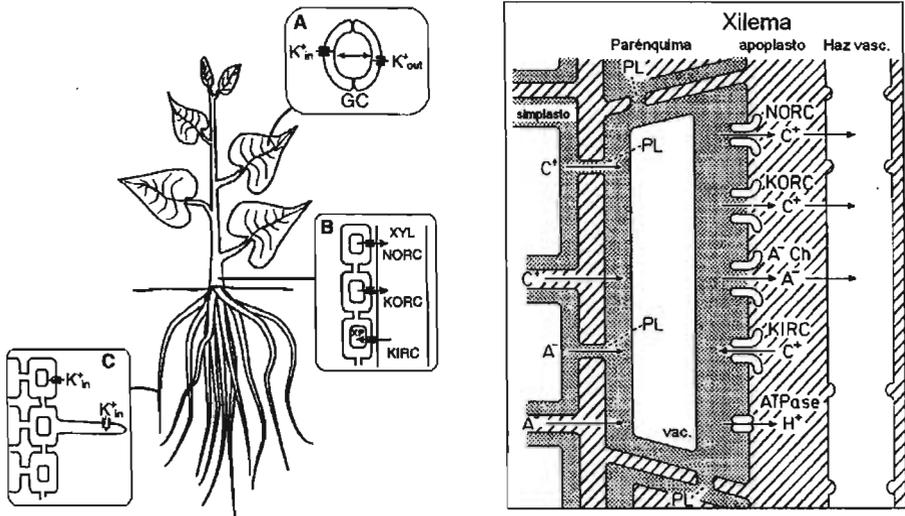


Figura 37. En el panel izquierdo se muestran algunas de las funciones esenciales de los canales permeables a potasio en plantas. A, Regulación de la transpiración y control de la apertura de células guarda (GC) de los estomas. B, Intercambio de nutrientes al sistema vascular (xilema, XYL) mediante diferentes tipos de canales (NORC, canales catiónicos no-selectivos; KORC, canales de potasio rectificadores salientes y KIRC, rectificadores entrantes). C, Nutrición mineral y recambio de iones a nivel de las células epidérmicas y pelos radicales. Tomado de: Maathuis, *et al.* 1997. En el panel derecho se presentan de manera simplificada las vías de flujo de cationes (C^+) a través de diferentes canales iónicos y su transporte hacia el apoplasto y xilema. A', Anion; A'Ch, canal aniónico; PL, plasmodesmo; vac., vacuola. Modificado de: Wegner y Raschke, 1994.

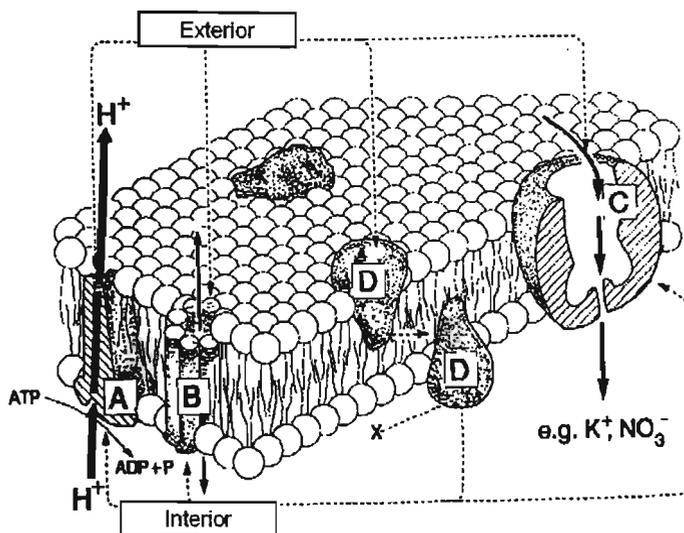


Figura 38. Principales vías de flujo de iones a través de la membrana en relación al intercambio de nutrientes. A, bomba de H^+ dependiente de ATP; B, canal iónico; C, acarreador; D, proteínas periféricas. Modificado de: H Marschner (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Academic Press.

Tabla VIII
Concentraciones iónicas en células vegetales [†]

Ion	Extracelular [mM]	Intracelular [mM]
K^+	~1	75-200
Na^+	1-200 *	10-30 *
Cl^-	~2-92	3-10 °
Ca^{+2}	0.5-1	~100 nM
NO_3^-	2	2-10 °

[†] Los valores dependen del status iónico y tipo de planta

* Tester, M. y Davenport, R., 2003.

° Barbier-Brygoo, H. *et al.* 2000.

En lo que respecta a la tolerancia al sodio, se ha propuesto, por ejemplo, que los canales catiónicos no selectivos de membranas plasmáticas en células epidérmicas de hojas de cebada participan en la acumulación de sodio como mecanismo de protección de las hojas jóvenes y redirigido hacia células más vacuoladas, metabólicamente menos activas en partes 'sacrificables' de la planta como las hojas viejas (Karley *et al.* 2000).

Finalmente, dada la contaminación con tonoplasto en nuestra preparación membranal, cabe discutir si alguno de los canales estudiados aquí provienen de vacuola. Los canales estudiados en este organelo indican que existen al menos tres tipos diferentes de canales catiónicos: SV (*slow-vacuolar*), FV (*fast-vacuolar*) y VK (vacuolar de K⁺) (Tikhonova, 1998). El primero de ellos (SV) es un canal dependiente de voltaje y de calcio con una cinética de activación de segundos (lenta). Sin embargo, este canal tiene una conductancia de 60-80 pS (100 mM catión-Cl simétrico) y es un rectificador entrante. Aunque se ha descrito como un canal catiónico poco selectivo y tiene una *Po* muy baja, se ha demostrado una alta ($P_{Ca}:P_K$, 3:1) permeabilidad a Ca²⁺ (Allen y Sanders, 1996; Weiser, 1993) que no observamos en el canal aquí descrito. En tonoplastos de células guarda de *V. faba* este tipo de canal tiene una conductancia unitaria de 117 pS en soluciones de KCl 100 mM externo y presencia de CaCl₂ 50 mM interno pero en ausencia de potasio y con un gradiente de calcio 50 mM > 5 mM, la conductancia es de 16 pS (Ward y Schroeder, 1994). Por otra parte, en células del alga marina *Posidonia oceanica* también se ha descrito este canal SV, su conductancia unitaria es de 106 ± 12 pS (400 mM K⁺ simétrico) (Carpaneto, 1997), la mitad de la conductancia observada para potasio en el canal de frijol. Los canales tipo FV tienen una cinética de activación rápida (< 1 ms) con una *Po* muy pequeña a -40 mV en soluciones simétricas de K⁺ que se incrementa a voltajes positivos o más negativos. Las corrientes unitarias presentan una ligera rectificación saliente y su conductancia es de 25.1 ± 0.8 pS a potenciales negativos y de 17.5 ± 0.4 pS a potenciales positivos (Tikhonova *et al.* 1997). Además, este canal FV es activado por niveles nanomolares de calcio libre citosólico. Ahora bien, los canales VK tienen conductancias de ~70 pS (100 mM KCl simétrico) pero tienen una gran selectividad para potasio en comparación con NH₄⁺ ($P_K:P_{NH_4^+}$, 2.2:1.0) y Rb⁺ mientras que el Na⁺, Li⁺ y Cs⁺ prácticamente no son permeables por este canal (Ward y Schroeder, 1994). Dados estos argumentos, nos inclinamos a creer que es poco probable que el canal de cationes descrito en frijol sea el mismo que los presentes en tonoplasto: SV, FV ó VK.

Otros canales iónicos presentes en las raíces del frijol común.

Durante nuestros experimentos utilizando bicapas planas, obtuvimos registros correspondientes a otros tipos de canales iónicos. Sin embargo, la baja frecuencia de incorporación en la reconstitución y en otras ocasiones la misma estabilidad de los registros, no hizo posible un análisis más completo de los mismos. Es por esto que el análisis presentado aquí corresponde a los dos canales observados más frecuentemente y constituye la parte medular del trabajo.

En resúmen, el presente trabajo reporta la caracterización de dos tipos de canales iónicos no descritos previamente en raíces de frijol. Uno de ellos permeable a cloro y el otro es poco selectivo entre cationes monovalentes. Ambos canales dependen de voltaje y fueron estudiados utilizando bicapas lipídicas planas en condiciones de fijación de voltaje.

De esta manera:

- El canal permeable a cloro presenta una conductancia unitaria elevada de (γ_{O1} , 293 pS, γ_{O2} , 570 pS).
- Este canal se caracteriza por presentar una elevada probabilidad de apertura a potenciales positivos y además es sensible al zinc.
- El canal catiónico presenta una conductancia unitaria de $\gamma = 213$ pS en las soluciones estandar de potasio (*cisK:transK*; 300mM:150mM).
- Si se substituye el K^+ por Na^+ , se observa una reducción en la conductancia unitaria que en estas condiciones es de 170 pS. Asimismo, es permeable a NH_4^+ con una conductancia de 238 pS.

PERSPECTIVAS

Aún quedan por responder varias preguntas respecto de los canales iónicos descritos aquí. La principal de ellas quizá podría ser encontrar cuál es la función de estos canales en la célula viva y si de alguna forma participan en el fenómeno de señalización por factores Nod que se mencionó. Sin embargo, dadas las limitaciones mismas de nuestro enfoque experimental y los problemas con el establecimiento del origen membranal de estos canales, quedan por resolver puntos más específicos:

- Eficientizar el fraccionamiento de membranas plasmáticas de raíces de frijol.
- Realizar estudios de permeabilidad a otros aniones para el canal de cloro.
- Establecer la permeabilidad de otros cationes en el canal catiónico.
- Determinar la sensibilidad al calcio en el canal catiónico.

Posteriormente, intentar obtener protoplastos para realizar *patch-clamp*.

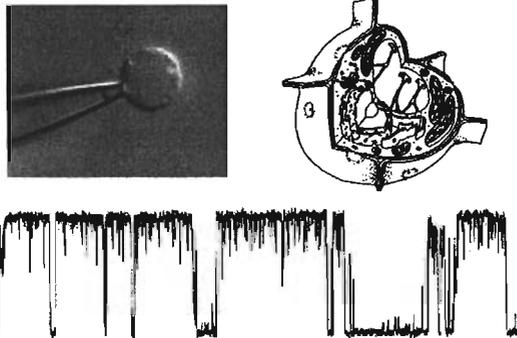


Figura 39. *Patch clamp*.

ANEXO

A chloride-permeable channel from *Phaseolus vulgaris* roots incorporated into planar lipid bilayers

Daniel Balleza,^a Carmen Quinto,^a Federico Sánchez,^a and Froylan Gómez-Lagunas^{b,*}

^a Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca Morelos 62210, Mexico

^b Departamento de Fisiología, Edificio de Investigaciones-1er. Piso, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, Ap. Postal 70-230, México D.F. 04510, Mexico

Received 4 June 2003

Abstract

Ion channels are key participants in physiological processes of plant cells. Here, we report the first characterization of a high conductance, Cl⁻-permeable channel, present in enriched fractions of plasma membranes of bean root cells. The Cl⁻ channel was incorporated into planar lipid bilayers and its activity was recorded under voltage clamp conditions. The channel is voltage-dependent, excludes the passage of cations (K⁺, Na⁺, and Ca²⁺), and is inhibited by micromolar concentrations of Zn²⁺. The Cl⁻ conductance here characterized represents a previously undescribed channel of plant cells.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Cl⁻-channel; Bean roots; Planar bilayers; Zn²⁺-inhibition

In order to fix nitrogen, root cells of the bean *Phaseolus vulgaris* establish a symbiotic relationship with the soil bacteria *Rhizobium etli*. This biologically relevant process involves the exchange of signals between bacterial and root cells [1,2] that trigger ion fluxes (Ca²⁺, K⁺, and Cl⁻) across the membrane of root hair cells [3]. The transport systems responsible for these fluxes are not yet well determined. Therefore, given that ion channels play a key role in signal transduction in all kinds of cells [4], we became interested in characterizing the ion channels present in the plasma membrane of bean root cells, in order to gain insight into the molecular events that take place during the symbiotic process.

Taking into account the fact that the cell wall hinders direct electrophysiological, patch-clamp recording, we have followed the alternative approach of incorporating the ion channels present in the plasma membrane of bean root cells into black lipid membranes (BLMs) to study them under voltage clamp conditions [5].

Here, we report the first description of a voltage-dependent, high conductance, and chloride-permeable

channel present in the plasma membrane of bean root cells. The channel excludes the passage of cations (K⁺, Na⁺, and Ca²⁺) and is inhibited by micromolar concentrations of Zn²⁺ ions.

Materials and methods

Enriched fractions of plasma membrane (PM) vesicles from bean roots were prepared as previously described [6]. The PM-enriched preparation shows ~38% vacuolar and ~2% mitochondrial membrane contamination, as assessed by measurements of ATPase-P [7], PPIase [8], and cytochrome *c* oxidase activities [9].

Black lipid membranes (BLMs) were formed from a 20 mg/ml solution of diphytanoylphosphatidylcholine (DPhPC) (Avanti Polar Lipids) in *n*-decane (Merck), on a 250 µm diameter hole separating two Teflon compartments of a cell (Warner), by the brush technique of Muller and Rudin [10]. The front (*cis*) compartment, where PMs were added, was filled with (in millimolar): 300 XCl, 10 CaCl₂, and 10 Hepes-X, pH 7.2, where X stands for K or Na, as indicated. The rear (*trans*) compartment was filled with (in millimolar): 150 KCl, 1 CaCl₂, and 10 Hepes-K, pH 7.2. The osmotic gradient across the BLM and the high *cis* [Ca²⁺] facilitate the fusion of membrane vesicles with BLM [11]. Experiments were performed at room temperature (20–24 °C). Currents were recorded under voltage-clamp conditions with an Axopatch 1D amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). Two Ag-AgCl electrodes were used to connect the rear, *trans*, compartment to the headstage

* Corresponding author. Fax: +52-77-73-17-23-88.

E-mail address: froylan@ibt.unam.mx (F. Gómez-Lagunas).

(CV-4B) of the amplifier and the *cis* compartment to ground, respectively. The current output of the amplifier was stored in VHS tapes with the use of a modified digital audio processor connected to a VCR [12]. Currents were low pass-filtered at 20kHz and

sampled at 50kHz with a Digidata 1322A interface (Axon Instruments). Channel analysis was done with pClamp 8.0 software (Axon Instruments). Results are expressed as means \pm SEM of the indicated number of experiments.

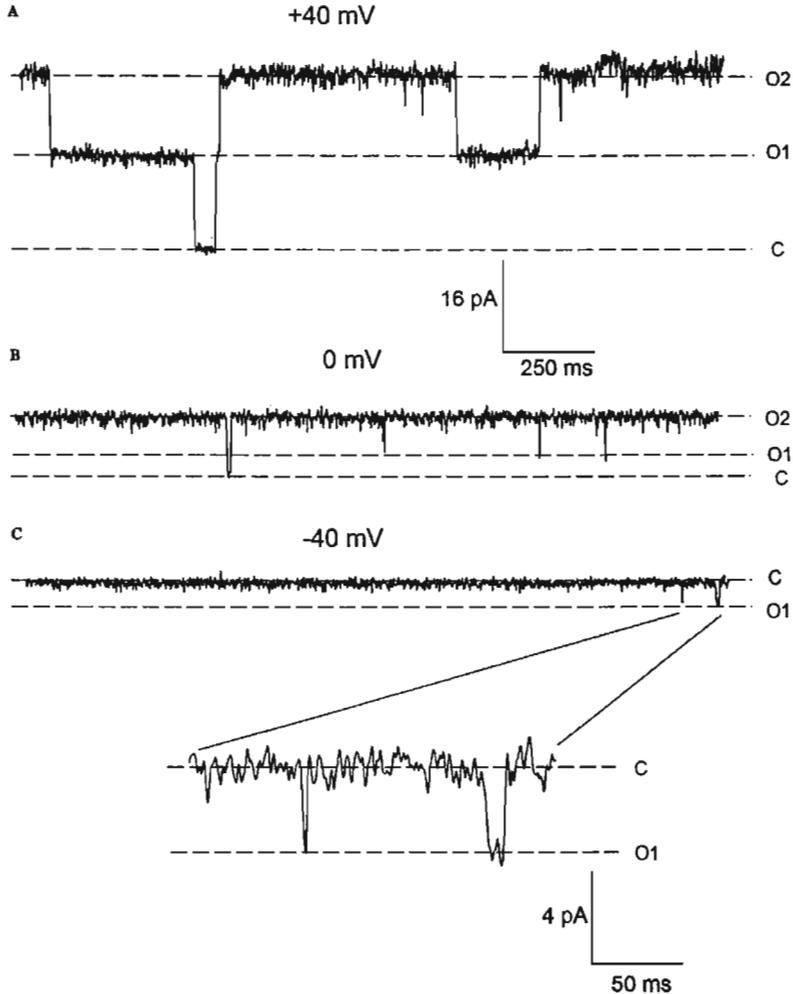


Fig. 1. Current through a Cl⁻-permeable channel incorporated into a DPhPC planar membrane. (A) Channel current at +40 mV (see Materials and methods). The channel fluctuates among two high conductance substates (labeled O₁, O₂) and the zero-current level (labeled C), being open most of the time. (B) Current at 0 mV. (C) Current at -40 mV. At negative potentials the channel remains closed most of the time. *cis* (mM): 300 KCl, 10 CaCl₂ and *trans* (mM): 150 KCl, 1 CaCl₂. Buffer was 10 HEPES, pH 7.2, on both sides. Traces were filtered at 200 Hz with pClamp 8.

Results and discussion

Single channel currents of a chloride-permeable bean root channel

At the beginning of every experiment a ± 100 mV control pulse was routinely applied. Membranes showing instability were discarded. After applying the control pulse, root PMs were added at 5–100 μ g protein/ml to the *cis* compartment and single channel currents were observed within ~ 0.5 –60 min.

Fig. 1 shows single channel currents from a Cl^- -permeable channel present in our bean root PM fraction. At *trans*-positive voltages (*cis* side is grounded, see Materials and methods), the channel presents a high probability of being open (see below), and random transitions between the closed, zero current level (labeled C), and two high conductance substates (O_1 , O_2) are observed. This is clearly seen in the top panel that shows the single channel current at +40 mV. The middle panel shows the current at 0 mV. Note that the channel is still open most of the time. In the 2-s trace, only a brief transition to the zero current level (C) is observed. The channel dwells most of the time in the substate of higher conductance O_2 . In contrast, at negative potentials (bottom panel, -40 mV) the channel exhibits a very low probability of being conductive. Only scant, brief transitions from the zero current level to the lower conductance substate (O_1) are observed.

At 0 mV current is positive, which could be accounted for either by a flux of cations from the *trans* to the *cis* side of the membrane, or by the passage of anions moving passively in the opposite direction. Taking into account the composition of the solutions across the membrane (see Fig. 1 legend), the polarity of the current indicates that at 0 mV there is a flux of anions (Cl^-) from the *cis* to the *trans* side of the membrane, which shows that the incorporated channel is permeable to Cl^- ions.

The anionic selectivity of the channel is best seen in Fig. 2A that presents the unitary current vs. voltage relationship with either KCl (filled circles) or NaCl (open circles) solutions in the *cis* side of the membrane. Note that with both solutions: (a) the channel exhibits two conductance substates (O_1 , O_2 in Fig. 1) and (b) the least-squares lines through the points corresponding to either the O_1 ($\gamma = 293$ pS) or the O_2 ($\gamma = 570$ pS) substates cross the voltage axis (zero-current-voltage) at negative potentials, of either -23.2 or -18.2 mV, respectively, near the Nernst potential of Cl^- ions, $E_{\text{Cl}} = -19$ mV. This demonstrates that the channel excludes the passage of the cations present in the bilayer chamber, all of which have positive Nernst potentials (Na^+ , K^+ , and Ca^{2+}), allowing the selective flux of chloride ions through it.

It is known that the CIC family of chloride channels characteristically presents a double-barreled structure,

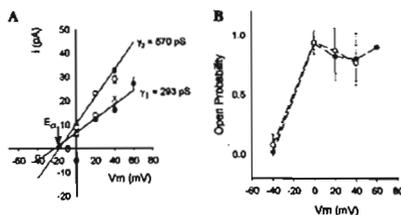


Fig. 2. Conductance and voltage dependence of the bean root Cl^- channel. (A) Single channel current vs. voltage relationship. The plot gathers observations from independent recordings obtained with either 300 mM NaCl (\circ , $n = 4$) or KCl (\bullet , $n = 5$) *cis*-solutions, other conditions were like in Fig. 1. The arrow points at the theoretical Nernst potential of Cl^- ions (-19 mV). Regardless of the main cation in the *cis* side, the channel presents two substates of high 293 pS (O_1 in Fig. 1) and 570 pS (O_2) conductance. The latter values are obtained from the slope of the least squares lines ($r(\text{O}_1 \text{ line}) = 0.98$; $r(\text{O}_2 \text{ line}) = 0.99$) through the points. (B) Open probability (P_o) as a function of the applied potential. Just like the two conductances, P_o values are also independent of the main cation (K^+ or Na^+) present in *cis*. P_o was determined as the fraction of time that the channel is open at the indicated voltages. The points are means \pm SEM of at least three experiments. The line through the points has no theoretical meaning.

with two independent pores, whose probability of opening is binomially distributed [13,14]. In the case of the bean Cl^- channel, the observations at -40 mV, where only the O_1 open level is observed, as well as the statistical analysis of the traces at positive voltages (not shown), indicate that the frequency of the two conductance levels (O_1 , O_2) does not follow the binomial distribution. Therefore, our observations suggest that the channel does not belong to the CIC family of chloride channels.

The elevated Cl^- conductance of the incorporated channel (293 and 570 pS) is higher than those of other reported anionic channels of plant cells, recorded under similar $[\text{Cl}^-]$; e.g., the so-called R (rapid, 36–39 pS) and S (slow, 33 pS) PM channels of *Vicia faba* and *Xanthium strumarium* guard cells [15,16], the anionic PM channel (77 pS) of *Hordeum vulgare* [17], the high conductance (200 pS) PM channel of *Anaranthus tricolor* [18], the stretch-activated channel (27 pS) of *V. faba* [19], and tonoplast anion channels of *Chara* (48 pS) [20]. On the other hand, regarding the bean *P. vulgaris*, to our knowledge only two types of channels have been reported previously. Both were recorded in coat protoplasts and were found to be non-selective (therefore, they are clearly different to the Cl^- channel here studied), namely: one slowly activating, and presenting a permeability ratio PK: $\text{PCl} \sim 2.9$, the other is fast activating with PK: $\text{PCl} \sim 2.5$ [21]. Thus, the Cl^- conductance here studied represents a previously undescribed channel of plant cells.

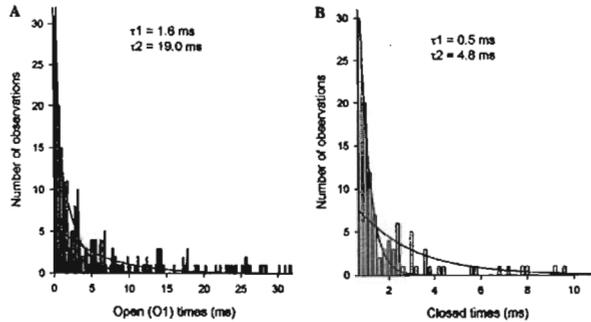


Fig. 3. Distribution of closed and open (O_1) dwell times. (A) O_1 state dwell time distribution. The distribution is well fitted by two exponentials (lines) with time constants $\tau_1 = 1.6$ ms and $\tau_2 = 19$ ms; and amplitudes $A_1 = 6$ and $A_2 = 101$ events. (B) Closed state dwell time distribution. The distribution is well fitted by the sum of two exponentials with $\tau_1 = 0.5$ ms and $\tau_2 = 4.8$ ms; and amplitudes $A_1 = 8$ and $A_2 = 43$ events. The histograms were obtained from a 1-min recording at $+20$ mV in 300 mM KCl (*cis*); 150 mM KCl (*trans*).

Fig. 2B presents the probability of opening as a function of the membrane potential. As already noticed in Fig. 1, the channel is markedly voltage-dependent, with high probability of opening (P_o) at 0 and *trans*-positive potentials, and a very low P_o at negative potentials, where only scant, brief, transitions to the O_1 substate are observed.

In a channel that presents several conductance substates, dwelling times as well as transitions among the states cannot be determined without ambiguity. In the case of the Cl^- channel, in three experiments, during a 1-min recording at $+20$ mV, we only observed fluctuations between the zero and the O_1 (293 pS) current levels. We therefore used these experiments to determine the distribution of the closed and O_1 state durations. The results in Fig. 3A illustrate that the open O_1 dwell time distribution was well fitted by two exponentials, with time constants $\tau_1 = 1.6$ ms and $\tau_2 = 19$ ms. The closed dwell time was also well fitted by the sum of two exponentials, with $\tau_1 = 0.5$ ms and $\tau_2 = 4.8$ ms. Thus, in those experiments, at the steady state conditions of planar bilayer recordings, the channel dwells in the O_1 conductance state with either short (1.4 ± 0.3 ms, $n = 3$) or long lasting (19.0 ± 0.2 ms, $n = 3$) mean times, from which it fluctuated to the zero current level either briefly (0.3 ± 0.2 ms, $n = 3$) or with longer mean closing times (4.7 ± 2.5 ms, $n = 3$).

Channel inhibition by Zn^{2+} ions

It is known that Zn^{2+} inhibits Cl^- channels of both plant and animal cells [20,22], e.g., Zn^{2+} inhibits R but not S anionic plant channels [15,23]. Therefore, we tested the effect of this divalent cation on the bean root Cl^- channel. Fig. 4 presents the results of a representative

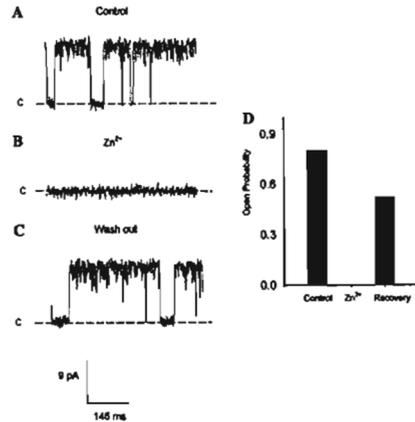


Fig. 4. Channel inhibition by Zn^{2+} ions. (A) Control currents at $+20$ mV. (B) Current left after the addition of $100 \mu M$ $ZnCl_2$ to both sides of the membrane. In the presence of Zn^{2+} , the channel remains non-conductive. (C) Current recovery after washing the bilayer compartments with the control solutions. (D) Open probability of the whole traces in A–C. Recording conditions were like in Fig. 1.

experiment. Fig. 4A, left panel, shows a control trace at $+20$ mV. As expected (Fig. 2B) the channel is open most of the time. Fig. 4B shows that the subsequent addition of $100 \mu M$ Zn^{2+} to both sides of the membrane completely inhibited the current through the channel. The inhibitory effect was partly reversed by the removal of Zn^{2+} from the chamber solutions (Fig. 4C). The above

observations are summarized in Fig. 4D that presents the open (conducting) probability of the channel before, during, and after the addition of Zn^{2+} , as indicated. After Zn^{2+} removal, the channel conducted again, although with smaller P_o , maybe because of an incomplete washout of Zn^{2+} . A similar behavior was observed in two other bilayers but in those cases the membrane broke before the completion of the experiments.

We have presented the first characterization of a voltage-dependent, high conductance, and anion-selective channel from bean root cells. The channel is not likely to have a mitochondrial origin since the contamination of our preparation by mitochondrial membranes is low (~2%), and the properties of the well-known voltage-dependent anionic channel (VDAC) present in the outer mitochondrial membrane [24] are different to those of the Cl^- conductance of bean roots. Although the origin of the channel (plasma membrane or tonoplast) remains to be determined, its marked voltage-dependence as well as its elevated conductance suggest that it may play important roles in the physiology of bean root cells. The possible participation of this, not previously described, Cl^- channel in the symbiotic interaction between bean and *R. etli* cells is currently under investigation.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. S. Gilroy and Dr. M. Villanueva for their comments on the manuscript. This work was partially supported by Grants IN200800, IN211600-2, and IN209202 from DGAPA-UNAM, and 33056-N, and 40690-Q from CONACYT. D. Balleza was supported by a CONACYT PhD scholarship 94079.

References

- [1] A.M. Hirsch, M.R. Lum, J.A. Downie, What makes the Rhizobia-Legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* 127 (2001) 1484–1492.
- [2] L. Cárdenas, T.L. Holdaway-Clarke, F. Sánchez, C. Quinto, J.A. Fejón, J.G. Kunkel, P.K. Hepler, Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant Physiol.* 123 (2000) 443–452.
- [3] H.H. Felle, Á. Kondorosí, É. Kondorosí, M. Schultze, The role of ion fluxes in Nod factor signaling in *Medicago sativa*, *Plant J.* 13 (1998) 455–463.
- [4] B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 2000.
- [5] W. Hanke, W.R. Schulz, *Planar Lipid Bilayers. Methods and Applications*. Academic Press, London, 1993.
- [6] R.J. Davenport, M. Tester, A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat, *Plant Physiol.* 122 (2000) 823–834.
- [7] B.N. Ames, Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphates. *Methods Enzymol.* 8 (1966) 115–118.
- [8] P. Druceck, R. Schinzl, D. Palm, Photometric microtiter assay of inorganic phosphate in the presence of acid-labile organic phosphates. *Anal. Biochem.* 230 (1995) 173–177.
- [9] J. García-Soto, M. Mourelle, I. Vargas, L. de la Torre, E. Ramírez, A.M. López-Colome, A. Darzón, Sea urchin sperm head plasma membranes: characteristics and egg jelly induced Ca^{2+} and Na^+ uptake, *Biochim. Biophys. Acta* 994 (1988) 1–12.
- [10] P. Mústler, D.O. Rudin, Biomolecular lipid membranes: techniques of formation, study of electrical properties, and induction of gating phenomena, in: M. Passow, R. Stampfli (Eds.), *Laboratory Techniques of Membrane Biophysics*, Springer-Verlag, Berlin, 1969, pp. 141–156.
- [11] F.S. Cohen, J. Zimmerberg, A. Finkelstein, Fusion of phospholipid vesicles with planar phospholipid bilayer membranes. II. Incorporation of a vesicular membrane marker into the planar membrane. *J. Gen. Physiol.* 75 (1980) 251–270.
- [12] F. Bezanilla, A high capacity data recording device based on a digital audio processor and a video cassette recorder, *Biophys. J.* 47 (1985) 437–441.
- [13] C. Miller, Open-state structure of single chloride channels from *Taraxaco* electroplax. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 299 (1982) 401–411.
- [14] T.J. Jenisch, T. Friedrich, A. Schriever, H. Yamada, The Cl^- channel family. *Plügers Arch.* 437 (1999) 783–795.
- [15] B.U. Keller, R. Hedrich, K. Raschke, Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells, *Nature* 341 (1989) 450–453.
- [16] B. Linder, K. Raschke, A slow channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing, *FEBS Lett.* 313 (1992) 27–30.
- [17] L.H. Wegner, K. Raschke, Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots (a procedure to isolate protoplasts from this tissue and a patch-clamp exploration of salt passageways into xylem vessels), *Plant Physiol.* 105 (1994) 799–813.
- [18] B.R. Terry, S.D. Tyerman, G.P. Findlay, Ion channels in the plasma membrane of *Amaranthus* protoplasts: one cation and one anion channel dominate the conductance, *J. Membr. Biol.* 121 (1991) 223–236.
- [19] D.J. Cosgrove, R. Hedrich, Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in the plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L., *Planta* 186 (1991) 143–153.
- [20] G. Berecki, Z. Varga, F. Van Iren, B. Van Duijn, Anion channels in *Chara corallina* tonoplast membrane: calcium dependence and rectification, *J. Membr. Biol.* 172 (1999) 159–168.
- [21] W.H. Zhang, M. Skerrett, N.A. Walker, J.W. Patrick, S.D. Tyerman, Nonselective currents and channels in plasma membranes of protoplasts from coats of developing seeds of bean, *Plant Physiol.* 128 (2002) 388–399.
- [22] B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, third ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2001.
- [23] J.I. Schroeder, C. Schmidt, J. Sheaffer, Identification of high-affinity slow anion channel blockers and evidence for stomatal regulation by slow anion channels in guard cells, *Plant Cell* 12 (1993) 1831–1841.
- [24] H. Abrecht, R. Watzig, J.M. Ruyschaert, F. Homble, Purification and characterization of two voltage-dependent anion channel isoforms from plant seeds, *Plant Physiol.* 124 (2000) 1181–1190.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrecht, H., Wattiez, J.M., Ruyschaert, F. y Hombie. 2000. Purification y characterization of two voltage-dependent anion channel isoforms from plant seeds. *Plant Physiol.* 124(3): 1181-1190.
- Allen, G.J. y Sanders, D. 1996. Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium. *Plant J.* 10(6): 1055-1069
- Álvarez, O., Benos, D. y Latorre, R. 1985. The Study of Ion Channels in Planar Lipid Bilayer Membranes. *J. Electrophysiol. Tech.* 12: 159-77.
- Ames, B. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate y phosphatases. *Methods Enzymol.* 8: 115-8.
- Ané, J.M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetza, R.V., Oldroyd, G.E., Ayax, C., Levy, J., Debelle, F., Baek, J.M., Kalo, P. 2004. *Medicago truncatula* DM1 required for bacterial y fungal symbioses in legumes. *Science* 303: 1364-1367
- Armstrong C.M., Binstock L. 1965. The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. *J. Gen. Physiol.* 48:859-872
- Assmann, S.M. 1995. Electrifying Symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 1795-1796.
- Balleza, D., Quinto, C., Sánchez, F. y Gómez-Lagunas, F. 2003. A chloride-permeable channel from *Phaseolus vulgaris* roots incorporated into planar lipid bilayers. *Bioch. and Biophys. Res. Comm.* 307: 114-118.
- Barbier-Brygoo, H., Vinauger, M., Colcombet, J., Ephraïkhine, G., Frachisse, J.-M. y Laurel, M. 2000. Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochim. et Biophys. Acta* 1465 (2000) 199-218.
- Bibikova TN, Zhigilev A, Gilroy S. 1997. Root hair growth in *Arabidopsis thaliana* is directed by calcium and an endogenous polarity. *Planta.* 203(4):495-505.
- Bibikova T.N., Jacob T., Dahse I., Gilroy S. 1998. Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* 125(15):2925-34.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.
- Brownlee, C. 2003. Plant signalling: calcium first y second. *Curr Biol.* 13(23): R923-4.
- Buchanan, B.B., Grulisse, W. y Jones, R.L. 2000. *Biochemistry y Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Bush, D.S. 1995. Calcium Regulation in Plant Cells and its Role in Signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 95-122.
- Carden, D.E., Felle H.H. 2003. The mode of action of cell wall-degrading enzymes y their interference with Nod factor signalling in *Medicago sativa* root hairs. *Planta* 216(6):993-1002.
- Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Feljo, J., Pérez, H., Sánchez, F., Kunkel, J., Hepler, P. y Quinto, C. 1998. *Rhizobium* Nodulation Signals Induce Calcium Changes y Actin Cytoskeleton Rearrangements in Plant Root Hair Cells. In *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*, C. Elmerich et al., eds. (Netherlands: Kluwer Academic Publishers). pp. 215-216.
- Carpaneto, A., Cantù, A.M., Busch, H. y Gambale, F. 1997. Ion channels in the vacuoles of the seagrass *Posidonia oceanica*. *FEBS Lett.* 412(1): 236-40.
- Charron, D., Pingret, J.-L., Chabaud, M., Jourmet, E.-P. y Barker, D.G. 2004. Pharmacological evidence that multiple phospholipid signaling pathways link *Rhizobium* Nodulation Factor perception in *Medicago truncatula* root hairs to intracellular responses, including Ca²⁺ spiking and Specific *ENOD* gene expression. *Plant Physiol.* 136: 1-12.
- Cherel, I. 2004. Regulation of K⁺ channel activities in plants: from physiological to molecular aspects. : *J Exp Bot.* 55(396): 337-351.
- Cohen, F.S., Zimmerberg, J. y Finkelstein, A. 1980. Fusion of Phospholipid Vesicles with Planar Lipid Bilayer Membranes: II. Incorporation of a Vesicular Membrane Marker into the Planar Membrane. *J. Gen. Physiol.* 75: 251-70.
- Coronado, R. y Latorre, R. 1983. Formation of Phospholipid Bilayers on Patch-clamp Pipettes. *Biophys. J.* 43: 231-6.
- Cosgrove, D.J., y Hedrich, R. 1991. Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 186, 143-153.
- Cullimore, J. y Dénarié, J. 2003. How legumes select their sweet talking symbionts. *Science.* 302(5645): 575-8.
- Crñado, M. y Keller, B. U. 1987. A Membrane Fusion Strategy for Single Channel Recording of Membranes usually non-accessible to Patch-clamp Pipette Electrodes. *FEBS Lett.* 224: 175-6.
- Darszon, A. 1986. Planar Bilayers: A Powerful Tool to Study Membrane Proteins Involved in Ion Transport. *Methods in Enzymol.* 127: 486-502.
- Davenport, R.J. y Tester, M. 2000. A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiol.* 122: 823-834.
- Demidchik V., Davenport R.J., y Tester M. 2002. Nonselective cation channels in plants. *Annual Rev. Plant Biol.* 53:67-107.
- Demidchik V. y Tester M. 2002. Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 128:379-87.
- Dénarié, J., Debelle, F. y Promé, J.C. 1996. *Rhizobium* Lipo-chitoooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 503-535.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T. y Neill, S.J. 2004. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.* 55:205-12.
- D'Haese, W., y Holsters M. 2002. Nod factor structures, responses, y perception during initiation of nodule development. *Glycobiology.* 12(6):79R-105R.
- Dittmer, H.J. 1949. Root hair variation in plant species.

- Am. J. of Botany. 36: 152-155.
- Dutzler, R., Campbell, E.B., Cadene, M., Chait, B.T., y MacKinnon, R. 2002. X-ray structure of a Cl⁻ channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415(6869): 287-294.
- Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M. y Long, S.R. 1992. Depolarization of alfalfa root membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science*. 256: 998-1000.
- Ehrhardt, D.W., Wais, R. y Long, S.R. 1996. Calcium Spiking in Plant Root Hairs Responding to *Rhizobium* Nodulation Signals. *Cell*. 85: 7-20.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P. y Kiss, G.B. 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*. 417: 962-6.
- Engstrom, E.M., Ehrhardt, D.W., Mitra, R.M. y Long, S.R. 2002. Pharmacological analysis of nod factor induced calcium spiking in *Medicago truncatula*. Evidence for the requirement of type IIA calcium pumps y phosphoinositide signaling. *Plant Physiol*. 128: 1390-1401.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. y Schultze, M. 1995. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. *The Plant J*. 7: 939-947.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. y Schultze, M. 1996. Rapid alkalinization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitooligosaccharide signals. *The Plant J*. 10: 295-301.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. y Schultze, M. 1998. The Role of Ion Fluxes in Nod Factor Signalling in *Medicago sativa*. *The Plant J*. 13: 455-463.
- Fisher, R. F. y Long, S.R. 1992. *Rhizobium*-plant Signal Exchange. *Nature*. 357: 655-660.
- Furman R.E. y Tanaka, J.C. 1990. Monovalent Selectivity of the Cyclic Guanosine Monophosphate-activated Ion Channel. *J. Gen. Physiol*. 96: 57-82.
- García-Soto, J., Mourelle, M., Vargas, I., de la Torre, L., Ramirez, E., López-Colome, A.M. y Darazon, A. 1988. Sea urchin sperm head plasma membranes: characteristics and egg jelly induced Ca²⁺ and Na⁺ uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 994: 1-12.
- Geelen, D., Lurin, C., Bouchez, D., Frachisse, J.M., Lelievre, F., Courtial, B., Barbier-Brygoo, H. y Maurel, C. 2000. Disruption of putative anion channel gene *AtCLC-a* in *Arabidopsis* suggests a role in the regulation of nitrate content. *Plant J*. 2000 21(3): 259-267.
- Gehring, C.A., Irving, H.R., Kabbara, A.A., Parish, R.W., Boukii, N.M. y Broughton, W.J. 1997. Rapid, Plateau-like Increases in Intracellular Free Calcium Are Associated with Nod-Factor-Induced Root-Hair Deformation. *MPMI*. 10: 791-802.
- Giles, E.D., Oldroyd, D. y Downie, A. 2004. Calcium, Kinases and Nodulation Signalling in Legumes. *Nature Reviews Mol. Cell Biol*. 5: 566-576.
- Hedrich, R. 1995. Technical Approaches to studying Specific Properties of Ion Channels in Plants. En: *Single-Channel Recording*. 2nd. Ed. by B. Sakmann y E. Neher. Plenum Press. NY y London. pp 277-305.
- Hedrich, R., Busch, H., y Raschke, K. (1990). Ca²⁺ and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO J*. 9, 3889-3892.
- Hille, B. 2001. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. (3ra. ed.), Sinauer Associates, Sunderland, MA (2001).
- Hille, B. y Schwarz, W. 1978. Potassium Channels as Multi-Ion Single-File Pores. *J. Gen. Physiol*. 72: 409-42.
- Hirsch, A.M., Lum, M.R. y Downie, J.A. 2001. What makes the *Rhizobia*-Legume symbiosis so special? *Plant Physiol*. 127: 1484-1492.
- Hodges, T.K. y Mills, D. 1986. Isolation of the plasma membrane. *Methods Enzymol* 118: 41-54.
- Hunt, L. y Gray, J.E. 2001. ABA signalling: a messenger's FIERY fate. *Curr. Biol*. 27;11(23):R968-70.
- Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F. y Zdebik, A.A. 2002. Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels. *Physiol Rev*. 82: 503-568.
- Johannes, E., Brosnan, J.M. y Sanders, D. 1991. Calcium Channels y Signal Transduction in Plant Cells. *BioEssays*. 13: 331-336.
- Karley, A.J., Leigh, R.A. y Sanders, D. 2000. Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells. *Trends in Plant Sc*. 5: 465-470.
- Kijne, J.W. 1992. The *Rhizobium* infection process. In *Biological Nitrogen Fixation*, G. Stacey, R.H. Burris y H.J. Evans, eds. (NY : Chapman y Hall). pp. 349-398.
- Klughammer, B., Benz, R., Betz, M., Thume M. y Dietz, K.J. 1992. Reconstitution of vacuolar ion channels into planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1104:308-16.
- Kürz, L., Wagner, S., George, A.L. Jr. y Rudel, R. 1997. Probing the major skeletal muscle chloride channel with Zn²⁺ y other sulfhydryl-reactive compounds. *Pflugers Arch*. 433(3): 357-363.
- Kurkdjian, A.C. 1995. Role of the Differentiation of Root Epidermal Cells in Nod Factor (from *Rhizobium meliloti*)-Induced Root-Hair Depolarization of *Medicago sativa*. *Plant Physiol*. 107: 783-790.
- Larsson, C. 1984. Sidedness of plant plasma membrane vesicles purified by partitioning in aqueous two-phase systems. *FEBS Letters* 171: 271-276.
- Larsson, C. 1985. Plasma membranes. En: *Modern Methods of Plant Analysis*. New Series (H.F. Linkens y J.F. Jackson, eds.), Vol. I, pp. 85-104. Springer-Verlag, Berlin.
- LeMasurier, M.L., Heginbotham, L. y Miller, C. 2001. KcsA: It's a Potassium Channel. *J. Gen. Physiol*. 118: 303-313.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemsse, J., Bisseling, T. y Geurts, R. 2003. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science*. 302: 630-633.
- Maduke, M., Miller, C. y Mindell, J.A. 2000. A Decade of Cl⁻ Chloride Channels: Structure, Mechanism, and many unsettled questions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*. 29: 411-438.
- Maathuis, F.J.M., Ichida, A.M., Sanders, D. y Schroeder, J.I. 1997. Roles of Higher Plant K⁺ Channels. *Plant Physiol*. 114: 1141-1149.

- Miller, C. 1982. Open-state substructure of single chloride channels from *Torpedo* electroplax. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 299: 401-411.
- Miller, C. (ed.). 1986. *Ion Channel Reconstitution*. Plenum, New York, 577 pp.
- Mills, J., Schwiebert, E y Stanton, B. 1994. The cytoskeleton and membrane transport. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 3: 529-34.
- Mitchell CH, Wang L, Jacob T.J. 1997. A large-conductance chloride channel in pigmented ciliary epithelial cells activated by GTP γ S. *J Membr Biol.* 158(2):167-75.
- Montal, M. y Mueller, P.U. 1972. Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of their Electrical Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69: 3561-6.
- Mueller, P.U., Rudin, D.O., Tien, H.T., y Wescott, W.C. 1962. Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System. *Nature.* 194: 979-80.
- Nilius, B. y Droogmans G. 2003. Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand.* 177(2):119-47.
- Nilius, B., Eggemont, J., Voes, T. y Droogmans, G. 1996. Volume-activated Cl⁻ channels. *Gen. Pharmacol.* 27: 1131-1140.
- O'Neill, S.D., Benett, A. B. y Spanswick, R.M. 1983. Characterization of a NO₃⁻ - Sensitive H⁺-ATPase from Com Roots. *Plant Physiol.* 72: 837-846.
- O'Neill, S.D. y Spanswick, R.M. 1984. Effects of Vanadate on the Plasma Membrane ATPase of Red Beet y Com. *Plant Physiol.* 75: 586-591.
- Persson, A. y Jergil, B. 1992. Purification of plasma membranes by aqueous two-phase affinity partitioning. *Anal Biochem.* 204(1):131-136.
- Pingret, J-L, Joumet, E-P y Barker, D.G. 1998. *Rhizobium* Nod Factor Signaling: Evidence for a G Protein-Mediated Transduction Mechanism. *The Plant Cell.* 10: 659-671.
- Poovaliah, B.W. y Reddy, A.S.N. 1993. Calcium and Signal Transduction in Plants. *Crit. Rev. Plant Sc.* 12: 185-211.
- Piñeros, M. y Tester, M. 1995. Characterization of a Voltage-dependent Ca²⁺-selective Channel from Wheat Roots in Planar Lipid Bilayers. *Planta* 195: 478-88.
- Poovaliah, B.W. y Reddy, A.S. 1993. Calcium and signal transduction in plants. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 12:185-211.
- Radutolu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Gronlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J. 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature.* 425(6958): 585-92.
- Randall, D., Burggren, W. y French, K. 1998. *Fisiología animal. Mecanismos y Adaptaciones (Eckert)*. 4ª Edición. Editorial MacGraw-Hill. Interamericana.
- Randall, S.K., Wang, Y. y Sze, H. 1985. Purification y characterization of the soluble F₁-ATPase of oat root mitochondria. *Plant Physiol.* 79: 957-62.
- Sabirov RZ, Dutta AK, Okada Y. 2001. Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J Gen Physiol.* 118(3):251-66.
- Salisbury, F.B. y Ross, C.W. 1992. *Plant Physiology*, Fourth Ed. Wadsworth Pub. USA.
- Schindler, H. 1980. Formation of planar bilayers from artificial or native membrane vesicles. *FEBS Lett.* 122: 77-79.
- Schmidt, C. y Schroeder, J.I. 1994. Anion Selectivity of Slow Anion Channels in the Plasma Membrane of Guard Cells (Large Nitrate Permeability). *Plant Physiol.* 106(1):383-391.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M. y Waner, D. 2001. Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology y Plant Molecular Biology* 52: 627-658.
- Schultze, M. y Kondorosi, A. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Review of Genetics.* 32: 33-57.
- Schroeder, J.I., Kwak, J.M. y Allen, G.J. 2001. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature.* 410(6826): 327-330.
- Schwartz, A., Ilan, N., Schwarz, M., Scheaffer, J., Assmann S.M., Schroeder J.I. 1995. Anion-Channel Blockers Inhibit S-Type Anion Channels y Abscisic Acid Responses in Guard Cells. *Plant Physiol.* 109(2): 651-658.
- Shimogawara K. y Usuda H. 1993. A concentrating two-phase partitioning: its application to isolation of plasma membrane from maize roots. *Anal. Biochem.* 212(2):381-7.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczygowski, K., y Pamiske, M. 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial y fungal symbiosis. *Nature.* 417: 959-62.
- Stryer, L. 1995. *Biochemistry*. Freeman. New York.
- Takeda, Y. y Kasamo, K. 2002. Transmembrane topography of plasma membrane constituents in mung bean (*Vigna radiata* L.) hypocotyls cells. II. The large scale asymmetry of surface peptides, *Biochim Biophys Acta* 1558(1), 14-25.
- Tank, D.W. y Miller, C. 1983. Patch-Clamped Liposomes: Recording reconstituted ion channels. In *Single Channel Recording*. B. Sakmann y E. Neher, (eds.), Plenum Press, New York.
- Terry, B.R., Tyerman, S.D. y Findlay, G.P. 1991. Ion channels in the plasma membrane of *Amaranthus* protoplasts: one cation and one anion channel dominate the conductance. *J. Membr. Biol.* 121: 223-236.
- Tester, M. 1990. Plant Ion Channels: Whole-Cell and Single-Channel Studies. *New Phytol.* 114: 305-340.
- Tester, M. y Blatt, M.R. 1989. Direct Measurement of K⁺ Channels in Thylacoid Membranes by Incorporation of Vesicles into Planar Lipid Bilayers. *Plant Physiol.* 91: 249-52.
- Tester, M. y Davenport, R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot. (Lond).* 91(5):503-27.
- Tikhonova, L.I. 1998. Ionic channels of the vacuolar membrane of higher plants. *Membr Cell Biol.* 12(3): 301-318.
- Trewavas, A. y Knight, M. 1994. Mechanical Signalling, Calcium and Plant Fom. *Plant Mol. Biol.* 26: 1329-1341.

- van Rhijn, P. y Vanderleyden, J. 1995. The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59: 124-142.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Bohnert, H.J. and Pantoja, O. 1999. Salt stress in *Mesembryanthemum crystallinum* L. cell suspensions activates adaptive mechanisms similar to those observed in the whole plant. *Planta.* 207:426-35.
- Ward, J.M. 1997. Patch-Clamping y Other Molecular Approaches for the Study of Plasma Membrane Transporters Demystified. *Plant Physiol.* 114: 1151-1159.
- Ward, J.M., Pei, Z.-M. y Schroeder, J.I. 1995. Roles of Ion Channels in Initiation of Signal Transduction in Higher Plants. *The Plant J.* 7: 833-844.
- Ward, J.M. y Schroeder, J.I. 1994. Calcium-Activated K⁺ Channels and Calcium-Induced Calcium Release by Slow Vacuolar Ion Channels in Guard Cell Vacuoles Implicated in the Control of Stomatal Closure. *Plant Cell.* 6(5):669-683.
- Wegner, L.H. y Raschke, K. 1994. Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots (a procedure to isolate protoplasts from this tissue y a patch-clamp exploration of salt passageways into xylem vessels), *Plant Physiol.* 105: 799-813.
- Weiser, T. 1993. Slowly-activating cation channels in the vacuolar membrane of plants. *EXS.* 66:305-10.
- White, P.J. 1993. Characterization of a High-conductance, Voltage-dependent Cation Channel from the Plasma Membrane of Rye Roots in Planar Lipid Bilayers. *Planta* 191: 541-51.
- White, P.J. 1996. The Permeation of Ammonium through a Voltage-independent K⁺ Channel in the Plasma Membrane of Rye Roots. *J. Membrane Biol.* 152, 89-99.
- White, P.J. y Tester, M. 1994. Using planar lipid-bilayers to study plant ion channels. *Physiol Plantarum* 91: 770-774.
- White, P.J. y Tester, M. 1992. Potassium Channels from the Plasma Membrane of Rye Roots Characterized following Incorporation into Planar Lipid Bilayers. *Planta* 186: 188-202.
- Widell, S., Lundborg, T. y Larsson, C. 1982. Plasma Membranes from Oats Prepared by Partition in an Aqueous Polymer Two-Phase System. *Plant Physiol.* 70: 1429-1435.
- Yang, T. y Poovaiah, B.W. 2003. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci.* 8(10):505-512.
- Zhang WH, Skerrett M, Walker NA, Patrick JW, Tyerman SD. 2002. Nonselective currents and channels in plasma membranes of protoplasts from coats of developing seeds of bean. *Plant Physiol.* 2002.128(2):388-99.
- Zimmerberg, J., Cohen, F.S y Finkelstein, A. 1980. Fusion of Phospholipid Vesicles with Planar Lipid Bilayer Membranes: I. Discharge of Vesicular Content across the Planar Membrane. *J. Gen. Physiol.* 75: 241-250.
- Zimmermann, S., Ehrhardt, T., Plesch, G. y Müller-Röber, B. 1999. Ion channels in signaling. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences.* 55: 183-203.
- Zonia, L. 2002. Oscillatory chloride efflux at the pollen tube apex has a role in growth and cell volume regulation y is targeted by inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. *The Plant Cell.* 14: 2233-46.



