



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
DEL CANAL DE MALATO DE LA  
MEMBRANA VACUOLAR DE LAS  
CÉLULAS GUARDA EN  
*Arabidopsis thaliana*

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

DULCE MARIA FIGUEIRAS FIERRO

DIRECTOR DE TESIS: DR. OMAR H. PANTOJA AYALA.  
MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

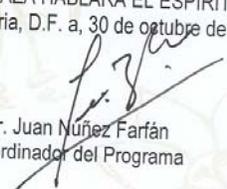
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de agosto del 2006, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la alumna **Figueiras Fierro Dulce María** con número de cuenta **504008797** con la tesis titulada: "**Identificación y caracterización del canal de malato de la membrana vacuolar de las células guarda en *Arabidopsis thaliana***" bajo la dirección del **Dr. Omar H. Pantoja Ayala**.

Presidente:	Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles
Vocal:	Dr. Froylán Miguel Gómez Lagunas
Secretario:	Dr. Omar H. Pantoja Ayala
Suplente:	Dra. Alicia Gamboa de Buen
Suplente:	Dr. Victor Valdés López

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 30 de octubre del 2006

  
Dr. Juan Nuñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

**La realización de este proyecto se financio por los apoyos de DGAPA IN229602, Beca CONACYT, Beca DGEP y por la DGIA de la UNAM.**

**Agradezco a mi Tutor:**

Dr. Omar H. Pantoja Ayala  
*Instituto de Biotecnología (IBT) UNAM.*

**A los miembros de mi Comité Tutorial:**

Dr. Omar H. Pantoja Ayala  
*IBT- UNAM.*

Dr. Froylán Gómez Lagunas  
*Facultad de Medicina UNAM.*

Dr. Víctor Valdés López  
*Facultad de Ciencias UNAM.*

**Así como a los miembros del Jurado**

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles  
*IBT- UNAM.*

Dr. Froylán Gómez Lagunas  
*Facultad de Medicina UNAM.*

Dr. Omar H. Pantoja Ayala  
*IBT- UNAM.*

Dra. Alicia Gamboa de Buen  
*Instituto de Ecología UNAM.*

**Dr. Víctor Valdés López**  
*Facultad de Ciencias UNAM.*

## TABLA DE CONTENIDO

LISTAS DE FIGURAS	2
LISTA DE TABLAS	2
RESUMEN	3
1. INTRODUCCION	5
1.1 CELULAS GUARDA	5
1.1.1 Apertura estomacal	8
1.1.2 Cierre estomacal	10
1.1.3 Canales iónicos en el tonoplasto de las células guarda	12
1.1.4 Señalización y transporte de calcio	18
1.1.5 Papel de malto <sup>2-</sup> en la fisiología vegetal	21
1.1.6 Compartimentalización vacuolar de malato <sup>2-</sup>	23
1.1.7 Malato <sup>2-</sup> como sustrato	24
2. HIPOTESIS	29
3. JUSTIFICACION	30
3. OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GENERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	31
4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	32
4.1 Condiciones de crecimiento de la plantas y material vegetal	32
4.2 Aislamiento de los protoplastos de las células guarda de <i>A. thaliana</i>	32
4.3 Purificación de los protoplastos de células guarda	34
4.4 Aislamiento de las vacuolas de las células guarda	34
4.5 Mediciones eléctricas	35
4.6 Soluciones	35
5. RESULTADOS	40
6. DISCUSION	57
7. PERSPECTIVAS	73
8. BIBLIOGRAFIA	74

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ambiente metabólico de malato	28
<b>Figura 2:</b> Imágenes de los tejidos y células obtenidos en los distintos pasos de aislamiento de las vacuolas de las células guarda.	38
<b>Figura 3:</b> Registro original de corrientes vacuolares de malato <sup>2-</sup> de una célula guarda e <i>Arabidopsis thaliana</i> .	46
<b>Figura 4:</b> Determinación del $E_r$ mediante el registro de las corrientes de cola.	48
<b>Figura 5:</b> Registro de $E_r$ por el protocolo de rampas voltaje.	52
<b>Figura 6:</b> Inhibición de las corrientes entrantes de malato <sup>2-</sup> por $H^+$ <sub>cit</sub> .	53
<b>Figura 7:</b> Efecto del pH <sub>cit</sub> sobre las corrientes vacuolares de malato <sup>2-</sup> .	54
<b>Figura 8:</b> Run- down de las corrientes de malato <sup>2-</sup> ..	55
<b>Figura 9</b> La sustitución de malato <sup>2-</sup> por fumarato <sup>2-</sup> conduce a la activación de Corrientes entrantes de mayor magnitud en vacuolas de células guarda:	57
<b>Figura 10:</b> Actividad de canal unitario.	58

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Valores del potencial de $E_{mal}$ calculados mediante la ecuación de Nernst y Obtenidos experimentalmente para las diferentes condiciones establecidas.	47
<b>Tabla 2:</b> Secuencias de permeabilidad reportadas para el canal vacuolar de malato <sup>2-</sup> , en distintas especies vegetales.	71

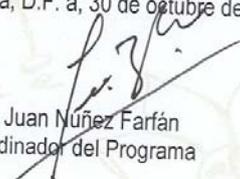
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de agosto del 2006, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la alumna **Figueiras Fierro Dulce María** con número de cuenta **504008797** con la tesis titulada: "**Identificación y caracterización del canal de malato de la membrana vacuolar de las células guarda en *Arabidopsis thaliana***" bajo la dirección del Dr. Omar H. Pantoja Ayala.

Presidente: Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles  
Vocal: Dr. Froylán Miguel Gómez Lagunas  
Secretario: Dr. Omar H. Pantoja Ayala  
Suplente: Dra. Alicia Gamboa de Buen  
Suplente: Dr. Víctor Valdés López

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 30 de octubre del 2006

  
Dr. Juan Nuñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

## RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la identificación y caracterización electrofisiológica de un canal iónico selectivo al anión orgánico malato<sup>2-</sup> localizado en la membrana vacuolar de las células guarda de *Arabidopsis thaliana*. Esta proteína es parcialmente responsable de la acumulación de malato<sup>2-</sup> en el compartimento vacuolar, necesario para mantener el equilibrio de cargas, como resultado del aumento del K<sup>+</sup> dentro de dicho organelo durante el proceso de la apertura estomatal. De acuerdo a reportes en la literatura, la membrana vacuolar posee una diferencia de potencial eléctrico igual a +30 mV y una concentración de malato<sup>2-</sup> citoplásmica fisiológica en las células guarda de 10 mM; Se ha sugerido que bajo estas condiciones fisiológicas, la actividad del canal de malato<sup>2-</sup> posiblemente permite la acumulación de malato<sup>2-</sup> a niveles cercanos de 500 mM, suficiente para balancear a las cargas positivas del K<sup>+</sup> dentro de la vacuola de las células guarda durante la apertura estomatal, donde la acumulación de K<sup>+</sup> puede ser hasta de 400 mM. Estos datos indican que la acumulación de malato<sup>2-</sup>, mediada por el canal iónico descrito en este trabajo, es probablemente uno de los principales mecanismos responsables de la apertura estomatal. Los datos electrofisiológicos obtenidos en células guarda muestran que la actividad del canal de malato<sup>2-</sup> en este tipo celular, es el principal contribuyente de la corriente aniónica vacuolar. Dicho canal es altamente selectivo a malato<sup>2-</sup> y fumarato<sup>2-</sup>. La actividad del canal de malato<sup>2-</sup> detectada, no requirió de la adición de una cinasa para su activación; Sin embargo, las corrientes vacuolares de este canal de dicarboxilatos mostraron “run-down” (desaparición de la actividad de las corrientes iónicas). Con base en nuestros resultados, y en las evidencias existentes, consideramos la posibilidad de que el “run-down” del canal vacuolar de las células guarda, sea resultado de una defosforilación generada por la activación de una

fosfatasa por las condiciones experimentales que impidieron mantener al canal en su estado activo. Nuestros resultados mostraron que el canal de malato<sup>2-</sup> es regulado negativamente por la acidificación del pH citoplásmico. Esta regulación ocurrió dentro de rangos de pH fisiológicos, sugiriendo que bajo condiciones que causen la acidificación del citoplasma como el aumento en las concentraciones de CO<sub>2</sub> apoplástico y/o el inicio del periodo oscuro, es posible que se induzca el cierre de los estomas. La actividad del canal vacuolar de malato<sup>2-</sup> fue observada en concentraciones de Ca<sup>2+</sup> fisiológicas. La disminución de dicha concentración causó una gran inestabilidad de las corrientes. Sin embargo, la actividad del canal de malato<sup>2-</sup> en concentraciones de Ca<sup>2+</sup> fisiológicas, indica que este canal juega un papel importante en la apertura y/o cierre de los estomas. Otro de los resultados importantes obtenidos es la selectividad del canal vacuolar a malato<sup>2-</sup> y fumarato<sup>2-</sup>, dos de los principales ácidos orgánicos en tejidos fotosintéticos, en esta especie vegetal. Si la concentración de fumarato<sup>2-</sup> en las células guarda es tan alta como la reportada para las hojas, podríamos proponer que el fumarato<sup>2-</sup> es el principal anión que balancea la carga del K<sup>+</sup> durante la apertura de los estomas. Por otro lado, la conductancia del canal fue mayor a fumarato<sup>2-</sup> que a malato<sup>2-</sup> (casi dos veces mayor), lo que sugiere que el fumarato<sup>2-</sup> es el dicarboxilato que se transporta principalmente a través del tonoplasto. Con base en las observaciones y en los resultados obtenidos en el presente trabajo proponemos que en las células guarda de *A. thaliana*, el anión orgánico que balancea la carga debida a la acumulación de K<sup>+</sup> es el fumarato<sup>2-</sup> y no el malato<sup>2-</sup>. Como consecuencia de esto, también proponemos que los altos niveles de fumarato<sup>2-</sup> en los tejidos fotosintéticos de *A. thaliana*, se deben a la acumulación de este dicarboxilato en la vacuola de las células respectivas. Los registros obtenidos demostraron que los componentes unitarios de la corriente vacuolar de las células guarda, son canales iónicos. Dichas corrientes unitarias,

se activaron únicamente a potenciales positivos con una conductancia para malato<sup>2-</sup> que varió entre 180 y 90 pS, y para fumarato<sup>2-</sup> varió entre 171 y 103 pS.



# **1 INTRODUCCION**

## **1.1 CELULAS GUARDA**

Los estomas son poros formados por un par de células especializadas, las células guarda. Estas células se localizan en la epidermis de las partes aéreas de la mayoría de las plantas superiores. Las células guarda abren el estoma y permiten la entrada del bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para su fijación, y su cierre evita la pérdida de vapor de agua, regulando así el intercambio gaseoso entre el espacio intercelular del tejido vegetal y el ambiente que la rodea (Blatt, 2000). Los estomas reciben un gran número de estímulos como la luz, el CO<sub>2</sub>, la temperatura, la humedad, la disponibilidad de agua en el suelo, la nutrición mineral, el viento y contaminantes atmosféricos, también reaccionan a señales endógenas como al ácido abscísico (ABA), auxinas y otras hormonas del crecimiento vegetal. La traducción de estas señales afecta la actividad de canales iónicos, bombas electrogénicas y el metabolismo celular. Los cambios en el tamaño del poro ocurren a los pocos minutos de la percepción del estímulo, ya sea incrementando o disminuyendo el volumen de las células guarda (Croxdale et al., 2001). Las células guarda también responden a señales foliares intrínsecas; como por ejemplo, la baja concentración interna de CO<sub>2</sub> resultado de una fotosíntesis activa, y a los niveles de la sacarosa del apoplasto de la hoja, un producto de la fotosíntesis en el mesófilo (Outlaw, 2003).

Las células guarda de *A. thaliana* en estado cerrado generalmente muestran una longitud de 10 µm y de 6 a 10 µm de diámetro, con un volumen celular promedio de 3 pl, mientras que en el estado totalmente abierto llegan alcanzar 12-14 µm. Los cambios en el volumen celular de las células guarda implican un incremento de dos a tres veces el del estado abierto con respecto al estado cerrado (Blatt et al. 1999). Las células guarda maduras carecen de plasmodesmatas (Wille & Lucas 1984), por lo que el flujo

de solutos y sales que regulan y generan los cambios en el volumen y turgor celular para el movimiento del estoma, ocurren principalmente a través de los sistemas de transporte localizados en las membranas plasmática y vacuolar (tonoplasto), lo que indican una actividad de transporte alta en comparación con otros tipos celulares.

Las células guarda son consideradas como el modelo más importante a nivel celular para estudiar la percepción de señales en plantas. Esto se debe a que estas células pueden funcionar autónomamente, están altamente diferenciadas, poseen una alta capacidad en el proceso de transporte a través de las membranas plasmática y vacuolar, además las membranas de sus organelos cuentan con una amplia variedad de transportadores, responden de manera rápida y reversible a diversas señales ambientales y son fácilmente accesibles por su ubicación. La importancia del estudio de estas células se debe a que participan en dos de los principales procesos en plantas, la fotosíntesis y la transpiración. Debido a las características que presentan estas células, se han podido estudiar funcionalmente tanto genes como proteínas que participan en las cascadas de señalización. Consecuentemente, se han desarrollado nuevas técnicas para el estudio de la señalización en las células guarda, que se han fortalecido combinándolas con otros métodos de biología molecular, biología celular, genética, biofísica, así como análisis de tipo genómico y proteómico. Debido a lo anterior, en estas células se han identificado un gran número de mecanismos de transducción de señales, así como de sus componentes, lo que ha permitido conocer y entender las interacciones entre los elementos que participan en las cascadas de señalización a nivel de célula única. A nivel genómico, se ha analizado la expresión de no menos de 8100 genes de *A. thaliana* (Beker et al., 2003; Birnbaum et al., 2003; Honys & Twell, 2003), de los cuales, 1309 transcritos se expresan significativamente en las células guarda. El análisis genómico comparativo entre células guarda y células del mesófilo ha detectado 64 transcritos expresados únicamente en células guarda. La caracterización del patrón de expresión genómico bajo diferentes condiciones en las células guarda, ha permitido la categorización funcional de los transcritos detectados en *A. thaliana*, donde el 4.9%

de éstos codifica para transportadores y canales iónicos, mientras que la mayoría de los genes identificados codifican para factores de transcripción, proteínas de transducción de señales como cinasas de proteínas, receptores de cinasas de proteínas, y proteínas de vías metabólicas (Harmer et al., 2000; Wang et al., 2000; Hugouvieux et al., 2001; Ghassemian et al., 2001; Chen et al., 2002; Leonhardt et al., 2004). Por otro lado, los elementos que se han identificado y caracterizado en la membrana plasmática y en el tonoplasto de las células guarda son canales iónicos que, junto con las respuestas metabólicas, controlan y regulan los movimientos de los estomas. Dichos elementos son blanco y/o forman parte de las vías de señalización, por lo que son componentes clave que nos permiten identificar y caracterizar a los reguladores en estas vías de señalización celular.

El intenso estudio realizado en las células guarda ha permitido el surgimiento de nuevos paradigmas sobre el transporte iónico, señalización y regulación del turgor celular. Estas células, representan un sistema de estudio muy específico para la percepción y respuesta a la luz. Este elemento es uno de los estímulos más estudiados y mejor caracterizados en plantas superiores (Devlin & Kay, 2000). Como muchas plantas, *A. thaliana* responde a los factores que producen la apertura estomatal, entre los que encontramos la luz roja (Serrano, 1988) y la luz azul (Assmann et al., 1985; Shimazaki et al., 1986). Una parte considerable de la investigación realizada al respecto se ha avocado a la identificación de los fotorreceptores, su compartimentalización y su regulación (Nagy et al., 2001). Los resultados de dichos estudios demuestran que la percepción de la señal luminosa se debe a la acción combinada de diferentes fotorreceptores. Entre éstos se cuentan los fitocromos (absorben luz roja, phyA-E), criptocromos (perciben la luz azul/UV-A, cry1 y cry2) y fototropinas (phot1 y phot2) (Ahmad et al., 1998; Casal, 2000; Christie & Briggs, 2001; Lin, 2000b; Nagy & Schafer, 2000). En algunos casos, los fotorreceptores actúan en forma independiente, en otros, dependiendo de las condiciones y estado de desarrollo de las plantas, pueden actuar en forma redundante o antagónica (Mazzella et al., 2001).

Los estudios de las respuestas de los fotorreceptores y sus intermediarios de señalamiento a nivel molecular han identificado a varios componentes de las vías de señalización en células guarda, como el GMPc, Ca<sup>2+</sup>-calmodulina y eventos de fosforilación/de-fosforilación de proteínas (Briggs & Huala, 1999; Casal, 2000; Christie & Briggs, 2001; Deng & Quail, 1999; Guo et al., 2001; Lin, 2000b). La amplia información que existe sobre la fisiología de las células guarda nos ha permitido conocer la plasticidad bioquímica de la célula vegetal en profundidad, mostrándonos algunos de los elementos que conforman las complicadas redes de percepción y transducción de señales (Outlaw, 2003).

### **1.1.1 Apertura estomatal**

La apertura de los estomas es causada por una gran variedad de estímulos, entre los que se encuentran la luz roja (Serrano et al., 1988), la luz azul (Assmann et al., 1985; Shimazaki et al., 1986; Zeiger & Zhu, 1998; Dietrich, 2001; Kinoshita et al., 2001; Olsen et al., 2002; Talbott et al., 2002; Zeiger et al., 2002; Talbott et al., 2003), auxinas (Lohse & Hedrich, 1992) y la toxina fusicoccina (Palmgren, 1998; Collinge et al., 1997). Todos estos estímulos tienen como factor común la estimulación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática de las células guarda. El bombeo de H<sup>+</sup> hacia el espacio extracelular por la H<sup>+</sup>-ATPasa hiperpolariza la membrana plasmática de las células guarda (el voltaje de membrana se vuelve más negativo que el basal de aproximadamente -100 mV, llegando a alcanzar hasta -150, -180 mV), lo que establece las condiciones necesarias para causar la toma de K<sup>+</sup> y otros solutos que son los responsables de aumentar su potencial osmótico, la consecuente toma de agua y el aumento en el turgor celular que finalmente causará el hinchamiento de las células guarda y la apertura del poro estomatal. La disposición radial de las microfibrillas de celulosa en las paredes de estas células fuerza al poro a abrirse cuando las células guarda se hinchan. La electroneutralidad en la célula esta dada por la toma de aniones

orgánicos e inorgánicos, sin embargo, las concentraciones relativas de dichos iones dependen de las fluctuaciones de los parámetros fisiológicos y ambientales

La toma de  $K^+$  por las células guarda es mediada por canales de  $K^+$  que muestran una rectificación entrante (permite la entrada del ión  $K^+$  pero no su salida;  $K^+_{in}$ ), lo cual causa que la concentración intracelular de este catión aumente, desde su nivel basal (cerca de 100 mM) hasta alcanzar concentraciones de entre 400-800 mM (Mühling y Sattelmacher, 1997; Felle et al., 2000). Además, la acidificación del medio externo celular de las células guarda asegura que el canal de  $K^+$  se abra únicamente cuando la  $H^+$ -ATPasa este activa (Schroeder et al., 1987). Este canal se identificó en las células guarda de *Arabidopsis* como canal de  $K^+$  tipo KAT1 (Nakamura et al., 1995), el cual es voltaje dependiente (Schroeder et al., 1988, Blatt 1992), es inhibido por niveles elevados de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), y es sensible al pH intracelular ( $pH_i$ ). Los canales  $K^+_{in}$  son inhibidos por la elevación en la concentración de  $Ca^{2+}$  libre en el citoplasma (McAinsh et al., 1990, 1992; Gilroy et al., 1990), una cinasa de proteínas dependiente de  $Ca^{2+}$  (CDPK) (Li et al., 1998) y por los filamentos de actina (Hwang et al., 1997). Por otro lado, la entrada de  $Cl^-$  a las células guarda ocurre presumiblemente por un proceso activo secundario, cuya actividad se supone está mediada por un simportador de  $H^+/Cl^-$  o por un anti-portador  $OH^-/Cl^-$ , aunque la existencia de estos dos mecanismos aún no ha sido demostrada. La acumulación de malato<sup>2-</sup> en el compartimento vacuolar, es el resultado del metabolismo del almidón, sin embargo, el mecanismo responsable de su acumulación en la vacuola aún no se ha caracterizado (Schroeder et al., 2001b). La sacarosa juega también un papel importante durante la apertura de los estomas por la luz, ya que se ha determinado que las concentraciones de  $K^+$  y su contraión ( $Cl^-$ ) no son suficientes para originar la apertura estomatal total (MacRobbie & Lettau, 1980; Lu et al., 1995; Talbott & Zeiger, 1996). Se sugiere que los flujos de sacarosa a través de membrana plasmática de las células guarda también contribuyen a la regulación del turgor celular, debido a que el nivel de sacarosa en

dichas células se incrementa durante la apertura de los estomas, cuando ésta es inducida por la luz (Outlaw, 2003).

Las bombas de protones son un elemento de suma importancia ya que generan el gradiente electroquímico de  $H^+$  transmembranal ( $\Delta\mu H^+$ ), el cual puede ser utilizado para el transporte de iones y solutos a través de las membranas. El transporte de iones como  $K^+$  y  $Cl^-$ , entre otros, dependen del gradiente electroquímico de protones establecido en la membrana plasmática por la  $H^+$ -ATPasa. El tonoplasto tiene diferentes bombas de  $H^+$ , una  $H^+$ -ATPasa tipo vacuolar (V-ATPasa) y una  $H^+$ -PPasa, (Rea et al., 1987). Para el caso de la membrana vacuolar de las células guarda, la V-ATPasa energiza el intercambio de  $K^+/H^+$ , el cual genera el flujo de  $K^+$  hacia la vacuola durante la apertura estomatal (Martiny-Baron et al., 1992; Kinoshita & Shimazaki, 1999, 2001, 2002; Emi et al., 2001). La actividad de esta bomba de protones también estimula la toma de aniones como malato<sup>2-</sup>,  $Cl^-$  y  $NO_3^-$ , del citoplasma hacia el compartimento vacuolar, manteniendo así la electroneutralidad con el  $K^+$  vacuolar. Esta acumulación de solutos es fundamental para la generación del turgor celular durante la apertura estomatal (Ratajczak, 2000).

### **1.1.2 Cierre estomatal**

Los eventos que causan el cierre de los estomas se han estudiado ampliamente en respuesta al ABA. El ABA es una hormona vegetal que se produce bajo condiciones de estrés hídrico (sequía), salino (exceso de sales), de temperatura (frío), hipoxia y luz. Hasta el momento, se ha reportado un receptor a ABA involucrado en distintas respuestas a esta hormona. El receptor denominado FCA (proteína de unión a RNA, componente de la llamada vía de floración autónoma en *A. thaliana*), se ha propuesto que se localiza en el citoplasma (Razem et al., 2006). La activación puede darse por unión a proteínas G ( $G\alpha$ ) y la activación de la fosfolipasa C (PLC), la cual causaría la hidrólisis de fosfoinositol bifosfato a  $IP_3$  y DG. Esto generaría una elevación en  $[Ca^{2+}]_i$

mediante la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes internos (MacRobbie, 1998), incluyendo a la vacuola (Ng, et al, 2001). Estas observaciones han generado gran interés por conocer la especificidad en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$ . El incremento en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inhibe a la  $\text{H}^+$ -ATPasa de la membrana plasmática (Kinoshita et al., 1995) y activa a su vez a dos canales aniónicos que median la liberación de aniones desde las células guarda (Hedrich et al., 1990; Linder & Raschke, 1992; Schroeder & Keller, 1992). Uno de estos canales aniónicos es de activación rápida y transitoria (tipo-R o CGAC1), y el segundo presenta una activación lenta y de actividad constante (tipo -S) (Schroeder & Keller, 1992). Las características de estos canales son necesarias para mantener los flujos de  $\text{Cl}^-$  que ocurren durante periodos prolongados en la respuesta a concentraciones elevadas de  $\text{CO}_2$  y ABA y que conducen al proceso del cierre de los estomas. Los dos canales de  $\text{Cl}^-$  presentan una activación por nucleótidos cíclicos y  $\text{Ca}^{2+}$ , así como una regulación por voltaje. (Schroeder et al.; 1987, Schroeder et al.; 1988, Blatt & Armstrong, 1993). La salida de aniones, junto con la inhibición de la  $\text{H}^+$ -ATPasa, produce la depolarización del potencial de membrana, generando la desactivación de los canales rectificadores entrantes de  $\text{K}^+$ , que en combinación con la activación de los canales salientes de  $\text{K}^+$ , da como resultado la pérdida neta de  $\text{K}^+$  y por lo tanto, de la turgencia de las células guarda produciendo el cierre de los estomas (Schroeder et al., 2001a). En la vacuola, el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  genera la activación de los canales VK (canal vacuolar selectivo a  $\text{K}^+$ ), los cuales se han propuesto como mediadores de la liberación de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el compartimento vacuolar hacia el citoplasma, tanto en células guarda (Ward & Schroeder, 1994; Allen & Sanders, 1997), como en betabel (Pottosin et al., 2002). Al mismo tiempo, la elevación de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  podría ser amplificada mediante un mecanismo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR), mediante la activación de los canales SV (canal vacuolar de activación lenta) de la vacuola (Ward & Schroeder, 1994; Allen & Sanders, 1997), aunque este mecanismo ha sido cuestionado (Pottosin et al., 1997). Otro de los elementos que participan en el cierre de los estomas en respuesta al ABA

son los segundos mensajeros  $IP_3$  (inositol 1,4,5-trifosfato) y ADPRc (ribosa-ADP cíclica) (Allen et al., 1995; Leckie et al., 1998). Las evidencias bioquímicas sugieren que el ABA induce la producción de  $IP_3$  en las células guarda (Parmer & Brearley, 1995). El  $IP_3$ , causa la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los almacenes intracelulares (Gilroy et al., 1990), inhibe los canales rectificadores entrantes de  $K^+$  de la membrana plasmática e induce el cierre de los estomas (Blatt et al., 1999). En plantas con metabolismo fotosintético tipo  $C_3$  y  $C_4$ , el cierre de los estomas también se induce por la obscuridad y por la elevación en la concentración de  $CO_2$  (proveniente de la respiración) en el espacio intracelular de la hoja (Assmann, 1999). El cierre estomatal y la reducción en la transpiración tienen como consecuencia el aumento en la temperatura interna de la hoja. Los elicitores patógenos son también algunos de los factores que generan el cierre de los estomas y que le confieren a la planta la capacidad de reducir el acceso de agentes dañinos al interior de la hoja. La respuesta estomatal se ve afectada por contaminantes aéreos y éste ocurre de diferentes formas dependiendo del tipo de contaminante, de la mezcla de los contaminantes, de sus concentraciones, de las condiciones ambientales y de la especie vegetal que se trate. La presencia de partículas contaminantes a elevadas concentraciones, como el ozono ( $O_3$ ) y el dióxido de sulfuro ( $SO_2$ ) en la atmósfera, generan el cierre de los estomas (Assmann, 1999), disminuyendo daños posteriores en los tejidos de la hoja. Sin embargo, las vías de señalización para algunos de estos estímulos, aún se desconocen.

### **1.1.3 Canales iónicos en el tonoplasto de las células guarda**

Dentro de los eventos que dictan los procesos vitales como el crecimiento, el desarrollo, la nutrición mineral así como el metabolismo del nitrógeno y del carbono en las plantas superiores, existe una dependencia por el flujo de solutos y agua a través de las membranas plasmática, y vacuolar, así como de endomembranas. Entre los diversos sistemas de transporte que participan en las funciones celulares, están los canales

iónicos que representan una clase de proteínas de transporte altamente diversificada. Dichas proteínas facilitan el flujo pasivo de iones bajo su gradiente electroquímico. Los canales iónicos participan en diversos procesos fisiológicos, tanto en la célula vegetal como animal y comprenden a) osmorregulación celular, donde las células llevan a cabo grandes flujos iónicos en periodos de tiempo corto; b) señalización celular, por propagación y amplificación de señales eléctricas, así como el transporte de segundos mensajeros, como  $\text{Ca}^{2+}$ ; c) mantenimiento del potencial de membrana, que se establece por la electrodifusión de los iones, por la diferencia de concentración iónica, así como por la permeabilidad selectiva a través de las membranas (Maurel et al., 2000).

Los canales iónicos muestran distintas selectividades iónicas y diferentes mecanismos de regulación específicos (Hille, 1992; Zimmermann et al., 1999). Las células vegetales presentan propiedades eléctricas particulares, basadas principalmente en el transporte de  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$  y aniones. La alta compartimentalización de las células vegetales en citosol, plástidos, mitocondria, y vacuola entre otros, sugiere la existencia de una gran variedad de sistemas de transporte de solutos. El transporte de iones a través del tonoplasto, juega un papel central en el control de la homeostasis y de la osmorregulación celular. La vacuola es el compartimento de mayor tamaño en la célula vegetal madura, ocupa aproximadamente el 90% del volumen total celular, proporcionándole a la célula la capacidad de incrementar su tamaño y su superficie utilizando el mínimo de energía disponible para llevar a cabo la síntesis de metabolitos orgánicos (Matile 1987, Martinoia 1992). La vacuola también funciona como un reservorio interno de metabolitos y nutrientes que participan en la homeostasis citosólica (Boller & Wiemken 1986; Matile 1987; Martinoia 1992; Leigh 1997). Los constituyentes vacuolares varían dependiendo de la especie vegetal y de las condiciones ambientales, lo que nos sugiere que el transporte de iones, metabolitos y nutrientes, está sujeto a un estricto control, el cual permite el funcionamiento óptimo de la célula (Martinoia et al., 2000). Es en la vacuola donde se registran las mayores concentraciones iónicas. Las células vegetales, presentan un potencial de turgor alto

(300-500 mOsmoles), mismo que resulta de la acumulación de los diversos iones ( $K^+$ ,  $Cl^-$  y  $mal^{2-}$ , entre otros).

El malato<sup>2-</sup>, es uno de los principales ácidos orgánicos que se acumula en grandes cantidades en la vacuola. Los análisis en tejidos de plantas revelan fluctuaciones en las concentraciones de malato<sup>2-</sup> que dependen del órgano, la especie vegetal y las condiciones ambientales (MacLennan et al., 1963). En las células guarda de *Vicia faba*, la acumulación de malato<sup>2-</sup> durante la apertura estomatal fluctúa de 38 mM (en el estado cerrado) a 75 mM (en el estado abierto), alcanzando hasta 145 mM, cuando el nivel de  $Cl^-$  es muy bajo en el citoplasma ( $\geq 1-3$  mM; Allaway, 1973; Raschke & Schnabl, 1978). La mayoría del malato<sup>2-</sup> se compartamentaliza dentro de la vacuola, como se ha demostrado en *Catharanthus roseus*, que realiza un metabolismo  $C_3$  (10-100 mM; Marigo et al., 1985), o en *Kalanchoe daigremontanium*, que posee un metabolismo CAM (200-300 mM; Buser & Matile; 1977; Martinoia & Neuhaus, 2001); En plantas CAM (metabolismo fotosintético ácido de las crasuláceas), la concentración citosólica del malato<sup>2-</sup> es baja, oscila entre 1-5 mM. En el caso específico de las células guarda, el  $K^+$  es uno de los principales iones que se transporta durante la apertura y cierre de los estomas, el malato<sup>2-</sup> junto con  $Cl^-$ , representan las especies aniónicas principales que participan en el equilibrio de la carga del  $K^+$  en vacuolas de especies como *V. faba* (Assmann & Shimazaki, 1999). En otras especies, como *Allium cepa*, el  $Cl^-$  actúa como único contraión (Schnabl & Ziegler 1977; Raschke & Schnabl, 1978; Schnabl & Raschke, 1980; Pemadasa, 1983). Otros estudios demuestran que cuando la concentración de  $Cl^-$  en la vacuola no compensa la carga del  $K^+$ , el malato<sup>2-</sup> lleva acabo el balance de cargas, acumulándose en el compartimento vacuolar (Outlaw, 1990; Outlaw et al., 2002).

Los estudios realizados en diferentes especies vegetales y en distintos tipos celulares, muestran que todas las endomembranas de la célula vegetal investigadas hasta el momento (membrana plasmática, tonoplasto, membranas mitocondriales y plástidos), cuentan con una amplia variedad de canales que muestran diferentes selectividades iónicas y mecanismos de regulación específicos (Blatt & Thiel, 1993;

Ward et al., 1995; Czempinski et al., 1999; Zimmermann et al., 1999). Estudios realizados en la membrana vacuolar han revelado la presencia de un canal altamente selectivo a  $K^+$  (y relativamente permeable a  $Rb^+$  y  $NH_4^+$ ), de activación instantánea, llamados canales vacuolares de potasio (VK, Vacuolar K<sup>+</sup> channels). Estos canales representan una vía importante para la liberación del  $K^+$  vacuolar, el cual se requiere para el proceso del cierre estomatal (Ward & Schroeder, 1994; Allen & Sanders, 1996). La activación de los canales VK es independiente de voltaje, se activan por el incremento en  $[Ca^{2+}]_{cit}$  (máxima actividad registrada a  $0.1 \mu M Ca^{2+}$ ; Ward & Schroeder, 1994; Allen & Sanders, 1996). Otros reportes indican que a una  $[Ca^{2+}]_{cit}$  de  $5 \mu M$ , los VK se encuentran completamente activos (Ward & Schroeder, 1994). La activación de estos canales por altas  $[Ca^{2+}]_{cit}$  se debe probablemente a su participación en el proceso de cierre de los estomas inducido por el ABA, evento durante el cual las células guarda sufren un incremento en  $[Ca^{2+}]_{cit}$  (Gilroy et al., 1990). Estos canales también son activados por  $pH_{cit}$  ácido, con una actividad máxima a  $pH 6.5$ , arriba del cual ( $pH 7.0 - 8.0$ ) se da una disminución progresiva de su actividad (Ward & Schroeder, 1994). Hedrich y Neher (1987) observaron otro tipo de canales iónicos en vacuolas de betabel. Las corrientes mediadas por estos canales muestran una cinética de activación rápida en respuesta a potenciales de membrana tanto positivos como negativos, nombrados como FV (Fast Vacuolar). Estos canales se activan a  $[Ca^{2+}]_{cit}$  fisiológicas ( $\sim 200 nM$ ), con una alta probabilidad de apertura (Hedrich & Neher, 1987; Allen & Sanders, 1996); Su actividad se ve inhibida por aumentos en  $[Ca^{2+}]_{cit} > 300 nM$  en el betabel y  $> 100 nM$  en células guarda (Hedrich & Neher, 1987; Allen & Sanders, 1996; Gambale et al., 1996; Allen et al., 1998; Tikhonova et al., 1997; Pottosin et al., 2003). Los canales FV son dependientes de voltaje (células guarda de *V. faba*, mesófilo de cebada) (Allen & Sanders, 1996; Tikhonova et al., 1997), y altamente sensibles a  $pH_{cit}$  (valor de  $pH$  óptimo para su actividad  $7.3$ ; Allen & Sanders, 1997). Los canales FV son permeables a cationes monovalentes, y muestran una secuencia de permeabilidad de  $NH_4^+ > K^+ \geq Rb^+ \geq Cs^+ > Na^+ > Li^+$  (Macklon et al., 1990; Bethmann et al., 1995; Felle, 1998;

Brüggemann et al., 1999). Se ha propuesto que debido a la abundancia del ión  $K^+$ , dichos canales muestran una permeabilidad alta para  $K^+$  y en menor grado median el flujo de  $Cl^-$  ( $P_{K^+}/P_{Cl^-} \gg 1$ ) (Brüggemann et al., 1999). Hasta ahora, no se ha podido asignar un papel fisiológico específico a los canales FV, sin embargo se han planteado algunas propuestas. Una posibilidad es que estos canales faciliten la liberación de  $K^+$  desde la vacuola de las células guarda durante el cierre estomatal, debido a que la activación de las corrientes de dichos canales se observa en presencia de una  $[Ca^{2+}]_{cit}$  de 10 nM (Allen & Sanders, 1996). Bajo condiciones metabólicas restringidas (anoxia, por ejemplo), pH bajo y actividad de la  $H^+$ -ATPasa disminuida (por el bajo nivel de ATP, en el medio), la actividad de dichos canales podría verse reducida (Allen & Sanders, 1997). Por lo tanto, los canales FV (en condiciones fisiológicas), representan la principal vía para la absorción y liberación pasiva de cationes monovalentes del citosol hacia la vacuola (Allen & Sanders, 1996; Tikhonova et al., 1997; Allen et al., 1998; Brüggemann et al., 1999a; Pottosin & Martínez-Estévez, 2003).

Los primeros canales descritos en la membrana vacuolar de las células vegetales fueron los canales SV (canal vacuolar de activación lenta; Slow Vacuolar), originalmente reportados en vacuolas de betabel (Hedrich & Neher, 1986; Coyaud et al., 1987; Hedrich & Neher, 1987; Kolb et al., 1987; Colombo et al., 1988). Estos canales también han sido ampliamente estudiados en las vacuolas de las células guarda (Ward & Schroeder, 1994, Allen & Sanders, 1995; 1996; Schulz-Lessdorf & Hedrich, 1995; Ward et al., 1995), y subsecuentemente se han descrito en una amplia variedad de especies y tejidos celulares (Pantoja et al., 1996). Los canales SV muestran una dependencia de voltaje, una fuerte rectificación entrante, son dependientes de tiempo y se activan a potenciales de membrana negativos, por lo que la polaridad del tonoplasto a la cual se da la apertura de estos canales, es opuesta al potencial de la membrana vacuolar en reposo (+20 a +50 mV), por lo que los canales SV permanecen cerrados en condiciones fisiológicas de reposo. Estos canales, muestran una conductancia muy variada a nivel de canal unitario en las diferentes especies reportadas (entre 50–250 pS

en 100 mM KCl: Hedrich et al., 1988). De manera semejante, la magnitud de las corrientes mediadas por estos canales varía entre los distintos tipos celulares a nivel de corriente macroscópica (entre 10 - 100 pA pF<sup>-1</sup> en betabel, y 100 - 500 pA pF<sup>-1</sup> en células guarda, a un potencial de membrana de -100 mV). Originalmente, se caracterizaron como canales selectivos a cationes monovalentes, K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> (Coyaud et al., 1987; Colombo et al., 1988; Pantoja et al., 1989; Maathuis & Prins, 1990; 1991). Los canales SV son permeables a K<sup>+</sup> (Schulz-Lessdorf & Hedrich, 1995; Allen & Sanders, 1996), Ca<sup>2+</sup> (Ward & Schroeder, 1994; Allen & Sanders, 1996; Schulz-Lessdorf & Hedrich 1995) y Mg<sup>2+</sup> (Allen & Sanders, 1996). Amodeo et al., (1994) y Pottosin et al., (2003) observaron que estos canales catiónicos vacuolares, son altamente permeables a Na<sup>+</sup> (60-30% más permeables a Na<sup>+</sup> que a K<sup>+</sup>) en contraste con los canales VK (altamente selectivos a K<sup>+</sup>) y con los canales FV (20% menos permeables a Na<sup>+</sup> que a K<sup>+</sup>; Brüggemann et al., 1999a). Pantoja et al. (1992) observaron la presencia de corrientes vacuolares de Ba<sup>2+</sup> (vacuolas de betabel), con algunas de las características propias de los canales SV, como la rectificación entrante, la cinética de activación lenta (>1 s), así como la dependencia de voltaje y de tiempo. Posteriormente, se determinó que los canales SV de las células guarda de betabel también son permeables a Ca<sup>2+</sup> (Ward & Schroeder, 1994, Allen & Sanders, 1995; Schulz-Lessdorf & Hedrich, 1995). Otra de las particularidades de los canales SV es su activación por Ca<sup>2+</sup>. Hedrich y Neher (1987) detectaron la activación de estos canales a 300 nM de Ca<sup>2+</sup> citosólico. Estudios posteriores han revelado que la activación de dichos canales también ocurre en el rango de 150 nM de Ca<sup>2+</sup> citosólico, como lo han demostrado las caracterizaciones detalladas en células del mesófilo de cebada (Kolb et al., 1987), en células de *Acer* (Colombo et al., 1988), en vacuolas de células guarda de *Allium cepa* (Amodeo et al., 1994), en células en suspensión de *Chenopodium* (Reifarth et al., 1994) y en células guarda de *V. faba* (Schulz-Lessdorf & Hedrich; 1995; Allen & Sanders, 1996). Las propiedades de permeabilidad así como las de apertura y cierre (“gating”) de los canales SV, sugieren que pueden funcionar como un mecanismo CICR (mecanismo

para la propagación y amplificación de señales de  $\text{Ca}^{2+}$ ), a través de la membrana vacuolar (Allen & Sanders, 1997).

#### **1.1.4 Señalización y transporte de calcio**

El  $\text{Ca}^{2+}$  es un segundo mensajero en la vía de transducción de señales, por la cual los estomas de las células guarda responden a estímulos externos. Los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  se dan a través de la actividad de canales iónicos (Sanders et al., 2002). La importancia de la localización celular de dichos canales iónicos y la especificidad de los estímulos se han enfatizado en estudios enfocados en el cierre de los estomas mediado por  $\text{Ca}^{2+}$  (en tabaco) (Wood et al., 2000). La remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (con quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  o bloqueadores) sugiere que el cierre de los estomas inducido por bajas temperaturas es causado principalmente por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática, mientras que la movilización intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ocurre si el cierre es inducido por ABA. Gelli y Blumwald (1977) reportaron la presencia de canales permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática (células en suspensión de tomate), que son activados por la hiperpolarización de la membrana, entre estos se encuentran los canales que presentan alta selectividad para  $\text{Ca}^{2+}$ , sobre  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Gelli & Blumwald 1977; Hamilton et al., 2000; Véry & Davies, 2000). Resultados experimentales obtenidos por Grabov & Blatt (1999) muestran que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las células guarda actúa como un estímulo que incrementa las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , lo que sugiere la acción del mecanismo CICR en estas células. Se tienen reportes de que en células guarda (tratadas con ABA), conforme el potencial de membrana se hace más negativo se genera un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , (Grabov & Blatt). Se ha propuesto que el ABA induce un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , mediante la entrada de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ , lo que inhibe las corrientes rectificantes entrantes de  $\text{K}^+$  ( $I_{\text{K,in}}$ ), que generalmente median la toma de  $\text{K}^+$  (Blatt, 1999). Schroeder & Hagiwara (1989) demostraron que el ABA causa incrementos repetitivos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como resultado de la entrada pasiva de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol a través de los canales permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  no selectivos. Recientemente, Hamilton et al., (2000) demostraron la presencia

de canales selectivos a  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática de las células guarda de *V. faba*, activados por depolarización y por ABA, por lo que se sugiere que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  es inducida por ABA, hacia el citosol a través de estos canales, y puede ser responsable en parte del incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . El aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inhibe la  $\text{H}^+$ -ATPasa de la membrana plasmática (Kinoshita et al., 1995) y activa a su vez a dos canales aniónicos que median la liberación de aniones desde las células guarda (Schroeder & Keller, 1992). CICR es un mecanismo que integra el incremento localizado en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en una señal de calcio única y compleja (oscilaciones y ondas). La salida de aniones, junto con la inhibición de la  $\text{H}^+$ -ATPasa, produce una depolarización de la membrana plasmática causando la activación de los canales rectificadores salientes de  $\text{K}^+$ , generando la pérdida neta de  $\text{K}^+$ , y por lo tanto, pérdida de la turgencia de las células guarda, causando así el cierre de los estomas (Schroeder et al., 2001a). La activación de los canales SV (por un cambio positivo en el potencial de la membrana vacuolar), permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , también pueden contribuir a la elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico durante el cierre estomatal (Ward & Schroeder, 1994).

Los canales selectivos a  $\text{Ca}^{2+}$  caracterizados en la membrana vacuolar de las células vegetales se han clasificado en tres categorías. La primera comprende a los canales permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ , dependientes de voltaje (la activación se da por la depolarización del tonoplasto reportados en vacuolas de betabel) y en las células guarda (Allen & Sanders, 1994). Dichos canales se caracterizan por mostrar una rectificación saliente (Johannes et al., 1992a; Gelli & Blumwald 1993). Estos canales, VVCa (Vacuolar Voltaje-dependent Calcium channel; Canal vacuolar de calcio activado por voltaje) liberan  $\text{Ca}^{2+}$  desde el compartimento vacuolar y muestran una probabilidad de apertura alta a potenciales de membrana positivos (Johannes et al., 1992; Gelli & Blumwald 1993; Allen & Sanders, 1994a). La segunda categoría de canales selectivos a  $\text{Ca}^{2+}$  comprende a aquellos canales que se activan por ligandos. La activación de estos canales se da por el incremento en la concentración citoplasmática de segundos mensajeros, como inositol-1,4,5 trisfosfato ( $\text{InsP}_3$ ; Alexandre et al., 1990; Alexandre & Lassalles, 1992; Allen and

Sanders, 1996). Recientemente, también se ha reconocido el papel de la adenosina 5'-difosforibosa cíclica (ADPRc), como uno de los intermediarios en la vía de transducción de señales por ABA en plantas (Allen et al., 1995; Muir & Sanders, 1996; Wu et al., 1997; Leckie et al., 1998).  $\text{InsP}_3$ , es uno de los componentes en la vía de traducción de señales que median los cambios de turgor en las células guarda en respuesta al ABA (Lemtiri-Chlief et al., 2000; Gilroy et al., 1990; Blatt et al., 1990). Estudios realizados en vacuolas de raíces de betabel mediante “patch-clamp”, así como la medición de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  en microsomas, demostraron que la ADPRc causa la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes endomembranales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Allen et al., 1995; Muir & Sanders, 1996; Muir et al., 1997). Se ha postulado que el receptor de la ADPRc es un homólogo del receptor a rianodina (RyR) (Meszaros et al., 1993). Leckie et al., (1998) observaron que la presencia de ADPRc en el citosol de las células guarda de *Commelina communis* genera un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  (desde 0.05 a 0.4  $\mu\text{M}$ , durante 10 min) y una disminución en el turgor celular. Resultados de estos autores, obtenidos mediante la técnica de “patch-clamp”, demostraron que la ADPRc induce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el compartimento vacuolar de las células guarda (Leckie et al., 1998). Todos estos datos sugieren que las vías de señalización que utilizan como intermediario a  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto en células animales como vegetales, se han conservado evolutivamente (Hetherington et al., 2001). Las vacuolas de las células vegetales poseen un homólogo a RyR, el cual se activa por ADPRc. Una de las isoformas de los RyR (RyR2), identificados hasta el momento, se activa por dinucleótido de adenina nicotinamida ( $\text{NAD}^+$ ) en respuesta a ABA, en la vía de traducción de señales en plantas (Wu et al., 1997; Leckie et al., 1998).

### **1.1.5 Papel de malato<sup>2-</sup> en la fisiología vegetal**

La información disponible sobre los canales catiónicos es muy amplia, comparada con los datos existentes para los canales aniónicos vacuolares. Actualmente existe sólo un reporte sobre los mecanismos responsables que median los flujos de los aniones,

hacia y desde la vacuola, necesarios para balancear la concentración de  $K^+$  durante la apertura y el cierre de los estomas. Pei et al., (1996) identificaron a un canal vacuolar de cloro (VCL) en células guarda de *V. faba*, que se activa por fosforilación, mediante una CDPK en presencia de ATP y  $Ca^{2+}_{cit}$ . En ausencia de esta cinasa, los canales de  $Cl^-$  permanecieron inactivos. Este canal se activa a potenciales de membrana fisiológicos, lo que favorece la toma de  $Cl^-$  hacia la vacuola. Aún cuando la actividad de estos canales puede ser la responsable de la acumulación del  $Cl^-$  dentro de la vacuola durante el proceso de apertura de los estomas, su función sólo podría compensar parcialmente la acumulación de  $K^+$ , el cual llega a alcanzar hasta 400 mM (Penny & Bowling, 1974). Por lo que la actividad de un canal selectivo a malato<sup>2-</sup> en el tonoplasto de las células guarda, como el que se ha descrito en células en cultivo de la remolacha (Pantoja et al., 1992) y en células del mesófilo de *Kalanchoe daigremontiana* (Pantoja & Smith, 2002), podría fácilmente mediar la acumulación necesaria para este anión orgánico y compensar así la concentración del  $K^+$  vacuolar.

El malato<sup>2-</sup> ocupa un papel central en el metabolismo de las plantas. Este ácido dicarboxílico está implicado en una amplia variedad de procesos fisiológicos que ocurren en los tejidos de plantas como en los movimientos de cierre y apertura de las células guarda, en la respiración y en la generación de energía, y en la absorción desigual de cationes y aniones por la raíz. Además, participa en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), en la glicólisis, en los tres tipos de fotosíntesis ( $C_3$ ,  $C_4$  y CAM), en el balance iónico, en el control del pH del citoplasma ( $pH_{cit}$ ), en el mantenimiento del balance eléctrico de la célula, en el ciclo del glyoxilato, en la oxidación de ácidos grasos, y en la biosíntesis de amino ácidos y lignina. Es un compuesto intermediario importante de plantas con metabolismo tipo CAM. El ácido málico acumulado en el compartimento vacuolar durante la noche, es decarboxilado y empleado fotosintéticamente durante el día. La compartimentalización de este metabolito en varios organelos y células involucra una compleja interacción metabólica. El malato<sup>2-</sup> también es importante en la nutrición mineral, hecho que se refleja en el papel que

desempeña en la fijación de nitrógeno ( $N_2$ ), en la absorción de fósforo (P), y en adaptación de las plantas a la toxicidad por aluminio ( $Al^3$ ) (Lance & Rustin, 1984; Lüttge, 1987; Gietl, 1992; Driscoll & Finan, 1993; Martinoia & Rentsch, 1994; Kochian, 1995; Smith et al., 1996).

El malato<sup>2-</sup> se encuentra en todos los tejidos vegetales y en un gran número de plantas. En el caso de las plantas con metabolismo CAM (y  $C_4$ ), que usan al ácido málico como una fuente disponible de  $CO_2$ , lo acumulan en niveles muy altos, encontrando en los tejidos vegetales concentraciones que oscilan alrededor de los 200-350 mM (la acumulación de malato<sup>2-</sup> respecto a la de otros ácidos orgánicos en las células vegetales, generalmente es superior) (Winter & Smith, 1995). Estas concentraciones derivan directamente de la carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP) el cual puede ser utilizado como fuente de energía en el ciclo TCA por la enzima PEP carboxilasa (PEPC), y la subsecuente reducción del oxalacetato (OAA) por la deshidrogenasa del malato<sup>2-</sup> (MDH). El equilibrio termodinámico de estas reacciones esta dirigido hacia la formación del malato<sup>2-</sup> de tal forma que el destino del PEP se asocia estrechamente con el de malato<sup>2-</sup> (Lance & Rustin, 1984). A la asociación de PEP/MDH y por consecuencia, a la concentración de malato<sup>2-</sup>, se le relaciona con diversos procesos; Por ejemplo, el malato<sup>2-</sup> puede mantener la actividad del ciclo de TCA, debido a su función como sustrato primario; sirve como almacén para mantener el  $CO_2$  derivado de la respiración; puede actuar como una fuente de  $CO_2$  para la fotosíntesis y generar poder reductor en la forma de dinucleótido de adenina nicotinamida fosfato (NADPH) mediante la participación de la enzima málica (ME) dependiente de NADPH (Latzko & Kelly, 1983; Day & Wiskich, 1984). En contraste con las plantas de tipo fotosintético CAM, las del tipo  $C_3$  y  $C_4$  acumulan el ácido málico en forma de sal y las concentraciones llegan a ser cercanas a 100 mM. En plantas  $C_3$ , los niveles de ácido málico disminuyen durante la noche, probablemente por la decarboxilación a piruvato (Lance & Rustin, 1984). La síntesis de malato<sup>2-</sup> durante el día y su consumo durante la noche, también resultan en un ritmo diurno en el

contenido de malato<sup>2-</sup> en plantas del tipo C<sub>3</sub>; Sin embargo, en contraste con las plantas con metabolismo tipo CAM, los niveles máximos de malato<sup>2-</sup> se dan al final del día. Cabe mencionar que los niveles intracelulares de malato<sup>2-</sup> pueden sufrir variaciones diarias, por ejemplo, durante la fijación nocturna de CO<sub>2</sub> en las plantas CAM (Winter & Smith, 1995), o durante la apertura y cierre de los estomas (Willmer & Fricker, 1996). Dichas concentraciones también varían en respuesta a los cambios en el medio ambiente. Condiciones de estrés como frío, calor, sequía, inundación, herbicidas, pesticidas, etc., pueden tener un gran efecto en las enzimas que metabolizan al malato<sup>2-</sup> y así, modificar su distribución celular. Algunas otras condiciones, como daño físico, contaminación por sulfatos (SO<sub>4</sub><sup>-</sup>), o ataques por parásitos, también aumentan las concentraciones de malato<sup>2-</sup>. Asimismo se ha reportado que la concentración de este ácido orgánico varía entre las especies vegetales (Lewitt, 1980).

#### **1.1.6 Compartimentalización vacuolar de malato<sup>2-</sup>**

La vacuola central de las células vegetales puede llegar a ocupar hasta un 95% del volumen celular (Rona et al., 1980; Steudle et al., 1980), y es capaz de almacenar grandes cantidades de malato<sup>2-</sup> (200-350 mM, en plantas con metabolismo CAM). La acumulación de carboxilatos como aconitato<sup>3-</sup>, ascorbato<sup>2-</sup>, citrato<sup>3-</sup>, malato<sup>2-</sup>, malonato<sup>2-</sup>, oxalacetato<sup>2-</sup> o tartrato<sup>2-</sup> se da a altas concentraciones (decenas o cientos de mM) en vacuolas de células vegetales en plantas con metabolismo CAM. La concentración de malato en el citoplasma de tejidos vegetales, generalmente oscila de 1 a 10 mM (Ugochukwi & Anosike, 1979) (bajo circunstancias especiales, las concentraciones de malato<sup>2-</sup> pueden exceder este límite; Osmond and Holtum, 1981), mientras que el fosfoenolpiruvato (PEP) se encuentra en el rango de 10 a 100 μM en plantas C<sub>3</sub> (Latzko & Kelly, 1983). El hecho de que la concentración de los ácidos carboxílicos libres (ácido málico y algunas veces ácido cítrico) oscile en plantas con metabolismo CAM, durante el ciclo día/noche, tiene importantes implicaciones para los posibles mecanismos de transporte del tonoplasto. Por ejemplo, para el equilibrio de

cargas, debe realizarse un balance estequiométrico entre los  $H^+$  netos y la transferencia de carboxilatos hacia el interior y exterior de la vacuola durante el ciclo CAM. Los ácidos dicarboxílicos se encuentran totalmente disociados a pH citosólico normal (7.3). En plantas  $C_3$ , los carboxilatos vacuolares son balanceados por cationes inorgánicos como  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ , y  $Mg^{2+}$ .

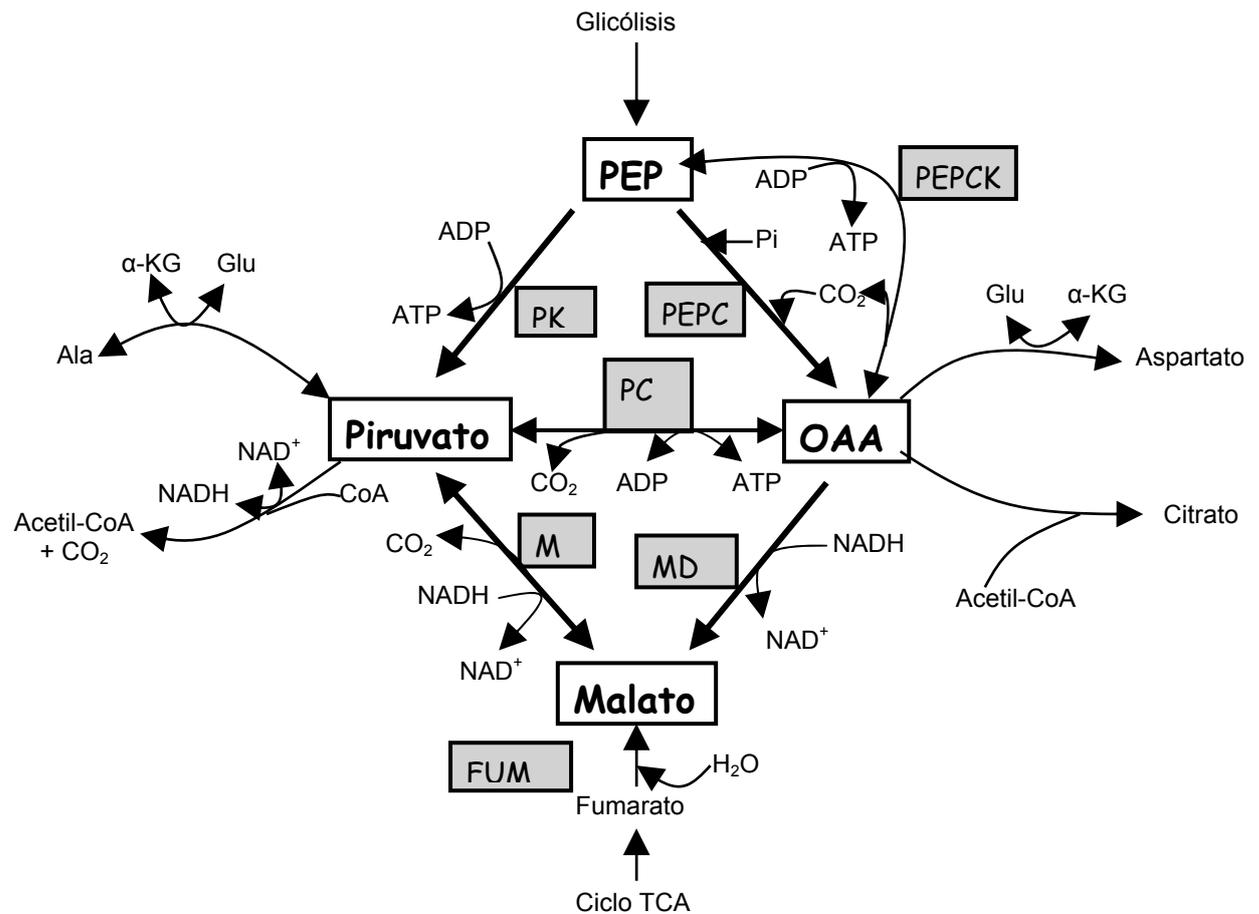
### **1.1.7 Malato<sup>2-</sup> como sustrato**

La principal característica del malato<sup>2-</sup> como sustrato puede ejemplificarse comparando sus propiedades con la de sus precursores o productos (PEP, fumarato<sup>2-</sup>, oxalacetato<sup>2-</sup>, piruvato) en reacciones en las cuales el malato<sup>2-</sup> participa, como en la formación de piruvato a partir de malato<sup>2-</sup> y viceversa. El malato<sup>2-</sup> aparece como una molécula de almacenaje de  $CO_2$  y como reductor de equivalentes, mientras que si se toma en cuenta como ácido (ácido málico), comparado con piruvato, éste puede generar  $H^+$  y bombearlos o bien utilizarlos para el intercambio con cationes, necesario para el balance de cargas (Lance & Rustin, 1984). Una de las propiedades importantes del malato<sup>2-</sup> es su capacidad para moverse fácilmente a través de las membranas celulares por la presencia de una variedad de acarreadores de membrana (Wiskich, 1977; Day & Wiskich, 1984). Esta propiedad es muy importante ya que el malato<sup>2-</sup> puede acarrear equivalentes reducidos desde un compartimento celular a otro, así como el hecho de que la mayoría de las membranas celulares son impermeables a nucleótidos cíclicos de nicotinamina reducidos. El papel del acoplamiento entre malato<sup>2-</sup> y piruvato (o PEP) en la regulación del pH celular es más claro cuando estas reacciones son integradas a la respiración de la célula vegetal, en la cual se reduce NAD, siendo re-oxidada por oxígeno atmosférico. Esta reacción es catalizada por la enzima málica (ME) (fig 1) aumentando el pH celular, mientras que la reacción reversa es catalizada por las enzimas PEP y MDH, principiando con el PEP en lugar de piruvato, lo cual contribuye a disminuir el pH del citoplasma (Lance & Rustin, 1984, Martinoia &

Rentsch, 1994).

La acumulación vacuolar del ácido málico es energizada por el gradiente electroquímico de protones establecido por la V-ATPasa y la V-PPasa, las dos bombas de H<sup>+</sup> presentes en el tonoplasto. El transporte de malato<sup>2-</sup> debe de ocurrir en la forma de la especie iónica mal<sup>-2</sup> (especie predominante a pHi), y que ocurre en respuesta al componente eléctrico (lado citosólico negativo) del potencial electroquímico de H<sup>+</sup> (Lüttge, 1987; Lüttge & Ratajczak, 1997; Smith et al., 1996). Todos los procesos fisiológicos mencionados requieren de un transporte de malato<sup>2-</sup> regulado rigurosamente, tanto hacia el interior como hacia el exterior del compartimento vacuolar. Por lo tanto, el tonoplasto no sólo requiere de un sistema de transporte de alta capacidad (que catalice los grandes flujos de malato<sup>2-</sup>), sino también, de propiedades regulatorias, que le permitan mediar el transporte de malato<sup>2-</sup> hacia el interior de la vacuola y llevar a cabo la acumulación temporal de este ácido dicarboxílico (Lüttge, 1987; Lüttge & Ratajczak, 1997; Smith et al., 1996).

En las últimas dos décadas, se ha realizado una búsqueda intensa de los transportadores que catalizan el transporte de este anión orgánico a través del tonoplasto (Lüttge et al., 2000; Martinoia & Ratajczak, 1997), tanto en plantas de tipo C<sub>3</sub> (Cerana et al., 1995; Pantoja et al., 1992; Pei et al., 1996; Plant et al., 1994), como en plantas con metabolismo de tipo CAM (Cheffings et al.



**Figura 1. Ambiente metabólico de malato<sup>2-</sup>.**

1997; Iwasaki et al., 1992; Pantoja & Smith, 2002; Smith & Bryce, 1992). Los estudios enfocados a identificar a los sistemas de transporte de malato<sup>2-</sup> responsables de la toma desde el citoplasma y liberación desde el compartimento vacuolar se han realizado mediante fisiología comparativa, bioquímica de proteínas, y estudios de transporte (mediante la electrofisiología por la técnica de “patch-clamp”), en vesículas de membranas y vacuolas aisladas (refs. en Lüttge et al., 2000). Sin embargo, los resultados obtenidos mediante estas disciplinas no han permitido su identificación molecular (Martinoia et al., 1991; Steiger et al., 1997). Los estudios realizados acerca del transporte de malato<sup>2-</sup> (en vesículas del tonoplasto y vacuolas aisladas) han demostrado la existencia del transporte de malato<sup>2-</sup> a través de esta membrana, con cinética de saturación (Lüttge et al., 2000; Martinoia & Rentsch, 1994; Smith et al., 1996). Por otro

lado, a pesar de la investigación tan amplia que se ha realizado en las células guarda en los últimos años, poco se sabe del o los mecanismos de transporte de malato<sup>2-</sup> en éstas células. Sólo existe un reporte acerca de la actividad de canales selectivos a Cl<sup>-</sup>, identificados en la membrana vacuolar de las células guarda y cuya función podría mediar la acumulación de malato<sup>2-</sup> dentro de la vacuola, aunque sólo bajo condiciones especiales. Estos canales se activan por fosforilación, mediante una CDPK en presencia de ATP y Ca<sup>2+</sup><sub>cit</sub>. En ausencia de esta cinasa, los canales de Cl<sup>-</sup> permanecen inactivos.

Recientemente, Neuhaus et al. (2003) reportaron la identificación de un gene que codifica para un transportador de dicarboxilatos vacuolares en hojas de *Arabidopsis* [AttDT]. La secuencia de este transportador muestra una alta homología con el cotransportador Na<sup>+</sup>/dicarboxilatos de humanos. En este trabajo se cuantificó el nivel total de malato<sup>2-</sup> en hojas, tanto de plantas silvestres como en plantas mutantes (knockout, donde el gen no es funcional, *AttDT::tDNA*). Los resultados mostraron que el nivel de malato<sup>2-</sup> en hojas de plantas silvestres fue cuatro veces mayor comparadas con las mutantes. Así mismo, se reportó que estas plantas mutantes sometidas a estrés salino, presentaron una menor acumulación de malato<sup>2-</sup> (en hojas), en comparación con las plantas silvestres. La localización endomembranal del transportador de dicarboxilatos, fué en el tonoplasto de las vacuolas de las células del mesófilo. El transporte de este anión desde el citoplasma hacia el compartimento vacuolar se vió fuertemente inhibido por la presencia de citrato (inhibidor competitivo con alta afinidad hacia el transporte vacuolar de malato<sup>2-</sup>). En contraste con su homólogo en células animales, este sistema de transporte se localiza en una endomembrana y no en la membrana plasmática. Además, el transporte de malato<sup>2-</sup> no es energizado por Na<sup>+</sup>. Sin embargo, en un trabajo posterior, Neuhaus et al, (2005) demostraron que el gene *AttDT* no codifica para el canal vacuolar de malato<sup>2-</sup>. Estos resultados sugieren la presencia de dos transportadores de dicarboxilatos en las vacuolas de las células del mesófilo de *Arabidopsis*, *AttDT* y el correspondiente al canal de malato<sup>2-</sup>, cuya identidad molecular se desconoce.

Debido a la escasa información que existe sobre los mecanismos de transporte de aniones a través de la membrana vacuolar de las células guarda, y en particular, sobre el transporte de malato<sup>2-</sup>, en este trabajo se propone caracterizar a un canal iónico selectivamente permeable a este ácido dicarboxílico en la vacuola de las células guarda.

## **2. HIPOTESIS**

En las células guarda uno de los mecanismos importantes para mantener el balance iónico dentro de la vacuola debido a la acumulación de  $K^+$  en este compartimento es un canal aniónico selectivo al malato<sup>2-</sup>, el cual es necesario para balancear la concentración de  $K^+$  durante la apertura y el cierre de los estomas, ya que como se mencionó con anterioridad, la acumulación de  $K^+$  durante la apertura puede llegar a alcanzar hasta 400 mM

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL:**

Estudiar la presencia de un canal iónico selectivo al anión orgánico malato<sup>2-</sup> en la membrana vacuolar de las células guarda de la planta modelo *A. thaliana*.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

Identificar al canal de malato<sup>2-</sup> del tonoplasto de las células guardia de *Arabidopsis thaliana*.

Estudiar y establecer sus propiedades en base a su sensibilidad al voltaje, cinética de activación, selectividad iónica, y su posible regulación por diferentes factores citoplasmáticos como  $pH_{cit}$ , y  $[Ca^{2+}]_{cit}$ .

### 3. JUSTIFICACION

A pesar de toda la investigación que se ha realizado en las células guarda en los últimos años, aún existen mecanismos que se postulan como necesarios en la fisiología de los estomas, pero que su actividad no se ha demostrado o identificado. Actualmente, existe sólo un reporte acerca de los mecanismos responsables que median los flujos de  $\text{Cl}^-$ , hacia y desde la vacuola, necesarios para balancear la concentración de  $\text{K}^+$  durante la apertura y el cierre de los estomas. Pei et al., (1996) identificaron a un canal vacuolar de  $\text{Cl}^-$  (VCL) en células guarda de *V. faba* que se activa por fosforilación, mediante una CDPK en presencia de ATP y  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ . En ausencia de esta cinasa, los canales de  $\text{Cl}^-$  permanecieron inactivos. Este canal se activa a potenciales de membrana fisiológicos, lo que favorece la toma de  $\text{Cl}^-$  hacia la vacuola. Aún cuando la actividad de estos canales puede ser la responsable de la acumulación de  $\text{Cl}^-$  dentro de la vacuola durante el proceso de apertura de los estomas, su función sólo podría compensar parcialmente la acumulación de  $\text{K}^+$  que llega a alcanzar concentraciones de hasta 400 mM (Penny & Bowling, 1974). Por lo que la actividad de un canal selectivo a malato<sup>2-</sup> en el tonoplasto de las células guarda, como el canal de malato<sup>2-</sup> descrito en células en cultivo de la remolacha (Pantoja et al., 1992) y en las células del mesófilo de *K. daigremontiana* (Pantoja & Smith, 2002), podría fácilmente mediar la acumulación necesaria de este anión orgánico para compensar la concentración del  $\text{K}^+$  vacuolar. En particular, estos estudios ayudarán a establecer una visión más completa de la fisiología de las células guarda y definir el/los mecanismo (s) responsables de los flujos de malato hacia y desde la vacuola de estas células.

## **5. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

### **5.1 Condiciones de crecimiento de las plantas y material vegetal**

Para la obtención de plantas, las semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia se germinaron en charolas de propagación conteniendo suelo experimental (Metro Mix 500, Scotts-Sierra Horticultural Products Company, Marysville, CH., y Peat Moss Canadian Sphagnum, Prod. Bork Ash, con relación 2:1), optimizando la humedad y la constante oxigenación del medio. Las charolas conteniendo las plantas de *Arabidopsis* se regaron diariamente con agua corriente, y fueron fertilizadas con solución de Hoagland una vez por semana, manteniéndose bajo el mismo sistema de riego durante 8-10 semanas. Las plantas permanecieron bajo condiciones óptimas de crecimiento en un invernadero, cuyo régimen de temperatura se mantuvo entre 14 y 25 °C durante el periodo oscuro, y el periodo de luz, respectivamente.

### **5.2. Aislamiento de los protoplastos de las células guarda de *A. thaliana*.**

La metodología que se empleó para el aislamiento de los protoplastos de las células guarda de *A. thaliana*, es una modificación del protocolo establecido por Assmann et al. (2002). Se utilizaron las hojas de una roseta de la planta *Arabidopsis*, de 4-6 semanas de edad, a las que se les removió la vena principal con una navaja de rasurar. Los segmentos de hoja fueron molidos dos veces en una licuadora comercial durante 30 s cada vez, en 300 ml de agua corriente para obtener fragmentos de epidermis conteniendo las células guarda (Fig 2 A). La suspensión obtenida se pasó a través de un filtro de nylon de 26  $\mu$ m, así como a través de un filtro metálico (mesh 40), para coleccionar los fragmentos de epidermis aisladas. Al material vegetal obtenido se le aplicó una serie de lavados con agua corriente para eliminar el mesófilo que pudo permanecer en la preparación. Inmediatamente después, se coleccionaron los fragmentos de epidermis

que se depositaron en la malla, y se colocaron en un medio de digestión inicial (MDI) compuesto de MES-TRIS 5mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 M, ác. ascórbico 0.5 mM, 1% de celulasa (Onozuka Tokyo, Japón), 0.02% de pectoliasa Y-23 (Seishin Corp., Tokyo, Japón) y 0.05 % de albumina de suero bovino (Sigma, Toluca, Mex.), con una osmolaridad de 300 mOsmol y un pH de 5.5. La baja osmolaridad del MDI se empleó para romper los protoplasto de las células epidérmicas y reducir así la contaminación de la preparación de las células guarda. Las secciones de epidermis se incubaron durante 30 min a 27 °C. A continuación, las epidermis se agitaron cuidadosamente por unos segundos, y se lavaron minuciosamente con el medio básico (MB) compuesto por MES-TRIS 5mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 M, ác. ascórbico 0.5 mM, y sorbitol para ajustar la osmolalidad a 500 mOsmol a pH 5.5, para ser filtradas a través de la malla metálica y remover así, los restos de las células epidérmicas y del mesófilo. Para aislar a los protoplastos de las células guarda, los fragmentos de epidermis que permanecieron en la malla se colectaron y se depositaron en el medio de digestión final (MDF; se composición idéntica al MDI, pero con una osmolaridad de 500 mOsmol), incubándose ahora durante 45 min a 27 °C. Después de este tiempo, los restos de las epidermis digeridas se pasaron por un filtro de nylon y se lavaron con el MB. El filtrado conteniendo los protoplastos de las células guarda, se colectó en tubos de 50 ml, y se centrifugó por 10 minutos a 1000g, en un rotor S4180 en una centrífuga GS-15R (Beckman, México). El sobrenadante se desechó y se colectaron cuidadosamente los protoplastos precipitados en el fondo de los tubos, resuspendiéndose en 5 ml de MB y manteniéndose a 4°C.

### **5.3. Purificación de los protoplastos de células guarda**

A continuación la pastilla que contenía los protoplastos de las células guarda se colectó y se colocó sobre un gradiente discontinuo de Percoll con una osmolaridad de 500 mOsmol. En la elaboración de dicho gradiente se colocó de 1-2 ml de 50% Percoll

en el fondo del tubo para centrifuga, con un volumen de 15 ml, siendo esta la capa más densa, seguida por una capa intermedia de 2-3 ml de 35% Percoll, la tercera capa más superficial del gradiente fue de 2-3 ml de 12% Percoll. La suspensión de protoplastos de células guarda se colocó en la parte superior de este gradiente y su separación se obtuvo por centrifugación a 1000g durante 10 min. Los protoplastos de las células guarda se colectaron cuidadosamente de la interfase 12%-35% del gradiente de Percoll con una pipeta Pasteur, para separarlos del resto de los gradientes y conservar la pureza de la capa. Posteriormente, los protoplastos de células guarda obtenidos en suspensión de Percoll, se lavaron con MB, y se centrifugaron nuevamente por 5 minutos a 1000g, esto con la finalidad de eliminar los residuos de Percoll. A continuación, el sobrenadante se removió y desechó, resuspendiendo a los protoplastos en 1 ml de MB. Cerca de 0.5 a 1 ml de este stock fue utilizado para los experimentos de “patch-clamp” y se mantuvieron en hielo, hasta su empleo.

#### **5.4. Aislamiento de las vacuolas de las células guarda**

Las vacuolas de las células guarda fueron obtenidas mediante un choque osmótico de los protoplastos de estas células. Para esto, se tomó una muestra de 200  $\mu$ l de la suspensión de protoplastos con una osmolaridad de 500 mOsmol y se diluyó 2:1 con una solución de EGTA/TRIS [Etileno glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N,N-ác. tetraacético; Tris (hidroximetil-d<sub>3</sub>)amino-d<sub>2</sub>-metano] 20 mM a pH 7.0, reduciendo así la osmolaridad y el Ca<sup>2+</sup> libre, lo que ayudó a causar el rompimiento de la membrana plasmática de las células guarda. Una vez que las vacuolas se liberaron, estas fueron estabilizadas por la adición del medio de estabilización (ME) compuesto por KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, ácido ascórbico 10 mM, MES 10 mM, pH 5.5, con una osmolaridad de 800 mOsmol ajustada con manitol, este es un paso intermedio que tiene como finalidad recuperar la estabilidad osmótica de nuestra muestra. Las

vacuolas se lavaron de dos a tres veces con 10 ml del MB para eliminar el exceso de EGTA, y se dejaron precipitar durante 5min, removiendose finalmente el sobrenadante.

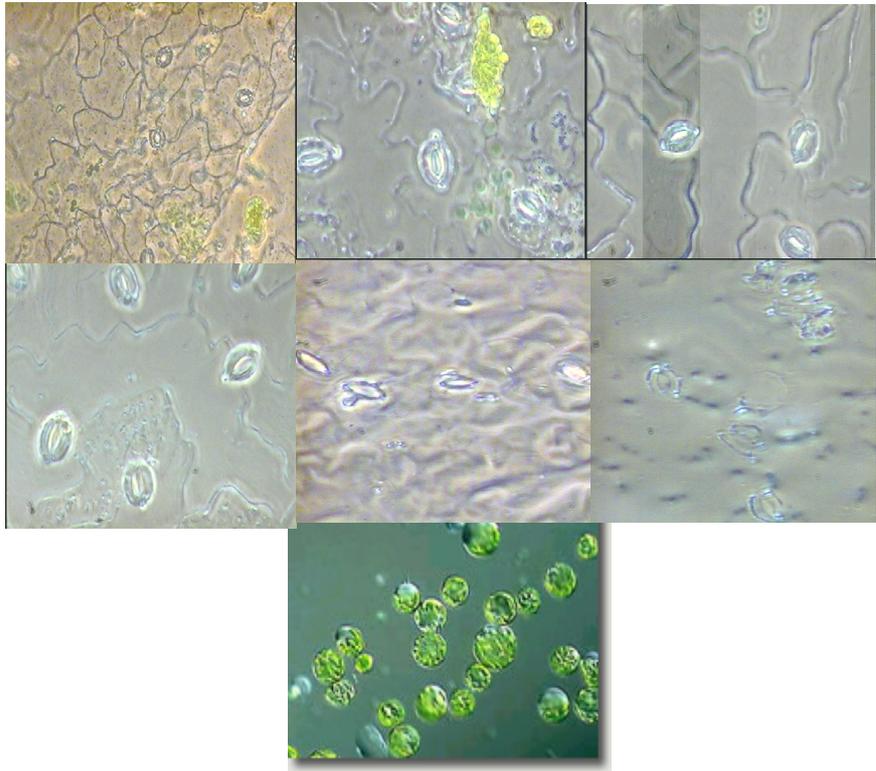


Figura 2. Imágenes de las etapas del aislamiento de los protoplastos para la obtención de las vacuolas de las células guarda en *A. thaliana*. A Fragmentos de epidermis aisladas. B Fragmentos de epidermis aisladas de primera digestión. C. Fragmentos de epidermis aisladas de la segunda digestión enzimática D. Vacuolas de las células guarda

## 5.5. Mediciones eléctricas

La medición de las corrientes iónicas a través de la membrana vacuolar, se realizaron por la técnica electrofisiológica de “patch -clamp”. Para dar inicio a esta parte del trabajo, las vacuolas aisladas se depositaron cuidadosamente en la cámara de registro (1 cm<sup>3</sup> volumen), montada y fijada en un microscopio invertido (Nikon DIAPHOT- TMD, Tokyo, Japón). En la cámara de registro también se colocó un electrodo de referencia compuesto de agar al 3% en la solución de la pipeta (interior de la vacuola), conectado a un filamento de Ag-AgCl. Después de un tiempo de aproximadamente 10 min, la mayoría de las vacuolas de células guarda se depositaron en el fondo de la cámara de registro y se observó la preparación bajo el microscopio (40x). Mediante el empleo del microscopio se pudo controlar el acercamiento lento de la pipeta a la vacuola localizada en la cámara de registro para la obtención del sellado entre la pipeta y la vacuola, con ayuda de un micromanipulador mecánico (Leica, Alemania). Durante todo este proceso, se mantuvo una ligera presión positiva continua en la pipeta para prevenir su bloqueo, hasta hacer contacto entre la vacuola y la punta de la pipeta, entonces la presión positiva fue removida, resultando ocasionalmente en el aumento espontáneo de la resistencia, hasta alcanzar una resistencia de sellado del orden de los 5 G $\Omega$ ; obteniéndose así, la configuración de vacuola unida. Las pipetas de registro fueron fabricadas de capilares de vidrio de borosilicato (tipo P-1174-IPAK, Sigma Co., Toluca, Mex.) de 100  $\mu$ l de capacidad y de 13 mm de longitud cortados por la mitad. Las resistencias de los microelectrodos (llenos con solución de pipeta) nos dieron lecturas entre 10 y 20 M $\Omega$ . Las micropipetas (aproximadamente 1  $\mu$ m de diámetro) se elaboraron empleando un jalador vertical de dos pasos (Modelo PP-83 Narishige Co. Tokyo, Japón). Las puntas se cubrieron con Sylgard (Dow Corning Co., Midland, Mich, USA), endurecido mediante un sistema de flujo de aire caliente generado por la microforja (ALA Scientific Inst. N.Y. USA), y las puntas se pulieron

mediante la aplicación de calor en esta microforja. La cubierta de silicon tiene la finalidad de disminuir la capacitancia que genera la pipeta cuando entra en contacto con la solución de baño en la cámara de registro, lo cual ayuda en la eliminación del ruido de fondo que se hace presente generalmente en los registros electrofisiológicos.

Los registros de las corrientes se hicieron en las configuraciones de vacuola completa y parches del tonoplasto con orientación correcta (“outside-out”). La configuración de vacuola completa fue obtenida a partir del modo de vacuola-unida, rompiendo una pequeña área de membrana en la punta de la pipeta por la aplicación de un pulso de succión o de voltaje. La obtención de esta configuración se confirmó por el aumento en los picos capacitativos al principio y al final del pulso de voltaje, y que representan el aumento en la superficie asociada a la membrana vacuolar. La configuración de vacuola-completa fue usada para cuantificar la corriente iónica a través del tonoplasto intacto. Las corrientes de canal unitario fueron registradas de parches aislados “outside-out”, obteniéndose desde la configuración de vacuola-completa al remover rápidamente la pipeta de la vacuola, dejando expuesta a la solución de la cámara de registro la membrana externa.

La utilización de soluciones idénticas en la pipeta y en el electrodo de referencia, ayudó para eliminar los potenciales de unión líquida. Los electrodos de Ag-AgCl se conectaron a un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) a través de un cabezal CV201 AU (Axon Instruments Co. USA). Las corrientes de vacuola-completa y canal unitario fueron registradas a una temperatura aproximada de  $21 \pm 2$  °C. Los registros de vacuola completa se obtuvieron con el programa Clampex (pClamp version 6.0, Axon Instruments, USA). Las corrientes iónicas se muestrearon con una frecuencia de 2 KHz. y la señal se filtró a 500 Hz a través del amplificador. Los datos obtenidos se almacenaron directamente en una computadora PC-486 y se analizaron con el programa Clampfit, incluido en el paquete pClamp6.0. Las corrientes vacuolares fueron activadas por la aplicación de pulsos de voltaje desde un potencial de mantenimiento de 0 mV y con duración de 8 s. Se aplicaron pulsos de voltaje entre

$\pm 100$  mV con incrementos de 10 ó 20mV, cada 10 s. La relación corriente-voltaje (I-V) se derivó de la corriente del estado estable, registrada al final del pulso de voltaje. Los registros del canal unitario se obtuvieron por la aplicación de rampas de voltaje desde +100 mV hasta -100 mV a una velocidad de 10 mV/50 ms. La señal de las corrientes del canal unitario se muestrearon con una frecuencia de 2 KHz. y la señal se filtró a 500 Hz procesadas con el programa Fetchex y su análisis se realizó con el programa Clampfit (pClamp version 6.0, Axon Instruments USA.). El signo de las corrientes se hizo con base a la siguiente convención: la polarización de la membrana hace referencia al interior de la vacuola, las corrientes negativas se refieren al movimiento de cargas positivas hacia el interior de la vacuola, de una forma contraria, se consideran como positivas a las corrientes hacia fuera de la vacuola.

## 5.6 Soluciones

Para estudiar la permeabilidad iónica del tonoplasto de las células guarda de *A. thaliana*, se elaboraron diferentes soluciones. La composición de la solución al interior de la vacuola (pipeta) fue: (NMDG)<sub>2</sub>malato (N-metil-D-glucamina) 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, MES 10 mM, pH 5.5, ajustada con sorbitol a 500 mOsmol. La solución del lado citoplásmico (baño) contenía: (NMDG)<sub>2</sub>malato 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, BTP 10 mM, EGTA 5 mM, con una osmolaridad de 500 mOsmol ajustada con sorbitol y con un pH de 7.5. El malato<sup>2-</sup> fue balanceado por NMDG, un catión relativamente impermeable a la membrana, lo que nos aseguró que las corrientes observadas a una concentración de Ca<sup>2+</sup> libre cercanas a 10<sup>-6</sup> M en el citoplasma, a pH 7.5, fueran atribuibles principalmente al movimiento de malato<sup>2-</sup>.

Debido a los requerimientos del protocolo experimental, se emplearon cuatro soluciones de baño, que consistieron de diferentes niveles de pH, variando los mismos por 0.5 unidades, en un rango de pH 5.5 a 7.3. Los cambios de las soluciones citosólicas

a las que cada una de las vacuolas fueron expuestas, se realizaron mediante un sistema de perfusión local.

Para los experimentos donde se estudio el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las corrientes vacuolares de malato<sup>2-</sup>, las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en las soluciones de baño se manejaron de acuerdo a los niveles requeridos, oscilando entre 6 mM y 1 nM (citoplasma) y 1 mM (interior de la vacuola). Debido a la exigencia de controlar con precisión las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en las soluciones de registro, se emplearon los quelantes EGTA y EDTA de acuerdo a su capacidad de buffer para  $\text{Ca}^{2+}$ . EGTA es un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  adecuado en concentraciones de  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$  M, y el EDTA lo es a concentraciones de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  M. Debido a la composición de las soluciones experimentales, así, como al uso de los quelantes y del malato<sup>2-</sup>, fue necesario estimar las concentraciones libres de todos los iones presentes en las soluciones con el programa WinMAXC<sup>16</sup> Version 2.5, 2002 (Chris Patton, Stanford University, Hopkins Marine Station, Pacific Grove), debido a la interacción compleja que existe en este sistema multiiónico.

El potencial reverso teórico ( $E_{\text{rev}}$ ), se calculó en base a la ecuación de Nernst (ecuación 1).

$$1) \quad E_{\text{ion}} = \frac{RT}{zF} \ln \left[ \frac{[\text{ion}]_o}{[\text{ion}]_i} \right]$$

La actividad iónica para malato<sup>2-</sup> en solución citoplásmica se calculó mediante la ecuación de Debye-Hückel, para obtener el valor del coeficiente de actividad de los aniones malato<sup>2-</sup> en solución acuosa a 25°C (ecuación 2).

$$2) \quad \log \gamma_{\pm} = \frac{0.51 z_+ z_- \sqrt{\frac{1}{2} \sum_j c_j z_j^2}}{32 + \sqrt{\frac{1}{2} \sum_j c_j z_j^2}}$$

La conductancia de los canales unitarios se determinó a partir de la pendiente de las gráficas I-V y mediante la fórmula de Ohm (ecuación 3).

$$3) \quad V = IR$$

## 6. RESULTADOS

La caracterización electrofisiológica más completa de varios canales iónicos se ha realizado en las células guarda (Hedrich et al., 1990; Schroeder & Keller, 1992; Schmidt & Schroeder, 1994). Los resultados que aquí se reportan revelan el comportamiento de un canal aniónico del tonoplasto bajo distintas condiciones, su tipo de activación, su dependencia del voltaje, así como su regulación por factores citoplásmicos como pH y  $\text{Ca}^{2+}$ .

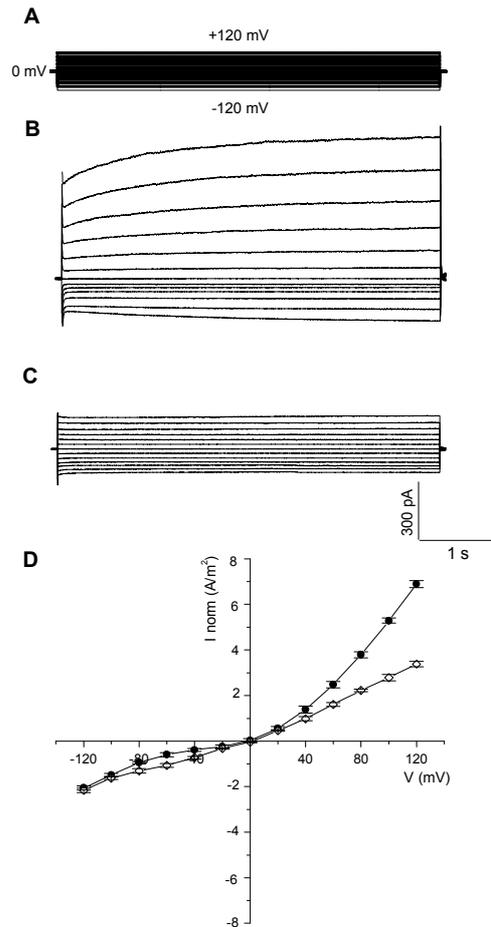
Los registros de las corrientes iónicas se realizaron empleando la técnica de “patch-clamp” en la configuración de vacuola completa en vacuolas aisladas de las células guarda de la planta *A. thaliana*. Para favorecer el transporte de malato<sup>-2</sup> desde el medio citoplasmático hacia el interior del compartimento vacuolar, la composición de la solución del lado citoplasmático consistió de 100 mM (NMDG)<sub>2</sub>malato, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM BTP, EGTA 5 mM y pH 7.5; La composición de la solución al interior de la vacuola fue de 10 mM (NMDG)<sub>2</sub>malato, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM MES, a pH 5.5, con osmolaridad de 500 mOsmol (soluciones básicas). El registro de las corrientes vacuolares se realizó desde un potencial de mantenimiento de 0 mV ( $V_h$ ), y la activación de las corrientes se obtuvo variando el potencial entre +120 mV y -100 mV en pasos de 20 mV. Los pulsos de voltaje positivos generaron inicialmente la activación rápida de corrientes salientes seguida de una activación lenta que requirió de varios segundos para alcanzar un nivel de corriente estable (Fig. 3A). Al final del pulso de voltaje, las corrientes salientes mostraron una desactivación rápida. En contraste, los pulsos de voltaje negativos generaron corrientes de activación rápida que mantuvieron un nivel constante desde el inicio, y hasta el final del pulso de voltaje que fueron de menor magnitud que las corrientes salientes (Fig. 3A). Para obtener mayor información y poder definir el ión responsable de estas corrientes, se modificó la condición de registro utilizando soluciones de KCl. Las vacuolas fueron expuestas a soluciones de

100 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM BTP, EGTA 5 mM, a pH 7.5, en el lado citoplásmico y 10 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES, con pH 5.5 en el lumen vacuolar. Bajo estas condiciones, la aplicación de los pulsos de voltaje negativos y positivos estimularon la actividad de corrientes entrantes y salientes respectivamente, que fueron activadas de manera instantánea y que permanecieron constantes durante la duración de los pulsos de voltaje de 5 s (Fig. 3B). Las corrientes salientes registradas sin embargo, fueron de menor magnitud que aquellas observadas en presencia de malato<sup>2-</sup> (comparar Figs. 3A y 3B). Estas corrientes mostraron el mismo comportamiento de los canales FV anteriormente reportados (Hedrich & Neher, 1987), lo cual concuerda con las condiciones experimentales empleadas. Los valores de las corrientes al inicio y al final de los pulsos de voltaje se emplearon para obtener gráficas corriente-voltaje (I-V), en presencia de soluciones de (NMDG)<sub>2</sub>malato y KCl (Fig. 3C). En esta figura se puede observar que las corrientes registradas en presencia de (NMDG)<sub>2</sub>malato presentaron una rectificación saliente, comparadas con las corrientes obtenidas con soluciones de KCl, las cuales mostraron una relación lineal (Fig. 3C). Estos resultados indicaban que las corrientes salientes registradas en presencia de (NMDG)<sub>2</sub>malato correspondían al movimiento de malato<sup>2-</sup> hacia el interior de la vacuola, como se ha reportado anteriormente (Pantoja et al., 1992; Pantoja & Smith, 2002).

Para obtener mayor información sobre las propiedades de las corrientes de malato<sup>2-</sup> del tonoplasto de las células guarda, se determinó su selectividad con relación a otros iones mediante la aplicación de un protocolo para la obtención de las corrientes de cola obtenidas al repolarizar la membrana a distintos voltajes después de un pulso activador. Mediante la aplicación de este protocolo se pretendió obtener el potencial de inversión de las corrientes ( $E_{rev}$ , potencial en donde el flujo neto de iones a través de la membrana es cero). El protocolo de voltaje partió desde un potencial de mantenimiento de 0 mV, activando a las corrientes salientes mediante la aplicación de un pulso de voltaje de +120 mV, durante 5 s. Dichas corrientes fueron desactivadas por un cambio

en el pulso de voltaje de -10 mV. Este protocolo se repitió 18 veces desde +100 mV hasta -70 mV (Fig. 4A). Los registros de las corrientes de cola se obtuvieron de vacuolas expuestas a 100 mM (NMDG)<sub>2</sub>malato del lado citoplasmático, y 10 mM (NMDG)<sub>2</sub>malato del lado vacuolar. Sin embargo, la aplicación de este protocolo no permitió obtener claramente el  $E_{rev}$  de las corriente salientes (Fig. 4A), por lo que se procedió a utilizar el protocolo de rampas de voltaje. Este último inició desde un potencial de mantenimiento de 0 mV, llevándolo hasta un nivel de +120 mV durante 5 s para activar a las corrientes salientes y a continuación se aplicó una rampa de voltaje desde +120 mV hasta -100 mV, con una velocidad de 24 mV/100 ms (Fig. 5A). Las rampas de voltaje se aplicaron a vacuolas expuestas a tres concentraciones asimétricas, dichas condiciones de registro fueron 100, 50 ó 10 mM (NMDG)<sub>2</sub>malato en el lado del citoplasma, y del lado vacuolar 10 mM (NMDG)<sub>2</sub>malato. La aplicación de este protocolo permitió registrar la variación del  $E_{rev}$  con las diferentes soluciones citoplásmicas de (NMDG)<sub>2</sub>malato, pudiéndose observar que el  $E_{rev}$  se desplazó hacia valores más positivos conforme la concentración citoplásmica de malato<sup>2-</sup> se disminuyó, lo cual indicó que las corrientes salientes correspondían al movimiento del anión malato<sup>2-</sup> (mal<sup>-2</sup>) hacia el interior de la vacuola (fig. 5B). Esto se pudo observar claramente al graficar los valores de  $E_{rev}$  contra la concentración citoplásmica de malato<sup>2-</sup> (fig. 5C). En esta gráfica se puede observar que  $E_{rev}$  varió 20 mV/decada de concentración de mal<sup>-2</sup>, valor muy cercano al potencial de equilibrio del malato<sup>2-</sup>, de acuerdo a la ecuación de Nernst (ver materiales y métodos), confirmando que las corrientes salientes registradas en presencia de malato<sup>2-</sup> corresponden al movimiento de malato<sup>2-</sup> hacia el interior de la vacuola. Debido a que la actividad de los iones divalentes disminuye considerablemente en soluciones salinas (Nobel, 1983), empleamos las actividades (concentraciones libres) en lugar de las concentraciones de malato<sup>2-</sup> (Tabla 1), para calcular el  $E_{rev}$  teórico de este ión. La tabla 1 muestra los valores de  $E_{mal}$  calculados con la ecuación de Nernst, así como los valores obtenidos experimentalmente, para las distintas condiciones establecidas (fig. 5C).

Diversos tipos de canales iónicos que participan en la regulación de diferentes procesos fisiológicos han sido caracterizados en la membrana vacuolar de las células guarda (SV, VK, FV,

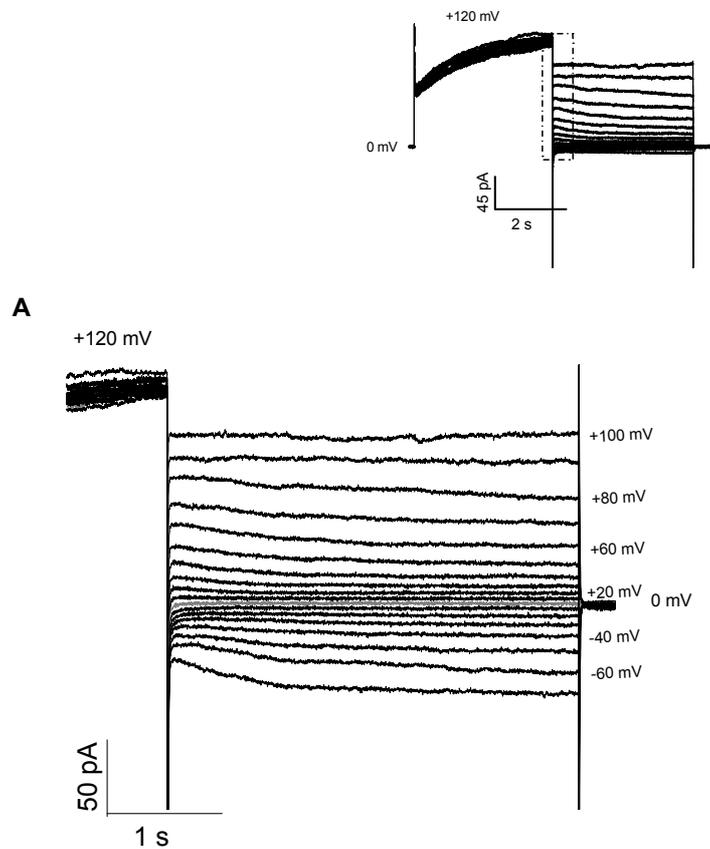


**Figura 3. Registro original de corrientes vacuolares de malato<sup>2-</sup> de una célula guarda de *A. thaliana*.** **A.** arriba, corrientes obtenidas de una vacuola expuesta a soluciones (mM) de 100 (NMDG)<sub>2</sub>malato, pH 7.5, 2 MgCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 EGTA mM del lado del citoplasma y 10 (NMDG)<sub>2</sub>malato, pH 5.5, 2 MgCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, del lado vacuolar. **A** abajo, protocolo de pulsos de voltaje I-V total. **B** corrientes registradas en vacuola expuesta a soluciones (mM) de 100 KCl del lado del citoplasma (baño), y 10 KCl del lado vacuolar (pipeta). **C** gráfica corriente-voltaje (I-V) de las corrientes finales registradas en **A** ( ) y **B** (◇). **Inserto:** Muestra la gráfica corriente-voltaje de las corrientes tomadas al inicio del pulso de voltaje de las corrientes registradas en **A** ( ) y **B** (◇). Los registros que se muestran en las figuras se obtuvieron de la misma célula. Los puntos son la media ± SE de al menos 14 vacuolas.

Tabla 1. Valores del potencial de  $E_{\text{mal}}$  calculados mediante la ecuación de Nernst y obtenidos experimentalmente bajo las diferentes condiciones experimentales.

$[(\text{NMDG})_2\text{malato}]_{\text{baño}}$ $/[(\text{NMDG})_2\text{malato}]_{\text{pip}}$ (mM)	$[\text{mal}^-]_{\text{cit libre}}$ (mM)	$[\text{mal}^-]_{\text{vac libre}}$ (mM)	$E_{\text{mal}^{2-}}$ estimado (mV)	$E_{\text{mal}^{2-}}$ estimado (mV)	$E_{\text{mal}^{2-}}$ obtenido (mV)
100 mM/10 mM	44	7.1	-29	-23	-20
50 mM/10 mM	19	7.1	-20	-12	-11
10 mM/10 mM	7.1	7.1	0	0	0

$[(\text{NMDG})_2\text{malato}]_{\text{baño}} / [(\text{NMDG})_2\text{malato}]_{\text{pip}}$ , se refiere a la concentración total de  $\text{mal}^{2-}$  en la solución de baño (lado citoplásmico) y en la pipeta (lado vacuolar), respectivamente. La actividad de  $\text{malato}^{2-}$  en las soluciones se calculó en base a la ecuación de Debye-Hückel (West, 1963) (ver mat. y mét.).



**Figura 4. Determinación del  $E_r$  mediante el registro de las corrientes de cola.** Las corrientes de cola se obtuvieron de la configuración de vacuola completa (whole cell), en las vacuolas de células guarda de *A. thaliana*. El registro de las corrientes de cola no mostró claramente un cambio en la dirección de estas, lo cual no permitió determinar el potencial reverso. Los registros se realizaron de vacuolas expuestas a (mM) 100 (NMDG)<sub>2</sub>malato, 1 MgCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 EGTA mM y pH 7.5, del lado citoplasmático, y 10 (NMDG)<sub>2</sub> malato, 1 MgCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, a pH 5.5, del lado vacuolar. **Inserto:** muestra el registro original de las corrientes de cola completo. Resultados similares se observarán en no menos de 20 vacuolas.

VVCa, VCl), en los cuales se han identificado aspectos importantes sobre su regulación por diversos factores citoplásmicos. Algunos de los componentes que regulan la actividad de estos canales iónicos incluyen a segundos mensajeros como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ , AMPc, GMPc,  $\text{InsP}_3$ , 1,-2-diacilglicerol, proteínas G y ADPCRC. Para estudiar la posible regulación de los canales de malato<sup>2-</sup> por  $\text{pH}_{\text{cit}}$ , los registros de las corrientes se obtuvieron de vacuolas expuestas a las soluciones básicas, donde la solución citoplásmica varió en un rango de  $\text{pH}_{\text{cit}}$  entre 7.5 a 5.5. Los niveles de pH se variaron por 0.5 unidades ( $\text{pH}_{\text{cit}}$  7.5, 7.0, 6.5, 6.0 y 5.5). La activación de las corrientes de malato<sup>2-</sup> se realizó mediante la aplicación del protocolo de voltaje similar al de la figura 3A. En general, las corrientes de malato<sup>2-</sup> se vieron reducidas cuando el  $\text{pH}_{\text{cit}}$  se acidificó, observándose una mayor inhibición conforme el  $\text{pH}_{\text{cit}}$  se hizo más ácido (fig. 6A). Así, el cambio de 7.5 a pH 7 causó una reducción en la magnitud de las corrientes de malato<sup>2-</sup> en un 8% (fig. 6C). Los valores de las corrientes al final y al inicio de los pulsos de voltaje se graficaron en las figuras 6B y C. Los registros de las corrientes de malato<sup>2-</sup> registradas a  $\text{pH}_{\text{cit}}$  de 6.5, 6.0 y 5.5 mostraron una disminución de 42%, 50% y 80%, respectivamente, comparadas con las corrientes registradas a  $\text{pH}_{\text{cit}}$  7.5 (fig. 6C). La inhibición de las corrientes de malato<sup>2-</sup> por  $\text{H}^+$  fue reversible, ya que al cambiar el  $\text{pH}_{\text{cit}}$  al valor inicial de 7.5 causó que las corrientes recuperaran casi completamente su nivel original (fig. 6A $\blacktriangleright$ ). El efecto de la acidificación del pH de citoplasma, sobre las corrientes vacuolares de malato<sup>2-</sup>, se resume en la relación I-V (fig. 7A), y en las figuras 6B y C. Estos resultados nos indican que los  $\text{H}^+$  regulan la actividad del canal vacuolar de malato<sup>2-</sup> en las células guarda de *A. thaliana*.

Los cambios en la concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  en las células guarda es un mecanismo importante de señalización que funciona en el control de la apertura y el cierre estomatal (Ng et al., 2001). Debido a la regulación de la actividad de los canales iónicos por  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática en las células vegetales (Dietrich et al., 1998; Schroeder & Hagiwara, 1998; Blatt et al., 2000; Hamilton et al., 2000; Véry & Davies, 2000; White, 2000; Ng et al., 2001; Sanders et al., 2002), así como en la membrana

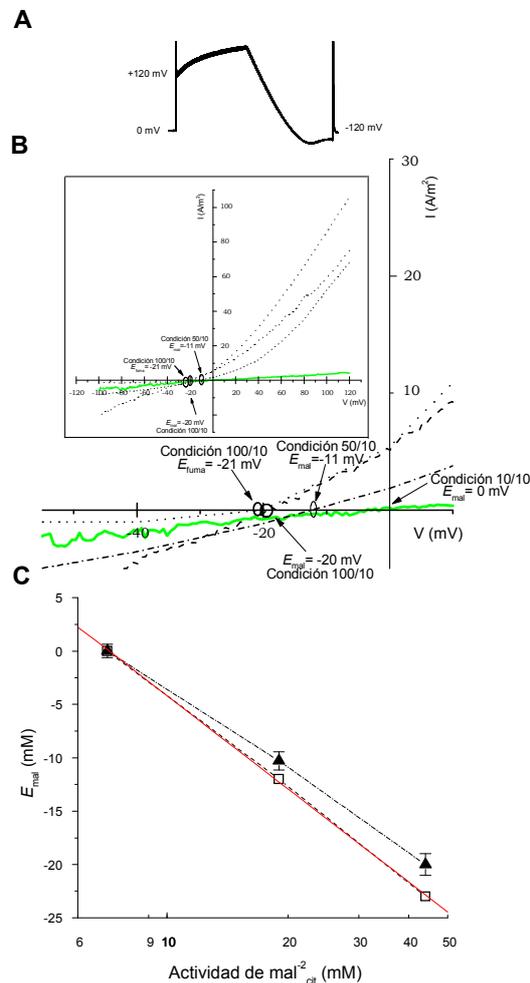
vacuolar (Hedrich & Neher, 1987; Ward & Schroeder, 1994; Allen & Sanders, 1995; Allen & Sanders, 1996; Sanders et al., 1996; Pottosin et al., 1997; Bewell et al., 1999), uno de los objetivos del presente trabajo, fue estudiar la posible regulación del canal vacuolar de malato<sup>2-</sup> de las células guarda de *A. thaliana* por Ca<sup>2+</sup><sub>cit</sub>.

Durante el registro de las corrientes de malato<sup>2-</sup> bajo diferentes [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub> libre se presentó una gran dificultad en poder obtener registros confiables ya que muy frecuentemente los registros mostraron una gran variabilidad. Esto es, al disminuir la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub> libre se podía registrar en ocasiones una disminución en la magnitud de las corrientes, mientras que en otro registro bajo las mismas condiciones experimentales, se observaba un aumento en la magnitud de las corrientes. Este tipo de respuesta se pudo observar con cualquier disminución en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub> libre. Durante el registro de las corrientes de malato<sup>2-</sup> en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub> bajas, la resistencia de los sellos disminuía considerablemente hasta perderse, lo cual nos lleva a pensar que posiblemente el sello entre la pipeta y el tonoplasto sufría alteraciones que fueron las responsables de los cambios registrados en esta serie de experimentos. Esta documentado en la literatura que el Ca<sup>2+</sup> es importante en el mantenimiento de la estructura de las membranas, lo que posiblemente haya causado una desestabilización del sello entre las membranas y las pipetas de registro cuando la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub> libre se disminuyó en el lado citoplásmico de las vacuolas, previniendo así la obtención de registros confiables que nos permitieran determinar la regulación de las corrientes de vacuolares de malato<sup>2-</sup> por Ca<sup>2+</sup>.

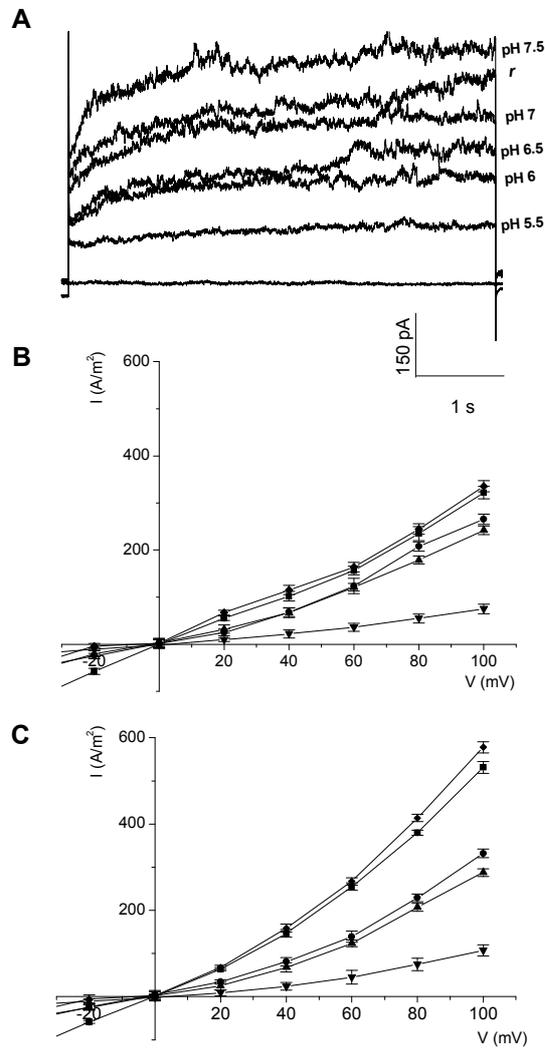
Durante el registro de las corrientes vacuolares, en la configuración de vacuola completa, se observó la disminución gradual en la magnitud de las corrientes vacuolares de malato<sup>2-</sup> (fig. 8A). Este fenómeno es conocido como “run-down”, lo que causó que la magnitud de las corrientes disminuyeran con el tiempo, alcanzando aproximadamente un 8% de la magnitud inicial a los 40 min (fig. 8B). La pérdida de actividad de los canales de malato mostró una constante de tiempo  $\tau = 10.3 \pm 3.6$  min. Este fenómeno es común en los registros electrofisiológicos y se asume que es debido a las condiciones experimentales, ya que muy probablemente, factores importantes que

mantiene la actividad de los canales iónicos no son incluidos en las soluciones de prueba, y más aún con vacuolas aisladas donde el citoplasma es lavado durante el aislamiento de aquellas.

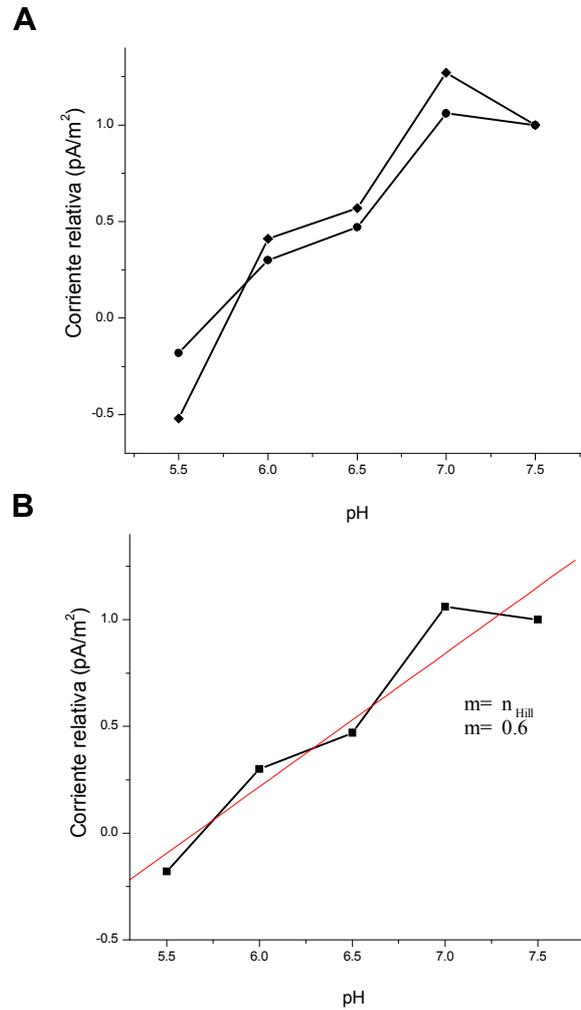
Dentro de los principales ácidos orgánicos presentes en hojas de *A. thaliana* encontramos al malato<sup>2-</sup>, al fumarato<sup>2-</sup> y al citrato<sup>3-</sup> (Chia et al., 2000). Dichos ácidos orgánicos son transportados a través del tonoplasto para su acumulación temporal (a menudo a altas concentraciones) en la vacuola. Existen evidencias de que uno de los rasgos distintivos del sistema que media el transporte de malato<sup>2-</sup> en la membrana vacuolar de *Kalanchoë daigremontiana* (planta CAM), es la selectividad característica entre varios dicarboxilatos, donde fumarato<sup>2-</sup> es el anión más permeable comparado con malato<sup>2-</sup> (White & Smith, 1989). Para investigar la selectividad del canal de malato<sup>2-</sup>, las vacuolas de las células guarda fueron expuestas a una solución de 100 mM (NMDG)<sub>2</sub>fumarato en el lado citoplásmico de la membrana. Los registros obtenidos bajo estas condiciones mostraron que el cambio de malato<sup>2-</sup> por fumarato<sup>2-</sup> en el lado citoplásmico, indujo un incremento en la magnitud de las corrientes salientes (fig. 9B), en comparación con las corrientes de malato<sup>2-</sup> (fig. 9A). Para poder comparar la magnitud de las corrientes de malato<sup>2-</sup> y fumarato<sup>2-</sup>, estas fueron normalizadas al ser expresadas por unidad de área (A/m<sup>2</sup>), basados en las mediciones del diámetro de cada una de las vacuolas empleadas. Graficando los valores de la corriente inicial y final de fumarato<sup>2-</sup>, en sus respectivas gráfica I-V, y comparadas con los valores de las corrientes registradas con malato<sup>2-</sup> (fig. 9C), se confirma que en presencia de fumarato<sup>2-</sup>, la magnitud de las corrientes fue mayor que las corrientes registradas con malato<sup>2-</sup>. Posteriormente, procedimos a determinar el potencial de inversión del fumarato<sup>2-</sup>, mediante la utilización de las rampas de voltaje, aplicándose a vacuolas expuestas a una concentración de 100 mM (NMDG)<sub>2</sub>fumarato, en el lado del citoplasma, y del lado vacuolar 10 mM (NMDG)<sub>2</sub>malato. El  $E_{rev}$  de este ión, fue igual a -21mV, un valor muy cercano al potencial de equilibrio obtenido para malato<sup>2-</sup> (-20 mV), de acuerdo a la ecuación de Nernst (fig. 5B).



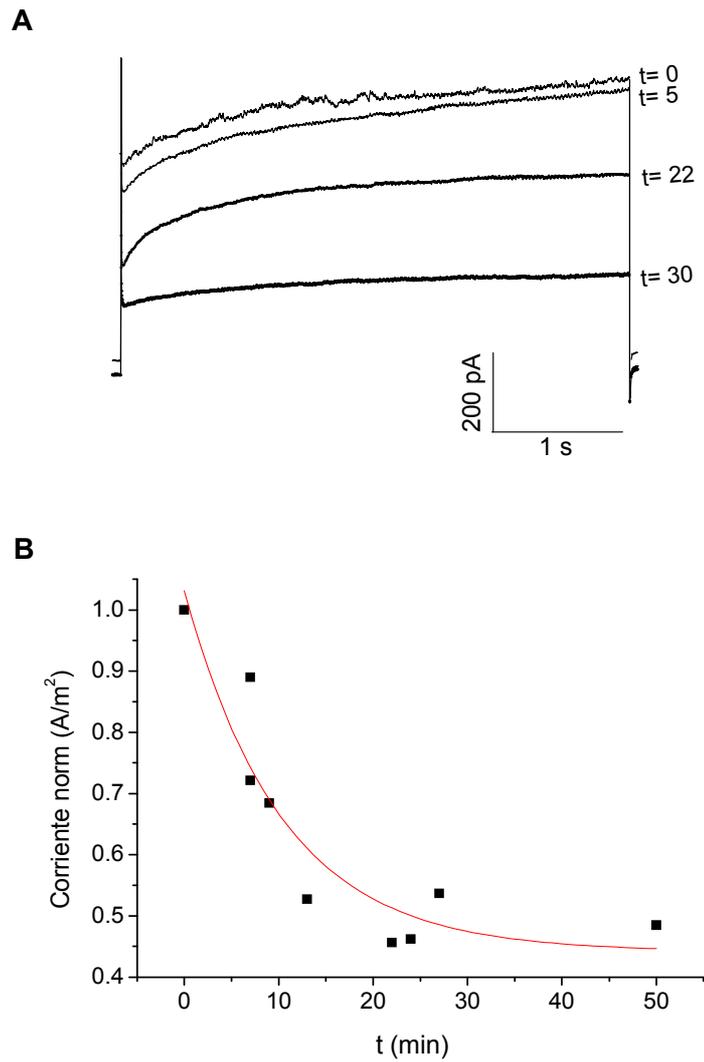
**Figura 5. Registro de  $E_r$  por el protocolo de rampas de voltaje.** **A** protocolo de rampa de voltaje. El cual partió de un potencial de mantenimiento de 0 mV, llevándolo hasta +120 mV durante 5 s, a continuación se aplicó la rampa de voltaje desde +120 mV hasta -100 mV, con una velocidad de 24 mV/100 ms. **B** gráfica I-V de las corrientes entrantes de malato<sup>2-</sup> a distintas concentraciones (mM) 100 (NMDG)<sub>2</sub>malato (~~), 50 (NMDG)<sub>2</sub>malato (•—•) y 10 (NMDG)<sub>2</sub>malato (—), 100 (NMDG)<sub>2</sub>fumarato (---), en el lado del citoplasma y 10 (NMDG)<sub>2</sub>malato en el interior de vacuolas de células guarda de *A. thaliana*. Las flechas indican el valor del potencial de Nernst obtenido para malato<sup>2-</sup> (-20 y -10 mV), bajo la condición 100 (NMDG)<sub>2</sub>malato, y para fumarato<sup>2-</sup> (-21 mV), para la condición 100 (NMDG)<sub>2</sub>fumarato. **Inserto:** muestra la gráfica I-V completa. **C**, variación de  $E_r$  con respecto a las concentraciones de malato<sup>2-</sup> citoplásmico. En la gráfica se muestran los valores del potencial de Nernst calculado para malato<sup>2-</sup> en base a la actividad de este anión ( ), y los valores obtenidos experimentalmente ( ). La pendiente de la recta calculada de los datos obtenidos fue igual a 20 mV/decada de concentración de malato<sup>2-</sup>. Los resultados son la media de al menos 10 vacuolas.



**Figura 6. Inhibición de las corrientes entrantes de malato<sup>2-</sup> por H<sup>+</sup><sub>cit</sub>.** **A** La acidificación del pH<sub>cit</sub> causó una disminución en la magnitud de las corrientes salientes de malato<sup>2-</sup>. La recuperación de la corriente vacuolar de malato<sup>2-</sup> se indica como (**r**). **B** y **C** muestran gráficas I-V que resumen el efecto de la acidificación del citoplasma sobre las corrientes iniciales y finales de malato<sup>2-</sup>, respectivamente de las vacuolas de células guarda a diferentes potenciales de membrana pH 7.5 (◇), 7.0 (□), 6.5 (△), 6.0 (○) y 5.5 (▽).

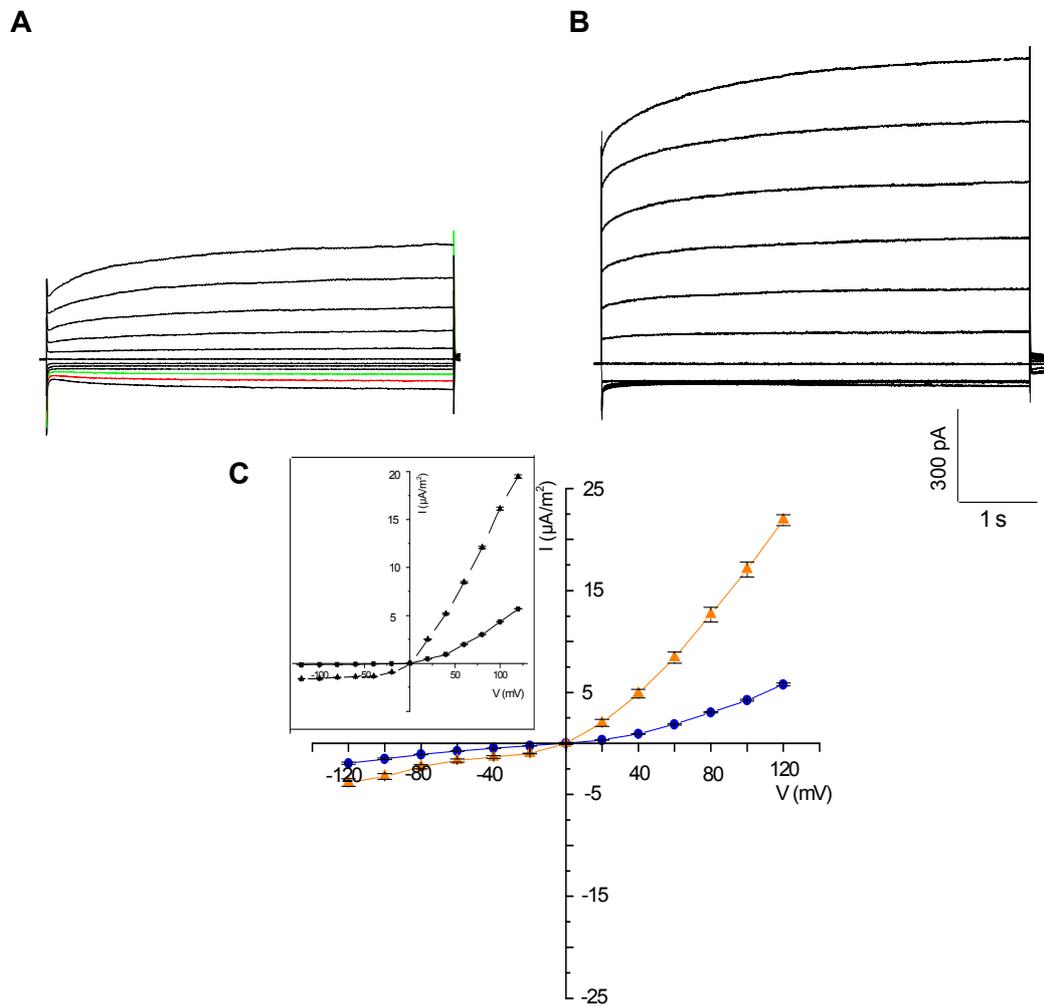


**Figura 7. Efecto del  $pH_{cit}$  sobre las corrientes vacuolares de malato<sup>2-</sup>.** **A** la gráfica muestra el resumen de los efectos de  $pH_{cit}$  en las corrientes vacuolares de malato<sup>2-</sup> iniciales y finales a +120 mV. **B** la gráfica muestra que las variaciones de  $pH_{cit}$  en un rango fisiológico (de 7.5 a 5.5) tiene efectos claros en las corrientes finales de malato<sup>2-</sup> registradas a +120 mV. El análisis de regresión lineal dió un coeficiente de Hill de 0.60, un valor de  $K_d$  de 2 mM y un  $pK_a$  de -5.7. Los registros se realizaron en soluciones de baño cuya composición fue (mM) 100 (NMDG)<sub>2</sub>malato, 2 MgCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 EGTA a distintos  $pH_{cit}$  y 10 (NMDG)<sub>2</sub>malato, MgCl, 1 CaCl<sub>2</sub> a pH 5.5, del lado vacuolar. Los resultados son la media  $\pm$  SE de al menos 5 vacuolas.

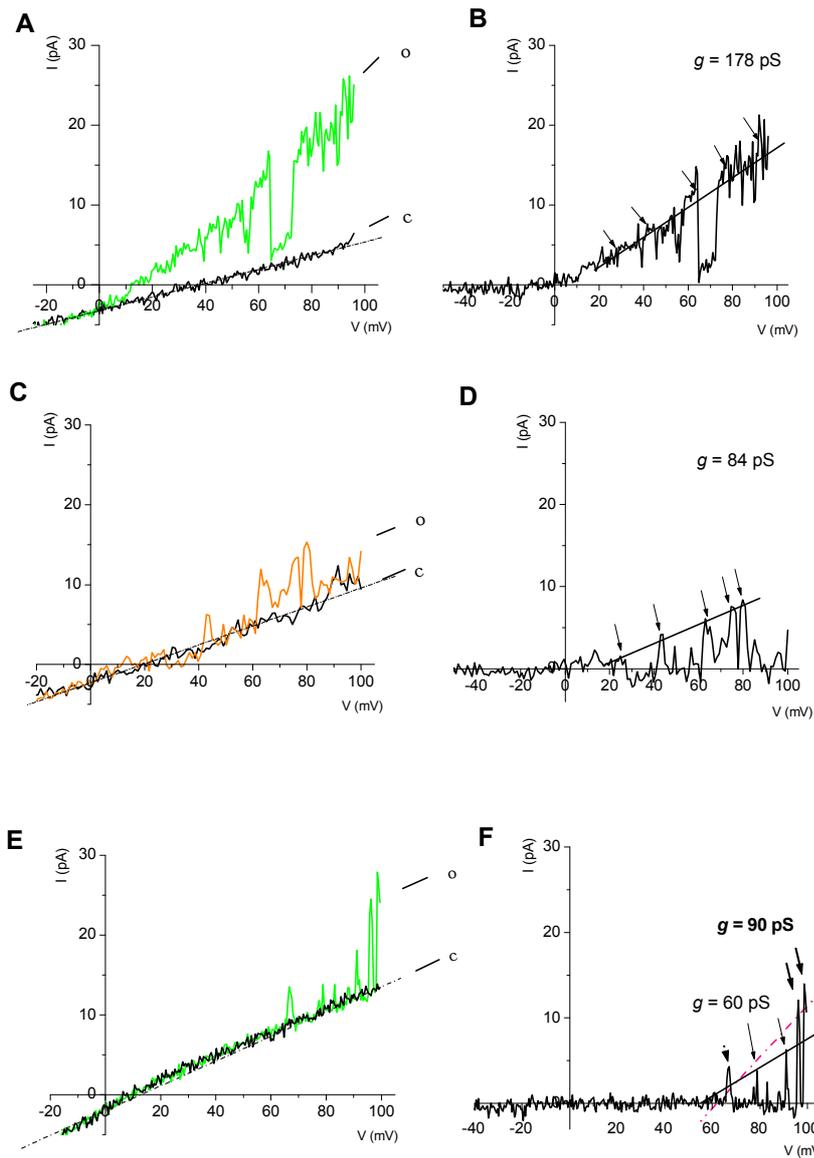


**Figura 8. “Run-down” de las corrientes de malato<sup>2-</sup>.** **A**, registro original de corrientes vacuolares de malato<sup>2-</sup> registradas a +120 mV, en distintos tiempos de registro (t), en la misma vacuola expuesta a (mM) 100 (NMDG)<sub>2</sub>malato, 1 MgCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 EGTA y pH 7.5, del lado citoplasmático, y 10 (NMDG)<sub>2</sub>malato, 1 MgCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, a pH 5.5, del lado vacuolar. **B**, gráfica corriente normalizada contra tiempo. La gráfica muestra el decremento gradual de las corrientes salientes con respecto al tiempo. Los datos se ajustaron a una exponencial. La constante de tiempo de la inactivación ( $\tau$ ), calculada para las corrientes de malato<sup>2-</sup> fue de  $\tau = 10.3 \pm 3.6$  min. Resultados similares se observaron en otros experimentos (n=8).

A pesar de muchos intentos para registrar la actividad de canal unitario en parches aislados de la membrana vacuolar, fue difícil obtener dichos registros. Generalmente, la actividad que se pudo registrar bajo esta modalidad de la técnica de "patch-clamp" fue, o muy "ruidosa" o con una actividad muy esporádica. De los registros obtenidos bajo la configuración de parche de membrana aislada con orientación correcta (outside out) del tonoplasto de las células guarda de *A. thaliana*, logramos identificar actividad a nivel de canal unitario (single channel, SC). Las corrientes unitarias se determinaron por la aplicación de rampas de voltaje entre +120 y -100 mV, las cuales iniciaron en un potencial de mantenimiento de 0 mV. En las condiciones experimentales, las vacuolas fueron expuestas a las soluciones básicas de malato<sup>2-</sup> o fumarato<sup>2-</sup>, tanto para el medio citoplásmico como vacuolar. Las corrientes unitarias se determinaron seleccionando uno de los nueve trazos de los registros de las rampas de voltaje que mostraron el canal en el estado aparentemente cerrado (closed, c), y otro(s) trazo(s) donde se observaron con claridad las transiciones entre el estado abierto (open, o) y el estado cerrado. Ambos trazos, se graficaron en la misma I-V (fig. 10A, C y E para malato<sup>2-</sup> y G, I y K, para fumarato<sup>2-</sup>). El trazo donde no se observó la actividad de canales unitarios se restó al segundo, obteniendo así, la corriente unitaria de dichos canales (fig. 10B, D, F y H, J y L). Posteriormente, se seleccionaron las aperturas de los canales (fig. 10B, D, F y H, J y L), que corresponden a la línea punteada, calculando la conductancia de los canales a partir de la pendiente de la gráfica I-V. A concentraciones de 100 y 10 mM (NMDG)<sub>2</sub>malato, en el lado citoplasmático y vacuolar de la membrana, respectivamente, obtuvimos valores de las conductancias que variaron entre 180 a 90 pS (fig. 10B, D y F), y a concentraciones idénticas de fumarato<sup>2-</sup> obtuvimos valores de las conductancias que variaron entre 171 y 103 pS. Estos resultados muestran que las corrientes de malato<sup>2-</sup> y fumarato<sup>2-</sup> son mediadas por canales iónicos selectivos a dicarboxilatos presentes en el tonoplasto de las células guarda de *A. thaliana*.



**Figura 9. La sustitución de malato<sup>2-</sup> por fumarato<sup>2-</sup> conduce a la activación de corrientes entrantes de mayor magnitud en vacuolas de células guarda.** **A** registro original de corrientes obtenidas de vacuolas expuestas a soluciones de (mM) 100 (NMDG)<sub>2</sub>malato, pH 7.5, 2 MgCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 EGTA del lado de citoplasma y 10 (NMDG)<sub>2</sub>malato, pH 5.5, 2 MgCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, del lado vacuolar. **B** corrientes registradas en presencia de fumarato<sup>2-</sup>. **C**, gráfica corriente- voltaje (I-V) de las corrientes finales de fumarato<sup>2-</sup> ( ) y malato<sup>2-</sup> ( ). **Inserto:** Muestra la gráfica corriente-voltaje de las corrientes tomadas al inicio del pulso de voltaje de las corrientes registradas en **A** ( ) y **B** ( ).



**Figura 10. Actividad de canal unitario.** **A, C y E.**- La gráfica corriente-voltaje (I-V), muestra los trazos originales obtenidos de parches de membrana vacuolar en la configuración outside-out, expuestos a (mM) 100 (NMDG)<sub>2</sub>malato, pH 7.5, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 EGTA del lado de citoplasma y 10 (NMDG)<sub>2</sub>malato, pH 5.5, 2 MgCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, del lado vacuolar, **G, I y K** fueron expuestos a (mM) 100 (NMDG)<sub>2</sub>fumarato, pH 7.5, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 EGTA del lado de citoplasma y 10 (NMDG)<sub>2</sub>fumarato, pH 5.5, 2 MgCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, del lado vacuolar, los cuales se registraron a un potencial de +120 a -100 mV. **c**, corresponde al registro de un canal cerrado y **o** al de un canal abierto. **B, D y F** corresponden a A, C y E, respetivamente, y **H, J y L** corresponden a G, I y K, respectivamente, estos registros muestran la actividad del canal unitario una vez restado el trazo control donde la corriente es **o**. la línea corresponde a la conductancia derivada (ver resultados)

## 6. DISCUSION

El malato<sup>2-</sup> es un compuesto central del metabolismo vegetal debido a los múltiples papeles funcionales que desempeña, tales como sustrato para la respiración y la generación de energía, un elemento importante en los tres tipos de fotosíntesis (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y CAM), en la oxidación de ácidos grasos, biosíntesis de ligninas, función estomatal y pulvinal, fijación de nitrógeno (N<sub>2</sub>) y biosíntesis de amino ácidos, balance iónico, absorción de fosfato (PO<sub>4</sub><sup>=</sup>) y hierro (Fe<sup>2+</sup>); así como tolerancia al aluminio (Al<sup>-</sup>) (Lance & Rustin, 1984; Gietl, 1992; Kochian, 1995; Martinoia & Rentsch, 1994). Debido a que el malato<sup>2-</sup> es un compuesto versátil, su movimiento a través de las membranas que separan los distintos compartimentos celulares es bastante dinámico. Esta bien establecido que el malato<sup>2-</sup> es uno de los principales solutos que se almacena en las vacuolas de las células vegetales y, que generalmente contribuye de manera sustancial al balance de carga de cationes vacuolares.

La apertura y el cierre del poro estomatal en la epidermis de hojas son regulados por los cambios en el contenido osmótico y en el turgor celular. Es precisamente en la vacuola donde se desarrolla la regulación del turgor celular, resultado del transporte y acumulación de iones K<sup>+</sup>, malato<sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, y de sacarosa, lo cual conduce a la toma osmótica del agua, generando un aumento en la turgencia de las células y, por lo tanto, la apertura de los estomas (Humble & Raschke, 1971; MacRobbie, 1981, 1993, 1990; Boller & Wiemken, 1986). Los procesos mencionados con anterioridad son el resultado de la actividad de distintos transportadores, entre ellos, canales iónicos localizados en la membrana vacuolar de las células guarda. El transporte de K<sup>+</sup> a través de la membrana vacuolar es dominado por un canal altamente selectivo a K<sup>+</sup>, el canal VK, activado por el aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub>, y cuya actividad no es dependiente de voltaje. Otro de los canales cuya actividad está regulada por el aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub>, y que también es permeable a K<sup>+</sup> (Schulz-Lessdorf & Hedrich, 1995; Allen & Sanders, 1996)

es el canal SV. La actividad de un tercer tipo de canal permeable a  $K^+$  son los FV, cuya actividad se observa tanto a potenciales positivos como negativos. Se ha propuesto que los canales FV facilitan la liberación de  $K^+$ , desde la vacuola hacia el citoplasma durante el proceso del cierre estomatal, debido al incremento en la magnitud de las corrientes, en presencia de un gradiente de  $K^+$  en el citosol (Allen & Sanders, 1996).

Las principales corrientes iónicas registradas en la vacuola de las células guarda de la epidermis de hoja de *A. thaliana*, expuestas a soluciones de  $(NMDG)_2$ malato y a niveles fisiológicos de  $[Ca^{2+}]$  citoplasmático, fueron corrientes que mostraron una rectificación saliente. La cinética de estas corrientes fue muy similar a la reportada en la literatura para canales de malato<sup>2-</sup> (*Beta vulgaris*, Pantoja et al., 1992b; *A. thaliana*, Cerana et al., 1995, y *Kalanchöe daigremontiana*, Cheffings et al., 1997; Pantoja & Smith, 2002, Hafke et al., 2003). Ésto es, una cinética compuesta de una activación instantánea al inicio del pulso de voltaje, seguida de un componente dependiente de tiempo, el cual requirió de más de 8 segundos para alcanzar un nivel estable (Fig. 3A). Estos resultados claramente nos indican que en el tonoplasto de las células guarda de los estomas de *A. thaliana* existe un canal selectivo a malato<sup>2-</sup> y que, muy posiblemente, sea este el canal responsable de su acumulación durante la apertura de los estomas.

Para determinar con mayor seguridad si las corrientes salientes correspondían al movimiento de malato<sup>2-</sup>, se sustituyó  $(NMDG)_2$ malato por KCl, lo cual condujo al registro de corrientes instantáneas de menor magnitud y con una cinética diferente (fig. 3B). Dichas corrientes indican la presencia de otros canales distintos y activos en la membrana vacuolar. Las corrientes registradas en soluciones de KCl son comparables con las de los canales vacuolares de activación rápida que generalmente se han registrado en el tonoplasto de varias especies a concentraciones fisiológicas de  $Ca^{2+}$  (FV; Hedrich y Neher, 1987; Pantoja et al., 1992). Las corrientes salientes dependientes de tiempo se observan únicamente cuando el malato<sup>2-</sup> estaba presente en el lado citoplásmico (fig. 3A), indicándonos que dichas corrientes corresponden al movimiento de cargas negativas desde el citoplasma hacia el interior vacuolar; Ya que, no pueden

representar el movimiento hacia fuera de NMDG debido a que este catión es demasiado voluminoso para moverse a través de canales iónicos. Los datos electrofisiológicos muestran que la actividad del canal vacuolar de malato<sup>2-</sup> en las células guarda de *A. thaliana*, identificado y caracterizado en el presente trabajo, es el principal contribuyente de la corriente aniónica vacuolar (figs 3A; 6A; 8A, 9B, 10A, C y E).

La confirmación de que las corrientes salientes corresponden al movimiento de malato<sup>2-</sup> desde el citoplasma hacia el compartimento vacuolar, cuando el tonoplasto se polarizó a potenciales fisiológicos (positivo del lado vacuolar), se obtuvo mediante la determinación del potencial reverso a nivel de vacuola completa. Esto se trató de evidenciar mediante registros de las corrientes de cola, sin embargo, no fue posible obtener con claridad el  $E_{rev}$  de las corrientes salientes por su rápida desactivación (fig. 4A). Aparentemente, los canales de malato del tonoplasto poseen la propiedad de desactivarse rápidamente ya que esta dificultad en obtener el  $E_{rev}$  por medio de las corrientes de cola ha sido reportada para las corrientes de malato<sup>2-</sup> de la vacuola de *B. vulgaris* (Pantoja et al., 1992) y *K. daigremontiana* (Pantoja y Smith, 2002b). Sin embargo, a pesar de este problema, se recurrió al protocolo de rampas de voltaje para la obtención de este parámetro (fig. 5A). Mediante este protocolo, se pudo observar que el potencial al cual las corrientes revirtieron, ocurrió a -20 mV en presencia del gradiente de concentración de 100/10mM (NMDG)<sub>2</sub>malato en el citoplasma y en el lumen vacuolar, respectivamente (fig. 5B), un valor muy cercano al potencial de equilibrio para malato<sup>2-</sup> ( $E_{mal} = -29$  mV) según la ecuación de Nernst. Al variar la concentración citoplásmica con 50 y 10 mM (NMDG)<sub>2</sub>malato, y manteniendo 10 mM (NMDG)<sub>2</sub>malato en el lado vacuolar, se registraron potenciales reversos de -11 y 0 mV, respectivamente (figura 5B), valores muy cercanos a los potenciales de equilibrio correspondientes. Estos resultados confirmaron que las corrientes salientes fueron debidas al movimiento de malato<sup>2-</sup> hacia el interior de las vacuolas. Sin embargo, los valores experimentales de los  $E_{rev}$  se desviaron del valor teórico esperado (Fig 5C), con una pendiente de 20 mV/decada de concentración de malato<sup>2-</sup>. Esto es debido al empleo de los valores de las

concentraciones de malato<sup>2-</sup> en los cálculos correspondientes en lugar de emplear a las actividades iónicas del mismo; Esto es relevante porque siendo el malato<sup>2-</sup> un anión divalente, las interacciones con otros iones son fuertes, particularmente en las concentraciones empleadas, lo cual da lugar a una disminución de la concentración libre del malato<sup>2-</sup>. Al emplear la actividad de malato<sup>2-</sup> para las diferentes soluciones experimentales en la ecuación de Nernst, se observa que al graficar los  $E_{\text{mal}}$  en contra de la actividad, la pendiente de esta regresión es igual a 23 mV/decada de actividad de malato<sup>2-</sup>, un valor muy cercano al experimentalmente obtenido de 20 mV/decada, confirmando así la alta selectividad del canal por este anión orgánico.

Los resultados descritos son consistentes con los reportados por Pantoja et al. (1992) en *Beta vulgaris*, Cerana et al. (1995) en células en suspensión de *A. thaliana*, y Pantoja & Smith (2002) y Hafke et al. (2003), en *K. daigremontiana*, quienes detectaron un canal de malato<sup>2-</sup> activado únicamente a voltajes positivos a través del tonoplasto, con una cinética similar, responsable del transporte de malato<sup>2-</sup> hacia la vacuola, lo que implica que esta especie iónica (mal<sup>2-</sup>) es la única permeable a través del tonoplasto. Las mediciones de la diferencia del potencial eléctrico a través del tonoplasto en las células vegetales sugiere que el voltaje de membrana oscila entre 30 y 60 mV (Allen & Sanders, 1997; Martinoia, 1992; Tyerman, 1992). Se ha reportado que la concentración citoplásmica fisiológica de malato<sup>2-</sup> en las células guarda es de aproximadamente 10-40 mM (*V. faba*, Raschke, 2003; y *C. communis*, Cousson, 2000; Schroeder et al., 1993; y Easser et al. 1997). Bajo estas condiciones fisiológicas, la actividad del canal de malato vacuolar permitiría la acumulación del malato<sup>2-</sup> a concentraciones de hasta 500 mM, una concentración más que suficiente para compensar los niveles de K<sup>+</sup> dentro de la vacuola de las células guarda de los estomas abiertos (la acumulación de K<sup>+</sup> durante la apertura estomatal puede ser hasta de 400 mM). Esta estimación sugiere fuertemente que la acumulación de malato<sup>2-</sup> es el principal mecanismo para balancear al K<sup>+</sup> en el compartimento vacuolar durante la apertura de los estomas. Por tanto, los aniones Cl<sup>-</sup> y posiblemente, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Guo et al.,

2003), juegan un papel menor. Actualmente existe sólo un reporte donde la actividad de canales selectivos a  $\text{Cl}^-$  se ha identificado en la membrana vacuolar de las células guarda cuya función podría mediar su acumulación dentro de la vacuola (Pei et al., 1996). Pei et al. reportaron la presencia de canales selectivos a  $\text{Cl}^-$ , cuya actividad es dependiente de una fosforilación mediada por una CDPK. En ausencia de esta cinasa, los canales de  $\text{Cl}^-$  permanecieron inactivos (Pei et al., 1996). Aún cuando la actividad de estos canales podría ser la responsable de la acumulación del  $\text{Cl}^-$  dentro de la vacuola durante el proceso de apertura de los estomas, su función sólo podría compensar parcialmente la acumulación de  $\text{K}^+$ . Empleando el potencial de membrana del tonoplasto de 50 mV y asumiendo una concentración citoplásmica de  $\text{Cl}^-$  de 1 mM (Felle et al., 2000), este anión, sólo podría compensar <10 mM de  $\text{K}^+$  vacuolar, confirmando así, que la acumulación de malato<sup>2-</sup> es uno de los mecanismos responsables de la apertura de las células guarda. Contrario a lo reportado por Pei et al. (1996), quienes demostraron que sólo en presencia de la CDPK fue posible activar a corrientes salientes aparentemente de malato<sup>2-</sup>, la actividad del canal de malato<sup>2-</sup> detectado en el presente estudio no requirió de la adición de una cinasa para su activación (figs 3A; 6A; 8A, 9B, 10A, C y E). Sin embargo, durante el registro de las corrientes vacuolares de malato<sup>2-</sup> se observó el “run-down” de dichas corrientes, lo cual podría sugerir que durante el registro de estas corrientes posiblemente se estuviera perdiendo un factor que mantiene la actividad del canal (fig 8, ver discusión más adelante).

El pH es uno de los factores importantes en la fisiología celular vegetal durante la transducción de señales. El cambio en el pH del citoplasma puede funcionar como segundo mensajero (Felle, 1989). Algunos de los estímulos que generan cambios en el  $\text{pH}_{\text{cit}}$  son: el suministro limitado de oxígeno ( $\text{O}_2$ ), lo que acidifica el pH del citoplasma (Roberts et al., 1984; Felle, 1987; Fox et al., 1995; Ratcliffe, 1999) y el ABA, que induce un incremento en el  $\text{pH}_{\text{cit}}$  (0.1-0.3 unidades de pH) en células guarda, cambio asociado con el cierre de los estomas (Blatt & Armstrong, 1993; Irving et al., 1992; Blatt &

Armstrong, 1993). Con base en estas evidencias se decidió estudiar la posible regulación del canal de malato<sup>2-</sup> por el pH citoplásmico.

Nuestros resultados mostraron que el canal de malato<sup>2-</sup> es regulado negativamente por la acidificación del pH citoplásmico (Fig 6A, 7A). Esta regulación ocurrió dentro de rangos de pH fisiológicos (7.5 a 5.5) sugiriendo que, bajo condiciones que causen la acidificación del citoplasma, es posible que se induzca el cierre de los estomas. La exposición de los estomas a una alta concentración de CO<sub>2</sub> (600 L·L<sup>-1</sup>) genera el cierre estomatal, mientras que una baja concentración de CO<sub>2</sub> (300 L·L<sup>-1</sup>) resulta en la apertura de los mismos (Makino & Mae, 1999). Una de las condiciones por las que se podría generar la acidificación del pH de citoplasma es mediante el aumento en las concentraciones de CO<sub>2</sub> apoplástico que, al disolverse en el citoplasma de las células guarda causarían una acidificación de éste y, por lo tanto, reduciría la actividad de los canales vacuolares de malato<sup>2-</sup> con la consecuente disminución en el potencial osmótico de la vacuola, pérdida del turgor celular y cierre de los estomas. Sin embargo, los elementos moleculares involucrados en la red de señalización que perciben el CO<sub>2</sub> aún no han sido identificados. Otro proceso que podría inducir la acidificación del citoplasma es la oscuridad. Durante el periodo oscuro muy probablemente se cause la desactivación de la bomba de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática (P-ATPasa), generando así una disminución del pH citoplásmico y, consecuentemente, la disminución de la actividad del canal vacuolar de malato<sup>2-</sup>, con el eventual cierre de los estomas, fenómeno bien establecido en plantas con fotosíntesis tipo C<sub>3</sub>, como *A. thaliana*. Nuestros resultados concuerdan con la inhibición de la actividad de los canales de malato<sup>2-</sup> por acidificación del citoplasma reportada por Pantoja & Smith (2002) y Hafke et al., (2003), quienes observaron la inactivación del canal de malato<sup>2-</sup> por pH en la membrana vacuolar de las células del mesófilo de *K. daigremontiana*.

Analizando los efectos del pH<sub>cit</sub> ácido sobre las corrientes vacuolares de malato<sup>2-</sup>, es necesario entender el mecanismo por el cual los H<sup>+</sup> inhiben las corrientes de malato<sup>2-</sup>. El efecto del pH citoplásmico ácido, fue la reducción de la magnitud de las corrientes de

malato<sup>2-</sup>, como lo muestra la figura. 6A. La dependencia de tiempo (activación e inactivación), o de voltaje, no mostraron cambio alguno (fig. 6B y C). Estos resultados nos sugieren que el efecto inhibitorio de los H<sup>+</sup> se debe a un bloqueo directo del canal, sin afectar las propiedades de “gating”. La interpretación más simple acerca de esta alternativa es que los H<sup>+</sup> se unan a residuos de amino ácidos que se localizan asociados dentro del poro del canal o que se asocien de manera cercana con el canal. Los H<sup>+</sup> pueden asociarse a un sitio específico en la proteína de canal, donde la protonación podría causar un cambio conformacional del poro del canal (Heinemann et al., 1992), o reducir el tamaño del poro del canal (Yool & Schwarz, 1991; Heinemann et al., 1992), obstruyendo así el libre movimiento del malato<sup>2-</sup>.

Estos resultados son similares a aquellos reportados en células animales en el bloqueo de canales de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> por H<sup>+</sup> (Cook, Ikekuchi & Fujimoto, 1984; Cornejo, Guggino & Guggino, 1989; Deutsch & Lee, 1989; Hille, 1992; Prod'homme, Pietrobon & Hess, 1987). La regulación del canal vacuolar de malato<sup>2-</sup> por H<sup>+</sup> sustenta fuertemente la hipótesis de que el pH<sub>cit</sub> actúa como segundo mensajero intracelular en las células vegetales (Felle, 1989; Blatt & Armstrong, 1993).

La inhibición de las corrientes vacuolares de malato<sup>2-</sup> por pH<sub>cit</sub> ácido observada en el presente trabajo (fig. 6A, B y C), contrasta con lo reportado anteriormente para el transporte vacuolar de malato<sup>2-</sup> en diferentes especies y tipos celulares (Marigo et al., 1988; Rentsch & Martinoia, 1991; Oleski et al., 1987; Dietz, Canut & Marigo, 1992). Marigo et al. (1988) reportaron que la toma de malato hacia el compartimento vacuolar en *C. roseus* es estimulada por pH<sub>cit</sub> ácido, actividad que presenta alta afinidad por H-mal<sup>1-</sup>. La estimulación en la toma de malato<sup>2-</sup> (o citrato) por el pH ácido citoplásmico, también ha sido reportada por Rentsch & Martinoia (1991) en vacuolas de células de mesófilo de cebada. Estos autores concluyeron que la especie reconocida por el transportador fue malato<sup>2-</sup>. Conclusiones similares han sido reportadas por Oleski et al. (1987), quienes han reportado la estimulación de la toma de citrato<sup>3-</sup> por pH<sub>cit</sub> ácido, a través del tonoplasto de células de tomate, concluyendo que el citrato<sup>3-</sup> y el malato<sup>2-</sup> son

las especies iónicas reconocidas por el canal/acarreador, basados en la fuerte inhibición en la toma del malato<sup>2-</sup> en presencia de citrato<sup>3-</sup>. En conjunto, nuestros resultados, así como los anteriormente descritos sobre la regulación del transporte de malato<sup>2-</sup> a través del tonoplasto por pH<sub>cit</sub>, sugieren la existencia de otro(s) transportador(es) involucrado(s) en el transporte de malato<sup>2-</sup> del citoplasma hacia el compartimento vacuolar (Smith et al., 1996, Lüttge et al., 2000). Recientemente, Emmerlich et al. (2003) y Hurth et al. (2005) han identificado y caracterizado un transportador de malato<sup>2-</sup> vacuolar en hojas de *A. thaliana* (AttDT), el cual presenta una alta homología en su secuencia con el co-transportador Na<sup>+</sup>/dicarboxilatos de nefronas en humano. Sin embargo, estos autores observaron que en células del mesófilo de las plantas mutantes (ausencia del transportador AttDT) fue posible registrar corrientes de malato<sup>2-</sup>, como las descritas en el presente trabajo, lo cual indica que en *A. thaliana* existen por lo menos dos mecanismos de transporte de ácidos dicarboxílicos.

Los resultados del presente trabajo muestran con claridad la actividad del canal de malato<sup>2-</sup> a concentraciones fisiológicas de Ca<sup>2+</sup><sub>cit</sub>, 10<sup>-6</sup> M (fig. 3A, 6A, 8A, 9B). Las variaciones en el Ca<sup>2+</sup><sub>cit</sub> libre, entre 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-7</sup> M, generaron cambios variables no reproducibles, en la magnitud de las corrientes del canal de malato<sup>2-</sup> vacuolar de células guarda de *A. thaliana*. Uno de los principales problemas que se observaron al intentar registrar las corrientes vacuolares a concentraciones libres de Ca<sup>2+</sup> por debajo de 10<sup>-6</sup> M, fue una gran inestabilidad de las corrientes. En muchas ocasiones, la configuración de vacuola completa se perdió durante el primer registro después de la disminución de Ca<sup>2+</sup>, lo cual nos sugiere que posiblemente esta disminución causó una alteración en la estructura de la membrana, ya que es bien conocido que este anión divalente favorece la estabilidad de las membranas biológicas. Debido a estos problemas experimentales fue imposible determinar si el Ca<sup>2+</sup><sub>cit</sub> regula o no a los canales de malato<sup>2-</sup> del tonoplasto de las células guarda. Sería importante determinar esta posible regulación ya que, aparentemente, la regulación del canal de malato<sup>2-</sup> por Ca<sup>2+</sup><sub>cit</sub> depende del tipo de célula o de la especie que se trate. Por ejemplo, Pantoja et al. (1992a) e Iwasaki et al. (1992),

reportaron que la actividad de dicho canal aniónico en betabel y en *Graptopetalum paraguayense*, respectivamente, sólo se detecta a concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$  libre, menores o cercanas a  $10^{-6}$  M; Por otro lado, variaciones en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  entre  $10^{-5}$  y  $10^{-9}$  M no afectaron las corrientes vacuolares de malato<sup>2-</sup> en células en suspensión de *A. thaliana* (Cerana et al. 1995), o de *K. daigremontiana* (Pantoja & Smith, 2002; Hafke et al., 2003).

Los canales iónicos son elementos pasivos, por lo tanto, su actividad requiere de un estricto control para la regulación de los flujos iónicos de acuerdo a los requerimientos fisiológicos, en nuestro caso particular, para la apertura y cierre de las células guarda. En los registros obtenidos en la configuración de vacuola-completa se observó una disminución gradual en la magnitud de las corrientes vacuolares de malato<sup>2-</sup> (fig. 8A). El “run-down” de las corrientes vacuolares del canal selectivo a ácidos dicarboxílicos causó que la magnitud de las corrientes disminuyera, aproximadamente 92% a los 40 min, comparada con las corrientes obtenidas al inicio del registro (figura 8B). Estos resultados sugieren que posiblemente el canal de malato<sup>2-</sup> sufre un cambio que causa su inactivación durante la obtención de los datos experimentales. Uno de estos cambios podría ser una defosforilación, ésto, como resultado de las condiciones experimentales de registro. La actividad de cinasas de proteínas durante la regulación del cierre y apertura de los estomas se ha demostrado ampliamente. Durante la señalización por ABA en las células guarda se ha demostrado que durante el cierre de los estomas una cinasa independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (AAPK) activa a los canales tipo S de  $\text{Cl}^-$  de la membrana plasmática (Li et al., 2000). También se describió que una cinasa dependiente de calcio y calmodulina (CDPK) fosforila a los canales KAT1 de las células guarda, causando con esto su inhibición, e impidiendo la toma requerida de  $\text{K}^+$  y causando así el cierre de los estomas (Li et al., 1998). Por otro lado, también existen reportes de una CDPK que activa a un canal de  $\text{Cl}^-$  del tonoplasto para permitir su acumulación dentro de la vacuola (Pei et al., 1996). Con base en estas evidencias, consideramos la posibilidad de que la inactivación del canal vacuolar de malato<sup>2-</sup> de las células guarda de *A. thaliana*

sea el resultado de una defosforilación causada o espontáneamente, o por una fosfatasa de proteínas, como consecuencia de las condiciones experimentales empleadas, lo cual impidió mantener al canal en su estado activo. Aún y cuando nuestros resultados contrastan con los reportados por Pei et al. (1996), ya que bajo nuestras condiciones experimentales no fue necesario incluir la CDPK para registrar la actividad de los canales de malato<sup>2-</sup> de la vacuola de células guarda, el “run-down” que nosotros observamos podría relacionarse con la ausencia de actividad de la cinasa (posiblemente asociada al tonoplasto) aparentemente necesaria para activar las corrientes de malato<sup>2-</sup> en las células guarda de *A. thaliana*.

En nuestro estudio, la selectividad observada del canal vacuolar de malato<sup>2-</sup> de las células guarda de *A. thaliana*, mostró la misma selectividad a malato<sup>2-</sup> que a fumarato<sup>2-</sup> (Fig. 9). Por otro lado, la conductancia del canal fue mayor al fumarato<sup>2-</sup> que al malato<sup>2-</sup> (casi dos veces mayor), lo cual sugiere que el fumarato<sup>2-</sup> y no el malato<sup>2-</sup> podría ser el dicarboxilato que se transporta principalmente a través del tonoplasto. Estos resultados son similares a los reportados para los canales de malato<sup>2-</sup> identificados en las distintas especies vegetales y tipos celulares estudiados hasta ahora (*K. daigremontiana*, White & Smith, 1989; Hafke et al., 2003; *A. thaliana*, Cerana et al., 1995; Hurth et al., 2005) (tabla 2). Para el caso particular de la vacuola de las células guarda de *A. thaliana*, resulta interesante que el fumarato<sup>2-</sup> sea la forma principal de carbono en los tejidos fotosintéticos de esta planta (Chia et al. 2000). Si la concentración de fumarato<sup>2-</sup> en las células guarda es alto también, podríamos proponer que el fumarato<sup>2-</sup> es el principal anión que balancea la carga del K<sup>+</sup> durante la apertura de los estomas, en *A. thaliana*. La fijación del CO<sub>2</sub> a través de la fotosíntesis resulta en la producción de una variedad de metabolitos, los cuales son utilizados para la generación de energía y la formación de esqueletos de carbono, así como para la formación de componentes celulares. (Buchanan et al., 2000). La abundancia de los distintos tipos de metabolitos varía entre las especies vegetales, y la concentración depende de diversos factores, tales como la intensidad luminosa y la disponibilidad de nutrientes, así como de las rutas

metabólicas preferentes o dominantes en el tipo celular (Chia et al., 2000). Algunos de estos metabolitos comprenden ácidos orgánicos que representan de manera importante una forma de carbono fijado en las células vegetales con metabolismo fotosintético C<sub>4</sub> y CAM. Hasta hace poco, la contribución de estos ácidos orgánicos (como moléculas almacenadoras de carbono) en plantas con metabolismo fotosintético tipo C<sub>3</sub>, se habían considerado superficialmente. Existe la idea general de que las plantas con metabolismo fotosintético tipo C<sub>3</sub>, como es el caso de *A. thaliana*, canalizan la conversión de la mayor parte de los fotoasimilables en azúcares (sacarosa, glucosa y fructuosa) y almidón. De manera interesante, existen reportes de altas concentraciones de ácido fumárico en hojas de *A. thaliana*, *A. griffithiana*, *A. himalaica*, *hollyhock* (*Alcea rosea*), rock cress (*Arabis* sp.), así como concentraciones moderadamente altas en otras especies vegetales (*Phaseolus vulgaris*, *Daucus carota*, *Glycine max*, *Helianthus annuus*, y *Catharathus roseus*). Estos resultados sugieren que el ácido fumárico constituye una forma importante de carbono fijado en algunas plantas con metabolismo fotosintético tipo C<sub>3</sub>. La acumulación de dicho ácido orgánico se da predominantemente en el tejido fotosintético activo (principalmente en hojas, tallo, flores y silicuas; Chia et al., 2000). Con base a estas observaciones y a los resultados obtenidos en el presente trabajo, proponemos que en las células guarda de *A. thaliana*, el anión orgánico que balancea la carga debida a la acumulación de K<sup>+</sup> es el fumarato<sup>2-</sup> y no el malato<sup>2-</sup>. Como consecuencia de ésto, también proponemos que los altos niveles de fumarato<sup>2-</sup> reportados por Chia et al. (2000), en los tejidos fotosintéticos de *A. thaliana*, se deben a la acumulación de este dicarboxilato en la vacuola de las células respectivas.

Como se mencionó en la sección de resultados, en un intento para registrar estas corrientes, se procedió a aplicar varias rampas de voltaje (10) de corta duración en aquellos registros donde se observó una actividad de canales unitarios para aumentar la probabilidad de registrar su apertura. Mediante este procedimiento se pudieron registrar corrientes unitarias (Fig. 10). Los registros obtenidos en parches aislados de

membrana demostraron que los componentes unitarios de la corriente vacuolar saliente dependiente de tiempo de las células guarda de *A thaliana* son canales iónicos (fig. 10B, D, F y H, J y L). Dicha actividad fue registrada en las mismas condiciones en las que se obtuvieron las corrientes a nivel macroscópico (fig. 3A). Es importante resaltar que las corrientes unitarias se activaron únicamente a potenciales positivos (entre 0 y +120 mV; Fig. 10A, C, E, y G, I y K), mientras que a potenciales negativos no se llegó a registrar actividad alguna, lo cual se correlaciona con la actividad de las corrientes salientes registradas en la configuración de vacuola completa. Los valores de las conductancias obtenidas para el canal de malato<sup>2-</sup> variaron entre 180 y 90 pS con soluciones de malato, y para fumarato<sup>2-</sup> los valores oscilaron entre 171 y 103 pS. Hasta ahora, sólo existen tres reportes sobre la conductancia del canal de malato<sup>2-</sup> para *K. daigremontiana* y con conductancias con valores bastante diferentes, 71 pS (Pantoja & Smith, 2002) y 3 pS (Hafke et al., 2003). En *Mesembryanthemum crystallinum* se reportó una conductancia de 50 pS (Figueiras, 2002). Nuestros resultados son similares a los reportados por Pantoja & Smith (2002), quienes también reportaron una dificultad en el registro de la actividad de canal unitario. Por el contrario, en *M. crystallinum*, se pudo observar la actividad a nivel de canal unitario, y su registro fue relativamente fácil. La conductancia de 3 pS, obtenida del canal vacuolar de malato<sup>2-</sup>, reportado por Hafke et al. (2003), difiere bastante de la conductancia del canal de malato<sup>2-</sup> (180 pS y 90 pS) estudiado en el presente trabajo, aún y cuando las condiciones experimentales fueron muy similares a las empleadas en dicho trabajo. Es posible que las diferencias entre los dos valores sean debidas al tipo celular (células guarda y células del mesófilo), a las diferentes especies estudiadas o a ambos factores. A pesar de esto, podemos concluir que las corrientes de malato<sup>2-</sup> registradas en vacuolas aisladas de células guarda son mediadas por canales iónicos presentes en el tonoplasto de estas células especializadas.

Tabla 2. Secuencias de permeabilidades reportadas para el canal vacuolar de malato<sup>2-</sup>, en distintas especies vegetales.

Especie	Tipo celular	Sol <sub>cit</sub> /Sol <sub>vac</sub> [carboxilato] <sub>tot</sub> (mM)	Secuencia de permeabilidad iónica	Referencia
K. daigremontiana	mesófilo	50 K <sub>2</sub> -malato	fum <sup>-2</sup> >mal <sup>-2</sup> ≈ suc <sup>-2</sup> > oaa <sup>-2</sup> ≈ tar <sup>-2</sup> , 2-oxoglut > glut <sup>-2</sup>	White & Smith, 1989
A. thaliana	células en cultivo	100/10 K <sub>2</sub> -malato	mal <sup>-2</sup> = suc <sup>-2</sup> = fum <sup>-2</sup> > oaa <sup>-2</sup>	Cerana et al., 1995
K. daigremontiana	mesófilo	100/10 (NMDG) <sub>2</sub> malato	fum <sup>2-</sup> > mal <sup>2-</sup> > Cl <sup>-</sup> > maleato <sup>2-</sup> ≈ cit <sup>3-</sup>	Hafke et al., 2003

Sol<sub>cit</sub> y Sol<sub>vac</sub> se refiere a la concentración total del carboxilato en la solución de baño (lado citoplásmico) y en la pipeta (lado vacuolar), respectivamente. 2-oxoglutarato (2-oxoglut) y glutarato (glu<sup>-2</sup>), son dicarboxilatos de cinco carbonos. Estos aniones no se localizan comúnmente en la naturaleza (White & Smith, 1989).

## 7. CONCLUSIONES

En el tonoplasto de las células guarda de la planta *A. thaliana* se determinó la presencia de un canal aniónico selectivo a ácidos dicarboxílicos. Este mecanismo es responsable de mediar la acumulación de malato<sup>2-</sup> y/o fumarato<sup>2-</sup> en el compartimento vacuolar, necesario para mantener el equilibrio de cargas como resultado de la acumulación de K<sup>+</sup> dentro de dicho organelo durante el proceso de apertura estomatal.

Los datos electrofisiológicos obtenidos muestran que la actividad del canal de malato<sup>2-</sup> en este tipo celular es el principal contribuyente de la corriente aniónica vacuolar. El canal aniónico es altamente selectivo a malato<sup>2-</sup> y fumarato<sup>2-</sup>, dos de los principales ácidos orgánicos en tejidos fotosintéticos, en esta especie vegetal. Si la concentración de fumarato<sup>2-</sup> en las células guarda es tan alta como la reportada para las hojas, proponemos que el fumarato<sup>2-</sup> es el principal anión que balancea la carga del K<sup>+</sup> durante la apertura de los estomas.

Dentro de las propiedades que se pudieron observar para el canal del tonoplasto selectivo a ácidos dicarboxílicos se determinó que su activación no requiere de la adición de factores citoplásmicos adicionales.

Se observó que las corrientes vacuolares de malato muestran "run down", posiblemente debida a la pérdida de un factor citoplásmico como resultado de las condiciones experimentales en que se registraron las corrientes.

El canal de malato<sup>2-</sup> es regulado negativamente por la acidificación del citoplasma. Esta regulación ocurrió dentro de los intervalos fisiológicos de pH, sugiriendo que bajo condiciones que causen la acidificación del citoplasma como las causadas por el aumento en las concentraciones de CO<sub>2</sub> apoplástico y/o inicio del periodo oscuro, es posible que este mecanismo participe en el cierre de los estomas .

La actividad del canal vacuolar fue observada en concentraciones de Ca<sup>2+</sup> fisiológicas. La disminución de dicha concentración causó una gran inestabilidad de los registros, lo que nos sugiere que posiblemente esta disminución generó una alteración

en la estructura de la membrana. Sin embargo, la actividad del canal de malato<sup>2-</sup> en [Ca<sup>2+</sup>] fisiológicas, indica que este canal tiene un papel importante en la apertura y/o cierre de los estomas.

La permeabilidad del canal fue mayor a fumarato<sup>2-</sup> que a malato<sup>2-</sup>, casi dos veces mayor, lo que sugiere que el fumarato<sup>2-</sup> es el dicarboxilato que se transporta principalmente a través del tonoplasto. Con base a esto y a las evidencias que sugieren una abundancia relativamente alta de fumarato<sup>2-</sup>, proponemos que en las células guarda de *A. thaliana*, el anión orgánico que balancea la carga debida a la acumulación de K<sup>+</sup> es preferencialmente el fumarato<sup>2-</sup>. Bajo las mismas consideraciones, proponemos que los altos niveles de fumarato<sup>2-</sup> en los tejidos fotosintéticamente activos de *A. thaliana*, se deben a la acumulación de este dicarboxilato en la vacuola de las células respectivas.

Los registros obtenidos demostraron que los componentes unitarios de la corriente vacuolar de las células guarda son canales iónicos con una conductancia que varió entre 180 y 90 pS para malato<sup>2-</sup> y para fumarato<sup>2-</sup> entre 171 y 110 pS.

## 8. PERSPECTIVAS

Se tiene contemplada la continuación del estudio de los mecanismos de regulación del canal vacuolar permeable a malato<sup>2-</sup> en las células guarda de *A. thaliana*. En particular nos interesa determinar si los cambios en la concentración de calcio libre en el citoplasma de estas células es un mecanismo de señalización que regule la actividad del canal vacuolar de malato<sup>2-</sup>. También sería importante estudiar la posible regulación del canal por otros factores citoplasmáticos como ATP y Mg<sup>2+</sup>, debido a que los canales iónicos como cualquier otra proteína son susceptibles de ser blanco de diversos factores de regulación. La información generada de estos estudios, nos ayudará a ampliar nuestros conocimientos sobre las vías de señalización en las células guarda relacionadas con la regulación directa o indirecta del turgor de las células guarda

Para la identificación del gen que codifica para el canal de ácidos dicarboxílicos se plantea realizar la transformación de *Saccharomyces cerevisiae* (la cual no cuenta con transportador de dicarboxilatos), con una librería de cDNA de *A. thaliana* (ecotipo columbia), con la finalidad de seleccionar a aquellas que crezcan en un medio mínimo suplementado con malato<sup>2-</sup>, como la única fuente de carbono. Posteriormente, la confirmación de éstos últimos resultados se podría realizar mediante la expresión heteróloga del gen en ovocitos de *Xenopus leavis* y su análisis electrofisiológico.

## 9. BIBLIOGRAFIA

**Ahmad M., Jarillo J.A., Smirnova O. and Cashmore A.R. (1998).** The CRY1 blue light photoreceptor of Arabidopsis interacts with phytochrome A in vitro. *Mol. Cell.* **1**: 939-948.

**Alexandre J., Lassalles JP. (1992).** Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release by  $\text{InsP}_3$  in plants and effect of buffers on  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, Series B. **338**, 53-61.

**Alexandre J., Lassalles JP. and Kado RT. (1990).** Opening of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-triphosphate. **Nature**. **343**, 567-570.

**Allaway WG. (1973).** Accumulation of malate in guard cells of *Vicia faba* during stomatal opening. **Planta**. **110**: 63-70.

**Allen GJ., Amtmann A., Sanders D. (1998).** Calcium-dependent and calcium independent  $\text{K}^+$  mobilization channels in *Vicia faba* guard cell vacuoles. **Journal of Experimental Botany**. **49**: 305-318.

**Allen GJ., Muir SR, Sanders D. (1995).** Release of  $\text{Ca}^{2+}$  from individual plant vacuoles by both  $\text{InsP}_3$  and cyclic ADP-ribose. **Science**. **268**, 735-37.

**Allen, G.J., Sanders, D. (1994).** Osmotic stress enhances the competence of *Beta vulgaris* vacuoles to respond to inositol 1,4,5-triphosphate. **Plant J.**, **6**, 687-695.

**Allen GJ. and Sanders D. (1994a).** Two voltage-gated, calcium release channels coreside in the vacuolar membrane of broad bean guard cells. **Plant Cell**. **6**, 685-694.

**Allen GJ, and Sanders D. (1995).** Calcineurin, a type 2B protein phosphatase, modulates the  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable slow vacuolar ion channel of stomatal guard cells. **Plant Cell**. **7**, 1473-1483.

**Allen GJ, and Sanders D. (1996).** Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium. **Plant Journal**. **10**: 1055-1067.

- Allen GJ, and Sanders D. (1997).** Vacuolar ion channels of higher plants. **Adv. Bot. Res.** **25**, 217-52.
- Amodeo G. Escobar A, Zeiger E. (1994).** A cationic channel in the guard cell tonoplast of *Allium cepa*. **Plant Physiology.** **105**, 999-1006.
- Assmann SM. (1999).** The cellular basis of guard cell sensing of rising CO<sub>2</sub>. **Plant Cell Environ.** **22**, 629-637.
- Assmann SM., Coursol SA., Wang X-Q. and Pandey S. (2002).** Preparation and applications of *Arabidopsis thaliana* guard cell protoplasts. **New Phytologist.** **153**, 517-526.
- Assmann SM, Shimazaki K-I. (1999).** The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. **Plant Physiol.** **119**, 809-15.
- Assmann SM, Simoncini L, Schroeder JI. (1985).** Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia Faba*. **Nature.** **318**, 285-87.
- Assmann SM, Wang X-Q (2001)** From milliseconds to millions of years: guard cells and environmental responses. **Curr Opin Plant Biol.** **4**, 421–428.
- Beker J.D., Boavida L.C., Carneiro J., Haury M., and Feijo J.A. (2003).** Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. **Plant Physiol.** **133**, 713-725.
- Bethmann BM., Thaler W., Simonis. and Schönknecht G. (1995).** Electrochemical potential gradients of H<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Cl<sup>-</sup> across the tonoplast of the green alga *Eremosphaera viridis*. **Plant Physiol.** **109**: 1317-1326.
- Bewell, M.A., Maathuis, F.J.M., Allen, G.J., and Sanders, D. (1999).** Calcium-induced calcium release mediated by a voltage-activated cation channel in vacuolar vesicles from red beet. **FEBS Lett.** **458**, 41–44.
- Birnbaum K., Shasha D.E., Wang, J.Y., Jung J.W., Lambert G.M., Galbraith, D.W., and Benfey P.N. (2003). A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science*. 302, 1956-60.

**Blatt, M.R. (1992).** K<sup>+</sup> channels of stomatal guard cells: characteristics of the inward rectifier and its control by pH. **J Gen. Physiol.** **99**, 615-44.

**Blatt, M.R. (1999).** Reassessing roles for Ca<sup>2+</sup> in guard cell signalling. **J. Exp. Bot.** **50**, 989- 99.

**Blatt, M.R. (2000).** Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.** **16**, 221-241.

**Blatt MR, Armstrong F. (1993).** K<sup>+</sup> channels of stomatal guard cells: abscisic acid-voked control of the outward-rectifier mediated by cytoplasmic pH. **Planta.** **191**, 330-41.

**Blatt, MR, Grabov A., Brearley J, Hammond- Kosack K, Jones JDG. (1999a).** K<sup>+</sup> channels of Cf-9 transgenic tobacco guard-cells as target for *Cladosporium fulvurun* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. **Plant J.** **19**, 453-62.

**Blatt, MR., Thiel G. (1993).** Hormonal control of ion channel gating. **Annu. Rev Plant. Mol. Biol.** **44**: 543-567.

**Blatt, MR., Thiel G., and Trentham DR. (1990).** Reversible inactivation of K<sup>+</sup> channels of Vicia stomatal guard cells following the photolysis of caged inositol 1,4,5-triphosphate **Nature.** **346**, 766-769.

**Boller T. and Wiemken A. (1986).** Dynamics of vacuolar compartmentation. **Annual Review of Plant Physiology.** **74**, 538-544.

**Bowling DJF and Edwards A. (1984).** pH gradients in the stomatal complex of *Tradescantia virginiana*. **Journal of Experimental Botany.** **35**, 1641-1645.

**Briggs WR. and Huala E. (1999).** Blue-light photoreceptors in higher plants. **Annu Rev. Cell Dev. Biol.** **15**, 33-62.

**Buchanan B., Gruissem RJ. and Rusell J. (2000).** *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* Rockville, MD.

**Buser C., and Matile P. (1977).** Malic acid in vacuoles isolated from *Bryophyllum* leaf cells. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie.** **82**, 462-466.

**Brüggemann LI., Pottosin II., and Schönknecht. (1999a).** Selectivity of the fast activating vacuolar cation channel. **J. Exp. Bot.** **50**, 873-876.

**Casal JJ. (2000).** Phytochromes, cryptochromes, phototropin: Photoreceptor interactions in plants. **Photochem. Photobiol.** **71**, 1-11.

**Cerana R., Giromini L, Colombo R. (1995).** Malate-regulated channels permeable to anions in vacuoles of *Arabidopsis thaliana*. **Aust. J. Plant Physiol.** **22**, 115-121.

**Cheffings CM., Pantoja O., Ashcroft FM., Smith JAC. (1997).** Malate transport and vacuolar ion channels in CAM plants. **J. Exp. Bot.** **48**, 623-631.

**Chen WQ., et al. (2002).** Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. **Plant Cell.** **14**, 559-574.

**Chia DW., Yoder TJ., Reiter WD., and Gibson SI. (2000).** Fumaric acid: an overlooked form of fixed carbon in *Arabidopsis* and other plant species. **Planta.** **211**, 743-51

**Chris Patton. (2002).** WinMAXC<sup>16</sup> Version 2.5. Stanford University, Hopkins Marine Station, Pacific Grove, CA 93950. cpatton@stanford.edu.

**Christie J.M. and Briggs W.R. (2001).** Blue light sensing in higher plants. **J. Biol. Chem.** **276**. 11457-11460

**Colombo R., Cerana R., Lado P., and Peres A. (1988).** Voltage dependent channels permeable to K<sup>+</sup> and Na<sup>2+</sup> in the membrane of *Acer pseudoplatanus* vacuoles. **J. Membrane Biol.** **103**, 227-236.

**Collinge DB, Bryngelsson T, Gregersen PL, Smedegaard-Petersen V and Thordal-Christensen H. (1997).** Resistance against fungal pathogens: Its nature and regulation. In Barse AS, Basra RK (eds) Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants. Harwood Academic Publishers, London, pp 335-372.b

- Cook DL., Ikeuchi M., Fujimoto WY. (1984).** Lowering of pH inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in pancreatic B-cells. **Nature.** **311**, 269-271.
- Cornejo M., Guggino WB. (1989).**  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels from cultured renal medullary thick ascending limb cells: effects of pH. **Journal Membrane Biol.** **110**, 49-55.
- Cousson A. (2000).** Analysis of the sensing and transducing processes implicated in the stomatal responses to carbon dioxide in *Commelina communis* L. **Plant Cell Environ.** **23**, 487-495.
- Coyaud L., Kurkdjian A., Kado R. and Hedrich R. (1987).** Ion channels and ATP driven pumps involved in ion transport across the tonoplast of sugar beet vacuoles. **Biochim Biophys Acta.** **902**, 263-268.
- Croxdale J. (2001).** Stomata. Encyclopedia of life Sciences. **Nature group.**
- Czempinski K., Gaedecke. N., Zimmermann S. and Mueller Roeber B. (1999).** Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *Journal Exp. Bot.* **50**, 955 ± 966.
- Davies JM., and Sandres D. (1995).** ATP, pH and  $\text{Mg}^{2+}$  modulate a cation current in *Beta vulgaris* vacuoles: a possible shut conductance for the vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase. **Journal of Membrane Biology.** **145**, 75-86.
- Day DA. and Wiskich JT.(1984).** Glycine metabolism and oxaloacetate transport in mitochondria. **Plant Physiol.** **63**, 425-429.
- Demidchik V, Tester M. (2002).** Sodium fluxes through non-selective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots. **Plant Physiology.** **128**, 379–387
- Deng XW. and Quail PH. (1999). Signalling in light-controlled development. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* **10**, 121-129.
- Deutsch C. and Lee SC. (1989).** by pH. **Journal Physiol.** **413**, 399-413.

**Devlin, P.F. and Kay, S.A. (2000)** Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. **Plant Cell**, **12**, 2499-2510.

**Discroll BT. And Finan TM. (1993).** NAD<sup>+</sup>-dependent malic enzyme of *Rhizobium melilotis* required for symbiotic nitrogen fixation. **Mol. Microbiol.** **7**, 8655-8873.

**Dietrich P, Dreyer I, Wiesner P, Hedrich R. (1998).** Cation sensitivity and kinetics of guard cell potassium channels differ among species. **Planta.** **205**, 277–287.

**Dietz KL., Canut H., Marigo G. (1992).** Identification of an essential histidine residue at the active site of the tonoplast malate carrier in *Catharanthus roseus* cells. **J.Membrane Biol.****129**, 137-143.

**Droese S, Bindseil KU, Bowman EJ, Siebers A, Zeeck A, and Altendorf K. (1993).** Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V- type adenosinetriphosphatases. **Biochemistry.** **32**, 3902-06.

**Elzenga JTM., and Van Volckenburgh E. (1997).** Characterization of Light-controlled anion channel in the plasma membrane of mesophyll cells of pea. **Plant Physiol.** **113**, 1419-11426.

**Emi T, Kinoshita T, and Shimazaki K-I. (2001).** Specific binding of vf14-3-3<sup>a</sup> isoform to the plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase in response to blue light and fusicoccin in guard cells of broad bean. **Plant Physiol.** **125**, 1115-25.

**Emmerlich V., Linka N., Reinhold T., Hurth MA., Traub M., Martinoia E., and Neuhaus E. (2003).** The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** **100**, 11122- 11126.

**Esser JE., Liao YJ. and Schroeder JI. (1997).** Characterization of ion channelmodulator effects on ABA- and malate- induced stomatal movements: strong regulation by kinase and phosphatase inhibitors, and relative insensitivity to mastoparans. **J. Exp. Bot.** **48**, 539-550.

- Felle HH. (1987).** Proton transport and pH microelectrodes. **Journal Exp Bot.** **38**, 340-354.
- Felle HH. (1988).** Cytoplasmic free calcium in *Riccia fluitans* L. and *Zea mays* L.: interaction of  $\text{Ca}^{2+}$  and pH?. **Planta.** **176**, 248-255.
- Felle HH. (1989).** pH as second messenger in plants. **In Second Messengers in Plant Growth and Development.** DJ. Morr  and WF., Boss (ed) Alan R. Liss., New York, pp. 145-166.
- Felle HH. (2001)** pH: Signal and Messenger in Plant Cells. **Plant Biology.** **3**, 577-591.
- Felle HH. Hanstein S., Steinmeyer R., and Hedrich R. (2000).** Dynamics of ionic activities in the apoplast of the sub-stomatal cavity of intact *Vicia faba* leaves during stomatal closure evoked by ABA and darkness. **Plant J.** **24**, 297-304.
- Figueiras FD. (2002).** Regulación del canal vacuolar de malato<sup>2-</sup> de la halofita *Mesembryanthemum crystallinum* por  $\text{H}^+$  Tesis de licenciatura. Dirección de Bibliotecas, Benem rita Universidad Autónoma de Puebla.
- Fox GG, McCallan, Ratcliffe RG. (1995).** Manipulating cytoplasmic pH under anoxia; a critical test of the role of pH in the switch from aerobic to anaerobic metabolism. **Planta.** **195**, 324–330.
- Gambale F., Bregante M., Stragapede F., Cantú AM., (1996).** Ionic channels of the sugar beet tonoplast are regulated by mult-ion single-file permeation mechanism. **Journal of membrane biology.** **154**, 69-79.
- Gelli A. and Blumwald E. (1993).** Calcium retrieval from vacuolar pools. **Plant Physiology.** **102**, 1139-1146.
- Gelli A. and Blumwald E. (1997).** Hyperpolarization-activated  $\text{Ca}^{2+}$  permeable channels in the plasma membrane of tomato cells. **J. Membr. Biol.** **155**, 35-45.

- Ghassemian M., Waner D., Tchieu J., Gribskov M., and Schroeder J.I. (2001).** An integrated Arabidopsis annotation database for Affymetrix Genechip® data analysis, and tools for regulatory motif searches. **Trends Plant Sci.** **6**, 448-449.
- Gietl C. (1992).** Malate dehydrogenase isoenzymes cellular locations and role in the flow of metabolites between cytoplasm and cell organelles. **Biochem Biophys. Acta.** **1100**, 217- 234.
- Gilroy S, Read ND, Trewavas AJ. (1990).** Elevation of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. **Nature.** **346**, 769-71.
- Gilroy S, Read ND, Trewavas AJ. (1991).** Role of calcium in signal transduction of *Commelina* guard cells. **Plant Cell.** **3**, 333-344.
- Goh CH., Oku T, Shimazaki K-I. (1995).** Properties of proton pumping in response to blue- light and fusicoccin in guard-cell protoplasts isolated from adaxial epidermis of *Vicia* leaves. **Plant Physiol.** **109**, 187-94.
- Grabov A, Blatt MR. (1997).** Parallel control of the inward-rectifier K<sup>+</sup> channel by cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and pH in *Vicia* guard cells. **Planta.** **201**, 84-95.
- Grabov A., Blatt MR. (1999).** A steep dependence of inward-rectifying potassium channels on cytosolic free calcium concentration increase evoked by hyperpolarisation in guard cells. **Plant Physiol.** **119**, 277-287.
- Guillain, F., Mintz. (2001).** ATPases, Ion-motive. **Enciclopedia Life Sciences.** Nature group.
- Guo H., Mockler T.C., Duong H., and Lin C. (2001).** SUB1, an Arabidopsis Ca<sup>2+</sup> binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. **Science.** **291**, 487-490.
- Guo FQ., Yound J. and Crawford NM. (2003).** The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in Arabidopsis. **Plant Cell.** **15**, 107-117.

**Hafke JB., Hafke Yuliya., Andrew J., Smith C., Lüttge U. and Thiel G. (2003).**

Vacuolar malate uptake is mediated by an anion-selective inward rectifier. *The Plant Journal*. **35**, 116-128.

**Hamilton DWA., Hills A., Khloer B. and Blatt MR. (2000).** Ca<sup>2+</sup> channels at the plasmamembrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 4967-4972.

**Harmer SL., Hogenesch J.B., Straume M., Chang, HS., Han B., Zhu T., Wang X., Kreps J.A., and Kay S.A. (2000).** Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science*. **290**, 2110-2113.

**Hedrich R., Barbier-Brygoo H., Felle H., Flügge UI., Lüttge U., Maathuis FJM., Marx. S., Prins HBA., Raschke K., Schnabl H., Schroeder JI., Struve I., Taiz L. and Ziegler P. (1988).** General mechanisms for solute transport across the tonoplast of plant vacuoles: a patch-clamp survey of ion channels and proton pumps. *Botanica Acta*. **101**, 7- 13.

**Hedrich R., Busch H., Raschke K. (1990).** Ca<sup>2+</sup> and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO J*. **9**: 3889- 92.

**Hedrich R., Marten I., Lohse G., Detrich P., Winter H., Lohaus G. and Heldt HW. (1994).** Malate-sensitive anion channels enable guard cells to sense changes in the ambient CO<sub>2</sub> concentration. *Plant J*. **6**, 74-748

**Hedrich R., and Neher E . (1987).** Cytoplasmic calcium regulates voltage dependent ion channels in plant vacuoles. *Nature*. **329**, 833-836.

**Heinemann SH., Terlau H., Stühmer W., Imoto K., Numa S. (1992).** Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by mutations. *Nature*. **356**, 441-443.

- Hetherington MA., Ng K-Y., Mcainsh MR., Gray JE., Hunt L., Leckie CP. and Mills Lewis. (2001).** Calcium-based signalling system in guard cells. **New Phytologist. 151,** 109-120.
- Hill AE, Shachar-Hill B, Shachar-Hill Y. (2004).** What are aquaporins for. **J. Membr. Biol. 197,** 1-32.
- Hille B. (1992).** Ionic Channels of Excitable Membrane. 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA.
- Honys D., and Twell D. (2003).** Comparative analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome. **Plant Physiol. 132,** 640-52.
- Hugovieux V., Kwak J.M., and Schroeder J.L. (2001).** An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. **Cell. 106,** 477-487.
- Humble GD, Raschke K (1971)** Stomatal opening quantitatively related to potassium transport: evidence from electron probe analysis. **Plant Physiol. 48,** 447-453.
- Hurt MA., Suh SJ., Kretschmar T., Geis T., Bregante M., Gambale F., Martinoia E. and Neuhaus E. (2005).** Impaired pH homeostasis in Arabidopsis lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. **Plant Physiol. 137,** 901-910.
- Hwang JU, Suh SJ, Yi H, Kim J, and Lee Y. (1997).** Actin filaments modulate both stomatal opening and inward K<sup>+</sup>-channel activities in guard cells of *Vicia Faba* L. **Plant Physiol. 335-42.**
- Irving HR., Gehring A. and Parish R.W. (1992).** Changes in cytoplasmic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. **Proc. Natn. Acad. Sci.USA. 89,** 1790-1794.

**Iwasaki I., Arata H., Kijima H., Nishimura M. (1992).** Two types of ion channels involved in the malate ion transport across the tonoplast of a crassulacean acid metabolism plant. **Plant Physiol.** **98**, 1494-1497.

**Johannes E., Brosnan JM. and Sanders D. (1992).** Calcium channels in the vacuolar membrane of plants: multiple pathways for intracellular calcium mobilization. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B.** **338**, 104-112.

**Johannes E., Brosnan JM. and Sanders D. (1992a).** Parallel pathways for intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release from the vacuole of higher plants. **Plant Journal.** **2**, 97-102.

**Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, and Kjellbom P. (1998).** Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. **Plant Cell.** **10**, 451-59.

**Keller CP. and Van Volkenburgh E. (1996).** Osmoregulation by oat coleoptile protoplast. **Plant Physiol.** **110**, 1007-1016.

**Kinoshita T, Nishimura M, Shimazaki K-I. (1995).** Cytosolic concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  regulates the plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPase in guard cells of fava bean. **Plant Cell.** **7**, 1333-42.

**Kinoshita T, Shimazaki K-I. (1999).** Blue light activates the plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPase by phosphorylation of the C terminus in stomatal guard cells. **EMBO J.** **18**, 5548-58.

**Kinoshita T, Shimazaki K-I. (2001).** Analysis of the phosphorylation level in guard-cell plasmamembrane  $\text{H}^{+}$  ATPase in response to fusicoccin. **Plant Cell Physiol.** **42**, 424-32.

**Kinoshita T, Shimazaki K-I. (2002).** Biochemical evidence for the requirement of 14-3-3 protein binding in activating of the guard-cell plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPase by blue light. **Plant Cell Physiol.** **43**, 1359-65.

- Kochian LV. (1995).** Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **46**, 237-260.
- Kolb HA., Köhler K., and Martinoia E. (1987).** Single potassium channels in the membranes of isolated Mesophyll barley vacuoles. **J. Membranes Biol.** **95**, 63-169.
- Kühlbrandt W. (2004).** Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. **Nature.** **5**, 282- 95.
- Lance C. And Rustin P. (1984).** The central role of malate in plant metabolism. **Physiol. Veg.** **5**, 625-641.
- Latzko E. and Kelly GJ. (1983).** The many faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>3</sub> plants. **Physiol. Veg.** **21**, 214-217.
- Leckie CP, McAinsh MR, Allen GJ, Sanders D, Hetherington AM. (1998).** Abscisic acid- induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **95**, 15837-15842.
- Leigh RA. and Sanders D. (1977).** The plant vacuole. In: Callow JA (ed.). **Advances in Botanical Research**, vol. 25. San Diego, CA: Academic Press.
- Lemitri-Chlieh F., MacRobbie EAC. and Brearley CA. (2000).** Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulation K<sup>+</sup> inward rectifying conductance in guard cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **97**, 8687-8692.
- Leonhardt N., Kwak J.M., Robert N., Waner D., Leonhardt and Schroeder JI. (2004).** Microarray Expression Analyses of Arabidopsis Guard Cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. **The Plant Cell.** **16**, 596-615.
- Lewitt, JL. (1980).** Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York.

**Li J., Lee R.J., and Assmann S.M. (1998).** Guard cells possess a calcium-dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. **Plant Physiol.** **116**, 785-795.

**Li K, Luan S. (1998).** Voltage-dependent K<sup>+</sup> channels as targets of osmosensing in guard cells. **Plant Cell.** **10**, 1957-70.

**Li J., Wang X-Q., Watson M.B., Assmann S.M. (2000)** Regulation of abscisic acid- induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. **Science.** **287**, 300–303

**Lin C. (2000b).** Plant blue-light receptors. **Trends Plant Sci.** **5**, 337-342.

**Linder B, Raschke K. (1992).** A slow anion channel in guard cells, activation at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. **FEBS Lett.** **313**, 27-30.

**Lohse G, Hedrich R. (1992).** Characterization of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from Vicia Faba guard cells; modulation by extracellular factors and seasonal changes. **Planta.** **188**, 206-14.

**Lu P, Zhang S.Q, and Outlaw, W.H. Jr. (1995).** Sucrose-a solute that acumulates in the guard cell symplast and guard cell apoplast of open stomata. **FEBS lett.** **362**, 180-84.

**Luan S, Li W, Rusnak F, Assmann S.M, Schreiber S.L. (1993).** Immunosuppressants implicate protein phosphatase regulation of K<sup>+</sup> channels in guard cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **90**, 2202-6.

**Lüttge U. (1987).** Malate relations of plants and crassulacean acid metabolism: protons, carbondioxide and water: a review. **G Bot Ital.** **121**, 217-227.

**Lüttge U. Pfeifer T., Fischer-Schliebs E. and Ratajczak R. (2000).** The role of vacuolar malate-transport capacity in crassulacean acid metabolism and nitrate nutrition. Higher malate transport capacity in ice plant after crassulacean acid metabolism-induction and in tobacco under nitrate nutrition. **Plant Physiology.** **124**, 1335-1347.

**Lüttge U. and Ratajczak R. (1997).** The physiology, biochemistry and molecular biology of the plant vacuolar ATPase. **Adv. Bot. Res.** **25**, 253-296

- Lüttge U., Ratajczak R., Rausch T., and Rokel B. (1995).** Stress responses of tonoplast proteins: an example of molecular ecophysiology and the search for eco-enzymes. **Acta Botanica Neerlandica**. **44**, 343-362.
- Macklon AES, Ron MM, Sim A. (1990).** Cortical cell fluxes of ammonium and nitrate in excised root segments of *Allium cepa* L.; studies using  $^{15}\text{N}$ . **J. Exp. Bot.** **41**, 359-370.
- MacLennan DH., Beevers H. and Harley JL. (1963).** Compartmentation of acids in plants tissues. *Biochemical Journal*. **89**, 316-327.
- MacRobbie EAC. (1981).** Effects of ABA on “isolated” guard cells of *Commelina communis* L. **J. Exp. Bot.** **32**, 563-572.
- MacRobbie EAC. (1990).** Calcium-dependent and calcium-independent events in the initiation of stomatal closure by abscisic acid. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.** **241**, 214-219.
- MacRobbie EAC. (1993).**  $\text{Ca}^{2+}$  and cell signalling in guard cells. **Cell Biology**. **4**, 113–122.
- MacRobbie EAC. (1995).** Effects of ABA on  $^{86}\text{Rb}^{+}$  fluxes at plasmalemma and tonoplast of stomatal guard cells. **The Plant Journal**. **7**, 835-843.
- MacRobbie EAC. (1998).** Stomatal guard cells. In “**Solute Transport in Plant Cells and Tissues**” (D. A. Baker and J. L. Hall, eds), pp. 453-97. Wiley, New York.
- MacRobbie EAC, and Lettau J. (1980).** Ion content and aperture in isolated guard cells of *Commelina communis* L. **J. Membr Biol.** **53**, 199-205.
- Maeshima M. (2000).** Vacuolar  $\text{H}^{+}$ -pyrophosphatase. *Review Biochemica et Biophysica Acta*. **1465**, 37-51.
- Maeshima, M, and Yoshida S. (1989).** Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. **Journal of Biological Chemistry**. **264**, 20068-73.

- Marigo G., Bouyssou H. and Belkoura M. (1985).** Vacuolar efflux of malate and its influence on nitrate accumulation in *Catharanthus roseus* cells. **Plant Science. 39**, 97-103.
- Maathius FJM. and Prins HBA. (1990).** Patch-clamp studies on root cell vacuoles of a salt-tolerant and a salt-sensitive *Plantago* species. **Plant Physiol. 92**, 23-28.
- Maathius FJM. and Prins HBA. (1991).** Outward current conducting ion channels in tonoplast of *Vigna unguiculata*. **Journal of Plant Physiology. 139**, 63-69.
- Marigo G., Bouyssou H., Laborie D. (1988).** Evidence for malate transport into vacuoles isolated from *Catharanthus roseus* cells. **Bot Acta. 101**, 187-91.
- Marin BP. (1985).** "Biochemistry and function of vacuolar adenosine-triphosphatase in fungi and plants". Springer-Verlag, Berlin.
- Matile P. (1987).** The sap of plants. **New Phytologist. 15**, 1-26.
- Martiny-Baron G, Manolson MF, Poole RJ, Hecker D, Scherer GFE. (1992).** Proton transport and phosphorylation of tonoplast polypeptides from zucchini are stimulated by phospholipid platelet-activating factor. **Plant. Physiol. 99**, 1635-41.
- Martinoia E. (1992).** Transport processes in vacuoles of higher plants. **Botanica Acta. 105**, 232-245.
- Martinoia E. Massonneau A. and Frangne N. (2000).** Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. **Plant Cell Physiol. 41**, 1175-1186.
- Martinoia E. and Neuhaus JM. (2001).** Plant Cell vacuoles. **Encyclopedia of life sciences.** Nature group.
- Martinoia E., Ratajczak R. (1997).** Transport of organic molecules across the tonoplast. In A Leigh, D Sanders, eds, **The Plant Vacuole, Advances in Botanical Research Academic Press**, San Diego, pp 365-400.
- Martinoia E. and Rentsch D. (1994).** Malate compartmentation—responses to a complex metabolism. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45**, 447-467.

- Martinoia E., Vogt E., Amrhein n. (1990).** Functional reconstitution of the malate carrier of barley mesophyll vacuoles in liposomes. **Biochim Biophys Acta.** **1062**, 271-278.
- Maurel C, Javot H, Lauvergeat V, Gerbeau P, Tournaire C, Santoni V, Heyes J. (2002).** Molecular physiology of aquaporins in plants. **Int. Rev Cytol.** **215**, 105-48.
- Mazzella M.A., Cerdan P.D. Staneloni R.J., and Casal J.J. (2001).** Hierarchical coupling of phytochromes and cryptochromes reconciles stability and light modulation of Arabidopsis development. **Development.** **128**, 2291-2299.
- McAinsh MR., Brownlee C., Hetherington AM. (1990).** Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic  $Ca^{2+}$  precedes stomatal closure. **Nature.** **343**, 186-88.
- McAinsh MR., Brownlee C., Hetherington AM. (1992).** Visualizing changes in cytosolic-free  $Ca^{2+}$  during the response of stomatal guard cells to abscisic acid. **Plant Cell.** **4**, 1113-22
- Meszáros LG., Bak J., Chu A. (1993).** Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the nonskeletal type ryanodine receptor  $Ca^{2+}$  channel. **Nature.** **364**, 76-79.
- Miedema H. and Pantoja O. (2001).** Anion modulation of the slow-vacuolar channel. **Journal of the Membrane Biology.** **183**, 137-145.
- Muir SR., Bewell MA., Sanders D., Allen GJ. (1997).** Ligand-gated  $Ca^{2+}$  channels and  $Ca^{2+}$  signalling in higher plants. **Journal of Experimental Botany.** **48**, 589-597.
- Muir SR. and Sanders D. (1996).** Pharmacology of  $Ca^{2+}$  release from red beet microsomes suggests the presence of ryanodine receptor homologs in higher-plants. **FEBS Lett.** **395**, 39-42.
- Mühling K. H. and Sattelmacher B. (1997).** Determination of apoplastic  $K^+$  in intact leaves by ratio imaging of PBFI fluorescence. **J.Exp. Bot.** **48**, 1604-1609.
- Müller-Röber BJ., Ellenberg N., Provart L., Willmitzer H., Busch, D., Becker P. Dietrich S., Hoth and R. Hedrich. (1995).** Cloning and electrophysiological analysis

of KST1, an inward rectifying K<sup>+</sup> channel expressed in potato guard cells. **EMBO J.** **14**, 2409- 2416.

**Nagy F., Kircher S., Schäfer E. (2001).** Intracellular trafficking of photoreceptors during light induced signal transduction. **J. Cell Sci.** **114**, 475-480.

**Nagy F., Schäfer E. (2000).** Nuclear and cytosolic events of light-induced, phytochrome regulated signalling in higher plants. **EMBO J.** **19**, 157-163.

**Nakamura RL, McKendree WL, Hirsch RE., Sedbrook JC, Gaber RF, Sussman MR. (1995).** Expression of an Arabidopsis potassium channel gene in guard cells. *Plant Physiol.* **109**, 371-74.

**Neuhaus E., Emmerlich V., Linka N., Reinhold T., Hurth MA., Traub M. and Martinoia E. (2003).** The plant homolog to the human sodium dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 11122-11126.

**Neuhaus E., Alois M., Suh SJ., Kretzschmar., Geis Tina., Bregante M., Gambale., and Martinoia E. (2005).** Impaired pH homeostasis in Arabidopsis Lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. **Plant Physiology.** **137**, 901-910.

**Ng CKY. and Hetherington AM. (2001).** Sphingolipid-mediated signalling in plants. **Ann. Bot. London.** **88**, 957-965.

**Nobel PS. (1983).** Leaf anatomy and water use efficiency. In N. C. Turner and P.J. Kramer W. (ed.). **In Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress.** Wiley, New York., pp. 43-55.

**Oleski N., Mahdavi P., Bennett AB. (1987).** Transport properties of the tomato fruit tonoplast (*Lycopersicon esculentum*). II Citrate transport. **Plant Physiol.** **84**, 997-1000.

**Osmond CB. And Holtum JAM. (1981).** Crassulacean acid metabolism. In the **Biochemistry of plants**, 8. M.D Hatchand N.K. Boardman, ed. Academic Press, New York, 283-328.

**Outlaw WH.Jr. (1990).** Kinetic properties of guard-cell phosphoenolpyruvate carboxylase. **Biochem. Physiol. Pflanzen. 186**, 317-325.

**Outlaw, W.H. Jr. (2003).** Integration of cellular and physiological functions of guard cells. **Critical Reviews in Plant Sciences. 22**, 503-529.

**Outlaw WH. Jr., Du Z., Meng FX., Aghoram K., Riddle KA., and Chollet R. (2002).** Requirements for activation of the signal-transduction network that leads to regulatory phosphorylation of leaf guard-cell phosphoenolpyruvate carboxylase during fusicoccin stimulated stomatal opening. **Arch. Biochem. Biophys. 407**, 63-71.

**Palmgren M.G. (1998).** Protons gradients and plant growth: role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. In *Advances in Botanical Research*, J.A. Callow (ed.). Academic Press, San Diego, C.A., pp. 1-70.

**Pantoja O, Dainty J. and Blumwald E. (1989).** Ion channels in vacuoles from halophytes and glycophytes. **FEBS Letters. 225**, 92-95.

**Pantoja O,Dainty J. and Blumwald E. (1992a).** Cytoplasmic chloride regulates cation channels in the vacuolar membrane of plant cells. **Journal Membrane Biol. 125**, 219-229.

**Pantoja O, Gelli A, and Blumwald E. (1992b).** Characterization of vacuolar malate and K<sup>+</sup> channels under physiological conditions. **Plant Physiol. 100**, 1137-41.

**Pantoja O, Smith JAC. (2002),** Sensitivity of the plant vacuolar malate channel to pH, Ca<sup>2+</sup> and Anion-channel blockers. **J. Membr Biol. 186**, 31-42.

**Parmar PN, Brearley CA. (1995).** Metabolism of 3- and 4-phosphorylated phosphatidylinositols in stomatal guard cells of *Commelina communis* L. **Plant J. 8**, 424-33.

**Pei ZM, Kuchitsu K, Ward JM, Schwarz M, Schroeder JI. (1997).** Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. **Plant Cell.** **9**, 409-23.

**Pei ZM, Ward JM, Harper JF, and Schroeder JI. (1996).** A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. **EMBO J.** **15**, 6564-6574.

**Pemadasa, M.A. (1983).** Effects of KCl concentration on changes in starch and malate levels in abaxial and adaxial epidermis in relation to stomatal opening. **J. Exp. Bot.** **34**, 514–522.

**Penny MG., and Bowling DJF. (1974).** A Study of potassium gradients in the epidermis of intact leaves of *Commelina communis* L. in relation to stomatal opening. **Planta.** **119**, 17-25.

**Plant PJ., Gelli A. and Blumwald E. (1994).** Vacuolar chloride regulation of an ion-selective tonoplast channel. **J. Membr Biol.** **140**, 1-12.

**Prod'homme B., Pietrobon D, and Hess P. (1987).** Direct measurement of proton transfer rates to a group controlling the dihydropyridine-sensitive  $Ca^{2+}$  channel. **Nature**, **329**, 243- 246.

**Pottosin II., Martínez-Estévez M. (2003).** Regulation of the fast vacuolar channel by cytosolic and vacuolar potassium. **Biophysical Journal.** **84**, 977-986.

**Pottosin II., Martínez-Estévez M., Dobrovinskaya OR. Muñiz J. (2003).** Potassium-selective channel in the red beet vacuolar membrane. *Journal of Experimental Botany.* **54**, pp. 663-667.

**Pottosin II., Tikhonova LI., Hedrich R., Schönknecht G. (1997).** Slowly activating vacuolar channels can not mediate  $Ca^{2+}$  induced  $Ca^{2+}$  release. **The Plant Journal.** **12**, 1387-1398.

**Raschke K. (2003).** Alternation of the slow with the quick anion conductance in whole guard cells effected by external malate. **Planta.** **217**, 651-657.

**Raschke K., and Schnabl H. (1978).** Availability of chloride affects the balance between potassium chloride and potassium malate in guard cells of *Vicia faba* L. **Plant Physiol.** **62**, 84-87.

**Ratajczak R. (2000).** Structure, function and regulation of the plant vacuolar H<sup>+</sup> translocating ATPase. **Biochim. Biophys. Acta.** **1465**, 17-36.

**Ratcliffe RG. (1999).** Intracellular pH regulation in plants under anoxia. In: Egginton S, Taylor EW, Raven JA, eds. **Regulation of acid-base status in animals and plants.** **Society of Experimental Biology Seminar Series**, Cambridge University Press, **68**, 193–213

**Razem FA., El-Kerramy A., Abrams SR. and Hill RD. (2006).** The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. **Nature.** **439**, 290-94.

**Rea PA, and Poole RJ. (1993).** Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase. **Annu. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.** **44**, 157-80.

**Rea P, Griffith CJ., Sanders D. (1987).** Purification of the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid of a higher plant tonoplast H<sup>+</sup>-ATPase. **Journal Biol. Chem.** **262**: 14745-14752.

**Rea P, and Sanders D. (1987).** Tonoplast energizations: two H<sup>+</sup>-pumps, one membrane. **Physiologia Plantarum.** **71**, 131-141.

**Reifarth WF., Weiser T. and Bentrup F-W. (1994).** Voltage- and Ca<sup>2+</sup>-dependence of the K<sup>+</sup> channel in the vacuolar membrane of *Chenopodium rubrum* L. suspension cells. **Biochim. Biophys Acta.** **1192**, 79-87.

**Rentsch D. Martinoia E. (1991).** Citrate transport into barley mesophyll vacuoles-comparison with malate-uptake activity. **Planta.** **184**, 532-537.

**Roberts JKM., Callis J., Wemmer D., Walbot V., Jardetzky O. (1984).** Mechanism of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA.** 81,3379–3383.

**Rona JP., Pitman MG, Lüttgeu., Ball E. (1980).** Electrochemical data on compartmentation into cell wall, cytoplasm, and vacuole of leaf cells in the CAM genus *Kalanchoë*. **Journal of Membrane Biology.** 57, 25-35.

**Sanders D., Pelloux J., Brownlee C. and Harper JF. (2002).** Calcium at the crossroads of signalling. *The Plant Cell. Supplement.* S401-S417.

**Schmidt C. and Schroeder JI. (1994).** Anion-selectivity of slow anion channels in *Vicia faba* guard cells: large nitrate permeability. **Plant Physiology.** 106, 383-391.

**Schnabl H. and Raschke K. (1980).** Potassium chloride as stomatal osmoticum in *Allium cepa* L. a species devoid of starch in guard cells. **Plant Physiol.** 65, 88-93.

**Schnabl H. and Ziegler H. (1977).** The mechanism of stomatal movement in *Allium cepa* L. **Planta.** 136, 37-43.

**Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D. (2001b).** Guard cell signal transduction. **Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 52, 627-58.

**Schroeder JI, Hagiwara S. (1989).** Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasmamembrane. **Nature.** 338, 417-430.

**Schroeder JI, Keller BU. (1992).** Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 89, 5025-29.

**Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ, (2001a).** Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. **Nature.** 410, 327-30.

**Schroeder JI, Raschke K, Neher E. (1987).** Voltage dependence of K<sup>+</sup> channels in guard- cell protoplasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 84, 4108-12.

**Schroeder JI., Schmidt C. and Sheaffer J. (1993).** Identification of high-affinity slow anion channel blockers and evidence for stomatal regulation by slow anion channels in guard cells. **Plant Cell.** **5**, 1831-1841.

**Schroeder JI, Schwarz M, Pei Z-M. (1988).** Protein kinase and phosphatase regulation during abscisic acid signaling and ion channel regulation in guard cells. **In Cellular Integration of Signalling Pathways in Plant Development.** (ed.) RLF Schiavo, G Morelli, N Raikhel, pp. 59-69. Heidelberg, Springer-Verlag.

**Schönknecht G, Spoormaker P, Steinmeyer R, Bruggemann L, Ache P, Dutta R, Reintanz B, Godde M, Hedrich R, and Palme K. (2002).** KCO1 is a component of the slow-vacuolar (SV) ion channel. **FEBS Lett.** **551**, 28-32.

**Schulz-Lessdorf B. And Hedrich R. (1995).** Protons and calcium modulate SV-type channels in the vacuolar-lysosomal compartment—channel interaction with calmodulin inhibitors. **Planta.** **197**, 655-671.

**Serrano EE, Zeiger E, Hagiwara S. (1988).** Red light stimulates an electrogenic proton pump in *Vicia guard* cell protoplasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **85**, 436-40.

**Shimazaki K. Iino M, Zeiger E. (1986).** Blue light-dependent proton extrusion by guard-cell protoplasts of *Vicia Faba*. **Nature.** **319**, 324-26.

**Smith JAC., Bryce JH. (1992).** Metabolite compartmentation and transport in CAM plants. In: **Plant Organelles: Compartmentation of metabolism in photosynthetic cells.** AK Tobin, editor, pp. 141-167. Cambridge University Press, Cambridge.

**Smith JAC., Ingram J., Tsiantis MS., Barkla BJ., Bartholomew DM., Bettey M., Pantoja O., Pennington AJ. (1996).** Transport across the vacuolar membrane in CAM plants. In: **Crassulacean Acid Metabolism: Biochemistry, Ecophysiology and Evolution.** K. Winter and J.A.C. Smith, editors, pp. 53-71. Springer-Verlag, Berlin

**Steiger S., Ratajczak R., Martinoia E., Lüttge U. (1997).** The vacuolar malate transporter of *Kalanchoë daigremontiana*: a 32-kDa polypeptide?. **J Plant Physiol.** **151**: 137-141.

**Steudle E., Smith JAC., Lüttgeu. (1980).** Water-relation parameters of individual mesophyll cells of the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoë daigremontiana*. **Plant Physiology.** **66**, 1155-1163.

**Sun MH, Xu W, Zhu YF, Su WA, and Tang ZC. (2001).** A Simple method for in situ hybridization to RNA in guard cells of *Vicia faba* L.: The expression of aquaporins in guard cells. **Plant. Mol. Biol. Reporter.** **19**, 129-135.

**Sze H. (1985).** H<sup>+</sup>-translocating ATPase: advances using membrane vesicles. **Annual Review of Plant Physiology.** **36**, 175-208.

**Sze H, Li x, Palmgren MG. (1999).** Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. **Plant Cell.** **11**, 677–689.

**Sze H., Ward J. and Lai S. (1992).** Vacuolar, H<sup>+</sup>-ATPases from plants: structure, function and isoforms. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes.** **24**, 371-381.

**Talbott LD, and Zeiger E. (1996).** Central roles for potassium and sucrose in guard-cell osmoregulation. **Plant. Physiol.** **111**, 1051-57.

**Thiel G., Wolf AH. (1997).** Operation of K<sup>+</sup> channels in stomatal movement. **Trends Plant Sci.** **2**, 339–345.

**Thomine S., Zimmermann S., Guern J., Barbier-Brygoo H. (1995).** ATP-dependent regulation of an anion channel at the plasma membrane of epidermal cells of *Arabidopsis* hypocotyls. **Plant Cell.** **7**, 2091-2100.

**Tikhonova LI., Pottosin II., Dietz KJ., Schönknecht G. (1997).** Fast activating cation channel in barley mesophyll vacuoles. Inhibition by calcium. **The plant journal.** **11**, 1059- 1070.

- Tyerman SD. (1992).** Anion channels in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* **43**, 351-73.
- Ugochukwi EN. and Anosike EO. (1979).** Effect of storage under nitrogen on ethanol, lactate, malate and their dehydrogenases in yam tubers. *Phytochemistry*. **18**, 1621-1624.
- Verý AA. and Davies JM. (2000).** Hyperpolarization-activated calcium channels at the tip of *Arabidopsis* root hairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 9801-9806.
- Wang R.C., Guegler K., LaBrie S.T., and Crawford N.M. (2000).** Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell*. **12**, 1491-1509.
- Ward JM, Pei ZM, and Schroeder JI. (1995).** Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell*. **7**, 833-44.
- Ward JM. and Schroeder JI. (1994).** Calcium-activated K<sup>+</sup> channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles in the control of stomatal closure. *Plant Cell*. **6**, 669-83.
- West ES. (1963).** *Textbook of Biophysical Chemistry.* (ed.). Macmillan: New York. pp. 76-88.
- White PJ. and Smith JAC. (1989).** Proton and anion transport at the tonoplast in crassulacean-acid-metabolism plants: specificity of the malate-influx system in *Kalanchoë daigremontiana*. *Planta*, **179**, 265-274.
- Wille A, Lucas W. (1984).** Ultrastructural and histochemical studies on guard cells. *Planta*. **160**, 129-42.
- Wilmer C. and Fricker M. (1996).** Stomata. *Topics in Plant Functional Biology:* Black and B. Charlwood (ed). Second edition, Chapman and Hall. London.
- Winter H, Smith JAC. (1995).** Crassulacean acid metabolism: Biochemistry, ecophysiology and evolution. Springer-Verlag, Berlin.

- Wiskich JT. (1977).** Mitochondrial metabolite transport. **Annu. Rev. Plant. Physiol.** 28, 45- 69.
- Wiskich JT. (1980).** Control of the Krebs cycle. In **The Biochemistry of Plants, 2**, D.D. Davies, ed. Academic Press, New York, 243-278.
- Wood NT., Allan AC., Haley A., Viry-Moussaid M. and Trewavas AJ. (2000).** The characterization of differential calcium signalling in tobacco guard cells. **Plant J.** 24, 335-344.
- Wu Y, Kuzma J., Marechal E., Graeff R., Lee HC., Foster R. and Chua N-H. (1997).** Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science.* 278, 2126-21330.
- Yool AJ., Schwarz TL. (1991).** Alteration of ionic selectivity of a K<sup>+</sup> channel by mutation of the H5 region. **Nature**, 349, 700-704.
- Zhen RGK, and Rea PA. (1997).** The molecular and biochemical basis of pyrophosphate-energized proton translocation at the vacuolar membrane. **Adv. Bot Res.** 25, 297-37.
- Zimmermann S., Ehrhardt T., Plesch G, and Müller-Rober B. (1999).** Ion channels in plant signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences.** 55, 183-203.
- Zimmermann S., Thomine S., Guern J. and Barbier-Brygoo H. (1994).** An anion current at the plasma membrane of tobacco protoplasts shows ATP-dependent voltage regulation and is modulated by auxin. **Plant J.** 6, 707-716.