7. DISCUSIÓN

7.1 FENOTIPOS DE LAS MUTANTES CAX.

El Ca^{2+} es un componente central de muchas rutas de señalización abióticas y el incremento del Ca^{2+} citosólico es un evento temprano durante estos eventos. Si el Ca^{2+} citosólico aumenta por arriba de cierto umbral, que es lo que se esperaría cuando CAX1 no es funcional, la duración de los pulsos de Ca^{2+} citosólico se prolongaría (Cheng et al., 2003). Debido a lo anterior, se podría esperar un efecto marcado de esta mutación en el desarrollo normal de la planta, sin embargo, las mutantes *cax* no mostraron un fenotipo muy diferente al de las plantas silvestres (Hirschi, 1999).

Un análisis macroscópico de las diferentes plantas empleadas en el presente estudio mostró que la mutante *cax1* fue de menor tamaño, con cotiledones angostos y doblados en comparación con los cotiledones grandes y extendidos de las plántulas WT; además la longitud de su hipocótilo fue más corto que el de las WT (Figura 6.1). Las semillas *cax1* tuvieron la tasa inicial de germinación más lenta, fueron las últimas en presentar sus primeras hojas y sus primeras raíces secundarias, causando que las plantas fueran de menor tamaño que las WT a las cuatro semanas de edad; sin embargo, las mutantes *cax1* fueron indistinguibles de las WT en plantas de mayor edad (9-10 semanas; datos no mostrados). Estos resultados sugieren que

las plantas *cax1* parecen tener un retraso en la velocidad de crecimiento y estos fenotipos son comparables a los reportados por Cheng et al. (2003), que resaltan la importancia del gen *CAX1* en el crecimiento de la planta.

Las mutantes *cax3* mostraron un tamaño intermedio entre las plántulas *cax1* y WT, con cotiledones extendidos pero de menor tamaño que las WT y un hipocótilo similar a las tipo silvestre. Fenotipos similares han sido observados por K.D. Hirschi (comunicación personal) quien describió que las mutantes *cax3* tienen fenotipos morfológicos sutiles; a diferencia de las líneas *cax1*, no hay alteración en la longitud de sus raíces y en el tiempo de floración. De forma interesante, se ha encontrado que CAX3 normalmente se expresa a niveles relativamente bajos, pero su expresión aumenta en las mutantes *cax1*, sugiriendo que CAX3 podría tomar un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} aunque sin compensar completamente la pérdida de *CAX1*. (Cheng et al., 2003).

Por otro lado, las mutantes *CAX1-OE* fueron indistinguibles de las plantas tipo silvestre, tanto en su germinación como en su desarrollo, lo cual es un poco sorprendente ya que la sobreexpresión de *CAX1* en *A. thaliana* aumenta su nivel de expresión basal, aunque tampoco se detectaron cambios en el crecimiento o desarrollo de la planta, lo cual contrasta con los fenotipos negativos reportados en plantas de tabaco que expresaron a *CAX1* bajo el control del promotor 35S (Hirschi, 1999). Debido a lo anterior, y considerando la importancia del Ca^{2+} en la señalización celular, se consideró que las mutantes *cax* podrían estar afectadas en respuestas que se sabe están reguladas por cambios en los niveles de Ca^{2+} citoplásmico.

7.2 RESPUESTA GRAVITRÓPICA

Diferentes evidencias sugieren que el calcio es requerido durante la respuesta gravitrópica de la raíz. Por ejemplo, la respuesta gravitrópica se pudo inducir al colocar un bloque de agar conteniendo iones de calcio sobre un lado de la cofia (root cap) de una raíz orientada verticalmente (Taiz y Zeiger, 2002). Otros experimentos reportados por los mismos autores, indican que un cambio en el pH intracelular es el cambio detectable más temprano en las células de la columnela que responden a la gravedad. Con estas evidencias, se hipotetizó que las mutantes *cax* podrían estar afectadas en su respuesta gravitrópica ya que la actividad antiportadora Ca^{2+}/H^{+} de dichas plantas se encuentra alterada.

Efectivamente, se encontró que la respuesta a la gravedad de las raíces de las mutantes *cax* fue diferente a la respuesta de la línea silvestre. En general las plántulas WT generaron una mayor curvatura en su raíz, alcanzando un ángulo superior a los 70° después de 24 horas de estimulación gravitrópica continua, además de haber mostrado una respuesta más rápida durante las primeras ocho horas de estimulación (Figura 6.4). En cambio, las plántulas *cax1* mostraron en su raíz la curvatura inicial más pequeña en las primeras ocho horas después del estímulo gravitrópico. A las 24 horas después del giro fueron las mutantes con la curvatura más grande, quedando por arriba de las mutantes *cax3* y de las sobreexpresoras *CAX1-OE*, pero por debajo de la WT (Figura 6.4). Las plántulas *CAX1-OE* fueron las mutantes que mostraron una respuesta gravitrópica menor. En conjunto, estos resultados sugieren que posibles cambios en los niveles citoplásmicos de Ca^{2+} debidos a alteraciones en la expresión de los

intercambiadores H^+/Ca^{2+} CAX, afectan la respuesta gravitrópica de *A. thaliana*. Para el caso de las mutantes *cax1* y *cax3*, el retraso en la respuesta de la raíz al estímulo gravitacional podría deberse a que las oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} citoplásmico no se presenten, ya que la ausencia de la actividad responsable de disminuir los niveles elevados de Ca^{2+} (CAX1 o CAX3) se encuentra ausente, impidiendo así la fase de recuperación de los niveles normales de Ca^{2+} citoplásmico, y por lo tanto, de la continuación de los cambios periódicos de Ca^{2+}. En el caso particular de las plántulas *CAX1-OE*, la inhibición de la respuesta gravitrópica podría ser debida a una disminución severa en los niveles de Ca^{2+} citoplásmico como resultado de la hiperactividad del intercambiador CAX1, como se ha reportado que sucede en plantas de tabaco que sobreexpresaron al gen *AtCAX1* (Hirschi, 1999).

Las diferencias encontradas entre la respuesta gravitrópica de las mutantes *cax* y la de la tipo silvestre a partir del análisis estadístico realizado no permite distinguir cual de las mutantes tiene mayor desigualdad con la WT, sin embargo los resultados sugieren que el desequilibrio causado en el transporte de Ca^{2+}, por la eliminación de los genes *CAX1* o *CAX3*, o la sobreexpresión de *CAX1* sí afectan la respuesta que las raíces generan ante un estímulo gravitrópico. Sería interesante realizar el mismo conjunto de experimentos empleando como organismo de prueba plántulas con la doble mutación *cax1*/*cax3*.

Por otro lado, el tiempo más rápido de respuesta de la raíz se presentó durante las primeras cuatro horas después del giro de la caja Petri, siendo superior a los 10° por hora en algunos casos (datos no mostrados). Durante las 16 horas no monitoreadas del giro de la raíz (entre las 8 y las 24 horas después del giro), la

velocidad de doblamiento disminuyó en la mayoría de los casos en todos los tipos de plántulas. Estas observaciones pueden explicarse con un modelo recientemente propuesto por Michael Evans (2003) (Ver sección 3.5.1 de la Introducción). Este modelo plantea que la curvatura de la raíz hacia abajo ocurre en la zona distal de elongación (DEZ) y que el inicio de la curvatura en esta zona es resultado de la estimulación de la elongación de la parte superior de la raíz. En etapas subsecuentes de la respuesta gravitrópica existe una fuerte inhibición de la elongación a lo largo del lado inferior de la raíz, especialmente dentro de la zona central de elongación (CEZ) donde las células son muy susceptibles a la inhibición del crecimiento por auxina. Estas respuestas indican que posiblemente existen dos motores gravitrópicos o grupos de células dentro de la cuales se desarrolla la asimetría en el crecimiento. Estos dos motores se podrían relacionar con las dos fases en la curvatura de la respuesta gravitrópica y así, la mayor velocidad de doblamiento de las raíces observadas en todas las plántulas de *A. thaliana* en las primeras horas del estímulo gravitrópico pueden relacionarse con la fase temprana rápida del gravitropismo, mientras que el doblamiento más lento observado en las últimas horas del estímulo aplicado se relacionaría con la segunda fase lenta del gravitropismo.

Aun cuando los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen indicar que existe una diferencia en la respuesta gravitrópica de la raíces de las plantas mutantes *cax1*, *cax3* y *CAX1-OE*, comparadas con las plantas silvestres, existe cierta incertidumbre en cuanto a la magnitud de las diferencias observadas. Esto se debe principalmente al efecto del ángulo de estimulación sobre la respuesta gravitrópica (Plieth y Trewavas, 2002). Estos autores han reportado que el ángulo

de óptima estimulación es de entre 120º y 135º, con ángulos menores causando respuestas menos pronunciadas. Como puede observarse en la Figura 7.1, la magnitud del ángulo de respuesta de raíces del mismo tipo de planta fue diferente de acuerdo a la posición original en que se encontraban, observándose ángulos de respuesta de menor magnitud en las raíces que inicialmente presentaban un crecimiento hacia abajo de la horizontal y con un ángulo diferente a cero; por el contrario, las raíces cuyo ángulo de crecimiento con respecto a la horizontal se encontraba por arriba de ésta, respondieron con ángulos de mayor magnitud. Para poder obtener resultados más representativos de las diferentes plantas empleadas en el presente estudio, será necesario repetir estos experimentos aplicando un ángulo de estimulación entre 120-135º de acuerdo a lo reportado por Plieth y Trewavas (2002).

Figura 7.1 Efecto del ángulo inicial sobre la respuesta gravitrópica. Algunas raíces generaron ángulos más agudos (líneas rectas) o más obtusos (líneas punteadas) según haya sido su linearidad con la horizontal.

7.3 RESPUESTA ESTOMATAL

Las células guarda de los estomas han sido ampliamente usadas como sistema modelo en el que se estudian las rutas de transducción de señales en las plantas debido a que responden de una manera fácilmente cuantificable a un rango de estímulos medioambientales como la luz, elevada concentración de CO_2, temperatura y fitohormonas (Outlaw, 2003; Assmann y Wang, 2001; McAinsh et al, 2000). Todos estos estímulos inducen una respuesta final fisiológica que es clara y relativamente fácil de medir: el cambio en la apertura estomatal, aunque con características estímulo-específicas (Scrase-Field y Knight, 2003).Por ejemplo, distintas intensidades de un único estímulo, como puede ser la presencia de ABA, pueden producir señales de Ca^{2+} (oscilaciones) de diferentes magnitudes o cinéticas, o pueden usar distintas fuentes de Ca^{2+} (Allen y Schroeder, 2001).

Para determinar los efectos del ABA sobre el cambio de la apertura estomatal en las plantas mutantes *cax*, se requirió primeramente de epidermis cuyos estomas estuvieran abiertos. Para ello las epidermis recién aisladas se incubaron en una solución de MES/KOH 10mM a pH 5.5 con KCl 50mM, esta solución fue burbujeada continuamente con aire libre de CO_2 y las epidermis se iluminaron con luz fría. De estas condiciones, la iluminación fue indispensable para obtener la apertura deseada de los estomas. Se sabe que la luz es la señal medioambiental dominante que controla el movimiento estomatal en hojas de plantas bien hidratadas bajo condiciones naturales; los estomas se abren cuando el nivel de luz que alcanza la superficie de la hoja aumentan, y se cierran conforme dicho nivel disminuye (Taiz & Zeiger, 2002). Esta apertura inducida por la luz es resultado de la activación

de la H^+-ATPasa de la membrana plasmática, lo cual causa la hiperpolarización de esta membrana, permitiendo así la toma de iones K^+ hacia el interior de las células guarda con el consiguiente aumento en la presión osmótica y el aumento en la turgencia de éstas células (Schroeder et al., 2001).

El ABA, regulador endógeno de crecimiento, inicia el cierre estomatal en gran variedad de plantas. Numerosos experimentos se han usado para demostrar el papel del ABA en el proceso fisiológico que lleva al cierre estomatal, como rociar ABA sobre las hojas, aplicar ABA a través de la corriente de transpiración e incubar tiras de epidermis en solución de ABA (Trejo et al., 1993).

En este trabajo se decidió emplear epidermis aisladas de *Arabidopsis thaliana* de las diferentes plantas en estudio para analizar la respuesta estomatal al ABA y determinar si existía una diferencia en la velocidad de cierre de los estomas en las planta con el antiportador CAX mutado. Sorprendentemente, en ninguno de los experimentos realizados se encontró una evidente disminución en la apertura estomatal como respuesta al ABA (Figura 6.5). A pesar de que existe una clara relación lineal entre la concentración del ABA en la epidermis y la respuesta estomatal (Trejo et al., 1993), tampoco se encontró respuesta alguna de los estomas empleando concentraciones elevadas de ABA (100 μM). Para evitar posibles efectos debidos a la existencia del ritmo circadiano de las células guarda, todos los experimentos se realizaron antes de las tres de la tarde, tomando en cuenta que Trejo et al. (1993) detectaron cambios en la sensibilidad al ABA en función de la hora del día. Por otra parte, las epidermis se mantuvieron en incubación con ABA por más de cuatro horas, ya que se ha reportado que el tiempo de respuesta de los

estomas de *A. thaliana* a este regulador es muy variable, pudiéndose observar el cierre de los estomas entre una y cuatro horas de tratamiento o más (Assmann y Shimazaki, 1999).

La respuesta nula de los estomas ante el ABA observada en este trabajo, podrían deberse a la situación fisiológica de las células guarda; es posible que las células de la epidermis no se mantuvieran lo suficientemente funcionales durante el tiempo de análisis, como se demostró con la tinción de Rojo Neutro de las epidermis de *A. thaliana*, incubadas por al menos dos horas en ABA (Figura 6.10.b)

A diferencia de los resultados obtenidos con *A. thaliana*, la incubación de epidermis aisladas de *C. communis* en ABA sí mostró un cambio en la apertura de los estomas. Utilizando una concentración de 10 μM de ABA se pudo apreciar el cierre casi total de los estomas de *C. communis* después de dos horas de tratamiento. Previamente al tratamiento con ABA, también se incubaron las epidermis aisladas en solución de MES/KOH 10mM a pH 5.5 con KCl 50mM burbujeada con aire libre de CO_2 y bajo iluminación, esto propició que los estomas que no se encontraban inicialmente abiertos aumentaran su grado de apertura. El cierre de los estomas de *C. communis* estimulado por la presencia de ABA se ha reportado como una respuesta rápida de las células guarda, que puede detectarse a partir de los 20 minutos de tratamiento (Wevers y Paterson, 1987). En los experimentos aquí reportados se encontró que la respuesta de los estomas de *C. communis* al ABA fue claramente perceptible después de una hora de tratamiento (Figura 6.13).

Análisis de la respuesta estomatal han mostrado que la reducción en la apertura de los estomas debida al ABA es muy variable y parece depender en gran

medida del método empleado. Trejo et al. (1993) evaluaron tres métodos de aplicación de ABA en *Commelina communis*, encontrando que los estomas de las epidermis aisladas fueron aparentemente más sensibles al ABA, pues concentraciones de 1 μM causaban el cierre casi completo de los estomas; sin embargo, cuando emplearon segmentos de hojas y los incubaron en soluciones de ABA a esta misma concentración (1 μM), los estomas permanecieron abiertos casi en su totalidad. Estos autores sugirieron que estas diferencias en la sensibilidad al ABA se debía a las diferencias en concentración de ABA en la epidermis; cuando las hojas se incubaron en ABA, su acumulación en la epidermis estaba limitada por la presencia del mesófilo y el metabolismo rápido del ABA en éste pudo también tener una influencia en la concentración del ABA tanto en el mesófilo como en la epidermis.

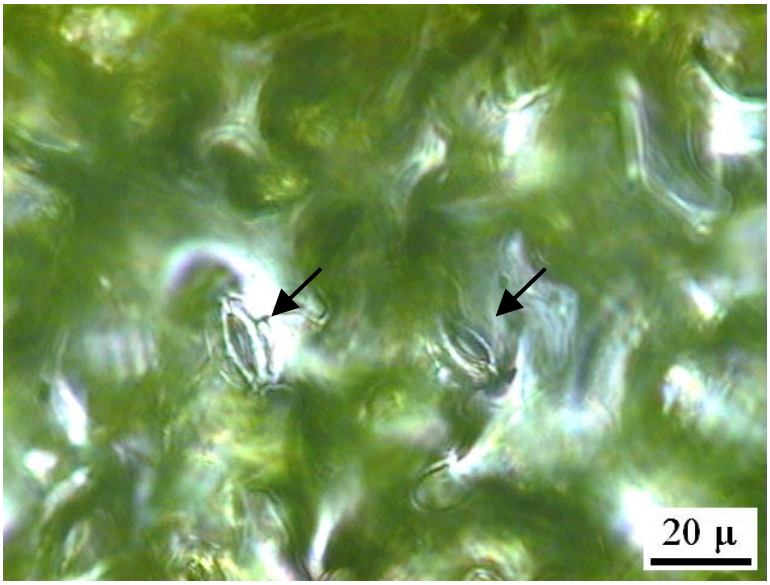
Los tratamientos con Fusicoccina tanto en *A. thaliana* como en *C. communis* se realizaron posteriormente a los ensayos con ABA, para comprobar que las células guarda no tenían ningún daño. En *A. thaliana* la respuesta a esta toxina fue nula (Figura 6.9), no se observó cambio en la apertura estomatal a pesar de mantener las epidermis en incubación por más de dos horas. Por el contrario, la respuesta de los estomas de *C. communis* a la Fusicoccina fue muy clara desde antes de los 30 minutos de incubación (Figura 6.14). Con estas observaciones se supuso que las células de la epidermis de *A. thaliana* efectivamente podrían tener un daño, probablemente debido al efecto mecánico del desprendimiento de la epidermis del mesófilo.

Para comprobar si la viabilidad de las células epidérmicas había disminuido después del aislamiento de la epidermis, se realizaron tinciones con Rojo Neutro en epidermis de *A. thaliana* y de *C. communis*, tanto de aquellas recién aisladas como de las ya tratadas con ABA (aproximadamente tres horas después de haber sido aisladas). Las epidermis de *A. thaliana* recién aisladas mostraron una viabilidad media alrededor del 50%; (Figura 6.10.a). En contraste, en *C. communis* prácticamente todas las células epidérmicas se mantuvieron viables en epidermis aisladas (Figura 6.16), *A. thaliana* presenta daño en sus células epidérmicas desde el momento en que éstas son separadas del mesófilo. La tinción de las epidermis tratadas previamente con ABA por al menos dos horas reflejó que la viabilidad de las células epidérmicas de *A. thaliana* disminuyó con el tiempo, donde se observó que las células guarda y solo algunas epidérmicas cercanas a estas células permanecieron viables (Figura 6.10.b). En *C. communis* la viabilidad de las células de las epidermis tratadas con ABA también disminuyó, pero aún después de dos horas se observó más de un 50% de células vivas y probablemente funcionales (datos no mostrados). Tanto el tratamiento con Fusicoccina como la tinción con Rojo Neutro, demostraron que la viabilidad de las células epidérmicas de *A. thaliana* sufren un daño irreversible que puede ser el causante de la inadecuada respuesta fisiológica observada ante el estímulo del ABA.

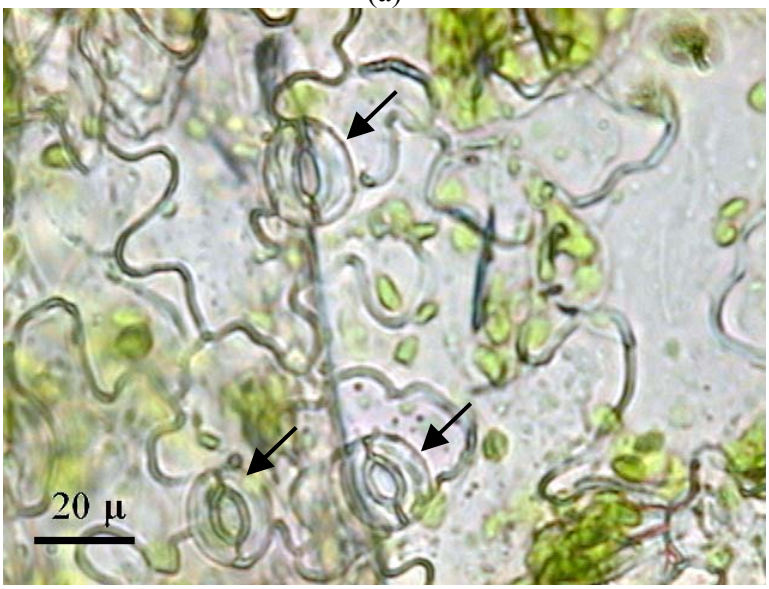
Debido a los problemas que se presentaron con las epidermis aisladas de *A. thaliana*, también se trabajó con segmentos de hojas y hojas completas, de modo que se eliminara el daño que ocasionaba la separación de las epidermis del mesófilo. Un gran obstáculo para continuar con el análisis de la respuesta al ABA en las hojas fue la dificultad para observar con claridad los estomas, y aún más, la apertura del

poro estomatal (Figura 6.12). Sin embargo, se observó algo interesante: después de haber analizado los estomas de la hoja que aparentemente estaban cerrados o ligeramente abiertos, el desprendimiento de la epidermis causó que estos estomas se abrieran (Figura 7.2). Esto confirma que durante el aislamiento de la epidermis se causa, muy posiblemente, la muerte de un gran número de células epidérmicas (como se observó con la tinción del Rojo Neutro), teniendo como consecuencia que los estomas se abran debido a una disminución en la presión que ejercen las células epidérmicas sobre las células guarda. En apoyo a esta conclusión está la propuesta de Roelfsema y Hedrich (2002) quienes han sugerido que la apertura estomatal en hojas intactas se contrarresta por la presión de las células epidérmicas en contra de las células guarda; cambios en el turgor de las células epidérmicas pueden entonces alterar la apertura estomatal.

En la mayoría de las plantas las células epidérmicas de las hojas están conectadas al mesófilo y se verán modificadas cuando la epidermis se remueva; debido a la pérdida del turgor (por la separación del mesófilo), las células epidérmicas no ejercerán más presión sobre las células guarda y los estomas se abrirán. Como consecuencia, los estomas de epidermis aisladas no se cerrarían por completo después de la exposición a ABA



(a)



(b)

Figura 7.2 Aumento de la apertura de los estomas (señalados con flechas) de *A. thaliana* como consecuencia del efecto mecánico de separar la epidermis del mesófilo. (a) Estomas poco abiertos en la hoja. (b) Estomas muy abiertos en epidermis recién aislada de la hoja.

Como ya se mencionó, además de la pérdida de viabilidad de las células epidérmicas, también se presentó la dificultad de conseguir una imagen clara de los estomas que permitiera obtener mediciones confiables de la apertura del poro (Figuras 6.6 y 6.7). La posición irregular de los estomas en diferentes planos respecto a la superficie sobre la que estuvo montado el segmento de epidermis impidió no solo la determinación de la apertura del poro, es decir, saber si un estoma estaba o no abierto, sino la medición del ancho de dicho poro. En algunas ocasiones en las que el poro se distinguió abierto, pero la posición del estoma no era perpendicular al plano de observación, pudo medirse el ancho del poro, pero tal medición fue muy inexacta ya que la pared celular interior de las células guarda (limitando al poro) es muy gruesa y generaba una sombra que impedía determinar donde terminaba dicha pared y por tanto donde comenzaba el poro estomatal. La dificultad para determinar los límites de las paredes de las células guarda que forman el estoma se atribuye en parte a la resolución alcanzada con el aumento utilizado (40X). Otra complicación en estas observaciones era la subjetividad con que se podían hacer las mediciones del ancho del poro; tal falta de objetividad trató de eliminarse buscando la ayuda de un software (Image-Pro plus V.4.1.1.2) que permitiera delinear el poro de manera automática, guiándose por los colores de los pixeles de las fotografías. Se pretendía que el programa creara por sí solo la forma del poro uniendo todos los pixeles de la foto que tuvieran la misma intensidad de color, pero debido a la propia resolución de la fotografía esto no fue posible.

La siguiente alternativa para poder hacer la medición del ancho de los poros de los estomas, fue medir el ancho de las dos células guarda a partir de sus paredes celulares externas, como un indicativo del grado de apertura del estoma. Una

amplitud mayor del ancho de las dos células guarda significaría la presencia de una mayor turgencia en dichas células, y por lo tanto, una mayor apertura del poro estomatal formado entre ellas. Se midió el ancho de los poros de los estomas que tenían una posición adecuada (paralela al plano horizontal) y los anchos de las células guarda que formaban tales estomas (Figura 5.4). La falta de relación lineal entre el ancho de las dos células guarda y el ancho del poro estomatal en *A. thaliana* (Figura 6.8) indicó que no puede tomarse el ancho de las dos células guarda como indicador del grado de apertura del poro. El mismo análisis se aplicó a las células guarda de *C. communis*, donde se pudo medir sin problemas el ancho de las dos células guarda y el ancho del poro, obteniéndose una relación lineal entre esos dos parámetros (Figura 6.15). En conjunto, estas observaciones nos permiten concluir que la irregularidad de la superficie de la epidermis de *A. thaliana* y el grosor de las paredes internas de sus células guarda son un obstáculo para obtener mediciones confiables de la amplitud del poro estomatal.

Con la finalidad de encontrar otra opción que eliminara la dificultad que la topografía de la epidermis imprimía a la tarea de medir el ancho del poro estomatal en *A. thaliana* se empleó la técnica de microscopía confocal (utilizando como colorante el Rojo Neutro; λex572; λem634). Nuevamente, el plano en el que se encontraban acomodados los estomas impedía una exacta medición del poro, además de que la gruesa pared de las células guarda que rodea al poro estomatal mostró una alta autofluorescencia que trajo una nuevo inconveniente para medir el poro. Debido a los conflictos generados se descartó la posibilidad de analizar las aperturas estomatales mediante esta técnica.

Es claro que trabajar con *C. communis* ofreció varias ventajas para analizar de una manera más sencilla el comportamiento de los estomas. La primer ventaja fue que sus estomas tienen un tamaño lo suficientemente grande como para poder ser observados con un objetivo de 20X, esto permitió a su vez una mejor exactitud en las mediciones del ancho de los poros estomatales. Otra ventaja fue que la topografía de la epidermis de *C. communis* fue plana, por lo que todos sus estomas se encontraban en un mismo plano, paralelo a aquél donde habían sido colocadas las epidermis. Sería muy beneficioso para el estudio de la función de CAX, que existieran mutantes *cax* de *C. communis*, pues la metodología que se empleó en este trabajo ha sido ampliamente comprobada en esta especie y acoplarla a *A. thaliana* presentó muchas dificultades. La particularidad por la que *A. thaliana* se empleó en este estudio es el conocimiento de su genoma completo y la existencia de mutantes *cax* en ella.

7.4 PAPELES DE CAX EN LAS RESPUESTAS GRAVITRÓPICA Y ESTOMATAL

Los cambios en el nivel de Ca^{2+} citosólico son aparentes durante la transducción de gran variedad de señales bióticas y abióticas (Sanders et al., 2002). White y Broadley (2003) sugieren que para que una respuesta fisiológica a un estímulo particular se efectúe de manera adecuada, se debe originar una perturbación única en el nivel de Ca^{2+} citoplásmico (denominada señal de calcio citoplásmico). Dicha especificidad reside en las características espacio-temporales

de la perturbación de calcio (McAinsh y Hetherington, 1998). La duración, periodicidad y amplitud de las oscilaciones en el Ca^{2+} citoplásmico varían considerablemente, y su forma depende de la intensidad y de la combinación de estímulos específicos (White y Broadley, 2003). Los mismos autores sugieren la existencia de múltiples hipótesis sobre la generación de las oscilaciones de Ca^{2+} citoplásmico; una de ellas incluye el sucesivo vaciamiento y rellenado de los almacenes intracelulares y extracelulares de Ca^{2+}; otra hipótesis incluye la activación y desactivación sucesivas de canales de Ca^{2+}, a través de coincidentes cascadas de señalización.

Las elevaciones transitorias en el nivel de calcio citoplásmico originadas por distintos estímulos pueden modificar varias de las proteínas celulares que dependen del calcio (Plieth y Trewavas, 2002). Si CAX participa en la restauración del nivel basal de calcio citoplásmico, al alterarse su expresión (como en las mutantes *cax* utilizadas en este estudio), se puede suponer una modificación en la magnitud o periodicidad de las oscilaciones de calcio generadas por estímulos que alteran el nivel de calcio citoplásmico, como son la respuesta gravitrópica de las raíces y la estimulación del cierre estomatal por ABA.

Una mutante de *Arabidopsis* con la actividad de la H^+-ATPasa vacuolar (V-ATPasa) reducida (*de-etiolated3* [*det3*]) muestra varios fenotipos fuertes, alguno de los cuales podría estar causado por la alteración de la actividad antiportadora H^+/Ca^+, que requiere de la energización del tonoplasto por la V-ATPasa (Pittman y Hirschi, 2003). Estos autores exponen que la sobreexpresión de CAX1 lleva a un aumento en la actividad de bombeo de H^+ mediada por la V-ATPasa, mientras que

la eliminación de *CAX1* reduce la actividad V-ATPasa pero no afecta la V-PPasa. Esta es una evidencia que sugiere la existencia de interacciones entre transportadores secundarios dirigidos por H^+, como el antiportador H^+/Ca^+ y la bomba primaria de protones.

7.4.1 Intervención de CAX en la respuesta gravitrópica

La participación de cambios en el Ca^{2+} citoplásmico en la respuesta gravitrópica era indirecta (comúnmente a través del uso de inhibidores, proteínas de unión a calcio u otros mensajeros celulares relacionados al calcio), hasta que Plieth y Trewavas (2002) detectaron directamente en la raíz de *A. thaliana* cambios en el nivel de Ca^{2+} citoplásmico debidos a estimulación gravitrópica. Estos autores demostraron que las características de la señal de calcio generada por el estímulo gravitrópico (un giro de 135° de la raíz por cinco segundos) incluyeron un pico (spike: transitorio corto) inicial en el nivel de calcio citoplásmico seguido de una respuesta temporal lenta (shoulder). Plieth y Trewavas (2002) también demostraron que la señal de calcio de la respuesta a la gravedad tiene diferencias claras con señales producidas por otros estímulos.

El retraso en el giro de las mutantes *cax1* respecto a la velocidad de respuesta de las WT, y la recuperación de esta velocidad en las últimas horas de estimulación gravitrópica pueden ser reflejo de un retraso o una ausencia de la primera fase rápida de la respuesta gravitrópica propuesta por Evans (2003). Esto a su vez puede deberse a una alteración en la oscilación de calcio. Es decir, debido a la ausencia de CAX1, el aumento inicial de Ca^{2+} citoplásmico causado por el

estímulo gravitacional no recupera el nivel requerido para continuar con la generación del próximo pico de Ca^{2+} y de la oscilación específica causada por este estímulo, lo cual podría interpretarse como ausencia de la señal, o bien, que la señal de calcio se genera de una forma deficiente trayendo como consecuencia una alteración en la respuesta gravitrópica. Una alteración similar en la generación y/o percepción de la señal de calcio puede suponerse en las mutantes *cax3*, donde la respuesta al estímulo de la gravedad también fue diferente con respecto a las plantas WT. Es posible que la disminución en la respuesta gravitrópica de las plantas *cax3* se deba a que este gen se expresa particularmente en las raíces (K.D. Hirschi, comunicación personal).

En el caso de las plantas sobreexpresoras *CAX1-OE*, que mostraron la menor respuesta gravitrópica de las plantas en estudio, puede proponerse también que la oscilación de calcio no se genera de forma adecuada, quizá porque no se alcanza el umbral de la concentración Ca^{2+} citoplásmico que origina el pico inicial de la señal, ya que la hiperactividad de CAX1 elimina de manera muy rápida el calcio del citoplasma; o bien, la disminución en el nivel de calcio originado por el exceso de CAX1 crea una señal distinta, de menor magnitud que la normal.

7.4.2 Intervención de CAX en la respuesta estomatal

Desde 1990, Schroeder y Hagiwara demostraron que en células guarda de la planta *Vicia faba* expuestas a ABA 1 μM, se generaban incrementos rápidos y transitorios en el nivel de Ca^{2+} citoplásmico. Estudios similares en células guarda de *Commelina communis* (Gilroy et al., 1991) y posteriormente de *Arabidopsis*

thaliana (McAinsh et al., 1995) comprobaron que la presencia del ABA originaba oscilaciones o incrementos repetitivos en el nivel de Ca^{2+} citoplásmico en estas células. Asimismo, el trabajo con mutantes que no desarrollaban la respuesta de cierre estomatal al producir señales anormales de calcio permitió llegar a la conclusión de que se requerían una frecuencia específica en las oscilaciones de Ca^{2+} para obtener una respuesta de cierre estomatal normal (Sanders et al., 2002). Estas evidencias demuestran que aumentos transitorios en el nivel de Ca^{2+} citoplásmico de las células guarda originados por la presencia de ABA son necesarios para provocar el cierre de los estomas.

Como se mencionó anteriormente, CAX1 o CAX3 pueden estar interviniendo en la adecuada generación de la señal de calcio originada por el ABA; por lo tanto, era de suponerse que las mutantes *cax* presentaran una respuesta estomatal anormal al ABA. Sin embargo, debido a los problemas metodológicos que se presentaron en este trabajo –como fueron la falta de respuesta al ABA por parte de los estomas de la epidermis de *A. thaliana* debido a la baja viabilidad de las células epidérmicas, así como la gran dificultad para hacer la medición del poro estomatal– no se obtuvo información confiable ni datos suficientes para comparar la respuesta de las células guarda de los estomas al ABA de ninguna de las mutantes *cax*. El sistema experimental utilizado no fue el adecuado pues generó una seria de artefactos difíciles de eliminar, como la apertura adicional de los estomas al momento de aislar la epidermis de las hojas.

No obstante, no puede descartarse la posibilidad de que CAX1 o CAX3 estén involucrados en el mecanismo del cierre estomatal inducido por ABA. Una

alternativa para continuar estudiando la posible participación de los transportadores CAX en la respuesta estomatal sería la utilización de nuevos sistemas experimentales, que puedan incluir especies modelo como *Medicago truncatula* o *Lotus japonicus*, dos leguminosas cuyo proyecto de secuenciación de sus genomas está en proceso y que pueden ser transformadas genéticamente. La condición necesaria para que dichas especies puedan ser útiles en esta investigación dependerá de las características de su epidermis. Por otra parte, existen otras especies donde se han identificado mutantes que han ayudado al estudio de los mecanismos de señalización por el ABA. Por ejemplo, Iwai et al. (2003) aislaron una mutante de *Vicia faba* (mutante *fia*) que presentaba afectada la inducción del cierre de los estomas por ABA, y propusieron que la mutación estaba inhibiendo el aumento de los niveles de Ca^{2+} que desencadena la cascada de señalización inducida por ABA. Sin embargo, existen evidencias de que las vías de señalización inducidas por el ABA pueden ser diferentes entre especies; por ello, Iwai y colaboradores (2003) sugieren que diferentes elementos de una cascada de señalización inducida por un estímulo determinado pueden tener papeles importantes en diferentes especies, y debe tenerse cuidado al generalizar mecanismos deducidos a partir de una sola especie.

La falta de conocimiento de la localización celular precisa de los cambios en el nivel de calcio citoplásmico, así como la falta de información sobre la localización tanto celular como tisular de los transportadores CAX, impiden integrar mejor el conjunto de señales de calcio producidas en las células vegetales. Distintas evidencias proponen la afección del desarrollo de la planta por la modificación (sobreexpresión o eliminación) de varios componentes endomembranales de la red

de señales de calcio. La pérdida de algunas señales de calcio ocasionada por distintos tipos de presiones puede deberse a la variación en el relleno vacuolar de Ca^{+}, por lo que la creación de más mutantes de transportadores de calcio podría permitir examinar la importancia de estos componentes en la transducción de señales por calcio (Pittman & Hirschi, 2003).