



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA APLICADA DEL SEGURA



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A

CEBAS-CSIC

Departamento de Nutrición Vegetal

**ABSORCIÓN DE K^+ EN PLANTAS CON
DIFERENTE TOLERANCIA A LA
SALINIDAD**

FERNANDO ALEMÁN GUILLÉN

2009

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a mis directores de Tesis, el Dr. Francisco Rubio Muñoz y el Dr. Vicente Martínez López, su supervisión, apoyo, interés y sobretodo paciencia mostrada durante estos años.

Al **Dr. Antonio Ortiz López** por aceptar la tutoría de esta tesis.

Al **Dr. Manolo Nieves** por haberme “reclutado” para su grupo de investigación y haberme facilitado la obtención de una beca predoctoral, por su ayuda y por su amistad dentro y fuera del laboratorio.

A las personas que he conocido en el CEBAS por su compañía y atención durante mi periodo de doctorando: **Vicente, Fernando** (otro farmacéutico “granaino”), **M^a Ángeles, Salva, Carmen, Laura, Antonio Rafael, Claudia, Paco García, Diana, Lorena, Mario, M^a Luisa, Elena, Asunción, Teresa, Leyanes, Javier, Walter, Bea, Olaya, M^a Carmen, Paco Cabañero, César, María** y muchos otros que por espacio no he incluido aquí.

A la gente que he conocido durante mi estancia en la Universidad de Purdue, en especial, al **Dr. P. Mike Hasegawa**, al **Dr. Jing Bo Jin** y a **Chan Yul Yoo** por su ayuda dentro y fuera del laboratorio, por haberme mostrado la forma “norteamericana” de hacer las cosas e incluso haberme iniciado en la gastronomía y tradiciones del mundo asiático.

A los compañeros del **equipo de fútbol 7** del CEBAS por los buenos momentos que hemos pasado durante el Trofeo Rector y en los partidos amistosos. La lesión de rodilla no empaña los buenos momentos y las fiestas.

Al resto de **becarios** y **personal laboral** del CEBAS por haber contribuido en mayor o menor medida a la realización de esta Tesis Doctoral. Desde el servicio de adquisiciones al de mantenimiento o limpieza.

A todos mis **amigos** y los que me han soportado, especialmente en los procesos más difíciles, porque sé que a veces soy un “pesao” y que me “ahogo en un Eppendorf de agua”. Gracias de verdad.

A mi **familia política**, por disculparme tantos momentos dedicados a este trabajo.

Quiero agradecer especialmente el haber podido realizar esta Tesis Doctoral a **mi familia**. A mis padres **Paco** y **Trini**, por la educación tan acertada que me han dado, y por haberme soportado, en el sentido castellano de la palabra, y también en el anglosajón (=financiado). A mi hermano **Pedro** por haber estado siempre ahí, por el razonamiento crítico del que siempre se aprende y por ser tan buen hermano como lo es él.

A **Lara**, por todo. Por su comprensión, su paciencia, su apoyo, su compañía, su sabiduría, sus consejos, su forma de ser y de pensar, por el equilibrio que me ha dado (y que sin duda necesito), por su dedicación y porque siempre me ha facilitado las cosas haciendo mi vida más feliz a su lado.

*A mi familia, amigos, conocidos, desconocidos
y, en su caso, enemigos, en ese orden*



D. Francisco Rubio Muñoz, Científico Titular del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) del departamento de Nutrición Vegetal y D. Vicente Martínez López, Profesor de Investigación del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) del departamento de Nutrición Vegetal,

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Absorción de K⁺ en plantas con diferente tolerancia a la salinidad”, realizada por D. Fernando Alemán Guillén bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Nutrición Vegetal y que se presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 2 de Septiembre de 2009

Francisco Rubio Muñoz
Científico Titular
CEBAS-CSIC

Vicente Martínez López
Profesor de Investigación
CEBAS-CSIC

PUBLICACIONES

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral se han publicado en los siguientes artículos en revistas científicas:

F. Alemán, M. Nieves-Cordones, V. Martínez, F. Rubio, “*Differential regulation of the HAK5 genes encoding the high-affinity K⁺ transporters of Thellungiella halophila and Arabidopsis thaliana*”, **Environ. Exp. Bot.** **65** (2009) 263–269.

F. Alemán, M. Nieves-Cordones, V. Martínez and F. Rubio “*Potassium/Sodium steady state homeostasis in Thellungiella halophila and Arabidopsis thaliana under long term salinity conditions*”. **Plant Science** **176** (2009) 768–774.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

ADP= Adenosín difosfato.

AKT= Canal de K^+ tipo Shaker.

ATP= Adenosina trifosfato.

ATPasa= Bomba de protones que hidroliza ATP.

CBL= Proteína sensible a calcio similar a Calcineurina-B.

cDNA= DNA complementario.

CIK= Proteína quinasa de interacción con CBL.

CNGC= Canales activados por nucleótidos cíclicos.

Ct= Ciclo umbral de la qPCR.

dATP= Desoxi ATP.

dCTP= Desoxicitosina trifosfato.

DEPC= Dietilpirocarbonato.

dGTP= Desoxiguanosina trifosfato.

DNA= Ácido desoxirribonucleico.

DNAsa= Enzima que degrada DNA.

dNTP= Desoxinucleósidos trifosfato.

DO₆₀₀= Densidad óptica a 600 nm.

dTTP= Desoxitimidina trifosfato.

EST= Marcador de secuencia expresada.

FA= Fosfato de arginina.

GFP= Proteína fluorescente verde.

GORK= Canal de K^+ rectificador de salida.

GUS= Beta-glucuronidasa.

HAK/KUP/KT= Familia de simportadores de $K^+ : H^+$ de alta afinidad.

HKT= Transportador de K^+ (y/o Na^+) de alta afinidad.

ICP= Espectrofotómetro de iones acoplado a plasma.

KAT= Canal de K^+ rectificador de entrada.

KIR/KIRC= Canal de K^+ rectificador de entrada.

K_m = Constante de Michaelis.

KOR/KORC= Canal de K^+ rectificador de salida.

Kup= Transportador de K^+ de bacterias.

LB= Medio de cultivo Luria Bertani.

LCT= Transportador catiónico de baja afinidad

MES= Tampón de ácido 2-morfolino etano sulfónico.

MOPS= Tampón de ácido 3-morfolinopropano sulfónico.

NHX= Antiportador Na^+ / H^+ de tonoplasto.

NORC= Canal iónico no selectivo rectificador de salida.
PCR= Reacción en cadena de la polimerasa.
PEG= Polietilenglicol.
Pi= Fosfato inorgánico.
PPasa= Bomba de protones pirofosfatasa.
PS= Peso seco.
qPCR= PCR cuantitativa.
RACE= Amplificación rápida de extremos de cDNA.
RGR= Tasa de crecimiento relativo.
RNA= Ácido ribonucleico.
RNAsa= Enzima que degrada RNA.
ROS= Especies reactivas de oxígeno.
rpm= Revoluciones por minuto.
RT= Transcripción reversa.
RT-PCR= Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa.
SAR= Tasa de absorción específica.
SD= Medio mínimo para levaduras.
SDS= Dodecil sulfato sódico.
SOS= Antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática. Mutantes hipersensibles a Na^+ (del inglés Salt Overly Sensitive).
SKOR= Canal de K^+ rectificador de salida de la estela.
SKT= Canal de K^+ de patata.
SSC= Tampón de citrato sódico/cloruro sódico.
T-DNA= DNA transferente/transferido.
TRANS= Tasa de transporte específico a la parte aérea.
TRH= Transportador de K^+ de pelos radiculares.
TRK= Transportador de K^+ de alta afinidad de levaduras.
 V_{max} = Velocidad máxima.
YPD= Medio rico para levaduras peptonado.

1	INTRODUCCIÓN	19
1.1	IMPORTANCIA DEL K^+	19
1.1.1	<i>Absorción y transporte</i>	22
1.1.2	<i>Caracterización molecular del transporte de K^+</i>	25
1.1.2.1	Canales de K^+	25
1.1.2.2	Transportadores de K^+	28
1.1.3	<i>Interacción K^+-NH_4^+</i>	32
1.2	EL PROBLEMA DE LA SALINIDAD	33
1.2.1	<i>Efectos causados por la salinidad</i>	33
1.2.2	<i>Mecanismos de tolerancia a la salinidad</i>	35
1.2.3	<i>Relación K^+/Na^+ como factor clave en la tolerancia</i>	39
1.3	ESPECIES MODELO Y TOMATE	41
1.3.1	<i>Especies modelo</i>	41
1.3.2	<i>Tomate</i>	43
1.3.2.1	Origen	44
1.3.2.2	Importancia económica	44
1.3.2.3	Genómica del tomate	46
1.3.2.4	Especies utilizadas en esta Tesis Doctoral	46
2	OBJETIVOS	51
2.1	OBJETIVOS	51
2.1.1	<i>Caracterización fisiológica del transporte de K^+ de baja afinidad en <i>A. thaliana</i> y <i>T. halophila</i> bajo estrés salino</i>	52
2.1.1.1	Efecto de la presencia de Na^+ en la solución de crecimiento sobre la nutrición de K^+ y de otros cationes relevantes como Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} en plantas de <i>A. thaliana</i> y <i>T. halophila</i> crecidas con 1,4 mM K^+	52
2.1.2	<i>Caracterización fisiológica del transporte de K^+ de alta afinidad en <i>A. thaliana</i> y <i>T. halophila</i> y bajo estrés salino</i>	52
2.1.2.1	Caracterización fisiológica del transporte de K^+ de alta afinidad en <i>T. halophila</i> y su inhibición por NH_4^+ o Ba^{2+}	52
2.1.2.2	Efecto de la presencia de Na^+ en la solución de crecimiento sobre la absorción de K^+ y de otros cationes relevantes como Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} en plantas de <i>A. thaliana</i> y <i>T. halophila</i> crecidas con una semana de ayuno de K^+	52
2.1.3	<i>Caracterización molecular del transporte de K^+ de alta afinidad en <i>T. halophila</i></i>	52
2.1.3.1	Aislamiento y caracterización del cDNA completo correspondiente a un gen de la familia de transportadores de K^+ HAK del tipo I: <i>ThHAK5</i>	52
2.1.3.2	Estudio de las condiciones de expresión de <i>ThHAK5</i> frente a estrés salino	52
2.1.3.3	Caracterización de la función de <i>ThHAK5</i> en sistemas de expresión heteróloga	52
2.1.4	<i>Obtención de transportadores de K^+ de alta afinidad más eficientes bajo estrés salino por mutagénesis al azar</i>	52

2.1.5	<i>Caracterización del transporte de K⁺ de alta afinidad en dos variedades de tomate (S. lycopersicum) y otra especie de tomate silvestre (S. pennellii).</i>	53
2.1.5.1	Efecto de los tratamientos con Na ⁺ y NH ₄ ⁺ sobre la absorción de K ⁺ de alta afinidad en las dos variedades de tomate cultivado y la especie silvestre.	53
2.1.5.2	Efecto de los tratamientos con Na ⁺ y NH ₄ ⁺ sobre las concentraciones de K ⁺ y de otros cationes relevantes como Na ⁺ , Ca ²⁺ y Mg ²⁺ .	53
2.1.5.3	Efecto de los tratamientos con Na ⁺ y NH ₄ ⁺ sobre la expresión del gen <i>LeHAK5</i> encargado de la absorción de K ⁺ de alta afinidad.	53
2.2	PLAN DE TRABAJO	53
3	MATERIALES Y MÉTODOS	59
3.1	MATERIALES	59
3.1.1	Material Biológico.	59
3.1.2	Productos químicos y bioquímicos.	59
3.2	MÉTODOS	60
3.2.1	Sistemas de cultivo y condiciones de crecimiento	60
3.2.1.1	Plantas de <i>A. thaliana</i> y <i>T. halophila</i> .	60
3.2.1.2	Plantas de tomate <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. pennellii</i> .	62
3.2.1.3	Bacterias.	65
3.2.1.4	Levaduras.	66
3.2.2	Ensayos de disminución de K ⁺ externo en plantas.	66
3.2.3	Tasas de crecimiento, absorción de cationes y transporte a la parte aérea.	68
3.2.4	Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos.	68
3.2.4.1	Aislamiento de plásmidos.	68
3.2.4.2	Extracción de RNA total de plantas.	69
3.2.4.3	Tratamientos enzimáticos del DNA.	70
3.2.4.4	Clonaje de fragmentos de DNA.	70
3.2.4.5	Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	71
3.2.4.6	Purificación de DNA.	71
3.2.4.7	Hibridación de ácidos nucleicos.	72
3.2.4.8	Síntesis de cDNA.	73
3.2.4.9	Amplificación por PCR de fragmentos de DNA.	74
3.2.4.10	PCR cuantitativa (qPCR).	74
3.2.4.11	Secuenciación de DNA.	75
3.2.4.12	Análisis de hidrofobicidad.	75
3.2.4.13	Alineamiento de secuencias de proteínas y generación del árbol filogenético.	75
3.2.4.14	PCR mutagénica.	75
3.2.5	Transformación de células.	76
3.2.5.1	Transformación de <i>E. coli</i> .	76
3.2.5.2	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> .	77
3.2.6	Ensayos de crecimiento de levaduras en medio sólido.	78
3.2.7	Ensayos de transporte iónico en levaduras.	79
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83

4.1	ESTUDIO DE LA TOLERANCIA A NaCl EN EL RANGO DE LA BAJA AFINIDAD DE ABSORCIÓN DE K ⁺ . COMPARACIÓN DE <i>THELLUNGIELLA HALOPHILA</i> Y <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .	83
4.1.1	<i>Parámetros fisiológicos bajo condiciones control no salinas.</i>	84
4.1.2	<i>Efecto del NaCl en el crecimiento de raíz y parte aérea.</i>	86
4.1.3	<i>K⁺: Concentraciones tisulares, absorción y transporte.</i>	88
4.1.4	<i>Na⁺: concentraciones tisulares, absorción y transporte.</i>	91
4.1.5	<i>Ca²⁺: Concentraciones tisulares, absorción y transporte.</i>	94
4.1.6	<i>Mg²⁺: Concentraciones tisulares absorción y transporte.</i>	94
4.1.7	<i>Discusión.</i>	96
4.2	ESTUDIO DE LA TOLERANCIA A NaCl EN EL RANGO DE LA ABSORCIÓN DE K ⁺ DE ALTA AFINIDAD.	101
4.2.1	<i>Transporte de K⁺ de alta afinidad en T. halophila.</i>	101
4.2.2	<i>Condiciones de cultivo que inhiben del transporte de K⁺ de alta afinidad.</i>	102
4.2.3	<i>Clonaje del gen ThHAK5.</i>	105
4.2.4	<i>ThHAK5 codifica un transportador de K⁺ de alta afinidad.</i>	109
4.2.5	<i>Patrón de expresión del gen ThHAK5.</i>	111
4.2.6	<i>Efecto del crecimiento en presencia de NaCl en el transporte de K⁺ de alta afinidad.</i>	113
4.2.7	<i>Concentraciones iónicas en raíz y parte aérea.</i>	114
4.2.8	<i>Discusión.</i>	117
4.3	OBTENCIÓN DE MUTANTES DEL GEN <i>AtHAK5</i> .	123
4.3.1	<i>Mutagénesis sobre AtHAK5 silvestre.</i>	123
4.3.2	<i>Mutagénesis de AtHAK5 3' (L776H).</i>	125
4.3.3	<i>Discusión.</i>	128
4.4	ESTUDIO DEL TRANSPORTE DE K ⁺ DE ALTA AFINIDAD EN DOS VARIEDADES <i>S. LYCOPERSICUM</i> Y EN <i>S. PENNELLII</i> .	135
4.4.1	<i>Efecto de los tratamientos aplicados en el transporte de K⁺ de alta afinidad.</i>	135
4.4.2	<i>Concentraciones iónicas.</i>	139
4.4.2.1	<i>Concentraciones de K⁺.</i>	139
4.4.2.2	<i>Concentraciones de Na⁺.</i>	142
4.4.2.3	<i>Concentraciones de Ca²⁺ y Mg²⁺.</i>	142
4.4.3	<i>Expresión de LeHAK5.</i>	145
4.4.4	<i>Discusión.</i>	147
5	CONCLUSIONES:	157
6	BIBLIOGRAFÍA	163

1.- INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del K^+ .

El K^+ es un componente imprescindible de las células vivas, y todas deben conservar unos niveles adecuados del mismo para crecer y mantenerse con vida. La selección del K^+ en lugar del Na^+ sucedió al principio de la evolución de la vida desde el medio marino y ha sido conservada con muy pocas excepciones incluso en la mayoría de especies halófilas. El continuo aporte de K^+ a la célula desde el medio marino, en el que la concentración de Na^+ es elevada, ha dado forma a los mecanismos de homeostasis iónica. Esto es también aplicable a las especies terrestres, ya que han evolucionado de las marinas que estaban continuamente bañadas por el líquido del mar (Garcia-deblas, B. y col. 2007, Rodríguez-Navarro, A. 2000).

Las células vegetales siguen el modelo general descrito anteriormente, siendo el K^+ un elemento esencial para las plantas. El K^+ puede suponer hasta el 10 % del peso seco de una planta por lo que es considerado como un macronutriente (Leigh, R. A. y Jones, R. G. W. 1984). En cuanto a las funciones del K^+ en las plantas, éste juega un papel biofísico y bioquímico fundamental. Al estar cargado positivamente y ser tan abundante, es un estabilizador de moléculas cargadas negativamente como los ácidos nucleicos y las proteínas (Figura 1.1). Por otro lado, el mantenimiento general del aparato fotosintético necesita K^+ , y la deficiencia de éste reduce la actividad fotosintética, el contenido de clorofila y la traslocación del carbono fijado (Hartt, C. E. 1969, Pier, P. A. y Berkowitz, G. A. 1987).

El K^+ muestra una alta movilidad en las plantas, traslocándose entre raíz y parte aérea por el xilema y el floema, y dentro de la parte aérea de unas hojas a otras (Karley, A. J. y White, P. J. 2009). El K^+ se acumula en la vacuola, lo que permite los movimientos de la planta, tales como la apertura y cierre de los estomas, el movimiento de las hojas, y otros tropismos de las plantas que se producen por la presión de turgor generada por el K^+ (Maathuis, Frans J. M. y Sanders, Dale 1996, Philippar, K. y col. 1999). La presión osmótica originada por la acumulación de K^+ es también utilizada para conducir la expansión celular y de las hojas (Elumalai, R P. y col. 2002, Maathuis, F. J. M. y Sanders, D. 1996, Ruan, Y. L. y col. 2001). El K^+ también es considerado un

Capítulo 1

osmolito compatible que contribuye al mantenimiento del estado hídrico de la planta, lo que es fundamental en la mayoría de estreses abióticos (Mahouachi, J. y col. 2006).

El K^+ es necesario para las reacciones metabólicas por su capacidad de activar numerosas enzimas (Figura 1.1). *In vitro*, la activación enzimática se lleva a cabo a concentraciones de 50-100 mM de K^+ , unos valores que concuerdan bien con los determinados en el citoplasma celular (Britto, D. T. y Kronzucker, H. J. 2008, Maathuis, F. J. M. y Sanders, D. 1993, Walker, N. A. y col. 1996). La unión del K^+ a las enzimas se realiza en su forma deshidratada, probablemente coordinado con 6 oxígenos que deriven de grupos carboxilo, carbonilo e hidroxilo y moléculas de agua (Maathuis, F. J. M. 2009). Esta unión es muy selectiva por el K^+ y no puede ser sustituida por otros iones similares como el Na^+ o el Li^+ . De entre las enzimas que se activan por K^+ encontramos varias isoformas de la PPasa vacuolar que acumula protones en el lumen de la vacuola. Además hay otras enzimas relacionadas con el metabolismo del carbono como la piruvato quinasa, la fosfofructoquinasa, y la ADP-glucosa almidón sintasa (Marschner, H. 1995). La síntesis de proteínas mediada por el ribosoma es otro proceso clave que requiere altas concentraciones de K^+ (Maathuis, F. J. M. y Sanders, D. 1994, Rodríguez-Navarro, A. y Rubio, F. 2006).

El estatus del K^+ en la planta puede afectar también al metabolismo a través de la regulación transcripcional y postranscripcional de los genes que codifican enzimas metabólicas (Amtmann, A. y Armengaud, P. 2009, Armengaud, P. y col. 2009). También se ha descrito la acumulación de azúcares reductores y la absorción de ácidos orgánicos y aminoácidos cargados negativamente como una consecuencia directa de la deficiencia de K^+ (Amtmann, A. y col. 2008).

Las plantas deben tomar el K^+ desde el suelo a través de las raíces. La corteza terrestre contiene alrededor del 2,6 % de K^+ . En el suelo, la mayoría está deshidratado y coordinado a átomos de oxígeno y por tanto no disponible para las plantas. Éstas deben tomar el K^+ desde la solución del suelo donde las concentraciones del mismo varían entre 0,1 mM y 1 mM de K^+ (Maathuis, F. J. M. 2009). Esto contrasta con la concentración de K^+ en el citoplasma celular que, como se ha visto anteriormente, se mantiene constante en torno a un valor de 100 mM. La elevada demanda de K^+ por parte de la planta ha de estar en consonancia con una eficiente absorción y translocación a la parte aérea. En algunos casos se pueden dar deficiencias de K^+ y las raíces responden mediante dos mecanismos de adaptación. El primero consiste en la activación

de los sistemas de adquisición y movilización del nutriente. El segundo se refiere a procesos del desarrollo de la raíz, lo que incluye aumento de la raíz primaria, formación de raíces laterales y elongación de los pelos radiculares (Jung, J. Y. y col. 2009).

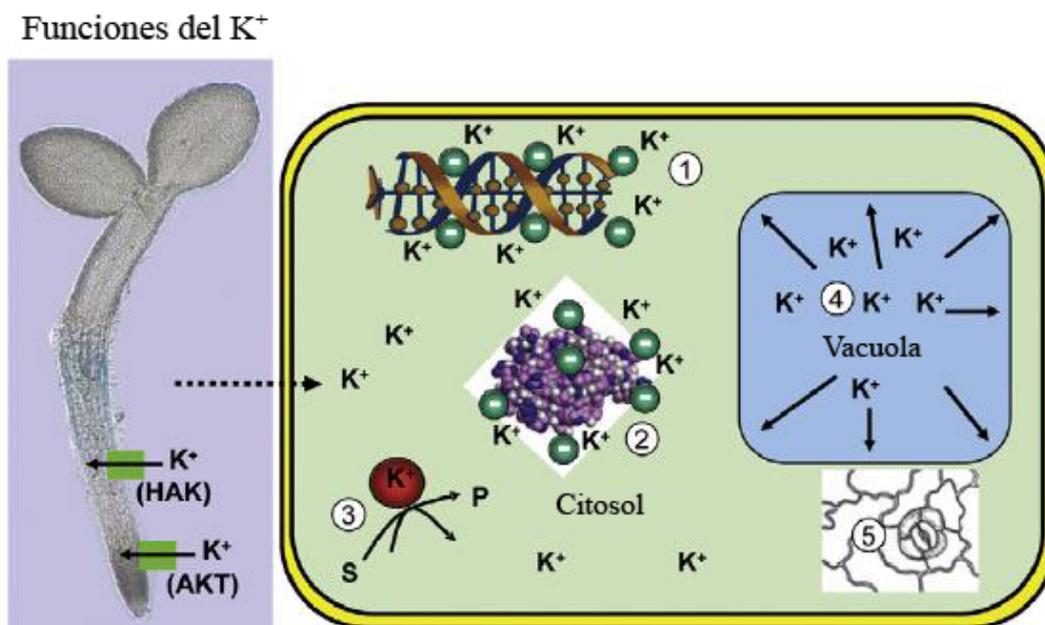


Figura 1.1. *Funciones del K^+ . El K^+ se absorbe a través de los transportadores (HAK) y canales (AKT). Dentro de la planta, las características intrínsecas del K^+ lo hacen idóneo para neutralizar las cargas negativas de los ácidos nucleicos (1) y las proteínas (2). Además, El K^+ activa enzimas específicas (3) actuando como cofactor en reacciones enzimáticas entre el sustrato (S) y el producto (P). Al ser el principal catión en las vacuolas(4), el K^+ genera presión de turgor al arrastrar agua, para proporcionar una estructura definida y conducir la expansión celular el crecimiento de la planta y los movimientos de ésta, como la regulación de la apertura y cierre de los estomas (5). Modificado de Maathuis 2009.*

La deficiencia de K^+ se manifiesta inicialmente como una necrosis que se desarrolla en primer lugar en las puntas y márgenes de las hojas y entre las venas, y que posteriormente se desarrolla hacia la base de la hoja. Ya que el K^+ puede ser movilizado a las hojas jóvenes, estos síntomas aparecen en primer lugar en las hojas viejas (Marschner, H. 1995). Debido al papel vital del K^+ en las células vegetales, las plantas con una deficiencia importante de este nutriente terminan por mostrar una reducción del crecimiento, especialmente de la parte aérea (Amtmann, A. y col. 2004). Las diversas manifestaciones fisiológicas de la deficiencia de K^+ , como la limitada expansión celular,

Capítulo 1

la reducción de la fotosíntesis, y la alteración en la regulación de la transpiración pueden ser fácilmente explicadas por las funciones del K^+ descritas anteriormente, pero en muchos casos es difícil saber cuál de estos procesos celulares dependientes de K^+ es el que está afectado en particular (Amtmann, A. y col. 2004).

1.1.1 Absorción y transporte.

La absorción de K^+ por la raíz se produce a través de los pelos radicales que son células epidérmicas especializadas que aumentan la superficie de contacto con la solución del suelo, así como a través de las células de la epidermis y del córtex de la raíz (Figura 1.2). Una vez que el K^+ ha alcanzado la superficie de la raíz, éste ha de llegar hasta la estela donde se encuentran los vasos xilemáticos y traqueidas. Estos vasos xilemáticos son los encargados del transporte del K^+ hacia la parte aérea, donde nuevamente tendrá que ser conducido a través de los distintos tejidos a todas las células de la planta.

Para llegar a la estela, el K^+ atraviesa los tejidos de la raíz camino del xilema por dos posibles rutas paralelas (Figura 1.2): una de ellas es la denominada ruta apoplástica que es aquella en la que el K^+ circula por el espacio denominado apoplasto, que corresponde a la parte de la planta fuera de la membrana plasmática de las células vivas, es decir, la pared celular y los espacios intercelulares. Esta ruta quedaría impedida al llegar a la banda de Caspary. Esta banda, que se extiende longitudinalmente alrededor de la estela y que está compuesta mayoritariamente de lignina y suberina, ejerce la función de barrera hidrofóbica impermeable en la matriz intercelular, limitando por tanto el paso de K^+ hasta el xilema. La otra ruta es la denominada ruta simplástica, que se denomina así porque transcurre por el simplasto, es decir, el *continuum* del citoplasma interconectado por plasmodesmos y excluyendo las grandes vacuolas de las células vegetales. Ya que en el camino hacia la estela la banda de Caspary impide la ruta apoplástica, la única posibilidad para que el K^+ llegue a los vasos del xilema es por la vía simplástica. Esto implica que en algún punto el nutriente debe atravesar una membrana plasmática. Debido a que la bicapa lipídica es impermeable al K^+ , la entrada de éste en el simplasto se produce a través de proteínas de membrana que constituyen los sistemas de transporte de K^+ . Estos sistemas son fundamentales por lo tanto para la correcta nutrición de las plantas.

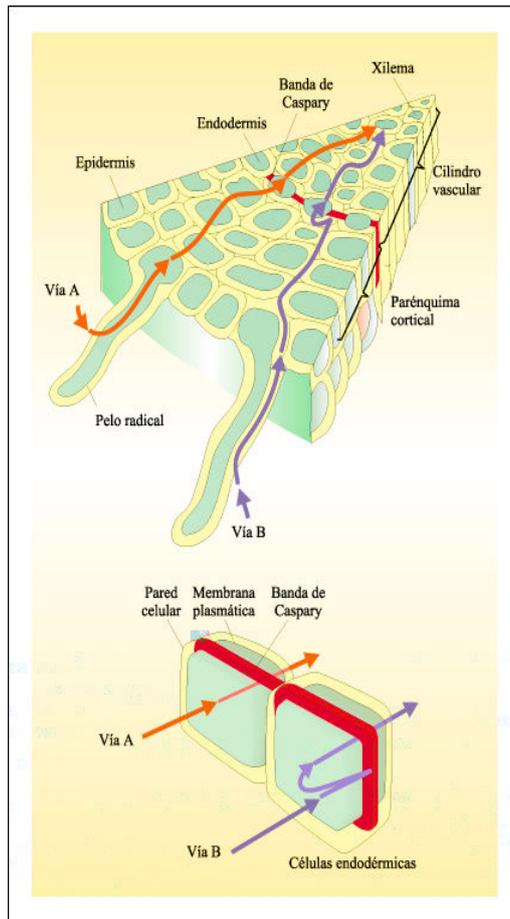


Figura 1.2. Diagrama de un corte transversal de una raíz que muestra las dos vías de absorción de sustancias. La mayor parte de los solutos y parte del agua que entra en la raíz siguen la vía apoplástica (A). Los solutos también pueden entrar al interior de la planta por la vía simplástica (B), y para atravesar la banda de Caspary, tanto el agua como los solutos tienen que ser transportados a través de las membranas celulares de las células endodérmicas

En la década de los 50 Epstein propuso considerar los sistemas de transporte de iones como enzimas y utilizar análisis cinéticos para su estudio (Epstein, E. y Hagen, C. E. 1952). Aplicando el concepto de cinética enzimática para estudiar la absorción de K^+ por la raíz de plantas de cebada y usando Rb^+ como análogo al K^+ observó que la velocidad de absorción de K^+ exhibía una cinética bifásica en respuesta al incremento en la concentración de K^+ en el medio externo (Epstein, E. y col. 1963). Estos estudios pusieron de manifiesto que al menos existían dos sistemas de transporte de K^+ implicados en la absorción del mismo. El primero era un sistema de *alta afinidad* que mostraba una K_m por K^+ de 21 μM , se saturaba a concentraciones de K^+ en el rango micromolar, era selectivo por K^+ y Rb^+ , y no se veía prácticamente afectado por el Na^+ . El segundo era un sistema de *baja afinidad*, que mediaba la absorción de K^+ a

Capítulo 1

concentraciones más altas de este catión, mostraba una K_m por K^+ de 11,4 mM, era saturable y se inhibía por Na^+ (Epstein, E. y col. 1963) (Figura 1.3). Esta cinética bifásica se ha descrito posteriormente en otras especies vegetales y parece ser un modelo universal. Sin embargo algunas especies muestran diferencias en el sistema de transporte de baja afinidad. Mientras que en cebada el componente de la baja afinidad se satura a concentraciones milimolares de K^+ , Kochian y Lucas en 1982 (Kochian, L. V. y Lucas, W. J. 1982) encontraron que en maíz este componente era lineal.

Para explicar la cinética bifásica descrita por Epstein en 1963 se propone la existencia de dos sistemas de transporte, o más, actuando en paralelo (Welch, R. M. y Epstein, E. 1968). La absorción en el rango de la alta afinidad, o mecanismo I, se supone mediada por un transportador del tipo simporte K^+/H^+ mientras que el mecanismo II, o de baja afinidad, parece estar mediado por canales de K^+ rectificadores de entrada (Maathuis, F. J. y col. 1997b).

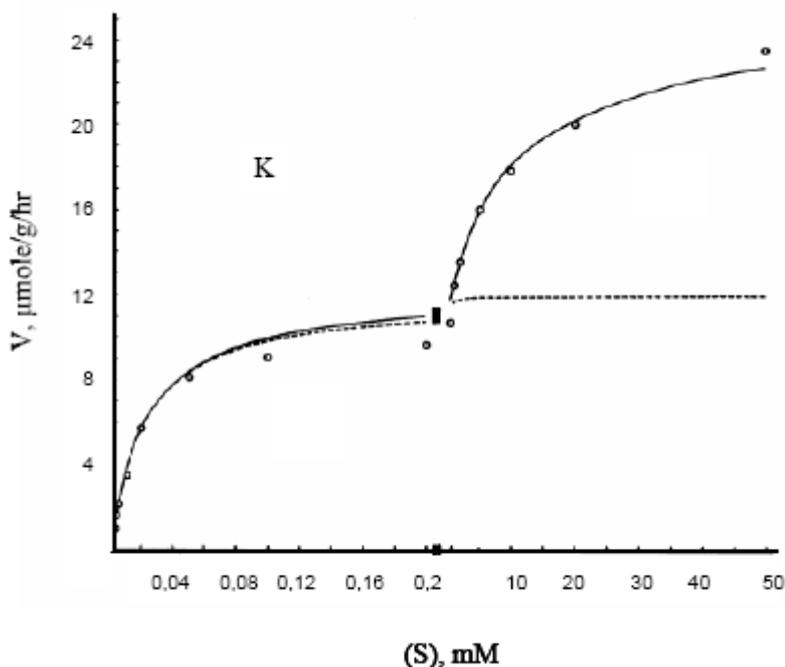


Figura 1.3. La absorción de K^+ por raíces de cebada sigue una cinética bifásica en la cual el primer componente muestra una absorción en el rango micromolar denominada de alta afinidad y un segundo componente con una absorción predominante en el rango de concentraciones milimolares denominada de baja afinidad. Modificado de Epstein 1963.

Para la caracterización del mecanismo implicado en la entrada de K^+ de alta afinidad ha sido de gran utilidad el empleo del hongo *Neurospora crassa*. Las células de los organismos eucariotas con pared celular, como son las de los hongos y las plantas, comparten muchas de sus características. En ambas, la energética de la membrana plasmática se basa en la creación de un gradiente electroquímico de H^+ mediante una bomba de H^+ que hidroliza ATP. Dicho gradiente es utilizado posteriormente para el transporte de solutos en contra de sus gradientes electroquímicos. En *N. crassa* los estudios electrofisiológicos y de transporte iónico permitieron demostrar que la entrada de K^+ de alta afinidad estaba mediada por un simporte K^+/H^+ de estequiometría 1:1 (Rodríguez-Navarro, A. y col. 1986). En *Arabidopsis thaliana* también se ha postulado la existencia de un mecanismo similar para la entrada de K^+ de alta afinidad (Maathuis, F. J. M. y Sanders, D. 1994). Este mecanismo permitiría a los hongos y las plantas absorber K^+ en contra de altos gradientes de concentración, lo que no sería posible a través de canales.

1.1.2 Caracterización molecular del transporte de K^+ .

La identificación de los genes implicados en la absorción de K^+ comenzó en los años 90 mediante la complementación funcional en *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura posee dos genes importantes para la absorción de K^+ , *TRK1* y *TRK2*, los cuales codifican transportadores que hacen posible el suministro de K^+ y el crecimiento de ésta a concentraciones micromolares de K^+ externo. Se han empleado con mucha frecuencia levaduras que tienen interrumpidos ambos genes para el estudio de canales y transportadores de K^+ de plantas.

1.1.2.1 Canales de K^+ .

En 1992, la complementación funcional en una levadura mutada en *TRK1* con una genoteca de cDNA de *A. thaliana* permitió el aislamiento de dos cDNAs, *AKT1* y *KAT1* (Schachtman, D. P. 1992, Sentenac, H. y col. 1992). Las proteínas deducidas de la secuencia de estos cDNAs mostraron gran homología con canales de K^+ de la familia Shaker de *Drosophila melanogaster*. La expresión en oocitos de *Xenopus laevis* demostró que *KAT1* funcionaba como un canal de K^+ rectificador de entrada con alta permeabilidad al K^+ , moderada al Rb^+ y baja a Cs^+ , Na^+ y Li^+ . La expresión en células de insecto mostró que *AKT1* era también un canal de K^+ (Gaymard, F. y col. 1996).

Capítulo 1

Tanto AKT1 como KAT1 se sugirió que podrían participar en el aporte de K^+ a largo plazo (Gaymard, F. y col. 1996, Schachtman, D. P. 1992) y por lo tanto eran buenos candidatos para mediar el transporte de K^+ de baja afinidad.

Posteriormente se clonaron otros genes que codifican canales de K^+ en *A. thaliana*. Respecto a las funciones de estos canales se puede decir que *KAT1* y *KAT2* y los canales de K^+ rectificadores de salida GORK participan en la apertura y cierre del poro de los estomas, y los canales SKOR, que están implicados en la carga de K^+ en el xilema, juegan un rol importante en la translocación de K^+ a la parte aérea (Lebaudy, A. y col. 2007, Maser, P. y col. 2001, Very, A. A. y Sentenac, H. 2003).

En 1998, se demostró que la pérdida de función de AKT1 en *A. thaliana* reducía el crecimiento de la planta incluso a una concentración externa de 10 μ M de K^+ en el ecotipo Wassilewskija (Hirsch, R. E. y col. 1998). Este estudio se llevó a cabo usando el mutante de inserción de T-DNA, *akt1-1*, y arrojó algunas dudas sobre la idea tradicional de que la absorción de K^+ en el rango de la alta afinidad era llevada a cabo exclusivamente por transportadores. Las membranas plasmáticas de las células de la raíz del mutante *akt1-1* mostraron despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ externo menores que en las plantas silvestres, en el rango de 10 a 1000 μ M. Analizando el efecto del NH_4^+ externo en el transporte de K^+ en el rango de alta afinidad en el mutante *akt1-1* y en plantas silvestres del ecotipo Wassilewskija, aparecieron dos componentes (Spalding, E. P. y col. 1999). El primer componente, que era insensible al NH_4^+ externo, fue en gran parte reducido en el mutante *akt1-1* y se pensó que estaba mediado por AKT1. El segundo componente, que era sensible al NH_4^+ externo, no fue afectado por la mutación en AKT1 y se pensó que estaba mediado por proteínas diferentes. Este componente sensible a NH_4^+ era activado por una acidificación del medio externo o por la adición de 2 mM de Na^+ en las raíces del mutante *atakt1-1*.

El nivel de transcripción de *AKT1* es insensible a las concentraciones de K^+ externo (Lagarde, D. y col. 1996), sin embargo la actividad del canal parece estar regulada por fosforilación. En condiciones de ayuno de K^+ , se registra una señal de Ca^{2+} por los sensores de Ca^{2+} CBL1 y CBL9 (proteínas similares a la Calcineurina-B, del inglés, Calcineurin-B Like proteins) que activan la proteína quinasa CIPK23 (Proteína quinasa de interacción con CBLs, del inglés, CBL-Interactin Protein Kinase). Ésta fosforila a AKT1 e incrementa la absorción de K^+ a través de este canal (Cheong, Y. H. y col. 2007, Li, L. y col. 2006, Luan, S. y col. 2009, Xu, J. y col. 2006).

Tras el clonaje de *AtAKT1*, siguió el de varios cDNAs que codifican canales de K^+ de otras especies. Éste es el caso de *SKT1* de patata (Zimmermann, S. y col. 1998), *LKT1* de tomate (Hartje, S. y col. 2000), *TaAKT1* de trigo (Buschmann, P. H. y col. 2000), *Kdc1* de zanahoria (Downey, P. y col. 2000), *CaAKT1* de pimiento (Martinez-Cordero, M. A. y col. 2005) y *NKT1* de tabaco (Sano, T. y col. 2007).

SKT1 fue inicialmente caracterizado en células de insecto (Zimmermann, S. y col. 1998) y se ha determinado que el gen que lo codifica se expresa principalmente en la epidermis de hoja y en raíz. El gen que codifica LKT1 se expresa a altos niveles en los pelos radiculares y a pesar de la importante homología con SKT1, presenta diferencias al ser expresado en oocitos de *Xenopus*, como por ejemplo en los potenciales de activación de cada uno de ellos. La diferencia principal de *TaAKT1* en relación con otros canales fue el incremento de su expresión tras un periodo de ayuno de K^+ (Buschmann, P. H. y col. 2000).

Otro cDNA de *A. thaliana*, *AtKCl*, que codifica una proteína con gran homología con los canales de K^+ , se clonó pero nunca mostró corrientes iónicas al expresarlo por sí solo en sistemas de expresión heteróloga (Reintanz, B. y col. 2002). Sin embargo, un mutante de *A. thaliana* con este gen interrumpido mostró alteraciones en la absorción de K^+ , como un movimiento positivo en la curva I/V de alrededor de 50 mV, y cinéticas de activación más rápidas al compararlas con el silvestre. *AtKCl* está fuertemente expresado en raíces (Reintanz, B. y col. 2002) y se sobreexpresa por estrés salino en la parte aérea (Pilot, G. y col. 2003). Cuando *AtKCl* se coexpresa junto a *AtAKT1* en protoplastos de mesófilo de tabaco se observa un cambio en el umbral de activación hacia valores más negativos (Duby, G. y col. 2008), permitiendo a las células regular la conductancia de su membrana en respuesta a cambios en las concentraciones externas de K^+ , y por tanto impidiendo que AKT1 medie en la salida de K^+ (Geiger, D. y col. 2009).

En 2002, Wang y col. identificaron un EST de tomate con notable homología a *AtKCl* y *Kdc1*. Ese EST se llamó *LeKCl* y se ha observado que los niveles de su transcrito se incrementan tras el ayuno de K^+ , Pi y Fe (Wang, Y. H. y col. 2002) y tras el suministro de NO_3^- seguido a un periodo de ausencia de NO_3^- (Wang, Y. H. y col. 2001).

Capítulo 1

1.1.2.2 Transportadores de K⁺.

En 1994, usando la complementación en una levadura *trk1⁻, trk2⁻*, fue aislado un nuevo cDNA de trigo, *TaHKT1* (Schachtman, D. P. y Schroeder, J. I. 1994). Este cDNA codificaba una proteína homóloga a los transportadores TRK de levadura. Expresándolo en levadura y oocitos de *Xenopus*, se observó que TaHKT1 transportaba K⁺ en el rango de la alta afinidad y estaba acoplado al simporte de Na⁺ (Rubio, F. y col. 1995), además de transportar Na⁺ en el rango de la baja afinidad. Este transportador fue el primero caracterizado como transportador de K⁺ de alta afinidad en plantas, aunque estudios posteriores han mostrado que, en general, los transportadores HKT de diferentes especies están implicados en el transporte de Na⁺ desde la solución externa y en los movimientos de Na⁺ dentro de la planta a través de la carga y descarga del xilema y floema (Berthomieu, P. y col. 2003, Golldack, D. y col. 2002, Haro, R. y col. 2005, Horie, T. y col. 2001, Horie, T. y col. 2007, Laurie, S. y col. 2002, Rus, A. y col. 2001, Rus, A. y col. 2004, Sunarpi y col. 2005, Uozumi, N. y col. 2000).

En 1995 se describió, en *Schwanniomyces occidentalis*, un transportador de K⁺ de alta afinidad, SoHAK1. (Bañuelos, M. A. y col. 1995a). Este transportador era homólogo al transportador Kup de *Escherichia coli* y fue caracterizado funcionalmente en el doble mutante *trk1⁻, trk2⁻* de *S. cerevisiae*. En este sistema heterólogo de expresión, SoHAK1 mediaba transporte de K⁺ de alta afinidad, no discriminaba entre K⁺ y Rb⁺ y era capaz de concentrar el K⁺ más de 6 órdenes de magnitud. Considerando las características cinéticas de SoHAK1 era probable que un homólogo de plantas de este transportador fuera el responsable del transporte de K⁺ de alta afinidad de las mismas. Para comprobar esta hipótesis, se diseñaron cebadores degenerados de las regiones conservadas entre *SoHAK1* y *kup* para llevar a cabo experimentos de RT-PCR con el objetivo de encontrar un homólogo a estos transportadores en plantas. Como resultado, en 1997, se clonó un cDNA de cebada, *HvHAK1* (Santa-María, G. E. y col. 1997). La traducción del cDNA mostró homología con los transportadores de K⁺ de *E. coli* y *S. occidentalis*. La expresión en levadura de HvHAK1 demostró que era un transportador de K⁺ de alta afinidad, que no discriminaba entre K⁺ y Rb⁺ y que era inhibido por Na⁺ y NH₄⁺. Recientemente se ha observado que la fosfatasa PPZ1 y las quinasas HAL4 y 5 controlan el transporte de Rb⁺ mediado por HvHAK1 en células de levadura (Fulgenzi, F. R. y col. 2008), lo que representa un posible mecanismo de regulación postraduccional de este tipo de transportadores en plantas.

Al mismo tiempo, se identificaron transportadores similares en *A. thaliana* llamados AtKT1, AtKT2, AtKT3 y AtKT4 (Quintero, F. J. y Blatt, M. R. 1997). Posteriormente, los mismos transportadores fueron aislados por dos grupos diferentes (Fu, H. H. y Luan, S. 1998, Kim, E. J. y col. 1998) y se llamaron AtKUP1, AtKUP2, AtKUP3 y AtKUP4. AtKUP1, idéntico a AtKT1, se caracterizó en bacterias y en suspensiones celulares de *A. thaliana* que sobreexpresaban *AtKUP1* (Kim, E. J. y col. 1998) mostrándose como un transportador de K^+ de baja afinidad.

En el año 2000, se aisló otro cDNA de *A. thaliana*, *AtHAK5*, cuya proteína mostró gran homología con HvHAK1, y que al ser expresado en levadura exhibía un transporte de K^+ de alta afinidad que no discriminaba entre K^+ , Rb^+ y Cs^+ (Rubio, F. y col. 2000). Mediante fusiones del promotor de *AtHAK5* al gen delator GUS se observó que el gen se expresaba en la epidermis, el córtex y la estela de raíces de plantas ayunadas de K^+ y mediante fusiones con GFP en la epidermis y la estela de la raíz (Gierth, M. y col. 2005). También se ha descrito que la expresión de *AtHAK5* puede estar mediada por etileno y por especies reactivas de oxígeno (Jung, J. Y. y col. 2009, Shin, R. y Schachtman, D. P. 2004).

En el artículo de Rubio y col., 2000, se describe un análisis filogenético para dilucidar la distribución de los diferentes miembros de la familia de transportadores de K^+ KT/HAK/KUP. Este análisis propuso la existencia de 4 grupos (Figura 1.5). El grupo 1 incluía a los transportadores de K^+ de alta afinidad como el HvHAK1 de cebada (Santa-María, G. E. y col. 1997), o *AtHAK5* de *A. thaliana* (Rubio, F. y col. 2000). El grupo 2 englobaba a KT1/KUP1 (Fu, H. H. y Luan, S. 1998, Kim, E. J. y col. 1998, Quintero, F. J. y Blatt, M. R. 1997) y a KT2/KUP2 de *A. thaliana* (Kim, E. J. y col. 1998, Quintero, F. J. y Blatt, M. R. 1997). El grupo 3 incluía secuencias genómicas de *A. thaliana* y el grupo 4 una secuencia traducida de cDNA incompleto de arroz, que fue posteriormente completado, aunque no se conoce todavía la función de los transportadores de los grupos 3 y 4.

Tras el clonaje de *AtHAK5*, se identificaron varios genes que codifican transportadores de K^+ de la familia KT/HAK/KUP en otras especies de plantas como: 17 genes en arroz (Bañuelos, M. A. y col. 2002), *GsKT1* en algodón (Ruan, Y. L. y col. 2001), *LeHAK5* en tomate (Nieves-Cordones, M. y col. 2008, Nieves-Cordones, M. y col. 2007, Wang, Y. H. y col. 2001, Wang, Y. H. y col. 2002), *CnHAK1* y *CnHAK2* en *Cymodocea nodosa* (Garcia-deblas, B. y col. 2002), 4 genes de *Mesembrianthemum*

Capítulo 1

crystallinum (Su, Hua y col. 2002), *LjKUP* en *Lotus japonica* (Desbrosses, G. y col. 2004), *VvKUP1* y *VvKUP2* en *Vitis vinifera* (Davies, Christopher y col. 2006), *AlHAK* en *Aeluropus littoralis* (Su, Qiao y col. 2007), 5 genes en *Phragmites Australis* (Takahashi, R. y col. 2007, Takahashi, Ryuichi y col. 2007), *CaHAK1* en pimiento (Martínez-Cordero, M. A. y col. 2004), *NrHAK1* en *Nicotiana rustica* (Guo Z.K. y col. 2008) y 4 genes de la familia HAK en *Physcomitrella patens* (Garcia de Blas, B. y col. 2007).

Estos transportadores parecen cumplir diferentes funciones fisiológicas. Por ejemplo, *GsKT1*, junto a un transportador de glucosa está implicado en la elongación de la fibra en el algodón (Ruan, Y. L. y col. 2001), y *VvKT1* y *VvKT2* participan en el crecimiento de los frutos de uva (Davies, C. y col. 2006). Ambos tipos de transportadores inducen un importante influjo de agua a las células a causa de la absorción de K^+ , lo que desemboca en el incremento del tamaño celular. Se le puede atribuir un papel similar a *AtKT2/AtKUP2* ya que una mutación puntual en este gen provoca defectos en el desarrollo de la planta y un hipocotilo más corto (Elumalai, R. P. y col. 2002).

TRH1 también conocido como *AtKT3/AtKT4*, probablemente crea gradientes de K^+ en las células apicales de la raíz que facilitan el transporte de auxinas (Rigas, S. y col. 2001, Vicente-Agullo, F. y col. 2004). La interrupción de este gen produjo fenotipos del desarrollo tales como disminución de la elongación de los pelos radiculares y un comportamiento gravitrópico alterado.

Los transportadores HAK se han relacionado también con el estrés salino. Por ejemplo, la expresión en la raíz de *PhaHAK5* se ha relacionado con la sensibilidad a la sal de *P. australis* (Takahashi, R. y col. 2007). Por el contrario, la expresión en la raíz de otro transportador de la familia HAK, *PhaHAK2*, se relacionó con la tolerancia a la salinidad de *P. australis* (Takahashi, R. y col. 2007). En la planta *M. crystallinum*, se observó un incremento de los niveles de transcripción de algunos miembros de esta familia instantes después de aplicar un tratamiento salino elevado (Su, H. y col. 2002). También se ha observado una sobreexpresión del *HvHAK1* de cebada a las 6 horas de aplicar un estrés salino de 100 mM de NaCl, efecto que desapareció a las 48 horas (Fulgenzi, F. R. y col. 2008), lo que podría estar más correlacionado con el efecto osmótico de la salinidad.

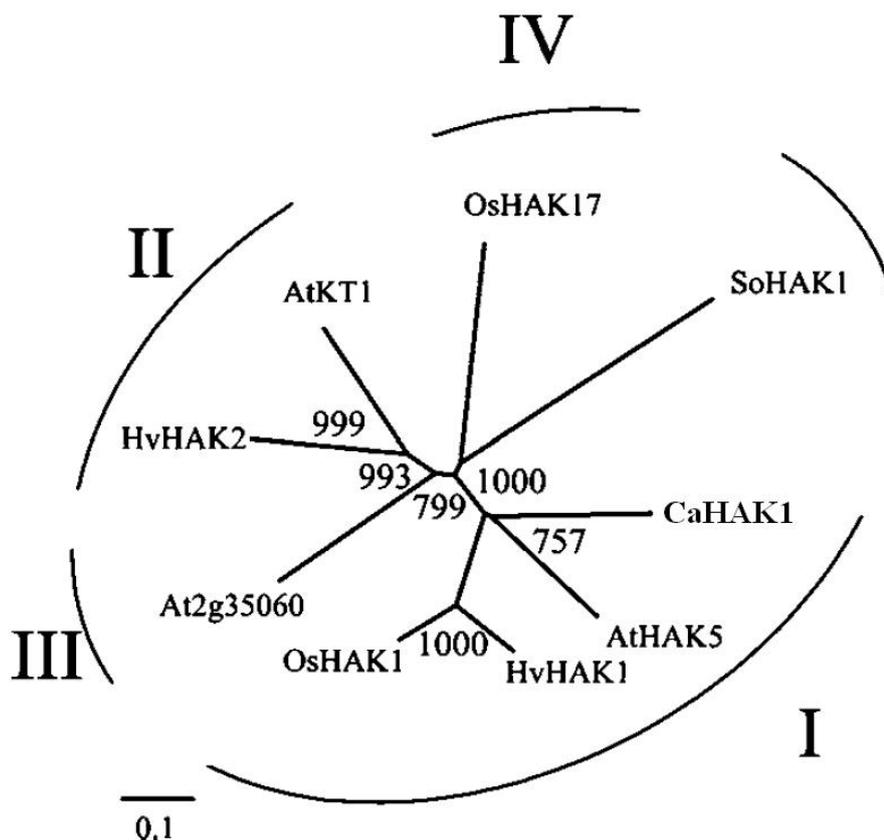


Figura 1.5. *Árbol filogenético representativo de los transportadores de K^+ de la familia HAK. Los transportadores de cebada, arroz, A. thaliana, pimienta y el hongo S. occidentalis están incluidos. Los números romanos representan los cuatro grupos filogenéticos identificados para la familia. La barra de escala representa la distancia equivalente a 10 cambios por cada 100 aminoácidos. Los valores indican el número de veces de cada 1000 árboles calculados en los que la rama se debe colocar en ese lugar. Números de acceso: CaHAK1, AY560009; AtHAK5, AF129478; HvHAK1, AF025292; OsHAK1, AJ427970; HvHAK2, AF129479; AtKT1, AF012656; OsHAK17, AJ427975; SoHAK1, U22945. Tomado de Martínez-Cordero y col., 2004.*

Por otro lado, los transportadores del grupo I de la familia KT/HAK/KUP (Figura 1.5) como HvHAK1, OsHAK1, AtHAK5, CaHAK1 o LeHAK5 están probablemente implicados en la absorción de K^+ de alta afinidad y los genes que los codifican se sobreexpresan cuando se suprime el aporte de K^+ (Rodríguez-Navarro, A. y Rubio, F. 2006). Todos estos transportadores muestran unas características cinéticas de transporte de K^+ al expresarlos en levadura similares a las mostradas por las respectivas plantas. Esto indica que estos transportadores median la absorción de K^+ de alta afinidad en las raíces o, al menos, son los componentes principales de esta absorción (Rodríguez-Navarro, A. y Rubio, F. 2006). Estudios con líneas de inserción de T-DNA en *AtHAK5*

han permitido demostrar que este transportador contribuye en gran medida al transporte de K^+ de alta afinidad en *Arabidopsis*, siendo el responsable del componente sensible al NH_4^+ (Gierth, M. y col. 2005, Rubio, F. y col. 2008).

1.1.3 Interacción K^+ - NH_4^+ .

Uno de los factores importantes que regulan las relaciones del estado nutricional del K^+ es la forma química en que se encuentra el nitrógeno (N) del medio, ya sea predominantemente como NH_4^+ o como NO_3^- (Szczerba, M. W. y col. 2008). El NH_4^+ se ha mostrado especialmente relevante en este sentido, ya que tanto el K^+ como el NH_4^+ comparten algunas características como la carga positiva, el diámetro del ion hidratado y el efecto sobre el potencial eléctrico de membrana (Wang, M. Y. y col. 1994). Estas similitudes hacen que ambos cationes compitan, y que la nutrición de K^+ se vea afectada negativamente especialmente cuando el NH_4^+ se encuentra a elevadas concentraciones (>1 mM) y el K^+ a bajas concentraciones (<1 mM) (Britto, D. T. y col. 2001, Britto, D. T. y Kronzucker, H. J. 2002, Szczerba, M. W. y col. 2008). Y al contrario, aumentando la concentración externa de K^+ se pueden disminuir los efectos tóxicos del NH_4^+ (Szczerba, M. W. y col. 2009). Aunque el NH_4^+ necesita menos energía que el NO_3^- para ser asimilado por las plantas, éste puede ser tóxico si es suministrado como la única fuente de N (Britto, D. T. y col. 2001), en parte por la inhibición de la absorción de K^+ .

Los mecanismos moleculares por los cuales el NH_4^+ inhibe la absorción radicular de K^+ de alta afinidad han sido desconocidos hasta la caracterización de los transportadores del tipo HAK1. La marcada inhibición del transporte mostrada por éstos, debida a la presencia de NH_4^+ externo al ser expresados en levadura, constituyeron una evidencia del papel de los mismos en el componente sensible a NH_4^+ de la absorción de alta afinidad de K^+ en raíces intactas (Bañuelos, M. A. y col. 2002, Martínez-Cordero, M. A. y col. 2004, Rodríguez-Navarro, A. y Rubio, F. 2006, Rubio, F. y col. 2008, Santa-María, G. E. y col. 1997, Spalding, E. P. y col. 1999). Por otra parte, los estudios con mutantes de inserción *athak5* han demostrado que este transportador es el responsable de la absorción de K^+ de alta afinidad sensible a NH_4^+ (Rubio, F. y col. 2008). Además, la inducción por ayuno de K^+ de los genes que codifican estos transportadores se ve afectada por el crecimiento en presencia de NH_4^+ . Este efecto parece depender de la especie porque mientras que en *Arabidopsis* o

pimiento el NH_4^+ reduce la expresión de estos genes, en tomate tiene un efecto contrario (Martinez-Cordero, M. A. y col. 2005, Nieves-Cordones, M. y col. 2007, Rubio, F. y col. 2008).

1.2 El problema de la salinidad.

La salinidad es uno de los principales estreses abióticos que afectan al crecimiento, rendimiento y calidad de los cultivos agrícolas, limitando con ello la producción de alimentos de origen vegetal (Aktas, H. y col. 2005, Cramer, G. R. 2002, Hasegawa, P. M. y col. 2000, Serrano, R. y col. 1999, Zhu, J. K. 2001). Este problema es especialmente importante en las zonas áridas o semiáridas, como el sureste español, en donde la escasez de recursos hídricos hace necesaria la utilización de aguas de baja calidad para el riego. El continuo aporte de sales con las aguas de riego y las altas tasas de evapotranspiración de agua originan la acumulación de sales en los suelos agrícolas. Se calcula que más de un tercio de los regadíos de todo el mundo están afectados por este problema de salinización secundaria. A nivel mundial hay más de 800 millones de hectáreas afectadas por la salinidad, lo que supone más del 6% del área total de la superficie terrestre (Munns, R. y Tester, Mark 2008), y en España alrededor de 2,4 millones de hectáreas (FAO, 2008; <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic2.htm>). El informe de la FAO 2008 también expone que de las 230 millones de hectáreas de tierras cultivadas, 45 millones (20%) están afectadas por la salinidad. Ya que la mayor parte de los cultivos son glicofitos la salinidad ocasiona pérdidas importantísimas en las explotaciones agrícolas, o directamente imposibilita la agricultura en extensas zonas.

1.2.1 Efectos causados por la salinidad.

Los principales iones que contribuyen a la salinidad son los cloruros, sulfatos, carbonatos, sodio, calcio y magnesio, siendo el NaCl la sal más abundante. La sal disuelta en el agua del suelo produce dos efectos sobre las plantas: un efecto osmótico y un efecto específico. El efecto osmótico es consecuencia del bajo potencial hídrico de las soluciones con altas concentraciones de sales, que dificulta la entrada de agua a la planta. El efecto específico es debido a la acumulación excesiva de sales en los tejidos de la planta, que da lugar a toxicidad por las altas concentraciones de los iones, desequilibrios nutricionales y estrés oxidativo (Figura 1.6).

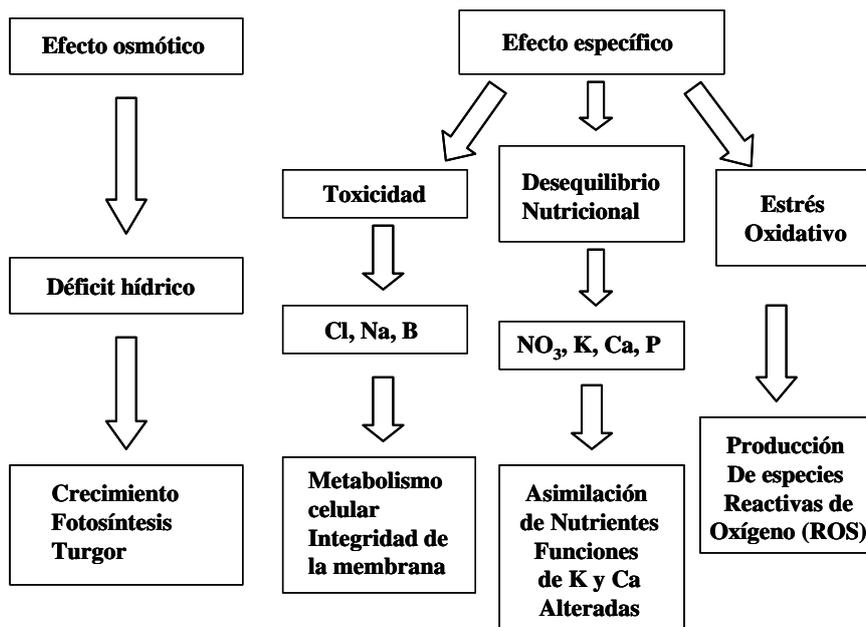


Figura 1.6. Efectos causados por la salinidad. Se observa la distinción entre el efecto osmótico sobre el potencial hídrico de la planta, y el efecto específico propio de los iones tóxicos que se acumulan.

- Efecto osmótico:** El agua es transportada desde el exterior de la planta hacia el sistema vascular por medio de la vía apoplástica y simplástica. La vía simplástica es directamente sensible a elevadas concentraciones salinas en el exterior ya que un estrés hiperosmótico va disminuyendo la diferencia de potencial hídrico entre el medio salino y el citosol hasta que se igualan y cesa la toma neta de agua por esta vía. La vía apoplástica no está directamente afectada por el medio salino y probablemente es capaz de continuar funcionando hasta que se pare la transpiración, permitiendo al agua (y las sales disueltas) entrar a la planta. Sin embargo, en condiciones salinas la planta cierra los estomas para limitar la pérdida de agua. Por lo tanto la entrada de agua por la vía del apoplasto también se ve disminuida. Con las vías de entrada de agua bloqueadas por la salinidad, las células pierden turgencia, lo que a su vez restringe la expansión celular y ralentiza el crecimiento de la planta provocando finalmente el marchitamiento.

- Efecto específico:** Como se dijo anteriormente el NaCl es la sal más abundante en condiciones de salinidad y la acumulación de Na^+ y Cl^- dar lugar a problemas de toxicidad. La mayor parte de las especies cultivadas son sensibles a la

acumulación de altas concentraciones de Na^+ , aunque hay ejemplos, como los cítricos, que presentan una mayor sensibilidad al Cl^- .

Cuando la concentración de sales en el medio externo es alta, aumenta la competencia entre los iones, pudiendo producirse deficiencias nutritivas importantes al perturbarse los equilibrios iónicos de elementos nutritivos (Greenway, H. y Munns, R. 1980, Pasternak, D. 1987). El desplazamiento del Ca^{2+} por el Na^+ en las posiciones de intercambio de las membranas y paredes celulares altera la permeabilidad de las mismas y dificulta la homeostasis iónica en general (Lynch, J. y Lauchli, A. 1984).

Uno de los efectos más importante de las altas concentraciones de Na^+ es el desplazamiento del K^+ en sus funciones, ya que ambos iones muestran gran similitud química. El primer punto de interacción entre el Na^+ y el K^+ es en la entrada de estos iones al simplasto de la raíz. Por una parte, las altas concentraciones de Na^+ inhiben directamente los sistemas de entrada de K^+ . Por otra, el Na^+ da lugar a una despolarización del potencial eléctrico de la membrana, disminuyendo la entrada de K^+ . En consecuencia, en condiciones salinas se pueden dar situaciones de deficiencia de K^+ , como se ha observado en plantas de maíz, melón y pimiento (Botella, M. A. y col. 1997, Kaya, C. y col. 2007, Kaya, C. y Higgs, D. 2003). Por otro lado, el Na^+ entra en la célula, lo que disminuye la relación K^+/Na^+ del citoplasma, y los procesos metabólicos que dependen del K^+ se ven afectados negativamente.

Otro efecto específico de la salinidad es la aparición de estrés oxidativo. La disminución de la fotosíntesis debida a la salinidad aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la actividad de las enzimas encargadas de neutralizar las mismas, como la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa y otras peroxidases, y la catalasa (Apel, K. y Hirt, H. 2004, Munns, R. y Tester, Mark 2008). Las plantas se adaptan cambiando la morfología de la hoja, la composición de los pigmentos de los cloroplastos, y la actividad de procesos bioquímicos que previenen el daño oxidativo.

1.2.2 Mecanismos de tolerancia a la salinidad.

Las distintas especies de plantas difieren ampliamente en la tolerancia a la salinidad (Greenway, H. y Munns, R. 1980). En función de la misma, las plantas se han clasificado en halofitas y glicofitas (Figura 1.7) presentando diversos comportamientos y mecanismos de adaptación al estrés salino.

Capítulo 1

Las plantas halofitas extremas tienen un desarrollo óptimo a concentraciones relativamente elevadas de NaCl en el medio. Por otra parte, las plantas glicofitas tienen una capacidad relativamente limitada para adaptarse a la presencia de sales y su desarrollo es fuertemente reducido a niveles relativamente bajos de las mismas (Figura 1.7). La sensibilidad de los cultivos a la salinidad del medio generalmente cambia de un estado de desarrollo vegetativo a otro. Dependiendo de la especie, las plantas pueden ser más sensibles durante las primeras etapas del desarrollo que durante las etapas reproductivas. En general, la germinación es la etapa más tolerante a la salinidad.

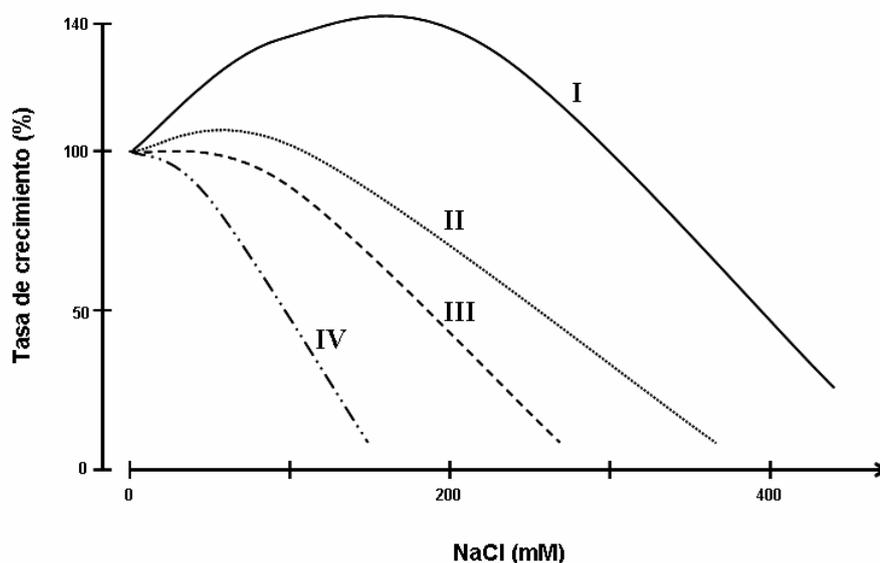


Figura 1.7. Efecto de la salinidad del sustrato sobre el desarrollo relativo de varias especies vegetales desde (I) halofitas extremas hasta (IV) verdaderas glicofitas (Greenway y Munns, 1980)

En respuesta al bajo potencial osmótico de la solución en condiciones salinas, las plantas deben ajustarse osmóticamente para evitar la pérdida de agua. Para ello acumulan iones inorgánicos o sintetizan compuestos orgánicos de forma que se disminuya el potencial osmótico en la célula, o mediante una combinación de ambos métodos. El balance osmótico en el citoplasma se consigue por acumulación de solutos que no inhiban procesos metabólicos, llamados osmolitos compatibles (Hasegawa, P. M. y col. 2000). Dentro de éstos encontramos azúcares (principalmente glucosa y fructosa), polialcoholes (glicerol, inositoles metilados), azúcares complejos (trehalosa, rafinosa, fructanos), iones (K^+), metabolitos cargados (glicina, betaína) y aminoácidos como la prolina. Algunas halofitas pueden acumular grandes cantidades de sales

inorgánicas en los orgánulos de las células, como por ejemplo la vacuola. La síntesis de osmolitos orgánicos requiere un coste energético mayor que el uso de osmolitos inorgánicos, y este coste energético es responsable de parte de la reducción del crecimiento.

Los mecanismos para la tolerancia al Na^+ durante un estrés salino son de dos tipos: mecanismos que minimizan la entrada de iones en la planta (especies excluidoras) y mecanismos que disminuyen la concentración de los mismos en el citoplasma (especies incluidoras) (Figura 1.8). Para mantener unas bajas concentraciones de Na^+ en el citoplasma la célula puede disminuir su entrada, aumentar su salinidad o acumularlo en las vacuolas, donde el Na^+ es menos tóxico. Esto se consigue mediante el funcionamiento de los sistemas de transporte de iones a través de las distintas membranas celulares. (Hasegawa, P. M. y col. 2000, Zhu, J. K. 2003).

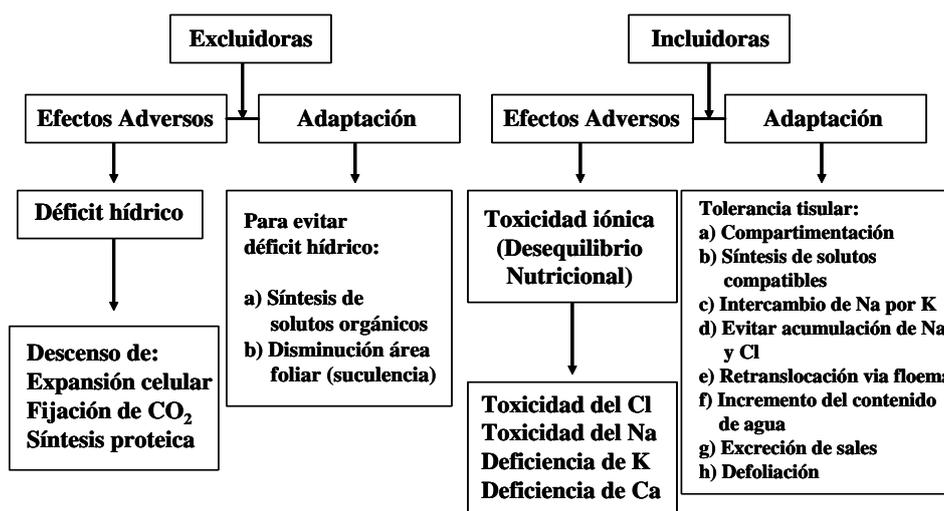


Figura 1.8. Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas. Se muestran los dos mecanismos fundamentales de exclusión e inclusión, y la adaptación que realizan frente al estrés salino. Las especies excluidoras impiden la entrada de Na^+ . Las especies incluidoras absorben y acumulan los iones tóxicos en la vacuola de las células de la planta.

Las vías de entrada de Na^+ en la célula vegetal no se han identificado en la actualidad. Se propone que los canales no selectivos podrían constituir importantes rutas de entrada de este catión (Amtmann, A. y Sanders, D. 1999). La acumulación en la vacuola tiene lugar a través de antiportadores Na^+/H^+ denominados NHX. La compartimentación del Na^+ en la vacuola, al tiempo que libera al citosol del exceso de

Capítulo 1

Na^+ , contribuye a disminuir el potencial osmótico y ajustar el potencial hídrico celular para permitir la absorción de agua durante el estrés salino (Glenn, E. P. y col. 1999). Además, la proteína NHX1 de *Arabidopsis* tiene la capacidad de transportar tanto Na^+ como K^+ , pudiendo contribuir al balance osmótico celular y tisular en cualquier condición de crecimiento de la planta (Venema, K. y col. 2002). Reafirmando esta hipótesis, se ha descrito que la sobreexpresión del antiportador vacuolar Na^+/H^+ , confiere mayor tolerancia al estrés salino en *Arabidopsis* y tomate, al incrementar la compartimentación vacuolar del Na^+ (Apse, M. P. y col. 1999, Zhang, H. X. 2001). Por último la salida de Na^+ de la célula está mediada por antiportadores Na^+/H^+ del plasmalema denominados SOS (Blumwald, E. y col. 2000, Shi, H. y col. 2000). Además de reducir el contenido celular de Na^+ , SOS1 de *Arabidopsis* también participa en el transporte de Na^+ desde la raíz al mesófilo foliar y es esencial para la redistribución del Na^+ entre los tejidos vegetales (Shi, H. y col. 2002). El balance neto de la actividad antiportadora Na^+/H^+ en el plasmalema deber ser positivo para la planta ya que los mutantes *sos1* de *Arabidopsis*, carentes de dicha actividad, son extremadamente sensibles a NaCl (Wu, S-J y col. 1996).

En las halofitas terrestres de la familia de las *Chenopodiaceae*, la tolerancia a la salinidad está basada en la inclusión de Na^+ (compartimentado en vacuolas) y su utilización para el mantenimiento de la turgencia celular o para el reemplazo de K^+ en algunas actividades metabólicas (Marschner, H. 1995). Las especies halotolerantes *Puccinellia peisonis*, *Festuca rubra* y *Casuarina* sp., en cambio, presentan un mecanismo de exclusión de iones que contribuye a la tolerancia a la salinidad, pero estas especies sufren problemas en el balance hídrico y su crecimiento se ve más afectado por la salinidad en comparación con las halofitas (Marschner, H. 1995).

En las glicofitas, el principal mecanismo para tolerar la salinidad es la exclusión de iones tóxicos, aunque este mecanismo tiene una capacidad limitada y por ello poseen una tolerancia a la salinidad limitada. Como ejemplos de cultivos que excluyen iones tóxicos (Na^+ y Cl^-) se conocen el trigo (Munns, R. 2005) y el maíz (Marschner, H. 1995). La judía, especie sensible a la salinidad, tiene una alta eficiencia en la exclusión de Na^+ pero no de Cl^- y la acumulación de éste es la principal razón de su sensibilidad al estrés salino (Marschner, H. 1995).

No obstante, no debe considerarse la exclusión de iones tóxicos como un mecanismo general de las glicofitas para tolerar altas concentraciones salinas, ya que la

caña de azúcar se encuentra entre las especies que usan el mecanismo de inclusión de Na^+ y Cl^- para tolerar la salinidad (de forma similar a las halofitas), al igual que la cebada, que presenta también una mayor tolerancia a la salinidad asociada a una mayor acumulación de Na^+ (Marschner, H. 1995).

1.2.3 Relación K^+/Na^+ como factor clave en la tolerancia.

Gran parte de la toxicidad del Na^+ intracelular es consecuencia de la sustitución que éste realiza por el K^+ en la activación de enzimas y la biosíntesis proteica. Por lo tanto, es obvio pensar que no es sólo la cantidad de Na^+ *per se*, si no más bien la proporción citosólica K^+/Na^+ la que determine las capacidades del metabolismo celular, y en última instancia la capacidad de la planta para sobrevivir en ambientes salinos. De hecho, el cociente citosólico K^+/Na^+ ha sido nombrado repetidamente como un factor clave en la tolerancia a la salinidad (Colmer, T. D. y col. 2006, Cui, T. A. y col. 2003, Dvorák, J. y col. 1994, Gaxiola, R. y col. 1992, Gorham, J. y col. 1991, Maathuis, F. J. M. y Amtmann, A. 1999). En este sentido, Volkov y col. (2004) encontraron que en condiciones salinas, *Thellungiella halophila*, un pariente cercano de *Arabidopsis thaliana* pero halotolerante, mantenía una alta relación K^+/Na^+ en las células del mesófilo, fundamentales para la fotosíntesis, en comparación con dicha proporción en las células de la epidermis. Esta mayor proporción K^+/Na^+ podría explicarse por la mayor selectividad por K^+ frente al Na^+ que muestran los canales de *T. halophila* (Volkov, V. y col. 2004).

El funcionamiento de los sistemas de transporte de K^+ y Na^+ a través de las distintas membranas celulares es fundamental para el mantenimiento de una adecuada relación K^+/Na^+ citoplasmática. Como se ha mencionado anteriormente, las altas concentraciones de Na^+ pueden inhibir los sistemas de transporte de K^+ y su selectividad K^+/Na^+ puede influir en última instancia en la tolerancia a la salinidad de las plantas. En este sentido se ha descrito que tanto los transportadores de alta afinidad de K^+ de la familia HAK como los canales del tipo AKT, son importantes para la entrada de K^+ en la planta (Gierth, M. y col. 2005, Qi, Z. y col. 2008, Rubio, Francisco y col. 2008), y éstos son inhibidos por concentraciones de Na^+ que producen estrés salino.

Capítulo 1

Además de la selectividad K^+/Na^+ de los transportadores, la regulación de su actividad también puede ser determinante. Se ha descrito que tanto la deficiencia de K^+ como el elevado Na^+ externo pueden inducir cambios en el Ca^{2+} celular que a su vez activan complejas redes de señalización. Una de estas redes que comparten ambos estreses es la de las CBLs, mencionadas anteriormente, que a su vez interactúan con las proteínas quinasas CIPKs. El complejo CBL-CIPK interactúa, y por tanto regula, la actividad de un número de proteínas transportadoras relacionadas con la absorción y translocación del K^+ y el Na^+ , manteniendo el equilibrio de estos cationes en condiciones de estrés (Figura 1.9). Como ya se dijo, la deficiencia de K^+ es percibida a través del Ca^{2+} por los CBL1/9 que interactúan físicamente con CIPK23. Ésta se activa y fosforila el dominio C-terminal del canal AKT induciendo la absorción de K^+ . Por otro lado, un elevado estrés salino activa los CBL10/4 (también llamado SOS3) y éstos a su vez interactúan con CIPK24 (también llamado SOS2). El complejo SOS3/SOS2 o CBL4/CIPK24 fosforila a su vez al antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática (SOS1) haciendo activa la salida de Na^+ de la célula (Luan, Sheng y col. 2009).

Es importante mencionar que los tres únicos genes que se mostraron fundamentales para tolerar la salinidad en *Arabidopsis*, *SOS1*, *SOS2* y *SOS3*, en un rastreo de mutantes sensibles al Na^+ , resultaron estar también involucrados en la nutrición de K^+ especialmente en condiciones de bajo K^+ externo (Zhu, J. K. y col. 1998). Por tanto, aunque hoy en día se desconoce el papel de las proteínas SOS en la nutrición de K^+ , cabe la posibilidad de que los sistemas de transporte de K^+ y Na^+ compartan alguno de los elementos de las cascadas de regulación CIPK/CBL mencionadas anteriormente.

En conclusión, el estudio de la nutrición del K^+ en condiciones salinas, así como de los transportadores de K^+ y Na^+ que determinan el cociente K^+/Na^+ del citoplasma, se presenta clave para entender los mecanismos de tolerancia a la salinidad de las plantas. El estudio de estos sistemas en plantas que difieren en la tolerancia a la salinidad puede llevar a la identificación de determinantes genéticos que mejoren esta relación (Amtmann, A. y col. 2004).

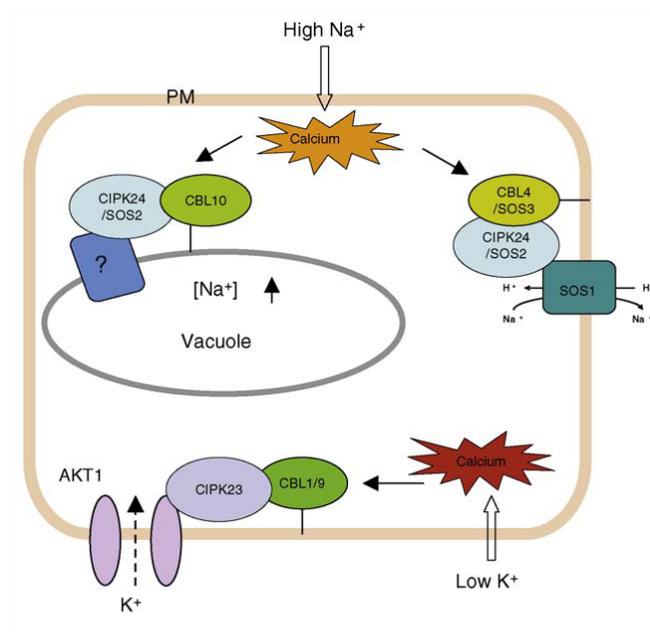


Figura 1.9. Conexión entre el K^+ , el Na^+ y el Ca^{2+} en la percepción de señales externas. Tanto el elevado Na^+ externo como el bajo K^+ inducen señales de Ca^{2+} que activan a los CBLs. Diferentes CBLs pueden interactuar con el mismo o con diferentes CIPKs que a su vez fosforilan y activan transportadores de K^+ y Na^+ manteniendo la homeostasis de estos cationes bajo condiciones adversas (tomado de Luan 2009).

1.3 Especies modelo y tomate

1.3.1 Especies modelo.

El estudio presentado en esta Tesis se enfocó en un primer lugar hacia las especies modelo *A. thaliana* ecotipo Columbia y la especie cercana evolutivamente *Thellungiella halophila* ecotipo Shandong. Desde hace tiempo, *A. thaliana* ha sido adoptada como modelo genético de plantas vasculares, jugando un papel crucial en la identificación de genes y sus funciones biológicas. Las características de *A. thaliana* que primero atrajeron a los genetistas, comparable con el modelo de *Drosophila melanogaster*, fue el pequeño tamaño, la alta fecundidad (autocompatible) y un ciclo de vida corto. Estas cualidades han permitido la compactación de los experimentos en el espacio y en el tiempo. También, la capacidad de transformar *A. thaliana* con genes exógenos, favoreció el desarrollo de los estudios genéticos y moleculares, lo que ha

Capítulo 1

colocado a *A. thaliana* en una situación incluso más ventajosa frente a los modelos animales (Bressan, R. A. y col. 2001). Otra ventaja importante de esta especie es el pequeño tamaño de su genoma, que está totalmente secuenciado en la actualidad (Arabidopsis Genome Initiative 2000), lo que ha permitido que se desarrollen numerosas técnicas para el estudio de la función génica. Desde julio de 2009 está disponible en la página web www.arabidopsis.org la novena anotación de los genes de *A. thaliana* (TAIR9).

En Septiembre de 2004, un grupo de investigadores de todo el mundo se reunieron en París para discutir las posibilidades que ofrecía una pequeña planta crucífera para convertirse en una nueva especie modelo para la investigación molecular en el campo de la tolerancia al estrés abiótico (Bressan, R. A. y col. 2001, Zhu, J. K. 2001). La planta en cuestión era *Thellungiella halophila*, un miembro de la familia Brassica y cercana evolutivamente a *A. thaliana* (Bressan, R. A. y col. 2001, Zhu, J. K. 2001). *Thellungiella halophila* se asemeja a *A. thaliana* en muchos de los aspectos que la hicieron popular entre biólogos y genetistas, incluyendo un ciclo de vida corto, un genoma pequeño, y gran producción de semillas. Aunque *T. halophila* es una especie cercana a *A. thaliana*, ésta no se encuentra en el mismo género, y teniendo 7 cromosomas, no puede cruzarse con *A. thaliana*. Usando citometría de flujo se ha visto que *T. halophila* tiene un genoma relativamente pequeño, de menos del doble que el de *A. thaliana*, y análisis de ESTs de varios cientos de clones de *T. halophila* han revelado niveles de identidad de aproximadamente el 90 y el 95 % entre los cDNAs y las secuencias aminoacídicas de ambas especies respectivamente (Bressan, R. A. y col. 2001).

Una de las características más importantes de *T. halophila* y por la que fue seleccionada en esta Tesis Doctoral es su alta tolerancia a la salinidad. *T. halophila* no produce glándulas salinas ni otros complejos morfológicos ni antes ni después del estrés salino. Al parecer, la tolerancia a la salinidad es fundamentalmente debida a mecanismos fisiológicos y bioquímicos básicos que podrían ser susceptibles al impacto de mutaciones de genes individuales (Bressan, R. A. y col. 2001). Diversos estudios han sugerido que *T. halophila* podría deber su tolerancia a la salinidad al mantenimiento de una elevada relación K^+/Na^+ en condiciones salinas en el aparato fotosintético y además poseer canales de absorción de K^+ más selectivos (Amtmann, A. 2009, Ghars, M. A. y

col. 2008, M'rah, S. y col. 2006, Volkov, V. y col. 2004, Volkov, V. y Amtmann, A. 2006).

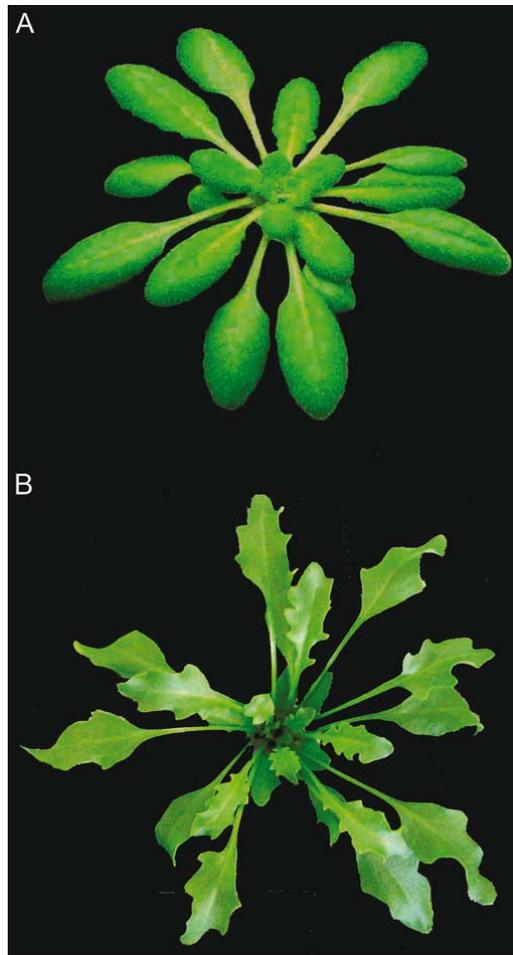


Figura 1.10. Clásica roseta de (A) *A. thaliana* ecotipo *Columbia-0* y (B) *T. halophila* (o *T. salsuginea*) ecotipo *Shandong* crecidas en cultivo hidropónico sin NaCl.

1.3.2 Tomate.

El tomate es un cultivo de gran importancia económica en todo el mundo y se ha utilizado también en esta Tesis Doctoral para estudiar la absorción de K^+ en un cultivo agrónomicamente interesante.

Capítulo 1

1.3.2.1 Origen.

El tomate es originario de la región andina que hoy comparten Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile. En este área crecen espontáneamente las diversas especies del género, y *Solanum lycopersicum* muestra su mayor variación. El antepasado más probable del tomate cultivado es el tomate pequeño silvestre (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*), que crece espontáneamente en las regiones tropicales y subtropicales de América. Recientemente se ha modificado la clasificación tradicional de las especies de tomate, quedando ahora englobadas en el género *Solanum* (Peralta, I. E. y col. 2005).

1.3.2.2 Importancia económica.

El tomate se cultiva tanto en las agriculturas mediterráneas de la Unión Europea como en las templadas. Una importante distinción entre las áreas de producción obedece a los modelos de utilización del producto. La producción de los países del norte de Europa se vende para consumo fresco, mientras que en los países mediterráneos una parte considerable de la producción constituye materia prima para la industria.

El tomate es uno de los cultivos hortícolas más importantes en España. Según el Anuario de Estadística Agroalimentaria (2007) es el primer cultivo en importancia en cuanto a superficie y a producción (3.800.552 toneladas de producción, siendo la hortaliza de mayor producción en España). Además, España es el séptimo productor de tomate del mundo.

El análisis de las comunidades españolas productoras de tomate lo podemos ver en la Tabla 1.1. Las comunidades con mayores producciones son Andalucía, Extremadura y Murcia. En esta tabla también se muestra la superficie dedicada al cultivo en cada comunidad.

Tabla 1.1. *Análisis por comunidades de superficie (en hectáreas) y producción de tomate (en toneladas). Fuente: Anuario de estadística agroalimentaria (2007).*

Comunidades	Superficie(Ha)	Producción (Tn)
Galicia	1.301	64.450
Asturias	70	2.700
Cantabria	94	2.464
País Vasco	290	8.113
Navarra	1.824	113.336
La Rioja	233	14.340
Aragón	1.778	124.619
Cataluña	2.050	84.229
Baleares	230	10.501
Castilla y León	336	13.802
Madrid	43	1.935
Castilla la Mancha	2.328	126.737
C. Valenciana	1.432	108.377
Murcia	4.239	323.628
Extremadura	19.601	1.229.826
Andalucía	18.363	1.374.595
Canarias	2.478	196.900

Capítulo 1

1.3.2.3 Genómica del tomate.

Existen proyectos científicos internacionales que intentan comprender aspectos básicos de la genómica de las solanáceas. Uno de tales proyectos consiste en secuenciar el genoma de tomate. Para ello, cada uno de los 12 cromosomas del genoma haploide del tomate ha sido asignado a distintos centros de secuenciación en diferentes países del mundo. La evolución del proceso de secuenciación se puede seguir en http://sgn.cornell.edu/about/tomato_sequencing.pl.

1.3.2.4 Especies utilizadas en esta Tesis Doctoral.

- *S. pennellii* (Correll, D'Arcy; PE-47): se trata de una especie silvestre de tomate. Se adapta a zonas áridas y es resistente a la sequía, pues puede absorber la humedad atmosférica por las hojas. Tiene una amplia variabilidad genética derivada de su autoincompatibilidad y un sistema radicular poco desarrollado.

- *S. lycopersicum* (L. cv San Pedro): es una variedad de precocidad media, con planta alta, aproximadamente 1,5 m. Sus frutos son de superficie lisa, pulpa abundante y jugosa, de forma globosa y tamaño medio a grande, con cuello verde. Se trata de una planta de estación cálida, para cultivo de verano y muy comercial.

- *S. lycopersicum* (L. cv microtom): Su primer uso fue propuesto para decoración. Tiene un fruto diminuto y rojo. Se trata de una variedad de escasa talla, crecimiento rápido y fácil transformación, por ello, ha sido propuesta como un sistema modelo conveniente para investigación en la regulación y desarrollo del fruto. Se ha sugerido que el fenotipo del microtomate es el resultado de mutaciones en genes del metabolismo de los brasinoesteroides y en el crecimiento vegetativo (Meissner, R. y col. 1997).

2.- OBJETIVOS

2 OBJETIVOS.

2.1 Objetivos.

Uno de los aspectos más importantes en la agricultura y en especial en el cultivo sin suelo es la optimización de la aplicación de fertilizantes para una correcta nutrición de la planta. El K^+ es uno de los nutrientes más importantes y el catión mineral más abundante respecto al peso seco de la planta, por lo que la nutrición de K^+ es un factor clave en el cultivo de cualquier planta. En condiciones de salinidad o de riego con aguas de mala calidad, como es el caso de la Región de Murcia, la nutrición de K^+ se puede ver afectada negativamente ya que las altas concentraciones de Na^+ interfieren negativamente con la nutrición de K^+ y producen toxicidad.

En la práctica del cultivo sin suelo se están utilizando soluciones nutritivas demasiado concentradas que superan las dosis óptimas de aplicación de nutrientes. Sería posible utilizar soluciones más diluidas sin comprometer la producción y disminuir de esta forma el aporte de fertilizantes. Esto requiere disponer de información suficiente sobre las características y la regulación de los sistemas de absorción de K^+ que operan en las raíces de las plantas en dichas condiciones. En el caso de especies de interés agronómico existe muy poca información sobre los aspectos relacionados con la absorción de K^+ desde un punto de vista molecular. Sin embargo, existen especies modelo con las que trabajar con el objetivo de una posterior extrapolación de los resultados a las especies cultivadas. Por otra parte la comparación de las características de los sistemas de transporte de K^+ en plantas que difieren en la tolerancia a la salinidad puede dar información sobre los mecanismos de tolerancia y los determinantes genéticos implicados. Además, el estudio de la relevancia de dichos sistemas en la absorción de K^+ a las distintas concentraciones del mismo ayudará a la optimización del riego con aguas de mala calidad.

Por lo tanto los objetivos que se han planteado en esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

2.1.1 Caracterización fisiológica del transporte de K^+ de baja afinidad en *A. thaliana* y *T. halophila* bajo estrés salino.

2.1.1.1 Efecto de la presencia de Na^+ en la solución de crecimiento sobre la nutrición de K^+ y de otros cationes relevantes como Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} en plantas de *A. thaliana* y *T. halophila* crecidas con 1,4 mM K^+ .

2.1.2 Caracterización fisiológica del transporte de K^+ de alta afinidad en *A. thaliana* y *T. halophila* y bajo estrés salino.

2.1.2.1 Caracterización fisiológica del transporte de K^+ de alta afinidad en *T. halophila* y su inhibición por NH_4^+ o Ba^{2+} .

2.1.2.2 Efecto de la presencia de Na^+ en la solución de crecimiento sobre la absorción de K^+ y de otros cationes relevantes como Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} en plantas de *A. thaliana* y *T. halophila* crecidas con una semana de ayuno de K^+ .

2.1.3 Caracterización molecular del transporte de K^+ de alta afinidad en *T. halophila*.

2.1.3.1 Aislamiento y caracterización del cDNA completo correspondiente a un gen de la familia de transportadores de K^+ HAK del tipo I: *ThHAK5*.

2.1.3.2 Estudio de las condiciones de expresión de *ThHAK5* frente a estrés salino.

2.1.3.3 Caracterización de la función de *ThHAK5* en sistemas de expresión heteróloga.

2.1.4 Obtención de transportadores de K^+ de alta afinidad más eficientes bajo estrés salino por mutagénesis al azar.

2.1.5 Caracterización del transporte de K^+ de alta afinidad en dos variedades de tomate (*S. lycopersicum*) y otra especie de tomate silvestre (*S. pennellii*).

2.1.5.1 Efecto de los tratamientos con Na^+ y NH_4^+ sobre la absorción de K^+ de alta afinidad en las dos variedades de tomate cultivado y la especie silvestre.

2.1.5.2 Efecto de los tratamientos con Na^+ y NH_4^+ sobre las concentraciones de K^+ y de otros cationes relevantes como Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} .

2.1.5.3 Efecto de los tratamientos con Na^+ y NH_4^+ sobre la expresión del gen *LeHAK5* encargado de la absorción de K^+ de alta afinidad.

2.2 Plan de trabajo

Para la consecución de los objetivos indicados anteriormente se llevaron a cabo una serie de experimentos con plantas cultivadas en sistema hidropónico. Se utilizaron plantas con distinta tolerancia a la salinidad, tanto modelo, como *A. thaliana* y *T. halophila*, como cultivadas como tomate. Dentro de tomate se utilizaron tanto variedades cultivadas como especies silvestres con mayor tolerancia a la salinidad.

En primer lugar se llevó a cabo un estudio fisiológico de la tolerancia a la salinidad en *A. thaliana* y *T. halophila* a una concentración de K^+ suficiente. A continuación se realizó un estudio similar cuando el K^+ era limitante. Las plantas se cultivaron en sistema hidropónico en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de luz, temperatura, humedad y fotoperiodo. Cada experimento tuvo la duración indicada en cada caso, y las disoluciones nutritivas se reemplazaban cada 7 días durante las primeras 4 semanas para el caso de *A. thaliana* y *T. halophila*, y dos veces por semana para las plantas de tomate y a partir de las 4 semanas en las especies modelo. Por otro lado, algunas plantas fueron sometidas a un ayuno de K^+ para estudiar el sistema de transporte de alta afinidad. Tras el periodo de crecimiento y ayuno de K^+ , las plantas se transfirieron a una solución de $50 \mu M K^+$ y se determinó la desaparición del catión de la solución. Estos experimentos de absorción de K^+ se realizaron con plantas crecidas en diversas condiciones para estudiar el efecto de las condiciones de crecimiento sobre la inducción del transporte de K^+ de alta afinidad.

Capítulo 2

Para la caracterización molecular del transporte K^+ de alta afinidad se procedió al aislamiento de cDNAs de genes que podrían estar implicados en dicho proceso. Para ello se aisló el RNA total de las raíces de las plantas cultivadas como se ha indicado anteriormente y mediante RT-PCR y distintos cebadores se aisló un cDNA completo del gen *ThHAK5*. Mediante Northern se caracterizó el patrón de expresión de este gen. El transportador *ThHAK5* fue también caracterizado funcionalmente en levaduras deficientes en los transportadores de K^+ .

Para la obtención de transportadores de K^+ de alta afinidad capaces de transportar K^+ en presencia de Na^+ (transportadores más selectivos) se realizó una mutagénesis al azar sobre *AtHAK5* parcialmente dirigida hacia los dos tipos de sustituciones nucleotídicas (transiciones y transversiones). Posteriormente, los productos de la mutagénesis se introdujeron en levaduras deficientes en el transporte de K^+ y se seleccionaron por crecimiento en condiciones de elevado estrés salino.

Para la caracterización del transporte de K^+ en las dos variedades de tomate San Pedro y Microtomate y el silvestre *S. pennellii*, se realizaron experimentos similares a los realizados con *A. thaliana* y *T. halophila* en sistema hidropónico en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de luz, temperatura, humedad y fotoperiodo. También se analizó la expresión de *LeHAK5* en raíz mediante qPCR.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material Biológico.

El trabajo experimental se ha realizado con plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, *Thellungiella halophila* ecotipo Shandong (recientemente renombrada como *Thellungiella salsuginea*; (Amtmann, A. 2009) y *Solanum lycopersicum* L. variedades Microtom y San Pedro y la variedad silvestre de tomate *Solanum pennellii*.

Se usó la cepa DH5 α (Hanahan, D. 1985) de la bacteria *Escherichia coli* para la amplificación de plásmidos, la cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* W Δ 3 (*MAT a*, *ade2*, *ura3*, *trp1*, *trk1* Δ ::*LEU2*, *trk2* Δ ::*HIS3*) deficiente en los transportadores de entrada de K⁺ *TRK1*, *TRK2* (Haro, R. y col. 1999) y la cepa de *S. cerevisiae* 9.3 (*MATa*, *ena1* Δ ::*HIS3*::*ena4* Δ , *leu2*, *ura3-1*, *trp1-1*, *ade2-1*, *trk1* Δ , *trk2*::*pCK64*) deficiente en los transportadores de de entrada K⁺ *TRK1* y *TRK2*, y las bombas de salida de Na⁺ *Ena1*-*Ena4* (Bañuelos, M. A. y col. 1995a).

3.1.2 Productos químicos y bioquímicos

Se han utilizado reactivos procedentes de las firmas Merck, Panreac Química, Sigma Chemical co, Fluka Biochemika, GE Life Sciences, Applied Biosystems, Roche, Invitrogen y Qiagen. Las enzimas de restricción procedieron de Roche y New England Biolabs, y se usaron con los tampones suministrados por el fabricante. La DNA ligasa del bacteriófago T4, nucleótidos trifosfato y la RNAsa procedían de Roche, la lisozima de Sigma, la Taq I DNA polimerasa de GE Life Sciences y la Pfu DNA polimerasa de Stratagene.

La ampicilina se obtuvo de Roche, se preparó y se utilizó como se ha descrito previamente (Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001). Para la recuperación del DNA de los geles de agarosa, se usó el Kit de Roche “High pure PCR product purification”. Para

Capítulo 3

hacer el marcaje de la sonda no radiactiva se utilizaron los kits “High pure PCR product purification” de Roche, y “Dig high prime DNA labeling and detection starter Kit II”, la cadena entera de cDNA se obtuvo usando el “5’3’ Race Kit” de Roche (Indianápolis, IN, EEUU).

Para las reacciones de qPCR se usó “Power SYBR® Green PCR Master Mix” de Applied Biosystems (Foster City, CA, EEUU). Los cebadores de qPCR (y PCR) que se utilizaron fueron de TIB Biomol (Berlín, Alemania).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Sistemas de cultivo y condiciones de crecimiento

3.2.1.1 Plantas de *A. thaliana* y *T. halophila*.

Las semillas de las distintas plantas fueron brevemente esterilizadas superficialmente en cabina de flujo laminar (TELSTAR Mini-H) con una mezcla desinfectante de etanol al 70%, seguido de lejía comercial al 20% y SDS al 10%, durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron cuatro veces con agua esterilizada y resuspendieron en agua esterilizada. Posteriormente se pasaron a oscuridad a 4 °C durante 72 horas.

El desarrollo de las plántulas se llevó a cabo en cultivo hidropónico (Gibeaut, D. M. y col. 1997), en una cámara de cultivo de condiciones controladas. Una vez esterilizadas las semillas se germinaron sobre lana de roca, material inerte que permite un fácil crecimiento de la raíz a través del mismo. La lana se insertó en microtubos de 1,5 mL y para ello se cortaron la tapa y la punta de tantos tubos como plantas se requería germinar, y se esterilizaron en autoclave. A continuación se insertaron en planchas de PVC de 361 cm², a las que previamente se habían realizado perforaciones con el diámetro de los microtubos. A continuación se encajaron las planchas sobre cubetas de 2.5 L cuya composición dependía del experimento a realizar, indicándose en cada caso. La solución nutritiva se renovaba cada 7 días durante las primeras 6 semanas, y a partir de ahí 2 veces por semana.

Se fijó un fotoperiodo de 8 horas de luz. La temperatura y la humedad relativa fueron de 25 °C y 65 % respectivamente. Como sistema de iluminación se emplearon

tubos fluorescentes (Philips TLD 36/W 83, Silvana F 36WGRO), consiguiendo una densidad homogénea de flujo de fotones de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3.1).

La solución nutritiva utilizada para el crecimiento de *A. thaliana* y *T. halophila* es la descrita en la Tabla 3.1, y la solución nutritiva para los tratamientos sin K^+ es la descrita en la Tabla 3.3.

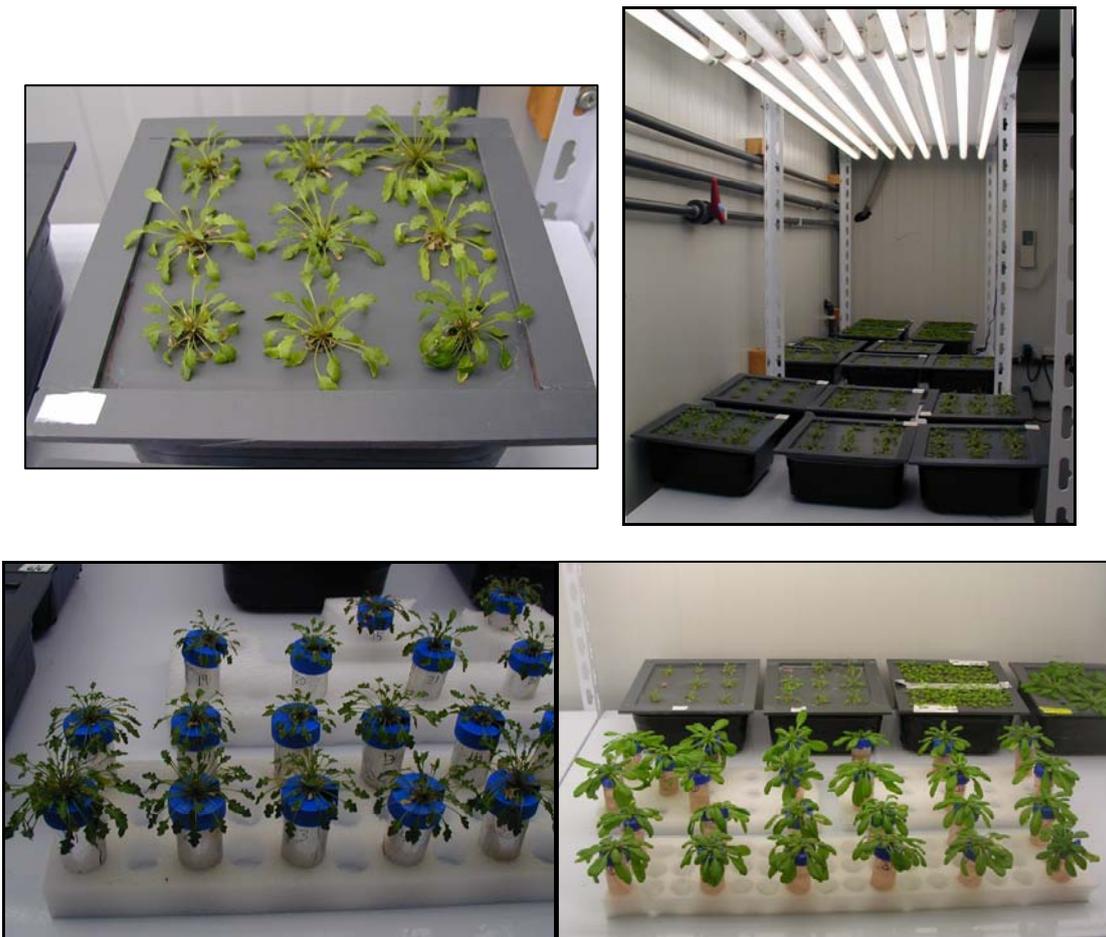


Figura 3.1. Detalle de los sistemas de crecimiento de *A. thaliana* y *T. halophila* en cultivo hidropónico y cámara de cultivo con iluminación y humedad controlada. En la parte inferior se observan los sistemas empleados para determinar la absorción de K^+ de alta afinidad también sobre sistema hidropónico.

Tabla 3.1. Composición de la disolución nutritiva 1/5 Hoagland modificada y sus concentraciones finales.

Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración
KNO ₃	1,2 mM	MnSO ₄	1 µM
Ca (NO ₃) ₂	0,8 mM	ZnSO ₄	1 µM
KH ₂ PO ₄	0,2 mM	CuSO ₄	0,5 µM
MgSO ₄	0,2 mM	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,1 µM
CaCl ₂	50 µM	NiSO ₄	0,1 µM
H ₃ BO ₃	12,5 µM	Fe-EDDHA	10 µM

Adicionalmente, se midió el NaCl en las soluciones nutritivas de las plantas control cultivadas sin NaCl añadido, obteniéndose una concentración de alrededor de 250 µM, determinada por espectrometría de absorción atómica.

3.2.1.2 Plantas de tomate *S. lycopersicum* y *S pennellii*.

Las semillas de tomate *S. lycopersicum* y *S pennellii* fueron prehidratadas con aireación en una solución 0,5 mM CaSO₄ durante 72 horas y germinadas en bandejas de 3-4 cm de profundidad con vermiculita previamente humedecida con la misma solución que la prehidratación. El proceso se llevó a cabo en una cámara de germinación cuya temperatura fue de 28 °C. Las semillas se taparon con papel de aluminio para impedir pérdida de humedad de forma excesiva. El agua evaporada se reponía cada día añadiendo agua desionizada.

Las semillas tardaron en germinar dependiendo de la variedad entre 4 y 6 días para Microtomate y San Pedro y entre 6 y 8 días para *S pennellii*. Cuando las plántulas tenían un tamaño de alrededor de 3-4 cm fueron transferidas a contenedores de 15 L con solución nutritiva cuya composición dependía del experimento a realizar y se indica en cada caso. El desarrollo de las plántulas se llevó a cabo en cultivo hidropónico, en una cámara de cultivo de condiciones controladas. La disolución nutritiva se renovaba cada 3 ó 4 días. Se fijó un fotoperiodo de 16 horas de luz. La temperatura y la humedad

fueron de 25 °C y 65 % durante el día, y 20 °C y 85% durante la noche. Como sistema de iluminación se empleó una combinación de tubos fluorescentes (Philips TLD 36/W 83, Silvana F 36WGRO) junto con lámparas de vapor de sodio (Oosram HQI. T 400W), consiguiendo una densidad homogénea de flujo de fotones de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3.2).

La solución control con la que se cultivaron las especies fue 1/5 Hoagland modificado (Tabla 3.1). En los casos indicados la disolución control se modificó para que contuviese NH_4^+ (50% del aporte de nitrógeno en forma de NH_4^+ y el otro 50% en forma de NO_3^- ; Tabla 3.2). En las disoluciones con 50 mM de NaCl, éste se añadió dividido en dos días para disminuir un choque osmótico.

Tabla 3.2. Composición de la disolución nutritiva con NH_4^+ y concentraciones finales.

Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración
NH_4NO_3	1,4 mM	MnSO_4	1 μM
KH_2PO_4	0,2 mM	ZnSO_4	1 μM
KCl	1,2 mM	CuSO_4	0,5 μM
MgSO_4	0,2 mM	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,1 μM
CaCl_2	0,8 mM	NiSO_4	0,1 μM
H_3BO_3	12,5 μM	Fe-EDDHA	10 μM

A los 8 días de crecimiento en cultivo hidropónico para San Pedro y Microtomate, y a los 10 días para *S. pennellii*, la mitad de las plantas se sometieron a condiciones de ayuno de K^+ , estas condiciones se observan en las Tablas 3.3. y 3.4.

Capítulo 3

Tabla 3.3. *Composición de la disolución nutritiva 1/5 Hoagland modificado sin K^+ y sus concentraciones finales.*

Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración
$Ca(H_2PO_4)_2$	0,1 mM	$MnSO_4$	1 μM
$Ca(NO_3)_2$	1,4 mM	$ZnSO_4$	1 μM
$MgSO_4$	0,2 mM	$CuSO_4$	0,5 μM
$CaCl_2$	50 μM	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0,1 μM
H_3BO_3	12,5 μM	$NiSO_4$	0,1 μM
		Fe-EDDHA	10 μM

Tabla 3.4. *Composición de la disolución nutritiva con NH_4^+ sin K^+ y sus concentraciones finales.*

Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración
NH_4NO_3	1,4 mM	$MnSO_4$	1 μM
$Ca(H_2PO_4)_2$	0,1 mM	$ZnSO_4$	1 μM
$CaCl_2$	1,4 mM	$CuSO_4$	0,5 μM
$MgSO_4$	0,2 mM	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0,1 μM
H_3BO_3	12,5 μM	$NiSO_4$	0,1 μM
		Fe-EDDHA	10 μM



Figura 3.2. Plantas de tomate de la variedad San Pedro (izquierda) y *S. pennellii* (derecha) en los sistemas de cultivo hidropónico.

3.2.1.3 Bacterias.

El trabajo de laboratorio general con microorganismos se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar (TELSTAR Mini-H), o junto a un mechero tipo Bunsen. Las bacterias se crecieron en medio LB (Luria Bertani: 1 % Triptona, 0,5 % extracto de levadura y 0,5 % NaCl) a 37 °C. Para solidificar el medio se añadió 2 % agar. La esterilización se hizo por tratamiento en autoclave durante 20 minutos a 120 °C y 1 atmósfera de sobrepresión.

Para preparar células competentes (cepa DH5 α) se crecieron las bacterias en medio LB hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,7-1. Posteriormente se incubaron las células en hielo para detener el crecimiento durante 15-30 minutos y se continuó el protocolo siempre a 4 °C, incluidos los reactivos, puntas y microtubos. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en un volumen de agua fría igual al volumen inicial. Se volvió a centrifugar y esta vez se resuspendió en la mitad del volumen inicial de agua fría. Tras la última centrifugación, se resuspendieron las células en 10 mL de agua por cada litro de volumen inicial de células al 10% de glicerol frío. Finalmente, las células se repartieron en alícuotas (40-60 μ L) en microtubos y se depositaron en nitrógeno líquido.

Para seleccionar los plásmidos en las células bacterianas transformadas, se añadió 100 μ g mL⁻¹ de ampicilina (Roche) o 50 μ g mL⁻¹ de espectinomicina (Sigma-Aldrich) al medio esterilizado y enfriado a aproximadamente 50° C. Las cepas de *E. coli* que contenían los plásmidos de interés se mantuvieron congeladas a -80 °C en medio de cultivo LB con antibiótico al 20 % de glicerina estéril.

Capítulo 3

3.2.1.4 Levaduras.

Las levaduras se crecieron a 28 °C. Para el crecimiento rutinario de las cepas sin transformar WΔ3 o 9.3, se usó medio rico YPD (1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % glucosa) suplementado con 100 mM de K⁺ o medio mínimo SD (0,17 % Base nitrogenada para levadura sin aminoácidos, 0,5 % (NH₄)₂SO₄, 2 % glucosa, 20 μg mL⁻¹ de adenina, 40 μg mL⁻¹ de leucina, 20 μg mL⁻¹ de histidina, 30 μg mL⁻¹ de triptófano, suplementado con 100 mM de K⁺, y ajustado el pH a 6.5 con NaOH). En el caso de las cepas transformadas, se añadieron los requerimientos necesarios para cada cepa. Para solidificar el medio se añadió agar (Scharlau) al 2 %.

Las cepas de levadura se conservaron a 4 °C en estrías de YPD o de SD suplementados con los requerimientos de cada cepa o se guardaron a -80 °C después de añadir 20 % de glicerina estéril a una suspensión de células en medio de cultivo.

Para el crecimiento de levaduras en condiciones de bajo K⁺ se utilizó el medio Fosfato de Arginina (FA), descrito anteriormente (Rodríguez-Navarro, A. y Ramos, J. 1984) compuesto por 8 mM H₃PO₄, 2 mM MgSO₄, 0,2 mM CaCl₂, y 2 % glucosa, ajustando el pH a 6,5 con arginina y posteriormente reducido a 6 con HCl; vitaminas (0,2 mg/mL biotina, 0,4 mg/L de ácido nicotínico, 0,4 mg/L piridoxina, 0,4 mg/L tiamina y 0,4 mg/L ácido pantoténico) y elementos traza (0,5 mg/L de H₃BO₃, 0,04 mg/L de CuSO₄, 0,1 mg/L de KI, 0,5 mg/L de FeSO₄, 0,4 mg/L de MnSO₄, 0,9 mg/L de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ y 0,04 mg/L de ZnSO₄). Este medio se suplementó con distintas concentraciones de K⁺ según la cepa para permitir el crecimiento de las levaduras.

Las vitaminas del medio se esterilizaron por filtración, añadiéndose al medio base una vez esterilizado en el autoclave.

Para realizar los experimentos de transporte de K⁺ y Rb⁺ en levaduras se utilizó un tampón de ensayo que contenía 10 mM MES, 0,1 mM de MgCl₂ y 2 % de glucosa ajustando el pH a 6,0 con Ca(OH)₂.

3.2.2 Ensayos de disminución de K⁺ externo en plantas.

Los experimentos de disminución del K⁺ externo se realizaron en la cámara de cultivo, bajo condiciones controladas siguiendo siempre el mismo protocolo (Figura 3.1). Consistían en transferir a tiempo 0 las plantas, previamente lavadas con una

solución fría libre de K^+ , a vasos de 250 mL o tubos de 50 mL, dependiendo del tamaño de la raíz de la planta, con una solución 1/5 de Hoagland modificada sin K^+ , suplementada con 50 μM de K^+ . Cuando correspondía se adicionaban además inhibidores como NH_4Cl o $BaCl_2$.

Se tomaron muestras cada 30 minutos durante 120 minutos, para tomate. Para *A. thaliana* y *T. halophila* se tomaron muestras más espaciadas, al inicio, a los 30 minutos y a los 60 minutos. A partir de la primera hora se tomaba una muestra cada hora. Posteriormente se determinaban las concentraciones de K^+ de las muestras por espectrometría de emisión atómica usando un espectrofotómetro Perkin- Elmer modelo ICP 5500. Se utilizaron al menos cinco plantas por tratamiento. Los datos de la concentración externa de K^+ en función del tiempo obtenidos con cada planta se ajustaron a la función de Michaelis Menten como se ha descrito anteriormente (Bañuelos, M. A. y col. 2002) y se calcularon los valores de las constantes cinéticas, K_m y V_{max} , así como las medias y los errores estándar.

Al final de los experimentos, se separó la parte aérea de la raíz de todas las plantas, lavándose la raíz en solución fría para eliminar los cationes del apoplasto y se determinaron los pesos frescos. El material se secó a continuación en una estufa a 65° C durante 4 días y se halló el peso seco.

Para determinar las concentraciones internas de iones en partes aéreas y raíces se hizo un análisis mineral de los órganos de la planta, para lo que se realizaron digestiones ácidas con una solución $HNO_3 - HClO_4$ (2:1). Para ello se pesaron 0,1 g de material vegetal y en su defecto la cantidad de material vegetal total obtenida, a los que se adicionaron 3 mL de la solución de ácido nítrico-perclórico. Seguidamente se colocaron en un digestor a 90 °C durante 1 hora, tras ello se subió la temperatura a 120 °C durante 4 horas. A continuación se aumento a 180 °C durante 2 horas y finalmente a 200 °C entre 4 y 6 horas hasta la decoloración de la muestra y volumen final inferior a 0,5 mL. Posteriormente y después de enfriarse, se llevó con agua destilada hasta 25 mL.

Las concentraciones de los iones se determinaron mediante espectrometría de ICP (Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, USA). Los datos de concentración de iones en los órganos se expresaron en milimoles de ion por Kg de peso seco del material vegetal y se calcularon las medias y los errores estándar.

3.2.3 Tasas de crecimiento, absorción de cationes y transporte a la parte aérea.

Las tasas de crecimiento de raíz y parte aérea se determinaron como el incremento de cada órgano en peso seco por unidad de tiempo:

$$\text{Tasa de crecimiento} = \frac{PS_2 - PS_1}{t_2 - t_1}$$

donde PS es el peso seco de la raíz o de la parte aérea en dos cosechas consecutivas (t_2 y t_1).

La absorción y el transporte de la raíz a la parte aérea para cada catión se calculó como:

$$\text{Absorción} = \frac{C_2 - C_1}{\frac{R_2 + R_1}{2} \cdot (t_2 - t_1)}$$

$$\text{Transporte} = \frac{Cs_2 - Cs_1}{\frac{R_2 + R_1}{2} \cdot (t_2 - t_1)}$$

donde R es el peso seco de la raíz, C es el contenido total del catión de la planta entera y Cs es el contenido total del catión en la parte aérea de la planta en dos cosechas consecutivas. (t_2 y t_1).

3.2.4 Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos.

3.2.4.1 Aislamiento de plásmidos.

La preparación de plásmidos amplificados en *E. coli* se llevó a cabo por el método de lisis alcalina, tal como se ha descrito anteriormente (Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001). Las células de *E. coli* crecidas en medio líquido LB suplementado con $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina, a una temperatura de 37°C , se recogieron por

centrifugación y se resuspendieron en un volumen de la Solución I [1 % Glucosa, 25 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8)]. Se añadieron 2 volúmenes de la solución II (0,2 M NaOH, 1 % SDS) recién preparada y se mezcló por inversión con suavidad. A continuación se añadieron 1,5 volúmenes de la Solución III (Acetato de potasio 3 M, ajustando a pH 6 con ácido acético) se mezcló por inversión y se incubó en frío durante 10 min. Mediante centrifugación se separó el DNA de los restos celulares. Se concentró el DNA por precipitación con 2,5 volúmenes de isopropanol en frío durante 30 min. Posteriormente se añadió alcohol etílico al 70% para lavar y eliminar restos. El DNA, tras un periodo de secado del alcohol, se resuspendió en un volumen adecuado de agua con una concentración de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RNAsa de Roche (Indianápolis, IN, EE.UU.).

Para extraer plásmidos de células de levaduras para su recuperación en *E. coli* se creció el cultivo en YPD suplementado con 100 mM de K^+ y se recogieron 1,5 mL de cultivo saturado de células. Se resuspendieron en 200 μL de tampón de lisis (2 % Triton-X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) y se añadieron 200 μL de cloroformo más arena de mar estéril, se agitaron vigorosamente durante 2 min. Se separaron las fases por centrifugación y se recogieron los sobrenadantes acuosos en microtubos limpios. Se usaron distintas cantidades de DNA para transformar células competentes de *E. coli*. Los vectores plasmídicos utilizados para la realización de ésta tesis fueron pYPGE15 (Brunelli, J. P. y Pall, M. L. 1993), pCR 2.1®-TOPO® de Invitrogen y pDR195 (Rentsch, D. y col. 1995).

3.2.4.2 Extracción de RNA total de plantas.

Para la extracción de RNA en plantas de tomate, *A. thaliana* y *T. halophila*, se trituró con mortero un gramo de tejido congelado, usando en todo momento nitrógeno líquido. Se pasó el polvo del mortero a un microtubo de 1,5 mL con 1 mL de TriPure de Roche, se mezcló con agitador varias veces, cambiando de velocidad media a alta. Se centrifugó y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadieron 200 μL de cloroformo y se mezclaron con agitador. Mediante centrifugación se separó la fase orgánica de la acuosa (sobrenadante). Se recogió el sobrenadante y se precipitó el RNA con 1 mL de alcohol etílico al 75 % preparado con agua tratada previamente con DEPC. El RNA se resuspendió en un volumen adecuado de agua tratada con DEPC.

Capítulo 3

Para el protocolo de PCR cuantitativa (qPCR), se extrajo el RNA total, mediante el RNeasy Plant mini kit de Qiagen (Qiagen Science, Maryland, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se pasaron 100 mg de material vegetal en polvo del mortero a un microtubo de 1,5 mL con 450 μL de tampón RLT y 4,5 μL de 2-mercaptoetanol. Se mezcló varias veces con un agitador y se transfirió la mezcla a las columnas suministradas por el fabricante. Tras centrifugar las columnas, se precipitó el RNA que estaba en el efluente con alcohol etílico y se transfirieron a otras columnas. Tras sucesivas centrifugaciones en presencia de tampones de lavado, se eluyó el RNA de la columna con agua libre de RNAsa hasta un volumen adecuado. Posteriormente, se trató el RNA con DNA-free™ (DNAsa-RNAsa-free) (Applied Biosystems/Ambion, Austin, Texas) siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar el DNA presente en las muestras. A continuación, se realizaron PCRs del RNA obtenido para comprobar la completa eliminación de DNA.

La medida de concentración de RNA se realizó de dos formas. La primera, utilizada para la técnica del Northern, consistió en cargar 2 μL de RNA en un gel de agarosa (gel y cubeta previamente tratados con SDS al 10%), estimando la concentración de RNA por comparación con patrones de peso molecular de masa conocida sometidos a electroforesis en el mismo gel. La segunda consistió en la técnica de espectrometría a través de un Nanodrop 1000 Spectrophotometer THERMO SCIENTIFIC, utilizado antes de la síntesis de cDNA para la PCR cuantitativa.

3.2.4.3 Tratamientos enzimáticos del DNA.

Las digestiones con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo usando los tampones y las condiciones recomendadas por los fabricantes. Se prepararon soluciones de DNA a concentraciones entre 1 y 0,1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ en un volumen de 10 μL , añadiendo al menos 1 U de enzima por cada μg de DNA. La incubación se realizó en baño de agua a la temperatura indicada para cada enzima, durante al menos 2 horas. Las digestiones dobles también se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.4.4 Clonaje de fragmentos de DNA.

Los vectores en los que se iba a realizar el clonaje y los fragmentos de DNA que se iban a introducir, se digirieron con las endonucleasas de restricción apropiadas. Para hacer el ligado entre vector e inserto se mezclaron los mismos a concentraciones

equimolares con ligasa de DNA del bacteriófago T-4 (Roche) en un volumen de 10 μL en el tampón proporcionado por el fabricante, incubando a 16 °C durante toda la noche. Se usaron 2-3 μL de la solución de ligado para transformar *E. coli*.

El clonaje de fragmentos también se realizó informáticamente mediante el software de Invitrogen (Vector NTI Advance 10).

3.2.4.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Los fragmentos de restricción procedentes de digestiones de DNA se analizaron en geles horizontales de agarosa preparados con tampón TAE (40 mM Tris/acetato, 1mM EDTA), con 0,05 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de bromuro de etidio para poder visualizar las bandas a la luz UV. Se utilizó agarosa a una concentración de 0,8-1,2 %, dependiendo del tamaño del DNA que se pretendía separar. La electroforesis se hizo sumergiendo el gel en el mismo tampón que se usó en su preparación. A las muestras se les añadió tampón de carga (60 % glicerina, 0,25 % de azul de bromofenol, 20 mM de EDTA pH: 8, 1 mg/mL de RNAsa) antes de cargar en el gel, y se fijó el voltaje a 1-10 V/cm. El tamaño y cantidad de DNA de los fragmentos de interés se estimó por comparación con los fragmentos obtenidos por digestión con el enzima de restricción Hind III de cantidades conocidas de DNA del bacteriófago lambda. El otro marcador de peso molecular utilizado (para fragmentos menores) fue el Molecular Weight Marker IV de Roche.

3.2.4.6 Purificación de DNA.

Para la recuperación del DNA del gel de agarosa se usó el Kit de Roche “High pure PCR product purification”. Con un bisturí se extrajo la porción de agarosa que contenía el fragmento de DNA de interés y se siguieron las instrucciones suministradas por el fabricante.

También, como método general, se utilizó una técnica de precipitación para concentrar-purificar el DNA. Ésta se basa en adicionar al DNA 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M más 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se mezcló e incubó durante 30 minutos a -20 °C y luego se precipitó por centrifugación. Finalmente, una vez lavado el precipitado con etanol al 70% y centrifugado de nuevo, se dejó secar y se resuspendió en el volumen deseado de agua desionizada.

Capítulo 3

3.2.4.7 Hibridación de ácidos nucleicos.

Las hibridaciones RNA/DNA (Northern) se realizaron tal y como se ha descrito previamente (Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001) con 30 µg de RNA total de raíz, resueltos en gel de agarosa en tampón MOPS (20 mM MOPS, 8 mM acetato sódico, 1 mM EDTA, pH 7,0) y en presencia de 6,6 % de formaldehído. El gel se lavó tres veces en 2× SSC (SSC 1× es NaCl 0,15 M y citrato de sodio 0,015 M). La transferencia del RNA del gel a la membrana de nylon se llevó a cabo por capilaridad utilizando como tampón 10× SSC durante toda una noche con 200-600 g de peso y a temperatura ambiente. Después de la transferencia la membrana se lavó brevemente en 5× SSC. La fijación del RNA a la membrana se hizo por exposición a la luz UV durante 3 minutos.

La hibridación molecular utilizando sondas marcadas con digoxigenina y su posterior detección inmunológica se realizó utilizando el Kit “DIG High Prime labeling and detection starter Kit II” siguiendo el protocolo del fabricante. En primer lugar, se realizó un bloqueo de los sitios inespecíficos de unión, incubando las membranas en un horno de hibridación (TECHNE) a 37 °C o a 42 °C con DIG Easy Hyb (10 mL/10 cm²) durante 30 minutos. A continuación se hibridó la membrana, durante 24 horas a 42 °C, en la misma solución a la que se añadió la sonda Dig-DNA (25 ng mL⁻¹) previamente desnaturalizada mediante calentamiento a 100 °C durante 5 minutos. Se utilizaron sondas específicas de *AtHAK5* y *ThHAK5* de los 1000 y 600 últimos pares de bases, respectivamente. Tras realizar la hibridación, las membranas se lavaron 2 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente con la disolución de lavado 2× SSC, 0,1 % SDS.

La detección inmunológica se realizó incubando la membrana con un tampón de lavado (0,1 M ácido maléico, 0,15 M NaCl pH 7,5, 0,3 % Tween 20) durante 5 minutos, posteriormente se incubó la membrana durante 30 minutos en una solución de bloqueo: (agente bloqueante Roche diluido 1:10 en 0,1 M ácido maléico, 0,15 M NaCl pH 7,5). A continuación, se incubaron las membranas durante otros 30 minutos con una solución con el anticuerpo antidigoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche) diluida 1:10.000 en la solución de bloqueo.

Para eliminar el exceso de anticuerpo no unido, las membranas se lavaron con tampón de lavado 2 veces durante 15 minutos y se equilibró durante 5 minutos con el tampón de equilibrado (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl pH 9,5). Todos los pasos fueron realizados a temperatura ambiente. A continuación se pasaron las membranas a una

transparencia a la que se añadió el sustrato quimioluminiscente Lumigen CSPD (®Tropix), (3-(4-metoxiespiro{1,2-dioxietano-3,2'-(5'-cloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decano}-4-il) fenil fosfato. Una vez añadido el sustrato se incubó la transparencia 5 minutos a 25 °C y después 10 minutos a 37 °C. Finalmente la membrana se expuso en una película autorradiográfica durante 20-180 minutos.

Tras el revelado de la autorradiografía, los filtros se lavaron para eliminar la sonda y ser reutilizados. Para ello se hicieron dos lavados de 60 minutos a 80 °C en una solución de Tris-HCl pH 7.5, 50 % formamida y 5 % SDS. Finalmente se lavó el filtro otras dos veces a temperatura ambiente durante 5 minutos en 2× SSC.

La sonda de hibridación no radiactiva se preparó con 300 ng de fragmento de cDNA. Para el marcaje se utilizaron los Kit “High pure PCR product purification” de Roche, y “Dig high prime DNA labeling and detection starter Kit II” siguiendo las instrucciones suministradas por los fabricantes.

3.2.4.8 Síntesis de cDNA.

La primera cadena de cDNA se sintetizó a partir del RNA total extraído de las plantas. Para ello se utilizó el kit “First-strand cDNA Síntesis Kit” (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). Esta primera cadena de cDNA se obtuvo mediante transcripción reversa (RT), usando un cebador bifuncional Not I-d (T)18 y transcriptasa reversa, ambas proporcionadas por dicho Kit partiendo de 2 µg de RNA. Una vez obtenida la primera cadena de cDNA, la síntesis del cDNA de cadena doble se obtuvo mediante PCR utilizando cebadores apropiados.

La extensión de fragmentos de cDNA hacia el extremo 5' y el 3', de secuencias desconocidas, se realizó mediante la técnica de RACE utilizando el kit “5'/3' RACE Kit” de Roche. Para ello, a la primera cadena de cDNA anteriormente sintetizada se le añadió mediante una transferasa terminal una cadena poli A en su extremo 3'. A continuación, mediante PCR con un cebador sentido d(T)n y un cebador antisentido específico de la secuencia de cDNA se obtuvo el fragmento de cDNA correspondiente al extremo 5'. Para la extensión hacia el extremo 3' del cDNA de secuencia desconocida, se realizó una PCR con un cebador sentido específico de la secuencia del cDNA y un cebador antisentido complementario al cebador bifuncional NotI-d(T)18 empleado para la síntesis de la primera cadena de cDNA.

Capítulo 3

3.2.4.9 Amplificación por PCR de fragmentos de DNA.

Para cada reacción se utilizaron distintas cantidades de cDNA, 0,2 mM dNTP (dATP + dCTP + dGTP + dTTP, Roche), tampón de PCR, 1 U de Taq I DNA polimerasa (GE Life Sciences) y dos cebadores, uno sentido y otro antisentido en un volumen de 50 μ L. Las reacciones se llevaron a cabo usando el Termociclador PTC 200 (MJ Research).

En cada grupo de reacciones se introducía un control negativo sin cDNA. Se analizaron todas las reacciones mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar que se había producido la amplificación del DNA y que los productos de PCR tenían el tamaño adecuado.

Los productos de PCR se clonaron en el vector PCR2.1-TOPO usando el “Kit TOPO TA Cloning ®” (Invitrogen).

3.2.4.10 PCR cuantitativa (qPCR).

Para llevar a cabo el protocolo de PCR cuantitativa, se empleó el cDNA de una cadena sintetizado a partir de 2 μ g de RNA total.

Las reacciones se llevaron a cabo en un sistema 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando la configuración de ciclos por defecto. La etapa de la curva de disociación se añadió en cada reacción para comprobar que la T_m de los productos era correcta. Los niveles de expresión se calcularon mediante el método de cuantificación relativa (Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. 2001). Se añadieron 12,5 μ L de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) a cada pocillo, más 2 μ L de cDNA y 10,5 μ L de cebadores específicos disueltos en agua a una concentración final de 100 nM.

Se prepararon diluciones seriadas de cDNA de cada muestra para comprobar que la eficiencia de las reacciones era 100 ± 5 %. Se llevaron a cabo reacciones control en cada carrera para verificar que no tuvo lugar ninguna amplificación inespecífica. Los valores de $\Delta\Delta C_t$ se transformaron en expresión relativa de acuerdo con la siguiente ecuación: $\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los cebadores se diseñaron con el programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando la configuración por defecto (Temperatura de alineamiento = 60 °C, Longitud del amplicón = 50 pb). Se

emplearon los siguientes cebadores para amplificar secuencias de *LeHAK5* y *LeEF1 α* de microtomate:

- LeHAK5F 5' CCGTGTTACGCGCCTTTAA 3'
- LeHAK5R 5' TCCTTTTTTACCGTTTCTTTTGAAG 3'
- LeEF1 α F 5' GGCGGTGGCGAGCAT 3'
- LeEF1 α R 5' AAACCAAGGCACCTCAACAAA 3'

Se realizaron búsquedas en las bases de datos para confirmar que no se producían amplificaciones de otros genes. No se observaron diferencias en los valores de C_t de LeEF1 α entre los tratamientos. Así, se descartó un efecto sobre el metabolismo del mRNA por los tratamientos aplicados. El análisis de regresión se realizó con Sigma Plot 10 (Systat Software Inc., San Jose, California).

3.2.4.11 Secuenciación de DNA.

El DNA utilizado para la secuenciación se obtuvo por el método de lisis alcalina, y fue secuenciado en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

3.2.4.12 Análisis de hidrofobicidad.

El análisis de hidrofobicidad se llevó a cabo mediante el método descrito por Hofmann K. y Stoffel W. en 1993 (Hofmann K. y Stoffel W. 1993).

3.2.4.13 Alineamiento de secuencias de proteínas y generación del árbol filogenético.

El alineamiento de las secuencias de proteínas y el árbol filogenético se obtuvieron usando el programa Clustal X y el Treeview (Thompson, J. D. y col. 1997).

3.2.4.14 PCR mutagénica.

La PCR mutagénica se realizó de acuerdo a Wong y col. en 2007 (Wong, T. S. y col. 2007) por los dos métodos, dirigidos hacia transversiones (menos cantidad de dGTP) y hacia transiciones (menos dATP) para abarcar el mayor amplio rango de mutaciones.

Capítulo 3

La Tabla 3.5 muestra con detalle las proporciones de reactivos para la PCR:

Tabla 3.5. *Composición detallada de la mezcla de reacción utilizada para cada tipo de PCR.*

Reactivo\Tipo PCR	Transiciones	Transversiones	Normal
cDNA	15ng	15ng	Variable
dCTC	1 mM	1 mM	0,2 mM
dTTP	1 mM	1 mM	0,2 mM
dATP	0,2 mM	1 mM	0,2 mM
dGTP	1 mM	0,2 mM	0,2 mM
Cebadores	30 pmol	30 pmol	Variable
MgCl ₂	7 mM	7 mM	1.5 mM
MnCl ₂	0.5 mM	0.5 mM	0
KCl	50 mM	50 mM	50 mM
Taq Polimerasa	2	2	1
V. Final	50	50	50
Nº ciclos	30	30	Variable

3.2.5 Transformación de células.

3.2.5.1 Transformación de *E. coli*.

La transformación de *E. coli* se realizó mediante electroporación. Se usaron células competentes de la estirpe DH5 α . Se introdujo una mezcla de DNA con células competentes en una cubeta de 0,2 cm y se aplicó un pulso de 3 kV, 25 μ F, 200 Ω y

aproximadamente 5 milisegundos de duración en un electroporador Micropulser (BioRad, Hercules CA, EEUU). Se añadieron tras el pulso 800 μ L de LB y se incubó la mezcla a 37 °C durante una hora en agitación. Posteriormente, se recogieron las células tras una centrifugación y se extendieron en LB sólido con el antibiótico correspondiente. Como control de transformación positivo se adicionaron siempre 20 μ g del plásmido pPUC18.

3.2.5.2 Transformación de *S. cerevisiae*.

Para transformar *S. cerevisiae* se usó el método del acetato de litio. Se preparó un cultivo inoculando células en 10 mL de YPD e incubándolo toda la noche a 28 °C en agitación. Se pasaron 1,5 mL del cultivo a microtubos en esterilidad, se centrifugó para precipitar las células y poder eliminar el sobrenadante. Tras lavar con 0.5 mL de agua estéril, se centrifugó y se añadieron 1-2 μ g de DNA plasmídico.

Sobre el DNA se añadieron 5 volúmenes (500 μ L) de solución PLATE (40 % PEG 4000, 0,1 M acetato de litio, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA) mezclando brevemente. Se incubaron las células en esta solución durante toda la noche a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se recogieron las células por centrifugación, se resuspendieron en agua y se extendieron en placas de medio selectivo.

Para la obtención de mutantes de *AtHAK5* se introdujeron los fragmentos amplificados y mutados por PCR del gen junto al plásmido pDR195 (ratio 10:1) directamente en levadura como se ha descrito otras veces (Rubio, F. y col. 1999). El plásmido se añadió digerido con las enzimas de restricción apropiadas y abierto como muestra la Figura 3.3. El gen mutado por PCR y el plásmido vacío purificado compartían una secuencia de al menos 50 pares de bases en ambos extremos para que se pueda realizar la recombinación homóloga por parte de *S. cerevisiae* (Muhlrad, D. y col. 1992) y así reconstruir el plásmido con un inserto funcional (Figura 3.3).

Para mejorar la eficiencia de clonaje se hicieron algunas modificaciones en la transformación. El preinóculo de *S. cerevisiae* se creció hasta una densidad óptica a 600 nm equivalente a $1-2 \times 10^7$ células por mL. Tras comprobar el crecimiento se añadieron 0,5 volúmenes de YPD más K^+ y se continuó el crecimiento a 28 °C durante 4 horas (2 generaciones aproximadamente). Pasado este tiempo se pasaron a alícuotas de 1,5 mL en microtubos y se centrifugaron. Se lavaron las alícuotas con 0,5 mL de agua estéril, se repitió la centrifugación y se resuspendió con el DNA a clonar más 50 μ g de DNA de

Capítulo 3

cadena sencilla (Roche, Indianápolis, IN, EE.UU.). Se agitó la mezcla en un agitador y se dio un choque térmico de 15 minutos en un baño a 42 °C .

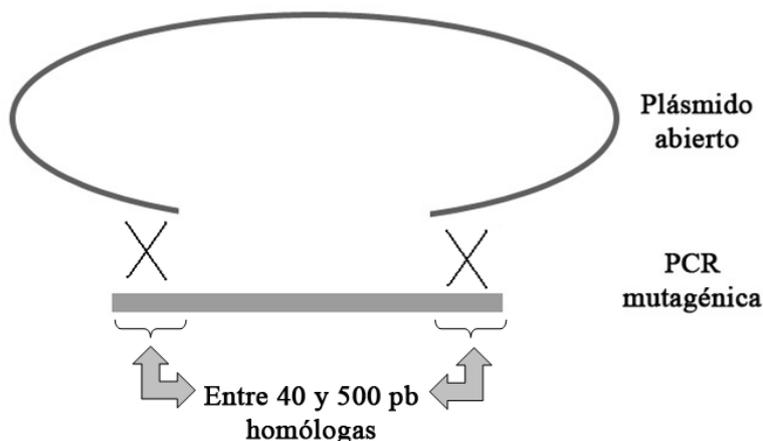


Figura 3.3. *Proceso de recombinación llevado a cabo por la levadura entre el plásmido abierto y el producto de PCR. Son necesarias entre 40 y 500 pares de bases de idéntica secuencia para que se realice la recombinación con éxito. Por ello los cebadores de la PCR mutagénica se diseñaron para que la amplificación comenzase desde el plásmido pDR195.*

La técnica se terminó igual, al día siguiente, precipitando, lavando y pasando a cultivo sólido en un medio sin uracilo para que crezcan sólo las células transformadas. Sobre cada placa de células transformadas se hizo un tampón copia, con fieltro esterilizado, y se replicó la placa original en distintos medios selectivos. De las placas selectivas se seleccionaron las colonias que presentaban mejor crecimiento para su posterior análisis.

3.2.6 Ensayos de crecimiento de levaduras en medio sólido.

Para estudiar el crecimiento de WΔ3 con el plásmido vacío y de WΔ3 transformada con *ThHAK5* en sólido, se prepararon placas de FA suplementadas con 0,1 mM 0,5 mM, 1 mM o 10 mM de K⁺. Con este fin, se prepararon primero cultivos celulares sólidos de WΔ3 y de WΔ3 transformada con *ThHAK5* en medios con K⁺ suficiente para el crecimiento de ambas cepas (SD sin uracilo y con 100 mM de K⁺). Cuando el cultivo sólido estaba suficientemente crecido se hicieron cuatro diluciones seriadas con densidades ópticas a 600 nm de: 1, 1:10, 1:100 y 1:1000. Posteriormente se

sembraron gotas de 10 μ L en dichos medios sólidos. Las placas se incubaron a 28 °C durante distintos tiempos según los casos.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para analizar los clones derivados de la PCR mutagénica de *AtHAK5* en la cepa 9.3.

3.2.7 Ensayos de transporte iónico en levaduras.

En las determinaciones de transporte iónico se midieron las velocidades iniciales de acumulación de cationes, tomando muestras a distintos tiempos y determinando el contenido interno del ion correspondiente mediante espectrometría de absorción atómica (Camacho, M. y col. 1981). Para evitar el uso de isótopos radiactivos de K^+ se utilizó el ion Rb^+ como trazador de flujos de K^+ (Rodríguez-Navarro, A. y Ramos, J. 1984).

Para los ensayos de agotamiento de Rb^+ , la cepa W Δ 3 transformada con *ThHAK5* en pDR195 se creció durante unas 14 horas a 28 °C en agitación en 50-100 mL de medio FA suplementado con 3 mM K^+ ; y la cepa W Δ 3 transformada con el plásmido sin inserto pDR195 en FA suplementado con 30 mM K^+ , hasta una $DO_{600} \approx 0,3$. Tras este periodo se retiró el K^+ externo. Para ayunarlas de K^+ las células se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos, se lavaron 2 veces con agua bidestilada, se resuspendieron en medio fresco FA (0 mM K^+) y se incubaron durante 6 horas más a 28 °C con agitación. Después de este periodo de ayuno las células se transfirieron a 50 mL de tampón de ensayo [10 mM de MES y 0,1 mM de $MgCl_2$ ajustado a pH 6,0 con $Ca(OH)_2$], suplementado con 2 % de glucosa justo antes del experimento, y distintas cantidades de Rb^+ (que significaban el tiempo cero). Seguidamente se tomaron muestras de células a intervalos regulares filtrando un volumen (5-10 mL) de cultivo en filtros (Millipore de 0,8 μ m de tamaño de poro) conectados a una bomba de vacío. Los filtros con células se lavaron externamente 2 veces con 5 mL de una solución 20 mM de $MgCl_2$. Para extraer los cationes celulares, los filtros se incubaron en tubos de 10 mL con 5 mL de una solución de 0,1 M HCl, 10 mM $MgCl_2$ durante toda la noche. Posteriormente los tubos se centrifugaron para depositar los restos celulares y se determinó la concentración de Rb^+ en la solución en un espectrómetro de absorción atómica, en el modo de emisión.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio de la tolerancia a NaCl en el rango de la baja afinidad de absorción de K⁺. Comparación de *Thellungiella halophila* y *Arabidopsis thaliana*.

Se llevó a cabo un estudio para comparar fisiológicamente *A. thaliana* y *T. halophila* en condiciones control y en presencia de NaCl. Comparar dos especies tan cercanas que difieren en su tolerancia a la salinidad puede dar información sobre los mecanismos implicados en dicha tolerancia.

Uno de los nutrientes más afectados por la salinidad es el K⁺ ya que Na⁺ y K⁺ comparten características similares que conducen a la sustitución del K⁺ de sus funciones fisiológicas cuando la concentración salina externa es elevada. Por ello, mantener la homeostasis K⁺/Na⁺ es crucial a la hora de tolerar la salinidad, y la función que desempeñan canales y transportadores de K⁺ y Na⁺ en las diferentes membranas celulares de las plantas es de especial importancia en este proceso.

Para estudiar posibles diferencias en dicha homeostasis en el rango de la baja afinidad de absorción K⁺, se realizaron una serie de experimentos como se describe a continuación.

Se realizó un experimento previo de crecimiento en condiciones control para determinar en qué momento aplicar los tratamientos salinos, de tal forma que ambas especies recibieran la sal con un tamaño similar. Así, se crecieron las plantas de *A. thaliana* durante 4 semanas y las plantas de *T. halophila* durante 6 semanas. Tras este periodo se aplicaron los tratamientos salinos (de 0, 5, 15, 30, 60 y 90 mM de NaCl para *A. thaliana*, y 0, 15, 30, 60, 90, 125 y 250 para *T. halophila*), gradualmente durante tres días hasta alcanzar la concentración final, excepto en el tratamiento de 250 mM de NaCl que se realizó aumentando 30 mM de NaCl cada día (8 días). Se realizaron tres cosechas de las plantas, antes de empezar el tratamiento salino, a los 11 y a los 18 días (tiempo 0,

11 y 18 respectivamente) y las plantas se separaron en raíz y parte aérea. Se muestran sólo las cosechas a tiempo 0 y 18 ya que fue donde se encontraron mayores diferencias.

4.1.1 Parámetros fisiológicos bajo condiciones control no salinas.

En primer lugar se comparó el estado nutricional de *A. thaliana* y *T. halophila* en condiciones control a tiempo 0 y 18 días. Las velocidades de crecimiento en raíz y parte aérea se determinaron para las dos especies y se observó que no había diferencias significativas bajo las condiciones control (no mostrado). Sin embargo, aunque los órganos de ambas especies crecían a velocidades similares, el tamaño relativo de la raíz con respecto a la parte aérea era significativamente distinto. Así, con respecto a la parte aérea, la raíz de *T. halophila* era mayor que la de *A. thaliana*, dando lugar a relaciones raíz/parte aérea mayores (Figura 4.1) en condiciones control sin NaCl.

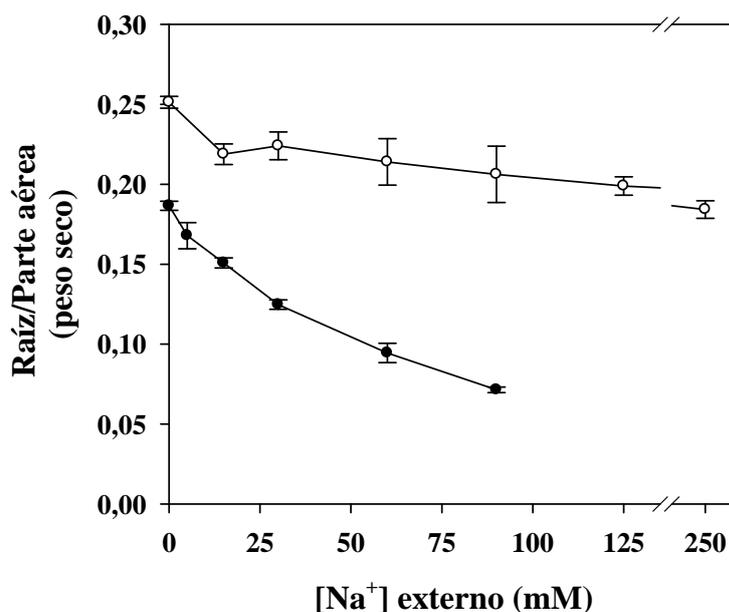


Figura 4.1. Relación raíz/parte aérea de peso seco de *A. thaliana* (círculos negros) y *T. halophila* (círculos blancos) a diferentes concentraciones de Na⁺ externo. El NaCl se aplicó durante 18 días. Se muestran las medias de al menos 5 plantas. Las barras de error corresponden al error estándar.

Las concentraciones de K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺ fueron determinadas para la condición control sin sal (Tabla 4.1). Las concentraciones de K⁺ fueron mayores en *T. halophila* que en *A. thaliana*. En la raíz fueron 1,5 veces mayores y en la parte aérea fueron 3 veces mayores. En cuanto a la distribución, encontramos que mientras en *T. halophila* la

raíz y la parte aérea mostraban concentraciones similares, en *A. thaliana* la concentración de la raíz era aproximadamente el doble que la de la parte aérea. Por su parte, las concentraciones de Ca^{2+} en la parte aérea de *A. thaliana* fueron 1,7 veces mayores que las de *T. halophila*, pero las de las raíces fueron 1,2 veces menores, mostrando también una distinta distribución del Ca^{2+} (7,7 veces mayor en la parte aérea de *A. thaliana* que en sus raíces). Por último, las concentraciones de Mg^{2+} en las partes aéreas fueron similares para ambas especies, mientras que las raíces de *A. thaliana* mostraron un concentración 1,7 veces menor que en *T. halophila*.

Tabla 4.1. Concentraciones de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} ($\mu\text{moles g}_{\text{PS}}^{-1}$) de raíces y parte aéreas de ambas especies en condiciones control no salinas a los 18 días.

		[K^+]	[Ca^{2+}]	[Mg^{2+}]
<i>Arabidopsis</i>	Shoot	526,1 ± 42,7	1.098,4 ± 27,0	140,7 ± 9,4
	Root	962,1 ± 78,6	143,5 ± 5,9	69,2 ± 2,4
<i>Thellungiella</i>	Shoot	1.559,4 ± 73,6	640,5 ± 19,7	153,6 ± 10,3
	Root	1.504,5 ± 102,3	176,8 ± 3,0	119,7 ± 11,3

Medias ($\mu\text{moles g}_{\text{PS}}^{-1}$) de al menos 5 plantas con el error estándar.

Las tasas de absorción y transporte de K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} también fueron calculadas para las condiciones control sin sal (Tabla 4.2). *T. halophila* mostró una tasa de absorción y transporte de K^+ 2 veces mayor que *A. thaliana*. Por el contrario, la tasa de absorción y la de transporte a la parte aérea para el Ca^{2+} fue cercana a 2,5 veces superior en *A. thaliana*. La absorción y transporte de Mg^{2+} fue similar para las dos especies, aunque mayor en *A. thaliana*.

Tabla 4.2. Tasa de absorción específica (SAR) y de transporte a la parte aérea (TRANS) para el K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} de ambas especies en condiciones control no salinas en el día 18.

		[K ⁺]	[Ca ²⁺]	[Mg ²⁺]
<i>Arabidopsis</i>	SAR	314,9 ± 18,4	544,1 ± 27,0	74,5 ± 7,4
	TRANS	225,8 ± 25,0	531,7 ± 26,3	67,7 ± 7,1
<i>Thellungiella</i>	SAR	605,5 ± 38,7	221,3 ± 9,5	55,1 ± 5,1
	TRANS	474,1 ± 27,6	212,6 ± 9,3	47,7 ± 4,1

Medias ($\mu\text{mol g}_{\text{PSraíz}}^{-1} \text{d}^{-1}$) de al menos 5 plantas con el error estándar.

4.1.2 Efecto del NaCl en el crecimiento de raíz y parte aérea.

Se determinó el efecto del NaCl de la solución externa sobre las velocidades de crecimiento (Figura 4.2). Las tasas de crecimiento a las diferentes concentraciones de NaCl se expresaron como porcentaje sobre la tasa de crecimiento en condiciones no salinas. El NaCl redujo el crecimiento en las dos especies con un efecto mayor sobre la raíz. Sin embargo, en *T. halophila*, la presencia de NaCl redujo el crecimiento de la planta en menor medida que en *A. thaliana*. Por ejemplo, a 90 mM de NaCl, el crecimiento de la raíz de *T. halophila* se redujo en un 60% con respecto al control sin NaCl, mientras que en *A. thaliana* el crecimiento de la raíz quedó prácticamente inhibido al completo. En la parte aérea se observó un efecto similar, y mientras en *T. halophila* el crecimiento se redujo al 78%, en *A. thaliana* se redujo al 30%.

Como se ha descrito anteriormente, la relación raíz/parte aérea en condiciones control sin NaCl, fue mayor en *T. halophila* que en *A. thaliana*. Al incrementar el Na⁺ en la solución de crecimiento esta diferencia se intensificó porque las raíces de *A. thaliana* se vieron mucho más afectadas por el tratamiento salino que las raíces de *T. halophila*. Así, a 90 mM de NaCl, *T. halophila* mostró una relación raíz/parte aérea 3 veces mayor que *A. thaliana* (Figura 4.1).

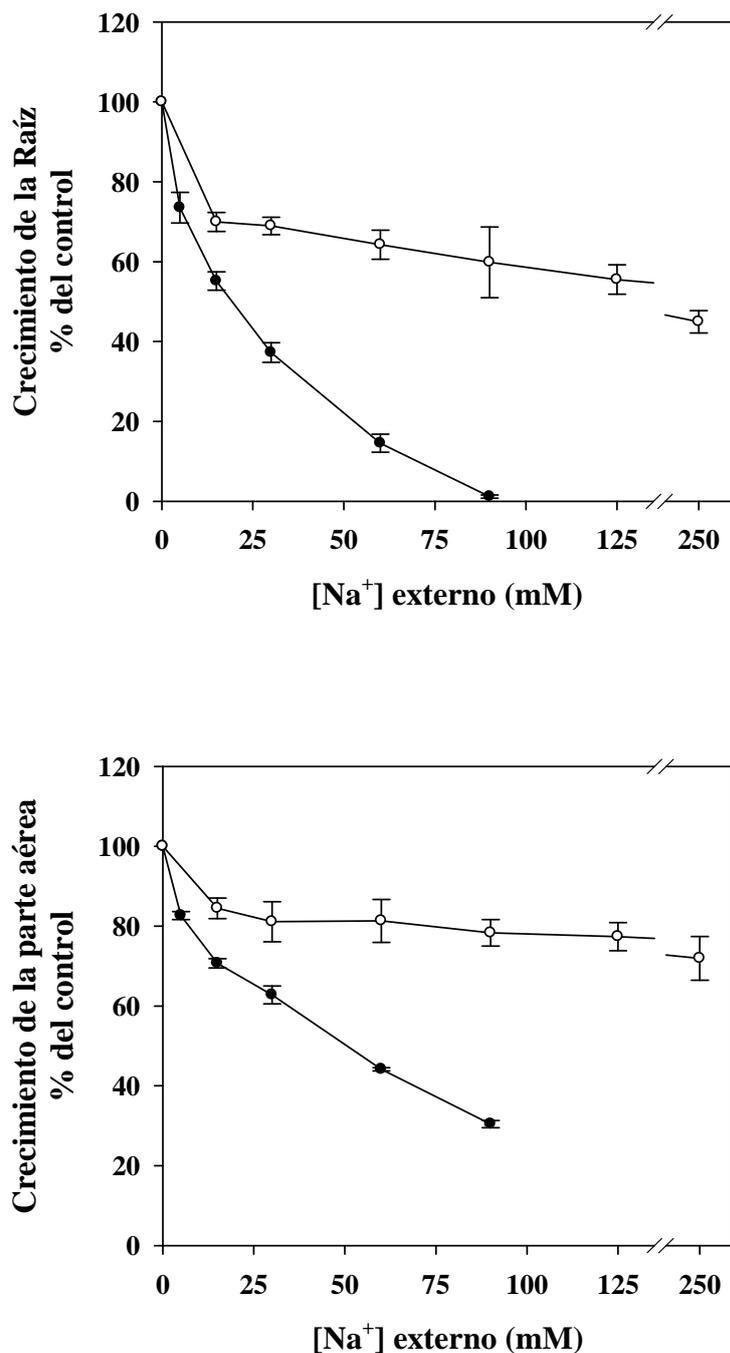


Figura 4.2. Crecimiento relativo al control sin sal de raíz (A) y parte aérea (B) de peso seco de *A. thaliana* (círculos negros) y *T. halophila* (círculos blancos) a diferentes concentraciones de Na⁺ externo. El NaCl se aplicó durante 18 días. Se muestran las medias de al menos 5 plantas con error estándar.

4.1.3 K⁺: Concentraciones tisulares, absorción y transporte.

Se analizó el efecto del NaCl externo en la concentración tisular de K⁺. Las concentraciones de K⁺ a las diferentes concentraciones de Na⁺ se refirieron al control sin Na⁺, que fue tomado como el 100 %.

El incremento del NaCl en la solución nutritiva disminuyó las concentraciones de K⁺ en la raíz de ambas especies (Figura 4.3). Sin embargo, la reducción fue más pronunciada en *A. thaliana* que en *T. halophila* y a 90 mM de NaCl la concentración de K⁺ en la raíz se redujo hasta el 82 % del control en *T. halophila* y hasta el 38 % en *A. thaliana*.

En la parte aérea de *A. thaliana* las concentraciones de K⁺ descendieron al incrementar la concentración externa de NaCl hasta 30 mM y luego se incrementaron. En *T. halophila* las concentraciones de K⁺ de la parte aérea se redujeron conforme se aumentaba el Na⁺ externo hasta 60 mM pero desde esta concentración hasta la final de 250 mM, no se observaron mayores reducciones (Figura 4.4).

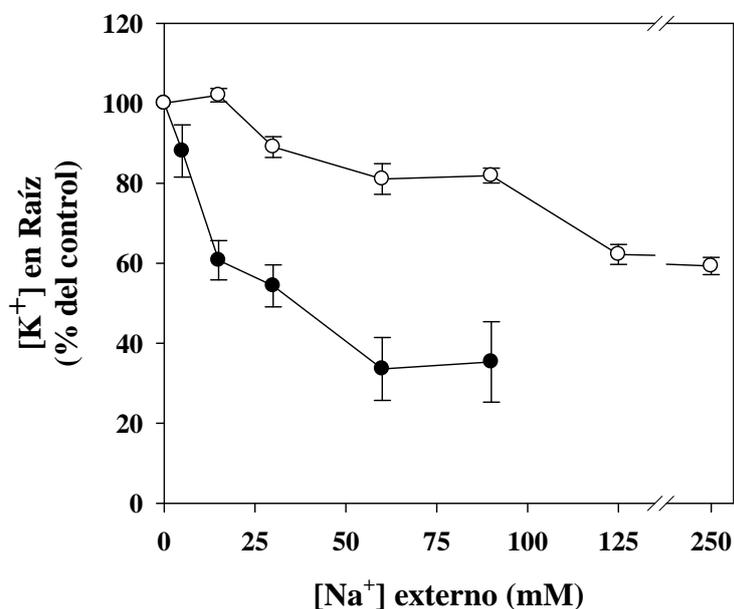


Figura 4.3. Concentraciones de K⁺ de raíz de *A. thaliana* (círculos negros) y *T. halophila* (círculos blancos) a diferentes concentraciones de Na⁺ externo. Valores relativos al 100% del control sin sal, a los 18 días de tratamiento. Se muestran las medias de al menos 5 plantas con error estándar.

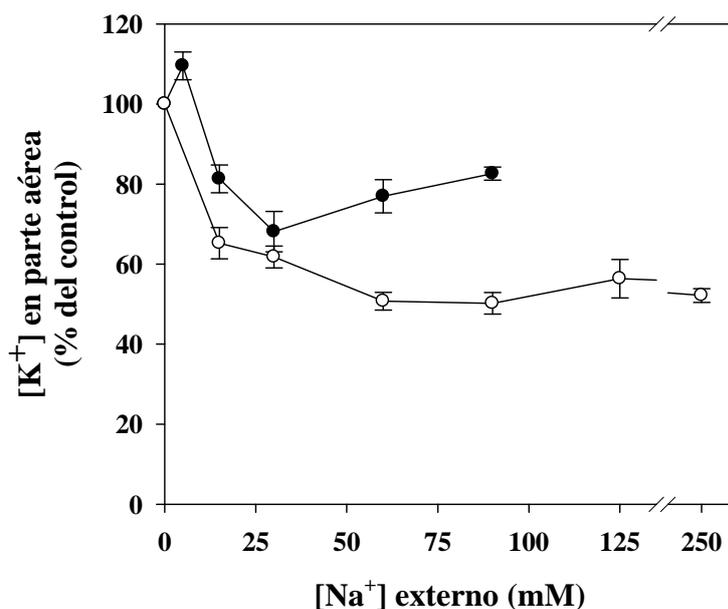


Figura 4.4. Concentraciones de K^+ de la parte aérea de *A. thaliana* (círculos negros) y *T. halophila* (círculos blancos) a diferentes concentraciones de Na^+ externo. Valores relativos al 100% del control sin sal, a los 18 días de tratamiento. Se muestran las medias de al menos 5 plantas con error estándar.

Las diferencias observadas en las concentraciones de K^+ de raíz y parte aérea de *T. halophila* y *A. thaliana* podrían ser debidas a diferencias en la absorción y/o el transporte de K^+ a la parte aérea, y estos dos parámetros fueron calculados. Tomando como referencia el control sin sal, la absorción de K^+ (SAR) a las diferentes concentraciones de Na^+ en la solución externa fue calculada como porcentaje sobre dicho control. Se observó que en ambas especies la absorción de K^+ descendía cuando aumentaban las concentraciones externas de NaCl (Figura 4.5).

En *T. halophila* la reducción de la absorción fue menos pronunciada que en *A. thaliana*. A 60 mM de NaCl, la tasa de absorción de *T. halophila* se redujo al 36% mientras que en *A. thaliana* llegó hasta el 18%. Mayores incrementos en la concentración de Na^+ externo no redujeron más la absorción de K^+ de *T. halophila* mientras que a 90 mM de Na^+ en *A. thaliana* la absorción estaba completamente inhibida.

De forma paralela a las tasas de absorción, se calcularon las tasas de transporte de la raíz a la parte aérea (TRANS). El incremento de la concentración externa de Na^+ produjo disminuciones similares de la tasa de transporte en ambas especies (Figura 4.6).

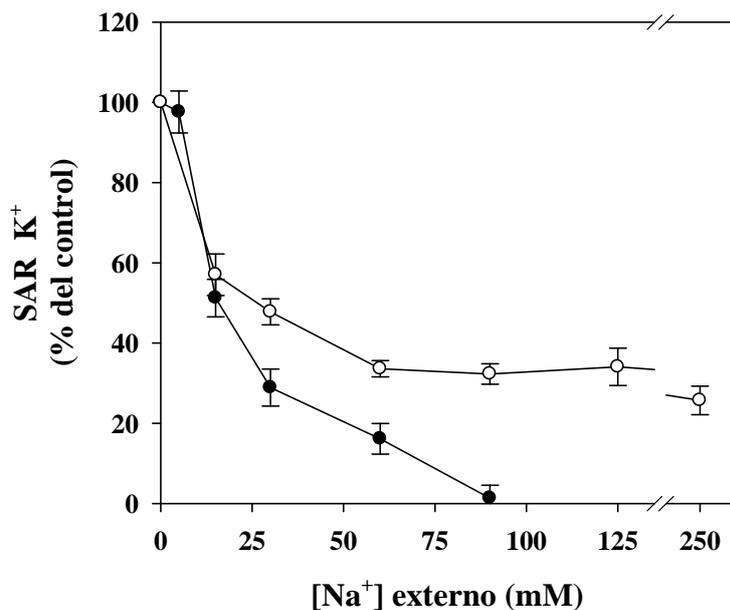


Figura 4.5. Tasa de absorción específica (SAR) de K⁺ en *A. thaliana* (círculos negros) y *T. halophila* (círculos blancos) a diferentes concentraciones de Na⁺ externo. Valores relativos al 100% del control sin sal, a los 18 días de tratamiento. Se muestran las medias de al menos 5 plantas con error estándar.

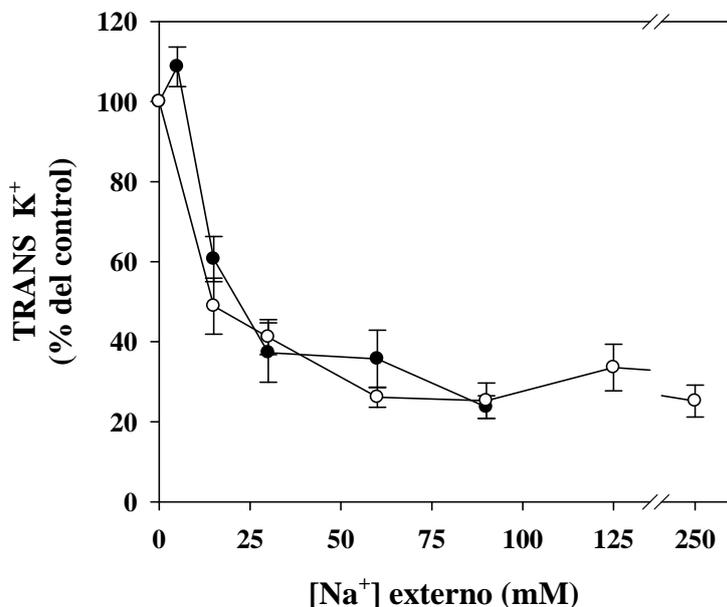


Figura 4.6. Tasa de transporte específico (TRANS) de la raíz a la parte aérea de K⁺ en *A. thaliana* (círculos negros) y *T. halophila* (círculos blancos) a diferentes concentraciones de Na⁺ externo. Valores relativos al 100% del control sin sal, a los 18 días de tratamiento. Se muestran las medias de al menos 5 plantas con error estándar.

4.1.4 Na^+ : concentraciones tisulares, absorción y transporte.

Las concentraciones de Na^+ en raíz (Figura 4.7) y parte aérea (Figura 4.8) fueron determinadas. Las raíces de *T. halophila* y *A. thaliana* mostraron incrementos en la concentración de Na^+ al incrementar las concentraciones externas de Na^+ al mismo nivel hasta 30 mM de NaCl. Mayores incrementos de Na^+ externo produjeron un mayor aumento en las concentraciones de Na^+ de la raíz de *T. halophila* que de *A. thaliana*, aunque no significativamente. A 90 mM de NaCl, *T. halophila* mostró unas concentraciones internas de Na^+ en la raíz 1,4 veces superiores que *A. thaliana*.

Lo contrario se observó en la parte aérea. El incremento en las concentraciones de Na^+ al incrementar el Na^+ externo fueron mucho mayores en *A. thaliana*. A 90 mM de NaCl, la parte aérea de *A. thaliana* mostró una concentración interna de Na^+ dos veces mayor que *T. halophila*.

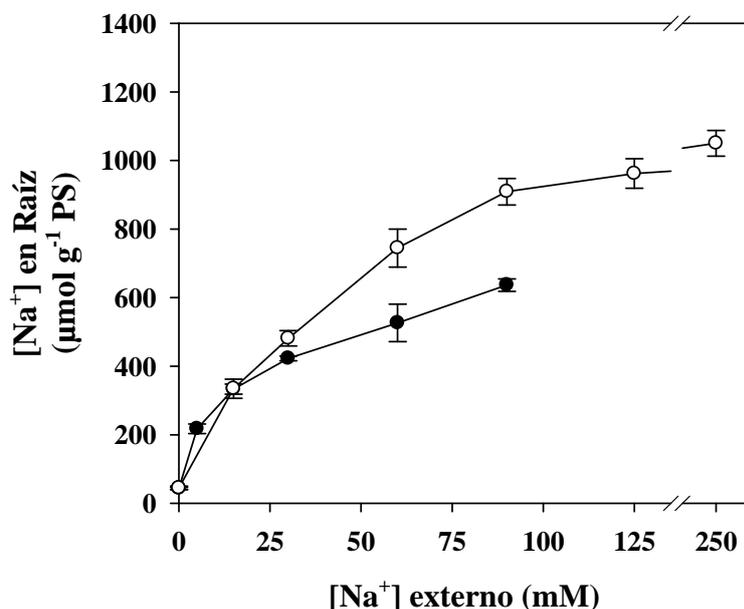


Figura 4.7. Concentraciones de Na^+ en la raíz de *A. thaliana* (círculos negros) y *T. halophila* (círculos blancos) a diferentes concentraciones de Na^+ externo tras 18 días de tratamiento. Media de al menos 5 plantas con error estándar.

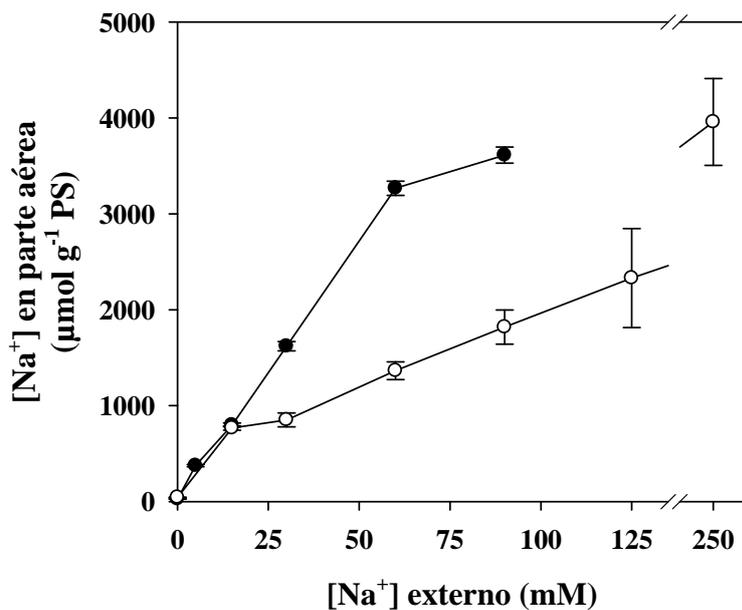


Figura 4.8. Concentraciones de Na⁺ en las raíces de *A. thaliana* (círculos negros) y *T. halophila* (círculos blancos) a diferentes concentraciones de Na⁺ externo tras 18 días de tratamiento. Media de al menos 5 plantas con error estándar.

El contenido total de Na⁺ de toda la planta también fue determinado y se observó que los niveles de *A. thaliana* fueron muy superiores a los de *T. halophila* (Figura 4.9).

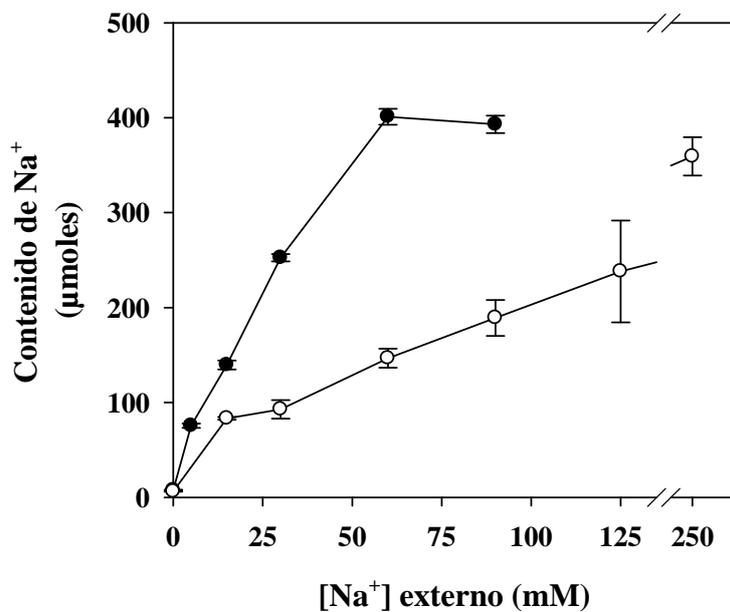


Figura 4.9. Contenido total de Na⁺ de las plantas de *A. thaliana* (círculos negros) y *T. halophila* (círculos blancos) a diferentes concentraciones de Na⁺ externo tras 18 días de tratamiento. Media de al menos 5 plantas con error estándar.

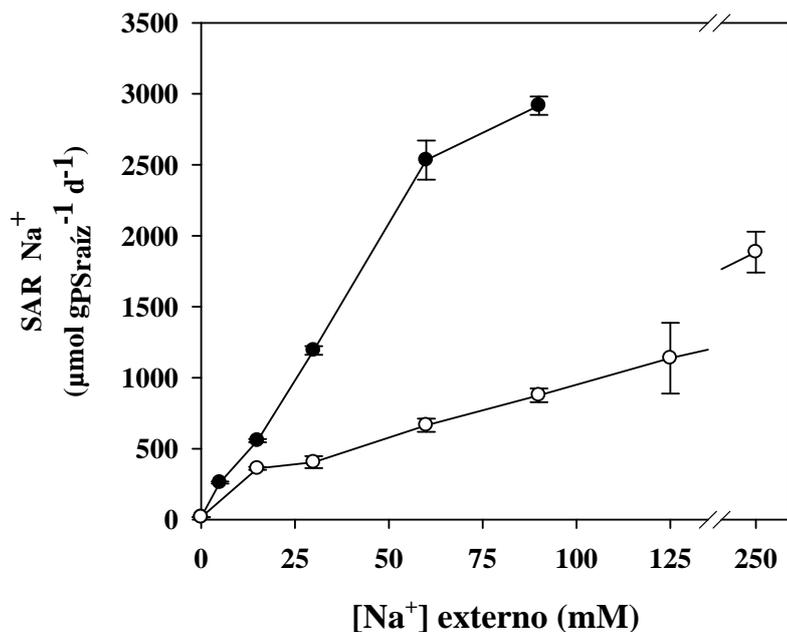


Figura 4.10. Absorción específica de Na^+ (SAR, $\mu\text{mol g}_{\text{PSraíz}}^{-1} \text{d}^{-1}$) de *A. thaliana* (círculos negros) y *T. halophila* (círculos blancos) a diferentes concentraciones de Na^+ externo tras 18 días de tratamiento. Media de al menos 5 plantas con error estándar.

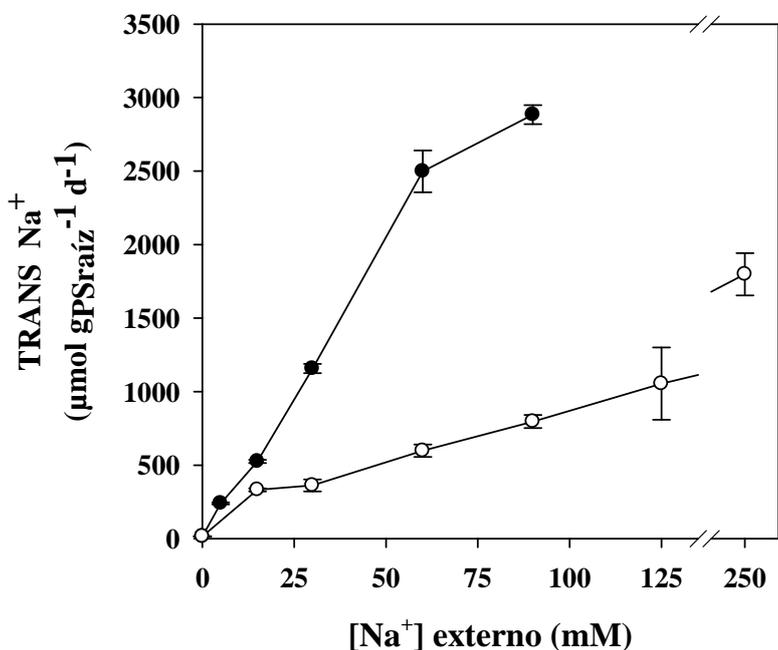


Figura 4.11. Transporte específico (TRANS; $\mu\text{mol g}_{\text{PSraíz}}^{-1} \text{d}^{-1}$) de Na^+ de la raíz a la parte aérea en *A. thaliana* (círculos negros) y *T. halophila* (círculos blancos) a diferentes concentraciones de Na^+ externo tras 18 días de tratamiento. Media de al menos 5 plantas con error estándar.

También se calculó la absorción específica de Na^+ (SAR) (Figura 4.10). *A. thaliana* mostró una mayor absorción de Na^+ que *T. halophila*. A 60 mM de NaCl externo, la tasa de absorción en *A. thaliana* fue cuatro veces superior a la de *T. halophila*. El transporte (TRANS) de Na^+ de la raíz a la parte aérea (Figura 4.11) mostró un patrón similar al de la absorción.

4.1.5 Ca^{2+} : Concentraciones tisulares, absorción y transporte.

Se analizó el efecto del NaCl externo sobre las concentraciones internas de Ca^{2+} en raíz y parte aérea. Tomando como referencia el control sin NaCl, los incrementos hasta 60 mM de NaCl supusieron incrementos en las concentraciones de Ca^{2+} en la raíz de *A. thaliana*. Un aumento de la concentración externa hasta 90 mM conllevó una reducción en la concentración de Ca^{2+} en la raíz de *A. thaliana*. Por el contrario, en *T. halophila*, los incrementos en la concentración externa de Na^+ produjeron disminuciones en las concentraciones de Ca^{2+} en la raíz (Tabla 4.3).

En la parte aérea de *A. thaliana*, los incrementos de Na^+ externo hasta 30 mM redujeron las concentraciones de Ca^{2+} y mayores aumentos de Na^+ externo llevaron a incrementos en las concentraciones de Ca^{2+} en la parte aérea. En *T. halophila*, las concentraciones de Ca^{2+} en la parte aérea disminuyeron al aumentar el Na^+ externo (Tabla 4.3).

La absorción de Ca^{2+} y su transporte de la raíz a la parte aérea fueron también determinados (Tabla 4.4). El aumento en la concentración externa de Na^+ redujo la absorción y transporte en ambas especies. Sin embargo, en *T. halophila* la reducción fue menos pronunciada que en *A. thaliana*.

4.1.6 Mg^{2+} : Concentraciones tisulares absorción y transporte.

Las concentraciones de Mg^{2+} en la raíz disminuyeron en ambas especies a partir de 60 mM el NaCl externo (Tabla 4.3). El Na^+ produjo un mayor descenso de las concentraciones de Mg^{2+} en la raíz en *A. thaliana*. En la parte aérea, la reducción de las concentraciones de Mg^{2+} fue también más pronunciada en *A. thaliana* que en *T. halophila* hasta 30 mM de NaCl externo. La absorción de Mg^{2+} y su transporte de la raíz a la parte aérea disminuyeron al aumentar el Na^+ externo (Tabla 4.4). La reducción fue mayor en *A. thaliana* que en *T. halophila*.

Tabla 4.3. Concentraciones en raíz y parte aérea de *A. thaliana* (*At*) y *T. halophila* (*Th*) de Mg^{2+} y Ca^{2+} a concentraciones crecientes de NaCl.

		NaCl (mM)								
		0	5	15	30	60	90	125	250	
[Ca ²⁺]	Raíz	At	100	120,1 ± 7,0	119,5 ± 9,7	139,3 ± 2,8	152,9 ± 7,5	120,9 ± 4,1	—	—
		Th	100	—	87,1 ± 1,0	77,9 ± 1,8	71,4 ± 2,2	60,0 ± 1,9	47,8 ± 1,5	46,1 ± 1,9
	Parte aérea	At	100	76,1 ± 1,8	59,3 ± 1,7	48,6 ± 2,2	53,7 ± 1,7	56,7 ± 1,1	—	—
		Th	100	—	80,5 ± 2,7	66,1 ± 2,7	54,3 ± 1,7	42,3 ± 1,7	41,0 ± 1,4	40,7 ± 2,6
[Mg ²⁺]	Raíz	At	100	105,0 ± 3,0	99,9 ± 3,5	102,3 ± 2,2	79,8 ± 1,9	48,8 ± 0,9	—	—
		Th	100	—	97,1 ± 4,8	99,7 ± 6,6	81,9 ± 4,1	88,1 ± 5,8	74,2 ± 6,0	58,1 ± 3,4
	Parte aérea	At	100	88,3 ± 1,0	70,4 ± 3,6	63,8 ± 4,0	66,8 ± 4,1	64,0 ± 1,5	—	—
		Th	100	—	92,4 ± 2,8	81,0 ± 4,8	71,9 ± 2,5	65,2 ± 3,2	54,6 ± 3,1	49,7 ± 2,8

Los valores se muestran relativos al tratamiento control sin NaCl como medias de al menos 5 plantas con el error estándar.

Tabla 4.4. Porcentajes de absorción (*Abs*) y transporte (*Trans*) de raíz a parte aérea de Ca^{2+} y Mg^{2+} con respecto al tratamiento control sin NaCl para *A. thaliana* (*At*) y *T. halophila* (*Th*) a concentraciones crecientes de NaCl.

		NaCl (mM)								
		0	5	15	30	60	90	125	250	
Ca ²⁺	Abs	At	100	65,7 ± 4,6	39,5 ± 2,7	23,0 ± 4,1	18,4 ± 2,5	7,0 ± 2,8	—	—
		Th	100	—	72,6 ± 3,5	51,1 ± 2,2	37,0 ± 1,7	20,1 ± 2,5	17,2 ± 1,9	14,4 ± 2,5
	Trans	At	100	64,8 ± 4,6	38,3 ± 2,6	21,6 ± 4,1	17,7 ± 2,4	7,7 ± 2,9	—	—
		Th	100	—	74,2 ± 3,6	52,6 ± 2,2	38,7 ± 2,0	22,5 ± 2,7	20,5 ± 1,9	18,3 ± 2,5
Mg ²⁺	Abs	At	100	81,6 ± 4,3	54,6 ± 5,3	44,6 ± 6,0	35,6 ± 7,7	13,7 ± 4,0	—	—
		Th	100	—	85,5 ± 4,6	69,3 ± 6,0	55,6 ± 2,9	47,4 ± 4,8	30,7 ± 4,2	17,9 ± 2,9
	Trans	At	100	80,6 ± 4,3	52,7 ± 5,4	43,0 ± 6,0	37,7 ± 7,7	17,9 ± 4,1	—	—
		Th	100	—	88,6 ± 4,8	69,3 ± 8,1	58,6 ± 3,9	49,0 ± 6,0	33,1 ± 3,8	23,8 ± 3,0

Los valores se muestran relativos al tratamiento control sin NaCl como medias de al menos 5 plantas con el error estándar.

4.1.7 Discusión.

En este apartado se ha llevado un estudio comparativo del efecto de la salinidad a largo plazo sobre *A. thaliana* y *T. halophila*, en condiciones de suministro de K^+ dentro del rango del sistema de absorción de baja afinidad. En otros estudios anteriores, se analizaron los efectos del NaCl en plantas de *T. halophila* y *A. thaliana* cultivadas en arena, en los que no se llevó a cabo análisis en las raíces (Ghars, M. A. y col. 2008). También se habían estudiado previamente las respuestas tempranas a la salinidad de estas dos especies tras incrementos súbitos de NaCl (Volkov, V. y col. 2004). En el estudio que aquí se describe las plantas fueron crecidas en cultivo hidropónico y el NaCl estuvo presente durante 18 días de crecimiento. Por tanto el estudio presentado se llevó a cabo con plantas adaptadas a la salinidad en un estado estacionario de crecimiento. El cultivo hidropónico permitió recolectar tanto la parte aérea como la raíz para análisis y el estudio de ambos órganos por separado. De esta forma, a diferencia con los estudios previos, se han podido caracterizar en ambas especies parámetros importantes para la tolerancia a la salinidad como el crecimiento, la composición mineral y las tasas específicas de absorción de iones y el transporte de los mismos de la raíz a la parte aérea.

De los resultados en condiciones control sin salinidad se ha mostrado que *T. halophila* posee un sistema radicular más vigoroso y un mayor cociente raíz/parte aérea (Figura 4.1) que *A. thaliana*. Esto da lugar a mayores tasas de absorción de K^+ (Tabla 4.2) y mayores concentraciones de K^+ en la planta (Tabla 4.1). Estas características posicionan a *T. halophila* en una situación ventajosa para enfrentarse al estrés salino. En otros estudios, las raíces de *T. halophila* mostraron concentraciones de K^+ inferiores a *A. thaliana* (Volkov, V. y col. 2004), lo que podría explicarse por unas condiciones de crecimiento distintas, ya que en el trabajo de Volkov y col. (2004) las plantas se sometieron tan solo 25 horas a 100 mM de NaCl cuando la concentración de K^+ externa era de 1,9 mM. Por tanto, las comparaciones deben hacerse con precaución debido a las diferencias en la duración de los tratamientos (fuerte choque osmótico) y en las concentraciones de K^+ externo.

Cuando las plantas se someten al tratamiento salino, las diferencias iniciales entre de ambas especies mencionadas anteriormente se ven aumentadas. La relación raíz/parte aérea en *T. halophila* fue mucho menos afectada por el incremento de la

salinidad en la solución de crecimiento (Figura 4.1). Así, la mayor proporción raíz/parte aérea en condiciones control en *T. halophila* junto a un menor descenso de dicho cociente al aumentar el Na^+ externo, resultaba en plantas con un potente sistema radicular incluso a elevadas concentraciones de NaCl externo.

La presencia de Na^+ en la solución externa dio lugar a reducciones de las concentraciones de K^+ en la raíz y en la parte aérea de ambas especies con respecto al control sin tratamiento salino (Figura 4.3 y 4.4). Esto se contrapone con estudios previos que indicaban incrementos de las concentraciones de K^+ tisulares en presencia de 100 mM de NaCl externo (Volkov, V. y col. 2004a). Estas diferencias pueden ser consecuencia del distinto tiempo de exposición al NaCl. Mientras que Volkov et al. (2004) estudiaron las concentraciones de K^+ tras 25 horas de exposición al NaCl, en el estudio que aquí se describe se han utilizado largos tiempos de exposición (18 días) para estudiar las condiciones en estado estacionario de crecimiento. Además, el NaCl se administró progresivamente para evitar en la medida de lo posible choques osmóticos que enmascararan los efectos tóxicos producidos por el ion Na^+ y en concreto su efecto sobre la nutrición de K^+ . Por tanto, es posible que, como describen Volkov y col. (2004) en un primer momento tenga lugar un incremento de las concentraciones de K^+ en *T. halophila* y que, tras un periodo de adaptación al crecimiento en presencia de sal, las concentraciones de K^+ disminuyan. De hecho, otro estudio posterior de los mismos autores (Volkov, V. y Amtmann, A. 2006) muestra disminuciones en las concentraciones de K^+ tras 2 días de exposición a 100 mM de NaCl.

T. halophila mostró concentraciones de K^+ mucho mayores que *A. thaliana* bajo estrés salino (Figura 4.3 y 4.4) que pueden ser explicadas por su sistema radicular más vigoroso (Figura 4.1) que mantiene altas las tasas de absorción de K^+ . Estas diferencias entre las dos especies pueden explicar parcialmente la mayor tolerancia a la salinidad de *T. halophila* porque un adecuado aporte de K^+ es un factor clave en la tolerancia a la salinidad, ya que ésta afecta negativamente a la nutrición del K^+ (Amtmann, A. y col. 2004).

El mayor sistema radicular de *T. halophila*, especialmente en condiciones salinas, no conlleva sin embargo una mayor absorción de Na^+ . Por el contrario, la absorción de Na^+ es mucho menor en *T. halophila* y por ejemplo a 60 mM de NaCl externo, la absorción de Na^+ en *A. thaliana* es 4 veces mayor que en *T. halophila* (Figura 4.10). Estos resultados pueden ser explicados por el menor influjo

Capítulo 4

unidireccional de Na^+ que muestran las plantas de *T. halophila* (Wang, B. y col. 2006). Como resultado, *T. halophila* mostraba menos contenido de Na^+ en la planta (Figura 4.9).

Además de las diferencias en la absorción de Na^+ , también se pueden observar en los resultados importantes diferencias en el transporte de Na^+ a la parte aérea. Una vez el Na^+ ha entrado en la planta, su distribución es diferente en ambas especies y mientras que en *T. halophila* el transporte de Na^+ a la parte aérea muestra unos niveles bajos, en *A. thaliana* dicho transporte es mucho mayor. Así, la concentración de Na^+ en la raíz de *T. halophila* aumenta más que en *A. thaliana* al incrementar el Na^+ externo (Figura 4.7) ocurriendo lo contrario en la parte aérea (Figura 4.8). Estos resultados parecen indicar que, *T. halophila* está dotada de mecanismos más efectivos para restringir el transporte de Na^+ a la parte aérea, donde este elemento podría producir un efecto más tóxico afectando procesos fisiológicos importantes como la fotosíntesis.

Nuestros resultados muestran que las raíces de *T. halophila* presentan mayor selectividad K^+/Na^+ y menor transporte de Na^+ a la parte aérea que *A. thaliana*. La selectividad K^+/Na^+ es un factor clave en la tolerancia salina y ello depende de las características de los transportadores que median la absorción y el transporte de K^+ y de Na^+ . En las condiciones de cultivo presentadas en esta Tesis, la absorción de K^+ tiene lugar en un rango de concentraciones de baja afinidad (1,4 mM de K^+), probablemente a través de canales iónicos (Maathuis, F. J. y col. 1997a). Se ha propuesto que los canales rectificadores de entrada de K^+ median la entrada de éste cation en el rango de la baja afinidad y sus características específicas en *T. halophila* y *A. thaliana* pueden ser importantes para la selectividad K^+/Na^+ . De hecho, estos canales, muestran mayor selectividad K^+/Na^+ en *T. halophila* que en *A. thaliana* (Volkov, V. y col. 2004).

Por otro lado, los canales catiónicos no selectivos independientes de voltaje se postulan como importantes rutas de absorción de Na^+ (Amtmann, A. y Sanders, D. 1999, Apse, M. P. y Blumwald, E. 2007). Aunque en glicofitas este tipo de canales no muestran selectividad catiónica, se ha visto una corriente instantánea en raíces de *T. halophila* que se asemeja a aquella de los canales independientes de voltaje de las glicofitas pero mostrando una alta selectividad K^+/Na^+ (Volkov, V. y Amtmann, A. 2006). Por tanto, estos canales pueden contribuir a que las plantas de *T. halophila* muestren una mayor selectividad K^+/Na^+ .

Respecto al transporte de Na^+ a la parte aérea, las características y la regulación de canales y transportadores en la membrana plasmática de las células del parénquima del xilema, que participan en la carga y descarga de Na^+ al mismo (De Boer, A. H. y Volkov, V. 2003) parecen ser determinantes. En relación con esto, el gen de *T. halophila* que codifica el antiportador Na^+/H^+ homólogo al de *A. thaliana AtSOS1* (Wu, S-J y col. 1996), que carga y descarga Na^+ desde y hacia el xilema (Shi, H. y col. 2002) muestra una regulación transcripcional diferente. El gen de *T. halophila* está más fuertemente inducido por sal en la parte aérea y constitutivamente más expresado en raíces no estresadas (Kant, S. y col. 2006). Por otra parte, plantas de *T. halophila* transformadas con un plásmido que contiene la secuencia antisentido para *ThSOS1* disminuyeron la tolerancia a la salinidad al descender los niveles del transcrito *ThSOS1* (Oh, D. H. y col. 2007).

Otros genes importantes involucrados en el transporte de Na^+ a la parte aérea como el gen de *A. thaliana AtHKT1*, también deben ser tenidos en cuenta (Berthomieu, P. y col. 2003, Davenport, R. J. y col. 2007, Sunarpi y col. 2005, Uozumi, N. y col. 2000). Dos variedades de *A. thaliana* con bajos niveles de expresión de *AtHKT1* en raíz en comparación con Col-0, mostraron mayores concentraciones de Na^+ en la parte aérea y aumento de la tolerancia a salinidad (Rus, A. y col. 2006). Aunque la expresión del gen homólogo de *AtHKT1* de *T. halophila* no está aumentada bajo el tratamiento salino (Vera-Estrella, R. y col. 2005), estudios comparativos más profundos en la regulación de este gen en estas dos especies pueden revelar diferencias importantes para la tolerancia a salinidad.

Todo lo anterior sugiere que uno de los procesos clave que pueden estar relacionados con el aumento de la tolerancia a la sal en *T. halophila* y probablemente en otras halofitas es la diferente regulación de los transportadores de Na^+ y K^+ . Investigaciones más profundas enfocadas a la regulación de estos genes deben aportar nuevas herramientas para mejorar la tolerancia a la sal en glicofitas y lo que es más importante, en cultivos agrónomicamente relevantes.

4.2 Estudio de la tolerancia a NaCl en el rango de la absorción de K^+ de alta afinidad.

Una vez caracterizado el crecimiento y nutrición de *A. thaliana* y *T. halophila* en condiciones no restrictivas de K^+ , sus flujos iónicos y las modificaciones producidas tras un tratamiento salino, se pasó al estudio específico del transporte de K^+ en condiciones limitantes de este catión.

Como se ha comentado, existe una cinética bifásica para la absorción de K^+ . En esta cinética se observa un primer sistema, denominado de alta afinidad, que se satura a concentraciones superiores a 200 μM y no discrimina entre K^+ y Rb^+ y un segundo componente, denominado de baja afinidad, que se satura en el rango de concentraciones milimolares de K^+ (Epstein, E. y col. 1963, Schroeder, J. I. y col. 1994, Very, A. A. y Sentenac, H. 2002). Mientras que en glicofitas existen estudios sobre el transporte de K^+ de alta afinidad, apenas existen en halofitas, como es el caso de *T. halophila*. Así, se diseñó un conjunto de experimentos para conocer la naturaleza de la absorción de K^+ en el rango de alta afinidad en esta halofita.

Para el estudio del transporte de K^+ en el rango de la alta afinidad se emplearon plantas de *T. halophila* crecidas durante 5 semanas en 1/5 de Hoagland con 1,4 mM de K^+ . Tras este periodo la mitad de las plantas continuó en esta solución y la otra mitad se pasó a un medio sin K^+ durante una semana. Tras este periodo se recolectaron las plantas y se llevaron a cabo las determinaciones detalladas a continuación.

4.2.1 Transporte de K^+ de alta afinidad en *T. halophila*.

Se estudió la absorción de K^+ en el rango de la alta afinidad a través de la raíz de plantas ayunadas de K^+ de *T. halophila*, midiendo la desaparición de K^+ en la solución externa a la raíz (Figura 4.12). En las plantas control no ayunadas de K^+ , la concentración externa de K^+ no disminuyó con el tiempo. Por el contrario, las raíces de las plantas ayunadas absorbieron el K^+ externo desde valores de 60 μM hasta valores inferiores a 5 μM en 6 horas, indicando la presencia de un transporte de K^+ de alta afinidad. De los datos de la desaparición del K^+ externo frente al tiempo se obtuvo una K_m para el transporte de K^+ de $5,1 \pm 1,9 \mu M$ (como se describió en (Bañuelos, M. A. y col. 2002). La sensibilidad de este transporte de K^+ al NH_4^+ también fue caracterizada.

Capítulo 4

La desaparición de K^+ fue fuertemente inhibida cuando en el medio se añadió 1 mM de NH_4^+ .

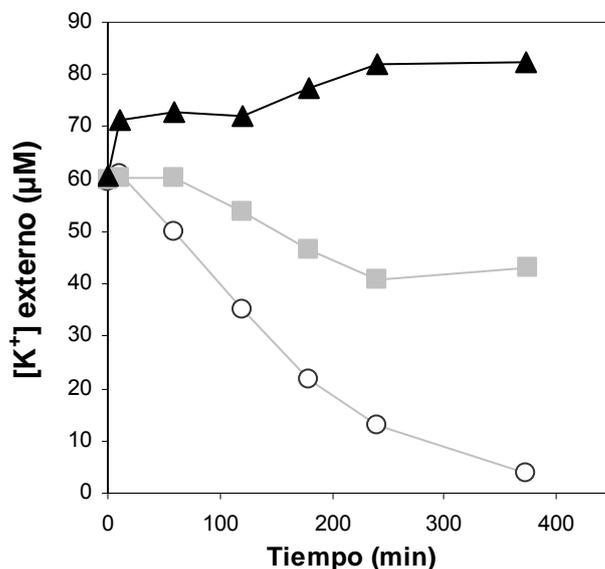


Figura 4.12. Transporte de K^+ en el rango de la alta afinidad en *Thellungiella halophila*. Las plantas se crecieron en medio Hoagland modificado que contenía 1,4 mM de K^+ . Un grupo de plantas se ayunó de K^+ durante 7 días. Tras este periodo, las plantas se transfirieron a una solución que contenía 60 $\mu M K^+$ y se fueron tomando muestras de la solución externa a diferentes tiempos para determinar su concentración. Se determinó la desaparición de K^+ desde 60 μM en plantas control no ayunadas de K^+ (triángulos negros), en plantas ayunadas (círculos blancos), y en plantas ayunadas pero en presencia de 60 μM de K^+ más 1 mM de NH_4^+ (cuadrados grises).

4.2.2 Condiciones de cultivo que inhiben del transporte de K^+ de alta afinidad.

Para ver el efecto que tenían las condiciones de crecimiento sobre el transporte de K^+ en el rango micromolar se sometieron las plantas a tres condiciones distintas previas al estudio de dicho transporte. Todas se crecieron durante 4 semanas en la solución 1/5 de Hoagland modificada mencionada anteriormente (1,4 mM de K^+), y 1 semana con 250 $\mu M K^+$. A partir de este momento las plantas se crecieron 1 semana más en tres tratamientos distintos. Un primer grupo, control, no se ayunó y continuó con 250 μM de K^+ externo. Un segundo grupo, fue transferido a una solución sin K^+ para ayunar las plantas durante una semana. El tercer grupo se ayunó de K^+ como el

segundo, pero en presencia de 50 mM NaCl, que fue añadido en dos veces en los dos días previos a la semana de ayuno. Concluidas las 6 semanas se procedió a realizar un experimento de desaparición de Rb^+ , utilizado como análogo al K^+ , en el rango de la alta afinidad (50 μM) en control sin inhibidores, con 1 mM de NH_4Cl , y con 1 mM de NH_4Cl más 1 mM de $BaCl_2$ (Figura 4.13).

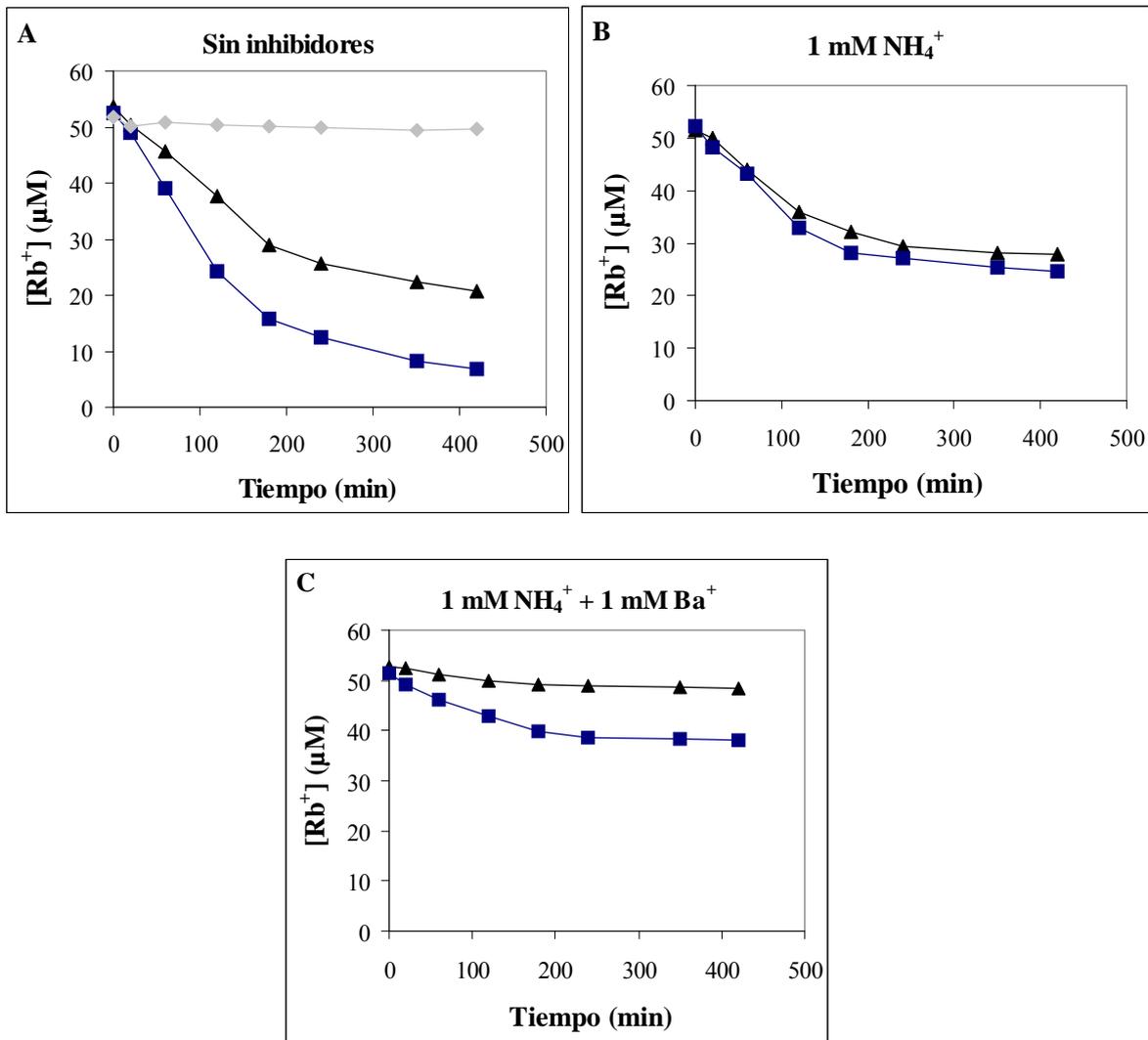


Figura 4.13. Transporte de Rb^+ en el rango de la alta afinidad. Las plantas de *T. halophila* se crecieron sin ayunar (rombos), ayunadas durante 7 días (cuadros) en condiciones control, y ayunadas durante 7 días en medio salino (triángulos). Se determinó la desaparición de Rb^+ desde 50 μM , en condiciones normales (A), con 1 mM de NH_4Cl (B) y con 1 mM de NH_4Cl más 1 mM de $BaCl_2$ (C). Se muestra un ejemplo representativo de cada grupo de plantas.

En condiciones control sin inhibidores se observó que las plantas sin ayunar no tomaron Rb^+ externo observándose una línea horizontal (Figura 4.13A). Las plantas ayunadas de K^+ cultivadas sin Na^+ absorbieron hasta valores inferiores a $10 \mu\text{M}$. Sin embargo, las plantas ayunadas de K^+ que habían sido crecidas con Na^+ sólo absorbieron hasta concentraciones en torno a $20 \mu\text{M}$ de Rb^+ , indicando que el crecimiento con Na^+ había inhibido parte del transporte de Rb^+ . Para descartar que este proceso se debiese a la salida de Na^+ durante la manipulación de las plantas, que podría inhibir la entrada de Rb^+ , éstas (crecidas con Na^+ y sin Na^+) se lavaron con la misma disolución del experimento sin Na^+ y a 4°C . Además, se midió el Na^+ en la disolución al principio y final del experimento por espectrometría de absorción atómica observándose datos de entre 300 y $600 \mu\text{M}$ de Na^+ .

Del mismo modo, las plantas ayunadas crecidas con y sin Na^+ se sometieron a la misma solución con Rb^+ más 1 mM de NH_4Cl (Figura 4.13B). Se observó en este caso que la presencia de NH_4^+ en la disolución experimental de absorción producía una inhibición algo mayor que la presencia de NaCl durante el crecimiento. Es decir el crecimiento con NaCl daba lugar a la desaparición de gran parte del componente sensible al NH_4^+ de la absorción de Rb^+ .

Por último, otro grupo de plantas ayunadas, crecidas con y sin Na^+ se sometieron al experimento de depleción de Rb^+ pero con 1 mM de NH_4Cl más 1 mM de BaCl_2 (Figura 4.13C). La presencia de NH_4Cl y BaCl_2 inhibía la absorción de Rb^+ en las plantas crecidas sin NaCl y en mayor medida, casi al completo, en las crecidas en presencia de NaCl . En estas últimas la inhibición era mayor, y las plantas no mostraban prácticamente absorción de Rb^+ . Rubio y col. (2008) observaron que en las mismas condiciones experimentales, 1 mM de NH_4Cl más 1 mM de BaCl_2 inhibía por completo la absorción de Rb^+ en plantas silvestres de *A. thaliana* así como en las líneas mutantes *athak5* y *atakt1*. Por tanto, que las plantas ayunadas de K^+ en ausencia de Na^+ de *T. halophila* absorban en estas condiciones mientras que *A. thaliana* no lo hace se podría explicar por la presencia de sistemas de absorción de K^+ más selectivos en la especie halofita, como se ha sugerido en algunos trabajos (Volkov, Vadim y Amtmann, Anna 2006).

4.2.3 Clonaje del gen *ThHAK5*.

Los estudios de absorción de Rb^+ sugerían que un transportador homólogo a los transportadores de alta afinidad de K^+ de la familia HAK descrito en otras especies estaba mediando este tipo de transporte también en *T. halophila*. Se procedió por lo tanto al aislamiento de un posible homólogo en esta especie vegetal. Se extrajo el RNA total de las raíces de plantas ayunadas de K^+ que desarrollaron el transporte de K^+ de alta afinidad como se ha indicado en *Materiales y Métodos*. Tras la transcripción reversa del RNA mensajero, los fragmentos de cDNA correspondientes a los genes de la familia HAK/KT/KUP se amplificaron por PCR con cebadores degenerados diseñados a partir de las secuencias conservadas entre estos transportadores. Estos fragmentos de PCR se clonaron en el vector PCR2.1 y se secuenciaron. La secuencia de aminoácidos deducida del cDNA de uno de ellos presentó gran homología con el transportador HAK5 de *A. thaliana* y con otros transportadores de tipo I de la familia HAK de otras especies de plantas. Este cDNA se extendió por la técnica de RACE 5'-3' y se obtuvo un cDNA completo que se secuenció y por su homología con *AtHAK5* se llamó *ThHAK5*. La secuencia fue depositada en el banco de datos GenBank con el número de acceso EF177193.

La traducción del cDNA aislado mostró que codificaba una proteína de 803 aminoácidos y 90,1 Kdaltons. Además, esta proteína mostró las regiones conservadas presentes en los transportadores de la familia HAK/KT/KUP (Figura 4.14). Se encontraron en la secuencia 77 aminoácidos fuertemente básicos (K,R), 72 fuertemente ácidos (D,E), 307 hidrofóbicos (A,I,L,F,W,V) y 216 aminoácidos polares (N,C,Q,S,T,Y), un punto isoeléctrico en 8.25, y a pH 7,0 una carga de 8.51.

Como se muestra en la figura 4.14, los trece primeros aminoácidos de *ThHAK5* no presentes en *AtHAK5*, podrían no formar parte de la estructura proteica. Por ello, como veremos más adelante, se realizaron dos construcciones distintas para expresarlos en levadura y comprobar si éstos se mostraban imprescindibles para el funcionamiento del transportador.

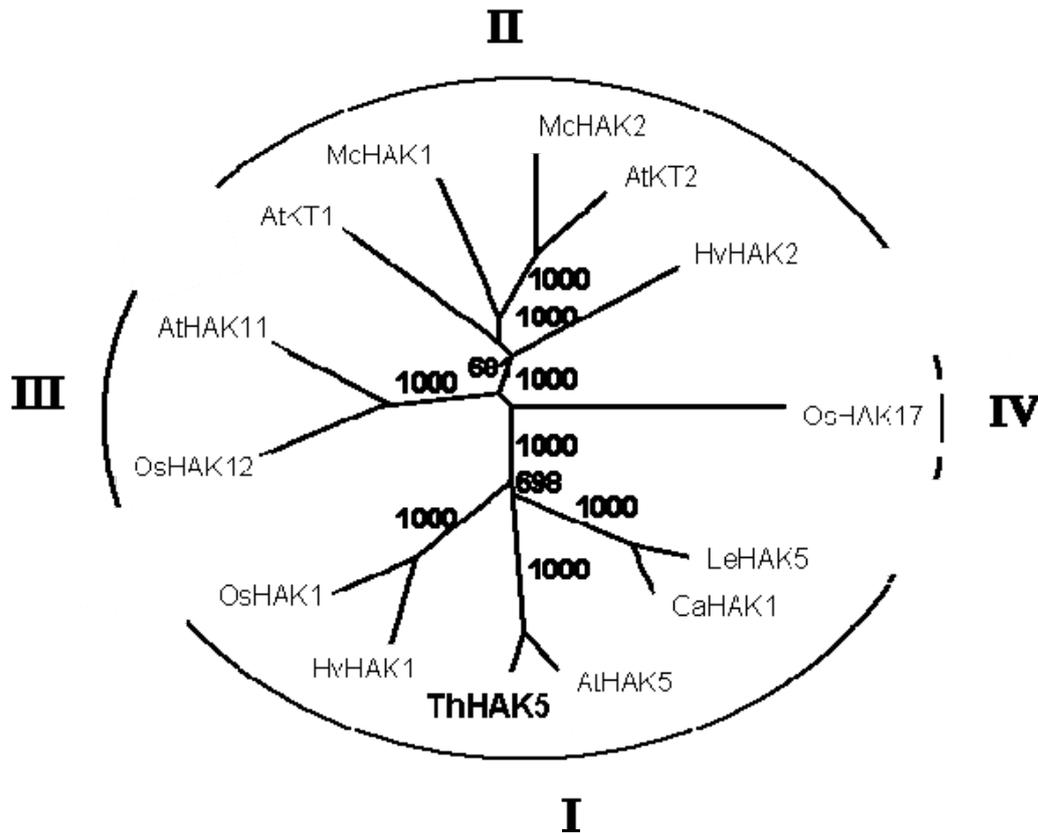


Figura 4.16. Árbol filogenético de la familia de transportadores KT/HAK/KUP. Se muestran miembros representativos de cada grupo y *ThHAK5* caracterizado aquí. *ThHAK5* es encuadrado en el grupo I de los transportadores muy cerca del transportador de *A. thaliana* *AtHAK5*. Realizado con el programa informático *ClustalX*, los valores indican el número de veces de cada 1000 análisis que esa rama aparece en esa misma posición. Números de acceso: *HvHAK1* AF025292; *AtHAK5* AF129478; *ThHAK5* EF177193; *OsHAK1* AJ427970; *CaHAK1* AY560009; *LeHAK5* DQ489721; *HvHAK2* AF129479; *AtKT1* AF012656; *McHAK1* AF367864; *McHAK2* AF367865; *OsHAK17* AJ427975; *AtHAK11* At2g35060; *OsHAK12* AJ427981.

Un análisis de hidrofobicidad reveló la presencia de 12 segmentos transmembrana (Figura 4.15) con ambos extremos amino y carboxilo terminales en la cara citosólica. Análisis filogenéticos posicionaron a *ThHAK5* en el grupo I de los transportadores de K^+ , cerca de *AtHAK5* (Figura 4.16).

4.2.4 *ThHAK5* codifica un transportador de K^+ de alta afinidad.

Para estudiar la función del transportador codificado por *ThHAK5*, el cDNA se clonó en el vector de expresión en levaduras pDR195. La construcción se introdujo en

Capítulo 4

la cepa de levadura $W\Delta 3$, deficiente en los transportadores de K^+ endógenos que transportan en el rango de la alta afinidad. Como control se utilizó $W\Delta 3$ transformado con el plásmido vacío. Del mismo modo, se clonó *ThHAK5* sin el fragmento correspondiente a los 13 primeros aminoácidos para comprobar si estos resultaban imprescindibles para su función.

Ensayos de crecimiento en placas de agar que contenían el medio mínimo FA mostraron que $W\Delta 3$ transformada con el plásmido vacío y con *ThHAK5* crecían de manera similar a 10 mM de K^+ (Figura 4.17). Sin embargo, cuando el medio contenía 0,1 mM de K^+ , la única cepa de levadura capaz de crecer fue la transformada con *ThHAK5* (Figura 4.17), demostrando que *ThHAK5* era un transportador de K^+ capaz de transportar en el rango micromolar. Asimismo, el clon sin los 13 primeros aminoácidos daba lugar a crecimiento en el medio 0,1 mM de K^+ indicando que estos no eran imprescindibles para la funcionalidad del transportador (no mostrado).

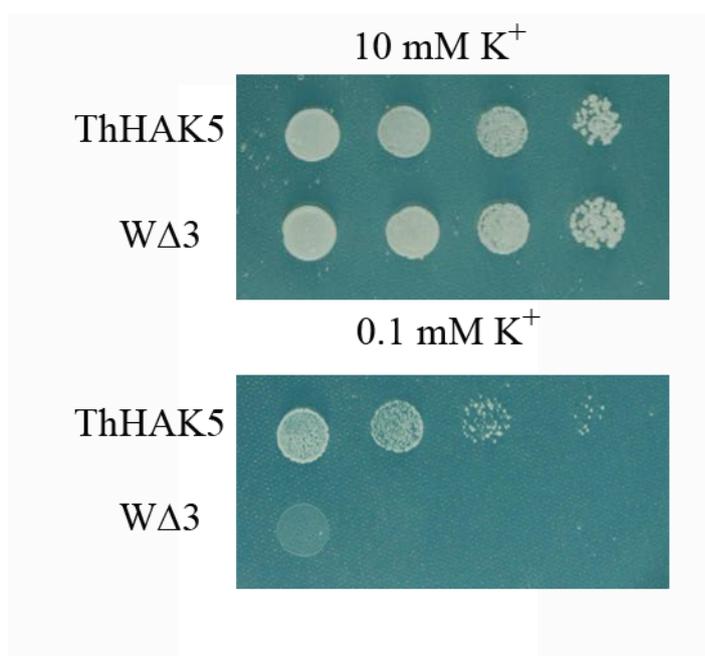


Figura 4.17. Crecimiento de células de levadura que expresan el gen *ThHAK5*. La levadura mutada $W\Delta 3$, deficiente en el transporte endógeno de K^+ en el rango de la alta afinidad, se transformó con el plásmido vacío ($W\Delta 3$) o con una construcción del cDNA del gen *ThHAK5* (*ThHAK5*). Se sembraron gotas de 10 μ L de diluciones seriadas sobre placas de agar con medio mínimo FA con las concentraciones de K^+ indicadas. Sólo la cepa que expresaba el gen *ThHAK5* creció a 0,1 mM de K^+ .

Para caracterizar con mayor profundidad el transporte de K^+ mediado por ThHAK5, se llevaron a cabo experimentos de absorción de Rb^+ en medio líquido a concentraciones micromolares en ambas cepas de levadura ayunadas de K^+ . Las levaduras que expresaban *ThHAK5* mostraron tasas de entrada de Rb^+ mucho mayores que la cepa transformada con el plásmido vacío (Figura 4.18). Las velocidades de entrada de Rb^+ mostradas por la cepa que expresaba el gen *ThHAK5*, en relación a la concentración externa de Rb^+ , se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten y se calculó una K_m para el Rb^+ de $1,2 \pm 0,3 \mu M$.

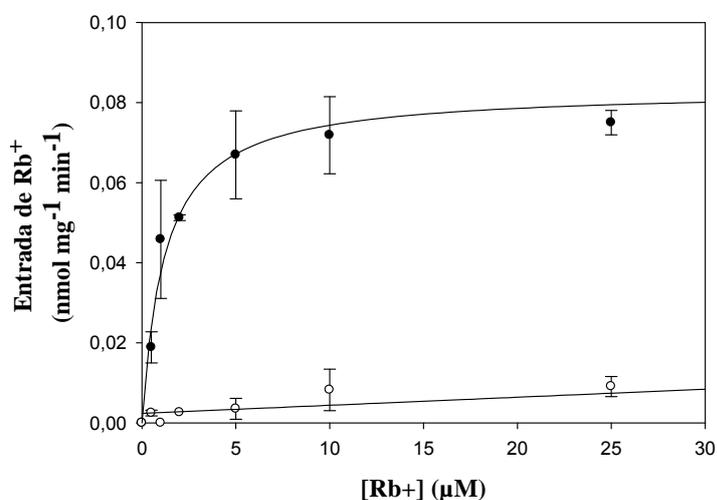


Figura 4.18. Entrada de Rb^+ en levaduras que expresan *ThHAK5*. La cepa WΔ3, transformada con el plásmido vacío (círculos blancos) o con *ThHAK5* (círculos negros), fue utilizada para los experimentos de absorción de Rb^+ en el rango de la alta afinidad. Se muestran las medias y la desviación estándar de las tasas de absorción inicial a diferentes concentraciones de Rb^+ , de al menos tres experimentos. Los datos fueron ajustados a una ecuación de Michaelis-Menten y se halló una K_m para *ThHAK5* de $1,2 \pm 0,3 \mu M$ para el Rb^+ .

4.2.5 Patrón de expresión del gen *ThHAK5*

El patrón de expresión de *ThHAK5* se caracterizó por la técnica de Northern. Se extrajo el RNA total de las raíces de plantas ayunadas de K^+ y plantas sin ayunar para detectar los transcritos de *ThHAK5*. El RNA mensajero de *ThHAK5* sólo se detectó en las raíces de las plantas ayunadas de K^+ (Figura 4.19).

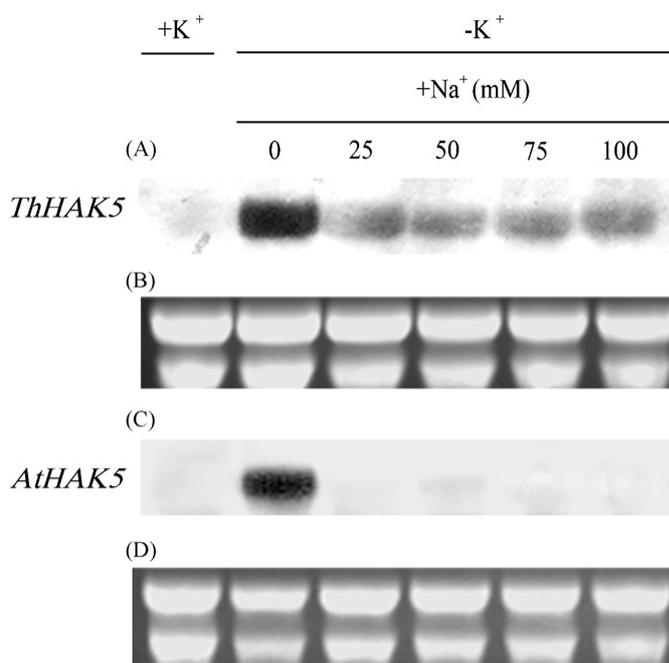


Figura 4.19. Análisis de la expresión de *ThHAK5* y *AtHAK5* mediante Northern. Las plantas de *T. halophila* y las de *A. thaliana* se crecieron en una solución Hoagland modificada con 1,4 mM de K⁺ (+K⁺). Un grupo de plantas se sometió al tratamiento salino indicado durante 2 días tras los que se comenzó con el ayuno de K⁺ (-K⁺) mientras se mantuvo la concentración salina. Tras 7 días de ayuno, se extrajo el RNA total de las raíces y se detectó la presencia de *ThHAK5* (A) o *AtHAK5* (C) mediante sondas específicas para cada gen. Tinción con bromuro de etidio del RNA total usado para el Northern de *ThHAK5* (B) y *AtHAK5* (D). El ayuno de K⁺ indujo *ThHAK5* y *AtHAK5* y la presencia de NaCl en la solución de crecimiento parcial y totalmente redujo la expresión de *ThHAK5* y *AtHAK5* respectivamente.

Se estudió a su vez el efecto de la presencia de NaCl en la solución de crecimiento en las plantas que indujeron *ThHAK5* por el ayuno de K⁺. Las plantas se crecieron durante 4 semanas en 1/5 de Hoagland modificado que contenía 1,4 mM de K⁺ y luego durante dos semanas en la misma disolución con 0,25 mM de K⁺. Durante los dos últimos días, se adicionaron gradualmente las distintas cantidades de NaCl a la disolución nutritiva hasta alcanzar las concentraciones finales de 25, 50, 75 ó 100 mM. El ayuno de K⁺ se aplicó entonces durante 7 días eliminando el K⁺ de la disolución, mientras que el NaCl se mantuvo constante.

Tras este periodo, se aisló el RNA total de la raíz y se analizó como antes para detectar el transcrito de *ThHAK5*. Se observó que la inducción del gen *ThHAK5* por ayuno de K^+ se redujo por el crecimiento de las plantas en presencia de NaCl, aunque aún eran detectables altos niveles del transcrito *ThHAK5* (Figura 4.19).

Para comparar estos resultados con lo que ocurre en glicofitas se realizaron los mismos experimentos en *A. thaliana* estudiando la expresión de *AtHAK5*. En *A. thaliana* la presencia de NaCl en la solución de crecimiento eliminó completamente la inducción de *AtHAK5* por ayuno de K^+ (Figura 4.19). En este caso no se detectó RNA mensajero de *AtHAK5* en las raíces ayunadas de K^+ que habían sido crecidas en presencia de NaCl.

4.2.6 Efecto del crecimiento en presencia de NaCl en el transporte de K^+ de alta afinidad.

Se estudió el transporte de K^+ en el rango de la alta afinidad en plantas de *A. thaliana* y *T. halophila* cultivadas en presencia de NaCl y ayunadas de K^+ . Las plantas de ambas especies se sometieron a los mismos tratamientos de NaCl que los descritos anteriormente, usados para estudiar la expresión de *AtHAK5* y *ThHAK5*.

Después del ayuno de K^+ , se realizaron experimentos de desaparición de K^+ externo similares a los descritos en la Figura 4.12. Se calcularon las tasas iniciales de absorción de K^+ durante las primeras dos horas, cuando la desaparición de K^+ era lineal, en varias plantas para cada especie y tratamiento de NaCl.

En ambas especies, el ayuno de K^+ indujo altas tasas de absorción de K^+ , las cuales disminuyeron cuando las plantas fueron crecidas en presencia de NaCl (Figura 4.20). Sin embargo, la absorción de K^+ se vio menos afectada en *T. halophila* por la presencia de NaCl en la solución de crecimiento, reduciendo la tasa de transporte de K^+ en el rango de la alta afinidad en menor grado que *A. thaliana*.

El crecimiento con 25 mM de NaCl redujo la tasa de transporte de K^+ en un 65% del control ayunado en *T. halophila* y un 23% en *A. thaliana*. En 50 mM de NaCl, la tasa se redujo a un 47 y a un 22% en *T. halophila* y *A. thaliana* respectivamente. El aumento de los niveles de NaCl en la solución de crecimiento dio lugar a mayores disminuciones en las tasas de transporte de K^+ , mostrando a 75 y 100 mM de NaCl similares reducciones en ambas especies.

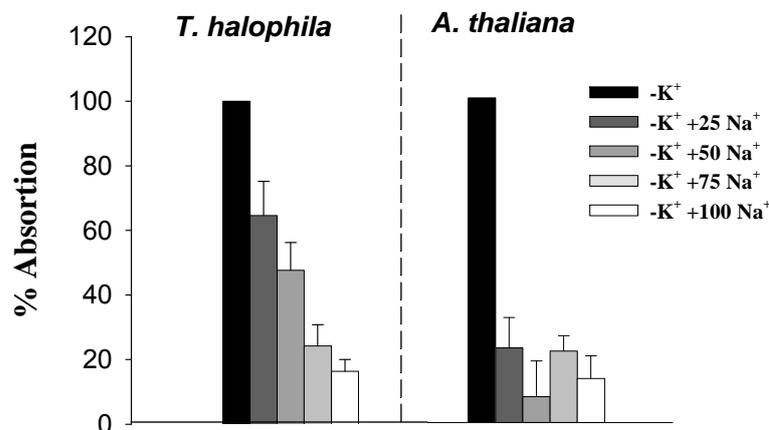


Figura 4.20. Reducción de las tasas iniciales de absorción de K^+ por la presencia de $NaCl$ en la solución de crecimiento, para *T. halophila* y *A. thaliana*. Las plantas de *T. halophila* y *A. thaliana* se crecieron, sujetas a las concentraciones salinas indicadas y ayunadas en las mismas condiciones salinas. Luego, se llevaron a cabo experimentos de desaparición de K^+ desde $60 \mu M$ como se indica en la figura 4.12. Se calcularon las tasas iniciales de absorción para las primeras 2 horas donde la desaparición de K^+ era lineal, a partir de al menos tres experimentos independientes. Se muestra el porcentaje de disminución de la absorción con respecto al control sin $NaCl$; las barras de error indican desviación estándar.

4.2.7 Concentraciones iónicas en raíz y parte aérea.

Se determinaron las concentraciones de K^+ en la raíz y en la parte aérea de las plantas utilizadas en los experimentos de Northern y absorción de K^+ (Figura 4.21). El ayuno de K^+ redujo la concentración de K^+ alrededor de un 50% en raíz y 30% en parte aérea en *T. halophila* y *A. thaliana*.

Las plantas de *T. halophila* ayunadas de K^+ no mostraron mayores disminuciones de la concentración de K^+ al ser cultivadas en presencia de $NaCl$ ni en raíz ni en parte aérea. Por el contrario, en *A. thaliana* la concentración de K^+ en la raíz mostró mayores disminuciones al aumentar la concentración de $NaCl$. Respecto a la parte aérea, la presencia de 25 mM de $NaCl$ redujo la concentración de K^+ en *A. thaliana*, y mayores incrementos de la concentración de $NaCl$ externo condujeron a un aumento en la concentración de K^+ en la parte aérea.

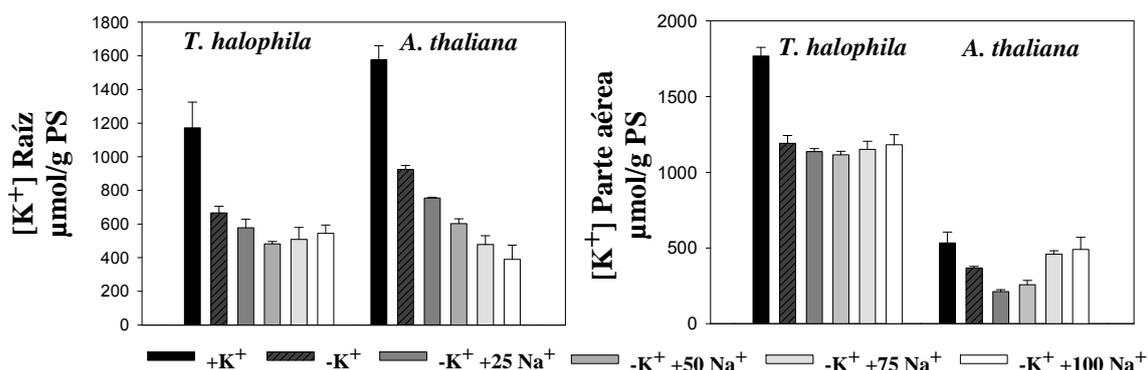


Figura 4.21. Concentraciones de K^+ internas en raíz y parte aérea de *T. halophila* y *A. thaliana* expuestas a diferentes tratamientos salinos. Las plantas se crecieron y ayunaron como lo descrito en la figura 4.19. Tras una digestión nítrico-perclórica de los tejidos, se determinaron las concentraciones de K^+ en raíz y parte aérea. Se muestran las medias de 3 experimentos independientes; las barras de error indican la desviación estándar.

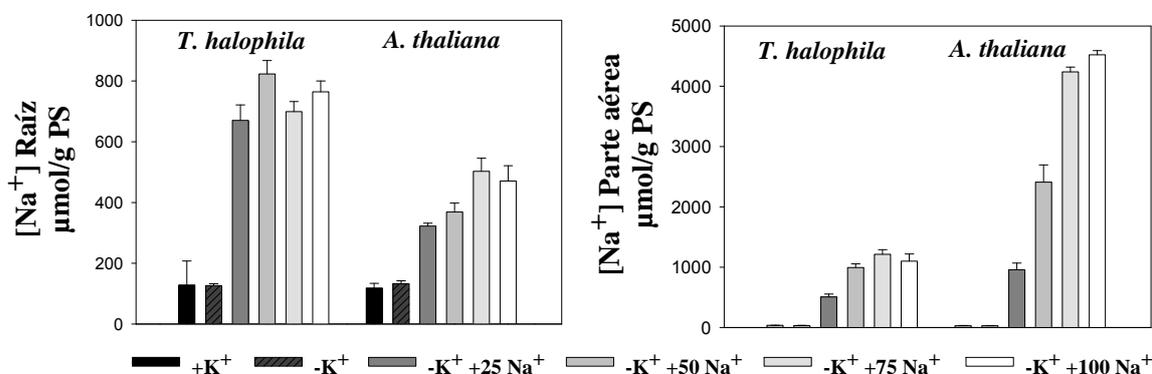


Figura 4.22. Concentraciones de Na^+ internas en raíz y parte aérea de *T. halophila* y *A. thaliana* expuestas a diferentes tratamientos salinos. Las plantas se crecieron y ayunaron como lo descrito en la figura 4.19. Tras una digestión nítrico-perclórica de los tejidos, se determinaron las concentraciones de Na^+ en raíz y parte aérea. Se muestran las medias de 3 experimentos independientes; las barras de error indican la desviación estándar.

Se determinaron, también, las concentraciones de Na^+ en raíz y parte aérea (Figura 4.22). El efecto del Na^+ externo sobre las concentraciones internas de Na^+ fue muy similar tanto en plantas ayunadas como no ayunadas de K^+ . Las raíces de *T.*

halophila presentaron mayores concentraciones de Na^+ interno a cualquier concentración de Na^+ externo. Por otra parte, las concentraciones de Na^+ en la parte aérea de *T. halophila* fueron inferiores a las de *A. thaliana* a cualquier concentración externa de Na^+ , aunque las diferencias fueron mayores en las concentraciones más altas de Na^+ externo. Esto sugiere un importante mecanismo de control en el transporte de Na^+ de la raíz a la parte aérea.

En cuanto a las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} en raíz y parte aérea se observó que mientras las concentraciones de Ca^{2+} en raíz aumentaban en *A. thaliana* por el tratamiento salino, en *T. halophila* disminuían (Figura 4.23). Sin embargo, en la parte aérea, en ambas especies disminuyeron las concentraciones de Ca^{2+} aunque sólo se encontraron diferencias significativas en *A. thaliana* (Figura 4.23).

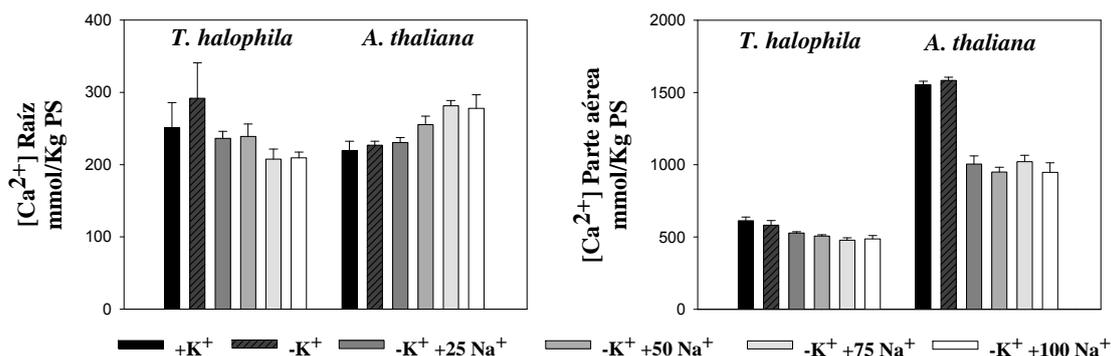


Figura 4.23. Concentraciones de Ca^{2+} internas en raíz y parte aérea de *T. halophila* y *A. thaliana* expuestas a diferentes tratamientos salinos. Las plantas se crecieron y ayunaron como lo descrito en la Figura 4.19. Tras una digestión nítrico-perclórica de los tejidos, se determinaron las concentraciones de K^+ en raíz y parte aérea. Se muestran las medias de 3 experimentos independientes; las barras de error indican la desviación estándar.

El Mg^{2+} en la raíz de ambas especies aumentó al ayunar las plantas de K^+ , efecto que se revirtió al ayunarlas en presencia de NaCl , llegando a disminuir en las concentraciones más altas de NaCl en *A. thaliana* (Figura 4.24). En la parte aérea, las concentraciones de Mg^{2+} disminuyeron ligeramente en *T. halophila* y significativamente en *A. thaliana* al aplicar el tratamiento salino (Figura 4.24).

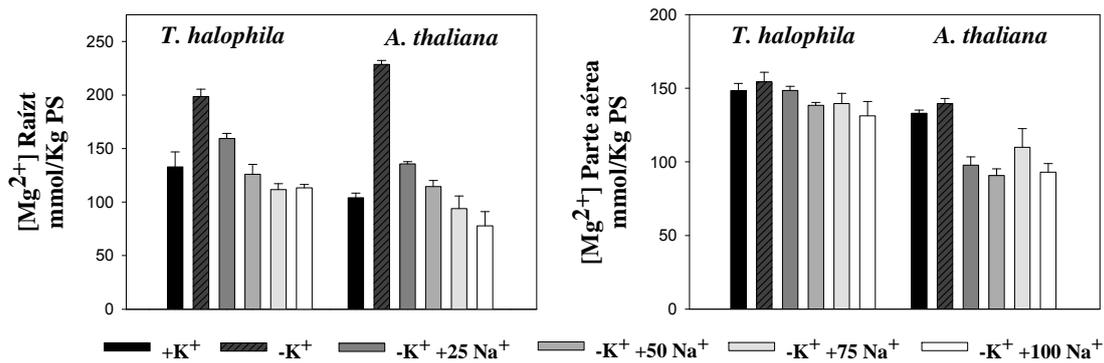


Figura 4.24. Concentraciones de Mg^{2+} internas en raíz y parte aérea de *T. halophila* y *A. thaliana* expuestas a diferentes tratamientos salinos. Las plantas se crecieron y ayunaron como lo descrito en la figura 4.19. Tras una digestión nítrico-perclórica de los tejidos, se determinaron las concentraciones de K^+ en raíz y parte aérea. Se muestran las medias de 3 experimentos independientes; las barras de error indican la desviación estándar.

4.2.8 Discusión.

Las plantas de *T. halophila* ayunadas de K^+ mostraron concentraciones de K^+ en raíz un 50% menores que las controles sin ayunar (Figura 4.21), y una entrada de K^+ de alta afinidad (Figura 4.12). Este sistema de entrada redujo el K^+ externo hasta valores inferiores a $5 \mu M$ en 6 horas y se mostró sensible a NH_4^+ . Estas son las características típicas de los transportadores de K^+ de alta afinidad de la familia HAK, y por ello se ha llevado a cabo el aislamiento del gen que codifica el transportador de esta familia en la especie halofita *T. halophila*.

Se aisló un cDNA correspondiente a un gen, *ThHAK5*, que codifica una proteína con alta homología a los transportadores de la familia HAK. La proteína mostró todas las características de estos transportadores, incluyendo las regiones conservadas y los doce dominios transmembrana (Rodríguez-Navarro, A. 2000).

Un análisis filogenético mostró que *ThHAK5* pertenecía al grupo I de los transportadores HAK (Rubio, F. y col. 2000) y además se encontraba, filogenéticamente, muy cercano al de *A. thaliana*, *AtHAK5* (Figura 4.16). La expresión en levadura de *ThHAK5* demostró que media el transporte de K^+ de alta afinidad con una K_m para el Rb^+ de $1,2 \pm 0,3 \mu M$ (Figuras 4.17 y 4.18).

Capítulo 4

Con los datos presentados en esta Tesis no se puede concluir si los primeros 13 aminoácidos que se deducen del cDNA de *ThHAK5* pertenecen o no a la proteína. En los experimentos de absorción de Rb^+ en la cepa WΔ3 transformada con las dos construcciones se observó una menor velocidad de transporte con el cDNA correspondiente a la proteína sin los primeros 13 aminoácidos (no mostrado), y la baja velocidad de transporte de esta construcción no permitió la caracterización cinética del transporte. Para determinar cuál es la proteína que opera en la planta serían necesarios otros estudios más específicos.

El gen homólogo *LeHAK5* de tomate no complementó la levadura WΔ3, pero sí lo hizo cuando se diseñó una quimera con los primeros 18 aminoácidos de *CaHAK1* (gen homólogo de pimiento), lo que sugiere que esta zona puede ser muy importante en las modificaciones postranscripcionales, como la localización, o en la funcionalidad de estos transportadores en el sistema heterólogo (Nieves-Cordones, M. y col. 2008). Apoyando esta idea se ha visto que una quimera con los primeros aminoácidos (hasta el primer segmento transmembrana) de *HvHAK2*, que no complementa en levadura, y *HvHAK1*, que sí complementa, no complementaba la levadura WΔ3 (Senn, M. E. y col. 2001).

El gen que codifica para el transportador *ThHAK5* estaba fuertemente inducido en las raíces de las plantas ayunadas de K^+ (Figura 4.12) que mostraron una absorción de K^+ de alta afinidad (Figura 4.20) y una reducción en la concentración de K^+ en raíz y parte aérea (Figura 4.21). Las características del transporte de K^+ en el rango de la alta afinidad en plantas (Figura 4.12) y las mediadas por *ThHAK5* en levadura (Figura 4.18), así como el patrón de expresión del gen que lo codifica (Figura 4.19), indican que *ThHAK5* es fundamental en el transporte de K^+ de alta afinidad para esta especie.

Así, en esta halofita, el transporte de K^+ de alta afinidad está mediado por un transportador homólogo al que opera en glicofitas (Rodríguez-Navarro, A. y Rubio, F. 2006). Las características mostradas por *ThHAK5* en levadura sugieren que la funcionalidad de este transportador puede ser similar a la de sus homólogos de glicofitas. No obstante, debe destacarse que la K_m de *ThHAK5* para el Rb^+ , 1,2 μM (Figura 4.18), es 10 veces inferior a la de *AtHAK5* 12.6 μM (Rubio, F. y col. 2000), indicando una mayor afinidad por K^+ del transportador de *T. halophila*. Si esta diferente afinidad está relacionada con la mayor tolerancia a la salinidad de *T. halophila* en

comparación con *A. thaliana* no se puede establecer hoy en día y es necesario llevar a cabo más investigaciones para aclarar este aspecto.

Por otra parte, aunque la expresión en levaduras muestra que la K_m para Rb^+ de ThHAK5 es menor que la de su homólogo AtHAK5, no se puede establecer una relación clara entre una mayor tolerancia a la salinidad y una mejor nutrición de K^+ en condiciones salinas por una baja K_m para el Rb^+ . Por ejemplo, la proteína homóloga de pimiento CaHAK1 muestra una K_m más baja para el Rb^+ , 1,9 μM (Martínez-Cordero, M. A. y col. 2004) que el homólogo de cebada HvHAK1, 18 μM , (Santa-María, G. E. y col. 1997) pero pimiento es más sensible a la salinidad que cebada.

La presencia de NaCl en la solución de crecimiento puede ser un factor importante que afecta a la expresión de genes que codifican transportadores HAK del grupo I. En tomate, se observó que la presencia de NaCl en la solución de crecimiento previene la inducción del homólogo de tomate *LeHAK5* producida por el ayuno de K^+ (Nieves-Cordones, M. y col. 2007), así como el desarrollo de la capacidad de transporte de K^+ en el rango de la alta afinidad por parte de la raíz.

El efecto de la salinidad sobre la expresión de *ThHAK5* se estudió en plantas ayunadas de K^+ expuestas a diferentes niveles de NaCl. En paralelo se comprobó la expresión de su homólogo cercano evolutivamente *AtHAK5* en *A. thaliana*. Una característica distintiva del gen *ThHAK5* se observó cuando las plantas se sometieron a un tratamiento salino. La presencia de NaCl en la solución de crecimiento redujo la expresión de ambos, *ThHAK5* y *AtHAK5*, aunque a un nivel distinto. En *A. thaliana*, la reducción fue completa (Figura 4.19) y no se observaron transcritos incluso en las raíces expuestas a 100 mM de NaCl que mostraron las menores concentraciones de K^+ (Figura 4.21). En *T. halophila*, sin embargo, los transcritos de *ThHAK5* se observaron a todas las concentraciones de NaCl a las que se expusieron las plantas (Figura 4.19). Como consecuencia, el transporte de K^+ en el rango de la alta afinidad en *T. halophila* se redujo con menor intensidad que en *A. thaliana* por la presencia de NaCl en la solución de crecimiento (Figura 4.20).

Aunque las raíces de ambas especies mostraron bajas concentraciones de K^+ (Figura 4.21), especialmente en *A. thaliana* donde las concentraciones de K^+ en raíz descendieron incluso más al aumentar la concentración de NaCl, la expresión del correspondiente gen de la familia HAK se observó únicamente en la halofita. Estos

Capítulo 4

resultados muestran que la expresión de estos genes no está relacionada exclusivamente con la concentración de K^+ en la raíz, y otros factores deben estar relacionados en su regulación.

En este sentido se ha descrito en raíces de tomate que se requiere un potencial de membrana hiperpolarizado para observar altos niveles de expresión de *LeHAK5*, independientemente de la concentración de K^+ de dichas raíces (Nieves-Cordones, M. y col. 2008). En *T. halophila* expuesta a sal, se han registrado potenciales de membrana en raíz más negativos que los de *A. thaliana* (Volkov, V. y Amtmann, A. 2006), lo que puede explicar la mayor expresión de *ThHAK5* bajo estas condiciones. En definitiva, el potencial de membrana podría ser un elemento que está mediando en la ruta de señalización celular para percibir la falta de K^+ citoplasmático e inducir los sistemas de entrada de K^+ de alta afinidad.

Los resultados mostrados en esta Tesis y otros publicados por otros autores sugieren la posibilidad de una regulación diferente de los genes implicados en los movimientos de K^+ y Na^+ en las halofitas y en las glicofitas. Por ejemplo en *Mesembryanthemum crystallinum*, los transportadores HAK del grupo II se expresan también en presencia de NaCl (Su, H. y col. 2002). La regulación del gen que codifica el antiportador H^+/Na^+ SOS1 de *T. halophila*, relacionado con la salida de Na^+ de la planta y el movimiento del mismo dentro de ésta (Shi, H. y col. 2002, Shi, H. y col. 2000, Wu, S-J y col. 1996) es diferente a su homólogo de *A. thaliana* (Kant, S. y col. 2006, Oh, D. H. y col. 2007). *SOS1* se induce con mayor intensidad por la salinidad en la parte aérea y se expresa en mayor grado (unas tres veces más) en las raíces sin estresar de *T. halophila* que en las de *A. thaliana*. Por otra parte, líneas de arroz que difieren en su tolerancia a la salinidad muestran una regulación diferencial de los genes que codifican el canal rectificador de entrada de K^+ *AKT1* (Golldack, D. y col. 2003).

Otra familia de transportadores que también está implicada en los movimientos de K^+ y Na^+ es la HKT (Rubio, F. y col. 1995, Schachtman, D. P. y Schroeder, J. I. 1994). En *A. thaliana* AtHKT1 (Berthomieu, P. y col. 2003, Davenport, R. J. y col. 2007, Sunarpi y col. 2005, Uozumi, N. y col. 2000) se ha relacionado con el movimiento del Na^+ en el xilema y en el floema (Davenport, R. J. y col. 2007, Rus, A. y col. 2006, Sunarpi y col. 2005) y puede ser importante para restringir el paso de Na^+ a la parte aérea, donde la acumulación de este catión puede llegar a ser tóxica al inhibir procesos fundamentales como la fotosíntesis. Según los resultados de esta Tesis

(Figuras 4.7, 4.8 y 4.22), la distribución del Na^+ en *T. halophila* es sustancialmente distinta a la que presenta *A. thaliana*. Las relaciones K^+/Na^+ en la parte aérea de *T. halophila* son 10 veces superiores a las de *A. thaliana* cuando las plantas se someten a ayuno de K^+ en presencia de Na^+ (relación K^+/Na^+ de $1,37 \pm 0,31$ en *T. halophila* frente a $0,14 \pm 0,03$ en *A. thaliana*, para las concentraciones salinas de 25, 50, 75 y 100 mM). Esta notable diferencia podría ser debida a diferencias en la funcionalidad o la regulación de los transportadores HKT1 de ambas especies, lo que necesita ser investigado en mayor profundidad.

En conclusión, una diferencia importante entre plantas tolerantes y sensibles a la salinidad puede residir en la regulación diferencial de los genes que codifican transportadores y canales de K^+ y Na^+ así como en una distinta funcionalidad de los mismos (Amtmann, A. 2009). La identificación en las plantas más tolerantes a la salinidad de estos mecanismos relacionados con la regulación génica y la funcionalidad de transportadores, implicados en la homeostasis K^+/Na^+ , puede proporcionar herramientas valiosas para incrementar la tolerancia a la salinidad de las plantas más sensibles.

4.3 Obtención de mutantes del gen *AtHAK5*.

Además de la importancia de la regulación transcripcional de los genes que codifican los transportadores HAK1, la regulación de la actividad proteica también puede ser relevante. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre los posibles dominios funcionales de este tipo de proteínas. Para ahondar en este aspecto y estudiar las relaciones estructura función del transportador de K^+ de alta afinidad de *A. thaliana* *AtHAK5*, se llevó a cabo una mutagénesis al azar del cDNA que codifica el transportador y se utilizó el sistema de expresión heteróloga de la levadura para seleccionar los mutantes con la función alterada. Se buscaron transportadores más eficientes, capaces de transportar K^+ incluso con altas concentraciones de Na^+ externo. El objetivo a largo plazo consistiría en transformar plantas con estas nuevas versiones del transportador, haciéndolas más eficientes en la nutrición de K^+ en condiciones de salinidad.

Se realizaron PCRs en condiciones mutagénicas (es decir, con altas tasas de error), sobre la construcción *AtHAK5* en pDR195. Ya que esta construcción no complementa en la cepa de *S. cerevisiae* WΔ3 deficiente en el transporte de K^+ , ni en la cepa 9.3 deficiente además en sistemas de salida de Na^+ , se preparó también otra construcción con la mutación en el extremo 3' L776H (Rubio, F. y col. 2000), que sí complementaba en levadura y tenía una V_{max} 10 veces superior a la del *AtHAK5* silvestre.

4.3.1 Mutagénesis sobre *AtHAK5* silvestre.

Dos métodos de mutagénesis, que favorecían la obtención de transversiones o de transiciones, fueron utilizados para identificar aminoácidos clave para la absorción de K^+ y una mayor especificidad frente a Na^+ (véase *Materiales y Métodos*). Para aislar nuevos mutantes de *AtHAK5* se usó la cepa de levadura 9.3, que es igualmente deficitaria en el transporte de K^+ que WΔ3 (por las mutaciones en los transportadores TRK1 y TRK2), pero más sensible a Na^+ . La cepa 9.3 posee una inserción en los cuatro genes ENA que codifican para las ATPasas de Na^+ de membrana plasmática implicadas en la salida de Na^+ (Bañuelos, M. A. y col. 1995b, Garciadeblas, B. y col. 1993, Haro, R. y Rodríguez-Navarro, A. 1991). Esta cepa se transformó con el cDNA mutado de *AtHAK5* junto con el plásmido vacío y abierto de pDR195, seleccionándose colonias

Capítulo 4

que habían reconstruido el vector más el inserto. Para no perder colonias mutantes, como se ha descrito en *Materiales y Métodos*, los mutantes se aislaron sin presión selectiva por K^+ , en medio SD sin uracilo pero con 100 mM de K^+ , para obtener todos los que habían reconstruido el vector.

Se hallaron alrededor de 1500 clones que daban lugar a crecimiento de la levadura en medio sin uracilo. Posteriormente se replicaron las colonias en medios que contenían 0,1 mM de K^+ , en ausencia o en presencia de varias concentraciones de inhibidores como Na^+ , NH_4^+ o Li^+ . De las colonias más tolerantes se aislaron los plásmidos y se retransformaron primero en *E. coli* (DH5a) y luego de nuevo en la levadura 9.3, para comprobar que el mejor comportamiento de la cepa era debido al plásmido y no de la reversión del fondo genético de la levadura (como en muchas ocasiones se ha descrito que puede suceder).

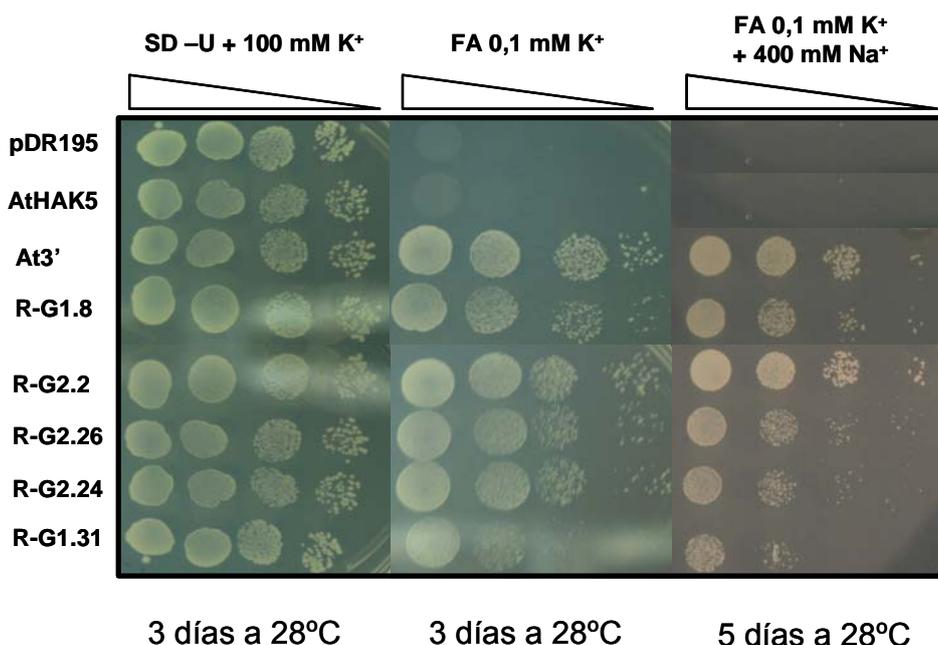


Figura 4.24. Crecimiento en medio sólido de las levaduras 9.3 transformadas con el plásmido vacío, con el cDNA silvestre de *AtHAK5* y con las versiones de *AtHAK5* mutantes, incluida la mutación L776H (*At3'*). Se observa crecimiento de los mutantes incluso con inhibidores del transporte de K^+ , mientras el del *AtHAK5* original no crece. Se presentan diluciones seriadas donde la primera de la izquierda equivale a una DO de 1 y los siguientes inóculos equivalen a diluciones decimales del anterior.

Posteriormente se realizaron, como se ha descrito anteriormente, experimentos de crecimiento en medio sólido FA a 28 °C con 0,1 mM de K⁺, mediante gotas de 10 µL de diluciones seriadas de suspensiones del cultivo para estudiar el crecimiento a bajo K⁺ y en presencia de inhibidores (Figura 4.24).

Asimismo, se realizó la secuenciación del cDNA de AtHAK5 de los clones obtenidos que mostraban una complementación en la levadura 9.3 y se obtuvieron las mutaciones mostradas en la Tabla 4.5.

Aunque todos los mutantes estudiados mostraron complementación en la cepa 9.3, no hubo ninguna que mejorara el crecimiento del mutante At3' (L776H) obtenido por Rubio y col. en 2000, a pesar de que algunos clones presentaban más de una mutación. Por ello se pasó al estudio de mutantes sobre el gen de *AtHAK5* previamente mutado en el extremo 3', L776H, para encontrar transportadores más eficientes que el ya descrito en el año 2000.

4.3.2 Mutagénesis de *AtHAK5* 3' (L776H).

La obtención del mutante L776H de AtHAK5 se realizó a partir de un cebador en el extremo 3' que incluía la mencionada mutación (5' CCACTAGTTTATAACTCATAGGTCATGCCAACCTTGAGATGCTT 3') y otro desde la mitad del cDNA. El fragmento de PCR que incluía la mutación se digirió con las mismas enzimas de restricción que el silvestre ya clonado en pDR195 y tras una purificación se ligó. Finalmente se secuenció para verificar la presencia de la mutación.

El proceso de mutagénesis al azar fue idéntico al de *AtHAK5* silvestre ya comentado en *Materiales y Métodos*. La obtención de clones positivos también se realizó del mismo modo que con el silvestre. Sin embargo, como el mutante At3' toleraba importantes cantidades de Na⁺ se incrementó la concentración de Na⁺ a 600 y 800 mM y se redujo también la de K⁺ a 50 µM en algunos casos (Figura 4.26). Además, se utilizó también litio, que es tóxico a menores concentraciones que el Na⁺.

Capítulo 4

Tabla 4.5. *Mutaciones encontradas tras la mutagénesis al azar de AtHAK5 y características del residuo con respecto a otros transportadores de K⁺.*

Nombre del mutante	Sustitución	Características de ese residuo
R-A1.3	S550G	No conservado
	Y563H	Muy conservado en otros transportadores
	S603P	No conservado, misma sustitución en otros HAKs como HvHAK1 o ThHAK5
R-G1.1	P367S	Variable, misma sustitución en otros transportadores
	V457A	En región transmembrana nº 10, no conservado
	T513M	En región transmembrana nº 12, no conservado
	G689W	No conservado
	G765E	No conservado
R-G1.8	V226E	En región transmembrana nº 4, no conservado
	M519L	En región transmembrana nº12, no conservado, misma sustitución en HvHAK1 y en NcHAK1
	T571N	Muy conservado como prolina (P), pero es el único transportador junto al ThHAK5 que no tiene una P en 571
	R610C	Conservado en HAKs de plantas, sustituido por glicina (G) en AtKT4, AtKT3, AtKT2 y HvHAK2
	A694V	No conservado, sustituido por treonina (T) en ThHAK5
R-G1.31	L719M	No conservado
	E736G	No conservado
	K778N	No conservado
R-G2.2	E149V	No conservado
	F268Y	En región transmembrana nº5, muy conservado, misma sustitución en el resto de las especies, [única excepción junto a ThHAK5 (Y268V) y Kup (Y268R)]
	R541C	No conservado
	S575T	No conservado
	G780S	Conservado en todas las especies

R-G2.24	A383S	En región transmembrana n°8, solo se ha sustituido por G en otras especies
	K594R	Conservado en transportadores de plantas.
R-G2.26	Y500H	No conservado
	F588L	No conservado
	L596F	No conservado
	E714K	No conservado, misma sustitución en AtKT3 y AtKT1

De los 17 clones seleccionados dos presentaron importantes diferencias con el mutante At3' (Figura 4.26). El clon R-G9' presentó mutaciones en tres residuos: R168G, T503K y S504G (todos en residuos no conservados aunque los dos últimos forman parte del inicio del último segmento transmembrana). El clon R-G11' presentó una sola mutación, F130S, que se encuentra en una región conservada evolutivamente entre los transportadores de K⁺.

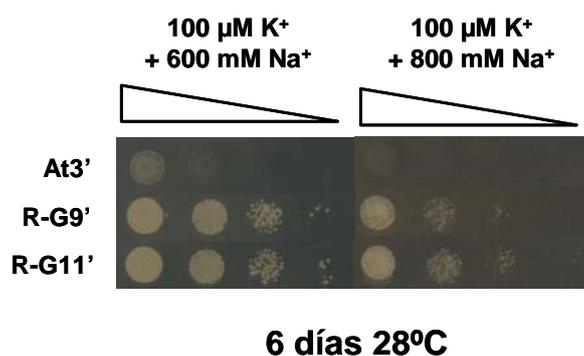


Figura 4.26. Crecimiento en medio sólido de la cepa de levadura 0.3 transformada con las versiones mutantes de AtHAK5 At3' (L776H), R-G9' (R168G, T503K y S504G) y R-G11' (F130S) en medios con 600 y 800 mM de Na⁺ y a 100 μM de K⁺. Se observa una aumentada capacidad de transporte de K⁺ frente a Na⁺ de los mutantes R-G9' y R-G11' incluso a altas concentraciones de Na⁺. Se presentan diluciones seriadas donde la primera de la izquierda equivale a una DO de 1 y los siguientes inóculos equivalen a diluciones decimales del anterior.

Asimismo, se analizaron los clones R-G9' y R-G11' en medios con otros inhibidores como NH_4^+ y Li^+ (Figura 4.27). Se observó que estos clones, especialmente el R-G9' frente a Li^+ , mostraron también mayor tolerancia (Figura 4.27).

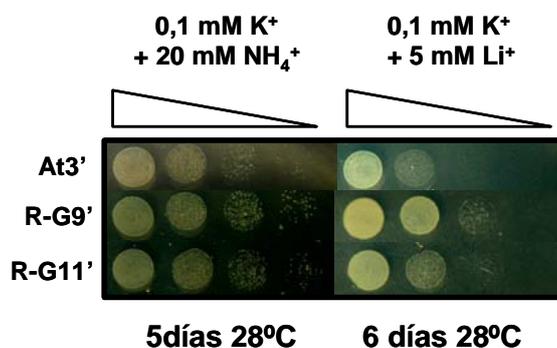


Figura 4.27. Crecimiento en sólido (FA) de clones mutados de *At3'* (L776H) en medios con $100 \mu\text{M}$ de K^+ más inhibidores del transporte de K^+ como 5 mM de LiCl y 20 mM de NH_4Cl . Se presentan diluciones seriadas donde la primera de la izquierda equivale a una DO de 1 y los siguientes inóculos equivalen a diluciones decimales del anterior.

4.3.3 Discusión.

Con objeto de generar diversidad a nivel génico, se han desarrollado diversos métodos de mutagénesis al azar tanto a nivel académico como industrial (Wong, T. S. y col. 2006). Un estudio de 19 métodos de mutagénesis mostró que la mayor variabilidad genética, en cuanto a cambio de aminoácido resultante, se obtenía mediante la generación tanto de transiciones (intercambio de purinas por pirimidinas o viceversa) como de transversiones (intercambio del mismo tipo de nucleótido) (Wong, T. S. y col. 2006). Por ello, Wong y col. (2007) sugirieron que se debía utilizar una combinación de un método dirigido hacia la obtención de transversiones, junto a uno dirigido hacia las transiciones para tener el mayor rango de posibles cambios de aminoácidos. Esta propuesta ha sido utilizada para la realización de la mutagénesis al azar en el presente trabajo, aunque los autores advirtieron que, a pesar de todo, hay determinadas sustituciones de aminoácidos que se realizan con una frecuencia extremadamente baja.

En la adquisición de K^+ a través de la raíz el transportador HAK5 es fundamental (Figura 1.1; Gierth, M. y col. 2005, Maathuis, F. J. M. 2009, Qi, Z. y col. 2008, Rubio, F. y col. 2008), ya que es el único sistema capaz de absorber K^+ cuando éste está presente a bajas concentraciones (20-10 μ M) (Qi, Z. y col. 2008, Rubio, F. y col. 2008). Por otra parte, la discriminación K^+/Na^+ de los transportadores de K^+ de la familia HAK puede jugar un papel en la homeostasis del K^+ durante la adaptación a la salinidad (Fulgenzi, F. R. y col. 2008). Por ello, biotecnológicamente sería muy interesante encontrar un transportador de alta afinidad por K^+ , con una alta discriminación K^+/Na^+ , capaz de suministrar suficiente K^+ a la planta en condiciones de bajo K^+ y salinidad.

En este estudio, el uso de *S. cerevisiae* como sistema heterólogo de expresión ha permitido identificar modificaciones en el transportador de K^+ de alta afinidad, AtHAK5, que lo hacen más eficiente en la absorción de K^+ y que se inhiben en menor medida por la presencia de NaCl. La cepa utilizada ha sido 9.3 (Bañuelos, M. A. y col. 1995a, Rubio, F. y col. 1999), deficiente en la entrada de K^+ y en la salida de Na^+ al portar mutaciones en los genes que codifican los transportadores de K^+ TRK1 y TRK2, y las ATPasas de Na^+ ENA1-4 (*Mata trkl trk2 ura3 leu2 trpl ade2 enal::HIS3::ena4*).

Ninguna de las mutaciones encontradas en este trabajo se había encontrado previamente en otros transportadores HAK (Garcia-deblas, B. y col. 2007, Mangano, S. y col. 2008, Senn, M. E. y col. 2001; Figura 4.28). Aunque para los canales de K^+ sí se han identificado los aminoácidos dentro del poro encargados de la unión del K^+ , GYGD/E (Doyle, D. A. y col. 1998, Rodríguez-Navarro, A. 2000, Ward, J. M. y col. 2009), dicho motivo no se encuentra en los transportadores de K^+ de la familia HAK. Para identificar dominios funcionales y el sitio de unión del K^+ serían necesarios un gran número de estudios que incluyeran el análisis estructura función y la cristalización proteica en presencia de K^+ . Estudios como el presentado en esta Tesis constituyen el comienzo en la identificación y caracterización de dichos dominios.

Se ha descrito que el extremo amino terminal de las proteínas de membrana es importante para la correcta inserción de éstas en la membrana del retículo endoplasmático de la célula, y su posterior traslado a la membrana plasmática (Lejay, L. y col. 2008, Lewin, B. 2008). En el estudio realizado en esta Tesis Doctoral no se ha aislado ninguna versión del transportador con una mutación anterior al aminoácido 130 (tras el segundo segmento transmembrana) y tampoco lo han hecho otros estudios de

Capítulo 4

mutagénesis sobre transportadores de K^+ de alta afinidad (Garcia-deblás, B. y col. 2007, Mangano, S. y col. 2008, Senn, M. E. y col. 2001). Además, se ha visto que cambiando el extremo N-terminal del LeHAK5 por el de su homólogo CaHAK1 de pimiento, se conseguía la complementación en levadura que no se obtuvo con el transportador LeHAK5 original (Nieves-Cordones, M. y col. 2008). También la adición del extremo amino terminal de HvHAK1 de cebada al transportador OsHAK1 de arroz, del que se disponía de un cDNA truncado que daba lugar a una proteína en la que faltaba el extremo amino terminal, daba lugar a complementación en levadura (Bañuelos, M. A. y col. 2002). Por otro lado, al sustituir el extremo N-terminal del HvHAK1 de cebada por el del transportador HvHAK2 (que no complementaba levadura), la nueva quimera tampoco complementó. Por lo tanto, de todos estos estudios se puede concluir que el extremo amino terminal de estos transportadores debe poseer características importantes para la complementación funcional en la levadura, posiblemente por jugar un papel en la inserción de estos transportadores en la membrana plasmática. Es posible además que este extremo amino terminal juegue un papel importante en la función de estos sistemas de transporte en la planta, lo que sería interesante investigar en el futuro.

La región C-terminal, después del último segmento transmembrana ha sido la receptora de dos tercios de todas las mutaciones encontradas en este trabajo, sugiriendo un papel importante en la regulación, localización o función del transportador. En otros trabajos con HvHAK1 (Mangano, S. y col. 2008, Senn, M. E. y col. 2001), PpHAK1 (Garcia-deblás, B. y col. 2007) o AtHAK5 (Rubio, F. y col. 2000) se encontraron resultados similares. En los estudios de Senn y col. 2001, Garcia-deblás y col. 2007 y Rubio y col. 2000, se describieron mutaciones que daban lugar a cambios en la velocidad máxima del transporte o en la afinidad del transportador por K^+ . En ninguno de estos trabajos se confirmó si el mayor crecimiento de las levaduras era debido a un mayor número de transportadores en la membrana o a un aumento de la velocidad máxima de los transportadores. Sólo Garcia-deblás y col. en 2007 describieron un transportador con menor K_m tras las mutaciones, aunque la K_m original de PpHAK1 era de 200 μM , no comparable al resto de transportadores HAK de alta afinidad.

La región C-terminal parece ser importante para determinar la V_{max} de los transportadores KT/HAK/KUP (Mangano, S. y col. 2008, Rubio, F. y col. 2000, Schleyer, M. y Bakker, E. P. 1993). Sin embargo, las mutaciones de los clones R-G9' (R168G, T503K y S504G) y R-G11' (F130S) no se localizan en esa zona, abriendo la

posibilidad de una modificación en la afinidad por el K^+ . Este extremo no se puede concluir en el presente trabajo y son necesarios más estudios de absorción de K^+ y Rb^+ para estudiar los cambios que las mutaciones han producido sobre las características cinéticas del transporte.

Recientemente han aparecido recursos informáticos que permiten identificar posibles dianas de fosforilación de proteínas mediante búsquedas en bases de datos. El programa *PhosPhAt* en su versión 3.0 (Heazlewood, J. L. y col. 2008), basado en sitios de fosforilación encontrados en proteínas de *Arabidopsis* por espectrometría de masas a gran escala de varios grupos de investigación, predice un sitio de fosforilación en la Serina 35 de AtHAK5. Por otro lado, usando la base de datos *Plant Protein Phosphorylation Database* en su versión 1.1 (P3DB; (Gao, J. y col. 2009) sólo se identificaron los residuos 507, 511 y 531 (Tirosina, Treonina y Tirosina respectivamente) como posibles sitios de fosforilación, por comparación con *Brassica napus*. Por último, la base de datos ProMEX (Hummel, J. y col. 2007) no produce ningún resultado de fosforilación cuando se introduce el gen *AtHAK5*. Hay que destacar que ninguno de los resultados mostrados por estos recursos bioinformáticos ha coincidido con residuos en los que han sido encontradas mutaciones en la presente Tesis Doctoral.

Hasta la fecha no se han descrito en la literatura transportadores de K^+ de plantas capaces de mantener el crecimiento de *S. cerevisiae* a 800 mM de NaCl con un aporte de K^+ de 100 μ M. La tolerancia a este elevado estrés salino descrita en este trabajo para algunos mutantes puede ser explicada por una reducción de la acumulación de Na^+ y/o una elevada capacidad de acumulación de K^+ . Para dilucidar este extremo se deberá realizar un análisis del contenido iónico de las levaduras que expresan los clones mutantes en presencia de Na^+ .

Como se ha destacado en la *Introducción* y en la Figura 1.8, el coeficiente citosólico K^+/Na^+ ha sido nombrado repetidamente como un factor clave en la tolerancia a la salinidad (Colmer, T. D. y col. 2006, Cuin, T. A. y col. 2003, Dvorák, J. y col. 1994, Gaxiola, R. y col. 1992, Gorham, J. y col. 1991, Maathuis, F. J. M. y Amtmann, A. 1999). Por tanto, los transportadores codificados por los clones R-G9' y R-G11' podrían emplearse en el futuro como herramientas para abordar el problema de la salinidad, ya que su sobreexpresión podría dar lugar a plantas con una mayor proporción citosólica K^+/Na^+ .

Recientemente se ha descrito, aunque con poca profundidad, la única planta transgénica que sobreexpresa un transportador de alta afinidad de K^+ (Fulgenzi, F. R. y col. 2008). Se trata de *A. thaliana* que sobreexpresa HvHAK1, y aunque tan solo se han presentado estudios de absorción de Rb^+ , en presencia y ausencia de K^+ , sería interesante hacer un análisis del transporte y la nutrición de K^+ en presencia de Na^+ para verificar que realmente mejoran la homeostasis del K^+ en condiciones salinas. Hay que destacar que los transportadores de la familia HAK, aunque posean alta afinidad por el K^+ también son inhibidos por concentraciones de Na^+ no muy elevadas. Por ello resulta muy interesante la selección de nuevos transportadores más tolerantes a Na^+ que mantengan la afinidad por el K^+ . En esta Tesis se han presentado dos buenos candidatos.

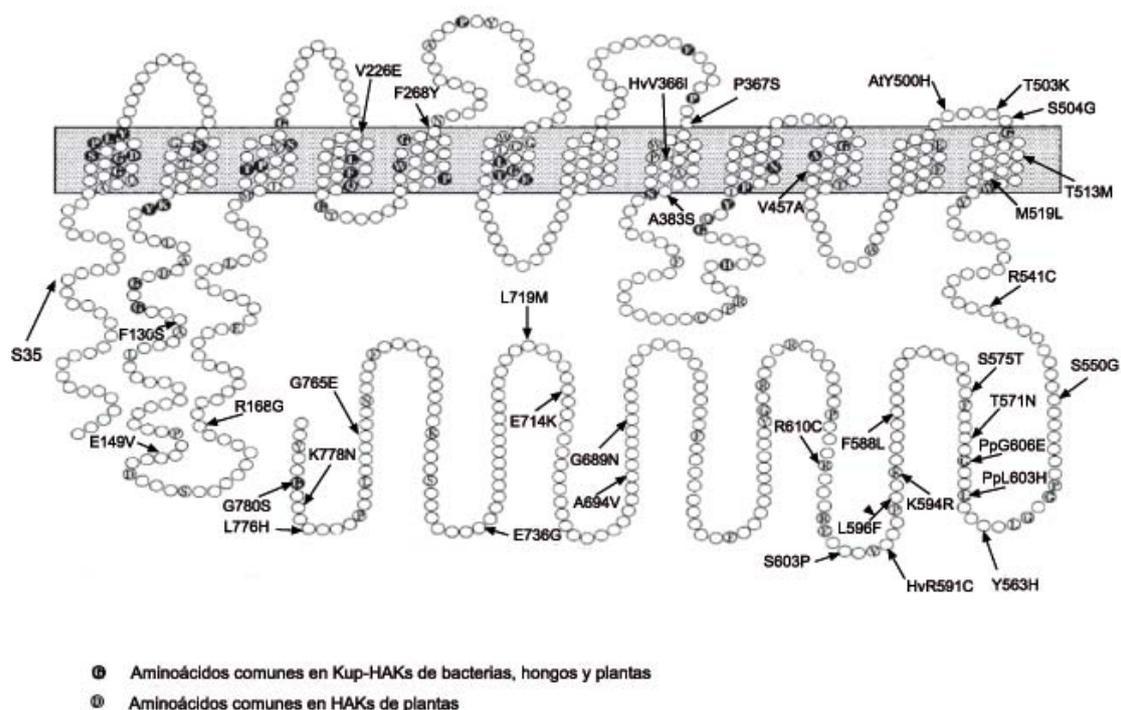


Figura 4.28. Localización de las mutaciones encontradas en un modelo de transportador de la familia HAK. Se incluyen las mutaciones encontradas en cebada (*Hv*) y *P. patens* (*Pp*) por Fulgenzi y col. y Garcíadeblas y col.. Asimismo se incluye el posible residuo receptor de una fosforilación según el programa PhosPhAt. Modificado de Rubio y col., 2000.

4.4 Estudio del transporte de K^+ de alta afinidad en dos variedades *S. lycopersicum* y en *S. pennellii*.

Tras la caracterización fisiológica y molecular del transporte de K^+ en el rango de alta afinidad en ausencia y en presencia de salinidad, en la especie modelo, *A. thaliana*, y habiéndola comparado con su homóloga tolerante a salinidad, *T. halophila*, se realizó el estudio similar en plantas agrónomicamente relevantes como el tomate. Las variedades escogidas de *S. lycopersicum* fueron, la variedad Micro-Tom o Microtomate, la variedad San Pedro, que al ser una variedad comercial, permite la posible extrapolación de los resultados al campo, y por otro lado, la especie de tomate silvestre *S. pennellii*, más tolerante a la salinidad que las dos anteriores, capaz de crecer en laderas rocosas y secas así como en áreas arenosas, y que puede revelar importantes mecanismos de tolerancia a la salinidad y la sequía (Peralta, I. E. y col. 2005).

Para este estudio, las plantas se sometieron a distintos tratamientos en un sistema hidropónico, (control 1/5 de Hoagland, sobre el que se adicionó NaCl, NH_4Cl o NaCl más NH_4Cl). Las plantas de estos 4 tratamientos se separaron además en dos grupos y a uno de ellos se le retiró el K^+ , haciendo un total de 8 tratamientos entre plantas ayunadas de K^+ y no ayunadas. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis mineral de raíz y parte aérea de todas las variedades en todos los tratamientos. Por otra parte, se llevó a cabo un análisis fisiológico del transporte de K^+ de alta afinidad y también se analizó la expresión génica mediante qPCR del gen que codifica el transportador de K^+ de alta afinidad *LeHAK5* (Nieves-Cordones, M. y col. 2007, Wang, Y. H. y col. 2001).

4.4.1 Efecto de los tratamientos aplicados en el transporte de K^+ de alta afinidad.

Se estudió el efecto de los tratamientos descritos anteriormente sobre la absorción de K^+ realizando experimentos de transporte de K^+ en el rango de la alta afinidad, como los descritos en apartados anteriores. Las figuras 4.29, 4.30 y 4.31 muestran un ejemplo representativo de la absorción de K^+ en el rango micromolar para cada especie y cada tratamiento. Así, se observó que al ayunar las plantas de K^+ , éstas desarrollaron un sistema de transporte de alta afinidad, tanto si habían sido tratadas con

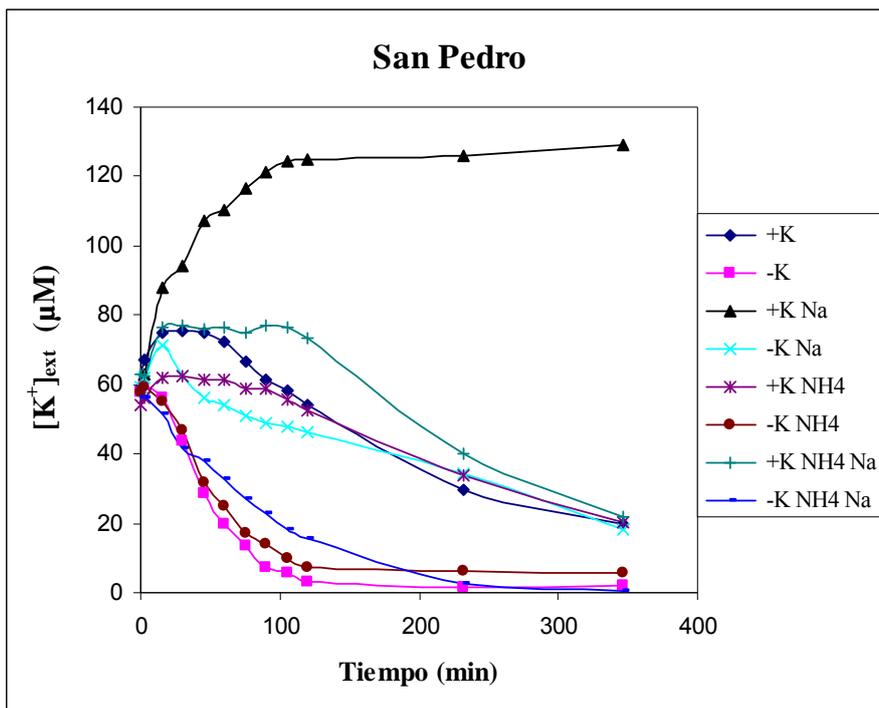


Figura 4.29. Absorción de K^+ de alta afinidad para la variedad San Pedro en todas las condiciones de cultivo. Se muestra una planta representativa por tratamiento.

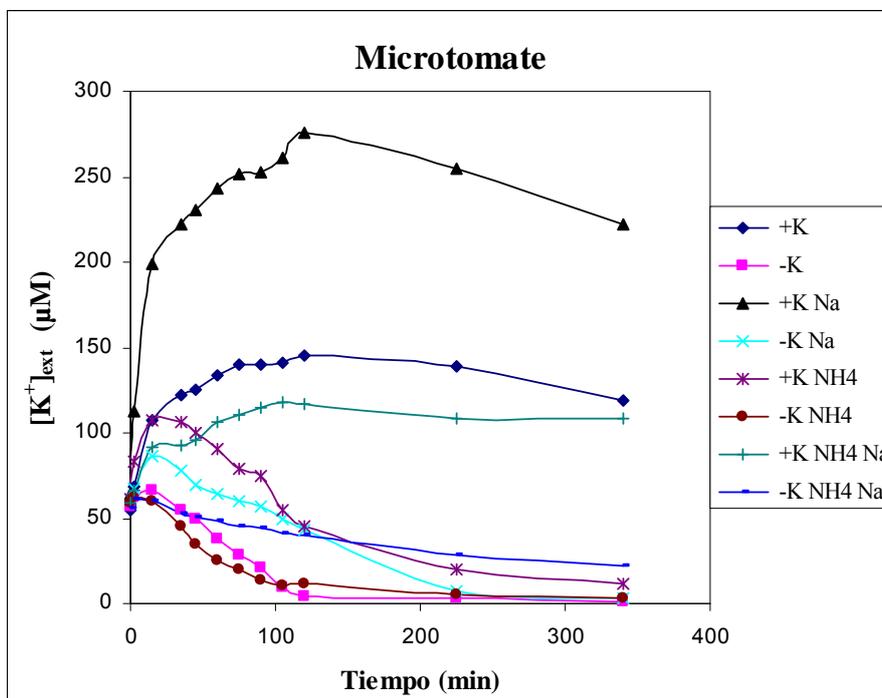


Figura 4.30. Absorción de K^+ de alta afinidad para la variedad Microtomate en todas las condiciones de cultivo. Se muestra una planta representativa por tratamiento.

NH_4^+ en la solución de crecimiento como si no. En las condiciones control sin ayunar de K^+ , la variedad San Pedro también absorbió, aunque dicha absorción empezó más tarde. El resto de tratamientos donde no se retiró el K^+ también presentaron la misma absorción lenta y con un tiempo de retardo similar excepto en el tratamiento control más NaCl (Figura 4.29).

Microtomate absorbió de forma similar a San Pedro (Figura 4.30), aunque en este caso los tratamientos control con K^+ , y más NaCl y NH_4^+ sin ayunar, no presentaron transporte.

S. pennellii fue la que presentó una capacidad de transporte más reducida (Figura 4.31). En la mayoría de los casos, tuvo lugar salida de K^+ en lugar de absorción, y tan solo se observó una absorción clara de K^+ en condiciones control ayunadas de K^+ , y en las mismas condiciones con NH_4^+ .

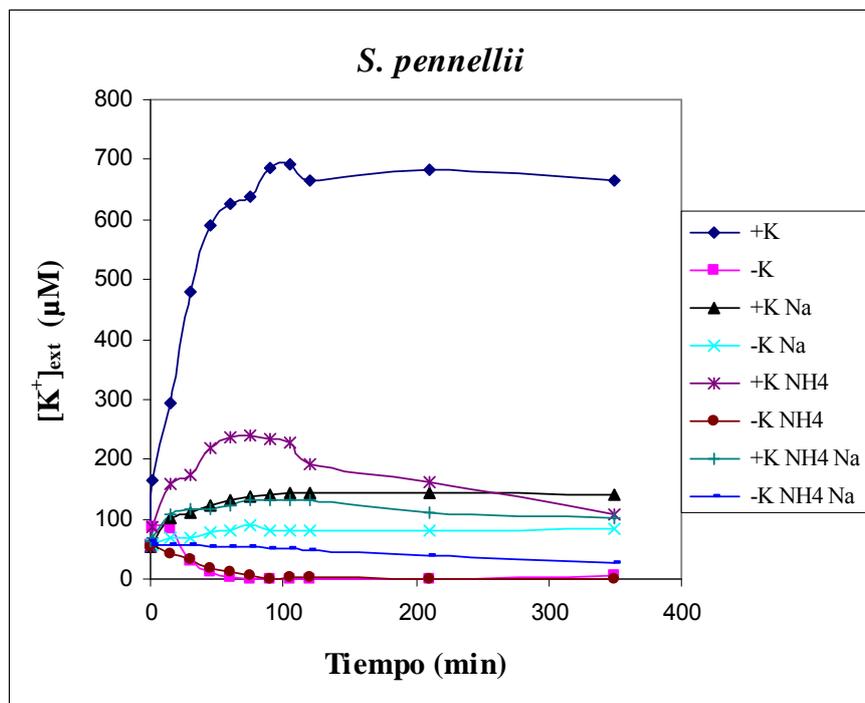


Figura 4.31. Absorción de K^+ de alta afinidad para la especie *S. pennellii* en todas las condiciones de cultivo. Se muestra una planta representativa por tratamiento.

Para la comparación de la capacidad de absorción de K^+ de las distintas variedades de *S. lycopersicum* y *S. pennellii*, se calcularon las velocidades de absorción de K^+ por gramo de peso seco de raíz para cada tratamiento y variedad, durante la primera hora de experimento de desaparición de K^+ , que corresponde a una

concentración externa de K^+ de $50 \mu M$ (Figura 4.32). Así, se observó que al ayunar las plantas de K^+ , todas desarrollaron un sistema de transporte de alta afinidad, tanto en el tratamiento con NH_4^+ en la solución de crecimiento como en el que no tenía NH_4^+ . Por tanto, en términos generales, la absorción de K^+ en el rango de la alta afinidad se vio favorecida por el tratamiento de NH_4^+ , mientras que los tratamientos salinos ejercieron el efecto opuesto (Figura 4.32).

También se puede observar que San Pedro es la variedad que muestra velocidades de absorción más altas en este rango en la mayoría de tratamientos, mientras que *S. pennellii* las más bajas (Figura 4.32).

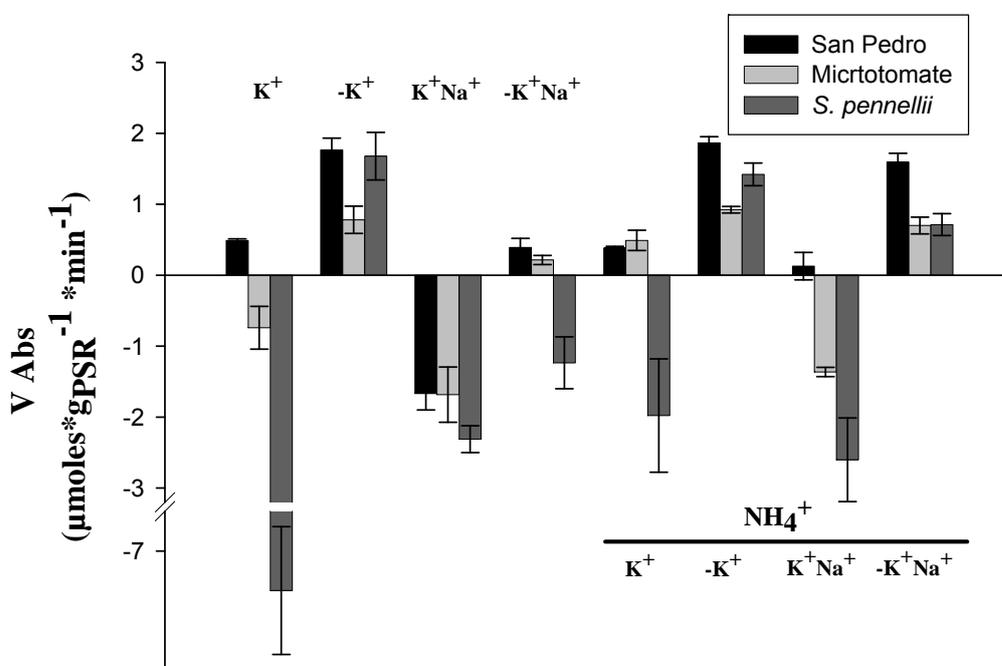


Figura 4.32. Velocidad de absorción de K^+ para una concentración externa de $50 \mu M$. Las plantas sometidas a los distintos tratamientos, ayunadas de K^+ y sin ayunar, se sometieron al mismo experimento descrito en la Figura 4.12 de absorción de K^+ en el rango micromolar. Sobre estas gráficas se calculó la velocidad máxima de absorción de K^+ (en los primeros minutos del experimento). Se muestra la velocidad de absorción en micromoles de K^+ absorbidos por gramo de peso seco de raíz y por minuto, junto a sus errores estándar de al menos 4 plantas.

4.4.2 Concentraciones iónicas.

Tras estos ensayos de absorción de K^+ en el rango de la alta afinidad, las plantas se lavaron con agua fría, se separaron en raíz y parte aérea, y tras un periodo de secado se sometieron a digestión ácida y se determinaron las concentraciones de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} para cada una de las plantas utilizadas.

4.4.2.1 Concentraciones de K^+ .

El ayuno de K^+ redujo las concentraciones de K^+ de todas las especies, siendo *S. pennellii* la más afectada, especialmente en la parte aérea (Tabla 4.6).

Microtomate presentó las mayores concentraciones de K^+ en la raíz mientras que *S. pennellii* las más bajas.

El tratamiento con NH_4^+ aumentó sensiblemente las concentraciones de K^+ en la raíz de San Pedro a la vez que redujo las de Microtomate. En *S. pennellii* no se observaron grandes diferencias en las concentraciones de K^+ en la raíz por la presencia de NH_4^+ , viéndose ligeramente aumentadas en algunos tratamientos.

Los tratamientos salinos, por su parte, disminuyeron significativamente las concentraciones de K^+ en la raíz para todos los tratamientos, siendo *S. pennellii* donde menos descendieron.

En cuanto a las concentraciones de K^+ de la parte aérea, Microtomate fue de nuevo la que mayores concentraciones presentó mientras *S. pennellii* la de concentraciones más bajas. Además, el ayuno hizo disminuir las concentraciones de K^+ de la parte aérea de *S. pennellii* más que en las otras dos variedades de tomate.

El tratamiento con NH_4^+ aumentó también las concentraciones de K^+ de la parte aérea de San Pedro a la vez que redujo las de Microtomate, especialmente en los tratamientos sin Na^+ .

Las concentraciones de K^+ en la parte aérea descendieron significativamente por la presencia de Na^+ , con mayor intensidad que en la raíz, y especialmente *S. pennellii* que las redujo en más de un 50%.

Tabla 4.6. Concentraciones de K^+ en raíz y parte aérea de las tres variedades en todos los tratamientos.

	Tratamiento	$[K^+]$ Raíz ($\mu\text{moles g}^{-1}$ PS)	$[K^+]$ Parte aérea ($\mu\text{moles g}^{-1}$ PS)
San Pedro	+ K^+	1399,8 \pm 81,2	795,86 \pm 25,8
	- K^+	600,01 \pm 33,9	231,20 \pm 22,5
	+ $K^+ Na^+$	637,03 \pm 20,7	255,53 \pm 58,6
	- $K^+ Na^+$	448,03 \pm 18,9	274,70 \pm 13,6
	+ $K^+ NH_4^+$	1637,03 \pm 31,4	925,93 \pm 93,3
	- $K^+ NH_4^+$	863,54 \pm 23,3	334,90 \pm 31,1
	+ $K^+ NH_4^+ Na^+$	985,70 \pm 59,4	542,81 \pm 62,1
	- $K^+ NH_4^+ Na^+$	495,07 \pm 8,1	268,04 \pm 37,2
Microtomate	+ K^+	1765,01 \pm 32,1	1062,44 \pm 39,0
	- K^+	837,70 \pm 15,9	526,15 \pm 18,2
	+ $K^+ Na^+$	1170,90 \pm 27,7	599,04 \pm 21,3
	- $K^+ Na^+$	402,10 \pm 6,4	327,57 \pm 28,4
	+ $K^+ NH_4^+$	1502,51 \pm 44,4	792,10 \pm 36,4
	- $K^+ NH_4^+$	849,20 \pm 48,5	285,10 \pm 15,3
	+ $K^+ NH_4^+ Na^+$	895,00 \pm 32,0	495,35 \pm 27,6
	- $K^+ NH_4^+ Na^+$	494,48 \pm 39,3	246,37 \pm 22,9
<i>S. pennellii</i>	+ K^+	1246,56 \pm 116,7	1082,08 \pm 126,9
	- K^+	306,83 \pm 13,4	224,50 \pm 27,6
	+ $K^+ Na^+$	718,21 \pm 34,9	396,82 \pm 97,5
	- $K^+ Na^+$	143,64 \pm 13,1	90,64 \pm 23,9
	+ $K^+ NH_4^+$	1499,87 \pm 47,2	823,94 \pm 42,6
	- $K^+ NH_4^+$	352,96 \pm 5,5	221,50 \pm 20,2
	+ $K^+ NH_4^+ Na^+$	1138,54 \pm 94,9	439,97 \pm 51,2
	- $K^+ NH_4^+ Na^+$	614,71 \pm 49,6	141,52 \pm 6,4

Media de la concentración de al menos 4 plantas expresada en micromoles g^{-1} de peso seco de raíz junto a sus errores estándar.

Tabla 4.7. Concentraciones de Na^+ en raíz y parte aérea de las tres variedades en todos los tratamientos.

	Tratamiento	$[\text{Na}^+]$ Raíz ($\mu\text{moles g}^{-1}$ PS)	$[\text{Na}^+]$ Parte aérea ($\mu\text{moles g}^{-1}$ PS)
San Pedro	+K ⁺	30,40 ± 4,5	22,87 ± 2,1
	-K ⁺	245,30 ± 19,1	34,47 ± 3,5
	+K ⁺ Na ⁺	917,05 ± 17,1	2311,90 ± 109,1
	-K ⁺ Na ⁺	1133,22 ± 46,0	1137,94 ± 27,0
	+K ⁺ NH ₄ ⁺	68,15 ± 9,8	28,08 ± 2,0
	-K ⁺ NH ₄ ⁺	290,42 ± 14,9	30,65 ± 2,1
	+K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	690,22 ± 16,4	894,34 ± 63,4
	-K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	1200,30 ± 49,1	1032,14 ± 104,5
Microtomate	+K ⁺	49,0 ± 3,1	67,87 ± 36,4
	-K ⁺	196,27 ± 22,1	37,56 ± 6,1
	+K ⁺ Na ⁺	1312,72 ± 41,7	840,12 ± 119,9
	-K ⁺ Na ⁺	1626,26 ± 41,5	1095,07 ± 50,6
	+K ⁺ NH ₄ ⁺	50,89 ± 1,2	24,11 ± 2,0
	-K ⁺ NH ₄ ⁺	203,26 ± 16,4	14,83 ± 1,5
	+K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	948,01 ± 32,4	544,76 ± 34,0
	-K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	1282,38 ± 22,2	678,42 ± 106,0
<i>S. pennellii</i>	+K ⁺	63,43 ± 6,4	37,28 ± 0,3
	-K ⁺	414,00 ± 48,4	183,97 ± 36,8
	+K ⁺ Na ⁺	737,37 ± 101,0	2410,83 ± 278,0
	-K ⁺ Na ⁺	1093,01 ± 90,2	3356,77 ± 448,7
	+K ⁺ NH ₄ ⁺	75,40 ± 8,2	29,34 ± 2,6
	-K ⁺ NH ₄ ⁺	261,04 ± 18,9	75,68 ± 6,7
	+K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	883,96 ± 33,5	1453,59 ± 104,7
	-K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	421,18 ± 41,1	759,91 ± 39,5

Media de la concentración de al menos 4 plantas expresada en micromoles g^{-1} de peso seco de raíz junto a sus errores estándar.

4.4.2.2 Concentraciones de Na^+ .

El ayuno de K^+ , como se ha descrito en otras ocasiones, provocó un aumento en las concentraciones de Na^+ tanto en raíz como en parte aérea e independientemente de que fuese un tratamiento salino o no (Tabla 4.7).

Como era de esperar, en los tratamientos donde se aplicaron los tratamientos salinos se obtuvieron concentraciones internas de Na^+ superiores. Microtomate fue la que mayores concentraciones de Na^+ mostró en raíz, mientras que *S. pennellii* fue la que presentó las concentraciones más altas en la parte aérea.

El NH_4^+ tuvo un efecto reductor de las concentraciones de Na^+ en la parte aérea de las dos variedades de tomate y de *S. pennellii*, sin embargo las concentraciones en la raíz sólo se vieron reducidas en Microtomate por el tratamiento con NH_4^+ .

4.4.2.3 Concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Las fluctuaciones en las concentraciones de Ca^{2+} producidas por los tratamientos fueron mucho menores que las de K^+ o Na^+ , y por este motivo hicieron más difícil encontrar diferencias significativas salvo en casos aislados (Tabla 4.8). Una diferencia clara fue la presencia de mayor concentración de Ca^{2+} en raíz y parte aérea en la especie *S. pennellii* frente a las otras dos variedades de tomate.

El ayuno de K^+ provocó en general un aumento de las concentraciones de Ca^{2+} en raíz y parte aérea de todas las plantas. La presencia de NH_4^+ en el tratamiento redujo las concentraciones de Ca^{2+} tanto en raíz como en parte aérea (donde se observa con más claridad). Del mismo modo los tratamientos salinos disminuyeron las concentraciones de Ca^{2+} en la parte aérea mientras no se observó un patrón para las concentraciones en raíz.

Por otro lado, se encontró un patrón para el Mg^{2+} mejor definido que en el caso del Ca^{2+} . Se observó que el ayuno de K^+ supuso un aumento significativo de las concentraciones de Mg^{2+} de la raíz, que es donde se encuentra más concentrado (Tabla 4.9). Sin embargo, el ayuno de K^+ no causó ningún patrón en las concentraciones de Mg^{2+} de la parte aérea.

Tabla 4.8. Concentraciones de Ca^{2+} en raíz y parte aérea de las tres variedades en todos los tratamientos.

	Tratamiento	[Ca ²⁺] Raíz ($\mu\text{moles g}^{-1}$ PS)	[Ca ²⁺] Parte aérea ($\mu\text{moles g}^{-1}$ PS)
San Pedro	+K ⁺	123,7 ± 6,5	887,2 ± 62,9
	-K ⁺	160,1 ± 6,9	784,4 ± 32,9
	+K ⁺ Na ⁺	144,0 ± 2,3	304,4 ± 9,9
	-K ⁺ Na ⁺	154,3 ± 5,2	695,7 ± 34,9
	+K ⁺ NH ₄ ⁺	147,3 ± 0,8	640,5 ± 37,4
	-K ⁺ NH ₄ ⁺	130,3 ± 2,8	724,9 ± 33,7
	+K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	119,3 ± 6,4	297,3 ± 29,2
	-K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	116,5 ± 0,7	501,0 ± 23,8
Microtomate	+K ⁺	153,3 ± 5,1	684,3 ± 19,9
	-K ⁺	157,3 ± 2,2	855,7 ± 11,5
	+K ⁺ Na ⁺	130,0 ± 0,8	493,9 ± 18,7
	-K ⁺ Na ⁺	145,8 ± 1,9	580,7 ± 24,1
	+K ⁺ NH ₄ ⁺	117,8 ± 3,9	566,6 ± 16,7
	-K ⁺ NH ₄ ⁺	120,5 ± 2,5	496,5 ± 15,1
	+K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	141,3 ± 12,3	273,6 ± 12,5
	-K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	139,6 ± 6,9	351,8 ± 28,7
<i>S. pennellii</i>	+K ⁺	169,2 ± 5,1	1464,8 ± 121,1
	-K ⁺	185,8 ± 18,6	1995,5 ± 214,5
	+K ⁺ Na ⁺	116,2 ± 3,4	568,8 ± 88,5
	-K ⁺ Na ⁺	273,6 ± 35,3	581,7 ± 68,3
	+K ⁺ NH ₄ ⁺	162,8 ± 8,6	998,3 ± 39,1
	-K ⁺ NH ₄ ⁺	133,7 ± 7,7	1004,3 ± 46,3
	+K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	150,4 ± 11,7	640,0 ± 30,7
	-K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	194,5 ± 14,2	532,0 ± 31,5

Media de la concentración de al menos 4 plantas expresada en micromoles g^{-1} de peso seco de raíz junto a sus errores estándar.

Tabla 4.9. Concentraciones de Mg^{2+} en raíz y parte aérea de las tres variedades en todos los tratamientos.

	Tratamiento	$[Mg^{2+}]$ Raíz ($\mu\text{moles g}^{-1}$ PS)	$[Mg^{2+}]$ Parte aérea ($\mu\text{moles g}^{-1}$ PS)
San Pedro	+K ⁺	262,9 ± 17,2	191,8 ± 11,7
	-K ⁺	580,6 ± 41,6	131,5 ± 6,0
	+K ⁺ Na ⁺	118,0 ± 1,3	82,8 ± 8,5
	-K ⁺ Na ⁺	362,1 ± 12,0	137,4 ± 5,5
	+K ⁺ NH ₄ ⁺	288,7 ± 13,4	132,6 ± 5,4
	-K ⁺ NH ₄ ⁺	329,6 ± 7,5	114,2 ± 3,9
	+K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	180,5 ± 14,1	79,0 ± 6,4
	-K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	204,8 ± 4,3	115,5 ± 11,9
Microtomate	+K ⁺	204,1 ± 11,4	200,3 ± 2,3
	-K ⁺	479,9 ± 12,8	192,6 ± 7,1
	+K ⁺ Na ⁺	182,8 ± 4,3	142,7 ± 11,5
	-K ⁺ Na ⁺	322,9 ± 6,7	135,2 ± 11,6
	+K ⁺ NH ₄ ⁺	200,0 ± 17,5	150,2 ± 6,5
	-K ⁺ NH ₄ ⁺	331,6 ± 11,5	113,5 ± 2,1
	+K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	162,6 ± 12,4	85,8 ± 3,8
	-K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	193,3 ± 12,7	100,8 ± 7,3
<i>S. pennellii</i>	+K ⁺	162,4 ± 28,9	179,9 ± 10,7
	-K ⁺	511,0 ± 10,2	212,0 ± 6,8
	+K ⁺ Na ⁺	116,3 ± 3,8	118,2 ± 21,7
	-K ⁺ Na ⁺	428,2 ± 32,8	95,0 ± 7,9
	+K ⁺ NH ₄ ⁺	143,9 ± 18,5	132,3 ± 6,3
	-K ⁺ NH ₄ ⁺	282,1 ± 8,5	110,6 ± 4,1
	+K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	147,3 ± 12,3	130,1 ± 8,6
	-K ⁺ NH ₄ ⁺ Na ⁺	170,5 ± 10,2	138,8 ± 19,3

Media de la concentración de al menos 4 plantas expresada en micromoles g⁻¹ de peso seco de raíz junto a sus errores estándar.

Tanto los tratamientos con NH_4^+ como los salinos, provocaron un descenso significativo en las concentraciones de Mg^{2+} de la raíz, tendencia determinada por las fluctuaciones de concentración de las plantas ayunadas, ya que las no ayunadas mostraron concentraciones más estables para los distintos tratamientos.

4.4.3 Expresión de *LeHAK5*.

Una característica común dentro de los transportadores de alta afinidad de la familia HAK, es el aumento de la expresión del gen que codifica al transportador en la raíz tras un periodo de retirada de K^+ externo (Rodríguez-Navarro, A. y Rubio, F. 2006). Con el fin de caracterizar en mayor profundidad la regulación de la expresión del gen de la familia HAK de tomate, *LeHAK5*, en las distintas variedades y en *S. pennellii*, se estudió la inducción de este gen mediante qPCR.

Se congelaron las raíces de las plantas expuestas a los tratamientos descritos de K^+ , NH_4^+ y Na^+ . Posteriormente, se extrajo el RNA del material congelado y se procedió a la detección del mRNA de *LeHAK5* mediante la técnica de qPCR para cada raíz y cada tratamiento.

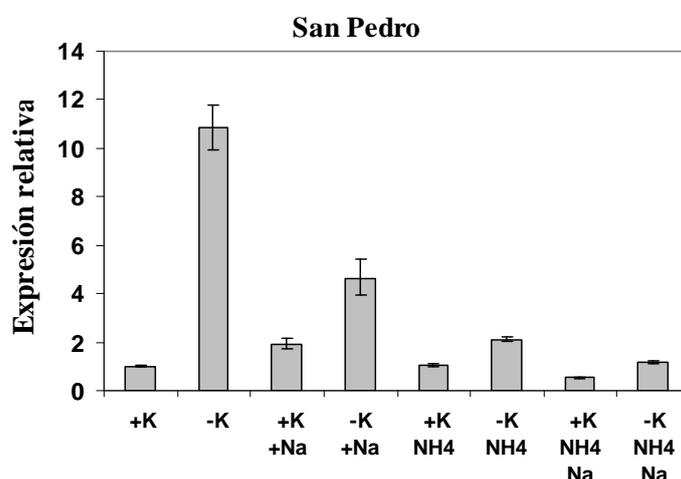


Figura 4.33. Expresión relativa de *LeHAK5* en raíces de la variedad San Pedro bajo distintos tratamientos descritos en el texto. El tratamiento control $+\text{K}^+$ se tomó como valor de referencia y se le asignó un valor de expresión relativa de 1. Las barras representan el error estándar.

La expresión de *LeHAK5* mostró un patrón similar en las dos variedades de *S. lycopersicum* y en la especie *S. pennellii*. Sin embargo se encontraron grandes

diferencias en el nivel de expresión, y mientras en San Pedro la retirada del K^+ externo supuso una inducción del *LeHAK5* de 11 veces, en Microtomate fueron 42 veces y en *S. pennellii* más de 1200 (Figuras 4.33, 4.34 y 4.35). En las plantas no ayunadas se encontraron niveles de expresión muy bajos y se le dio el valor 1 a todas, refiriéndose como tratamiento control, mientras que en las ayunadas se encontraron los mayores niveles de expresión de todos los tratamientos aplicados.

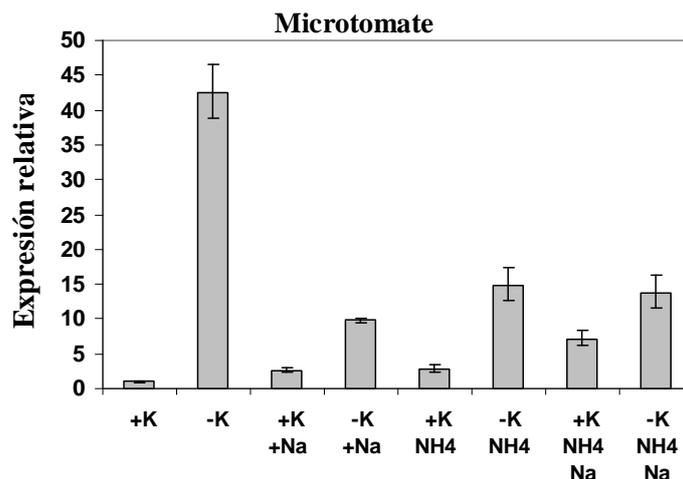


Figura 4.34. Expresión relativa de *LeHAK5* en raíces de la variedad *Microtomate* bajo distintos tratamientos descritos en el texto. El tratamiento control $+K^+$ se tomó como valor de referencia y se le asignó un valor de expresión relativa de 1. Las barras representan el error estándar.

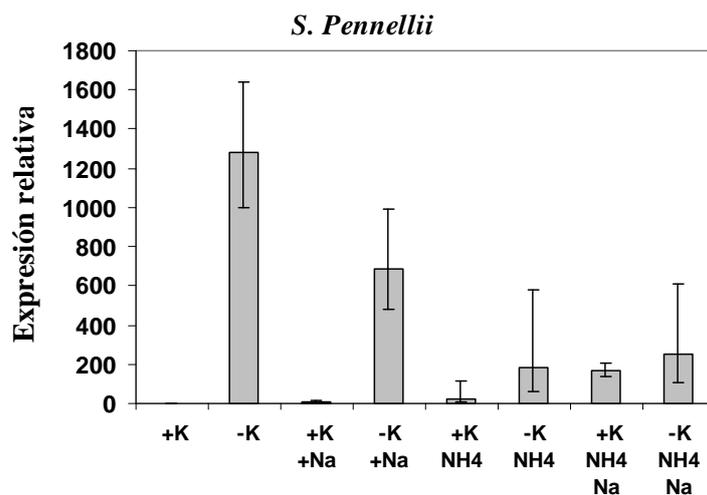


Figura 4.35. Expresión relativa de *LeHAK5* en raíces de la especie *S. pennellii* bajo distintos tratamientos descritos en el texto. El tratamiento control $+K^+$ se tomó como valor de referencia y se le asignó un valor de expresión relativa de 1. Las barras representan el error estándar.

En general, se observaron los menores niveles de expresión cuando se trataba de tratamientos donde no se retiró el K^+ . En las plantas ayunadas de K^+ , tanto los tratamientos con NH_4^+ como con Na^+ redujeron el nivel de expresión del gen en las dos variedades de *S. lycopersicum* y en *S. pennellii*.

4.4.4 Discusión.

En este estudio se llevó a cabo una caracterización del transporte y nutrición de K^+ en el rango de alta afinidad para dos variedades de *S. lycopersicum*, una de ellas comercial, y una especie silvestre de tomate más tolerante a la salinidad. Se abordaron distintos aspectos como el estudio fisiológico de la absorción de K^+ en el rango micromolar, el estudio de las concentraciones internas de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , y el análisis de expresión del gen involucrado en la absorción de K^+ de alta afinidad *LeHAK5* (Nieves-Cordones, M. y col. 2007, Wang, Y. H. y col. 2002).

Al igual que en *A. thaliana*, *T. halophila* y otras especies descritas (Kochian, L. V. y Lucas, W. J. 1988, Rodríguez-Navarro, A. 2000) todas las variedades de tomate indujeron el transporte de K^+ de alta afinidad al ser ayunadas de K^+ . Las plantas cultivadas en presencia de K^+ de la variedad San Pedro también presentaban absorción de K^+ en este rango de concentraciones, aunque con una velocidad menor que las plantas ayunadas de K^+ (Figura 4.29).

También se observó que la presencia de Na^+ durante el crecimiento de las plantas redujo esa absorción de K^+ , e incluso dio lugar a la salida de K^+ de la raíz en el momento del experimento para las plantas no ayunadas. Esta salida de K^+ podría explicarse por la despolarización de la membrana plasmática que produce la presencia de Na^+ en el medio externo (Cuin, T. A. y col. 2003, Cuin, T. A. y col. 2008, Nieves-Cordones, M. y col. 2008).

S. pennellii fue la que mostró las velocidades de absorción de K^+ más bajas, presentando además las mayores tasas de salida de K^+ en los experimentos (Figura 4.31 y 4.32). Por el contrario, la variedad San Pedro presentó las tasas de absorción más altas (Figura 4.29 y 4.32). El tratamiento con NH_4^+ no afectó la absorción de K^+ en las plantas ayunadas. Sin embargo, en las plantas no ayunadas produjo efectos distintos

Capítulo 4

según la variedad: en San Pedro no alteró la absorción de K^+ , en Microtomate dio lugar a entrada de K^+ en vez de salida y en *S. pennellii* disminuyó la salida de K^+ . El tratamiento con Na^+ redujo la absorción de K^+ en todos los casos. Cuando el tratamiento incluía NH_4^+ y Na^+ conjuntamente también se observó una disminución de la absorción de K^+ , en comparación con el tratamiento control sin los mismos. Por lo tanto en general se puede concluir que el tratamiento de las plantas con NH_4^+ mejora la absorción de K^+ tanto en plantas crecidas con Na^+ como sin Na^+ y el crecimiento con Na^+ reduce la absorción de K^+ . Efectos similares a los descritos por el NH_4^+ y el Na^+ se han observado en estudios previos en pimiento y Microtomate (Martinez-Cordero, M. A. y col. 2005, Nieves-Cordones, M. y col. 2007) y podrían deberse a los cambios que el Na^+ y el NH_4^+ provocan sobre el potencial de membrana ya que se ha descrito que el crecimiento de las plantas con Na^+ da lugar a raíces con potenciales despolarizados y el crecimiento con NH_4^+ a raíces con potenciales hiperpolarizados (Nieves-Cordones, M. y col. 2008).

Al analizar los datos de concentración de K^+ , se observó que *S. pennellii* mostraba los niveles más bajos de K^+ tanto en raíz como en parte aérea lo que podría ser consecuencia de la baja entrada de K^+ observada en los experimentos de absorción. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Taha y col (2000), en los que se propuso que la mayor tolerancia a la salinidad de *S. pennellii* no se correlacionaba con una elevada relación K^+/Na^+ sino con un uso más eficiente del K^+ (Rengel, Z. y Damon, P. M. 2008, Taha, R. y col. 2000). Cabe resaltar además que los tratamientos salinos disminuyeron en mayor medida el peso seco de *S. pennellii* que el de las otras dos variedades de tomate (datos no mostrados).

El NH_4^+ tuvo efectos diferentes en las concentraciones de K^+ en Microtomate y San Pedro. Mientras que en San Pedro aumentaba las concentraciones de K^+ tanto en raíz como en parte aérea, en Microtomate las disminuía en especial en la parte aérea. Sin embargo, con *S. pennellii* no se observó un patrón claro. El NH_4^+ y el K^+ comparten algunas características como la carga positiva, el diámetro del ion hidratado o su efecto en el potencial de membrana. Las interacciones entre los mismos han sido ampliamente estudiadas y se han mostrado complejas y dependientes de la especie (Kirkby, E. A. 1968, Martinez-Cordero, M. A. y col. 2005, Nieves-Cordones, M. y col. 2007, Rufty, TW y col. 1982, Santa-María, G. E. y col. 2000, Shaff, J. E. y col. 1993, Spalding, E. P. y col. 1999, Szczerba, M. W. y col. 2006, Szczerba, M. W. y col. 2008, Vale, F. R. y

col. 1988, Wang, M. Y. y col. 1996, Xu, G. H. y col. 2002). Por un lado, Szczerba y colaboradores en 2006 mostraron que en plantas de cebada el NH_4^+ disminuía las concentraciones de K^+ tanto de raíz como de parte aérea. También vieron que en condiciones de bajo K^+ (0,1 mM de K^+) y alta concentración de nitrógeno, el NO_3^- aumentaba las concentraciones de K^+ frente al NH_4^+ . Este mismo grupo en 2008 describió, en arroz, una disminución de K^+ en raíz y parte aérea por la presencia de NH_4^+ cuando el K^+ externo era de 0,02 ó 0,1 mM. Sin embargo, al aumentar la concentración de K^+ externo a 1,5 mM, el NH_4^+ aumentaba las concentraciones de K^+ en la parte aérea, lo que ilustra la complejidad en la relación K^+ - NH_4^+ . Además, observaron que las mejores condiciones de crecimiento (máxima biomasa), se obtuvieron con un aporte medio de K^+ (1,5 mM) en presencia de NH_4^+ en lugar de NO_3^- (sugiriendo que el arroz prefiere esta fuente de nitrógeno cuando hay K^+ suficiente).

Por otro lado, se ha descrito en tomate que una sustitución parcial de NO_3^- por NH_4^+ en la solución de crecimiento reduce los efectos deletéreos de la salinidad, mejorando la producción de biomasa (Flores, P. y col. 2001) y disminuyendo las concentraciones de Na^+ sin alterar las de K^+ en los tejidos (Kant, S. y col. 2007). En cambio, en guisante no se ha observado tal efecto beneficioso al aportar cierta cantidad de NH_4^+ en presencia de altas concentraciones de sal (Figueira, E. M. D. y Caldeira, G. C. N. 2005). En general, en la presente Tesis se ha observado que la sustitución parcial del NO_3^- por NH_4^+ en condiciones salinas ha sido beneficiosa para las dos variedades de *S. lycopersicum* y *S. pennellii*, tanto en concentraciones de K^+ y Na^+ (mejorando el balance K^+/Na^+), como en biomasa.

Los genes que codifican transportadores de K^+ de alta afinidad de la familia HAK se expresan de forma mayoritaria en las raíces de plantas ayunadas de K^+ cuando la concentración de K^+ en la raíz se encuentra por debajo de un valor umbral (Ahn, S. J. y col. 2004, Armengaud, P. y col. 2004, Gierth, M. y col. 2005, Martínez-Cordero, M. A. y col. 2005, Nieves-Cordones, M. y col. 2008, Nieves-Cordones, M. y col. 2007). Tanto *S. pennellii* como las dos variedades de *S. lycopersicum* mostraron una fuerte inducción del gen *LeHAK5* por el ayuno de K^+ . Sin embargo, otros factores distintos del K^+ reducen dicha inducción. Como se ha visto, al ayunar las plantas en presencia de Na^+ éste inhibe la expresión del gen aunque las concentraciones de K^+ en las raíces sean incluso menores que en ausencia de Na^+ , como también se ha visto en apartados anteriores de esta Tesis en *A. thaliana* y *T. halophila*. Estudios transcriptómicos

Capítulo 4

realizados en tomate y *A. thaliana* han demostrado que muy pocos genes que codificaban transportadores o canales de K^+ responden a la presencia o ausencia de K^+ (Armengaud, P. y col. 2004, Wang, Y. H. y col. 2002). Dentro de la familia HAK, sólo los que codifican transportadores de alta afinidad de K^+ tipo HAK5 se inducen por ausencia de K^+ . La regulación precisa de los genes que codifican transportadores del tipo HAK5 sugiere que éstos desempeñan unas funciones muy específicas y que sólo están presentes en la raíz bajo unas condiciones particulares. Los genes que codifican transportadores HAK5 se inducen fuertemente cuando el K^+ es un factor limitante y la concentración de K^+ se encuentra por debajo de un determinado valor. Cuando el K^+ está de nuevo disponible, puede que no sean necesarios los transportadores de alta afinidad y sus niveles de mRNA se ven reducidos rápidamente (Amtmann, A. y col. 2004, Nieves-Cordones, M. y col. 2008). Estos cambios ocurren antes de que la concentración de K^+ en la raíz alcance el nivel de las plantas no ayunadas de K^+ y podrían estar mediados, como describieron Nieves-Cordones y col. (2008), por cambios en el potencial de membrana, de tal forma que cuanto más negativo es el potencial de membrana más expresión se detecta. Por otro lado, no se ha encontrado dicha correlación entre las concentraciones de K^+ de la raíz y la expresión del gen (Nieves-Cordones, M. y col. 2008). Esto sugiere que el potencial de membrana puede jugar un papel importante en la regulación de este tipo de genes. Además se han encontrado altos niveles de expresión de *LeHAK5* en plantas de Microtomate no ayunadas de K^+ y crecidas con NH_4^+ (Nieves-Cordones, M. y col. 2008) lo que no permite establecer una correlación perfecta entre la concentración de K^+ en la raíz y los niveles de transcrito. Por tanto, la regulación de este tipo de genes parece ser compleja y estar afectada por diversos factores, algunos no relacionados con la nutrición de K^+ . De hecho, el reabastecimiento de NO_3^- o las deficiencias de Pi o Fe, que no están relacionadas con la nutrición de K^+ , suponen cambios en la expresión de *LeHAK5* (Wang, Y. H. y col. 2001, Wang, Y. H. y col. 2002). Cabe la posibilidad de que las deficiencias en estos nutrientes conlleven efectos secundarios que imiten el ayuno de K^+ o que dichas deficiencias activen puntos comunes de cascadas de señales implicadas en la nutrición de K^+ y de otros nutrientes.

Como se ha mencionado, el crecimiento de las plantas en presencia de concentraciones moderadas de NH_4^+ mejora la absorción de K^+ . Este efecto es distinto al que tiene lugar a corto plazo por la adición de NH_4^+ , que da lugar a una inhibición de

la entrada de K^+ . Los mecanismos moleculares por los cuales el NH_4^+ inhibe esta absorción de K^+ no se conocieron hasta la caracterización de los transportadores de la familia HAK. La marcada inhibición debida al NH_4^+ externo y las cinéticas del K^+ mostradas por estos transportadores en levadura, constituyen una evidencia del papel que desempeñaban los mismos en el componente sensible a NH_4^+ de la absorción de K^+ de alta afinidad (Bañuelos, M. A. y col. 2002, Martínez-Cordero, M. A. y col. 2005, Rodríguez-Navarro, A. y Rubio, F. 2006, Santa-María, G. E. y col. 1997). Apoyando esta idea se ha observado que los mutantes de inserción de *A. thaliana athak5*, pierden el componente sensible al NH_4^+ del transporte de K^+ de alta afinidad (Rubio, F. y col. 2008).

A parte de la inhibición del transportador, el NH_4^+ parece también influir de forma compleja en la regulación de la expresión de estos genes. A largo plazo, el NH_4^+ puede inducir la expresión génica como es el caso de *LeHAK5* (Nieves-Cordones, M. y col. 2008, Nieves-Cordones, M. y col. 2007) pero también puede reducirla como en *A. thaliana* o pimiento (Martínez-Cordero, M. A. y col. 2005, Rubio, F. y col. 2008). Estas diferencias en los efectos del NH_4^+ sobre la expresión de estos genes se han observado en distintos experimentos realizados en nuestro laboratorio. Por una parte se ha observado inducción del gen *LeHAK5* en las plantas de microtomate no ayunadas de K^+ y crecidas con NH_4^+ (Nieves-Cordones, M. y col. 2008) y por otra, en otro grupo de experimentos dicha inducción no fue observada, como se muestra en esta Tesis Doctoral. Para dilucidar el motivo por el que se obtuvieron estos resultados contradictorios se diseñó un experimento específico. Cuando se aplicaba el NH_4^+ desde el principio del desarrollo de las plantas, la inducción del gen *LeHAK5* era mayor que el control sin NH_4^+ , y cuando se aplicaba al final, la expresión era menor que el control sin NH_4^+ (datos no mostrados). Así pudimos observar que dependiendo del momento de aplicación del NH_4^+ , éste tenía un efecto distinto sobre la expresión de *LeHAK5*. Esto podría explicarse por un efecto distinto del NH_4^+ sobre el potencial de membrana, en función del momento de su aplicación. El NH_4^+ produciría despolarización de la membrana a corto plazo, inhibiendo la expresión de *LeHAK5* (lo sucedido en los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral), mientras que en las plantas crecidas con NH_4^+ como fuente de nitrógeno durante todo el periodo de crecimiento, las membranas se encuentran hiperpolarizadas y el gen *LeHAK5* estaría inducido (Nieves-Cordones, M. y col. 2008).

Capítulo 4

Cabe añadir que el estado hiperpolarizado de las membranas por utilizar el NH_4^+ como fuente parcial de nitrógeno es dependiente de la especie (Britto, D. T. y col. 2001).

5.- CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES:

T. halophila muestra una relación en peso raíz/parte aérea mayor que *A. thaliana*, y esta diferencia se ve incrementada en condiciones de estrés salino, lo que podría suponer una ventaja para afrontarlo.

El estrés salino produce en *A. thaliana* mayores reducciones en la absorción y en las concentraciones internas de K^+ que en *T. halophila*, a la vez que *T. halophila* presenta menor absorción de Na^+ y transporte a la parte aérea que *A. thaliana*. Ambas circunstancias resultan en una mayor relación K^+/Na^+ en *T. halophila*, lo que puede suponer una mayor tolerancia a la salinidad.

El gen *ThHAK5* codifica para un transportador que media un transporte de K^+ de alta afinidad en levaduras similar al observado en las plantas de *T. halophila* lo que sugiere que este transportador juega un papel fundamental en la absorción de K^+ en el rango de la alta afinidad en esta especie vegetal.

Aunque *AtHAK5* y *ThHAK5* presentan una gran homología de secuencia y unas características funcionales similares, la regulación de los genes que los codifican difieren en condiciones salinas. Así, la salinidad reduce en menor medida la inducción de *ThHAK5* por ayuno de K^+ . En consecuencia, la absorción de K^+ de alta afinidad está menos afectada por la presencia de $NaCl$ en el medio externo en *T. halophila*.

La mutagénesis al azar permite encontrar aminoácidos importantes para la función de las proteínas y ésta ha permitido identificar dos versiones mutantes del transportador de K^+ de alta afinidad *AtHAK5* (F130S en el mutante R-G11', y R168G, T503K y S504G en el mutante R-G9') más eficientes, capaces de transportar K^+ a concentraciones externas de Na^+ muy elevadas (0.1 mM K^+ y 800 mM Na^+).

Los resultados obtenidos en las especies modelo para el K^+ y el Na^+ son extrapolables a tomate. El ayuno de K^+ induce un transporte de K^+ de alta afinidad en todas las especies estudiadas en la presente Tesis Doctoral. También produce un descenso en las concentraciones de K^+ y el incremento en la expresión del gen correspondiente, perteneciente a la familia HAK. La presencia de Na^+ reduce esa

Capítulo 5

capacidad de transportar K^+ a la par que disminuye la expresión de dichos genes pero en diferente medida según la especie.

La mayor tolerancia a salinidad de *S. pennellii* no se debe a una mejor absorción de K^+ ni a una mejor relación K^+/Na^+ , de hecho, esta especie presentó menores tasas de absorción de K^+ que las dos variedades de *S. lycopersicum* y mayores concentraciones de Na^+ en la parte aérea.

6. - BIBLIOGRAFÍA

6 BIBLIOGRAFÍA

Reference List

Ahn, S.J., Shin, R., y Schachtman, D.P. (2004) Expression of KT/KUP Genes in Arabidopsis and the Role of Root Hairs in K⁺ Uptake. *Plant Physiol* **134**:1135-1145.

Aktas, H., Karni, L., Chang, D.C., Turhan, E., Bar-Tal, A., y Aloni, B. (2005) The suppression of salinity-associated oxygen radicals production, in pepper (*Capsicum annuum*) fruit, by manganese, zinc and calcium in relation to its sensitivity to blossom-end rot. *Physiologia Plantarum* **123**:67-74.

Amtmann, A. y Armengaud, P. (2009) Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Current Opinion in Plant Biology* **12**:275-283.

Amtmann, A., Armengaud, P., y Volkov, V. (2004) Potassium nutrition and salt stress. In *Membrane transport in plants*, Michael R. Blatt, ed (Oxford: Blackwell), pp. 293-339.

Amtmann, A. y Sanders, D. (1999) Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Adv Bot Res* **29**:75-112.

Amtmann, A., Troufflard, S., y Armengaud, P. (2008) The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia Plantarum* **133**:682-691.

Amtmann, A. (2009) Learning from Evolution: *Thellungiella* Generates New Knowledge on Essential and Critical Components of Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Mol Plant* **2**:3-12.

Apel, K. y Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**:373-399.

Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., y Blumwald, E. (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science* **285**:1256-1258.

Apse, M.P. y Blumwald, E. (2007) Na⁺ transport in plants. *FEBS Letters* **581**:2247-2254.

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**:796-815.

Armengaud, P., Sulpice, R., Miller, A.J., Stitt, M., Amtmann, A., y Gibon, Y. (2009) Multilevel Analysis of Primary Metabolism Provides New Insights into the Role of

Potassium Nutrition for Glycolysis and Nitrogen Assimilation in Arabidopsis Roots. *Plant Physiology* **150**:772-785.

Armengaud,P., Breitling,R., y Amtmann,A. (2004) The Potassium-Dependent Transcriptome of Arabidopsis Reveals a Prominent Role of Jasmonic Acid in Nutrient Signaling. *Plant Physiol* **136**:2556-2576.

Bañuelos,M.A., Garcíadeblas,B., Cubero,B., y Rodríguez-Navarro,A. (2002) Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiol* **130**:784-795.

Bañuelos,M.A., Klein,R.D., Alexander,S.J., y Rodríguez-Navarro,A. (1995a) A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO J* **14**:3021-3027.

Bañuelos,M.A., Quintero,F.J., y Rodríguez-Navarro,A. (1995b) Functional expression of the ENA1(PMR2)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta* **1229**:233-238.

Berthomieu,P., Conejero,G., Nublat,A., Brackenbury,W.J., Lambert,C., Savio,C., Uozumi,N., Oiki,S., Yamada,K., Cellier,F., Gosti,F., Simonneau,T., Essah,P.A., Tester,M., Verry,A.A., Sentenac,H., y Casse,F. (2003) Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *Embo Journal* **22**:2004-2014.

Blumwald,E., Aharon,G.S., y Apse,M.P. (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta* **1465**:140-51.

Botella,M.A., Martínez,V., Nieves,M., y Cerda,A. (1997) Effect of salinity on the growth and nitrogen uptake by wheat seedlings. *Journal of Plant Nutrition* **20**:793-804.

Bressan,R.A., Zhang,C., Zhang,H., Hasegawa,P.M., Bohnert,H.J., y Zhu,J.K. (2001) Learning from the Arabidopsis Experience. The Next Gene Search Paradigm. *Plant Physiology* **127**:1354-1360.

Britto,D.T. y Kronzucker,H.J. (2002) NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* **159**:567-584.

Britto,D.T. y Kronzucker,H.J. (2008) Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiologia Plantarum* **133**:637-650.

Britto,D.T., Siddiqi,M.Y., Glass,A.D.M., y Kronzucker,H.J. (2001) Futile transmembrane NH₄⁺ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:4255-4258.

Brunelli,I., y Pall,M.L. (1993) A Series of Yeast Shuttle Vectors for Expression of Cdnas and Other Dna-Sequences. *Yeast* **9**:1299-1308.

Buschmann,P.H., Vaidyanathan,R., Gassmann,W., y Schroeder,J.I. (2000) Enhancement of Na⁺ Uptake Currents, Time-Dependent Inward-Rectifying K⁺ Channel

Currents, and K⁺ Channel Transcripts by K⁺ Starvation in Wheat Root Cells. *Plant Physiology* **122**:1387-1398.

Camacho, M., Ramos, J., y Rodriguez-Navarro, A. (1981) K⁺ requirements of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol* **6**:295-299.

Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Grant, J.J., Batistic, O., Li, L., Kim, B.G., Lee, S.C., Kudla, J., y Luan, S. (2007) Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **52**:223-239.

Colmer, T.D., Flowers, T.J., y Munns, R. (2006) Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany* **57**:1059-1078.

Cramer, G.R. (2002) Response of abscisic acid mutants of *Arabidopsis* to salinity. *Functional plant biology* **29**:561-567.

Cuin, T.A., Betts, S.A., Chalmandrier, R., y Shabala, S. (2008) A root's ability to retain K⁺ correlates with salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany* **59**:2697-2706.

Cuin, T.A., Miller, A.J., Laurie, S.A., y Leigh, R.A. (2003) Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *Journal of Experimental Botany* **54**:657-661.

Davenport, R.J., Munoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P.A., Rus, A., y Tester, M. (2007) The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment* **30**:497-507.

Davies, C., Shin, R., Liu, W., Thomas, M.R., y Schachtman, D.P. (2006) Transporters expressed during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development are associated with an increase in berry size and berry potassium accumulation. *Journal of Experimental Botany* **57**:3209-3216.

De Boer, A.H. y Volkov, V. (2003) Logistics of water and salt transport through the plant: structure and functioning of the xylem. *Plant Cell and Environment* **26**:87-101.

Desbrosses, G., Kopka, C., Ott, T., y Udvardi, M.K. (2004) *Lotus japonicus* LjKUP is induced late during nodule development and encodes a potassium transporter of the plasma membrane. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**:789-797.

Downey, P., Szabo, I., Ivashikina, N., Negro, A., Guzzo, F., Ache, P., Hedrich, R., Terzi, M., y Schiavo, F.L. (2000) KDC1, a Novel Carrot Root Hair K⁺ Channel. Cloning, Characterization, And Expression In Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* **275**:39420-39426.

Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A.L., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., y MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**:69-77.

Duby,G., Hosy,E., Fizames,C., Alcon,C., Costa,A., Sentenac,H., y Thibaud,J.B. (2008) AtKC1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K⁺ channels. *Plant Journal* **53**:115-123.

Dvorák,J., Noaman,M.M., Goyal,S., y Gorham,J. (1994) Enhancement of the salt tolerance of *Triticum turgidum* L. by the *Kna1* locus transferred from the *Triticum aestivum* L. chromosome 4D by homoeologous recombination. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **87**:872-877.

Elumalai,R.P., Nagpal,P., y Reed,J.W. (2002) A Mutation in the Arabidopsis KT2/KUP2 Potassium Transporter Gene Affects Shoot Cell Expansion. *The Plant Cell* **14**:119-131.

Epstein,E. y Hagen,C.E. (1952) A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiology* **27**:457-474.

Epstein,E., Rains,D.W., y Elzam,O.E. (1963) Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proc Natl Acad Sci USA* **49**:684-692.

Figueira,E.M.D. y Caldeira,G.C.N. (2005) Effect of nitrogen nutrition on salt tolerance of *Pisum sativum* during vegetative growth. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **168**:359-363.

Flores,P., Carvajal,M., Cerda,A., y Martínez,V. (2001) Salinity and ammonium/nitrate interactions on tomato plant development, nutrition, and metabolites. *Journal of Plant Nutrition* **24**:1561-1573.

Fu,H.H. y Luan,S. (1998) AtKuP1: a dual-affinity K⁺ transporter from Arabidopsis. *Plant Cell* **10**:63-73.

Fulgenzi,F.R., Peralta,M.L., Mangano,S., Danna,C.H., Vallejo,A.J., Puigdomenech,P., y Santa-Maria,G.E. (2008) The Ionic Environment Controls the Contribution of the Barley HvHAK1 Transporter to Potassium Acquisition. *Plant Physiology*:107.

Gao,J., Agrawal,G.K., Thelen,J.J., y Xu,D. (2009) P3DB: a plant protein phosphorylation database. *Nucl.Acids.Res.* **37**:D960-D962.

Garciadeblas,B., Barrero-Gil,J., Benito,B., y Rodriguez-Navarro,A. (2007) Potassium transport systems in the moss *Physcomitrella patens*: *pphak1* plants reveal the complexity of potassium uptake. *Plant Journal* **52**:1080-1093.

Garciadeblas,B., Benito,B., y Rodriguez-Navarro,A. (2002) Molecular cloning and functional expression in bacteria of the potassium transporters CnHAK1 and CnHAK2 of the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Plant Molecular Biology* **50**:623-633.

Garciadeblas,B., Rubio,F., Quintero,F.J., Banuelos,M.A., y Rodriguez-Navarro,A. (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics* **236**:363-368.

Gaxiola,R., Delarrinoa,I.F., Villalba,J.M., y Serrano,R. (1992) A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* **11**:3157-3164.

Gaymard,F., Cerutti,M., Horeau,C., Lemaillet,G., Urbach,S., Ravallec,M., Devauchelle,G., Sentenac,H., y Thibaud,J.B. (1996) The Baculovirus/Insect Cell System as an Alternative to *Xenopus* Oocytes. First Characterization Of The AKT1 K⁺ Channel From *Arabidopsis Thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **271**:22863-22870.

Geiger,D., Becker,D., Vosloh,D., Gambale,F., Palme,K., Rehers,M., Anschuetz,U., Dreyer,I., Kudla,J., y Hedrich,R. (2009) Heteromeric AtKC1/AKT1 channels in *Arabidopsis* roots facilitate growth under K⁺ limiting conditions. *Journal of Biological Chemistry*:M109.

Ghars,M.A., Parre,E., Debez,A., Bordenave,M., Richard,L., Leport,L., Bouchereau,A., Saviourθ,A., y Abdelly,C. (2008) Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K⁺/Na⁺ selectivity and proline accumulation. *Journal of Plant Physiology* **165**:588-599.

Gibeaut,D.M., Hulett,J., Cramer,G.R., y Seemann,J.R. (1997) Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiology* **115**:317-319.

Gierth,M., Maser,P., y Schroeder,J.I. (2005) The Potassium Transporter AtHAK5 Functions in K⁺ Deprivation-Induced High-Affinity K⁺ Uptake and AKT1 K⁺ Channel Contribution to K⁺ Uptake Kinetics in *Arabidopsis* Roots. *Plant Physiol* **137**:1105-1114.

Glenn,E.P., Brown,J.J., y Blumwald,E. (1999) Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences*: 18 (2) 227-255 **18**:227-255.

Golldack,D., Quigley,F., Michalowski,C.B., Kamasani,U.R., y Bohnert,H.J. (2003) Salinity stress-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa* L.) regulate AKT1-type potassium channel transcripts differently. *Plant Mol.Biol* **51**:71-81.

Golldack,D., Su,H., Quigley,F., Kamasani,U.R., Munoz-Garay,C., Balderas,E., Popova,O.V., Bennett,J., Bohnert,H.J., y Pantoja,O. (2002) Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. *The Plant Journal* **31**:529-542.

Gorham,J., Bristol,A., Young,E.M., y Wyn Jones,R.G. (1991) The presence of the enhanced K/Na discrimination trait in diploid *Triticum* species. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **82**:729-236.

Greenway,H. y Munns,R. (1980) Mechanisms of Salt Tolerance in Non-Halophytes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **31**:149-190.

Guo Z.K., Yang Q, Wan XQ, y Yan PQ (2008) Functional characterization of a potassium transporter gene NrHAK1 in *Nicotiana rustica*. *J Zhejiang Univ Sci B.* **9**:944-952.

Hanahan,D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA cloning: A practical approach, (Oxford: IRL Press), pp. 109-135.

Haro,R. y Rodriguez-Navarro,A. (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Letters* **291**:189-191.

Haro,R., Sainz,L., Rubio,F., y Rodriguez-Navarro,A. (1999) Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **31**:511-520.

Haro,R., Banuelos,M.A., Senn,M.E., Barrero-Gil,J., y Rodriguez-Navarro,A. (2005) HKT1 Mediates Sodium Uniport in Roots. Pitfalls in the Expression of HKT1 in Yeast. *Plant Physiology* **139**:1495-1506.

Hartje,S., Zimmermann,S., Klonus,D., y Mueller-Roeber,B. (2000) Functional characterisation of LKT1, a K⁺ uptake channel from tomato root hairs, and comparison with the closely related potato inwardly rectifying K⁺ channel SKT1 after expression in *Xenopus* oocytes. *Planta* **210**:723-731.

Hartt,C.E. (1969) Effect of Potassium Deficiency Upon Translocation of C-14 in Attached Blades and Entire Plants of Sugarcane. *Plant Physiology* **44**:1461-&.

Hasegawa,P.M., Bressan,R.A., Zhu,J.K., y Bohnert,H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**:463-499.

Heazlewood,J.L., Durek,P., Hummel,J., Selbig,J., Weckwerth,W., Walther,D., y Schulze,W.X. (2008) PhosPhAt: a database of phosphorylation sites in *Arabidopsis thaliana* and a plant-specific phosphorylation site predictor. *Nucl.Acids.Res.* **36**:D1015-D1021.

Hirsch,R.E., Lewis,B.D., Spalding,E.P., y Sussman,M.R. (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**:918-21.

Hofmann K. y Stoffel W. (1993) TMbase- A database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe Seyler* **357**:166.

Horie,T., Costa,A., Kim,T.H., Han,M.J., Horie,R., Leung,H.Y., Miyao,A., Hirochika,H., An,G., y Schroeder,J.I. (2007) Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. *Embo Journal* **26**:3003-3014.

Horie,T., Yoshida,K., Nakayama,H., Yamada,K., Oiki,S., y Shinmyo,A. (2001) Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J.* **27**:129-138.

Hummel,J., Niemann,M., Wienkoop,S., Schulze,W., Steinhauser,D., Selbig,J., Walther,D., y Weckwerth,W. (2007) ProMEX: a mass spectral reference database for proteins and protein phosphorylation sites. *BMC Bioinformatics* **8**:216.

Jung,J.Y., Shin,R., y Schachtman,D.P. (2009) Ethylene Mediates Response and Tolerance to Potassium Deprivation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*:tpc.

Kant,S., Kant,P., Raveh,E., y Barak,S. (2006) Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na⁺ uptake in *T-halophila*. *Plant Cell and Environment* **29**:1220-1234.

Kant,S., Kant,P., Lips,H., y Barak,S. (2007) Partial substitution of NO₃⁻ by NH₄⁺ fertilization increases ammonium assimilating enzyme activities and reduces the deleterious effects of salinity on the growth of barley. *Journal of Plant Physiology* **164**:303-311.

Karley,A.J. y White,P.J. (2009) Moving cationic minerals to edible tissues: potassium, magnesium, calcium. *Current Opinion in Plant Biology* **12**:291-298.

Kaya,C. y Higgs,D. (2003) Supplementary potassium nitrate improves salt tolerance in bell pepper plants. *J Plant Nutr* **26**:1367-1382.

Kaya,C., Tuna,A.L., Ashraf,M., y Altunlu,H. (2007) Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. *Environmental and Experimental Botany* **60**:397-403.

Kim, E.J., Kwak, J.M., Uozumi, N., y Schroeder, J.I. (1998) AtKUP1: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* **10**:51-62.

Kirkby,E.A. (1968) Influence of Ammonium and Nitrate Nutrition on Cation-Anion Balance and Nitrogen and Carbohydrate Metabolism of White Mustard Plants Grown in Dilute Nutrient Solutions. *Soil Science* **105**:133-&.

Kochian,L.V. y Lucas,W.J. (1982) Potassium transport in corn roots. I. Resolution of kinetics into a saturable and linear component. *Plant Physiol.* **70**:1723-1731.

Kochian,L.V. y Lucas,W.J. (1988) Potassium transport in roots. *Adv Bot Res* **15**:93-178.

Kyte,J. y Doolittle,R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* **157**:105-132.

Lagarde,D., Basset,M., Lepetit,M., Conejero,G., Gaymard,F., Astruc,S., y Grignon,C. (1996) Tissue-specific expression of *Arabidopsis* AKT1 gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *The Plant Journal* **9**:195-203.

Laurie, S., Feeney, K.A., Maathuis, F.J., Heard, P.J., Brown, S.J., y Leigh, R.A. (2002) A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *The Plant Journal* **32**:139-149.

Lebaudy,A., Very,A.A., y Sentenac,H. (2007) K⁺ channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *FEBS Letters* **581**:2357-2366.

Leigh,R.A. y Jones,R.G.W. (1984) A Hypothesis Relating Critical Potassium Concentrations for Growth to the Distribution and Functions of This Ion in the Plant-Cell. *New Phytologist* **97**:1-13.

Lejay, L., Wirth, J., Pervent, M., Cross, J.M.F., Tillard, P., y Gojon, A. (2008) Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant Physiology* **146**: 2036-2053.

Lewin, B. (2008) *Genes IX*. Jones and Bartlett Publishers.

Li, L., Kim, B.G., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., y Luan, S. (2006) A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:12625-12630.

Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**:402-408.

Luan, S., Lan, W., y Chul Lee, S. (2009) Potassium nutrition, sodium toxicity, and calcium signaling: connections through the CBL-CIPK network. *Current Opinion in Plant Biology* **12**:339-346.

Lynch, J. y Lauchli, A. (1984) Potassium transport in salt-stressed barley roots. *Planta* **161**:295-301.

M'rah, S., Ouerghi, Z., Berthomieu, C., Havaux, M., Jungas, C., Hajji, M., Grignon, C., y Lachaal, M. (2006) Effects of NaCl on the growth, ion accumulation and photosynthetic parameters of *Thellungiella halophila*. *Journal of Plant Physiology* **163**:1022-1031.

Maathuis, F.J., Ichida, A.M., Sanders, D., y Schroeder, J.I. (1997a) Roles of higher plant K⁺ channels. *Plant Physiol* **114**:1141-9.

Maathuis, F.J., Sanders, D., y Gradmann, D. (1997b) Kinetics of high-affinity K⁺ uptake in plants, derived from K⁽⁺⁾- induced changes in current-voltage relationships. A modelling approach to the analysis of carrier-mediated transport. *Planta* **203**:229-36.

Maathuis, F.J.M. (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* **12**:250-258.

Maathuis, F.J.M. y Sanders, D. (1994) Mechanisms of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:9272-9276.

Maathuis, F.J.M. y Sanders, D. (1993) Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **191**:302-307.

Maathuis, F.J.M. y Amtmann, A. (1999) K⁺ Nutrition and Na⁺ Toxicity: The Basis of Cellular K⁺/Na⁺ Ratios. *Ann Bot* **84**:123-133.

Maathuis, F.J.M. y Sanders, D. (1996) Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiologia Plantarum* **96**:158-168.

Mahouachi, J., Socorro, A.R., y Talon, M. (2006) Responses of papaya seedlings (*Carica papaya* L.) to water stress and re-hydration: Growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance. *Plant and Soil* **281**:137-146.

- Mangano,S., Silberstein,S., y Santa-Maria,G.E.** (2008) Point mutations in the barley HvHAK1 potassium transporter lead to improved K⁺-nutrition and enhanced resistance to salt stress. *FEBS Letters* **582**:3922-3928.
- Marschner,H.** (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. New York: Springer.
- Martínez-Cordero,M.A., Martínez,V., y Rubio,F.** (2004) Cloning and functional characterization of the high-affinity K⁺ transporter HAK1 of pepper. *Plant Mol.Biol.* **56**:413-421.
- Martinez-Cordero,M.A., Martinez,V., y Rubio,F.** (2005) High-affinity K⁺ uptake in pepper plants. *Journal of Experimental Botany* **56**:1553-1562.
- Maser,P., Thomine,S., Schroeder,J.I., Ward,J.M., Hirschi,K., Sze,H., Talke,I.N., Amtmann,A., Maathuis,F.J., Sanders,D., Harper,J.F., Tchieu,J., Gribskov,M., Persans,M.W., Salt,D.E., Kim,S.A., y Guerinot,M.L.** (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**:1646-1667.
- Meissner,R., Jacobson,Y., Melamed,S., Levyatuv,S., Shalev,G., Ashri,A., Elkind,Y., y Levy,A.** (1997) A new model system for tomato genetics. *Plant Journal* **12**:1465-1472.
- Muhrad,D., Hunter,R., y Parker,R.** (1992) A rapid method for localized mutagenesis of yeast. *Yeast* **8**:79-82.
- Munns,R.** (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* **167**:645-663.
- Munns,R. y Tester,M.** (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**:651-681.
- Nieves-Cordones,M., Martinez-Cordero,M.A., Martinez,V., y Rubio,F.** (2007) An NH₄⁺-sensitive component dominates high-affinity K⁺ uptake in tomato plants. *Plant Science* **172**:273-280.
- Nieves-Cordones,M., Miller,A., Alemán,F., Martínez,V., y Rubio,F.** (2008) A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Molecular Biology* **68**:521-532.
- Oh,D.H., Gong,Q.Q., Ulanov,A., Zhang,Q., Li,Y.Z., Ma,W.Y., Yun,D.J., Bressan,R.A., y Bohnert,H.J.** (2007) Sodium stress in the halophyte *Thellungiella halophila* and transcriptional changes in a thsos1-RNA interference line. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**:1484-1496.
- Pasternak,D.** (1987) Salt Tolerance and Crop Production - A Comprehensive Approach. *Annual Review of Phytopathology* **25**:271-291.
- Peralta,I.E., Knapp,S.K., y Spooner,D.M.** (2005) New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany* **30**:424-434.

Philippar,K., Fuchs,I., Luthen,H., Hoth,S., Bauer,C.S., Haga,K., Thiel,G., Ljung,K., Sandberg,G., Bottger,M., Becker,D., y Hedrich,R. (1999) Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**:12186-12191.

Pier,P.A. y Berkowitz,G.A. (1987) Modulation of Water-Stress Effects on Photosynthesis by Altered Leaf K⁺. Plant Physiology **85**:655-661.

Pilot,G., Gaymard,F., Mouline,K., Cherel,I., y Sentenac,H. (2003) Regulated expression of Arabidopsis Shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. Plant Molecular Biology **51**:773-787.

Qi,Z., Hampton,C.R., Shin,R., Barkla,B.J., White,P.J., y Schachtman,D.P. (2008) The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K⁺ concentrations and provides a caesium uptake pathway in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany **59**:595-607.

Quintero,F.J. y Blatt,M.R. (1997) A new family of K⁺ transporters from Arabidopsis that are conserved across phyla. FEBS Lett **415**:206-11.

Reintanz,B., Szyroki,A., Ivashikina,N., Ache,P., Godde,M., Becker,D., Palme,K., y Hedrich,R. (2002) AtKC1, a silent Arabidopsis potassium channel alpha -subunit modulates root hair K⁺ influx. Proceedings of the National Academy of Sciences **99**:4079-4084.

Rengel,Z. y Damon,P.M. (2008) Crops and genotypes differ in efficiency of potassium uptake and use. Physiologia Plantarum **133**:624-636.

Rentsch,D., Laloi,M., Rouhara,I., Schmelzer,E., Delrot,S., y Frommer,W.B. (1995) NTr1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in Arabidopsis. FEBS Lett **370**:264-268.

Rigas,S., Debrosses,G., Haralampidis,K., Vicente-Agullo,F., Feldmann,K., Grabov,A., Dolan,L., y Hatzopoulos,P. (2001) Trh1 encodes a potassium transporter required for tip growth in arabidopsis root hairs. Plant Cell **13**:139-151.

Rodríguez-Navarro,A. (2000) Potassium transport in fungi and plants. Biochim Biophys Acta **1469**:1-30.

Rodríguez-Navarro,A., Blatt,M.R., y Slayman,C.L. (1986) A potassium-proton symport in *Neurospora crassa*. J.Gen.Physiol. **87**:649-674.

Rodríguez-Navarro,A. y Ramos,J. (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J.Bacteriol. **159**:940-945.

Rodríguez-Navarro,A. y Rubio,F. (2006) High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. J Exp Bot **57**:1149-1160.

Ruan,Y.L., Llewellyn,D.J., y Furbank,R.T. (2001) The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and

coordinated expression of sucrose and K⁺ transporters and expansin. *Plant Cell* **13**:47-60.

Ruan, Y.L., Llewellyn, D.J., y Furbank, R.T. (2001) The Control of Single-Celled Cotton Fiber Elongation by Developmentally Reversible Gating of Plasmodesmata and Coordinated Expression of Sucrose and K⁺ Transporters and Expansin. *The Plant Cell* **13**:47-60.

Rubio, F., Gassmann, W., y Schroeder, J.I. (1995) Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* **270**:1660-3.

Rubio, F., Santa-Maria, G.E., y Rodríguez-Navarro, A. (2000) Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiologia Plantarum* **109**:34-43.

Rubio, F., Schwarz, M., Gassmann, W., y Schroeder, J.I. (1999) Genetic selection of mutations in the high affinity K⁺ transporter HKT1 that define functions of a loop site for reduced Na⁺ permeability and increased Na⁺ tolerance. *J Biol Chem* **274**:6839-6847.

Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Alemán, F., y Martínez, V. (2008) Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiologia Plantarum* **134**:598-608.

Rufty, T., Jackson, W., y Raper, C. (1982) Inhibition of nitrate assimilation in roots in the presence of ammonium: the moderating influence of potassium. *J Exp Bot* **33**:1122-1137.

Rus, A., Yokoi, S., Sharkhuu, A., Reddy, M., Lee, B.H., Matsumoto, T.K., Koiwa, H., Zhu, J.K., Bressan, R.A., y Hasegawa, P.M. (2001) AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:14150-14155.

Rus, A., Baxter, I., Muthukumar, B., Gustin, J., Lahner, B., Yakubova, E., y Salt, D.E. (2006) Natural Variants of *AtHKT1* Enhance Na⁺ Accumulation in Two Wild Populations of *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **2**:1964-1973.

Rus, A., Lee, B.h., Muñoz-Mayor, A., Sharkhuu, A., Miura, K., Zhu, J.K., Bressan, R.A., y Hasegawa, P.M. (2004) AtHKT1 Facilitates Na⁺ Homeostasis and K⁺ Nutrition in Planta. *Plant Physiology* **136**:2500-2511.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sano, T., Becker, D., Ivashikina, N., Wegner, L.H., Zimmermann, U., Roelfsema, M.R.G., Nagata, T., y Hedrich, R. (2007) Plant cells must pass a K⁺ threshold to re-enter the cell cycle. *Plant Journal* **50**:401-413.

Santa-María, G.E., Danna, C.H., y Czibener, C. (2000) High-affinity potassium transport in barley roots. Ammonium-sensitive and -insensitive pathways. *Plant Physiol* **123**:297-306.

Santa-María,G.E., Rubio,F., Dubcovsky,J., y Rodríguez-Navarro,A. (1997) The *HAK1* Gene of Barley is a Member of a Large Gene Family and Encodes a High-Affinity Potassium Transporter. *Plant Cell* **9**:2281-2289.

Schachtman,D.P. (1992) Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA. *Science* **258**:1654-1658.

Schachtman,D.P. y Schroeder,J.I. (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**:655-8.

Schleyer,M. Y Bakker,E.P. (1993) Nucleotide-Sequence And 3'-End Deletion Studies Indicate That The K⁺-Uptake Protein Kup From *Escherichia-Coli* Is Composed Of A Hydrophobic Core Linked To A Large And Partially Essential Hydrophilic-C Terminus. *Journal Of Bacteriology* **175**:6925-6931.

Schroeder,J.I., Ward,J.M., y Gassmann,W. (1994) Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plants: biophysical implications for K⁺ uptake. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**:441-71.

Senn,M.E., Rubio,F., Bañuelos,M.A., y Rodríguez-Navarro,A. (2001) Comparative functional features of plant potassium HvHAK1 and HvHAK2 transporters. *J Biol Chem* **276**:44563-44569.

Sentenac,H., Bonneaud,N., Minet,M., Lacroute,F., Salmon,J.M., Gaymard,F., y Grignon,C. (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* **256**:663-5.

Serrano,R., Mulet,J.M., Rios,G., Marquez,J.A., de Larrinoa,I.F., Leube,M.P., Mendizabal,I., Pascual-Ahuir,A., Proft,M., Ros,R., y Montesinos,C. (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany* **50**:1023-1036.

Shaff,J.E., Lucas,W.J., y Kochian,L.V. (1993) Evidence for common transport systems for K⁺ and NH₄⁺ absorption in maize roots: an investigation utilizing extracellular vibrating K⁺ and NH₄⁺ microelectrodes (abstract No. 595). *Plant Physiol.* **102**:S-106.

Shi,H., Ishitani,M., Kim,C., y Zhu,J.K. (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:6896-6901.

Shi,H., Quintero,F.J., Pardo,J.M., y Zhu,J.K. (2002) The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter *SOS1* controls long- distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* **14**:465-477.

Shin,R. y Schachtman,D.P. (2004) Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:8827-8832.

Spalding,E.P., Hirsch,R.E., Lewis,D.R., Qi,Z., Sussman,M.R., y Lewis,B.D. (1999) Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity: Inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *J Gen Physiol* **113**:909-18.

Su,H., Gollmack,D., Zhao,C., y Bohnert,H.J. (2002) The Expression of HAK-Type K⁺ Transporters Is Regulated in Response to Salinity Stress in Common Ice Plant. *Plant Physiology* **129**:1482-1493.

Su,Q., Feng,S., An,L., y Zhang,G. (2007) Cloning and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a K⁺ transporter, AlHAK, from the graminaceous halophyte, *Aeluropus litoralis*. *Biotechnology Letters* **29**:1959-1963.

Sunarpi, Horie,T., Motoda,J., Kubo,M., Yang,H., Yoda,K., Horie,R., Chan,W.Y., Leung,H.Y., Hattori,K., Konomi,M., Osumi,M., Yamagami,M., Schroeder,J.I., y Uozumi,N. (2005) Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *The Plant Journal* **44**:928-938.

Szczerba,M.W., Britto,D.T., Balkos,K.D., y Kronzucker,H.J. (2008) Alleviation of rapid, futile ammonium cycling at the plasma membrane by potassium reveals K⁺-sensitive and -insensitive components of NH₄⁺ transport. *Journal of Experimental Botany* **59**:303-313.

Szczerba,M.W., Britto,D.T., Ali,S.A., Balkos,K.D., y Kronzucker,H.J. (2008) NH₄⁺-stimulated and -inhibited components of K⁺ transport in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **59**:3415-3423.

Szczerba,M.W., Britto,D.T., y Kronzucker,H.J. (2006) Rapid, Futile K⁺ Cycling and Pool-Size Dynamics Define Low-Affinity Potassium Transport in Barley. *Plant Physiology* **141**:1494-1507.

Szczerba,M.W., Britto,D.T., y Kronzucker,H.J. (2009) K⁺ transport in plants: Physiology and molecular biology. *Journal of Plant Physiology* **In Press, Corrected Proof**.

Taha,R., Mills,D., Heimer,Y., y Tal,M. (2000) The relation between low K⁺/Na⁺ ratio and salt-tolerance in the wild tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Plant Physiology* **157**:59-64.

Takahashi,R., Nishio,T., Ichizen,N., y Takano,T. (2007) Cloning and functional analysis of the K⁺ transporter, PhaHAK2, from salt-sensitive and salt-tolerant reed plants. *Biotechnology Letters* **29**:501-506.

Takahashi,R., Nishio,T., Ichizen,N., y Takano,T. (2007) High-affinity K⁺ transporter PhaHAK5 is expressed only in salt-sensitive reed plants and shows Na⁺ permeability under NaCl stress. *Plant Cell Reports* **26**:1673-1679.

Thompson,J.D., Gibson,T.J., Plewniak,F., Jeanmougin,F., y Higgins,D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl.Acids.Res.* **25**:4876-4882.

Uozumi,N., Kim,E.J., Rubio,F., Yamaguchi,T., Muto,S., Tsuboi,A., Bakker,E.P., Nakamura,T., y Schroeder,J.I. (2000) The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol* **122**:1249-59.

Vale,F.R., Volk,R.J., y Jackson,W.A. (1988) Simultaneous Influx of Ammonium and Potassium Into Maize Roots - Kinetics and Interactions. *Planta* **173**:424-431.

Venema,K., Quintero,F.J., Pardo,J.M., y Donaire,J.P. (2002) The Arabidopsis Na⁺/H⁺Exchanger AtNHX1 Catalyzes Low Affinity Na⁺ and K⁺ Transport in Reconstituted Liposomes. *Journal of Biological Chemistry* **277**:2413-2418.

Vera-Estrella,R., Barkla,B.J., Garcia-Ramirez,L., y Pantoja,O. (2005) Salt Stress in *Thellungiella halophila* Activates Na⁺ Transport Mechanisms Required for Salinity Tolerance. *Plant Physiology* **139**:1507-1517.

Very,A.A. y Sentenac,H. (2003) Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Ann Rev Plant Biol* **54**:575-603.

Very,A.A. y Sentenac,H. (2002) Cation channels in the Arabidopsis plasma membrane. *Trends in Plant Science* **7**:168-175.

Vicente-Agullo,F., Rigas,S., Desbrosses,G., Dolan,L., Hatzopoulos,P., y Grabov,A. (2004) Potassium carrier TRH1 is required for auxin transport in Arabidopsis roots. *The Plant Journal* **40**:523-535.

Volkov,V., Wang,B., Dominy,P.J., Fricke,W., Y Amtmann,A. (2004) *Thellungiella Halophila*, A Salt-Tolerant Relative Of *Arabidopsis Thaliana*, Possesses Effective Mechanisms To Discriminate Between Potassium And Sodium. *Plant, Cell And Environment* **27**:1-14.

Volkov,V. y Amtmann,A. (2006) *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, has specific root ion-channel features supporting K⁺/Na⁺ homeostasis under salinity stress. *The Plant Journal* **48**:342-353.

Walker,N.A., Sanders,D., y Maathuis,F.J. (1996) High-affinity potassium uptake in plants. *Science* **273**:977-9.

Wang,B., Davenport,R.J., Volkov,V., Y Amtmann,A. (2006) Low unidirectional sodium influx into root cells restricts net sodium accumulation in *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **57**:1161-1170.

Wang,M.Y., Glass,A.D.M., Shaff,J.E., y Kochian,L.V. (1994) Ammonium Uptake by Rice Roots .3. Electrophysiology. *Plant Physiology* **104**:899-906.

Wang,M.Y., Siddiqi,M.Y., y Glass,A.D.M. (1996) Interactions between K⁺ and NH₄⁺: Effects on ion uptake by rice roots. *Plant Cell and Environment* **19**:1037-1046.

Wang,Y.H., Garvin,D.F., y Kochian,L.V. (2001) Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiol* **127**:345-359.

Wang,Y.H., Garvin,D.F., y Kochian,L.V. (2002) Rapid Induction of Regulatory and Transporter Genes in Response to Phosphorus, Potassium, and Iron Deficiencies in Tomato Roots. Evidence for Cross Talk and Root/Rhizosphere-Mediated Signals. *Plant Physiol* **130**:1361-1370.

Ward,J.M., Mäser,P., y Schroeder,J.I. (2009) Plant Ion Channels: Gene Families, Physiology, and Functional Genomics Analyses. *Annual Review of Physiology* **71**:59-82.

Welch,R.M. y Epstein,E. (1968) Dual Mechanisms of Alkali Cation Absorption by Plant Cells - Their Parallel Operation Across Plasmalemma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **61**:447-&.

Wong,T.S., Roccatano,D., Zacharias,M., y Schwaneberg,U. (2006) A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution. *Journal of Molecular Biology* **355**:858-871.

Wong,T.S., Roccatano,D., y Schwaneberg,U. (2007) Are transversion mutations better? A Mutagenesis Assistant Program analysis on P450 BM-3 heme domain. *Biotechnol J* **2**.

Wu,S.-J., Ding,L., y Zhu,J.-K. (1996) SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* **8**:617-627.

Xu,G.H., Wolf,S., y Kafkafi,U. (2002) Ammonium on potassium interaction in sweet pepper. *J Plant Nutr* **25**:719-734.

Xu,J., Li,H.D., Chen,L.Q., Wang,Y., Liu,L.L., He,L., y Wu,W.H. (2006) A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell* **125**:1347-1360.

Zhang,H.X. (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature biotechnology* **19**:765-768.

Zhu,J.K., Liu,J., y Xiong,L. (1998) Genetic analysis of salt tolerance in arabidopsis. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* **10**:1181-91.

Zhu,J.K. (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:441-445.

Zhu,J.K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* **6**:66-71.

Zimmermann,S., Talke,I., Ehrhardt,T., Nast,G., y Muller-Rober,B. (1998) Characterization of SKT1, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cells. *Plant Physiology* **116**:879-890.

