

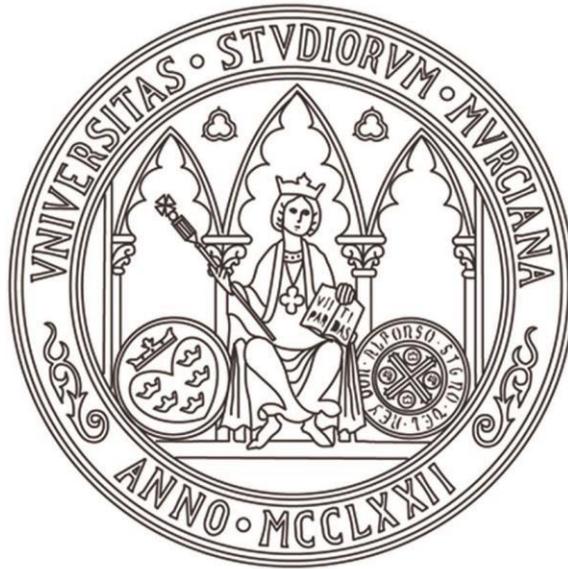


UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Función y regulación de los sistemas de entrada y translocación de
K⁺ en la raíz en plantas de *Arabidopsis thaliana* L. y *Solanum*
lycopersicum L.

D. Jesús Amo Pérez

2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Función y regulación de los sistemas de entrada y translocación de K⁺
en la raíz en plantas de *Arabidopsis thaliana* L. y *Solanum*
lycopersicum L.

Autor: D. Jesús Amo Pérez

Director/es: D. Francisco Rubio Muñoz

D. Manuel Jesús Nieves Cordones



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Jesús Amo Pérez

doctorando del Programa de Doctorado en

Biología Molecular y Biotecnología

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Función y regulación de los sistemas de entrada y translocación de K⁺ en la raíz en plantas de *Arabidopsis thaliana* L. y *Solanum lycopersicum* L

y dirigida por,

D./Dña. Francisco Rubio Muñoz

D./Dña. Manuel Jesús Nieves Cordones

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 18 de Mayo de 2023

Fdo.: Jesús Amo Pérez

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

PUBLICACIONES

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

Amo J, Lara A, Martínez-Martínez A, Martínez V, Rubio F. (2021). The protein kinase SICIPK23 boosts K⁺ and Na⁺ uptake in tomato plants. *Plant, Cell & Environment* 44 (12), 3819-3835. DOI: 10.1111/pce.14189.

Nieves-Cordones M., Amo J., Hurtado-Navarro L., Martínez A.M., Martínez V. & Rubio F. (2023). *New Phytologist (en prensa)*. Inhibition of SISKOR by SICIPK23-SICBL1/9 uncovers CIPK-CBL-target network rewiring in land plants DOI: 10.1111/nph.18910.

Además, durante el desarrollo de la Tesis Doctoral, el doctorando ha podido participar en la publicación de los siguientes artículos:

Ródenas R, Ragel P, Nieves-Cordones M, Martínez-Martínez A, Amo J, Lara A, Martínez V, Quintero FJ, Pardo JM, Rubio F. (2021). Insights into the mechanisms of transport and regulation of the Arabidopsis high-affinity K⁺ transporter HAK5. *Plant Physiology* 185: 1860–1874. DOI: 10.1093/plphys/kiab028.

Nieves-Cordones M, Lara A, Silva M, Amo J, Rodríguez-Sepúlveda P, Rivero RM, Martínez V, Botella MA, Rubio F. (2020). Root high-affinity K⁺ and Cs⁺ uptake and plant fertility in tomato plants are dependent on the activity of the high-affinity K⁺ transporter SIHAK5 *Plant, Cell & Environment* 43: 1707–1721. DOI: 10.1111/pce.13769.

Nieves-Cordones M, Lara A, Ródenas R, Amo J, Rivero RM, Martínez V, Rubio F. (2019). Modulation of K⁺ translocation by AKT1 and AtHAK5 in Arabidopsis plants. *Plant, Cell & Environment* 42: 2357–2371. DOI: 10.1111/pce.13573.

Además de los artículos mencionados anteriormente también se ha publicado un capítulo de libro:

Jesús Amo, Almudena Martínez-Martínez, Vicente Martínez, Manuel Nieves-Cordones, Francisco Rubio. (2023). Potassium Transport Systems at the Plasma Membrane of Plant Cells. Tools for Improving Potassium Use Efficiency of Crops. John Wiley & Sons, Ltd. *Book Editor(s): Vijay Pratap Singh, Manzer H. Siddiqui: 120-147.* DOI: 10.1002/9781119803041.ch7.

FINANCIACIÓN

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos:

- **Título del proyecto:** Nutrición de K⁺ en plantas: Identificación de mecanismos de regulación y nuevos sistemas de absorción de K⁺ por la raíz.

Entidad financiadora: Plan Nacional. Ministerio de Economía y Competitividad

Número de identificación: AGL2015-66434-R

Presupuesto total: 133.100 euros

Duración: 2016-2019

Investigador principal: Francisco Rubio Muñoz

- **Título del proyecto:** Obtención de herramientas moleculares para aumentar la absorción de K⁺ en las raíces de tomate.

Entidad financiadora: Fundación Séneca de la Región de Murcia

Número de identificación: 20806/PI/18

Duración: 2019-2021

Presupuesto total: 87.500 euros

Investigador principal: Francisco Rubio Muñoz

- **Título del proyecto:** Incremento del uso eficiente del K⁺ en cultivos: Identificación de nuevos sistemas de transporte de K⁺ y de redes de regulación fundamentales para la nutrición de K⁺ de las plantas.

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación. Plan Nacional Proyectos I+D+i Retos Investigación (RTI)

Número de identificación: PID2019-106649RB-I00

Duración: 2020-2023

Presupuesto total: 147.000 euros

Investigador principal: Francisco Rubio Muñoz

- Red temática 'Sistemas de Transporte de Sodio y Potasio en Plantas', con referencia BIO2016-81957-REDT, financiada por la Agencia Estatal de Investigación, Ministerio de Economía y competitividad, Gobierno de España.

El firmante de la presente Tesis Doctoral ha disfrutado de un contrato predoctoral del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU), con referencia FPU17/01883, concedido por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Durante el desarrollo del contrato, el firmante de la tesis también disfrutó de una ayuda complementaria de movilidad con referencia EST22/00211 destinada a beneficiarios del programa FPU para realizar una estancia en la Universidad de Milán.

AGRADECIMIENTOS

Tras la realización de todo el trabajo experimental y documental para la redacción de esta memoria, me gustaría agradecer, de todo corazón, a todas las personas que me han enseñado y acompañado en esta aventura.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, Dr Francisco Rubio Muñoz y Dr Manuel Jesús Nieves Cordones, por su supervisión, su ayuda incondicional y su capacidad para transmitirme la ilusión por la investigación desde el primer día. Me gustaría terminar este agradecimiento hacia ellos parafraseando esta célebre cita de Isaac Newton: «Si he logrado ver más lejos ha sido porque he subido a hombros de gigantes».

En segundo lugar, agradecer a mi tutora, Dra. María Senena Corbalán García por la gran ayuda prestada y la oportunidad de aprender de la experiencia docente en la Universidad.

Al Dr. Alex Costa por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio en la Universidad de Milán y al resto del equipo: Cristina, Francesca, Matteo, Stefano, Sara, Andrea, Carlotta, Laura, Bianca, Claudia, Giorgia y Elisa, por haberme enseñado tantas cosas nuevas y haberme hecho sentir como en casa.

A mis compañeros de laboratorio durante estos años: A Reyes, por la paciencia mostrada durante mi primera etapa en el laboratorio y todo lo que me ha enseñado, a Alberto por haberme ayudado en todo siempre que lo he necesitado, a Almudena que siempre está ahí para animar cuando no sale algún experimento y Adrián por el gran soporte técnico que ha aportado y la amistad que hemos forjado. Agradecer también a todas aquellas personas que en algún momento han pasado por el laboratorio aportando valor añadido con su trabajo: Cristina, M^a Carmen, Félix, Laura Hurtado, Pedro, Elisa y Alberto Pedrero.

Al resto de miembros del departamento que me han ayudado con sus consejos: Dr. Vicente Martínez, Dra. Rosa María Rivero y Dr. Francisco García.

A los buenos amigos que han compartido espacio conmigo dentro de este gran departamento: María 'gallega', María 'Orihuela', Silvia, Tere, Ulises, Juan Antonio, Valeria, Marina, José Manuel, Miriam, Sara y Juanico.

A los amigos que me han acompañado durante este tiempo: Álvaro, José Gustavo, Diego, Jesús Nicolás, Andrés, Jesús David, Ramón, Jesús Baltanás y David López y todos aquellos con los que he compartido momentos de 'desconexión'.

A Celia, por haberme apoyado en toda mi trayectoria y saber estar tanto en los buenos como en los malos momentos.

A mis padres, M^a Dolores y Jesús, y a mi hermana Ana Inés por hacer siempre más fácil el camino y haberme permitido llegar en cada momento a donde quiero estar. Sois el ejemplo que seguir.

A mi familia,

Por cultivar en mi la actitud más importante para la ciencia, la curiosidad.

Índice

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia del potasio (K ⁺) para las plantas.....	3
1.1.1 Funciones del K ⁺	4
1.1.2 El K ⁺ en la agricultura	7
1.2 Relevancia del sodio (Na ⁺) para las plantas.....	9
1.2.2 El Na ⁺ en la agricultura	12
1.3 Bases moleculares de la absorción y transporte de K ⁺ y Na ⁺	13
1.3.1 Proteínas implicadas en el transporte de K ⁺ y Na ⁺	14
1.3.2 Mecanismos de regulación de los sistemas de transporte de K ⁺ y Na ⁺	22
1.4 Uso de sensores para la detección de iones en plantas	25
1.5 Implicación del K ⁺ como segundo mensajero en tareas de señalización.....	30
1.6 Plantas modelo y de interés agronómico	31
1.6.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> L. como planta modelo	32
1.6.2 <i>Solanum lycopersicum</i> L. como planta de interés agronómico	33
II. OBJETIVOS	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1 MATERIALES.....	42
3.1.1 Material biológico.....	42
3.1.2 Medios y condiciones de cultivo	46
3.2 MÉTODOS	54
3.2.1 Sistema de cultivo hidropónico, sistema de cultivo en maceta, condiciones de crecimiento para las plantas.....	54

3.2.2 Producción de plantas 'Knock out' (KO) mediante CRISPR-Cas y generación de líneas transgénicas	59
3.2.3 Determinación de potenciales de membrana en células de la raíz	63
3.2.4 Determinación del contenido de cationes, aniones y tasa de absorción de cationes.	65
3.2.5 Generación de raíces transgénicas de tomate.	66
3.2.6 Ensayos de fluorescencia en <i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>Xenopus laevis</i>	67
3.2.7 Experimentos de fijación de voltaje en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	69
3.2.8 Ensayos de complementación en levadura	71
3.2.9 Manejo de microscopios, análisis de imagen y preparación de soluciones de imagen.....	72
3.2.10 Cruzamiento de líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
3.2.11 Análisis estadísticos y representación gráfica	75
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
4.1 CAPÍTULO 1: ESTUDIO DEL PAPEL DE SIHAK5, LKT1 Y SICIPK23 EN LA ENTRADA DE K ⁺ EN LA PLANTA DE TOMATE	80
4.1.1 Análisis del fenotipo de plantas <i>lkt1</i>	80
4.1.2 Contribución de LKT1 a la absorción de K ⁺ a concentraciones externas en el rango milimolar	85
4.1.3 Las plantas <i>lkt1</i> son hipersensibles a altas concentraciones de Mg ²⁺	88
4.1.4 La actividad de LKT1 es incrementada debido a la interacción con los complejos SICIPK23-SICBL1/9.....	90
4.1.5 SIHAK5 es activado por los complejos SICIPK23-SICBL1/9 .	94
4.1.6 SICIPK23 regula la absorción de K ⁺ en la planta mediada por LKT1 y SIHAK5	95

DISCUSIÓN	100
4.2 CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE SICIPK23 EN LA REGULACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ENTRADA DE Na ⁺ EN LA RAÍZ	105
4.2.1 La entrada de Na ⁺ en plantas ayunadas de K ⁺ depende de la actividad de SICIPK23.....	105
4.2.2 Regulación de la entrada de Na ⁺ por SICIPK23 en condiciones de ayuno de K ⁺	108
4.2.3 Uso de inhibidores de sistemas de transporte conocidos para la identificación de candidatos	113
4.2.4 SICIPK23 no está implicado en la regulación de los transportadores de Na ⁺ SIHKT1.1 y SIHKT1.2.....	120
DISCUSIÓN	125
4.3 CAPITULO 3: ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE SISKOR POR SICIPK23	129
4.3.1 SISKOR se expresa mayoritariamente en la estela de la raíz	129
4.3.2 SISKOR constituye canales selectivos de K ⁺ en ovocitos de <i>Xenopus</i>	133
4.3.3 SISKOR se inhibe por SICIPK23-SICBL1/9	135
4.3.4 La inhibición de canales tipo SKOR por parte de CIPK23-CBL1 está conservada en tomate, vid, Medicago y lechuga, pero no en <i>Arabidopsis</i> y <i>Eutrema salsugineum</i>	138
4.3.5 La inhibición de SISKOR por parte de los complejos CIPK23-CBL1 está mediada por mecanismos dependientes e independientes de fosforilación	140
4.3.6 SISKOR, pero no AtSKOR, interacciona con SICIPK23 en ensayos de BiFC	142
4.3.7 La concentración de K ⁺ en el xilema se incrementa en plantas <i>slcipk23</i> después del ayuno de K ⁺	146

DISCUSIÓN	149
4.4 CAPITULO 4: EXPRESIÓN EN PLANTAS DE SENSORES DE IONES CODIFICADOS GENÉTICAMENTE	153
4.4.1 Caracterización de las líneas GEPI1.0 de Arabidopsis	153
4.4.2 Generación de líneas transgénicas GEPI1.0 de tomate.	159
4.4.3 Caracterización de las líneas GEPI1.0 de tomate	160
DISCUSIÓN	162
V. CONCLUSIONS.....	167
VI. SUMMARY.....	172
6.1 INTRODUCTION.....	174
6.2 OBJECTIVES	174
6.3 METHODOLOGY	175
6.3.1 Bacterial and yeast strains and media	175
6.3.2 Plant material and growth conditions	175
6.3.3 KO plants generation with CRISPR tools.....	176
6.3.4 Membrane potential determination	176
6.3.5 Determination of ion and anion contents	177
6.3.5 Transgenic roots generation	177
6.3.6 BiFC assays in <i>Nicotiana benthamiana</i> and <i>Xenopus laevis</i>	177
6.3.7 Two-electrode-voltage-clamp in <i>Xenopus oocytes</i>	178
6.3.8 Yeast complementation assays	179
6.3.9 Microscopy.....	179
6.4 RESULTS AND DISCUSSION.....	180
6.4.1 LKT1 contributes to K ⁺ uptake at millimolar concentrations.	180
6.4.2 <i>lkt1</i> plants are hypersensitive to high Mg ²⁺ concentrations ..	181
6.4.3 LKT1 activity is enhanced by SICIPK23-SICBL1/9 complexes	181
6.4.4 SIHAK5 is activated by SICIPK23-SICBL1/9 complexes.....	182

6.4.5 SICIPK23 regulates plant K ⁺ uptake mediated by LKT1 and SIHAK5.....	182
6.4.6 Na ⁺ entry in K ⁺ starved plants is dependent on SICIPK23 activity	183
6.4.7 SICIPK23 – mediated regulation of Na ⁺ uptake under K ⁺ starving conditions is maintained at high Na ⁺ concentrations.	184
6.4.8 Use of inhibitors contribute to identify candidates for SICIPK23-mediated Na ⁺ transport.	185
6.4.9 SICIPK23 is not involved in SIHKT1.1 and SIHKT1.2 regulation.	185
6.4.10 SISKOR is inhibited by SICIPK23-SICBL1/9 complexes	186
6.4.11 Inhibition of SKOR-like channels by CIPK23-CBL1 is conserved in tomato, grapevine, Medicago, and lettuce but not in Arabidopsis and saltwater cress.....	187
6.4.12 SISKOR inhibition by CIPK23-CBL1 is mediated by dependent and non-dependent phosphorylation mechanisms.....	188
6.4.13 Xylem K ⁺ concentration is increased in <i>slcipk23</i> plants after K ⁺ deprivation.....	188
6.4.14 Characterization of Arabidopsis GEPI1.0 lines	188
6.4.15 Generation of GEPI1.0 transgenic lines of tomato.....	189
6.4.16 Characterization of tomato GEPI1.0 lines	190
VII. ANEXOS	192
7.1 Anexo I. Abreviaturas y símbolos	194
7.2 Anexo II. Cebadores.....	197
7.3 Anexo III Material suplementario de la tesis.....	199
VIII. BIBLIOGRAFÍA	201

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Elementos esenciales.....	3
Tabla 2: Cepas de bacterias utilizadas	43
Tabla 3: Cepa de levadura utilizada.....	43
Tabla 4: Líneas de Arabidopsis utilizadas.	44
Tabla 5: Líneas de tomate (var. Micro-Tom) utilizadas.	45
Tabla 6: Línea utilizada de <i>N.benthamiana</i>	45
Tabla 7: Composición del medio LB.....	47
Tabla 8: Composición del medio NA.	47
Tabla 9: Composición del medio YPD	48
Tabla 10: Composición del medio SD	49
Tabla 11: Composición del medio PA	50
Tabla 12: Composición del stock de oligoelementos 1000X.....	50
Tabla 13: Composición del stock de vitaminas 100X.....	51
Tabla 14: Composición de la solución nutritiva de 1/5 Hoagland modificada	52
Tabla 15: Composición de la solución OR2.....	53
Tabla 16: Composición de la solución ND96	53
Tabla 17: Secuencia mutante obtenida en el gen SICIPK23.....	63
Tabla 18: Solución de imagen para la raíz.	74
Tabla 19: Solución de imagen para los estomas.....	74
Tabla 20: Secuencias mutantes obtenidas en el gen LKT1..	81
Tabla 21: Concentración miliequivalente (mEq g _{DW} ⁻¹) en parte aérea y raíz de plantas WT, lkt1-1 y lkt1-2 crecidas a 0,1 y 1,4 mM de K ⁺ y sustitución de K ⁺ por Mg ²⁺ , Ca ²⁺ y Na ⁺	83
Tabla 22: Especificidad de los inhibidores del transporte para cada una de las familias de transportadores.	113
Tabla 23: Potencial de semiactivación (E _{a50}) y “gating charge” (Z _g) para corrientes de ovocitos que expresan SISKOR y SISKOR-SICIPK23-SICBL1 a 3 y 30 mM de K ⁺	136
Tabla 24: Tabla de cebadores utilizados durante la Tesis Doctoral.	197

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principales funciones del K ⁺ en la célula vegetal.....	5
Figura 2: El ciclo del K ⁺ en el suelo.....	9
Figura 3: Imagen de plantas WT y slhak5-1 crecidas a 10 μM de K ⁺ en ausencia o presencia de 50mM NaCl.....	11
Figura 4: Vías de absorción de sustancias en la raíz.....	14
Figura 5: Representación de la estructura de un sensor ratiométrico tipo “Cameleon”.....	28
Figura 6: Representación esquemática del mecanismo de detección de K ⁺ por los GEPiIs basados en FRET.....	29
Figura 7: Planta de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Columbia-0.....	33
Figura 8 : Planta de <i>Solanum lycopersicum</i> var. Micro-Tom.....	34
Figura 9: Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> utilizados para los experimentos de fijación de voltaje.....	46
Figura 10: Sistema de germinación y aclimatación para plántulas de tomate.....	54
Figura 11: Material utilizado para el cultivo hidropónico de tomate.....	55
Figura 12: Material utilizado para el cultivo hidropónico de <i>Arabidopsis</i>	57
Figura 13: Planta de tomate cultivada en maceta.....	57
Figura 14: Cultivo en maceta de plantas de <i>Arabidopsis</i>	58
Figura 15: Cultivo de plantas de <i>N. benthamiana</i> en maceta.....	58
Figura 16: Representación esquemática del gen SICIPK23 y localización de los sitios diana para el complejo sgARN-Cas9.....	60
Figura 17: Representación de los plásmidos utilizados para la edición con CRISPR-Cas9.....	60
Figura 18: Proceso de transformación genética de plantas de tomate.....	61
Figura 19: Aclimatación de plantas de tomate regeneradas a partir del cultivo in vitro.....	62
Figura 20: Equipo de electrofisiología para la determinación de los potenciales de membrana.....	64
Figura 21: Generación de raíces transgénicas de tomate mediante transformación con <i>A. rhizogenes</i>	67

Figura 22: Representación esquemática del gen LKT1 y los sitios diana para el complejo sgARN-Cas9.....	80
Figura 23: Concentración de K ⁺ y Mg ²⁺ y peso seco de parte aérea y raíz de plantas WT, <i>lkt1-1</i> y <i>lkt1-2</i> crecidas a diferentes concentraciones de K ⁺ (0,1, 1,4, 5 y 10 mM K ⁺) durante 14 días.	82
Figura 24 Contenido de K ⁺ y Mg ²⁺ en partes aéreas y raíces de plantas WT y <i>akt1</i> de <i>Arabidopsis</i> crecidas a 0.1 y 1.4 mM K ⁺ durante 35 días.....	85
Figura 25: Absorción de K ⁺ in plantas WT y <i>lkt1</i>	87
Figura 26: Concentración de K ⁺ y Mg ²⁺ y peso seco de plantas WT, <i>lkt1-1</i> , <i>lkt1-2</i> crecidas bajo tres condiciones diferentes de Mg ²⁺ (0,05, 0,35 y 20 mM Mg ²⁺) durante 14 días.	90
Figura 27: Caracterización electrofisiológica de LKT1-SICIPK23-SICBL1/9 en ovocitos de <i>Xenopus</i>	92
Figura 28: Visualización de la interacción entre proteínas de los complejos LKT1-SICIPK23-SICBL1/9 en ensayos de BiFC.	93
Figura 29: Crecimiento de levaduras que expresan el transportador de K ⁺ SIHAK5 o la construcción quimérica qSIHAK5 en presencia o ausencia de los complejos SICIPK23/SICBL1 o SICIPK23/SICBL9 en medio AP.	95
Figura 30: Contribución de SICIPK23 al transporte de K ⁺ mediado por LKT1 y SIHAK5.	97
Figura 31: Tinción de GUS de raíces pilosas que expresan 35S::GUS-Int-pBI321 (izquierda) y pBI321 vacío (control negativo) (derecha). Barra de escala = 75 μm.	99
Figura 32: Concentración de Na ⁺ en plantas de <i>Arabidopsis</i> y tomate. ...	107
Figura 33: Concentración de Na ⁺ en plantas de tomate WT, <i>lkt1-1</i> y <i>slhak5-1</i> crecidas bajo condiciones de ayuno de K ⁺	108
Figura 34: Análisis del fenotipo de las plantas WT, <i>slcipk23</i> , <i>lkt1</i> y <i>slhak5</i> cultivadas bajo condiciones de ayuno de K ⁺ y a diferente concentración de Na ⁺	110
Figura 35: Tasa de absorción de Na ⁺ de plantas WT y <i>slcipk23</i> ayunadas de K ⁺ y cultivadas a 0,09 o 10 mM de Na ⁺	111
Figura 36: (A) Longitud de las raíces de plantas WT, <i>slcipk23</i> , <i>lkt1</i> y <i>slhak5</i> cultivadas a 0,09 mM o 10 mM de Na ⁺ . (B) Representación gráfica de las plantas utilizadas en el experimento.	112

Figura 37: Concentración de Na ⁺ en plantas WT y <i>slcipk23</i> cultivadas en condiciones de ayuno de K ⁺ en presencia (tratamiento) o no (tratamiento control) de 4 mM de NH ₄ ⁺	115
Figura 38: Concentración de Na ⁺ en plantas WT y <i>slcipk23</i> cultivadas en condiciones de ayuno de K ⁺ en presencia (tratamiento) o no (tratamiento control) de 4 mM de Ba ²⁺	116
Figura 39: Concentración de Na ⁺ en plantas WT y <i>slcipk23</i> cultivadas en condiciones de ayuno de K ⁺ en presencia (tratamiento) o no (tratamiento control) de 0,1 mM de Li ⁺	118
Figura 40: Concentración de Na ⁺ en plantas WT y <i>slcipk23</i> cultivadas en condiciones de ayuno de K ⁺ en presencia (tratamiento) o no (tratamiento control) de 10 mM de Ca ²⁺ o La ³⁺	120
Figura 41: Crecimiento de levaduras que expresan el transportador de Na ⁺ AtHKT1.1 y SlHKT1 de Arabidopsis y tomate, respectivamente.....	122
Figura 42: SlHKT1.2 forma canales de entrada de Na ⁺ que no son regulados por el complejo CIPK23-CBL.....	123
Figura 43: Visualización de la interacción entre proteínas en ensayo de BiFC.....	124
Figura 44: Árbol filogenético de las secuencias de canales de K ⁺ activados por voltaje de tomate y Arabidopsis.....	130
Figura 45: Expresión de SISKOR, SIK5.1 y SIK5.2 en el córtex (A) y la estela (B) de las raíces de tomate.....	130
Figura 46 SISKOR se expresa en la estela de la raíz de las raíces de tomate.	132
Figura 47 :Expresión de SIK5.1 en respuesta al ayuno de K ⁺ (7d) (A) y la aplicación de 10 μM de ABA durante 3 h (B). Expresión de SIK5.2 en respuesta al ayuno de K ⁺ (7d) (C) y la aplicación de 10 μM de ABA durante 3 h (D).	132
Figura 48: SISKOR forma canales de salida de K ⁺ en ovocitos de <i>Xenopus</i> que son activados por bajas concentraciones externas de K ⁺ y pH alcalino..	134
Figura 49: SISKOR es inhibido por los complejos SlCIPK23-SlCBL1/9. .	137
Figura 50: La inhibición de los canales de salida de K ⁺ por parte de los complejos CIPK23-CBL1 está conservada en tomate, <i>Medicago trunculata</i> ,	

vid (<i>Vitis vinífera</i>), lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) pero no en <i>Arabidopsis</i> y <i>Eutrema salsugineum</i>	140
Figura 51: El dominio N-terminal contiene un posible sitio de fosforilación o interacción implicado en la inhibición de SISKOR por los complejos CIPK23-CBL1.	145
Figura 52: La concentración de K ⁺ en la savia del xilema se incrementa en las plantas <i>slcipk23-1</i> tras un tratamiento de ayuno de K ⁺	148
Figura 53: Corriente relativa en estado estacionario a +60 mV (%) de ovocitos inyectados con los cARNs que codifican SISKOR en presencia o ausencia de AtCIPK23 + AtCBL1, SICIPK9 + SICBL1 (en (A)) y SICIPK2 + SICBL1 (en (B)).	151
Figura 54 (A) Representación esquemática de plantas GEPI1.0 de <i>Arabidopsis</i> incubadas a 0, 0,5, 5, 20, 100, y 200 mM de K ⁺ . (B) Ratio cpVenus/CFP de las plantas incubadas a las concentraciones de K ⁺ mencionadas.	154
Figura 55: (A) Ratio cpVenus/CFP de plantas GEPI1.0 de <i>Arabidopsis</i> incubadas a 0, 5, 100 y 200 mM de K ⁺ . (B) Ratio cpVenus/CFP de plantas WT-Nes-YC3.6 de <i>Arabidopsis</i> crecidas a 0, 5, 100 y 200 mM de K ⁺ . (C) Ratio 405/488 de plantas pH-GFP de <i>Arabidopsis</i> crecidas a 0, 5, 100 y 200 mM de K ⁺	155
Figura 56: Ratio cpVenus/CFP de estomas de plantas GEPI1.0 de <i>Arabidopsis</i> en estado abierto y cerrado (tras tratamiento con 50 μM de ABA).	157
Figura 57: (A) Señal de Ca ²⁺ ($\Delta F/F_0$) y de K ⁺ ($\Delta R/R_0$) de las plantas GEPI1.0XR-GECO tratadas con 2 mM de ATP. (B) Imagen ampliada de las señales de Ca ²⁺ y K ⁺ donde se aprecia la diferencia de tiempo entre la señal de Ca ²⁺ (en primer lugar) y las de K ⁺ (seguida de la de Ca ²⁺).....	159
Figura 58: Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia durante la comprobación de las líneas de tomate transformadas.....	161
Figura 59: Ratio cpVenus/CFP de estomas de plantas GEPI1.0 de tomate en estado abierto y cerrado (tras tratamiento con 50 μM de ABA).	162
Figura 60: Alineamiento de la secuencia proteica de AtSKOR y SISKOR.	199

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del potasio (K⁺) para las plantas

Las plantas requieren 14 elementos minerales, denominados esenciales, para desarrollarse y completar su ciclo vital (Marschner, 2011) . Según los requerimientos de la planta, los elementos esenciales pueden clasificarse en macronutrientes y micronutrientes (Tabla 1). La concentración de macronutrientes en la planta es del 0,1 % en peso seco aproximadamente, mientras que los micronutrientes se encuentran en concentraciones inferiores o iguales al 0,01 %.

Tabla 1: Elementos esenciales

Macronutrientes	Micronutrientes
Nitrógeno (N)	Hierro (Fe)
Fósforo (P)	Zinc (Zn)
Potasio (K)	Manganeso (Mn)
Calcio (Ca)	Boro (B)
Magnesio (Mg)	Cobre (Cu)
Azufre (S)	Molibdeno (Mo)
	Cloro (Cl)
	Níquel (Ni)

El potasio (K⁺) forma parte del grupo de los macronutrientes esenciales y además, es el catión más abundante en los tejidos vegetales representando entre el 1 y el 10 % del peso seco de la planta (Leigh & Wyn Jones, 1984) . La concentración de K⁺ en el citosol de las células vegetales se encuentra alrededor de 100 mM y esto permite a la célula mantener la homeostasis y un correcto

funcionamiento. En otros compartimentos celulares como la vacuola, el K^+ alcanza concentraciones de hasta 200 mM. En las vacuolas de las células oclusivas de los estomas, la concentración de K^+ puede llegar a valores de 500 mM. Las plantas obtienen el K^+ del suelo a través de la raíz. La concentración de K^+ en la solución del suelo oscila entre 0,1 y 1 mM. El K^+ presenta una alta movilidad entre la raíz y la parte aérea a través del xilema y el floema (Karley & White, 2009) , distribuyéndose de forma eficiente por toda la planta para cumplir sus funciones.

1.1.1 Funciones del K^+

La naturaleza del K^+ (ion positivo) hace que desempeñe muchas funciones importantes dentro de la planta. El K^+ está implicado en el metabolismo celular, en el crecimiento y en la adaptación a diferentes estreses. El cumplimiento de estas funciones depende de que la planta sea capaz de mantener la concentración adecuada en cada uno de los compartimentos celulares y de la capacidad de la planta para movilizarlo a través del xilema y del floema a aquellos tejidos donde este catión cumple sus funciones.(Marschner, 2011).

El K^+ , gracias a su abundancia y debido a que está cargado positivamente, actúa como estabilizador de moléculas cargadas negativamente como ácidos nucleicos y proteínas (Figura 1). Además, participa como cofactor enzimático (Figura 1) en muchas reacciones provocando un cambio conformacional de las enzimas con las que interactúa y facilitando que se incremente la velocidad de reacción catalítica (V_{max}) o aumentando la afinidad de la enzima por el sustrato (K_m). El papel del K^+ como cofactor es muy específico y su función no puede ser completamente sustituida por otros cationes como el Na^+ o Li^+ (Marschner, 2011).

El K^+ también es esencial durante el proceso de síntesis de proteínas implicadas en el metabolismo vegetal como la ribulosa bifosfato carboxilasa (RUBISCO) o la enzima nitrato reductasa. Este hecho determina que en plantas

con déficit de K^+ se observe una menor acumulación de aminoácidos, amidas y nitratos (Marschner, 2011) ya que son componentes de las proteínas.

Otra de las funciones importantes que cumple el K^+ es el mantenimiento de la turgencia celular (Marschner, 2011). El hecho de que el K^+ sea el principal soluto inorgánico en el interior de la célula (Leigh & Wyn Jones, 1984) hace que, a través de la vacuola (Figura 1), sea el principal implicado en procesos que dependen directamente de cambios en el turgor de la célula como, por ejemplo, la apertura y cierre de los estomas, la elongación del tubo polínico, el crecimiento y mantenimiento de la estructura de la planta o el cierre del órgano de captura de las plantas carnívoras.

Se debe destacar también el papel del K^+ en el flujo de protones a través de la membrana de los tilacoides, y que está implicado en el establecimiento de un gradiente de pH que es imprescindible para la síntesis de ATP (Cotsaftis et al., 2012; Tester & Blatt, 1989). El movimiento de K^+ a través de la membrana plasmática también es esencial para la regulación del potencial eléctrico en las células vegetales (Cheeseman & Hanson, 1979).

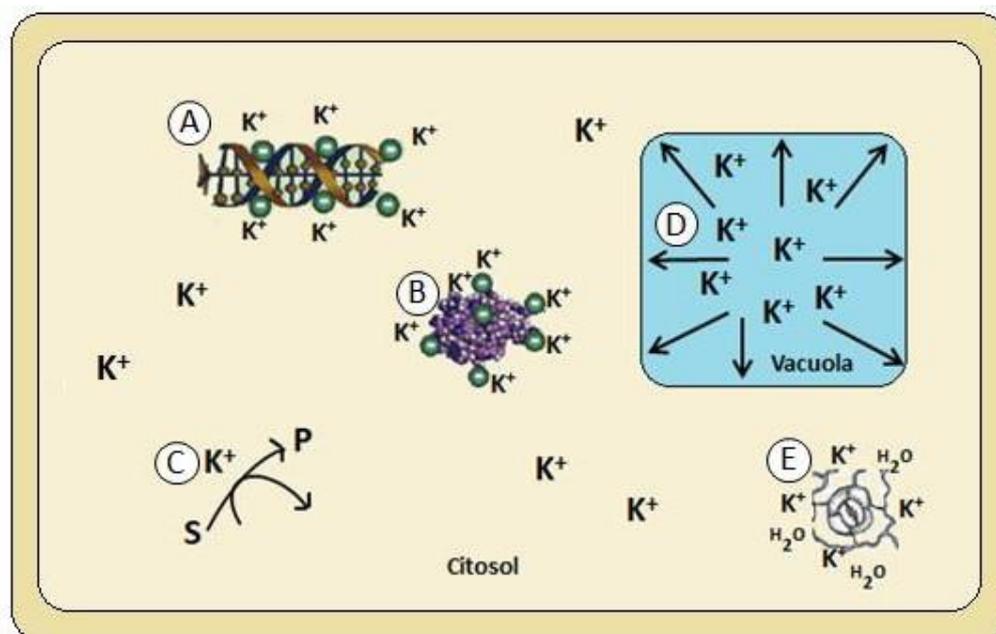


Figura 1: Principales funciones del K^+ en la célula vegetal. La carga positiva del K^+ lo convierte en el principal estabilizador de moléculas cargadas negativamente como ácidos nucleicos (A) y proteínas (B). El K^+ es esencial en el proceso de síntesis de proteínas (C). El K^+ forma parte de la vacuola donde contribuye a mantener el turgor de la célula (D). Relacionado con el mantenimiento del turgor, el K^+ participa en la apertura y cierre de los estomas (E). Figura modificada de Maathuis, F.J.M., 2009.

Algunos estudios recientes sugieren que el K^+ está implicado, junto con el Ca^{2+} y las especies reactivas de oxígeno (ROS), en los procesos de señalización frente a situaciones de estrés (Shabala, 2017). La salida de K^+ inducida por condiciones de estrés serviría como señal para la activación de rutas metabólicas que facilitan la supervivencia de la planta bajo condiciones adversas.

Para cumplir con las funciones descritas, la planta tiene que captar el K^+ de la solución del suelo a través de las raíces. Como se ha descrito, la concentración de K^+ en la solución del suelo oscila entre 0,1 y 1 mM (F. J. Maathuis, 2009). Sin embargo, como se ha mencionado también anteriormente, la concentración de K^+ en los compartimentos celulares debe ser más elevada, entre 100 y 500 mM, para asegurar el correcto funcionamiento de los procesos biológicos. Por ello, las plantas cuentan con eficientes sistemas de transporte para asegurar la absorción en la raíz y la translocación de K^+ a la parte aérea. Además, el K^+ puede ser movilizado de forma interna entre diferentes zonas de la planta en función de las necesidades (Karley & White, 2009). Anatómicamente, ante la escasez de K^+ , las plantas son capaces de desarrollar y expandir su sistema radicular, destacando el mayor desarrollo de los pelos radicales (Jung et al., 2009) con el objetivo de explorar nuevas zonas del suelo que garanticen la adquisición de K^+ .

Los síntomas relacionados con la deficiencia de K^+ como el amarilleamiento y clorosis de las hojas, la aparición de necrosis de las mismas y la muerte de los meristemas laterales y apicales (Amtmann et al., 2018; Marschner, 2011) aparecen cuando la concentración de K^+ presente en la planta es inferior a $10 \text{ g kg}^{-1}\text{PS}$. Esta situación de déficit de K^+ hace que las plantas también presenten más susceptibilidad a los estreses abióticos, como la sequía, el frío y la salinidad, así como a los estreses bióticos, como el ataque de patógenos (Amtmann et al., 2008).

Por todo lo anterior, el correcto estado nutricional de K^+ de las plantas cultivadas es esencial para asegurar el buen rendimiento de los cultivos y la calidad nutricional de las cosechas.

1.1.2 El K⁺ en la agricultura

Según datos de las Naciones Unidas (NU), la población mundial es más de tres veces mayor en la actualidad que a mediados del siglo XX. A mediados de noviembre de 2022, la población mundial alcanzó los 8.000 millones de habitantes. Esto hace necesario incrementar el ritmo de producción de alimentos para poder atender a toda la población. Como consecuencia de esta gran demanda de alimentos, la superficie cultivada ha aumentado considerablemente en el periodo de tiempo 1961-2020, creciendo alrededor del 0,1 % por año hasta situarnos en los 4.740 millones de hectáreas (ha) cultivadas en la actualidad (FAO, 2020). La rápida transformación de diferentes áreas como nuevas zonas de cultivo implica la utilización de suelos que son poco fértiles debido a la baja disponibilidad de nutrientes. La baja disponibilidad de nutrientes en las nuevas áreas de cultivo y el agotamiento de los nutrientes en las zonas que llevaban más tiempo cultivándose, ha hecho que durante los últimos años haya aumentado el uso de fertilizantes inorgánicos con el fin de mejorar la producción de los cultivos.

Aunque el K⁺ representa un alto porcentaje de la corteza terrestre (~2,6 %), la mayor parte del mismo no está disponible para las plantas (F. J. Maathuis, 2009). Así, el K⁺ es uno de los tres nutrientes, junto con el nitrógeno y el fósforo que más se aporta como fertilizante inorgánico, suponiendo un 20 % de los fertilizantes inorgánicos utilizados (FAO, 2020). En 2020, el uso de K⁺ como fertilizante (39 millones de toneladas) ha aumentado un 81 % con respecto al año 2000 (21,54 millones de toneladas) (FAO, 2020). Para reducir el coste económico y medioambiental que conlleva el uso de fertilizantes, que en muchos casos puede ser abusivo (Galloway et al., 2008; Ju et al., 2009), es necesario optimizar el uso de los mismos por parte de las plantas. Trabajando en esta dirección, se logrará reducir la importante huella de carbono que supone la producción y distribución de los fertilizantes, ya que, según un estudio publicado recientemente, la utilización de abonos sintéticos provoca la emisión de 2,6 gigatoneladas de carbono al año, una cantidad que supera la emitida por la aviación y el transporte marítimo juntos (Gao & Cabrera Serrenho, 2023). También se evitarían problemas como la eutrofización debida al aporte incesante

de fertilizantes que afecta a diferentes ecosistemas como el de la laguna del Mar Menor (Informe del Instituto Español de Oceanografía, 2021). Además, la mejora de la planta con respecto a su capacidad en la adquisición de nutrientes supondría un menor gasto económico para los agricultores en un contexto geopolítico en el que los fertilizantes sintéticos se han encarecido un 58 % (The World Bank, 2022) con respecto al año 2002, debido al incremento del precio del gas natural.

Las plantas obtienen el K^+ a través de las raíces y a partir de la solución del suelo. En función de su disponibilidad para la planta, el K^+ puede clasificarse en 4 tipos (Figura 2): 1) K^+ soluble en la solución (0,1-0,2 %), disponible de forma directa para la absorción por parte de la raíz, 2) K^+ intercambiable, que se encuentra unido electrostáticamente a los materiales que componen la fase orgánica y mineral del suelo, 3) K^+ de intercambio lento, que forma parte de las arcillas y 4) K^+ estructural, que es el que se encuentra formando parte de los distintos minerales del suelo y supone hasta el 99 % del total, que no está disponible de forma directa para las plantas (Rengel & Damon, 2008). Generalmente, el mantenimiento del equilibrio entre los 4 tipos de K^+ genera una disponibilidad constante de K^+ para las plantas. Para ello, cuando la concentración de K^+ soluble disminuye, debe reabastecerse a partir del K^+ intercambiable. Cuando disminuye la cantidad de K^+ intercambiable, es el K^+ de intercambio lento el encargado de participar en la restitución de los niveles de K^+ intercambiable. Por último, la degradación de los minerales que contienen el K^+ estructural es necesaria para mantener las reservas de K^+ de intercambio lento. Cuando se rompe este equilibrio o aumenta excesivamente el lixiviado, los suelos se agotan, y es necesario aplicar fertilizantes inorgánicos o fertilizantes orgánicos (residuos vegetales o residuos animales) para garantizar la disponibilidad de K^+ para la planta. En consecuencia, gracias al aporte de los nutrientes que son limitantes, se consigue cumplir con el principal objetivo de la aplicación de fertilizantes, que es el aumento del rendimiento de las cosechas. Según una guía (Los fertilizantes y su uso) elaborada por la FAO en 1965 y reeditada en 2002, con los fertilizantes, los rendimientos de los cultivos pueden

uplicarse e incluso triplicarse, lo que repercute muy positivamente en el rendimiento y la economía de los agricultores.

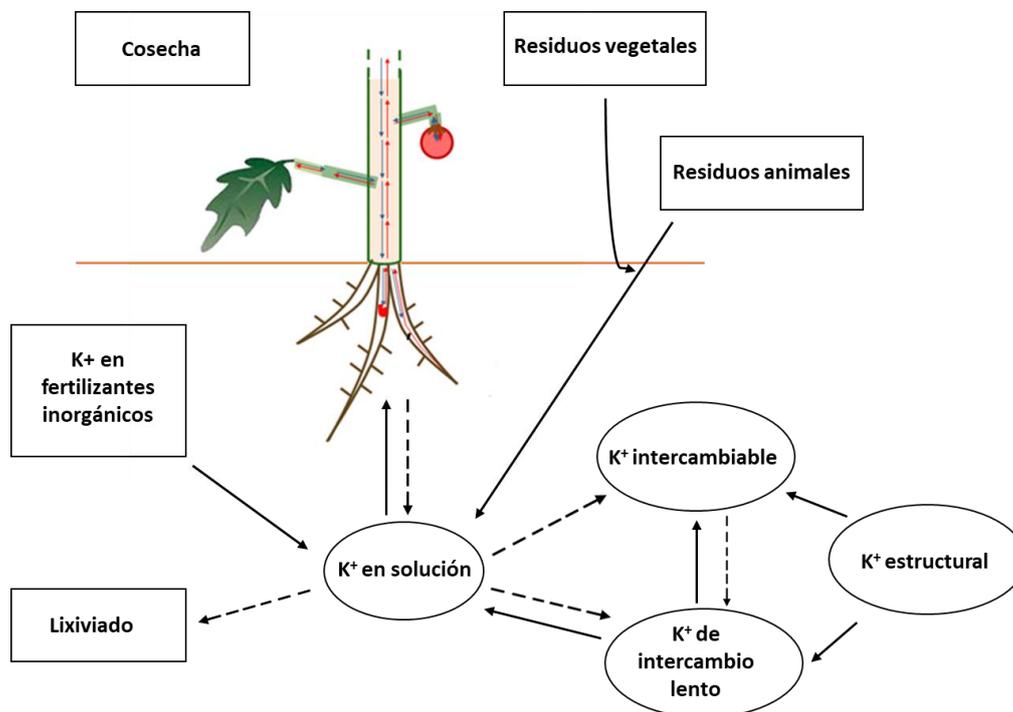


Figura 2: El ciclo del K^+ en el suelo. La figura representa los 4 tipos de K^+ en función de su disponibilidad para la planta. Las líneas continuas representan el K^+ que está en disposición de ser absorbido. Las líneas discontinuas muestran aquel K^+ que se aleja de su absorción por parte de la planta. Los rectángulos muestran el K^+ que se aporta al medio o el que se pierde según el tipo de flecha. Figura adaptada de Römheld, V. y Kirkby, E, 2010.

1.2 Relevancia del sodio (Na^+) para las plantas

El Na^+ es bastante abundante en la corteza terrestre y supone el 2,8 % (p/p) de la misma. La mayor parte del Na^+ presente en la corteza terrestre se encuentra en forma de $NaCl$. En las regiones templadas, la concentración en la solución del suelo se encuentra comprendida entre 0,1 y 1 mM, por tanto, muy similar o superior a la concentración de K^+ . En las regiones áridas, esta concentración puede ser más alta, situándose entre 50 y 100 mM (Marschner, 2011, Capítulo 8). Las altas concentraciones de $NaCl$, típicas de las zonas afectadas por salinidad, reducen el crecimiento de las plantas (Munns & Tester, 2008). Los problemas causados por la salinidad sobre las plantas tienen tres

componentes: Efecto osmótico, efecto tóxico y estrés oxidativo. Más de 1.000 millones de hectáreas de tierra en todo el mundo están afectadas por la salinidad. Un suelo salino se caracteriza por contener una alta concentración de sales solubles. Podemos clasificar un suelo como salino cuando la conductividad eléctrica (EC) del extracto de la pasta saturada del suelo es de 4 dS m⁻¹ o superior, lo que equivale aproximadamente a una concentración de 40 mM de NaCl. El problema de la salinidad de los suelos es global, y se estima que, si no se toman medidas para evitarlo, en los próximos 30 años el porcentaje de suelos salinos podría alcanzar el 50 % de las tierras de cultivo (F. Wang et al., 2020) . Este problema global origina unas pérdidas anuales de más de 27.000 millones de dólares (F. Wang et al., 2021).

Aunque como resumen de los párrafos anteriores se podría concluir que el Na⁺ es perjudicial para las plantas, este catión también puede cumplir un papel beneficioso en el crecimiento y desarrollo de las mismas. Los efectos beneficiosos del Na⁺ se conocen bien en la agricultura y la horticultura (Pilon-Smits et al., 2009). Por ejemplo, el Na⁺ es capaz de sustituir al K⁺ sin causar una disminución en el crecimiento. Este efecto sustitutivo podría deberse a que el Na⁺ es capaz de actuar como cofactor de las mismas enzimas que requieren K⁺, o a que, gracias a que el Na⁺ estaría sustituyendo al K⁺ en sus funciones osmóticas, podría quedar más K⁺ disponible para ser destinado a sus funciones de regulación enzimática. Otro efecto beneficioso del Na⁺ sobre las plantas es su capacidad para estimular el crecimiento de éstas cuando se encuentran creciendo a bajas concentraciones de K⁺ (10 µM) (M. Nieves-Cordones, Al Shiblawi, et al., 2016). Esta capacidad reside en el efecto que tiene este catión sobre la expansión celular y el balance hídrico de la planta. El Na⁺ se acumula en las vacuolas y actúa como soluto contribuyendo a la generación de turgor y por tanto a la expansión celular (Jeschke, 1972; Nunes et al., 1984). El Na⁺ se ha relacionado con una mejora en el balance hídrico de la planta cuando la disponibilidad de agua es limitada. Ante una repentina disminución de la cantidad de agua, las plantas suplementadas con Na⁺ cierran más rápido los estomas y, además, también son capaces de abrirlos más rápido cuando desaparece el estrés hídrico (Perera et al., 1997; Raghavendra et al., 1976). Además de lo descrito anteriormente, resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio (M.

Nieves-Cordones et al., 2020), muestran que el aporte de Na^+ mejora el crecimiento de las plantas cuando éstas crecen en condiciones de bajo K^+ . Sin embargo, esta mejora del crecimiento requiere también el aporte de K^+ , de ahí que dicha mejora se observe en las plantas WT, pero no en las plantas *slhak5*, que carecen del sistema de entrada de K^+ de alta afinidad SIHAK5 (Figura 3).

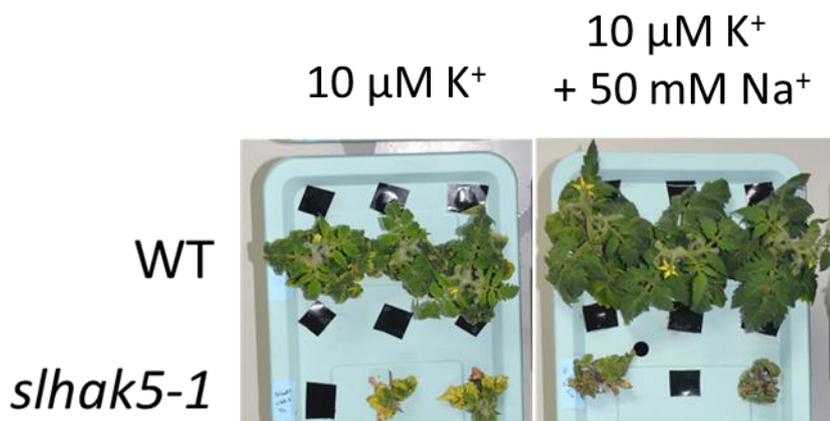


Figura 3: Imagen de plantas WT y *slhak5-1* crecidas a 10 μM de K⁺ en ausencia o presencia de 50mM NaCl. Figura modificada de (M. Nieves-Cordones et al., 2020)

El papel beneficioso del Na^+ para las plantas podría tener, una explicación evolutiva. La evolución de las plantas briófitas a vasculares tuvo lugar en ambientes en los que el K^+ del medio era escaso. El hecho de que el Na^+ fuera predominante al principio de la historia evolutiva de las plantas podría estar relacionado con la capacidad de éste para sustituir al K^+ en algunas de las funciones que cumple en las plantas terrestres (Rodríguez-Navarro & Rubio, 2006). Este escenario explicaría la existencia de transportadores de alta afinidad de Na^+ en las plantas. Por ejemplo, se ha demostrado que el transportador OsHKT2.1 de arroz está implicado en el transporte de Na^+ en condiciones de déficit de K^+ (Horie et al., 2007). PpHAK13 de *Physcomitrella patens* también es un ejemplo de transportador de alta afinidad de Na^+ que, además, presenta muy baja permeabilidad por el K^+ (Benito et al., 2012). Otro ejemplo de transportador implicado en la entrada Na^+ y que contribuye a mantener la ratio Na^+/K^+ es SIHAK20 de tomate (Z. Wang et al., 2020). Es importante mencionar también al transportador ZmHAK4 de maíz, que forma parte del grupo IV de la

familia HAK junto a PpHAK13 y SIHAK20 (M. Nieves-Cordones, Ródenas, et al., 2016) y estaría implicado en la reabsorción de Na^+ a partir de la savia del xilema (Ming Zhang et al., 2019).

En resumen, los efectos beneficiosos descritos para el Na^+ , así como la existencia de los sistemas descritos implicados en su entrada, hacen que se vaya abandonando poco a poco la idea de que las plantas tratan solamente de excluir el Na^+ o compartimentalizarlo para evitar sus efectos tóxicos. Este hecho hace que sea necesario profundizar en el estudio de los sistemas implicados en la entrada de Na^+ ya que su comprensión ofrece una oportunidad para seguir mejorando la respuesta de los cultivos con respecto al metabolismo de este ion y hacer frente a situaciones de estrés relacionados con la deficiencia de K^+ .

1.2.2 El Na^+ en la agricultura

Los efectos positivos del Na^+ sobre algunos cultivos han llevado a aplicarlo como fertilizante en muchas situaciones. Además, la aplicación de Na^+ como fertilizante es especialmente importante en aquellos suelos que presentan una gran cantidad de K^+ fijado (Wakeel et al., 2010) . Un ejemplo representativo de los beneficios de aplicar Na^+ como fertilizante lo vemos con el cultivo de remolacha azucarera, donde la aplicación de Na^+ como fertilizante en las primeras etapas del crecimiento provoca un incremento del índice de área foliar, que permite un incremento de la percepción de la luz. Así, mejora la eficiencia en el uso del agua y se reduce el estrés hídrico que pueda producirse durante la estación de crecimiento (Durrant et al., 1978) .

Estudios recientes han mostrado que el aporte de Na^+ promueve el crecimiento de especies como el trigo, la colza, el sorgo y el tomate cuando las concentraciones de K^+ en el medio son bajas (20 μM). Debido a ello, en la actualidad se está planteando la utilización de fertilizantes con Na^+ ante la escasez de K^+ , ya que los abonos de K^+ presentan precios elevados. Sin embargo, estas prácticas aún requieren estudios de campo a largo plazo con distintas especies para ajustar correctamente las proporciones K:Na para los diferentes cultivos y tipos de suelo (Thorne & M Maathuis, 2022).

Una correcta nutrición con respecto al Na^+ repercute también de manera positiva sobre la ganadería. La concentración de Na^+ en los pastos y forrajes es importante para la nutrición animal. Por ejemplo, la cantidad de Na^+ requerida durante la lactancia de las vacas es de 2 g kg^{-1} PS de forraje (Smith & Middleton, 1978) . Por tanto, el uso de Na^+ como fertilizante en la agricultura es importante en muchas áreas del planeta tanto para mejorar el rendimiento de los cultivos como para contribuir a mejorar la nutrición animal.

1.3 Bases moleculares de la absorción y transporte de K^+ y Na^+

El crecimiento y el desarrollo de las plantas requiere una eficiente adquisición de los elementos esenciales como el K^+ y de todos aquellos que puedan reportarle beneficios durante el desarrollo como el Na^+ . La adquisición del K^+ y Na^+ a partir de la solución del suelo es mediada por las raíces, en concreto por las células de la epidermis y del córtex. Una vez captados por las células de la raíz, tanto el K^+ como el Na^+ son vertidos a los vasos del xilema para ser distribuidos al resto de la planta (Shi et al., 2000; White, 2012). Hay dos vías por las que los solutos y el agua pueden entrar en la raíz (Figura 4). La primera de ellas es la vía apoplástica. Por medio de esta vía el K^+ y el Na^+ presentes en la solución del suelo entran en la planta y circulan por el apoplasto, que es la parte de la raíz formada por los espacios intercelulares y la pared celular de las células de la raíz. Sin embargo, la vía apoplástica se ve limitada al llegar a la endodermis por la banda de Caspary, que está formada por la endodermis suberizada, y define el cilindro central que contiene el xilema y el floema (estela) (Barberon et al., 2016). Para que el K^+ y el Na^+ puedan llegar a la estela de la planta y verse al xilema, deben seguir la vía simplástica. La vía simplástica está formada por el *continuum* de los citoplasmas de las células interconectados por plasmodesmos. Para que estos iones puedan atravesar la membrana de las células y entrar en el simplasto, es necesaria la presencia de sistemas de transporte a través de la membrana. En la distribución del K^+ y el Na^+ en la planta, el floema, y los sistemas de transporte localizados en el mismo, también juegan un papel fundamental. En definitiva, los sistemas de transporte

localizados en la membrana plasmática de diferentes células son piezas clave para el control de la homeostasis del K^+ y la ratio Na^+/K^+ dentro de la planta y por tanto para asegurar su correcta nutrición.

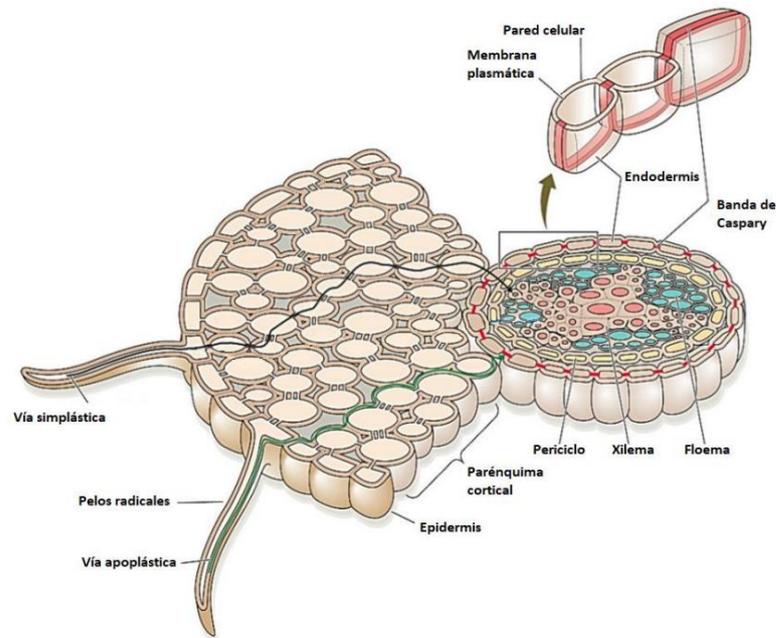


Figura 4: Vías de absorción de sustancias en la raíz. Los nutrientes y el agua pueden entrar en la planta a través de la vía simplástica (línea negra) atravesando las células de la epidermis a través de los plasmodesmos o a través de la vía apoplástica (línea verde), a través de los espacios intercelulares. Si los nutrientes siguen la vía del apoplasto, al llegar a la banda de Caspary (representada en rojo) es necesario su transporte a través de la membrana plasmática por medio de transportadores y canales, para entrar en el simplasto y llegar hasta el xilema. Figura modificada de Taiz 2006.

1.3.1 Proteínas implicadas en el transporte de K^+ y Na^+

A continuación, se describen desde un punto de vista filogenético las familias a las que pertenecen los sistemas de transporte de K^+ y Na^+ más relevantes.

1.3.1.1 Canales de K⁺ y Na⁺

En el transporte de K⁺ y Na⁺ mediado por canales hay implicados dos grupos principalmente: Canales activados por voltaje y canales activados por nucleótidos cíclicos.

1.3.1.1.1 Canales de K⁺ y Na⁺ activados por voltaje

Los canales de K⁺ activados por voltaje, están presentes en todos los reinos: plantas, animales, hongos y bacterias (Jegla et al., 2018) . Esta familia está formada por proteínas multiméricas implicadas en el transporte de K⁺, con una alta selectividad por el mismo, a través de la membrana plasmática. Estas proteínas se disponen en la membrana formando una estructura que permite el movimiento específico del K⁺ a través de un poro. Las proteínas de esta familia presentan un largo fragmento citoplasmático que forma diferentes dominios: dominio C-linker, dominio de unión a nucleótidos cíclicos, dominio anquirina (presente solo en algunas subunidades) y dominio K_{HA} (Jegla et al., 2018) . Según los estudios filogenéticos, los canales de K⁺ activados por voltaje pueden clasificarse en cinco grupos (Pilot, Pratelli, et al., 2003) . A continuación, se detallan estos cinco grupos aportando ejemplos de los canales mejor estudiados en Arabidopsis.

Grupo I: este grupo está compuesto por canales implicados en la entrada de K⁺. En inglés son conocidos comúnmente con el nombre de “inward rectifiers”. Los miembros de este grupo tienen en su estructura el dominio anquirina que participa en las interacciones proteína-proteína (Michaely & Bennett, 1992) . Uno de los canales de este grupo mejor caracterizados en plantas es AKT1. Este canal se localiza en la membrana plasmática de las células de la raíz y es el principal implicado en mantener en la planta unos niveles de K⁺ adecuados para su nutrición ya que forma parte de la principal ruta de entrada de K⁺ cuando la concentración de éste en la solución externa es superior a 10 µM (Hirsch et al., 1998) . Otros ejemplos representativos de este grupo son los canales SPIK y AKT6. Ambos se expresan en las flores (Lacombe et al., 2000; Mouline et al., 2002) . El canal SPIK se expresa en los granos de polen y está implicado en la

germinación y el crecimiento del tubo polínico mediando la entrada de K^+ requerida para estos procesos (Mouline et al., 2002).

Grupo II: los canales pertenecientes a este grupo no presentan el dominio anquirina. Todos los miembros de este grupo están implicados en la entrada de K^+ . Como miembros representativos de este grupo tenemos los canales KAT1 y KAT2. Estos canales han sido bien caracterizados, se encuentran localizados en las membranas de las células oclusivas de los estomas y están implicados en el control del turgor y los movimientos de apertura de los estomas (Lebaudy et al., 2010; Pilot et al., 2001).

Grupo III: dentro de este grupo solo se ha identificado un miembro en *Arabidopsis*, el canal AKT2. Éste se expresa en el floema y en el mesófilo donde forma canales heteroméricos con KAT2, mencionado anteriormente, o canales homoméricos (Xicluna et al., 2007). Estructuralmente presenta el dominio anquirina como los canales del Grupo I. AKT2 está implicado en la entrada y salida de K^+ . Que actúe mediando la entrada o la salida de K^+ en el floema depende de su estado conformacional. El cambio entre un estado y otro parece estar mediado por fosforilación y es importante para el transporte de solutos como la sacarosa a través de sistemas de transporte específicos bajo condiciones de baja energía. Por tanto, en condiciones de baja energía, AKT2 estaría mediando la salida de K^+ del floema favoreciendo el transporte de sacarosa a través de los simportadores sacarosa/ H^+ (Deeken et al., 2002; Michard et al., 2005).

Grupo IV: al igual que en el caso anterior, este grupo cuenta con un solo representante, KC1. Este canal no presenta el dominio anquirina y no es capaz de formar homotetrámeros como sí forman otros miembros de la familia. Por tanto, KC1 desempeña su función a partir de la formación de heterotetrámeros con otros miembros de la familia pertenecientes a otros grupos. Los canales que forman son de entrada (Véry et al., 2014). Las subunidades de KC1 se expresan en las células de la raíz donde interactúan formando heterotetrámeros con AKT1, moderando su actividad y por tanto la adquisición de K^+ a partir de la solución del suelo (Honsbein et al., 2009; Reintanz et al., 2002; Y. Wang et al., 2010). Además, contribuye a la regulación de la apertura estomática a través de las células del pavimento. Allí permite una acumulación de K^+ y un turgor celular

adecuados para que las células del pavimento limiten el grado de apertura de los estomas y, en consecuencia, la pérdida de agua por transpiración (M. Nieves-Cordones et al., 2022).

Grupo V: los canales de este grupo están implicados en la salida de K^+ . Los miembros descritos en este grupo son SKOR y GORK y ambos presentan el dominio anquirina. SKOR se localiza en las células del periciclo y del xilema y está implicado en la carga de K^+ en el xilema (F Gaymard et al., 1998). GORK se expresa en las células de los pelos radicales de la raíz y se encarga de mediar la salida de K^+ hacia la solución externa. También se expresa en las células oclusivas de los estomas, mediando la salida de K^+ y jugando un papel importante en el cierre de los mismos (Hosy et al., 2003; Ivashikina et al., 2001).

Además de los sistemas descritos en la clasificación anterior, recientemente se ha identificado el primer canal de Na^+ activado por voltaje presente en un organismo eucariota fotosintético (Helliwell et al., 2020) . Este canal, que resulta selectivo por el Na^+ , está formado por dominios únicos que forman homotetrámeros y está presente en las algas haptofitas *Emiliania huxleyi* y *Scyphosphaera apsteinii*. Los canales de Na^+ activados por voltaje parecen estar implicados en la absorción rápida de Na^+ (Helliwell et al., 2020) . Aunque todavía no se han descrito estos sistemas en plantas terrestres, la existencia de plantas como Venus atrapamoscas (*Dionaea muscipula*), donde se ha descrito una excitabilidad eléctrica rápida, puede hacer pensar en este tipo de sistemas como implicados en la regulación de respuestas rápidas de Na^+ en plantas terrestres.

1.3.1.1.2 Canales activados por nucleótidos cíclicos

Durante mucho tiempo se ha propuesto la idea de que el transporte de K^+ que no tenía lugar a través de los canales y transportadores de K^+ conocidos, era mediado por canales no selectivos, en inglés “Non selective cation channels” (NSCC) (Demidchik & Maathuis, 2007) . También se ha propuesto este tipo de sistemas como vía de entrada de Na^+ en la planta. Por lo general, las familias de

canales no selectivos están poco estudiadas y los genes que codifican estos sistemas no están identificados. Aun así, se han propuesto miembros de algunas de estas familias como canales implicados en el transporte de K^+ y Na^+ . Una de las familias mejor caracterizadas (Kaplan et al., 2007) y que ha sido propuesta para los canales no selectivos, es la familia de los canales activados por nucleótidos cíclicos, en inglés “Cyclic nucleotide gated channels” (CNGCs). Los CNGCs están relacionados evolutivamente con los canales de K^+ activados por voltaje (Jegla et al., 2018), de ahí que tengan una estructura parecida. Al igual que los canales activados por voltaje, los CNGCs forman canales tetraméricos (homoméricos o heteroméricos). Todos ellos tienen un dominio de unión a nucleótidos cíclicos en su extremo C-terminal. Algunos miembros de la familia como CNGC10, CNGC3 o CNGC2, han mostrado permeabilidad al K^+ (Gobert et al., 2006; Leng et al., 1999; X. Li et al., 2005). Además de la permeabilidad por K^+ , CNGC10, localizado en la endodermis y la epidermis de la raíz, parece estar implicado en el transporte de Na^+ (Jin et al., 2015). La expresión de CNGC3 en levaduras también muestra la permeabilidad de CNGC3 al Na^+ (Gobert et al., 2006).

1.3.1.2 Transportadores de K^+ y Na^+

En el transporte de K^+ y Na^+ mediado por transportadores encontramos principalmente dos familias: transportadores HAK/KUP/KT y transportadores HKT.

1.3.1.2.1 Transportadores HAK/KUP/KT

Los miembros de esta familia muestran homología con los transportadores KUP de bacterias y con los transportadores HAK de los hongos. Los miembros de esta familia, cuyas siglas en inglés significan “High-Affinity K⁺/K⁺ Uptake / K⁺ Transporter”, están presentes en el genoma de todas las plantas, lo que indica que cumplen un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis de K^+ y la ratio Na^+/K^+ (Santa-María et al., 2018; Z. Wang et al., 2020).

Los transportadores de esta familia no discriminan entre K^+ , Rb^+ y Cs^+ y son inhibidos por NH_4^+ . Estas propiedades farmacológicas han convertido a estos iones en herramientas útiles para estudiar el papel de estos transportadores en el transporte de K^+ . Por ejemplo, el Rb^+ ha sido utilizado para estudiar el transporte de K^+ mediado por transportadores HAK y el NH_4^+ se ha utilizado como inhibidor específico de dicho transporte (Rubio et al., 2008). La permeabilidad que presentan estos transportadores a Cs^+ hace que constituyan la principal vía de entrada para este catión tóxico en plantas como el tomate o el arroz (M. Nieves-Cordones et al., 2017, 2020).

En las plantas, estos transportadores están formados por 10-15 dominios transmembrana (TM) (Véry et al., 2014). Filogenéticamente, pueden ser clasificados en 5 grupos (M. Nieves-Cordones, Ródenas, et al., 2016). El grupo 1 presenta 2 subgrupos y el grupo 2 presenta 3 subgrupos.

Grupo I: Este grupo se divide en Grupo Ia y Grupo Ib. Dentro del grupo Ia se encuentran transportadores presentes en dicotiledóneas y monocotiledóneas. Sin embargo, dentro del grupo Ib, solo aparecen transportadores pertenecientes a dicotiledóneas. En general, los transportadores del grupo I que han sido identificados y estudiados hasta la fecha actúan como simportadores K^+ - H^+ . La primera evidencia de este cotransporte se observó en *Neurospora crassa*, asociándose más tarde a NcHAK1. Posteriormente, también se confirmó este mecanismo en transportadores de plantas pertenecientes a este grupo (DmHAK5) (Rodríguez-Navarro, 2000; Scherzer et al., 2015). A este grupo pertenecen transportadores de alta afinidad de K^+ que han sido bien caracterizados. Dentro del grupo Ia encontramos ejemplos como HvHAK1, OsHAK1, SIHAK5 o AtHAK5 presentes en cebada, arroz, tomate y Arabidopsis, respectivamente. También encontramos otros miembros como OsHAK21 que está implicado en la distribución de K^+ en la parte aérea de plantas de arroz que crecen en condiciones de estrés salino (Shen et al., 2015). Dentro del grupo Ib encontramos sistemas como DmHAK5 que está implicado en el transporte de K^+ que conduce al cierre del órgano de captura de las plantas de *Dionaea muscipula* (Scherzer et al., 2015). También VvKUP1/VvHAK1 pertenece a este grupo mediando la entrada de K^+ en el fruto y por tanto regulando su tamaño (Davies et al., 2006).

Grupo II: Los sistemas de este grupo presentan diferencias respecto a sus propiedades. Algunos de sus miembros están implicados en el transporte de alta o baja afinidad de K^+ , mientras que otros participan en el transporte de hormonas o el desarrollo de la planta. Dentro de este grupo encontramos 3 subgrupos: IIa, IIb y IIc. AtKUP4/TRH1 pertenece al grupo IIa y está implicado en el transporte de auxinas (Rigas et al., 2001; Vicente-Agullo et al., 2004) . AtKUP1/KT1 pertenece al grupo IIb y actúa mediando el transporte de K^+ tanto de alta como de baja afinidad (Fu & Luan, 1998; E. J. Kim et al., 1998). AtKUP2, AtKUP6 y AtKUP8 son ejemplos de transportadores que pertenecen al subgrupo IIc, funcionan como sistemas de salida de K^+ de baja afinidad y están implicados en el metabolismo de la planta a través de la señalización por auxinas y ABA (Osakabe et al., 2013).

Grupo III: Los transportadores de este grupo se expresan en membranas de diferentes tejidos vegetales. Como ejemplos representativos encontramos AtKUP9 que está implicado en el crecimiento bajo condiciones de estrés por deficiencia de K^+ (Mei-Ling Zhang et al., 2020) y AtKUP7 que está implicado en el transporte de K^+ desde la solución del suelo y su distribución hacia la parte aérea (M. Han et al., 2016).

Grupo IV: Los transportadores pertenecientes a este grupo participan en el transporte de alta afinidad de Na^+ . Como transportadores bien caracterizados dentro de este grupo encontramos a ZmHAK4 y SlHAK20 de maíz y tomate, respectivamente. Ambos transportadores están implicados en el mantenimiento de la homeostasis K^+/Na^+ bajo condiciones de estrés salino mediante el transporte de Na^+ (Z. Wang et al., 2020; Ming Zhang et al., 2019). Otro ejemplo de transportador de alta afinidad de Na^+ perteneciente a este grupo es PpHAK13 de *Physcomitrella patens* (Benito et al., 2012).

Grupo V: En el último grupo encontramos sistemas como AtKUP5 de *A. thaliana* y PpHAK1 de *P. patens*. Estos sistemas han sido poco estudiados por el momento. Mientras que no está claro el papel que desempeña AtKUP5, se ha descrito que PpHAK1 está implicado en el transporte de K^+ en un amplio rango de concentraciones (Garcíadeblas et al., 2007) .

1.3.1.2.2 Transportadores HKT

Los miembros de esta familia provienen de la subunidad de un canal de K^+ ancestral que está relacionado con la familia Trk/Ktr presente en los hongos (Corratgé-Faillie et al., 2010). En plantas, estos transportadores se encuentran como monómeros (Corratgé-Faillie et al., 2010). Las proteínas HKT están formadas por cuatro repeticiones de tipo MPM, $M1_A-P_A-M2_A - M1_D-P_D-M2_D$ donde “M” corresponde con el segmento transmembrana y “P” corresponde con el dominio “loop”-poro. Todas las proteínas de la familia HKT tienen conservado un residuo de glicina en la tercera posición antes del final del dominio P. Esta glicina conservada recuerda a la del motivo GYG presente en los canales de K^+ que es imprescindible para conferir selectividad por este ion (Rodríguez-Navarro, 2000). Este residuo de glicina está conservado siempre en las posiciones P_B , P_C y P_D . Sin embargo, existe variabilidad entorno al residuo presente en la posición P_A . La variabilidad en esta posición determina la clasificación filogenética de estas proteínas y su mayor o menor afinidad por el Na^+ y la selectividad por K^+ (Ali et al., 2021; Mäser et al., 2002). Además, encontramos los motivos GNTXFP y SXYG conservados en las posiciones $M2_B$ y P_D respectivamente (Rodríguez-Navarro, 2000).

Los transportadores HKT de plantas presentan una alta diversidad de sustratos en función de su selectividad iónica. En función de ésta, los miembros de la familia HKT se pueden clasificar en 3 tipos: transportadores selectivos de K^+ , transportadores selectivos de Na^+ y simportadores Na^+-K^+ . Filogenéticamente, los transportadores HKT se clasifican en dos subfamilias: subfamilia 1 y subfamilia 2 (Platten et al., 2006).

Subfamilia 1: Los transportadores de esta subfamilia se han identificado en la mayoría de las plantas angiospermas (Platten et al., 2006). En la posición P_A tienen una serina (S) altamente conservada, de ahí que también puedan ser referidos como transportadores tipo SGGG (Hauser & Horie, 2010; Mäser et al., 2002). La presencia de la serina proporciona selectividad al Na^+ , por tanto, los transportadores de esta subfamilia están implicados en el transporte de Na^+ . Como ejemplos bien caracterizados encontramos AtHKT1, OsHKT1, OsHKT1.3, OsHKT1.5 y OsHKT1.4.

Subfamilia 2: Los miembros de esta subfamilia solo aparecen en plantas monocotiledóneas (Platten et al., 2006). La estructura que determina la selectividad iónica presenta una glicina (G) en la posición P_A, por tanto, también se pueden clasificar como transportadores tipo GGGG (Hauser & Horie, 2010; Mäser et al., 2002). Aunque la presencia de la glicina en la posición P_A confiere selectividad por el K⁺, los transportadores de esta subfamilia pueden operar como simportadores Na⁺ /K⁺ (Horie et al., 2001; Platten et al., 2006). Como ejemplo representativo tenemos OsHKT2.1 que participa en la entrada de Na⁺ ante condiciones de ayuno de K⁺ (Horie et al., 2007). Conviene destacar que, aunque la presencia de G en la posición P_A facilita la entrada de K⁺, se ha podido demostrar que el transporte de Na⁺ sigue siendo posible a través de estos transportadores. Además, el transporte de K⁺ a través de algunos transportadores que presentan S en la posición P_A (EchKT1;2, McHKT1.1 o EpHKT1;2) estaría indicando que en la permeabilidad al K⁺ deben de estar implicados otros residuos además de los mencionados.

1.3.2 Mecanismos de regulación de los sistemas de transporte de K⁺ y Na⁺

Durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, la solución del suelo donde se encuentran sufre cambios continuos, como, por ejemplo, el aumento o disminución de la disponibilidad de K⁺. Para adaptarse a esta situación fluctuante, las plantas cuentan con mecanismos físicos de adaptación como el crecimiento de la raíz o el desarrollo de raíces secundarias o pelos radicales. Además de estos cambios físicos, la planta también presenta cambios moleculares para adaptarse a estas condiciones cambiantes. Por ello, la actividad de los sistemas implicados en el transporte de K⁺ está sometida a diferentes tipos de regulación: Regulación transcripcional y regulación postraducciona

1.3.2.1 Regulación transcripcional

El resultado de esta regulación es la inducción o la represión de los genes en función del estímulo ambiental al que se encuentre sometida la planta. Por ejemplo, cuando las plantas de *Arabidopsis* son ayunadas de K^+ , se observa en las células de la raíz una fuerte inducción de la expresión del gen que codifica el transportador de K^+ de alta afinidad AtHAK5 (Gierth et al., 2005). El incremento de la expresión génica va precedido de unas señales que registran la deficiencia de K^+ y que resultan en la inducción del gen. En primer lugar, se observa una hiperpolarización de la membrana (Rubio et al., 2014), y, posteriormente, un incremento en las ROS y en la concentración de etileno, que resulta en el incremento de la expresión de AtHAK5 (Jung et al., 2009). Otras hormonas como el ácido jasmónico (JA), las citoquininas o las giberelinas pueden tener un papel relevante en la regulación de la expresión de los genes que codifican los transportadores de K^+ . Por otro lado, cuando las plantas son suplementadas con K^+ , se observa la disminución de la expresión del gen que codifica AtKUP12 en las hojas de *Arabidopsis* (Armengaud et al., 2004). Hay que destacar que son pocos los genes que codifican sistemas de transporte o canales de K^+ que están sometidos a regulación transcripcional en respuesta al suministro de K^+ (Gierth et al., 2005).

1.3.2.2 Regulación postraducciona

La regulación postraducciona tiene lugar una vez que las proteínas han sido sintetizadas por los ribosomas. Con respecto a los sistemas implicados en el transporte de K^+ , la regulación postraducciona tiene lugar mediante dos mecanismos, mediante la oligomerización de las proteínas y mediante su estado de fosforilación.

Regulación mediante oligomerización: muchos de los sistemas implicados en el transporte de K^+ y Na^+ funcionan como multímeros. Estos sistemas aparecen como homo o heteromultímeros y cada uno de los monómeros que los forman participa en la formación del poro selectivo para K^+ o para Na^+ . Un ejemplo representativo es el caso de AKT1, que forma un

homotetramero pero cuya actividad está además regulada mediante la interacción con KC1, una subunidad adicional cuya función es modificar las propiedades y estado de activación de AKT1 (Duby et al., 2008). La regulación a nivel de oligomerización de los sistemas implicados en el transporte de Na^+ no se ha descrito hasta el momento, y son necesarios más estudios para confirmar su existencia y en su caso, comprender los mecanismos implicados.

Regulación mediante fosforilación: En el apartado sobre regulación transcripcional se ha descrito como las señales producidas por ROS o por hormonas suponen un paso previo para la inducción de la expresión de los genes. En el caso de la regulación postraduccional, son las señales de Ca^{2+} , actuando como segundo mensajero, las que juegan un papel clave en la regulación de la actividad de las proteínas implicadas en el transporte de K^+ (Saito & Uozumi, 2020). Ante un estímulo externo, se produce un aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} y, la duración, la magnitud y la oscilación de este aumento constituyen en una señal específica que conduce a la respuesta de la planta. Por ejemplo, cuando la planta se expone a bajas concentraciones de K^+ , se producen dos señales de Ca^{2+} sucesivas y diferentes en el citosol (Behera et al., 2017). Estas señales de Ca^{2+} son percibidas por proteínas capaces de unir Ca^{2+} (proteínas sensoras y efectoras de Ca^{2+}). Entre las proteínas capaces de detectar las señales de Ca^{2+} se encuentran calmodulinas (CaMs), proteínas similares a calmodulina, en inglés *Calmodulin-like proteins* (CMLs), proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} , en inglés *Ca²⁺-dependent protein kinases* (CDPKs) y proteínas del tipo calcineurina B, en inglés *Calcineurin B-like proteins* (CBLs). Las CBLs actúan en coordinación con proteínas quinasas que interactúan con CBLs, en inglés *CBL-interacting protein kinases* (CIPKs) (Saito & Uozumi, 2020).

En la regulación de los sistemas de transporte de K^+ , las proteínas CBL, en combinación con quinasas de la familia CIPK, juegan un papel fundamental (Saito & Uozumi, 2020). Para la formación del complejo CIPK-CBL es necesario que, tras la señal de Ca^{2+} producida como consecuencia de la baja disponibilidad de K^+ , las proteínas CBL, que se localizan en la membrana plasmática de la célula, unan el Ca^{2+} a través de los dominios manos-EF. La unión del Ca^{2+} a

estas proteínas tiene como consecuencia el reclutamiento de las proteínas CIPK a la membrana plasmática, donde desempeñan su papel, modulando la actividad los sistemas implicados en el transporte de K^+ . Así pues, como ejemplos de esta regulación, encontramos la activación del canal AKT1 mediante su fosforilación por AtCIPK23/AtCBL1 (Xu et al., 2006). AtCIPK23 también es capaz de fosforilar y activar el transportador AtHAK5 mediante la interacción con AtCBL1, AtCBL8, AtCBL9, y AtCBL10 (Ragel et al., 2015; Ródenas et al., 2021). Además, en la regulación de AtHAK5 también están implicadas quinasas de la familia CIPK (Lara et al., 2020).

También se ha descrito la participación de los complejos CIPK-CBL en la regulación de procesos relacionados con la respuesta al estrés salino (Qiu et al., 2002). Esta ruta de regulación ha sido bien caracterizada y se denomina en inglés *Salt Overly Sensitive pathway* (SOS). Bajo una situación de estrés salino, el complejo AtCIPK24-AtCBL4 (SOS2-SOS3) es capaz de regular al antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática SOS1, permitiendo la salida de Na^+ hacia la solución del suelo. Además, AtCBL10 puede interactuar con AtCIPK24, promoviendo el almacenamiento de Na^+ en la vacuola a través de la activación de un sistema de transporte de Na^+ todavía desconocido (B. G. Kim et al., 2007).

1.4 Uso de sensores para la detección de iones en plantas

Los procesos de adaptación a diferentes tipos de estrés, así como los procesos de desarrollo de las plantas, están sometidos a la regulación mediante señales de Ca^{2+} que, además de cumplir una función estructural, actúa como segundo mensajero (Kudla et al., 2010). Así, el estudio de las señales de Ca^{2+} citosólica reviste especial interés. En los últimos años se han desarrollado multitud de sensores codificados genéticamente que permiten medir los cambios en las concentraciones de Ca^{2+} , en respuesta a diferentes estímulos que tienen lugar en los diferentes orgánulos de las células vegetales (Grenzi et al., 2021).

En las plantas, entre las primeras herramientas que se desarrollaron para estudiar la dinámica del Ca^{2+} *in vivo* se encuentra la aequorina. Ésta es una proteína bioluminiscente de 22 kDa que fue descubierta y aislada a partir de la

medusa *Aequorea victoria* en 1962 (Shimomura et al., 1962). La aequorina tiene 3 sitios de unión a Ca^{2+} y, cuando el Ca^{2+} se une a la aequorina, la proteína experimenta un cambio conformacional que la convierte en una luciferasa que cataliza la reacción de luminiscencia de la coelenteracina. Cuando tiene lugar esta reacción enzimática se produce una emisión de luz azul (465 nm) que permite medir cambios en la concentración de Ca^{2+} ya que, cuando mayor es la concentración de Ca^{2+} , un mayor número de moléculas de aequorina experimenta el cambio conformacional que permite catalizar la reacción de oxidación de la coelenteracina a coelenteramida dando lugar a mayor emisión de luz. El uso de estas proteínas supuso una revolución en la obtención de imágenes de señales de Ca^{2+} citosólico cuando se expresó la aequorina en plantas de *Nicotiana plumbaginifolia* y fue posible medir cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Knight et al., 1991). La aequorina fue el primer sensor de Ca^{2+} en formar parte de lo que se denomina indicadores de Ca^{2+} codificados genéticamente, en inglés, **Genetically Encoded Calcium Indicators** (GECIs)

Debido a que la aequorina presentaba problemas como la necesidad de proporcionar coelenteracina o falta de linealidad en la tasa de emisión de la señal, se desarrollaron los tintes de Ca^{2+} (Tsien, 1980). Estos sensores químicos consisten en cromóforos fluorescentes unidos a quelantes selectivos de Ca^{2+} . Algunos ejemplos de estos tintes son Fura-2 dextrano o calcium green dextrano y con ellos se realizaron los primeros estudios *in vivo* de las dinámicas de Ca^{2+} en células vegetales (Gilroy et al., 1991; Mcainsh et al., 1990).

Aunque los tintes de Ca^{2+} habían supuesto un gran avance para la realización de estudios *in vivo*, presentaban una serie de limitaciones relacionadas con su secuestro en compartimentos celulares como la vacuola o con la necesidad de inyectarlos manualmente en las células vegetales. Por tanto, para superar las limitaciones encontradas en las dos herramientas descritas anteriormente, comenzaron a desarrollarse una nueva generación de sensores (GECIs), basados en explotar las propiedades de proteínas fluorescentes como GFP y la capacidad de la Calmodulina para unir Ca^{2+} (Miyawake et al 1997). Poco después de su desarrollo, estos sensores fueron expresados exitosamente

en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Allen et al., 1999). Estos sensores son denominados sensores ratiométricos.

Los sensores ratiométricos consisten en fusiones en tándem de un mutante de la proteína verde fluorescente GFP que emite en azul cian (CFP), calmodulina, el péptido M13 y una GFP que emite verde, o YFP que emite amarillo, mejoradas (Figura 5). La unión de Ca^{2+} hace que la calmodulina envuelva el dominio M13 aumentando la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre las dos proteínas fluorescentes (Miyawaki et al., 1997). Como se ha mencionado anteriormente, este tipo de sensores se expresó exitosamente en plantas. Conforme se iban realizando experimentos se fueron generando versiones mejoradas de estos sensores. La primera versión desarrollada fue YC2.1 (Miyawaki et al., 1997) y poco después se desarrollaría YC3.6, mediante la introducción de mutaciones específicas en la proteína fluorescente (Nagai et al., 2004). YC3.6 se expresó con éxito en el citosol y el núcleo de plantas de *Arabidopsis* para demostrar la regulación por ABA de los canales permeables a Ca^{2+} de las células oclusivas (Mori et al., 2006). YC3.6 se expresa en el núcleo y en el citosol, sin embargo, a lo largo del tiempo, y ante la necesidad de estudiar las señales de Ca^{2+} producidas en otros compartimentos celulares, los sensores se han ido modificando mediante la adición de etiquetas que permiten su localización específica en distintos orgánulos y estructuras de las células vegetales como las mitocondrias (4mt-YC3.6), los cloroplastos (2Bam4-YC3.6), el núcleo (NUP-YC3.6) o la membrana plasmática PM-YC3.6-LTI6b (Costa et al., 2017; Krebs et al., 2012; Loro et al., 2012, 2016).

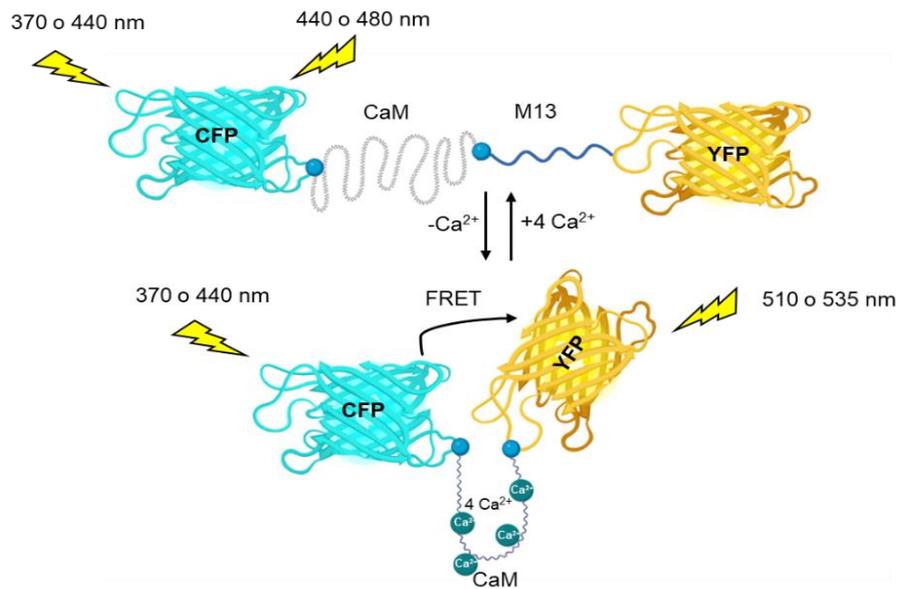


Figura 5: Representación de la estructura de un sensor ratiométrico tipo "Cameleon": En el esquema se muestra cómo se pueden medir los cambios en la concentración de Ca^{2+} gracias al FRET entre las proteínas fluorescentes. Cuando el Ca^{2+} se une a la estructura formada por CFP, calmodulina, péptido M13 e YFP, se produce un cambio conformacional produciendo cambios en las propiedades de emisión de CFP e YFP. Figura modificada de Miyawaki, 1997.

Las ventajas que presentan este tipo de sensores a la hora de medir los cambios en la concentración de Ca^{2+} radican en su fiabilidad, la reducción de artefactos, la fuerte independencia de los niveles de expresión y la utilidad en la comparación de fondos genéticos (Grenzi et al., 2021).

Todo esto ha dado lugar al desarrollo de sensores ratiométricos diseñados para medir otros iones como el K^+ , en inglés **Genetically Encoded Potassium Ion Indicators** (GEPiIs) (Bischof et al., 2017). La reciente caracterización de una proteína bacteriana (Kbp) que consta de un dominio BON (bacterial OsmY and nodulation) capaz de unir K^+ , y un segundo motivo de lisina (LysM) que interacciona con el primero en presencia de K^+ , ha permitido el diseño de una sonda de K^+ basada en FRET (Bischof et al., 2017). En el caso de los GEPiIs, las proteínas fluorescentes optimizadas (mseCFP y cpVenus) están fusionadas a través del dominio BON de unión a K^+ y el motivo LysM (Figura 6). La unión de K^+ hace que el dominio BON interactúe con LysM, provocando un aumento de la transferencia de energía por resonancia (FRET) al igual que ocurría en los sensores de Ca^{2+} .

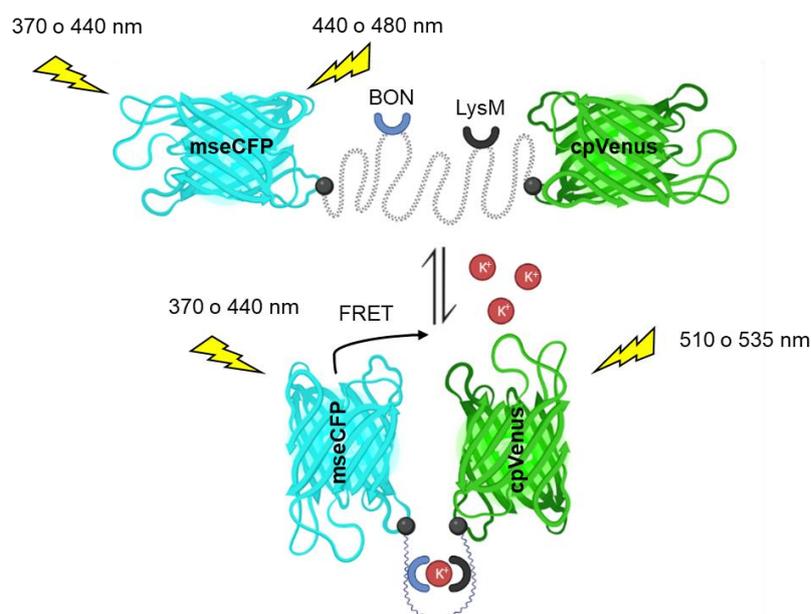


Figura 6: Representación esquemática del mecanismo de detección de K^+ por los GEPiIs basados en FRET. Cuando aumenta la concentración de K^+ en el medio, éste se une al dominio BON provocando la interacción con el dominio LysM. El cambio estructural provocado tras la unión del K^+ permite medir los cambios gracias al FRET entre las proteínas fluorescentes. Figura modificada de Bischof, 2017.

El desarrollo de los sensores de K^+ y su expresión en plantas (Wang et al 2021) abre un gran abanico de posibilidades a la hora de estudiar los cambios de concentración de K^+ en los diferentes tejidos de la planta ante diferentes

estímulos. También estos sensores van a ser útiles para estudiar el papel del K^+ en procesos de señalización.

1.5 Implicación del K^+ como segundo mensajero en tareas de señalización.

Recientemente se ha propuesto un modelo en el que la salida de K^+ en condiciones de estrés podría ser importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones hostiles. Este nuevo modelo concede al K^+ un papel de señalizador junto con las ya bien estudiadas señales de Ca^{2+} y ROS (Shabala, 2017) .

Estudios previos han demostrado que mantener altas concentraciones de K^+ citosólico protege a la planta frente a diferentes tipos de estrés como el estrés salino, el estrés inducido por metales pesados, el estrés provocado por hipoxia y el estrés oxidativo (Demidchik et al., 2010; M. Han et al., 2016; Murphy & Taiz, 1997; Shabala & Pottosin, 2014). Sin embargo, a pesar de ello, las plantas presentan canales de salida de K^+ como GORK que además de en las células oclusivas de los estomas, se expresa en la raíz. Curiosamente, la expresión de GORK se incrementa ante el estrés salino (Adem et al., 2014). Según el modelo propuesto, la salida de K^+ , provocaría un cambio metabólico con el objetivo de parar las reacciones anabólicas para ahorrar energía y poder responder al estrés. La respuesta al estrés estaría compuesta por 3 fases: homeostasis, aplicación de estrés y fase de recuperación (Shabala, 2017).

Homeostasis: En esta fase la concentración de K^+ permanece constante en la raíz.

Aplicación de estrés: Una vez aplicado el estrés, se induce la salida masiva de K^+ a través del canal GORK. Esta salida de K^+ contribuiría a la estabilización del potencial de membrana y provocaría el cambio del estado de la célula para destinar la mayor parte de la energía a las reacciones de defensa frente al estrés.

Fase de recuperación: La activación de la ATPasa de H^+ debida al estrés permite la recuperación del K^+ perdido para alcanzar de nuevo niveles óptimos

en la concentración de K^+ y evitar así comprometer el transporte a larga distancia del mismo.

Además de los estreses abióticos mencionados anteriormente, las plantas se enfrentan también al estrés biótico provocado por el ataque de patógenos. El estrés inducido por patógenos provoca la liberación de patrones moleculares asociados al daño, en inglés “*damage-associated molecular patterns*” (DAMPs). Muchos DAMPs son moléculas que, en un estado fisiológico normal, están presentes en el citosol de la célula y cumplen funciones metabólicas (Rubartelli & Lotze, 2007; Tanaka et al., 2014). El ATP, que normalmente sirve como fuente de energía de los procesos metabólicos, se convierte en señal DAMP después de liberarse al medio externo como consecuencia de un daño celular provocado por patógenos o daño mecánico. El papel del ATP extracelular como señal en las plantas se describió por primera vez en 1970 (Burnstock, 1972; Jaffe, 1973). Muchos estudios han asociado la presencia de ATP extracelular con la generación de segundos mensajeros como Ca^{2+} , ROS y NO (Tripathi et al., 2018). Durante esta Tesis Doctoral se hicieron experimentos para estudiar cómo el ATP podía estar implicado también en la generación de una señal de K^+ que estaría actuando, en este caso, como segundo mensajero.

1.6 Plantas modelo y de interés agronómico

Los organismos modelo son especies que cumplen una serie de características que los hacen ideales para ser estudiados. Para que un organismo sea considerado como modelo, debe de ser fácil de mantener, es decir que no suponga grandes costes económicos. El organismo modelo debe tener un ciclo biológico corto, debe de ser capaz de producir un alto número de descendientes y contar con un genoma sencillo (Bolker, 1995). Gracias a estas características, los organismos modelo son utilizados por muchos equipos de investigación por lo que se desarrollan muchas herramientas que permiten mejorar su estudio.

Las plantas de interés agronómico son aquellas que son extensamente cultivadas ya que reportan beneficios nutricionales para la población. Estos beneficios nutricionales llevan a destinar millones de hectáreas a su cultivo

reportando también importantes beneficios económicos. Algunas plantas de interés agronómico cumplen las características necesarias para considerarse también organismos modelo.

1.6.1 *Arabidopsis thaliana* L. como planta modelo

Arabidopsis thaliana (Figura 7) es una pequeña planta que crece en forma de roseta y pertenece a la familia de las brassicáceas. Esta planta cumple con las características de organismo modelo mencionadas anteriormente. Fue descrita por primera vez por el médico Johannes Thal en las montañas Harz del norte de Alemania en 1577. Apareció publicada por Linneo en 1753 y recibió su nombre actual, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh de Gustavo Heynh en 1842 (Krämer, 2015). Friederich Laibach fue el primero en fomentar el uso científico de *Arabidopsis* en la década de 1940, aunque fue a partir de la década de 1980 cuando se popularizó definitivamente debido a que los investigadores consiguieron combinar la selección genética con métodos de biología molecular. En el año 2000, se publicó la secuencia del genoma de *Arabidopsis* (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Este hecho ayudó a desarrollar bases de datos para trabajar con ella como The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) (Berardini et al., 2015).

Por tanto, el cumplimiento de las características de organismo modelo, el desarrollo de técnicas eficientes para su transformación (Meyerowitz, 2003) y de numerosas herramientas bioinformáticas y biotecnológicas, ha hecho que sea la planta modelo más utilizada en la actualidad.



Figura 7: Planta de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0

1.6.2 *Solanum lycopersicum* L. como planta de interés agronómico

El tomate, *Solanum lycopersicum* (Figura 8), es una planta dicotiledónea y herbácea perteneciente a la familia de las solanáceas y concretamente al género *Solanum* (Peralta et al., 2005). Sus orígenes se sitúan en la región andina que hoy comparten Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile. En esta región crece de manera silvestre el antepasado más probable del tomate comercial, el tomate pequeño silvestre (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*).

El cultivo de tomate representa una gran importancia económica ya que se usa tanto directamente en la alimentación, mediante la elaboración de ensaladas, como para obtener numerosos subproductos como zumos, concentrados de tomate, salsas y mermeladas. Por estas razones es el primer cultivo en importancia en cuanto a superficie y producción en España (Según la FAO, en 2021 se cultivaron 4.754.380 toneladas). Además, España es el octavo país productor de tomate del mundo.

Además de ser una especie de interés agronómico, el tomate también cumple las características para ser un buen organismo modelo. En esta Tesis Doctoral los experimentos se han realizado con *Solanum lycopersicum* L. cv

Microtom. Aunque la variedad Microtom fue propuesta al principio como planta ornamental, su escasa talla, el crecimiento rápido, la fácil transformación genética y la alta producción de frutos llevó a esta planta a ser propuesta como modelo experimental para el estudio de la regulación y el desarrollo de la planta y del fruto de tomate (Marti et al., 2006).

El genoma de tomate completamente secuenciado se publicó en 2012. En su secuenciación participaron 14 países (Tomato Genome Consortium et al., 2012). El genoma de tomate tiene 31.760 genes distribuidos en 12 cromosomas. Una vez disponible el genoma de tomate, se han desarrollado diferentes bases de datos como Sol Genomics Network (SGN) (Fernandez-Pozo et al., 2015) o TomExpress (Zouine et al., 2017) que facilitan el trabajo de los investigadores al proporcionar herramientas para trabajar e información sobre la secuencia, función y expresión de los genes anotados en las diferentes versiones del genoma de tomate.



Figura 8 : Planta de *Solanum lycopersicum* var. Micro-Tom

II. OBJETIVOS

El K^+ es un nutriente esencial para las plantas siendo un elemento indispensable para el crecimiento y el desarrollo de las mismas. Por ello, la correcta nutrición de K^+ es imprescindible para asegurar la calidad y producción de los cultivos. El Na^+ también puede tener un papel importante en la planta y, en determinadas ocasiones, ser beneficioso para la misma.

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral es profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la entrada de K^+ en la raíz de la planta, en la translocación a la parte aérea y en la regulación de estos procesos. A este primer objetivo se suman el estudio de la mediación de las proteínas reguladoras en la adquisición de otros elementos como el Na^+ , y el uso de sensores biológicos para medir la concentración de K^+ en diferentes tejidos.

Los objetivos específicos que se han planteado en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Estudio del papel de SIHAK5, LKT1 y SICIPK23 en la entrada y translocación de K^+ en la planta de tomate.
2. Caracterización de la función de SICIPK23 en la regulación de los mecanismos de entrada de Na^+ en la raíz.
3. Estudio de la regulación de SISKOR por SICIPK23.
4. Expresión en plantas de sensores de iones codificados genéticamente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Material biológico

3.1.1.1 Bacterias

3.1.1.1.1 *Escherichia coli*

El uso de *Escherichia coli* ha sido fundamental para el almacenamiento y propagación de las construcciones de ADN plasmídico utilizadas durante el desarrollo de la tesis doctoral. En concreto, se ha utilizado la cepa Top10 para ambos fines (Tabla 2).

3.1.1.1.2 *Agrobacterium rhizogenes*

La cepa ATCC 15834 de *Agrobacterium rhizogenes* (Tabla 2), se utilizó para generar raíces transgénicas de tomate.

3.1.1.1.3 *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* (Tabla 2), ha sido utilizada para la generación de plantas transgénicas, permitiendo la expresión permanente de genes (GEPI1.0 y Clúster CRISPR) en *Solanum lycopersicum* o la expresión transitoria en plantas de *Nicotiana benthamiana* (SPYNE y SPYCE).

Tabla 2: Cepas de bacterias utilizadas

Cepa	Genotipo	Referencia
Top 10	$\Delta(araA-leu)7697$, $[araD139]B/r$, $\Delta(codB-lacI)3$, $\phi 80dlacZ58(M15)$, $galK0$, $mcrA0$, $galU-$, $recA1$, $endA1$, $nupG-$, $rpsL-(strR)$, $\Delta(mcrC-mrr)715$	(Edwards et al., 2011)
ATCC 15834	Sin publicar	(Ron et al., 2014)
GV3101	Rif ^R pMP90 (pTiC58CT-DNA)	(Koncz & Schell, 1986)

3.1.1.2 Levaduras

3.1.1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

En el caso de levaduras, la cepa 9.3 de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (Tabla 3), que carece de los sistemas TRK1 y TRK2 de entrada de K⁺ y de los sistemas de salida de Na⁺ ENA1-ENA4 (Bañuelos et al., 1995), ha sido utilizada para la realización de ensayos de complementación con el objetivo de estudiar la función y regulación de los sistemas implicados en el transporte de nutrientes como K⁺ y elementos beneficiosos como el Na⁺.

Tabla 3: Cepa de levadura utilizada.

Cepa	Genotipo	Referencia
9.3	$MAT\alpha$, $ena1D:HIS3::ena4D$, $leu2,ura3-1$, $trp1-1$, $ade2-1$, $trk1D$, $trk2::pCK64$	(Bañuelos et al., 1995)

3.1.1.3 Plantas

3.1.1.3.1 *Arabidopsis thaliana*

Se han utilizado plantas de *Arabidopsis* de la variedad Columbia (Col-0) para la realización de los experimentos. Éstos se han llevado a cabo con plantas con genotipo silvestre (WT) y con plantas mutantes homocigóticas del gen que codifica para la proteína quinasa AtCIPK23 (Tabla 4). También se han utilizado plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan el sensor de K⁺ GEPI1.0 y el sensor de Ca²⁺ R-GECO.

Tabla 4: Líneas de *Arabidopsis* utilizadas.

Línea	Origen
Silvestre	Arabidopsis Biological Resource Center
<i>atcipk23</i>	Este laboratorio (M. Nieves-Cordones et al., 2012)
<i>GEPI1.0</i>	Cedida por Zaida Andrés del laboratorio de Karin Schumacher, Heidelberg (Alemania)
<i>GEPI1.0 x R-GECO</i>	Desarrollada durante la tesis en el laboratorio de Alex Costa

3.1.1.3.2 *Solanum lycopersicum*

Para los experimentos realizados durante esta tesis se han utilizado plantas de *Solanum lycopersicum* de la variedad Micro-Tom (Tabla 5). Los ensayos se han llevado a cabo con plantas de genotipo WT, plantas mutantes homocigóticas para los genes que codifican las proteínas LKT1 Y SIHAK5, implicadas en el transporte de K⁺ y plantas mutantes homocigóticas para el gen que codifica la proteína quinasa SICIPK23, implicada en la regulación del transporte de K⁺. También se han utilizado plantas transgénicas de tomate que expresan el sensor de K⁺ GEPI1.0.

Tabla 5: Líneas de tomate (var. Micro-Tom) utilizadas.

Línea	Origen
Silvestre	Micro-Tom WT
<i>lkt1</i>	Desarrollada durante la tesis
<i>slhak5</i>	Material del grupo de investigación
<i>slcipk23</i>	Desarrollada durante la tesis
GEPI1.0	Desarrollada durante la tesis

3.1.1.3.3 *Nicotiana benthamiana*

Se han utilizado plantas de *Nicotiana benthamiana* silvestre (Tabla 6) para la realización de los experimentos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC). Para ello, sus hojas fueron infiltradas con *A. tumefaciens*.

Tabla 6: Línea utilizada de *N. benthamiana*.

Línea	Origen
Silvestre	Material del grupo de investigación

3.1.1.4 Ovocitos de *Xenopus laevis*

Se han utilizado ovocitos procedentes de la rana de uñas africana *Xenopus laevis* como sistema de expresión heteróloga en la realización de experimentos de fijación de voltaje con dos electrodos. (Figura 9)

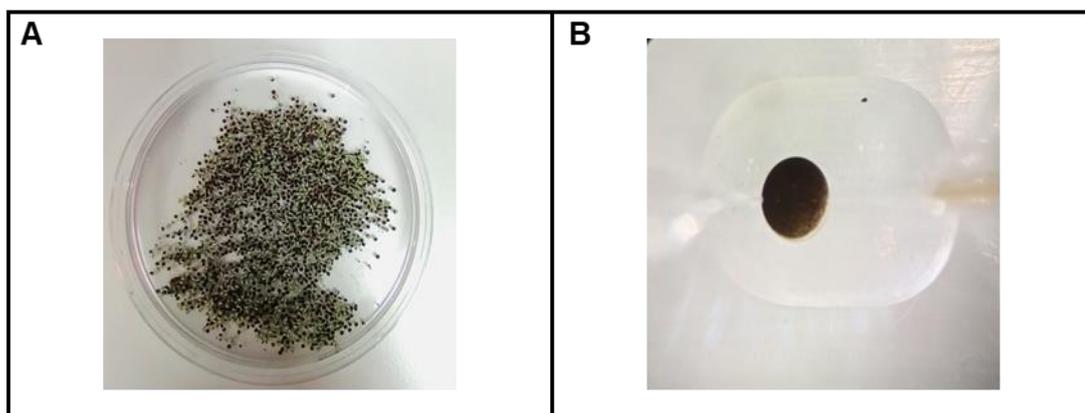


Figura 9: Ovocitos de *Xenopus laevis* utilizados para los experimentos de fijación de voltaje. (A) Selección de ovocitos obtenidos de la rana. (B) Ovocito en la cubeta de perfusión traspasado por los electrodos y preparado para iniciar la fijación de voltaje.

3.1.2 Medios y condiciones de cultivo

Los medios destinados al cultivo de bacterias y levaduras han sido esterilizados mediante el uso de autoclave. Las condiciones para la esterilización fueron de 1 atmósfera de sobrepresión y 120 °C durante 20 minutos.

Los medios destinados al cultivo de plantas no se esterilizaron. El medio de cultivo utilizado para el cultivo de las raíces generadas mediante *A. rhizogenes* sí fue esterilizado.

3.1.2.1 Medios y condiciones de cultivo para bacterias

La cepa de *E. coli* ha sido cultivada en el medio Luria-Broth (LB) (Tabla 7). En cada caso, y dependiendo de la resistencia que le confiriera el plásmido a amplificar, el medio se ha suplementado con antibióticos (ampicilina (50 mg/L); kanamicina (50 mg/L); spectinomicina (50 mg/L)) con el objetivo de elaborar un medio selectivo.

Las condiciones de cultivo fueron de 37 °C y agitación en el caso de tratarse de cultivo en medio líquido.

Para el cultivo de *A. tumefaciens* también se utilizó el medio LB, suplementado siempre con los antibióticos rifampicina (50 mg/L) y tetraciclina (10 mg/L) y con kanamicina (50 mg/L) o spectinomicina (50 mg/L) según la resistencia aportada por el plásmido con el que se había transformado en cada caso.

Las condiciones de cultivo fueron de 28 °C y agitación en el caso de tratarse de cultivo en medio líquido.

Tabla 7: Composición del medio LB.

Compuesto	Concentración
Triptona	1 % (p/v)
Extracto de levadura	0,5 % (p/v)
NaCl	0,5 % (p/v)
Agar Bacteriológico*	1,5 % (p/v)

* Se añade solo en caso de medio sólido

El crecimiento de *A. rhizogenes* se ha llevado a cabo en medio “Nutrient Agar” (NA) (Tabla 8). El medio se suplementó con el antibiótico requerido en cada caso.

Las condiciones de cultivo fueron de 28°C y agitación en el caso de tratarse de cultivo en medio líquido.

Tabla 8: Composición del medio NA.

Compuesto	Concentración
Triptona	0,3 % (p/v)
Peptona	0,5 % (p/v)
Agar Bacteriológico*	1,5 % (p/v)

* Se añade solo en caso de medio sólido.

Las cepas generadas en el laboratorio fueron conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para ello, se usaron $800\text{ }\mu\text{L}$ del cultivo en el que se encontraban creciendo en el momento de la toma de la muestra a los que se añadieron $200\text{ }\mu\text{L}$ de glicerina estéril.

3.1.2.2 Medios y condiciones de cultivo para levaduras

Para el manejo de levaduras se han utilizado tres medios diferentes. El medio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) (Tabla 9) (Ausubel et al., 2003) se empleó para el crecimiento y propagación de *S. cerevisiae*.

Tabla 9: Composición del medio YPD.

Compuesto	Concentración
Extracto de levadura	1 % (p/v)
Peptona	2 % (p/v)
Glucosa	2 % (p/v)
Agar Bacteriológico*	1,5 (p/v)

* Se añade solo en caso de medio sólido.

Para la selección de las levaduras transformadas se utilizó el medio SD (*Sherman Dextrose*) (Tabla 10). Para esta selección, se excluyó del medio el requerimiento que debía ser sintetizado a partir del gen marcador del plásmido introducido en la levadura.

Tabla 10: Composición del medio SD.

Compuesto	Concentración
YNB	0,67 % (p/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 % (p/v)
Glucosa	2 % (p/v)
Histidina**	2 % (p/v)
Adenina**	2 % (p/v)
Uracilo**	2 % (p/v)
Leucina**	2 % (p/v)
Triptófano**	2 % (p/v)
Agar Bacteriológico*	2 % (p/v)

* Se añade solo en caso de medio sólido.

** Se adicionaba según requerimiento de la levadura

El pH del medio se ajustó a 6,5 con NaOH.

Para la realización de los experimentos de complementación en levaduras en condiciones de bajo K⁺ se eligió el medio PA (*Fosfato de Arginina*) (Rodríguez-Navarro & Ramos, 1984). Composición en Tablas 11, 12 y 13.

Tabla 11: Composición del medio PA.

Compuesto	Concentración
H ₃ PO ₄	8 mM
L-Arginina	10 mM
MgSO ₄	2 mM
CaCl ₂	0,2 mM
KCl	Variable según experimento
Glucosa	20 % (p/v)
Oligoelementos (1000X)	1 X
Vitaminas (100X)	1 X
Agar Bacteriológico*	1,5 % (p/v)

* Se añade solo en caso de medio sólido.

Tabla 12: Composición del stock de oligoelementos 1000X.

Compuesto	Concentración
H ₃ BO ₃	500 mg/mL
CuSO ₄	40mg/mL
KI	100 mg/mL
MnSO ₄ H ₂ O	400 mg/mL
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	200 mg/mL
ZnSO ₄ 7H ₂ O	400 mg/mL
FeSO ₄	500 mg/mL

Tabla 13: Composición del stock de vitaminas 100X.

Compuesto	Concentración
Tiamina (Vit.B1)	40 mg/L
Ácido nicotínico (Vit.B3)	40 mg/L
Ácido pantoténico (Vit.B5)	40 mg/L
Piridoxina (Vit.B6)	40 mg/L
Biotina (Vit.B7)	20 mg/L

3.1.2.3 Medios de cultivo para plantas

3.1.2.3.1 Medio para cultivo hidropónico

Para el cultivo de las plantas en sistema hidropónico se ha utilizado una solución nutritiva que se corresponde con una modificación de la solución Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) . Su composición se detalla en la Tabla 14. El pH de la solución se ajustó a 5,5 adicionando $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Tabla 14: Composición de la solución nutritiva de 1/5 Hoagland modificada.

	Compuesto	Concentración
Macronutrientes	Ca(NO ₃) ₂ 2H ₂ O	1,4 mM
	MgSO ₄ 2H ₂ O	0,35 mM
	KCl	Según experimento
	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ H ₂ O	1 mM
Micronutrientes	Fe-EDDHA	10 µM
	H ₃ BO ₃	12,5 µM
	MnSO ₄	1 µM
	ZnSO ₄	1 µM
	CuSO ₄	0,5 µM
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,1 µM
	NiSO ₄	0,1 µM

3.1.2.3.2 Sustrato para cultivo en suelo

Este medio se utilizó, sobre todo, para el cultivo de plantas de *Arabidopsis* y *N. benthamiana*, pero también para cultivar plantas de tomate para la obtención de semillas.

Como sustrato se utilizó una mezcla de turbas y perlita. El pH del suelo era de 6 y el contenido en materia orgánica del 97 %.

3.1.2.4 Soluciones para la conservación y manejo de los ovocitos

Para la conservación y manejo de los ovocitos se ha trabajado principalmente con las soluciones OR2 y ND96 cuya composición aparece en las Tablas 15 y 16 respectivamente.

Tabla 15: Composición de la solución OR2.

Compuesto	Concentración
NaCl	0,48 % (p/v)
KCl	0,015 % (p/v)
MgCl ₂	0,02 % (p/v)
HEPES	0,119 % (p/v)

Tabla 16: Composición de la solución ND96.

Compuesto	Concentración
NaCl	0,56 % (p/v)
KCl	0,015 % (p/v)
MgCl ₂	0,020 % (p/v)
CaCl ₂	0,0264 % (p/v)
HEPES	0,119 % (p/v)
Gentamicina	0,005 % (p/v)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Sistema de cultivo hidropónico, sistema de cultivo en maceta, condiciones de crecimiento para las plantas.

Antes de su germinación, todas las semillas fueron esterilizadas. Para la esterilización de las semillas de tomate y Arabidopsis, éstas se trataron con alcohol etílico al 75 % durante 2 minutos. Transcurrido este tiempo se retiró el alcohol y se añadió durante 15 minutos una solución de lejía concentrada al 5 % y SDS al 0,02 %. Pasados los 15 minutos se realizaron 5 lavados con agua milliQ estéril y quedaron las semillas listas para ser germinadas.

3.2.1.1 Sistema de cultivo hidropónico

Para la realización de los experimentos con plantas de tomate las semillas fueron germinadas en placas rellenas con solución nutritiva modificada de Hoagland (1/5) en estado sólido (Figura 10A). Una vez germinadas (aproximadamente una semana después de su siembra), las plántulas se traspasaron a cajas de puntas de micropipeta modificadas (Figura 10B) y rellenas con solución nutritiva para ser aclimatadas.

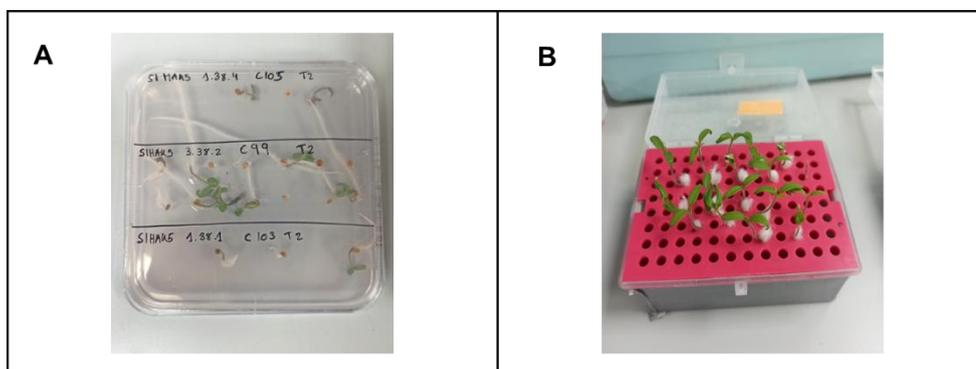


Figura 10: Sistema de germinación y aclimatación para plántulas de tomate. (A) Placa con solución nutritiva modificada (1/5 Hoagland) en estado sólido. (B) Caja de puntas modificada para permitir la aclimatación de las plántulas antes de la realización de los experimentos.

Una vez aclimatadas, las plantas de tomate se cultivaron haciendo uso del sistema de cultivo hidropónico. Para ello, se utilizaron contenedores de plástico con un volumen de 10 o 4 litros (Figura 11A y 11B) que contenían solución modificada de Hoagland (1/5) (descrita en el apartado de materiales). Los barreños contaban con tapaderas que fueron modificadas para generar los orificios con el diámetro adecuado para ubicar las plantas en contacto con la solución nutritiva. Las plantas se pusieron sobre la tapa del barreño utilizando como soporte una fibra de poliéster que podía adaptarse perfectamente a la arquitectura del tallo proporcionándoles sostén (Figura 11C). Además, cada uno de los contenedores contaba con un aireador (Figura 11D) para proporcionar el oxígeno requerido por las raíces. Las condiciones de luz, temperatura y humedad estaban controladas. Para ello se fijó un fotoperiodo de 16 h de luz, 25 °C de temperatura diurna, 22 °C de temperatura nocturna y una humedad relativa del 45 % durante el día y del 50 % durante la noche. El sistema de iluminación empleado consistió en bombillas led Philips que aportaron una densidad homogénea de flujo de fotones de $360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

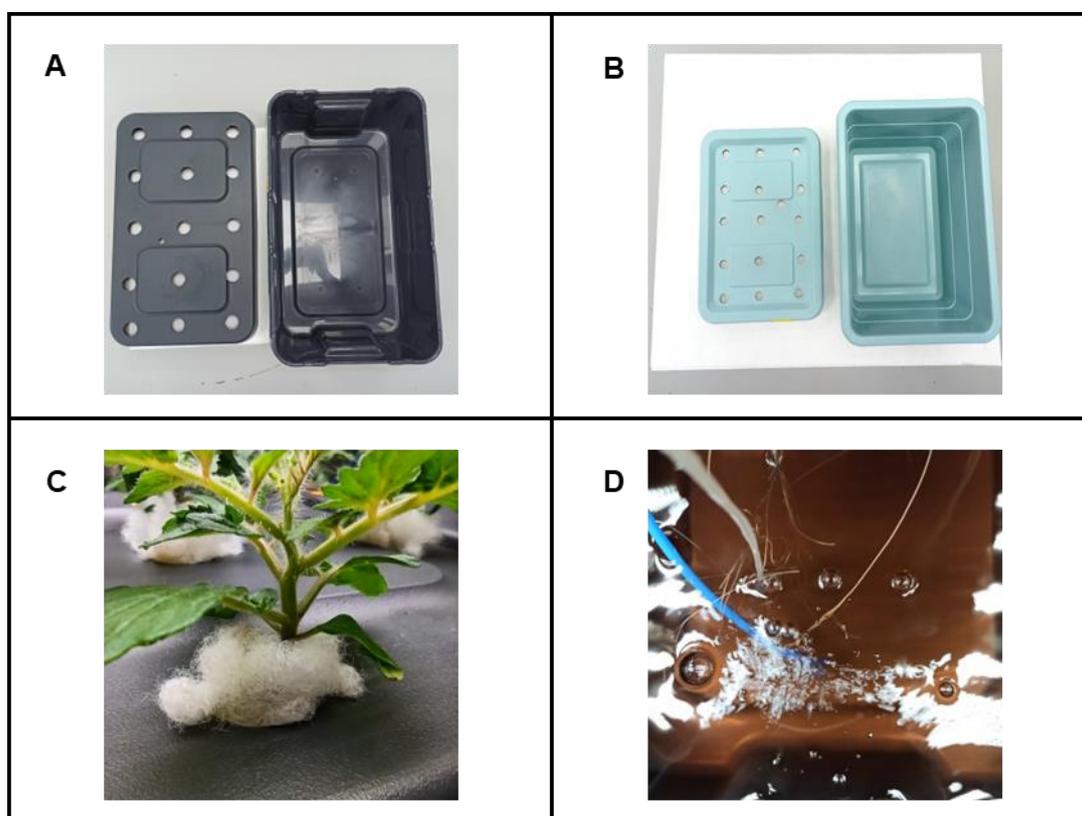


Figura 11: Material utilizado para el cultivo hidropónico de tomate. (A) Contenedor de 10 litros utilizado para los experimentos de larga duración. (B) Barreño de 4 litros

utilizado habitualmente. (C) Fibra de poliéster utilizada para soporte. (D) Sistema de aireación.

Por su parte, las plantas de *Arabidopsis* utilizadas para los experimentos también se cultivaron en sistema hidropónico (Gibeaut et al., 1997). En este caso, se utilizaron contenedores de plástico (Figura 12A) que fueron rellenados con un volumen de 2,5 litros de solución nutritiva (1/5 Hoagland). Las tapaderas de estos barreños fueron perforadas ajustándose a un diámetro que permitiese insertar un microtubo de 1,5 mL. El microtubo se rellenó con lana de roca, un material inerte que, al igual que en el caso anterior, actuaba como soporte para facilitar el crecimiento y correcto desarrollo de la raíz (Figura 12B). La semilla, una vez esterilizada, se germinaba sobre la lana de roca desde un principio, en el mismo contenedor donde se iba a llevar a cabo el experimento (Figura 12C). Tras colocar las semillas, el contenedor se llevó a la cámara de cultivo (Figura 12D). Para el cultivo de *Arabidopsis*, se fijó un fotoperiodo de 8 h de luz, 22 °C de temperatura y una humedad relativa del 65 %. El sistema de iluminación en este caso consistió en el uso de tubos fluorescentes Philips TLD 36/W 83, Silvana F 36WGRO, que aportaban una densidad homogénea del flujo de fotones de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 12D).

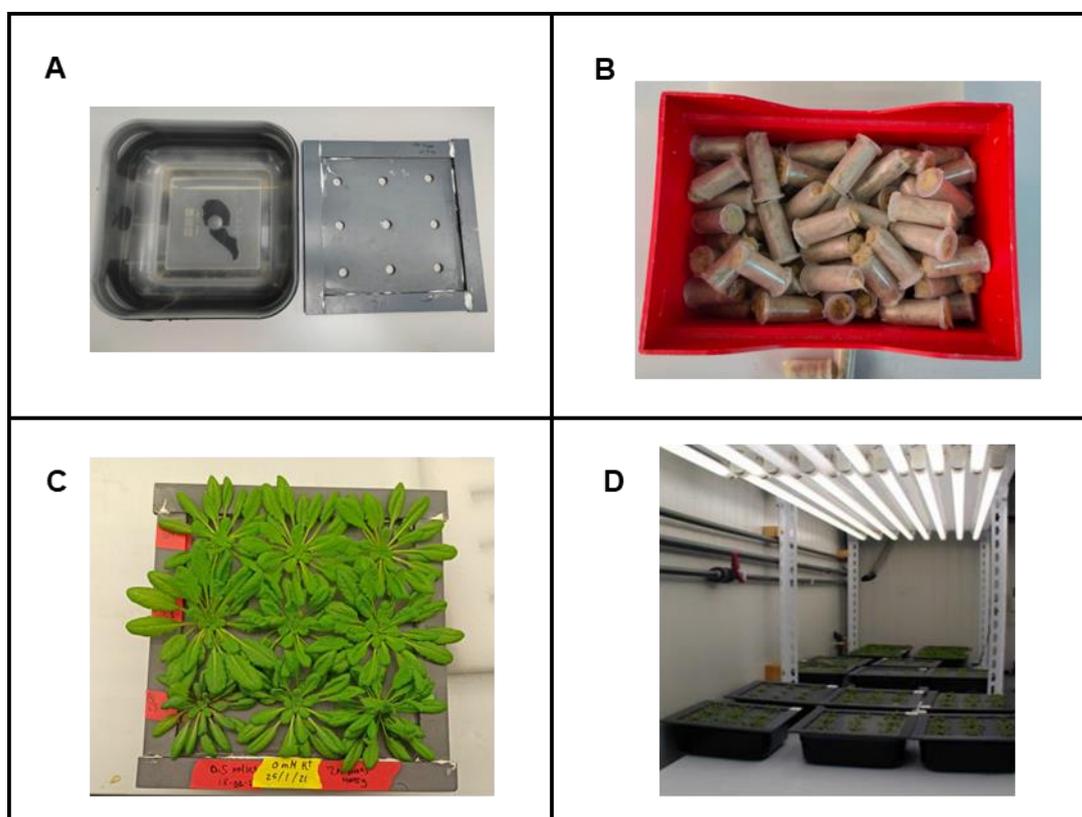


Figura 12: Material utilizado para el cultivo hidropónico de Arabidopsis. (A) Contenedor de 2,5 litros. (B) Microtubos rellenos de lana de roca. (C) Plantas preparadas para el experimento después de ser germinadas sobre el microtubo. (D) Disposición de los barreños en la cámara de cultivo.

3.2.1.2 Sistema de cultivo en maceta

El cultivo de las plantas en macetas se realizó con el objetivo de crecer las plantas hasta la obtención de semillas para la propagación de las líneas.

Las plántulas de tomate germinadas se pasaron a macetas rellenas con sustrato (descrito en el apartado de materiales) y se mantenían creciendo hasta la maduración de los frutos de los que se extraían las semillas (Figura 13). Las macetas se depositaron en bandejas que se rellenaban con agua una vez por semana como sistema de riego. Las condiciones de crecimiento de la cámara fueron similares a las de las plantas de tomate en cultivo hidropónico, descritas en el apartado anterior.



Figura 13: Planta de tomate cultivada en maceta.

Las plantas de Arabidopsis se cultivaron en macetas más pequeñas (Figura 14A). Como en el caso de tomate, el objetivo también fue propagar las diferentes líneas. Para ello, cuando las plantas tuvieron un tamaño suficiente y comenzaron a brotar las inflorescencias, se añadieron colectores comerciales de

semillas Aracons™ (Arasystem-Betatech) (Figura 14B). Las macetas se depositaron en bandejas que se rellenaban con agua una vez por semana como sistema de riego. Las condiciones de crecimiento de la cámara fueron similares a las de las plantas de *Arabidopsis* en cultivo hidropónico, descritas en el apartado anterior.

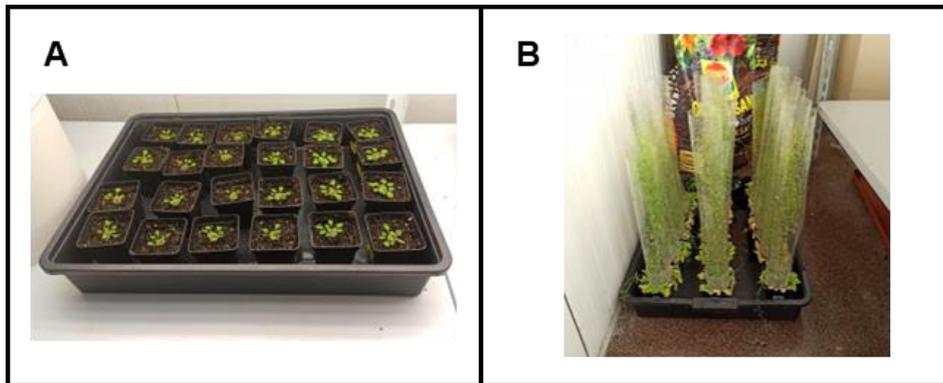


Figura 14: Cultivo en maceta de plantas de *Arabidopsis*. (A) Plantas de *Arabidopsis* cultivadas en maceta. (B) Plantas de *Arabidopsis* cultivadas en maceta con colectores comerciales de semillas para la obtención de las mismas y propagación de las líneas.

El cultivo de *N. benthamiana* se realizó en macetas similares a las empleadas para tomate. Sin embargo, en este caso, las macetas fueron recortadas para disminuir el volumen de sustrato empleado de forma que el desarrollo morfológico de la planta fuera el ideal para permitir posteriormente la infiltración con *A. tumefaciens* (Figura 15). El riego también se realizó mediante inundación de la bandeja una vez a la semana.



Figura 15: Cultivo de plantas de *N. benthamiana* en maceta.

3.2.2 Producción de plantas ‘Knock out’ (KO) mediante CRISPR-Cas y generación de líneas transgénicas

El sistema CRISPR-Cas permite la inactivación de genes en plantas de forma específica y eficiente. Ya se había empleado anteriormente en plantas de interés agrícola como el tomate (Brooks et al., 2014).

La generación de líneas transgénicas nos permitió la expresión genética de manera constitutiva en las plantas de las herramientas necesarias tanto para la edición genética como para la expresión ectópica de genes de interés, como el sensor de K⁺.

3.2.2.1 Diseño de secuencias guía (sgARN) y ensamblaje de los plásmidos para edición genética

En el laboratorio, ya se contaba con las líneas mutantes *slhak5*, *slskor* y *lkt1*, que habían sido desarrolladas anteriormente con esta herramienta. En esta Tesis Doctoral, y como se indica en el apartado de materiales, se han utilizado plantas de *S. lycopersicum* (variedad Micro-Tom) para la inactivación de *SICIPK23* mediante edición genética. Para inactivar *SICIPK23* (locus: Solyc02g02144) se identificaron regiones de 20 pb mediante la herramienta web Breaking Cas del Centro Nacional de Biotecnología (Oliveros et al., 2016) que permitían dirigir un complejo sgARN-Cas9 al gen *SICIPK23*. Concretamente, se diseñó un sgARN dirigido al exón 2 del gen *SICIPK23* (Figura 16) que presentaba una alta especificidad (la probabilidad de que se alineara en un sitio inespecífico (off-target) era inferior al 0,5 %). El fragmento de 20 pb se clonó en el plásmido pEn-C1.1 (Schiml et al., 2016) (Figura 17), haciendo uso de la enzima de restricción BbsI en fase con una secuencia estructural denominada “scaffold” que permite la interacción del sgARN con Cas9. La secuencia codificante del sgARN está aguas abajo del promotor pU6-26. Este plásmido presenta un gen de resistencia a ampicilina y los elementos necesarios para la edición genética están flanqueados por dos puntos de corte para la enzima de restricción MluI, conformando un casete de expresión. Posteriormente, tras digerir con la enzima MluI, el casete de expresión se clonó, permitiendo la coexpresión constitutiva de

todos los elementos, dentro del ADN-T del plásmido pCAS9-TPC2 (Figura 17), una modificación de pCAS9-TPC descrito en (Schiml et al., 2016), que se hizo para introducir el gen de resistencia a kanamicina y seleccionar las líneas transgénicas por este antibiótico.



Figura 16: Representación esquemática del gen *SICIPK23* y localización de los sitios diana para el complejo sgARN-Cas9. En rojo se representan las 20 pb que dan especificidad a complejo sgARN. La secuencia subrayada corresponde a la secuencia PAM necesaria para que pueda cortar la endonucleasa Cas9. La diana para el complejo sgARN se encuentra en el exón 2 de *SICIPK23*.

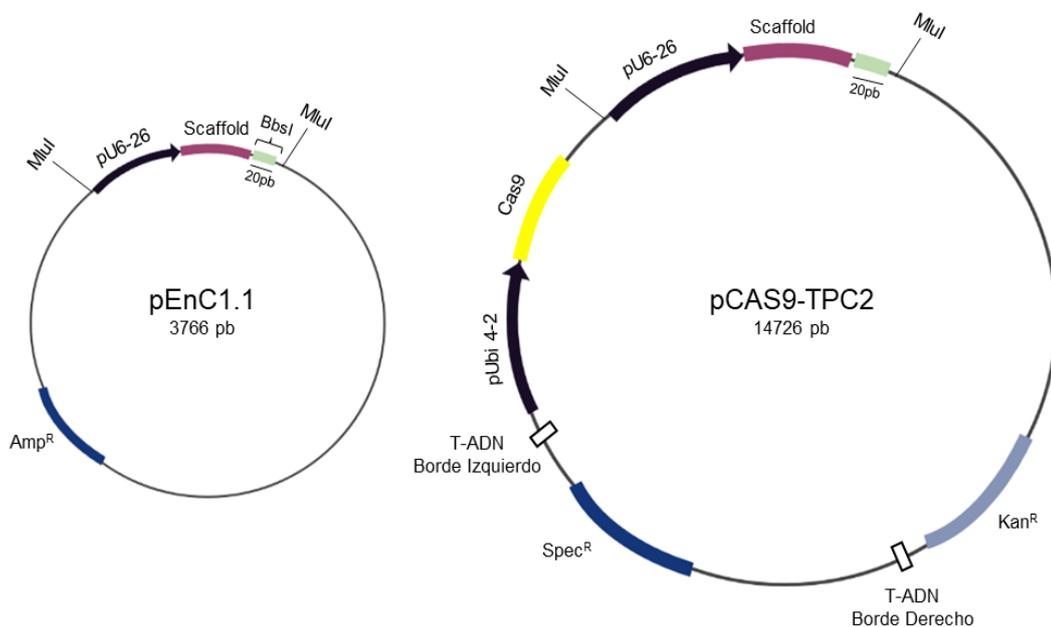


Figura 17: Representación de los plásmidos utilizados para la edición con CRISPR-Cas9.

3.2.2.2 Generación de las líneas transgénicas de tomate

Para generar las líneas transgénicas de tomate, se transformó la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 con el plásmido pCAS9-TPC2 que albergaba los elementos necesarios (sgARN, y proteína Cas9) para la edición genética de las plantas de tomate. Se incubaron cotiledones de plantas de tomate (Figura 18A) con suspensiones de la bacteria transformada y posteriormente se regeneraron las plantas (Figura 18B) mediante cultivo *in vitro* (Eck et al., 2019) y se seleccionaron las plantas resistentes a kanamicina.

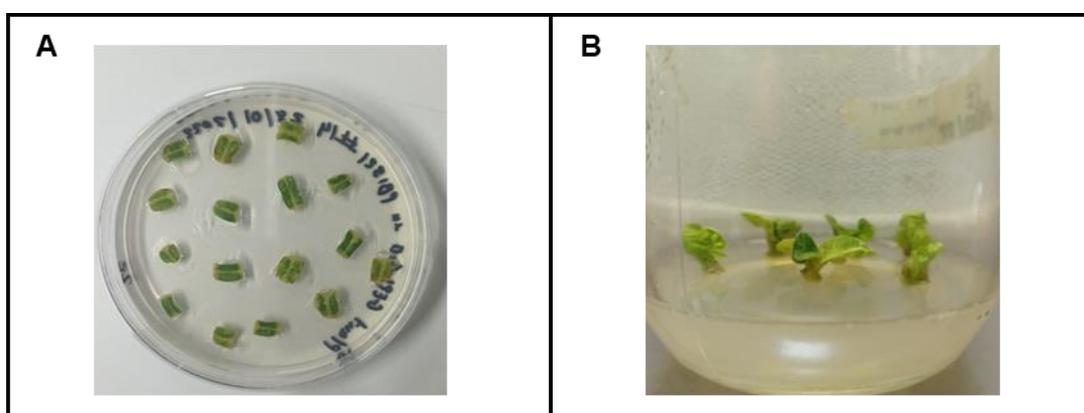


Figura 18: Proceso de transformación genética de plantas de tomate. (A) Cotiledones incubados en medio selectivo tras la infección con *A. tumefaciens*. Plantas de tomate regeneradas a partir de los cotiledones. (B) Las plantas permanecen en medio de enraizamiento hasta la aparición de la raíz.

Tras la regeneración de la parte aérea y la raíz, las plantas se pasaron a macetas y se aclimataron antes del estudio de su genotipo (Figura 19).



Figura 19: Aclimatación de plantas de tomate regeneradas a partir del cultivo in vitro. Para la aclimatación se utilizaron botellas de plástico cuyo tapón permitía controlar la humedad que recibía la planta.

Siguiendo este método de generación de plantas transgénicas, también se desarrollaron las plantas transgénicas de tomate que expresan constitutivamente el sensor ratiométrico de K^+ GEPI1.0. Mediante una reacción de PCR se amplificó la secuencia codificante para el sensor a partir del plásmido pGGZ004-plantGEPI1.0 con unos cebadores que permitieron introducir los sitios de corte para las enzimas de restricción XhoI y BamHI. Al mismo tiempo, con el objetivo de clonar el sensor, se digirió el plásmido pBI321 con las mismas enzimas de restricción y se realizó una reacción de ligamiento entre el producto de PCR y el plásmido digerido (DNA ligase T4 Thermo Fischer). El producto de PCR se insertó en el sitio de clonación múltiple dando lugar a pBI321-plantGEPI1.0 (35S::plantGEPI1.0-pBI321).

3.2.2.3 Selección y mantenimiento de líneas

Para identificar las líneas en las que el gen *SICIPK23* estaba inactivado, se procedió a la caracterización del genotipo de las plantas regeneradas (generación T0). Para ello se amplificó mediante PCR (Phire Plant Direct PCR Kit, Thermo Fischer Scientific) el fragmento del gen *SICIPK23* (1121 pb) que contenía la zona a editar, y el producto de amplificación fue secuenciado por el método Sanger (STAB vida, Lisboa, Portugal). Una vez recibidos los cromatogramas de las secuencias correspondientes a los productos de PCR, éstos fueron analizados haciendo uso de la herramienta web CRISPR-ID (Dehairs et al., 2016). Las plantas que presentaban mutaciones que alteraban la fase de lectura para el gen *SICIPK23* fueron seleccionadas para obtener semillas (Tabla 17). Las plantas de la generación T1 se usaron para los experimentos.

Tabla 17: Secuencia mutante obtenida en el gen *SICIPK23*. La mutación (inserción) aparece representada con una letra minúscula. La secuencia diana de *SICIPK23* se muestra en rojo y la secuencia PAM aparece subrayada.

Nombre	Cadena	Alelos	Genotipo
<i>SICIPK23</i> (WT)	+	5' TTATTAGACACCCCAATGT-AATC <u>CGG</u> 3'	
<i>slcipk23</i>	+	5' TTATTAGACACCCCAATGTaAATCCGG 3' + 1pb	Homocigótico

3.2.3 Determinación de potenciales de membrana en células de la raíz

Para la determinación del potencial de membrana de las células de la epidermis y córtex de la raíz de plantas de tomate se usaron microelectrodos de borosilicato (1B120F-4, World Precision Instruments Inc. Sarasota, FL) (Figura 20A) (F. J. M. Maathuis & Sanders, 1994; Rubio et al., 2008, 2014). Los microelectrodos rellenos con KCl a 200 mM, fueron introducidos en un portaelectrodos (MEHF1S10, World Precision Instruments Inc. Sarasota, FL) que contenía una semicélula Ag/AgCl, conectada a un amplificador de alta

impedancia (DUO 773, World Precision Instruments Inc. Sarasota, FL) (Figura 20B). Las raíces se montaron sobre una cámara (Figura 20C) que podía ser acoplada a la platina de un microscopio invertido (Figura 20D). Para asegurar el buen estado de la raíz, evitar la desecación y aplicar los tratamientos, la cámara se rellenó mediante un sistema de perfusión con una solución control que contenía 0,5 mM Ca^{2+} ajustada a pH 6 (5 mM MES/Bis-Tris). La velocidad de perfusión fue de 10 mL min^{-1} . Una vez preparada la muestra, los microelectrodos se introducían en las células de la raíz (Figura 20A) hasta obtener un potencial estable que permitiera comenzar los experimentos.

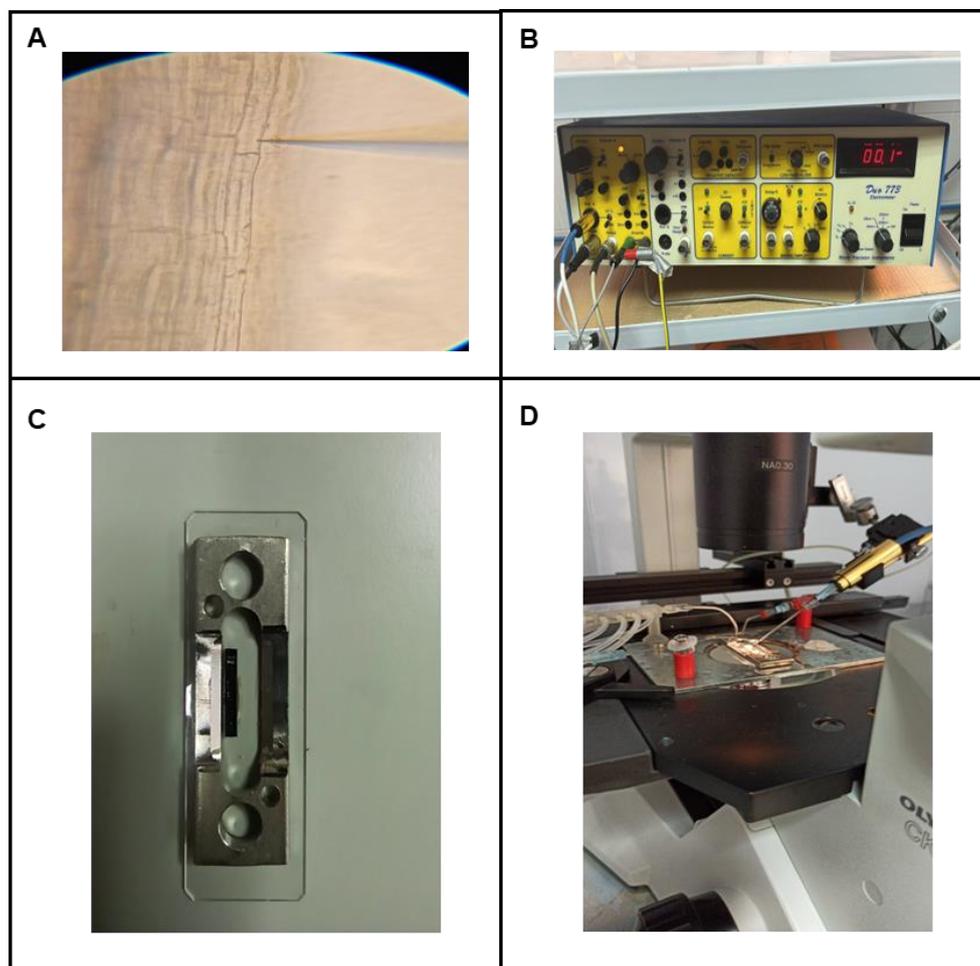


Figura 20: Equipo de electrofisiología para la determinación de los potenciales de membrana. (A) Microelectrodo introducido en una célula de la raíz (B) Electrómetro (C) Cámara de perfusión sobre la que se coloca la raíz. (D) Sistema de perfusión, microelectrodo, y muestra acoplados sobre la platina de un microscopio invertido.

3.2.4 Determinación del contenido de cationes, aniones y tasa de absorción de cationes.

Las plantas fueron cosechadas después de los experimentos. Durante la cosecha se separaron en raíz y parte aérea. Después de determinar el peso fresco de ambas partes, los tejidos se secaron a 65 °C durante al menos 4 días con el objetivo de determinar el peso seco. El material seco se digirió con HNO₃:H₂O₂ (5:3 v:v) en un microondas (CERM Mars Xpress, North Carolina) y el contenido de cationes se determinó mediante análisis en ICP-OES (Iris Interpid II, Thermo Electron Corporation, Franklin).

Para el análisis del contenido de aniones, se recogieron 50 mg de material vegetal seco, se añadieron 10 ml de agua miliQ y se agitaron (agitación mecánica) las preparaciones durante 30 minutos. Tras la agitación se centrifugaron las muestras durante 20 minutos a 4000 rpm. Pasado este tiempo, se cogió el sobrenadante y se pasó por un filtro de 45 µm. La solución resultante fue usada para determinar el contenido de aniones mediante análisis en el cromatógrafo de iones Dionex Aquion (Thermo Fisher Scientific).

Las tasas netas de absorción de K⁺ se determinaron a partir del contenido de K⁺ en las plantas cosechadas a los 14 y 21 días de crecimiento en cultivo hidropónico a 1,4 mM de K⁺ según la fórmula descrita a continuación:

$$\text{Tasa Neta de Absorción} = (C_2 - C_1) / (t_2 - t_1) * (R_2 + R_1) / 2$$

En la fórmula, *C* es la concentración total de K⁺, *R* es el peso seco de la raíz y *t* es el tiempo de la cosecha, 1 y 2 indicarían en qué orden cronológico fueron cosechadas las plantas.

Las tasas de absorción de Rb⁺ se determinaron a partir del contenido de Rb⁺ de plantas que fueron ayunadas de K⁺ durante 7 días y luego transferidas a una solución sin K⁺ suplementada con 0,02 mM de RbCl. La tasa de absorción de Rb⁺ se calculó a partir de la concentración de Rb⁺ en la planta completa, el tiempo de duración del experimento y el peso seco de la raíz.

3.2.5 Generación de raíces transgénicas de tomate.

Para la generación de raíces pilosas transgénicas de tomate se utilizó un protocolo establecido anteriormente (Ron et al., 2014) . Se esterilizaron semillas de tomate de las líneas WT y *slcipk23*. Las semillas esterilizadas se sembraron en placas que contenían medio Murashige y Skoog (MS) solidificado con 0,8 % de agar. Cuando las plantas tenían alrededor de 5 días, los cotiledones tenían el tamaño ideal para ser transformados. Se cortaron los cotiledones y se incubaron durante 20 min. en una solución de *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC15834) que presentaba una densidad óptica (DO) de entre 0,2 y 0,4 (550 nm).

Antes de la incubación con los cotiledones, *A. rhizogenes* se transformó con dos construcciones diferentes. La primera construcción consistía en el plásmido pBI321 vacío. La segunda construcción consistía en el plásmido pBI321 con la secuencia insertada del gen *SICIPK23* (*35S::SICIPK23-pBI321*). Para insertar la secuencia en el plásmido, tanto el ADNc de *SICIPK23* como el plásmido se digirieron con las enzimas XhoI y SacI y tras realizar un ligamiento con ligasa (DNA ligase T4 Thermo Fischer) el ADNc de *SICIPK23* quedó insertado en el sitio de clonación múltiple del vector.

Los cotiledones de tomate se secaron con un papel de filtro después de su incubación con la suspensión de *A. rhizogenes* con el objetivo de eliminar el exceso de bacteria. Una vez secos, se transfirieron a placas Petri que contenían medio MS sólido suplementado con sacarosa al 3 %. Los cotiledones se incubaron en este medio durante 3 días en oscuridad y una temperatura controlada de 26 °C. Pasado este tiempo, los cotiledones se pasaron a otra placa como la descrita en el paso anterior suplementada con cefotaxima (200 mg L⁻¹) y kanamicina (50 mg L⁻¹). La cefotaxima se utilizó para eliminar *A. rhizogenes* una vez tuvo lugar la agroinfección y transferencia del ADN-T a los cotiledones, y la kanamicina para seleccionar las raíces que se generaban y que habían sido correctamente transformadas. Los cotiledones permanecieron en este medio hasta la aparición de las raíces pilosas (10-14 días) (Figura 21A). Se obtuvieron raíces transformadas de cada construcción y, de cada una, se transfirieron entre 6 y 10 raíces a botes con medio 1/5 de Hoagland sólido suplementado con

sacarosa al 1 % y los antibióticos mencionados anteriormente. Las raíces crecieron en este medio durante 14 días (Figura 21B).

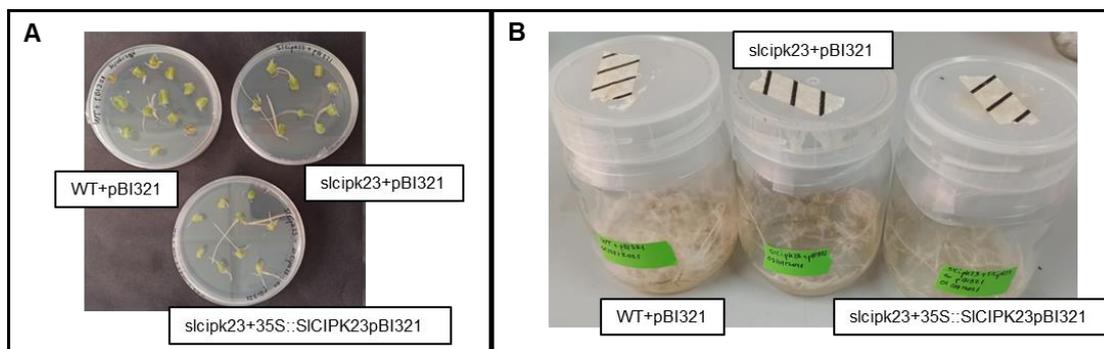


Figura 21: Generación de raíces transgénicas de tomate mediante transformación con *A. rhizogenes*. (A) Cotiledones con raíces adventicias creciendo en medio MS. (B) Raíces transformadas creciendo en botes con medio 1/5 de Hoagland sólido.

Se realizó un control de transformación para calcular la eficiencia del proceso. Para ello se incubaron cotiledones de tomate con una cepa de *A. rhizogenes* que expresaba la construcción 35S::GUS-Int-pBI321. Las raíces generadas se cultivaron durante 14 días en botes con 1/5 de Hoagland sólido. Se realizó la tinción GUS y se contabilizó el porcentaje de raíces que eran transgénicas.

3.2.6 Ensayos de fluorescencia en *Nicotiana benthamiana* y *Xenopus laevis*

3.2.6.1 Complementación bimolecular fluorescente en hojas de *N. benthamiana*

Para comprobar la interacción entre las proteínas bajo estudio se utilizó la técnica de complementación bimolecular fluorescente que había sido descrita previamente (Waadt et al., 2008). Los ADNs codificantes para las proteínas objeto de estudio (LKT1, SISKOR, AtSKOR, SIHKT1.1, SIHKT1.2, SICIPK23, SICBL1, SICBL9, AtCIPK23, AtCBL1, y AtCBL9) se clonaron en el sitio de clonación múltiple de los plásmidos pSPYNE173 y pSPYCE(M). LKT1, SISKOR, AtSKOR, SIHKT1.1, SIHKT1.2, SICBL1, SICBL9, AtCBL1 y AtCBL9 se clonaron en el plásmido pSYPCE(M) (en fase con la mitad C-terminal de YFP, YFP^C). Por

su parte, SICIPK23 y AtCIPK23 se clonaron en el plásmido pSPYNE173 (en fase con la mitad N-terminal de YFP, YFP^N). Se generaron las siguientes construcciones LKT1::YFP^C, SISKOR::YFP^C, AtSKOR::YFP^C, SIHKT1.1::YFP^C, SIHKT1.2::YFP^C, SICBL1::YFP^C, SICBL9::YFP^C, AtCBL1::YFP^C, AtCBL9::YFP^C, SICIPK23::YFP^N, y AtCIPK23::YFP^N. Además, AtSOS1::YFP^N + AtSOS1::YFP^C se usaron como control positivo (Núñez-Ramírez et al., 2012). Cada construcción se utilizó para transformar *A. tumefaciens* GV3101 generando así diferentes cepas que fueron utilizadas para los experimentos de complementación. Después de crecer durante 3 semanas, las hojas de las plantas de *N. benthamiana* se co-infiltraron con diferentes combinaciones de las cepas generadas. Antes de la agroinfiltración, las cepas de *A. tumefaciens* fueron cultivadas en estría en placas de LB sólido + rifampicina, tetraciclina y kanamicina durante dos días. La noche de antes de la infiltración cada una de las cepas se creció en un matraz con LB líquido más los antibióticos mencionados. Las células de *A. tumefaciens* se recogieron por centrifugación y se transfirieron a medio de infiltración (10 mM MES pH 5,6, 10 mM MgCl₂ y 100 μM acetosiringona), incubándose durante 3h. Transcurrido este tiempo, las mezclas de cepas se ajustaron a una densidad óptica de 0,25 (600 nm) y se usaron para infiltrar las hojas de *N. benthamiana*. Para asegurar la efectividad de la agroinfección, se incluyó en la mezcla *A. tumefaciens* que expresaba la proteína P19 a una densidad óptica de 0,1. La proteína P19 del virus TBSV de tomate actúa como supresor del silenciamiento génico. Por tanto, facilita la sobreexpresión de los genes durante la infiltración de las hojas.

Para comprobar la interacción entre las proteínas mediante la reconstitución de la proteína fluorescente YFP, se utilizó el microscopio de epifluorescencia (LEICA DM6). La señal de la YFP se observó utilizando el filtro del microscopio L5 (BP480/40, Dic. Mirr. 505, BP527/30) tras la excitación y la emisión.

3.2.6.2 Complementación bimolecular fluorescente en ovocitos de *Xenopus laevis*

Además de en hojas de *N. benthamiana*, es posible realizar los ensayos de complementación bimolecular fluorescente en ovocitos de *Xenopus*. Para

ello, se realizó una PCR utilizando como molde las construcciones generadas que han sido descritas en el apartado anterior. Se diseñaron unos cebadores (Tabla 25, Anexo II) que permitieron introducir el promotor T7 en el extremo 5' de las secuencias codificantes para las proteínas de interés. Además, gracias al cebador reverso, se pudieron amplificar también los fragmentos en fase YFP^C e YFP^N. Se generaron dos tipos de productos de PCR: T7- ADNc- YC y T7- ADNc- YFP^N. Los productos de PCR resultantes se utilizaron para la síntesis de ARNc (mMESSAGE mMACHINE™ T7 Ultra kit Thermo Fischer) que se inyectó usando el microinyector Nanoliter 2010 (World Precision Instruments) en los ovocitos. Cuatro días después de la inyección del ARNc se observó el resultado de la complementación usando el microscopio confocal (Leica Stellaris 8). La proteína YFP se excitó a 514 nm y la fluorescencia emitida se recogió entre 522 y 625 nm. La intensidad de fluorescencia de la señal de la superficie de los ovocitos se midió con el programa Fiji.

3.2.7 Experimentos de fijación de voltaje en ovocitos de *Xenopus laevis*

Se obtuvieron los ADNc codificantes de *LKT1*, *SISKOR*, *SICIPK23*, *SICBL1* y *SICBL9* mediante amplificación por RT-PCR a partir de las raíces de tomate (Anexo II). Los fragmentos amplificados se clonaron en el plásmido PCR2.1 TOPO (Invitrogen) y se comprobaron mediante secuenciación Sanger. Las secuencias de ADNc obtenidas se amplificaron con unos cebadores específicos (Anexo II) para introducir el promotor T7 en el extremo 5' como ha sido descrito en el apartado anterior. Una vez amplificados los fragmentos se sintetizó el ARNc y se midió su concentración usando un espectrofotómetro Nanodrop. Se inyectaron 20 ng del ARNc de *LKT1* y 5 ng del ARNc de *SISKOR*, *SICIPK23*, *SICBL1* y *SICBL9* en los ovocitos de *Xenopus* usando el microinyector Nanoliter 2010 (World Precision Instruments). Antes de realizar los experimentos de fijación de voltaje, los ovocitos se conservaron de 3 a 5 días en la solución ND96 (descrita en el apartado de materiales) a una temperatura de 18 °C. El potencial de membrana de los ovocitos se fijó con un amplificador Axoclamp 900A (Molecular Devices). Para recoger y analizar los datos se utilizó el software Henry Suite EP (<http://www.psrq.org.uk/electrophys.html>). La solución utilizada durante el experimento para el registro de los datos de *LKT1* contenía 100 mM

de gluconato potásico, 1 mM de CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 y 10 mM de MES-NaOH. El pH se ajustó a 5,5. La inhibición por Cs^+ se comprobó añadiendo 10 mM de CsCl a la solución descrita. Para los gráficos I/V se utilizó la intensidad de corriente en estado estacionario. Los voltajes de membrana oscilaron entre 0 y 140 mV (incrementos de 20 mV; potencial de mantenimiento 20 mV; potencial de desactivación 20 mV). En el caso de SISKOR, la solución contenía (mM): 1 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 10 HEPES-NaOH (pH 7.5) y KCl a las concentraciones indicadas. Las curvas corriente-voltaje en estado estacionario se obtuvieron a partir de corrientes en estado estacionario resultantes de la fijación de voltaje en el rango -80 a +60 mV (incrementos de 20 mV; potencial de mantenimiento -60 mV; potencial de desactivación, -60 mV).

En el caso de HKT1.2 la solución contenía (mM) 2 NaCl, 0 KCl 6 MgCl_2 , 1,8 CaCl_2 , 10 MES y 200 de Manitol, por último, el pH se ajustó a 5,5. Las curvas corriente-voltaje en estado estacionario se obtuvieron a partir de corrientes en estado estacionario resultantes de la fijación de voltaje en el rango -20 a -140 (incrementos de -20 mV; potencial de mantenimiento -20 mV, potencial de desactivación, -20 mV).

La probabilidad relativa de apertura ($P_o/P_{o_{\max}}$) se calculó de la siguiente manera $P_{o_{\max}} = I / I_{\max}$ donde I_{\max} es la corriente registrada a la máxima probabilidad de apertura obtenida a partir de la ecuación de Boltzmann: $I = I_{\max} \times [1/(1 + \exp(z_g \times F \times (V - E_{a50}) / R \times T))]$ en la que las corrientes de cola iniciales se ajustaron como se describió previamente (Jeanguenin et al., 2011). z_g es la "gating charge", V es el potencial de membrana aplicado, E_{a50} es el potencial de activación y F , R y T representan la constante de Faraday, la constante de los gases ideales, y la temperatura respectivamente.

La intensidad de la corriente en estado estacionario se determinó en cada pulso hiperpolarizante o despolarizante.

La constante de activación se calculó como el tiempo en el que se observó la mitad de intensidad de corriente en estado estacionario mediante un ajuste exponencial de primer orden de las corrientes dependientes del tiempo en pulsos hiperpolarizantes.

La constante de desactivación se obtuvo mediante ajustes exponenciales de primer orden de las corrientes de cola al potencial de desactivación (20 mV).

El ajuste de las curvas se realizó con el software Sigma plot.

3.2.8 Ensayos de complementación en levadura

Se usó la cepa de levadura 9.3 descrita en el apartado de materiales para realizar los ensayos de complementación funcional. Antes de empezar los experimentos, las células de levadura se cultivaron en medio YPD con una concentración de 100 mM de K^+ lo que fue fundamental para permitir el correcto crecimiento y evitar la reversión genotípica por la mutación de sistemas endógenos de la levadura. Tras incubar el cultivo durante toda la noche a 28 °C se realizaron diluciones decimales seriadas en agua estéril para conseguir suspensiones con densidades ópticas (DO_{600}) de 1, 0,1, 0,01, y 0,001 en el caso de los experimentos de complementación de K^+ y 1, 0,2, 0,04 y 0,008 en los experimentos de sensibilidad a Na^+ . Una vez realizadas las diluciones, se inocularon 10 μ l de cada una en placas de cultivo cuadradas con PA solidificado con 1,5 % de agar y con distintas concentraciones de K^+ o Na^+ . El tiempo de incubación a 28 °C hasta observar las colonias de levadura dependió de factores como la concentración de K^+ y el fenotipo y osciló entre 3 y 7 días.

Para los ensayos de complementación a bajas concentraciones de K^+ , la cepa de levadura 9.3 se transformó con diferentes combinaciones de ADNc que codificaba las proteínas *SIHAK5*, *qSIHAK5*, *SICIPK23*, *SICBL1* y *SICBL9*. Los ADNcs de *SIHAK5* y *qSIHAK5* se clonaron en el plásmido pYPGE15 (Brunelli & Pall, 1993) y fueron descritos previamente (Ragel et al., 2015; Rubio et al., 2008). El ADNc de *SICIPK23* se amplificó con los cebadores descritos en la tabla 25 (Anexo II), se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y Sall y se clonó en el sitio de clonación múltiple del plásmido pGPD414 (Mumberg et al., 1995). El ADNc de *SICBL1* Y *SICBL9* se amplificó con los cebadores descritos en el Anexo II , se digirió con las enzimas SpeI y Sall y se clonó en el sitio de clonación múltiple del plásmido p425GPD (Mumberg et al., 1995).

Para los ensayos de sensibilidad a distintas concentraciones de Na^+ , se transformó la levadura 9.3 con diferentes combinaciones de ADNc que

codificaba las proteínas SIHKT1.1, SICIPK23, SICBL1 y SICBL9. El ADNc de SIHKT1.1 fue sintetizado y clonado en pESC (sintetizado por la empresa Genscript). El ADNc de *SICIPK23* se amplificó con unos cebadores (descritos en Anexo II) para introducir el sitio de restricción para la enzima Bsal. El producto de PCR se digirió con Bsal y se clonó en el sitio de clonación múltiple del plásmido p2P, una modificación del plásmido pGPD414 (Mumberg et al 1995), para introducir el sitio de restricción para Bsal. *SICBL1* y *SICBL9* se clonaron en p425GPD según se ha descrito en el apartado anterior.

3.2.9 Manejo de microscopios, análisis de imagen y preparación de soluciones de imagen

3.2.9.1 Microscopios

Se han utilizado diferentes microscopios para la realización de los experimentos. Para los experimentos de complementación bimolecular fluorescente en hojas de *N. benthamiana*, se utilizó como hemos descrito anteriormente el microscopio de epifluorescencia LEICA DM6. Las muestras se prepararon sobre un portaobjetos con el envés de la hoja hacia arriba, después se colocó un cubreobjetos y se rellenó con agua el espacio entre el portaobjetos y el cubreobjetos.

El microscopio confocal LEICA Stellaris 8 se utilizó para los experimentos de complementación bimolecular de fluorescencia como se ha descrito en apartados anteriores. Las muestras se prepararon depositando el ovocito en una cubeta a la que se añadió ND96 para asegurar el buen estado de la muestra durante la visualización al microscopio.

Los experimentos con el sensor GEPI1.0 de K⁺ se realizaron con tres microscopios diferentes. El microscopio invertido de fluorescencia (Widefield) (Ti-E Nikon) se utilizó para analizar la fluorescencia en raíces y en estomas de *Arabidopsis* tras aplicar tratamientos de ATP y ABA. Se utilizó un objetivo seco CFI PLAN APO X20 y la excitación de la muestra se realizó con la lámpara para fluorescencia Prior Lumen 200 PRO a 440 nm y con una potencia de láser que varió entre el 20 y el 80 % según el experimento. Para el análisis tipo Cameleon

se utilizó el bloque óptico FRET CFP/YFP A11400-03 (emisión 1 483/32 nm para CFP y emisión 2 542/27 nm para cpVenus) con un espejo dicróico de 510 nm (Hamamatsu) para la adquisición simultánea de CFP y cpVenus. El microscopio invertido de fluorescencia LEICA THUNDER DMI8 se utilizó para analizar la fluorescencia en estomas de tomate después de la aplicación de tratamientos para abrirlos o cerrarlos. Se utilizó un objetivo de multiinmersión Leica x20/0.75. En este caso, la proteína CFP se excitó con la lámpara para fluorescencia integrada en el microscopio a 440 nm con una potencia de láser del 80 % y la proteína cpVenus se excitó a 510 nm con una potencia de láser de 25 %. Las imágenes se recogieron con la cámara Leica DFC9000 GTC VSC-12349. El microscopio confocal Nikon AX R se utilizó para analizar las raíces de plantas que expresaban el sensor GEPI1.0 y R-GECO.

Las muestras que expresaban el sensor pH-GFP, se estudiaron utilizando el microscopio invertido de fluorescencia Ti-E-Nikon (Widefield). La excitación de la muestra se realizó con la lámpara para fluorescencia Prior Lumen 200 PRO a 405 y 488 nm y la emisión se recogió con un filtro de paso 505/530 nm (Chroma Technology Corp).

Para los experimentos realizados con los microscopios Nikon se utilizó el software NIS Elements. El software utilizado por los microscopios de Leica fue LAS X.

3.2.9.2 Análisis de imagen

Las imágenes ratiométricas individuales se analizaron utilizando el software Fiji. La intensidad de fluorescencia se determinó de manera independiente para cada uno de los dos canales (canal de emisión de CFP y canal de emisión de cpVenus) sobre las regiones de interés (ROIs) usando un *plugin* de Fiji (ROI Manager). Los valores de las emisiones de CFP y cpVenus de las ROIs analizadas se usaron para calcular la ratio (R) (cpVenus/CFP). Los cálculos de la ratio se realizaron con Microsoft Excel (Microsoft Office 365). Los valores de fondo inespecífico fueron sustraídos de forma independiente para cada uno de los dos canales antes de calcular la ratio.

3.2.9.3 Soluciones de imagen

Durante la adquisición de imágenes las raíces permanecían montadas en una cámara y sumergidas en una solución de imagen (Tabla 18) que facilitaba la correcta conservación de las mismas.

Tabla 18: Solución de imagen para la raíz.

Compuesto	Concentración
KCl	5 mM
MES	10 mM
CaCl ₂	10 mM

El pH de la solución se ajustó a 5,8.

La solución de imagen utilizada para los estomas (Tabla 19) presentaba modificaciones en la concentración de CaCl₂ y en este caso, el pH debía ser ajustado a 6,15.

Tabla 19: Solución de imagen para los estomas.

Compuesto	Concentración
KCl	5 mM
MES	10 mM
CaCl ₂	50 μ M

3.2.10 Cruzamiento de líneas de *Arabidopsis thaliana*

Se llevó a cabo el cruzamiento de la línea GEPI1.0 de *Arabidopsis* con la línea R-GECO1 (Ngo et al., 2014; Zhao et al., 2011). Se seleccionaron los botones florales de plantas GEPI1.0 que se encontraban en estado óptimo para ser fecundados (no habían emergido todavía los pétalos y el botón floral estaba bien formado). Las flores maduras se eliminaron. Los botones florales seleccionados para la fecundación se procesaron con unas pinzas de microcirugía eliminando pétalos y estambres de forma que sólo quedó el pistilo no fecundado. Se utilizó la planta R-GECO1 como donante de polen. De esta planta se obtuvo una flor madura con los pétalos abiertos y los estambres completamente formados y produciendo polen en las anteras. La flor con los estambres se puso en contacto con el pistilo del parental femenino para realizar la fecundación. Las flores fecundadas mediante este método se marcaron con un fragmento de cinta en el tallo floral para realizar el seguimiento del proceso.

Las plantas fecundadas se mantuvieron en la cámara de cultivo hasta la formación y maduración de la silicua. Una vez secas, las silicuas se recogieron y las semillas se depositaron en microtubos de 1,5 ml.

La comprobación de los genotipos de las plantas de las semillas de los cruzamientos se realizó mediante la comprobación de los fenotipos de emisión de fluorescencia (cpVenus y mCherry) en el microscopio de epifluorescencia.

3.2.11 Análisis estadísticos y representación gráfica

El análisis de la varianza (ANOVA) se realizó con el programa Statistix V.8 para Windows (Analytical Software, Tallahassee, FL). Los grupos de datos homogéneos se identificaron mediante la prueba post hoc de LSD ($p < 0,05$). Para las comparaciones por pares, se utilizó la prueba t de Student. Se utilizó el programa Sigma Plot 14.0 para el ajuste de datos (Michaelis-Menten, Boltzmann y ajustes exponenciales de primer orden).

Gran parte de los datos obtenidos durante esta Tesis Doctoral se representan en forma de gráficos de cajas con barras y bigotes. En ese caso, los recuadros de las cajas van del primer cuartil al tercer cuartil, y los bigotes indican los valores mínimo y máximo. Las líneas centrales muestran las medianas (segundo cuartil). Los puntos de datos fuera de los recuadros son valores atípicos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CAPÍTULO 1: ESTUDIO DEL PAPEL DE SIHAK5, LKT1 Y SICIPK23 EN LA ENTRADA DE K⁺ EN LA PLANTA DE TOMATE

4.1.1 Análisis del fenotipo de plantas *lkt1*

Para evaluar la contribución del canal de K⁺ LKT1 a la nutrición de este elemento en las plantas de tomate (var. Micro-Tom), se generaron mutantes de pérdida de función “knock-out (KO)” con el sistema CRISPR-Cas. Para ello se diseñaron dos secuencias guías de ARN (sgARNs) que dirigieron la endonucleasa Cas9 al locus de *LKT1* para generar una rotura de la doble hélice (Figura 22). Se seleccionaron dos líneas mutantes independientes (*lkt1-1* y *lkt1-2*) que contenían mutaciones que alteraban la fase de lectura del gen *LKT1* (Tabla 20).

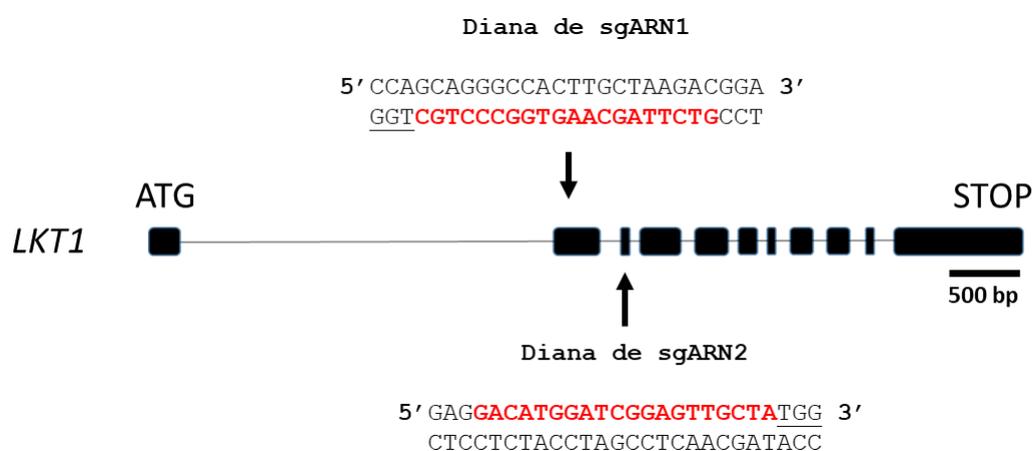


Figura 22: Representación esquemática del gen *LKT1* y los sitios diana para el complejo sgARN-Cas9. Los sitios diana aparecen marcados en rojo. La diana para el sgARN1 se encuentra en el exón 2 y la diana para el sgARN2 se encuentra en el exón 3. Las secuencias PAM aparecen subrayadas.

Tabla 20: Secuencias mutantes obtenidas en el gen *LKT1*. Las mutaciones (delecciones) aparecen representadas con un guion. Las secuencias diana de *LKT1* se muestran en rojo y la secuencia PAM aparece subrayada.

Nombre	Cadena	Alelos	Genotipo
<i>LKT1</i> (WT)	-	5' TCCGTCTTAGCAAGTGGCCCTGGCTGG 3'	
<i>lkt1-1</i>	-	5' TCCGTCTTAGCAAGTGG-CCTGCTGG 3' -1 bp	Homocigótico
<i>lkt1-2</i>	-	5' TCCGTCTTAGCAAGTG----TGCTGG 3' -4 bp	Homocigótico o bialélico
	-	5' TCCGTCTTAGCAAGTGG-CCTGCTGG 3' -1 bp	

Estas líneas fueron propagadas y utilizadas para los experimentos. Para realizar el análisis fenotípico se realizaron experimentos creciendo plantas WT, *lkt1-1* y *lkt1-2* en medio hidropónico con una solución modificada de 1/5 de Hoagland añadiendo hasta cuatro concentraciones diferentes de K⁺ externo (0,1 mM, 1,4 mM, 5 mM y 10 mM) durante 14 días. Como resultado de los experimentos se observó que las plantas *lkt1* cultivadas a una concentración externa de 1.4, 5 y 10 mM de K⁺ presentaban un menor contenido de K⁺, tanto en parte aérea como en raíz, comparadas con las plantas WT. Sin embargo, esto no ocurría cuando las plantas se cultivaban a 0.1mM de K⁺ (Figura 23A y 23B). Al mismo tiempo, y como consecuencia del análisis del resto de iones, también se observó que cuando se realizaba el experimento a concentraciones externas de 1.4, 5 y 10 mM de K⁺, el contenido en Mg²⁺ era claramente superior (aproximadamente el doble) en las raíces de plantas *lkt1* que en las plantas WT. Cuando la concentración externa era de 0.1 mM no se apreciaban estas diferencias (Figura 23D). En la parte aérea no se observaron diferencias en la concentración de Mg²⁺ entre *lkt1* y WT, independientemente de la concentración de K⁺ en el medio (Figura 23C). El análisis de la biomasa mostró que no había diferencias entre las plantas WT y *lkt1*, ni en la parte aérea ni en la raíz (Figura 23E y 23F). Estos resultados mostraron que el canal LKT1 era necesario para mantener las concentraciones de K⁺ en las plantas de tomate al nivel de las plantas silvestres.

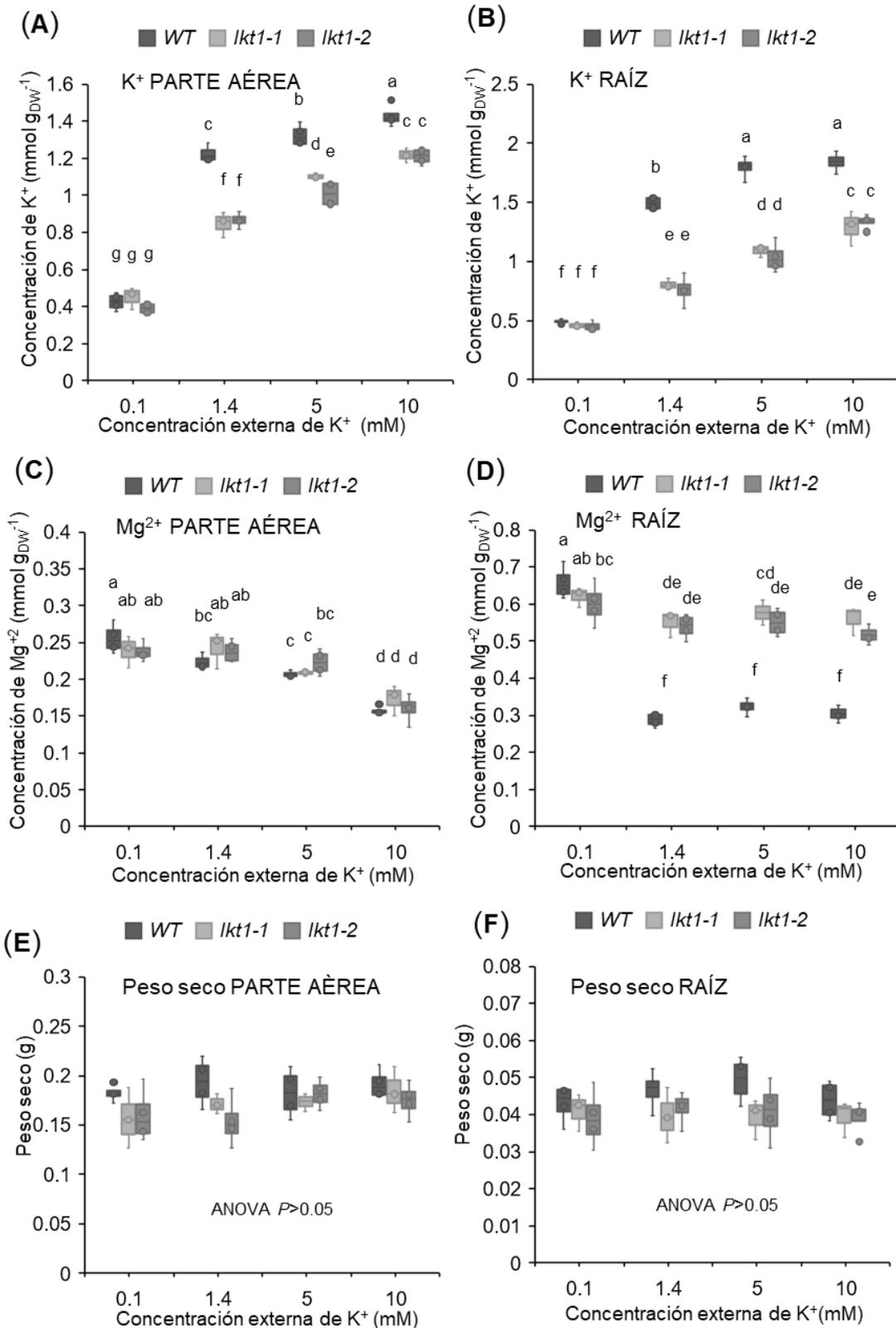


Figura 23: Concentración de K⁺ y Mg²⁺ y peso seco de parte aérea y raíz de plantas WT, *lkt1-1* y *lkt1-2* crecidas a diferentes concentraciones de K⁺ (0,1, 1,4, 5 y 10 mM K⁺) durante 14 días. Concentración de K⁺ en la parte aérea (A) y raíz (B). Concentración de Mg²⁺ en la parte aérea (C) y raíz (D). Peso seco de la parte aérea (E)

y raíz (F). Los datos se muestran en gráficos de cajas ($n = 4-6$). Las letras indican grupos homogéneos de datos donde $p < 0,05$ de acuerdo con el test LSD (realizado después de un ANOVA). En (E) y (F), el resultado de ANOVA fue $> 0,05$ lo que indica que no hay diferencias significativas en las medias de todos los grupos.

En las plantas WT cultivadas a 0,1 mM de K^+ y en las plantas *lkt1* se producía una disminución del K^+ interno y por tanto de las cargas positivas aportadas por éste. Al mismo tiempo se observó un incremento en la concentración Mg^{2+} (Figura 23) que podía compensar el déficit de carga positiva y de osmolitos. Se estudió si otros cationes como Ca^{2+} y Na^+ mostraban un comportamiento similar. Para determinar qué parte de la disminución de K^+ se podía compensar por el aumento en otros cationes se cuantificó el contenido como $mEq\ g_{DW}^{-1}$ de Mg^{2+} , Ca^{2+} y Na^+ (Tabla 21). También se calculó cuanto K^+ era compensado por estos cationes. En las raíces, el incremento de la concentración de Mg^{2+} compensaba el 70 % del descenso de K^+ (Tabla 21). El Na^+ compensaba hasta el 20 % de la pérdida de K^+ mientras que el Ca^{2+} tiene una menor implicación en la compensación (1-5 %). En la parte aérea, el Ca^{2+} y no el Mg^{2+} es el que cumple el papel principal en la compensación (32%-47% del K^+ fue sustituido por Ca^{2+}). Por tanto, el Mg^{2+} fue el principal catión inorgánico implicado en reemplazar el K^+ en las raíces.

Tabla 21: Concentración miliequivalente ($mEq\ g_{DW}^{-1}$) en parte aérea y raíz de plantas WT, *lkt1-1* y *lkt1-2* crecidas a 0,1 y 1,4 mM de K^+ y sustitución de K^+ por Mg^{2+} , Ca^{2+} y Na^+ .

Tejido	K ⁺ en solución (mM)	Genotipo	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	% de K ⁺ perdido que ha sido reemplazado por:			Total mEq/g_{DW}^{-1}
							Mg ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	
Parte aérea	0,1	WT	0.43 ± 0.02	0.51 ± 0.02	2.12 ± 0.06	0.06 ± 0.01				3.11 ± 0.11
		<i>lkt1-1</i>	0.45 ± 0.03	0.48 ± 0.02	2.01 ± 0.09	0.05 ± 0.01				2.99 ± 0.15
		<i>lkt1-2</i>	0.39 ± 0.01	0.48 ± 0.01	1.85 ± 0.07	0.04 ± 0.01				2.76 ± 0.10
	1,4	WT	1.22 ± 0.02	0.45 ± 0.01	1.83 ± 0.03	0.03 ± 0.01	8.06*	36.32	4.12	3.52 ± 0.06
		<i>lkt1-1</i>	0.85 ± 0.04	0.48 ± 0.03	2.00 ± 0.07	0.03 ± 0.01	10.19**	47.62	0.74	3.36 ± 0.14
		<i>lkt1-2</i>	0.87 ± 0.02	0.47 ± 0.01	1.94 ± 0.08	0.03 ± 0.01	7.98**	31.96	0.98	3.31 ± 0.12

Raíz	0,1	WT	0.49 ± 0.01	1.32 ± 0.04	0.36 ± 0.01	0.24 ± 0.02				2.41 ± 0.08
		<i>lkt1-1</i>	0.43 ± 0.02	1.24 ± 0.03	0.40 ± 0.02	0.20 ± 0.02				2.27 ± 0.08
		<i>lkt1-2</i>	0.40 ± 0.02	1.20 ± 0.06	0.38 ± 0.01	0.21 ± 0.01				2.19 ± 0.09
	1,4	WT	1.49 ± 0.03	0.57 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.03 ± 0.01	74.00	1.80	20.57	2.45 ± 0.06
		<i>lkt1-1</i>	0.80 ± 0.03	1.10 ± 0.04	0.38 ± 0.02	0.07 ± 0.01	76.02	4.71	5.71	2.35 ± 0.10
		<i>lkt1-2</i>	0.76 ± 0.06	1.08 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.05 ± 0.01	68.47	1.67	2.52	2.24 ± 0.12

*Calculado como $100 \cdot (C_{0,1K} - C_{1,4K}) / (K_{1,4} - K_{0,1K})$. C= es la concentración mEq del catión analizado. Representa la ratio entre el incremento en mEq aportado por cationes inorgánicos en relación con la pérdida de K⁺ debido al crecimiento en solución de 0,1 mM K⁺ en plantas WT.

**Calculado como $100 \cdot (C_{lkt1} - C_{WT}) / (K_{WT} - K_{lkt1})$. C = es la concentración mEq del catión analizado. Representa la ratio entre el incremento en mEq aportado por cationes inorgánicos en relación a la pérdida de K⁺ debido a la mutación *lkt1*.

Los efectos sobre los contenidos de Mg²⁺ en las plantas *lkt1* resultaron interesantes y se decidió estudiar si éstos se observaban también en las plantas de Arabidopsis K⁺ mutantes en el homólogo AKT1. Para ello, se determinó el contenido de Mg²⁺ en plantas de Arabidopsis WT y mutante *akt1*, cultivadas bajo diferentes concentraciones de K⁺ (Figura 24). El análisis de las plantas cultivadas a 0.1 y 1.4 mM de K⁺ mostró que *akt1* acumulaba menos K⁺ y más Mg²⁺ que las plantas WT en las raíces en ambos tratamientos (Figura 24B y 24D). El mismo fenotipo se observó en la parte aérea, excepto en las plantas crecidas a 1,4 mM de K⁺. En este último caso, el contenido de Mg²⁺ en la parte aérea fue similar en las plantas WT y *akt1* (Figuras 24A y 24C). Hay que resaltar que, a diferencia de las plantas de tomate, en las plantas de Arabidopsis las diferencias más importantes en los contenidos de K⁺ y Mg²⁺ entre las líneas WT y *akt1* se observaron cuando éstas se cultivaron a 0.1 mM de K⁺. En este sentido, el contenido de Mg²⁺ se incrementó un 100 % en las raíces *akt1* comparado con las WT, mientras que a 1.4 mM K⁺, el incremento sólo fue del 50 % (Figura 24D).

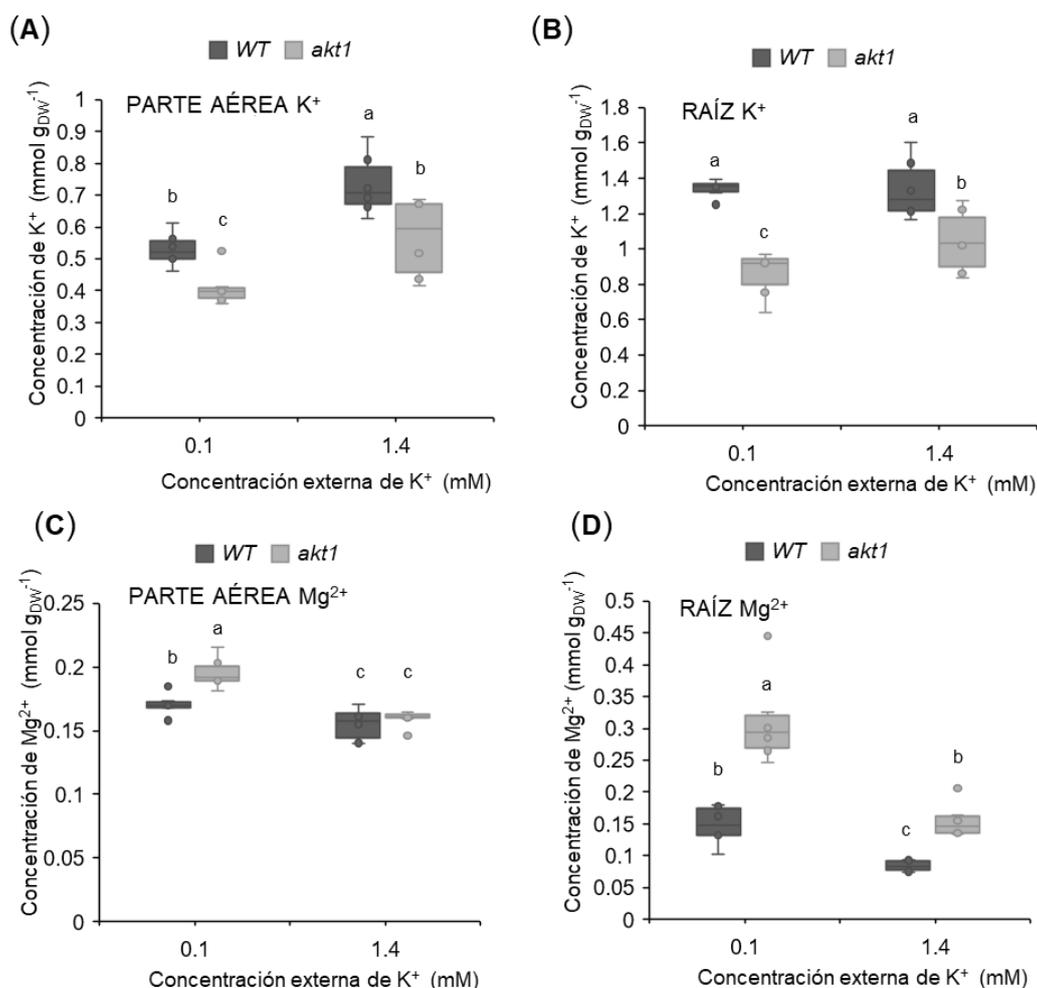


Figura 24 Contenido de K⁺ y Mg²⁺ en partes aéreas y raíces de plantas WT y *akt1* de *Arabidopsis* crecidas a 0.1 y 1.4 mM K⁺ durante 35 días. Contenido de la parte aérea (A) y raíz (B) de plantas WT y *akt1* de *Arabidopsis*. Contenido de Mg²⁺ de parte aérea (C) y raíz (D) de plantas WT y *akt1* de *Arabidopsis*. Los datos se muestran en diagramas de cajas (n=6). Las letras indican grupos homogéneos de datos agrupados a p < 0,05 según la prueba post-hoc de LSD (realizada tras ANOVA).

4.1.2 Contribución de LKT1 a la absorción de K⁺ a concentraciones externas en el rango milimolar

Tras los primeros resultados, se investigó si el bajo contenido de K⁺ observado en las raíces de plantas *lkt1* era debido a una menor capacidad de absorción del K⁺ por parte de la raíz. Para ello, se cosecharon en dos tiempos diferentes plantas WT, *lkt1-1* y *lkt1-2* que habían crecido a 1,4 mM de K⁺, con el objetivo de calcular las tasas netas de absorción de K⁺. Los resultados de los experimentos mostraron que la tasa neta de absorción de K⁺ de las plantas *lkt1*

fue aproximadamente un 50% menor que en las plantas WT (Figura 25A). Un análisis más detallado de la función de LKT1 en la raíz se llevó a cabo a nivel celular, mediante el uso de microelectrodos simples que fueron introducidos en células individuales de la raíz para determinar su potencial eléctrico con respecto al exterior. Este enfoque, permite identificar las concentraciones externas de K^+ a las que LKT1 es el principal sistema implicado en su transporte a través de la raíz. En este caso, la absorción de K^+ se dedujo de la magnitud de la despolarización de la membrana inducida por un aumento de la concentración externa de K^+ . Las despolarizaciones de membrana inducidas por K^+ en las células radicales de *lkt1-1* y *lkt1-2* fueron de menor magnitud que en las WT bajo todas las concentraciones de K^+ administradas (Figura 25B). La máxima diferencia entre WT y las líneas mutantes se observó a 2.5 mM K^+ (los valores de despolarización mostraron una reducción del 75% y el 66% en las raíces de *lkt1-1* y *lkt1-2*, respectivamente). Las despolarizaciones de la membrana fueron menores en las raíces *lkt1-1* y *lkt1-2* que en la línea WT incluso cuando la solución administrada era de 20 mM de K^+ . El ajuste de los datos de despolarización de la membrana frente a la concentración externa de K^+ se llevó a cabo mediante la ecuación de Michaelis-Menten. De estos ajustes se dedujeron unos valores de K_m aparente de $1,3 \pm 0,3$ mM, $13 \pm 3,7$ mM y $6,4 \pm 1,9$ mM K^+ para las raíces WT, *lkt1-1* y *lkt1-2*, respectivamente (Figura 25B). Las despolarizaciones máximas inducidas por K^+ (D_{max}) fueron 37.5 ± 2.0 , $39,7 \pm 6.1$ y $31,07 \pm 3.9$ mV para raíces de WT, *lkt1-1* y *lkt1-2*, respectivamente. Por tanto, la mutación *lkt1* redujo de forma considerable la afinidad aparente del transporte de K^+ en las raíces de tomate, mientras que la despolarización máxima por K^+ (D_{max}) no se alteró. En general, estos datos indicaban que LKT1 es un componente importante en el transporte de K^+ a través de la raíz en condiciones de disponibilidad suficiente de K^+ .

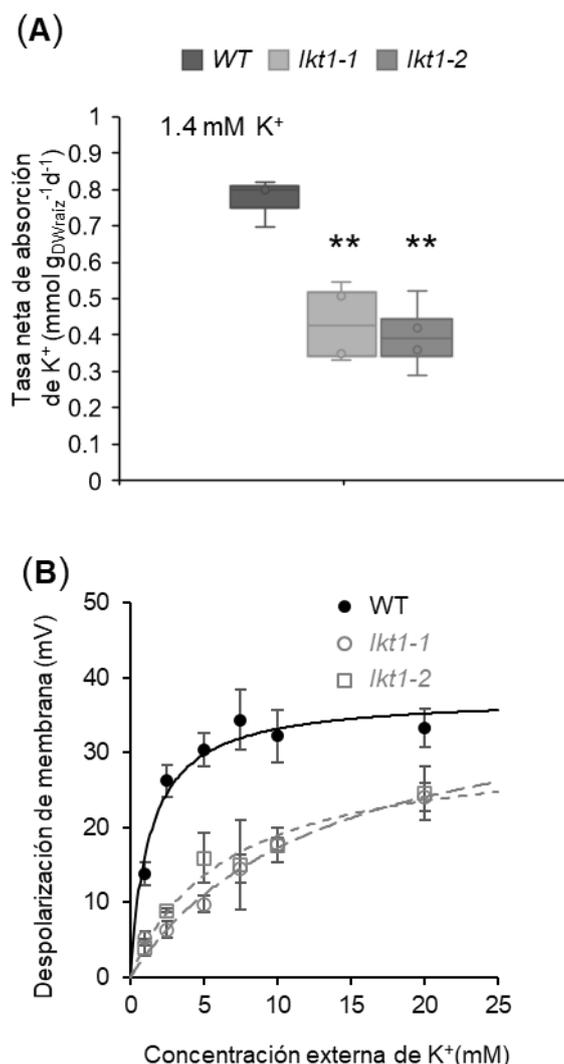


Figura 25: Absorción de K⁺ en plantas WT y *lkt1*. (A) Tasa de absorción neta de K⁺ en plantas WT, *lkt1-1* y *lkt1-2* calculada a partir del incremento en el contenido de K⁺ de la planta entre dos cosechas (día 14 y día 21 de crecimiento de la planta) según está descrito en (M. Nieves-Cordones et al., 2010). Los datos se muestran en diagramas de cajas (n = 4). ** indican un valor de p < 0,01 en Student's t test. (B) Absorción de K⁺ medida como despolarizaciones de membrana de células de la epidermis y el córtex de la raíz de plantas WT, *lkt1-1* y *lkt1-2* estimuladas por el aumento de las concentraciones externas de K⁺. Las medidas se realizaron mediante la introducción de microelectrodos individuales en raíces de plantas de 14 a 21 días cultivadas en solución 1/5 de Hoagland a 1,4 mM K⁺. Los datos se ajustaron a la cinética de Michaelis-Menten (R² de 0,93, 0,97 y 0,99 para los datos de WT, *lkt1-1* y *lkt1-2*, respectivamente). Los valores de K_m fueron 1,3 ± 0,3 mM 13,0 ± 3,7 mM y 6,4 ± 1,9 mM K⁺ para WT, *lkt1-1* y *lkt1-2*, respectivamente. Los valores (D_{max}) fueron 37,5 ± 2,0 mV, 39,7 ± 6,1 mV y 31,07 ± 3,9 mV para WT, *lkt1-1* y *lkt1-2*, respectivamente. Los datos son valores medios de al menos tres repeticiones y las barras de error representan la error estándar.

4.1.3 Las plantas *lkt1* son hipersensibles a altas concentraciones de Mg^{2+}

Como se ha visto en apartados anteriores, las plantas *lkt1* presentaban más Mg^{2+} en la raíz que las plantas WT. Por ello, se evaluó si diferentes concentraciones externas de Mg^{2+} afectaban a la acumulación de K^+ y Mg^{2+} en los diferentes órganos de plantas WT y *lkt1*. Para este estudio, las plantas se cultivaron bajo tres concentraciones diferentes de Mg^{2+} : 0,05, 0,35 y 20 mM. En todos, los casos la concentración de K^+ del medio fue de 1,4 mM. La concentración estándar de Mg^{2+} en la solución modificada de Hoagland (1/5 Hoagland) utilizada de forma estándar en esta tesis, es de 0,35 mM.

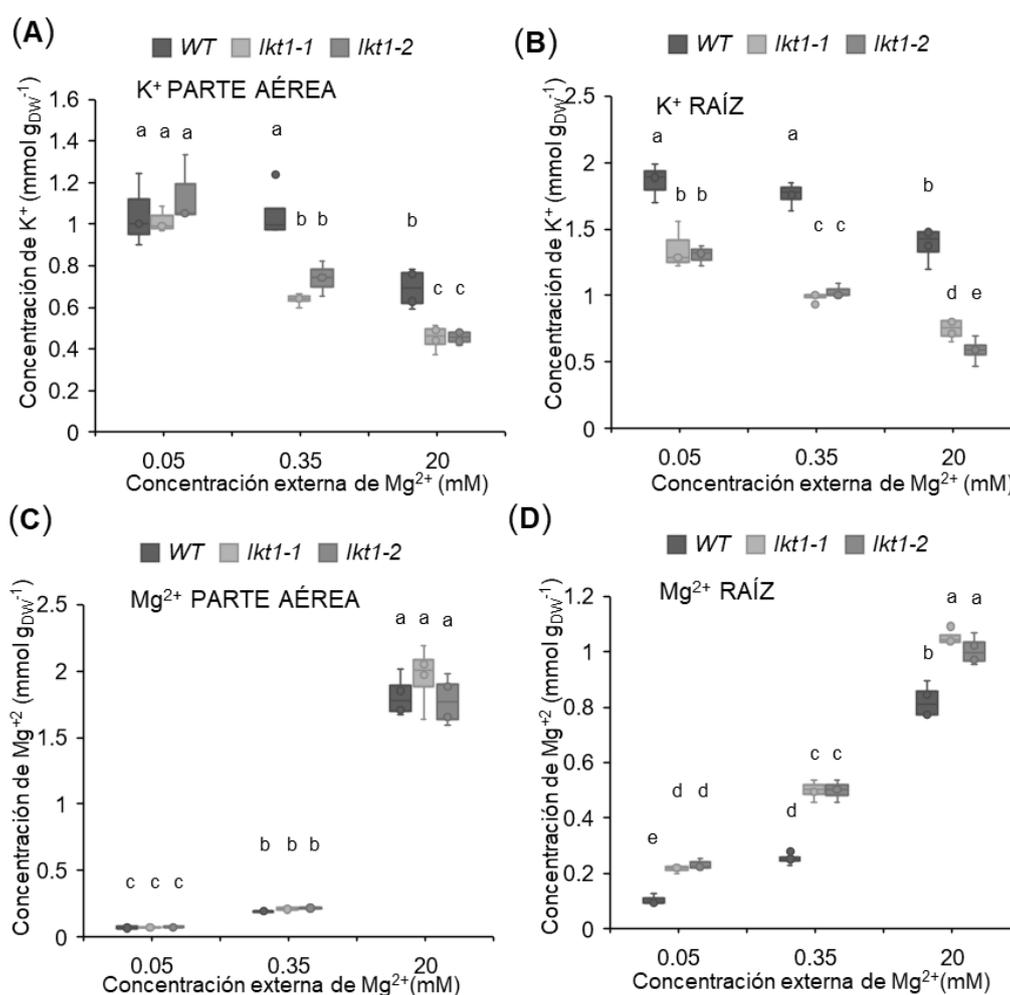
El análisis del contenido de iones puso de manifiesto que el contenido de K^+ era similar en la parte aérea de las plantas WT y *lkt1* cuando éstas eran cultivadas en el medio que contenía una concentración de 0,05 mM de Mg^{2+} (Figura 26A). Sin embargo, cuando las plantas eran cultivadas en medios con 0,35 y 20 mM de Mg^{2+} , el contenido de K^+ en la parte aérea fue menor en las plantas *lkt1* que en las plantas WT (Figura 26A).

Respecto a la raíz, las plantas *lkt1* presentaron menor contenido de K^+ comparado con las plantas WT bajo todas las condiciones de Mg^{2+} utilizadas en el experimento (Figura 26B). Al igual que en el caso de la parte aérea, el contenido más bajo de K^+ en la raíz se dio cuando las plantas eran cultivadas a 20 mM de Mg^{2+} y esto ocurría tanto para WT como para *lkt1* (Figura 26B). Merece la pena destacar que el contenido de K^+ fue más elevado en la parte aérea y la raíz de las plantas *lkt1* cultivadas a 0,05 mM Mg^{2+} que cuando fueron cultivadas a una concentración estándar (Figura 26A y 26B). Por tanto, la conclusión que podemos obtener es que cuando la concentración externa de Mg^{2+} es muy baja, las plantas *lkt1* son capaces de acumular más K^+ , tanto en la parte aérea como en la raíz. Por su parte, la concentración de K^+ en la parte aérea y raíz de plantas WT es similar a 0,05 mM y a 0,35 mM Mg^{2+} . Estos resultados indican que el K^+ y el Mg^{2+} compiten por entrar en la raíz en ausencia de LKT1.

También se han analizado los valores de Mg^{2+} en los tejidos. El contenido de Mg^{2+} en la parte aérea fue similar en ambos genotipos bajo las tres condiciones experimentales probadas (Figura 26C). Sin embargo, en la raíz sí se observaron diferencias y las raíces de plantas *lkt1* presentaron un contenido

de Mg^{2+} más elevado que las WT, independientemente de la concentración externa de Mg^{2+} (Figura 26D).

Con respecto a los pesos secos de la parte aérea y la raíz, los valores fueron similares en ambos genotipos a las concentraciones de 0,05 y 0,35 mM de Mg^{2+} , mientras que a 20 mM de Mg^{2+} , las plantas *lkt1* mostraron una disminución importante en el peso seco en ambos órganos (aproximadamente del 60%) comparado con el de plantas WT (Figura 26E y 26F). Además, y a diferencia de las plantas WT, las plantas *lkt1* desarrollaron clorosis en los márgenes de las hojas (Figura 26G). Por tanto, la presencia de LKT1 se ha mostrado fundamental para hacer frente a la presencia de altas concentraciones de Mg^{2+} .



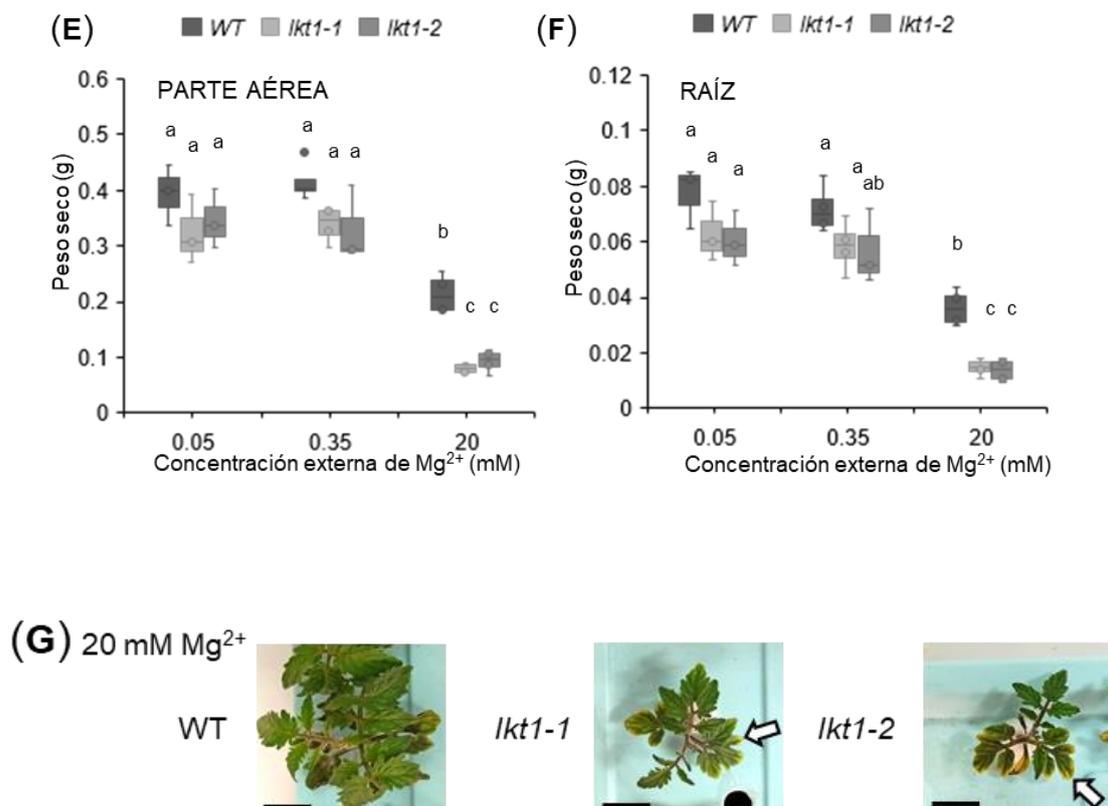


Figura 26: Concentración de K⁺ y Mg²⁺ y peso seco de plantas WT, *lkt1-1*, *lkt1-2* crecidas bajo tres condiciones diferentes de Mg²⁺ (0,05, 0,35 y 20 mM Mg²⁺) durante 14 días. (A) Concentración de K⁺ en la parte aérea. (B) Concentración de K⁺ en raíz. (C) Concentración de Mg²⁺ en la parte aérea. (D) Concentración de Mg²⁺ en raíz. (E) Peso seco de la parte aérea. (F) Peso seco de la raíz. Fotografías de plantas WT, *lkt1-1* y *lkt1-2* crecidas a 20 mM de Mg²⁺. Las flechas indican las zonas cloróticas de la hoja. Barra de escala = 2 cm. Los datos se muestran en gráficos de cajas (n =4-6). Las letras indican grupos homogéneos de datos agrupados a p < 0,05 según la prueba post-hoc de LSD (realizada tras ANOVA).

4.1.4 La actividad de LKT1 es incrementada debido a la interacción con los complejos SICIPK23-SICBL1/9

Para profundizar en los mecanismos de regulación del canal LKT1, se utilizaron sistemas de expresión heteróloga. En estudios previos realizados en *Arabidopsis*, cebada y arroz, se había descrito que los complejos CIPK23-CBL1/9 activaban el transporte de K⁺ a través de proteínas homólogas a LKT1 (Boscari et al., 2009; Cuéllar et al., 2010; Geiger et al., 2009; J. Li et al., 2014;

Xu et al., 2006). Para comprobar que una ruta similar estaba operando en tomate, se expresaron el canal LKT1 y diversas proteínas reguladoras del complejo CIPK-CBL, en ovocitos de *Xenopus laevis*. Utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos, en inglés two-electrode voltage-clamp (TEVC), se estimaron las corrientes a través de la membrana plasmática que generaba la entrada de K^+ desde soluciones con distintas concentraciones del mismo y a distintos voltajes. Cuando se expresó LKT1 en ausencia de complejos CIPK-CBL se observaron corrientes que se activaban lentamente con el tiempo (Figura 27A y 27D). Estas corrientes se inhibieron por completo tras añadir 10 mM de Cs^+ , lo que indicaba que estaban mediadas por LKT1, ya que este canal se bloquea fuertemente por Cs^+ (Hartje et al., 2000). Sin embargo, cuando la expresión de LKT1 se realizó junto con los complejos SICIPK23-SICBL1 y SICIPK23-SICBL9, se produjo un incremento de la magnitud de la corriente (600 % y 100 %, respectivamente) (Figuras 27A – 27D). Merece la pena destacar que, cuando se expresó LKT1 sólo con una de las proteínas del complejo (SICIPK23 o SICBL1) no se observó un claro incremento de la amplitud de la corriente y por tanto de la actividad de LKT1 (Figura 27D). Respecto a las cinéticas del canal, se observó que los tiempos de activación y desactivación del canal LKT1 fueron más cortos en presencia de SICIPK23-SICBL1 y SICIPK23-SICBL9 (66 % y 40 % respectivamente), que cuando estaba presente solo LKT1 (Figura 27E y 27F). Además, la presencia de los complejos permitió la apertura de los canales a potenciales menos negativos de acuerdo con las ecuaciones de Boltzmann (Figura 27G). Por tanto, de estos experimentos se pueden deducir dos conclusiones. En primer lugar, SICIPK23-SICBL1/9 aumenta notablemente la sensibilidad del canal LKT1 al potencial eléctrico de la membrana. En segundo lugar, SICIPK23-SICBL1 contribuye de forma más importante al aumento de la actividad de LKT1 que SICIPK23-SICBL9.

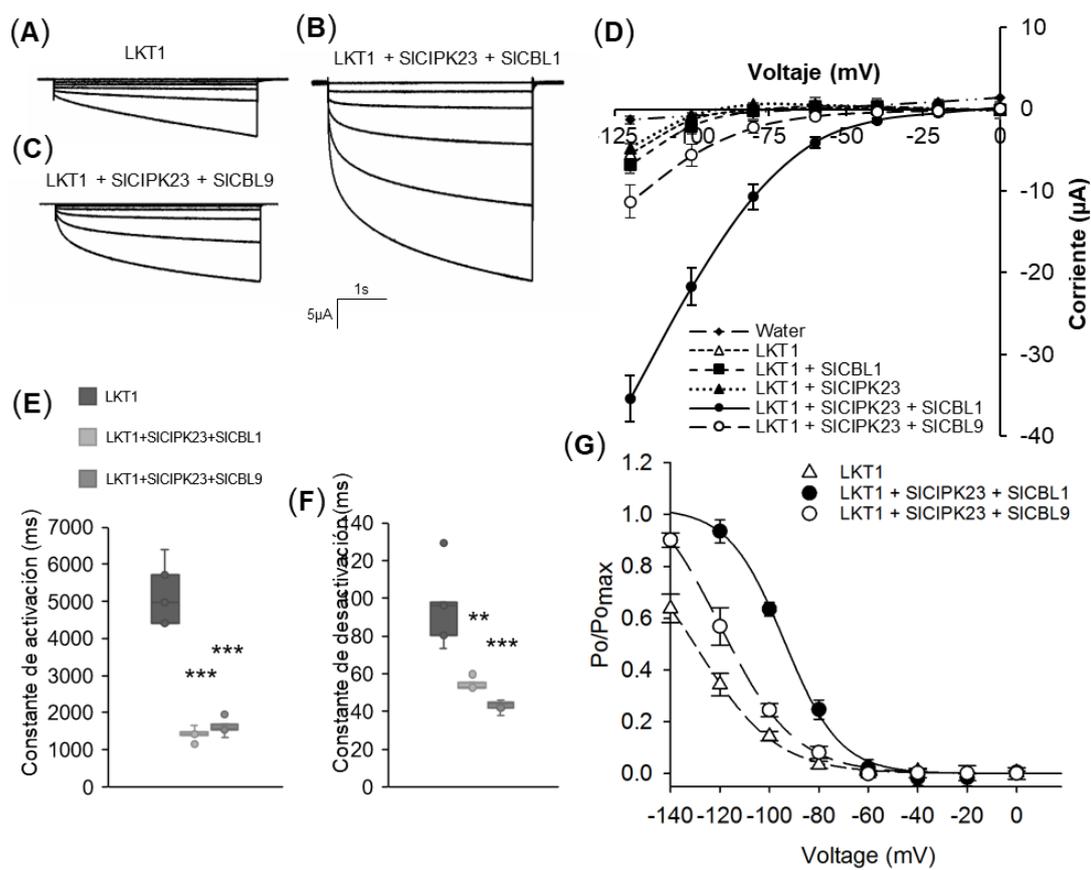


Figura 27: Caracterización electrofisiológica de LKT1-SICIPK23-SICBL1/9 en ovocitos de *Xenopus*. Corrientes representativas de los ovocitos que expresan LKT1 (A), LKT1 + SICIPK23 + SICBL1 (B) y LKT1 + SICIPK23 + SICBL9 (C). (D) Curvas Corriente / voltaje obtenidas al final de los pulsos de hiperpolarización (ver apartado 3.2.7 de materiales y métodos). Constantes de activación (E) y desactivación (F) de la actividad del canal en ovocitos que expresan LKT1, LKT1 + SICIPK23 + SICBL1 y LKT1 + SICIPK23 + SICBL9. Los datos se muestran en gráficos de cajas (n = 5) ** y *** indican $p < 0,01$ y $p < 0,001$ en el test t de Student, respectivamente. (G) Probabilidades relativas de apertura de LKT1, LKT1 + SICIPK23 + SICBL1 y LKT1 + SICIPK23 + SICBL9. Representación de la media de los valores de 5-7 repeticiones y del error estándar (barras de error) (G).

Otro de los sistemas de expresión heteróloga que se ha utilizado para caracterizar la interacción entre proteínas ha sido la complementación bimolecular fluorescente (BiFC) en hojas de *N. benthamiana*. Estos experimentos han permitido comprobar, mediante la reconstitución de la proteína fluorescente (Waadt et al., 2008), la interacción directa entre las proteínas utilizadas en los experimentos con los ovocitos de *Xenopus*.

Como control positivo del experimento, se ha usado AtSOS1 (Núñez-Ramírez et al., 2012). Se ha descrito previamente que AtSOS1 forma dímeros. De esta manera, cuando AtSOS1-nYFP y AtSOS1-cYFP interactúan, se observa la fluorescencia que emite YFP al ser excitada por el láser del microscopio. Los resultados mostraron que LKT1 interactuaba con SICIPK23, pero no con SICBL1 ni con SICBL9 (Figura 28). Además, también se observó que SICIPK23 era capaz de interactuar con SICBL1 y SICBL9. Por tanto, SICIPK23 puede actuar como puente en el sistema canal-CIPK-CBL y llevar a cabo la activación del canal.

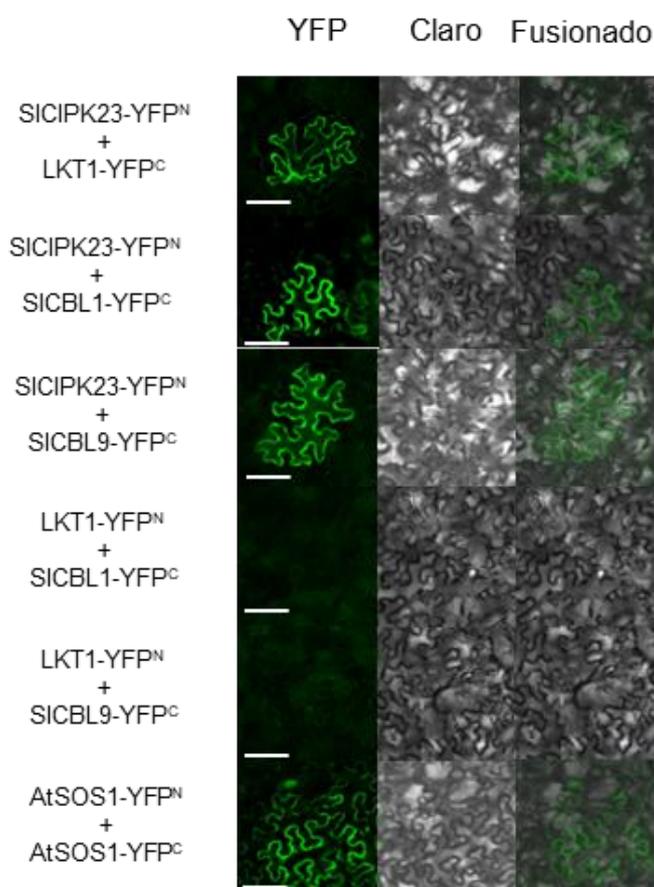


Figura 28: Visualización de la interacción entre proteínas de los complejos LKT1-SICIPK23-SICBL1/9 en ensayos de BiFC. Cada proteína se fusionó o al extremo N-terminal (YFP^N) o al extremo C-terminal (YFP^C) de la proteína amarilla fluorescente (YFP), y las interacciones fueron ensayadas mediante la co-expresión de las proteínas de fusión YFP^N e YFP^C en las hojas de *Nicotiana benthamiana* tal y como se ha indicado en el apartado de Materiales y Métodos. AtSOS1-YFP^N + AtSOS1-YFP^C se usó como control positivo. Para cada construcción se muestra la señal YFP, la imagen de campo claro y una fusión de ambas. Barra de escala = 100 μ m.

4.1.5 SIHAK5 es activado por los complejos SICIPK23-SICBL1/9

En estudios previos se ha descrito que el transportador de K^+ de *Arabidopsis* AtHAK5 es activado en levaduras por el complejo AtCIPK23-AtCBL1/9 (Ragel et al., 2015). Para comprobar si los complejos homólogos de tomate, SICIPK23-SICBL1/9 son capaces de regular SIHAK5, se han realizado experimentos de complementación a bajo K^+ haciendo uso de la cepa 9.3 de levadura descrita en el apartado de materiales y métodos, que carece de los sistemas endógenos para el transporte de K^+ TRK1 y TRK2. El transportador nativo SIHAK5 no se ha mostrado funcional en levadura. Sin embargo, una quimera de SIHAK5, qSIHAK5, que contiene los primeros 18 residuos del transportador de pimiento CaHAK1 del extremo N-terminal, sí que se ha mostrado funcional (M. Nieves-Cordones et al., 2008). Para los ensayos de complementación se han utilizado tanto la proteína nativa SIHAK5 como la versión quimérica, qSIHAK5 (Nieves-cordones et al 2008). Las levaduras que expresaban qSIHAK5 junto con el complejo SICIPK23-SICBL1/9 proliferaron en el medio con bajo K^+ (0,1 mM K^+), mientras que para el resto de las construcciones no se observó crecimiento (Figura 29). Cabe destacar que las levaduras que expresaban el transportador qSIHAK5 junto con el complejo SICIPK23-SICBL9 experimentaron un crecimiento más rápido que aquellas que expresaban qSIHAK5 junto con el complejo SICIPK23-SICBL1 (Figura 29). El rápido crecimiento de todas las cepas de levadura en el medio que contiene 50 mM de K^+ demuestra que los fenotipos observados eran dependientes del K^+ . Por tanto, en estos experimentos, el transportador qSIHAK5 ha sido activado por SICIPK23-SICBL1/9, mientras que SIHAK5 ha permanecido inactivo en levaduras como ya estaba descrito (M. Nieves-Cordones et al., 2008; Ragel et al., 2015). Gracias a que qSIHAK5 contiene solo una pequeña modificación en el segmento N-terminal y todos los componentes implicados en la permeabilidad del K^+ a través de la membrana y la regulación de este estarían intactos, la regulación de qSIHAK5 por SICIPK23-SICBL1/9 puede ser válida para el transportador nativo SIHAK5 en la planta de tomate.

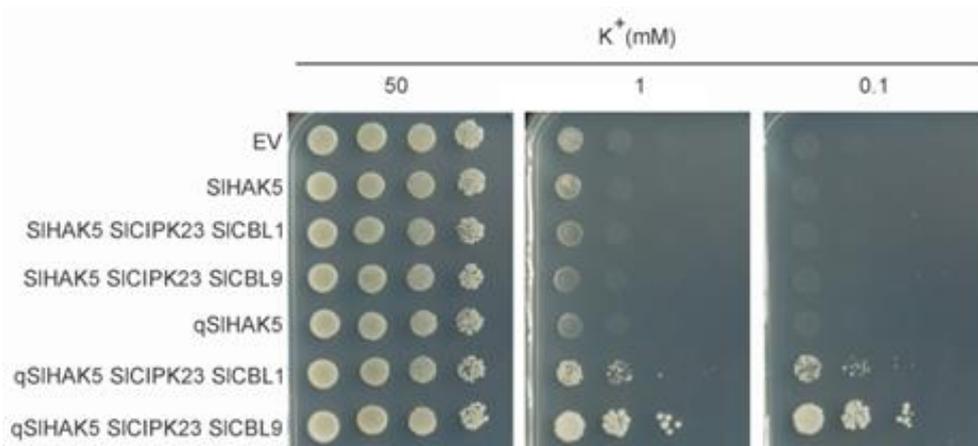


Figura 29: Crecimiento de levaduras que expresan el transportador de K⁺ SIHAK5 o la construcción quimérica qSIHAK5 en presencia o ausencia de los complejos SICIPK23/SICBL1 o SICIPK23/SICBL9 en medio AP. La cepa 9.3 de levadura, deficiente en los transportadores endógenos de K⁺ TRK1 y TRK2, se transformó con vectores vacíos (EV) o con los vectores que contenían el cADN de las proteínas indicadas en la columna de la izquierda. Diez microlitros de suspensiones de levaduras procedentes de diluciones seriadas (1, 1/10, 1/100 y 1/1000) se pipetearon en medio mínimo AP suplementado con las concentraciones de K⁺ indicadas. (primera gota empezando por la izquierda OD₆₀₀ = 1)

4.1.6 SICIPK23 regula la absorción de K⁺ en la planta mediada por LKT1 y SIHAK5

Con el objetivo de demostrar la mediación de SICIPK23 en la activación de ambos sistemas de transporte de K⁺ LKT1 y SIHAK5 en la planta, se caracterizó un mutante nulo *slcipk23* que se obtuvo mediante el uso de la herramienta CRISPR-Cas. Para ello se diseñó una secuencia guía de ARN (sgARNs) que dirigieron la endonucleasa Cas9 al locus de *SICIPK23* para generar una rotura de la doble hélice (Figura 16, Materiales y Métodos). Tras ello, se seleccionó una línea que contenía mutaciones que alteraban la fase de lectura del gen *SICIPK23* (Tabla 17, Materiales y Métodos). La contribución de SICIPK23 a la regulación de LKT1 ha sido estudiada en plantas que crecieron en condiciones de K⁺ suficiente (la cosecha de material vegetal para su análisis se realizó tras 14 días de crecimiento en medio hidropónico). Por su parte, la

contribución de SICIPK23 a la regulación de SIHAK5 se estudió en plantas ayunadas de K^+ mediante la medida del transporte de Rb^+ a una concentración externa de 0,02 mM. De esta manera, las plantas de tomate se crecieron durante 14 días a 1,4 mM de K^+ , y durante 14 días a 1,4 mM de K^+ más 7 días de ayuno de K^+ ($[K^+]_{ext} = 0,003$ mM). Tras la cosecha se analizó la concentración iónica de las plantas. Dicho estudio reveló que la concentración de K^+ era similar en la parte aérea y en la raíz tanto en las plantas WT como en las plantas *slcipk23* cuando las plantas eran ayunadas una semana de K^+ (Figura 30A y 30B). Sin embargo, el contenido de K^+ era diferente en los diferentes órganos entre las plantas WT y *slcipk23* cuando estas se cultivaban a 1,4 mM de K^+ , siendo más bajo en la parte aérea y la raíz de plantas *slcipk23* (Figura 30A y 30B).

Tras analizar la concentración de K^+ , también se analizó el contenido de Mg^{2+} . En este caso, el contenido en la parte aérea de plantas ayunadas fue menor en las plantas *slcipk23* que en las WT. También en la parte aérea los valores fueron similares en los dos genotipos cuando las plantas se cultivaron a 1,4 mM de K^+ (Figura 30C). En la raíz no se observaron diferencias en la concentración de Mg^{2+} cuando las plantas se cultivaron en condiciones de ayuno de K^+ . Sin embargo, sí que se observaron diferencias en la concentración de Mg^{2+} en la raíz cuando las plantas se crecieron a 1,4 mM de K^+ . En este caso, la concentración de Mg^{2+} fue superior en las raíces de *slcipk23*, hasta un 60 %, que en las raíces de plantas WT (Figura 30D). Dado que el crecimiento a 1,4 mM de K^+ dio lugar al mismo perfil en el contenido de K^+ y Mg^{2+} en las raíces y partes aéreas de las plantas *slcipk23* y *lkt1* (Figuras 23 y 30), se ha podido deducir que SICIPK23 es necesaria para la función de LKT1 en aquellas plantas que crecían a 1,4 mM de K^+ .

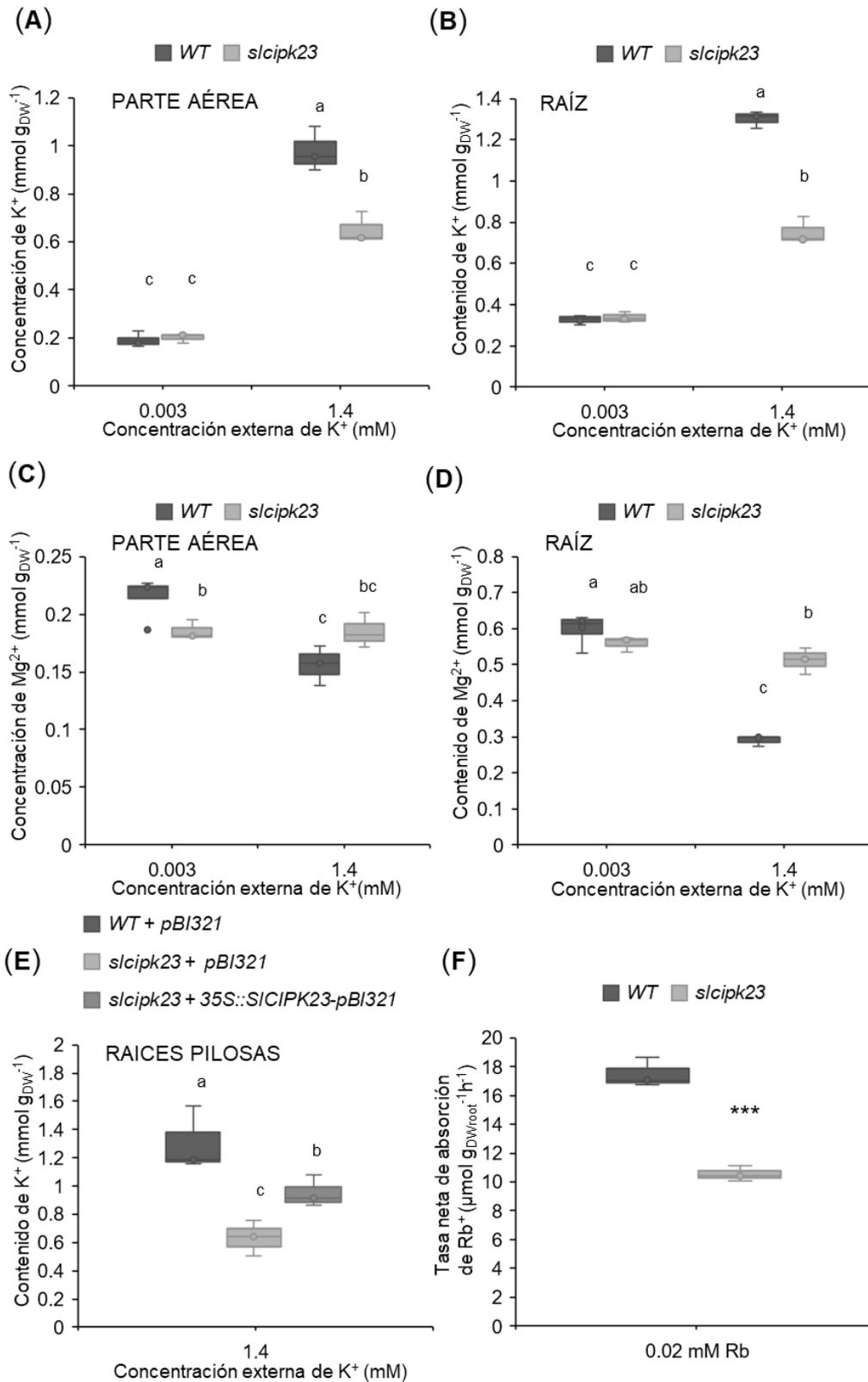


Figura 30: Contribución de SICIPK23 al transporte de K^+ mediado por LKT1 y SIHAK5. Concentración de K^+ y Mg^{2+} en parte aérea y raíz de plantas bajo condiciones de suficiencia o deficiencia de K^+ . Las plantas de tomate fueron cosechadas después de 14 días creciendo a 1,4 mM de K^+ y 14 días a 1,4 mM de K^+ + 7 días en ayuno de K^+

($[K^+]_{ext}$ 0,003 mM). Concentración de K^+ en la parte aérea (A) y en raíz (B) de plantas WT y *slcipk23*. Concentración de Mg^{2+} en la parte aérea (C) y en raíz (D) de plantas WT y *slcipk23*. Concentración de K^+ en raíces pilosas obtenidas de cotiledones de plantas WT transformados con pBI321 (vector vacío) y de cotiledones de plantas *slcipk23* transformados con pBI321 (vector vacío) o 35S::SICIPK23-pBI321 (construcción de complementación) y crecidas en medio 1/5 de Hoagland sólido (E). Tasa neta de absorción de Rb^+ a 0,02 mM en plantas WT y *slcipk23* ayunadas de K^+ .

Para confirmar que el bajo contenido de K^+ en las raíces de *slcipk23* era debido a la mutación del gen *SICIPK23*, se llevó a cabo un ensayo de complementación en la planta, haciendo uso de la generación de raíces pilosas de tomate mediada por *Agrobacterium rhizogenes* (Ron et al., 2014). En trabajos anteriores se ha descrito que algunas de las raíces obtenidas por este método podrían no ser transgénicas (Cheng et al., 2021; Irigoyen et al., 2020; Lin et al., 2011). Con el objeto de calcular el porcentaje de raíces transgénicas obtenidas bajo nuestras condiciones experimentales, se llevó a cabo un test de transformación. Para ello, los cotiledones de plantas WT se infectaron con *A. rhizogenes*, que portaba la construcción 35S::GUS-Int-pBI321. Tras la infección y la generación de raíces, se contabilizó el número de raíces que mostraban expresión del gen *GUS*. Veintitrés raíces de un total de 28 (82%) mostraron expresión *GUS* (Figura 31). En el ensayo de complementación se han obtenido raíces a partir de cotiledones de plantas WT infectados con *A. rhizogenes* transformado con el vector vacío y de cotiledones de plantas *slcipk23* transformados con *A. rhizogenes* transformado con pBI321 o 35S::SICIPK23-pBI321 (construcción de complementación). Las raíces generadas se crecieron durante 14 días en medio sólido 1/5 de Hoagland con una concentración de 1,4 mM de K^+ . Tras este tiempo, fueron cosechadas. Las raíces WT y *slcipk23* transformadas con pBI321 (vector vacío) mostraron un contenido de K^+ similar a las raíces que crecieron en medio hidropónico (Figura 30B), siendo el contenido de K^+ de las raíces de *slcipk23* un 50% menor que el de las raíces WT (Figura 30E). Las raíces transformadas con 35S::SICIPK23-pBI321 mostraron un contenido de K^+ en la raíz más alto que las raíces *slcipk23* transformadas con el vector vacío (0.91 ± 0.09 mmol $K^+_{gdw}^{-1}$ vs 0.63 ± 0.07 mmol $K^+_{gdw}^{-1}$, respectivamente) (Figura 30E). Sin embargo, la complementación observada fue parcial en las raíces 35S::SICIPK23-pBI321 *slcipk23*, ya que no se recuperaban los niveles de K^+ de las raíces WT ($1,31 \pm 0,13$ mmol $K^+_{gdw}^{-1}$). Dado que la

eficiencia de la transformación no es del 100%, es probable que las muestras 35S::SICIPK23-pBI321 *slcipk23* contengan raíces no transgénicas, lo que podría explicar la complementación parcial observada.

Como se ha mencionado anteriormente, la activación de SIHAK5 por parte de SICIPK23 en planta ha sido estudiada mediante un experimento de transporte de Rb^+ . Para este experimento se ha administrado Rb^+ a una concentración de 0,02 mM a un contenedor de plantas WT y *slcipk23* ayunadas de K^+ (Figura 30F). Bajo estas condiciones experimentales, SIHAK5 media el 95% de transporte de Rb^+ (M. Nieves-Cordones et al., 2020). Los resultados del experimento han revelado que las plantas *slcipk23* presentan una reducción del 40% de la tasa de absorción de Rb^+ en comparación con las plantas WT (Figura 30F). Por tanto, se ha concluido que SICIPK23 promueve la activación de SIHAK5 en las raíces de tomate, aunque SIHAK5 mantiene cierta actividad basal en ausencia de SICIPK23.

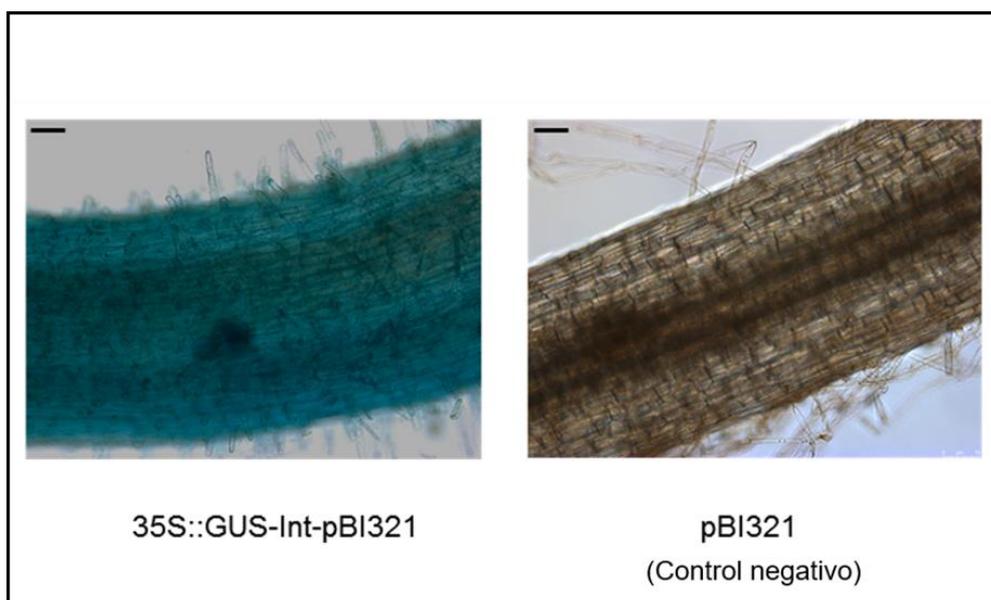


Figura 31: Tinción de GUS de raíces pilosas que expresan 35S::GUS-Int-pBI321 (izquierda) y pBI321 vacío (control negativo) (derecha). Barra de escala = 75 μ m.

DISCUSIÓN

El trabajo realizado durante esta tesis doctoral y estudios previos realizados con SIHAK5 (M. Nieves-Cordones et al., 2020) han permitido desarrollar un modelo para el transporte de K^+ en plantas de tomate que puede ser comparado con los modelos descritos para *Arabidopsis* y arroz (M. N. Nieves-Cordones et al., 2016). Como en las especies mencionadas, el transporte de K^+ en plantas de tomate está también dominado por un transportador tipo HAK5 y un canal de K^+ tipo AKT1. SIHAK5 es el principal sistema de transporte de K^+ operando en las células de la raíz a concentraciones externas de K^+ inferiores a 0,1 mM (M. Nieves-Cordones et al., 2020). A concentraciones superiores, LKT1 que contribuye mayoritariamente al transporte de K^+ . La contribución de LKT1 se dedujo por el bajo contenido de K^+ , la baja tasa de absorción y la baja despolarización de la membrana inducida por K^+ que tuvo lugar en las células de la raíz de plantas *lkt1*, en comparación con las plantas WT (Figuras 24-26). Los parámetros cinéticos de entrada de K^+ en la raíz deducidos de las despolarizaciones inducidas por el K^+ externo mostraron que la mutación KO de *LKT1* afectó a la afinidad aparente por el K^+ pero no a la velocidad máxima del transporte para captar este catión (Figura 25B). En comparación con *Arabidopsis* o arroz, las plantas *lkt1* de tomate mostraron características distintivas. Por ejemplo, la concentración límite a la que el canal de K^+ LKT1 es relevante para la nutrición de K^+ en plantas de tomate (0,1 mM) es un orden de magnitud mayor que la de AKT1 en *Arabidopsis* (0,01 mM) (Pyo et al., 2010; Rubio et al., 2010). En arroz y *Arabidopsis*, el contenido de K^+ en las raíces y en las partes aéreas de las plantas *osakt1* y *akt1* decreció de forma similar debido a la mutación (J. Li et al., 2014). En las plantas de tomate tanto el contenido de K^+ de la raíz como de la parte aérea también se redujeron debido a la mutación *lkt1* (Figuras 24A y 24B). Sin embargo, una diferencia llamativa entre *Arabidopsis* y tomate es que el déficit de K^+ no se compensa en plantas *lkt1* de tomate cultivadas a 20 mM de K^+ (Figura 25B), mientras que sí lo hace en plantas de *akt1* cultivadas a 10 mM (M. Nieves-Cordones et al., 2010; Rubio et al., 2010). Estos resultados indican que hay sistemas de transporte de K^+ en las plantas de *Arabidopsis*, todavía sin identificar, que pueden compensar completamente la ausencia de AKT1 a altas

concentraciones de K^+ , pero estos sistemas no serían suficientemente eficaces en las plantas de tomate.

En sistemas de expresión heteróloga, los complejos CIPK23/CBL1-9 de *Arabidopsis* activaron los sistemas de transporte tipo HAK5 y AKT1 de diferentes especies (Boscari et al., 2009; Cuéllar et al., 2010; Geiger et al., 2009; Ragel et al., 2015; Scherzer et al., 2015; Xu et al., 2006), indicando que estos complejos constituyen un mecanismo de regulación bien conservado en plantas terrestres. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que el complejo SICIPK23-SICBL1/9 incrementa la actividad de LKT1 en ovocitos de *Xenopus* (Figura 27), lo que confirma la presencia de esta vía de regulación en plantas de tomate. En *Arabidopsis*, la subunidad reguladora AtKC1 forma canales heteroméricos con AKT1, produciendo canales con diferentes propiedades de transporte con respecto a los canales AKT1 homoméricos (Duby et al., 2008; Honsbein et al., 2009; Reintanz et al., 2002; Y. Wang et al., 2010). En concreto, AtKC1 evita la salida de K^+ a través de los canales AKT1 en condiciones de bajas concentraciones de K^+ externo (Duby et al., 2008; Geiger et al., 2009). Un homólogo de AtKC1 existe en las plantas de tomate, SIKC1 (Y.-H. Wang et al., 2002) y sería interesante estudiar en el futuro el papel de esta subunidad dentro del modelo de transporte de K^+ en tomate. SICIPK23-SICBL1/9 produjeron valores más bajos de las constantes de activación y desactivación del canal LKT1 (aproximadamente un 66 y 40 % más rápido que con el canal solo, respectivamente) (Figura 27E, 27F). Además, se observó que el complejo SICIPK23-SICBL1/9 aumentaba la probabilidad de apertura del canal para un potencial de membrana determinado (Figura 27G). Por tanto, el complejo SICIPK23-SICBL1/9 tuvo un fuerte impacto positivo en la sensibilidad de LKT1 al voltaje de membrana. Estos efectos del complejo SICIPK23-SICBL1/9 sobre las constantes de activación y desactivación de LKT1 no habían sido descritos anteriormente para otros canales tipo AKT1. En la mayoría de los casos no hay información relativa a las constante de activación y desactivación debido a la ausencia de actividad del canal de K^+ en ausencia de los complejos CIPK23-CBL1/9 (Boscari et al., 2009; Cuéllar et al., 2010; Geiger et al., 2009; Xu et al., 2006). Solo en el caso de OsAKT1, fue posible comparar la actividad de OsAKT1 con OsAKT1 + OsCIPK23 + OsCBL1/9 (J. Li et al., 2014). Se observó un

incremento en las corrientes macroscópicas de OsAKT1 después de su coexpresión con OsCIPK23 + OsCBL1/9, pero no hubo cambios aparentes en las características de apertura en función del voltaje (J. Li et al., 2014). Una cinética de activación y desactivación más rápida de LKT1 en presencia de SICIPK23-SICBL1/9, como se muestra en este trabajo (Figura 27), podría constituir un mecanismo de adaptación a las fluctuaciones en la solución externa, lo que permitiría un rápido ajuste del transporte de K^+ en la raíz ante las nuevas condiciones ambientales. Por tanto, la cinética de los canales de K^+ de la raíz podría ser un aspecto relevante de la nutrición de K^+ de las plantas que requerirá más atención en el futuro.

Los ensayos de BiFC mostraron que SICIPK23 podía actuar como puente entre LKT1 y SICBL9 sin aparente interacción directa entre SICBL1/9 y LKT1 (Figura 28). En *Arabidopsis*, se había observado la interacción directa entre CBL1/9 y AKT1 en ensayos de ubiquitina partida (Grefen & Blatt, 2012). En arroz, la interacción de OsAKT1 con OsCIPK23 se observó en ensayos de BiFC solo si se coexpresaban con OsCBL1 (J. Li et al., 2014). En vid, el canal de K^+ activado por voltaje VvK3.1 también interaccionó con VvCBL4, pero no con VvCIPK3 en experimentos de doble híbrido (M. Nieves-Cordones et al., 2019). Por tanto, podrían existir diferentes tipos de asociaciones entre la proteína diana, CIPK y CBL. Sin embargo, los experimentos mostrados en esta Tesis Doctoral con ovocitos de *Xenopus* muestran que solo la coexpresión de SICIPK23 con SICBL9/1 incrementaba claramente la actividad del canal de K^+ LKT1 (Figura 27D), indicando la necesidad del complejo CIPK-CBL completo para la regulación de LKT1. El hecho de que las plantas *slcipk23* resultaran una fenocopia de las plantas *lkt1* crecidas a 1,4 mM de K^+ (Figuras 24 y 26), sugirió que la actividad de LKT1 en la planta depende totalmente de SICIPK23, sin que participe, aparentemente, otro mecanismo de compensación bajo condiciones de suficiente K^+ cuando SICIPK23 no está presente.

Bajo condiciones de bajo K^+ , SICIPK23 reguló a SIHAK5 para incrementar el transporte de alta afinidad de K^+ . Este transporte fue activado por el complejo SICIPK23-SICBL1/9 en levaduras (Figura 29), y esta vía de regulación también estaba operando en planta ya que la entrada de Rb^+ desde una solución externa con una concentración de 0,02 mM de Rb^+ , se redujo un 40% en plantas *slcipk23*

ayunadas de K^+ (Figura 26F). En este tipo de ensayo, el 95% de la tasa de absorción de Rb^+ depende de SIHAK5 (M. Nieves-Cordones et al., 2020). Sin embargo, a pesar de una importante reducción de la actividad de SIHAK5 en las plantas *slcipk23* (40%), todavía se puede observar una actividad significativa de SIHAK5 en ausencia de la quinasa. En Arabidopsis se han obtenido resultados similares (Ragel et al., 2015), y se han propuesto dos explicaciones. La primera explicación propone que la pérdida de AtCIPK23 puede ser compensada por otras quinasas. De hecho, se ha demostrado que AtHAK5 puede ser activado por AtCIPK1, AtCIPK9 y otras quinasas de la familia AtCIPK, además de por AtCIPK23 (Lara et al., 2020). Otra explicación a estos resultados es que AtHAK5 tiene una actividad basal independiente de su activación por una quinasa CIPK (Ródenas et al., 2021). Estas explicaciones podrían aplicarse también a las plantas de tomate, un aspecto interesante que requiere de más investigaciones. Las bajas tasas de absorción de Rb^+ de las plantas *slcipk23* a 0,02 mM de Rb^+ en comparación con las plantas WT (Figura 26F) contrastan con el contenido similar de K^+ en plantas WT y *slcipk23* tras el periodo de ayuno de K^+ (Figura 26A). Es posible que no haya fenotipo con respecto al contenido de K^+ en plantas *slcipk23* debido a que el impacto de la mutación *slcipk23* sobre el transporte de K^+ de alta afinidad es menor que el de la mutación *slhak5*.

Resulta interesante destacar que los resultados de los experimentos realizados en levaduras con qSIHAK5 mostraron que el complejo SICIPK23-SICBL9 tenía un mayor impacto positivo con respecto a la activación de SIHAK5 que el complejo SICIPK23-SICBL1 (Figura 29). En contraste, los experimentos en ovocitos de *Xenopus* con LKT1 mostraron que el complejo SICIPK23-SICBL1 fue más eficaz activando el canal que el complejo SICIPK23-SICBL9 (Figura 27). Por tanto, se podría especular que las actividades de transporte de LKT1 y SIHAK5 podrían estar moduladas diferencialmente mediante la inclusión de SICBL1 o SICBL9 en el complejo con SICIPK23.

Durante el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral, se ha mostrado que en tomate y en Arabidopsis, la reducción del contenido de K^+ en los tejidos es compensada mayoritariamente por Mg^{2+} . El Mg^{2+} se almacena preferentemente en las vacuolas como una reserva metabólica, lo que permite que la concentración de Mg^{2+} en el citoplasma sea relativamente baja (<1 mM) y

esté bien controlada (Shaul, 2002). De hecho, el Mg^{2+} podría asumir parcialmente funciones desempeñadas por el K^+ relacionadas con el equilibrio de cargas y el control del potencial osmótico en la vacuola y de la célula, minimizando así los efectos negativos de las condiciones de bajo K^+ (Shaul, 2002). Los experimentos realizados durante esta Tesis Doctoral aportan una evidencia de la sustitución química del K^+ por Mg^{2+} en las raíces. Sin embargo, son necesarias más investigaciones para determinar qué funciones del K^+ han sido asumidas por el Mg^{2+} en las células de las plantas con bajo contenido de K^+ . Se sabe que existe un antagonismo K^+ / Mg^{2+} en plantas (Daliparthi et al., 1994; Kabu & Toop, 1970; Koch et al., 2019; Newman et al., 1987; Pujos & Morard, 1997) e investigaciones recientes han empezado a desvelar los mecanismos moleculares implicados en este antagonismo. Un ejemplo de la relación molecular entre la homeostasis de estos dos cationes es el cuarteto de CIPKs de Arabidopsis CIPK3/9/23/26 que, junto con CBL2/3, regulan la acumulación de K^+ (a través del canal vacuolar de K^+ TPK1) (R J Tang et al., 2020) y Mg^{2+} (a través de un sistema de transporte no identificado) (Mogami et al., 2015; Ren Jie Tang et al., 2015) en la vacuola. La señalización de lípidos parece estar implicada también en esta relación ya que la fosfolipasa $D\alpha 1$ es necesaria en Arabidopsis para crecer a altas concentraciones de Mg^{2+} (Kocourková et al., 2020). Cabe destacar que esta adaptación ocurre a través de la regulación de la homeostasis de K^+ (por ejemplo, a través de la inducción de genes como *AtHAK5* o *AtCIPK9*). A nivel de la membrana plasmática, se ha sugerido que los canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNGCs) podrían contribuir tanto al transporte de K^+ como de Mg^{2+} en la raíz, siendo, por tanto, sistemas de transporte candidatos a estar implicados en el antagonismo K^+ / Mg^{2+} (Kobayashi & Tanoi, 2015). Durante esta Tesis Doctoral se intentó profundizar en este tema mediante el estudio de las plantas *lkt1*, ya que éstas mostraron alterada la ratio K^+ / Mg^{2+} en las raíces a altas concentraciones externas de K^+ . El crecimiento de las plantas a bajas concentraciones de Mg^{2+} (0,05 mM) permitió la acumulación de más K^+ en las partes aéreas y raíces de plantas *lkt1* que cuando las plantas se crecieron a la concentración estándar de Mg^{2+} (0,35 mM) (Figura 26A y 26B). Por tanto, en ausencia del canal selectivo de K^+ LKT1, el K^+ y el Mg^{2+} parecen competir para entrar en la raíz. Estas observaciones concuerdan con la existencia de un sistema no selectivo de

transporte que contribuye al transporte de K^+ y Mg^{2+} en la raíz como se ha sugerido para *Arabidopsis* (Caballero et al., 2012; Coskun et al., 2013; Demidchik et al., 2002). Este sistema permitiría una rápida compensación de K^+ con Mg^{2+} si hay un déficit de K^+ . Sin embargo, es necesario seguir investigando para comprender el transporte de Mg^{2+} y su relación con el transporte de K^+ en las plantas.

Además de lo anterior, se observó que LKT1 jugó un papel crítico en plantas de tomate bajo un suministro alto de Mg^{2+} (Figura 26). Las altas concentraciones de Mg^{2+} tienen claros efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas de tomate y *Arabidopsis* (Figura 26) (Kocourková et al., 2020; Ren Jie Tang et al., 2015) y sobre el rendimiento de los cultivos (Qadir et al., 2018). Por tanto, los resultados obtenidos del estudio de LKT1 muestran que los sistemas selectivos de transporte de K^+ son objetivos interesantes para desarrollar plantas tolerantes al exceso de Mg^{2+} .

4.2 CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE SICIPK23 EN LA REGULACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ENTRADA DE Na^+ EN LA RAÍZ

4.2.1 La entrada de Na^+ en plantas ayunadas de K^+ depende de la actividad de SICIPK23

Algunos resultados preliminares realizados durante esta Tesis Doctoral sugerían una mayor acumulación de Na^+ en las plantas de tomate ayunadas de K^+ . Para estudiar si esta acumulación dependía de la quinasa SICIPK23, se analizó el contenido de Na^+ en plantas WT y *slcipk23*. Se utilizaron dos condiciones de cultivo para los experimentos. Por un lado, un grupo de plantas se cultivaron con suficiente K^+ en el medio (1,4 mM K^+ durante 21 días) mientras que otro grupo de plantas se cultivaron en condiciones de ayuno de K^+ durante la última semana (1,4 mM K^+ durante 14 días + 7 días a 0,003 mM de K^+). Es importante mencionar que la concentración de Na^+ en estas soluciones nutritivas era de 90 μ M. Cuando las plantas se cultivaron en el medio con condiciones de

K^+ suficiente, ambos genotipos mostraron concentraciones similares de Na^+ tanto en la raíz como en la parte aérea (Figura 32A y 32B). Sin embargo, en condiciones de ayuno de K^+ , las plantas WT incrementaron el contenido de Na^+ en la parte aérea y la raíz un 100 % y un 550 % respectivamente (Figura 32A y 32B). Este comportamiento respecto a la concentración de Na^+ observado en las plantas WT ayunadas de K^+ fue diferente en las plantas *slcipk23*. La concentración de Na^+ en la parte aérea en el mutante ayunado de K^+ permaneció similar a la de las plantas mutantes 1.4 mM K^+ y el incremento en la concentración de Na^+ de la raíz debido al ayuno de K^+ fue de sólo un 90 %. Estos resultados indicaron que SICIPK23 era necesaria en las plantas de tomate para la entrada de Na^+ bajo condiciones limitantes de K^+ . No obstante, las plantas *slcipk23* mostraban una cierta acumulación de Na^+ por lo que debería también existir un sistema de entrada de Na^+ no regulado por SICIPK23. Es preciso resaltar que, ni las plantas *lkt1* ni las plantas *slhak5* mostraron estas diferencias con respecto a las plantas WT en la concentración de Na^+ interno bajo el ayuno de K^+ (Figura 33). Por tanto, el fenotipo de la concentración reducida de Na^+ bajo condiciones de bajo K^+ fue específico de las plantas *slcipk23*. Después del fenotipo observado en tomate, se comprobó si AtCIPK23 cumplía una función similar en Arabidopsis. Para ello se crecieron plantas WT y *atcipk23* aplicando los mismos tratamientos descritos anteriormente para tomate. Se observó que las plantas WT y *atcipk23* mostraron concentraciones similares de Na^+ tanto en raíz como en parte aérea bajo los dos tratamientos (Figura 32C y 32D). Además, la concentración de Na^+ en la parte aérea no aumentó por el tratamiento de ayuno de K^+ , mientras que sí lo hizo alrededor de un 80 % en las raíces de plantas de Arabidopsis ayunadas de K^+ . En resumen, en comparación con las plantas de tomate, Arabidopsis tenía una capacidad reducida para acumular Na^+ bajo condiciones de ayuno de K^+ y AtCIPK23 no participó en la entrada de Na^+ en plantas de Arabidopsis.

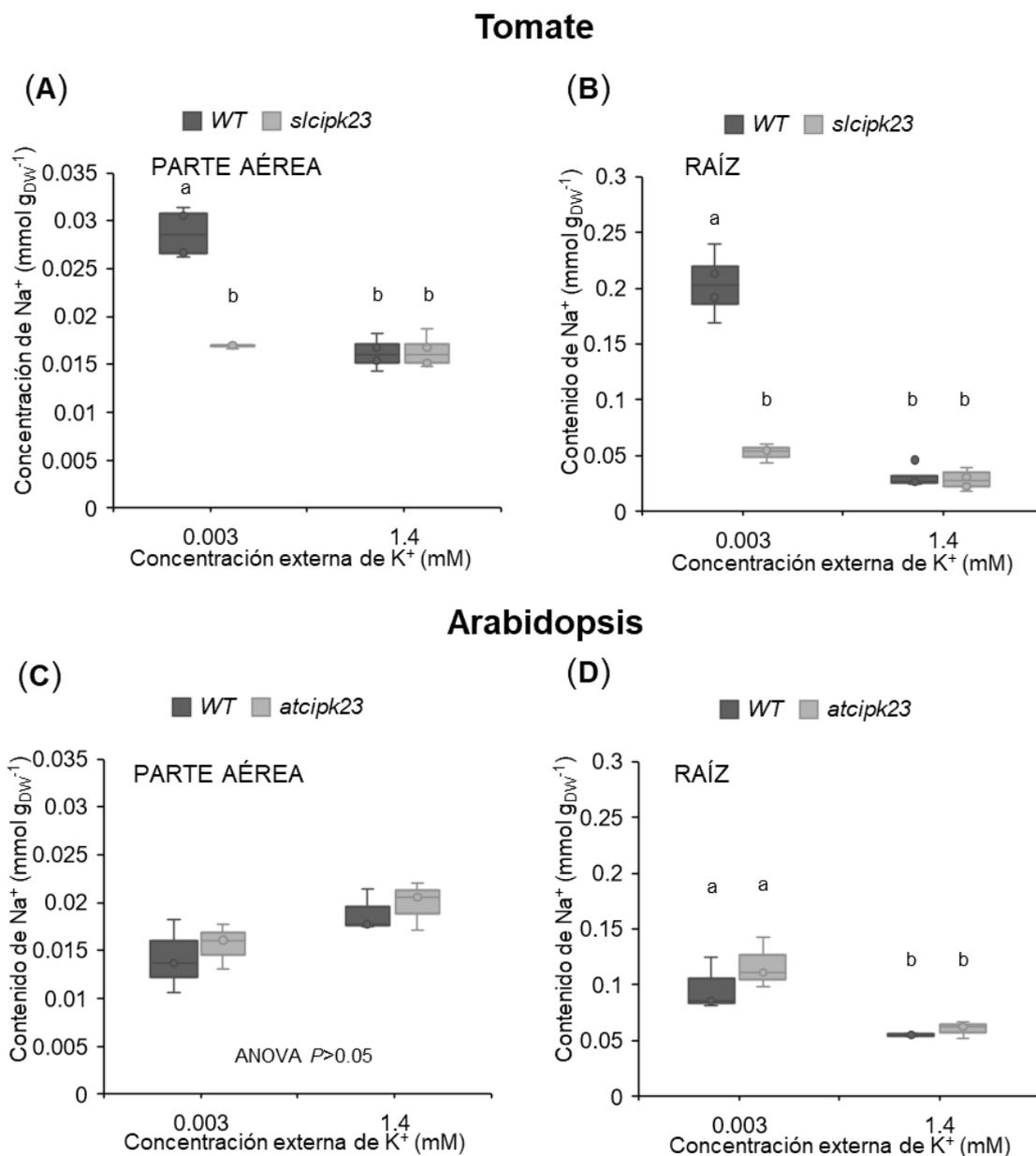


Figura 32: Concentración de Na^+ en plantas de Arabidopsis y tomate. Concentración de Na^+ en la parte aérea (A) y raíz (B) de plantas WT y *slc1pk23* de tomate crecidas bajo condiciones de suficiente K^+ o deficiencia de K^+ . Las plantas de tomate se cultivaron durante 21 días a 1,4 mM de K^+ (suficiente K^+) o durante 14 días + 7 días a 0,003 mM K^+ (deficiencia de K^+). Concentración de Na^+ en la parte aérea (C) y raíz (D) de plantas WT y *atc1pk23* de plantas de Arabidopsis crecidas en condiciones de suficiente K^+ o deficiencia de K^+ . Las plantas de Arabidopsis se crecieron durante 30 días a 1,4 mM de K^+ y luego un grupo de plantas se ayunaron de K^+ durante 7 días mientras que el resto continuaron creciendo a 1,4 mM de K^+ . Los datos se muestran en los gráficos de cajas ($n = 4-6$). Las letras indican grupos homogéneos de datos $p < 0,05$ de acuerdo con el test post hoc LSD (llevado a cabo después de un ANOVA). En (C) ANOVA fue $p > 0,05$, por tanto, no había diferencias significativas en entre las medias de los grupos.

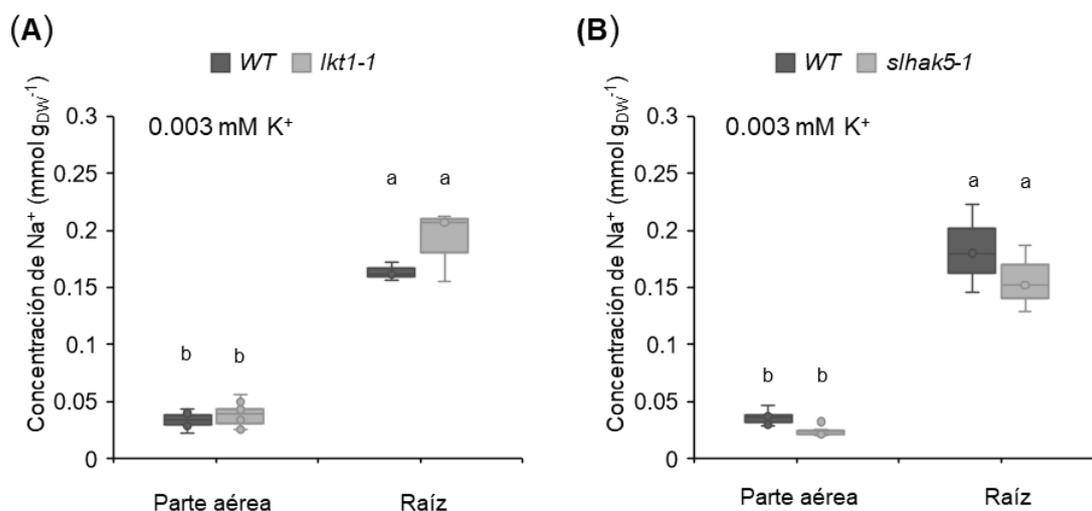


Figura 33: Concentración de Na⁺ en plantas de tomate WT, *lkt1-1* y *slhak5-1* crecidas bajo condiciones de ayuno de K⁺. Las plantas de tomate se crecieron durante 14 días a 1,4 mM de K⁺ y luego se ayunaron de K⁺ durante 7 días ([K⁺]_{ext} = 0,003 mM). Concentración de Na⁺ en la parte aérea y raíz de las plantas WT y *lkt1-1* de tomate (A). Concentración de Na⁺ en la parte aérea y raíz de las plantas WT y *slhak5-1* de tomate (B). Los datos se muestran en gráficos de cajas (n = 6-9). Las letras indican grupos homogéneos de datos p < 0,05 de acuerdo con el test post hoc LSD (llevado a cabo tras ANOVA).

4.2.2 Regulación de la entrada de Na⁺ por SICIPK23 en condiciones de ayuno de K⁺

La concentración de Na⁺ en la solución estándar (1/5 Hoagland) utilizada en el experimento anterior es muy baja (0,09 mM de Na⁺). Con el fin de comprobar si las diferencias en las concentraciones de Na⁺ entre las plantas WT y las *slcipk23* desaparecían en presencia de altas concentraciones de Na⁺, en condiciones de ayuno de K⁺, se planteó el siguiente experimento: Primero, todas las plantas de los distintos genotipos (WT, *slcipk23*, *slhak5* y *lkt1*) se cultivaron durante 7 días a 1,4 mM de K⁺. Transcurridos los 7 días, un grupo de plantas se transfirió a una solución de ayuno de K⁺ (0,003 mM) y con condiciones estándar de Na⁺ (0,09 mM, 0,09Na), mientras que otro grupo de plantas se cultivó también en condiciones de ayuno de K⁺ (0,003 mM K⁺) pero en este caso suplementada con 10 mM de Na⁺ (10Na). Las plantas estuvieron creciendo 12 días bajo estas

condiciones antes de ser cosechadas. Tras su cosecha, las plantas se secaron y se determinó la concentración de iones de la raíz y el peso seco.

Bajo ambos tratamientos (0,09Na y 10 Na), las plantas *slcipk23* mostraron una menor concentración de Na⁺ en la raíz que el resto de los genotipos (Figura 34A). La concentración de K⁺ se mantuvo similar en todos los genotipos cuando las plantas crecieron en 0,09Na. Sin embargo, cuando las plantas crecieron en la solución 10Na, las plantas *slhak5* mostraron una concentración de K⁺ significativamente menor que el resto de los genotipos (Figura 34B).

Por tanto, de estos resultados, podemos confirmar que: primero, el sistema de entrada de Na⁺ regulado por SICIPK23 puede mediar la entrada de Na⁺ tanto a bajas (0,09 mM) como a altas concentraciones de Na⁺ (10 mM), ya que las plantas *slcipk23* siguen teniendo menos Na⁺ en la raíz que las plantas WT a 10 mM Na⁺. Segundo, a 10 mM Na⁺ existe una entrada de Na⁺ que sería independiente de SICIPK23 ya que el Na⁺ aumenta en raíces *slcipk23* cuando hay 10 mM Na⁺ en la solución de cultivo.

En el grupo de plantas cultivadas en condiciones estándar de Na⁺ (0,09Na), las raíces de las plantas *slcipk23* y *slhak5* mostraron un menor peso seco con respecto al del resto de fenotipos (Figura 34C). El peso seco de las raíces de plantas *slcipk23* y *slhak5* se incrementó cuando las plantas crecieron en la solución 10Na. Bajo estas condiciones, las plantas WT y *lkt1* presentaron un peso seco de la raíz similar a cuando crecieron en la solución 0,09Na (Figura 34C).

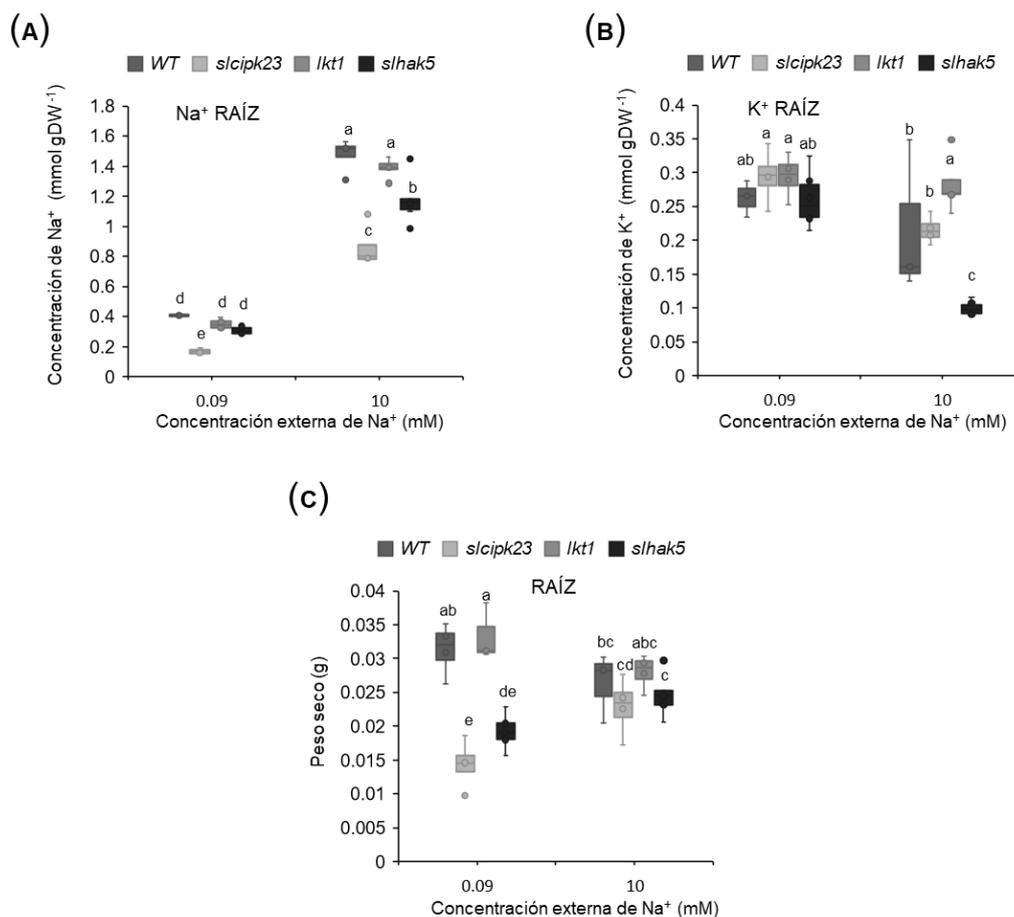


Figura 34: Análisis del fenotipo de las plantas WT, *slcipk23*, *lkt1* y *slhak5* cultivadas bajo condiciones de ayuno de K⁺ y a diferente concentración de Na⁺. (A) Concentración de Na⁺ de las plantas cultivadas bajo las dos condiciones experimentales descritas. (B) Concentración de K⁺ de las plantas cultivadas bajo las dos condiciones experimentales descritas. (C) Peso seco de las plantas cultivadas en ayuno de K⁺ y con concentraciones de 0,09 mM o 10 mM de Na⁺. Los datos se muestran en gráficos de cajas (n = 4-5). Las letras indican grupos homogéneos de datos p < 0,05 de acuerdo con el test post hoc LSD (llevado a cabo tras ANOVA).

A continuación, haciendo uso de los datos de plantas cosechadas previamente, se calculó la tasa neta de absorción de Na⁺ de las plantas crecidas bajo ambos tratamientos. La tasa neta de absorción aumentó tanto en las plantas WT como en las plantas *slcipk23* al aumentar la concentración externa de Na⁺. La tasa de absorción de Na⁺ fue menor en la línea *slcipk23* que en la WT en los dos tratamientos de Na⁺, 0,09Na y 10Na (Figura 35). En el caso de las plantas *slcipk23*, el incremento en la tasa de absorción debido al aumento del Na⁺ externo de 0,09 a 10 mM, se debería principalmente a la entrada de Na⁺ mediada

por sistemas independientes de la regulación mediada por SICIPK23, mientras que, en el incremento de la tasa de absorción observado para las plantas WT, estarían implicados tanto el sistema de entrada de Na^+ regulado por SICIPK23 como otros sistemas que no estarían regulados por la quinasa.

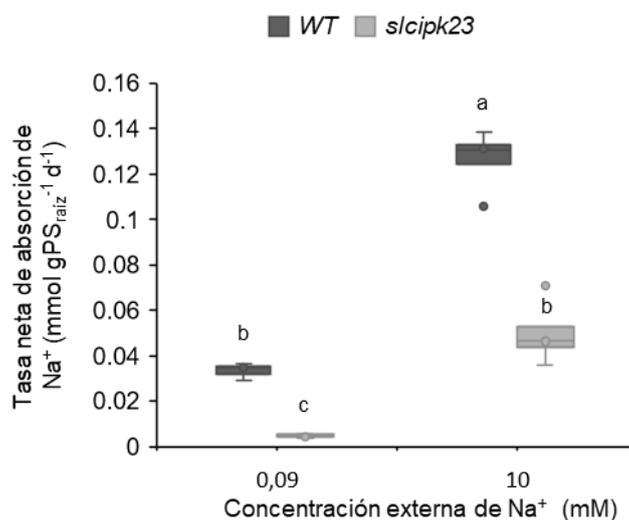


Figura 35: Tasa de absorción de Na^+ de plantas WT y *slcipk23* ayunadas de K^+ y cultivadas a 0,09 o 10 mM de Na^+ . Los datos se muestran en gráficos de cajas (n=4-5). Las letras indican grupos homogéneos de datos $p < 0,05$ de acuerdo con el test post hoc LSD (llevado a cabo tras ANOVA).

4.2.2.1 Las plantas *slcipk23* presentan una morfología de la raíz diferente a la de las plantas WT

Además del fenotipo relacionado con el peso seco (Figura 34A), se evaluó la longitud de la raíz de las plantas WT, *slcipk23*, *lkt1* y *slhak5* (Figuras 36A y 36B). Cuando las plantas crecieron en la solución 0,09Na, las raíces de las plantas *slcipk23*, *lkt1* y *slhak5* mostraron una mayor longitud con respecto a las plantas WT. Sin embargo, cuando las plantas crecieron en la solución 10Na, se observó como la diferencia en la longitud de la raíz entre plantas WT y *slcipk23* desaparecía (Figuras 36A y 36B). También disminuyó la longitud de las raíces de plantas *lkt1* y *slhak5* cuando crecieron en 10Na. Además, como se muestra

en el apartado anterior, el peso seco de las plantas *slcipk23* se vio incrementado en 10Na respecto a las plantas que crecieron en 0,09Na (Figura 34A). Es preciso mencionar que el peso seco de las raíces de las plantas *slhak5* también aumentó en el medio suplementado 10Na (Figura 34A). Por tanto, la morfología de la raíz cambió en estos dos genotipos al suplementarlas con 10 mM Na⁺: redujeron su longitud y aumentaron su peso seco. La mayor longitud de las raíces en condiciones de bajo Na⁺ externo, podría constituir un patrón de crecimiento característico de las plantas en su camino por explorar el medio en búsqueda de K⁺ o Na⁺ (Figura 34C). La concentración de K⁺ fue similar en todos los genotipos cuando las plantas crecieron en la solución 0,09Na. Cuando las plantas crecieron en 10Na, todas las plantas, salvo *slhak5*, mostraron la misma concentración de K⁺. Por tanto, estos resultados sugieren que características como una mayor longitud de la raíz podrían relacionarse con el crecimiento de raíces que exploran el medio para encontrar K⁺ o Na⁺ ante una situación de escasez del primero.

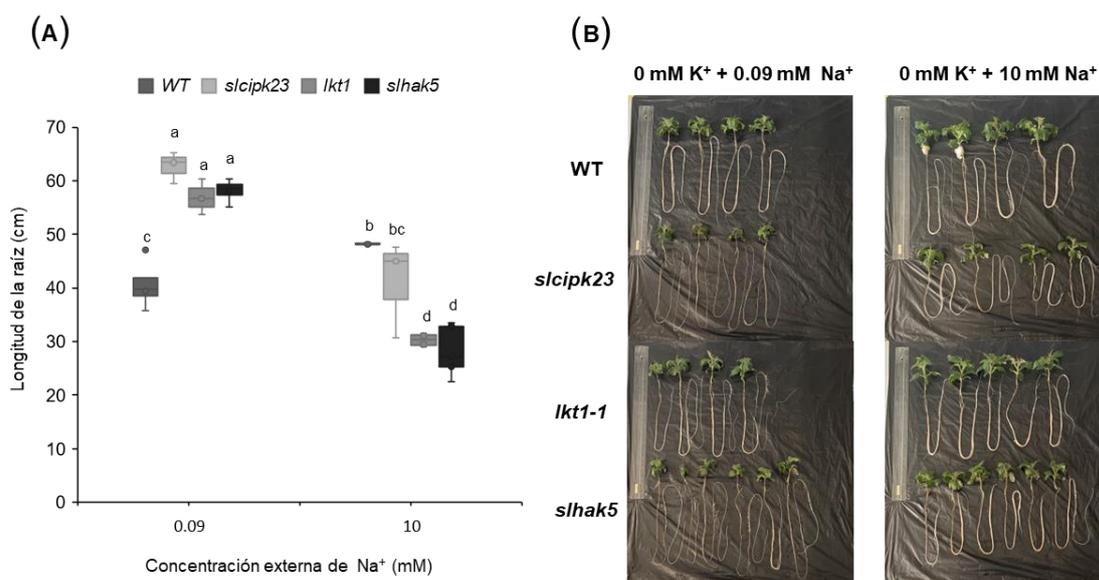


Figura 36: (A) Longitud de las raíces de plantas WT, *slcipk23*, *lkt1* y *slhak5* cultivadas a 0,09 mM o 10 mM de Na⁺. (B) Representación gráfica de las plantas utilizadas en el experimento. Los datos se muestran en gráficos de cajas (n = 4-5). Las letras indican grupos homogéneos de datos p < 0,05 de acuerdo con el test post hoc LSD (llevado a cabo tras ANOVA).

4.2.3 Uso de inhibidores de sistemas de transporte conocidos para la identificación de candidatos

Se utilizaron diferentes compuestos que habían sido descritos como inhibidores relativamente específicos de cada familia de sistemas de transporte de K^+ o Na^+ de las plantas, con el objetivo de identificar la familia a la que pertenecía la proteína que estaba implicada en la entrada de Na^+ que se observaba en las plantas de tomate descrita anteriormente (Tabla 22). El uso de inhibidores específicos de cada familia de sistemas de transporte de iones en experimentos de entrada de éstos en la planta, es decir, la caracterización farmacológica del transporte puede dar información sobre qué tipo de transportador podría estar implicado en dicho proceso.

Tabla 22: Especificidad de los inhibidores del transporte para cada una de las familias de transportadores.

Inhibidor	Familia inhibida	Referencia
NH_4^+	HAK/KUP/KT	(Alemán et al., 2011; M. Nieves-Cordones et al., 2007; Rubio et al., 2008)
Ba^{2+}	HKT, Canales activados por voltaje y Canales no selectivos (NSCCs)	(Garcia deblás et al., 2003)
Li^+	NSCCs	(Rodríguez-Navarro & Benito, 2010)
Ca^{2+}	NSCCs	(Caballero et al., 2012)
La^{3+}	NSCCS	(Lewis & Spalding, 1997)

4.2.3.1 El NH_4^+ inhibe la entrada de Na^+ en plantas WT, pero no en plantas *slcipk23*

En general, se considera que el NH_4^+ es un inhibidor del transporte de iones mediado por proteínas de la familia HAK/KUP/KT (Alemán et al., 2011; M. Nieves-Cordones et al., 2007; Rubio et al., 2008). Así, se plantearon experimentos usando NH_4^+ en plantas WT y *slcipk23* cultivadas durante 21 días (14 días a 1,4 mM de K^+ y ayuno de K^+ durante 7 días). A un grupo de plantas se le añadió NH_4^+ en la solución nutritiva a una concentración de 4 mM durante el tiempo de ayuno, mientras que otro grupo de plantas permanecieron ayunadas, pero sin NH_4^+ en el medio (tratamiento control). Después de los 7 días de ayuno se cosecharon las plantas y se determinó la concentración de Na^+ en la raíz. En la raíz, el fenotipo observado bajo el tratamiento control mostraba, como ya se ha descrito anteriormente, una menor concentración de Na^+ en las plantas *slcipk23* que en las WT. Sin embargo, cuando las plantas ayunadas eran tratadas además con 4 mM NH_4^+ , la concentración de Na^+ de las raíces de las plantas WT disminuía hasta no presentar diferencias significativas con respecto a las plantas *slcipk23* (Figura 37A), cuya concentración permaneció similar a la del tratamiento control. La concentración relativa de Na^+ (Figura 37B) en las raíces de plantas WT incubadas en presencia de 4 mM NH_4^+ se vio reducida un 50 % con respecto a las plantas control sin NH_4^+ . Por el contrario, la concentración relativa de Na^+ de las plantas *slcipk23* se incrementó aproximadamente un 40%. Por tanto, los resultados indicaban que el NH_4^+ inhibía un sistema que estaba activo en las plantas WT, pero no en las *slcipk23*.

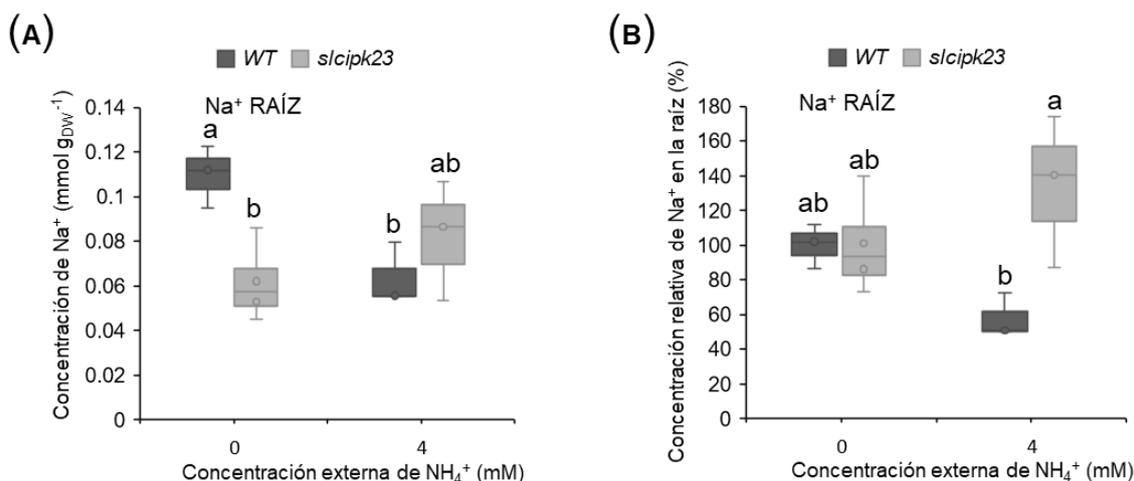


Figura 37: Concentración de Na⁺ en plantas WT y *slcipk23* cultivadas en condiciones de ayuno de K⁺ en presencia (tratamiento) o no (tratamiento control) de 4 mM de NH₄⁺. Las plantas de tomate se crecieron durante 14 días a 1,4 mM de K⁺ y luego se ayunaron de K⁺ durante 7 días. Durante el ayuno a un grupo de plantas se les administró 4 mM de NH₄⁺ mientras que otro grupo de plantas permaneció únicamente en ayuno de K⁺. (A) Concentración de Na⁺ en la raíz de plantas de tomate tratadas con NH₄⁺ y sin tratar. (B) Concentración relativa de Na⁺ en la raíz de plantas bajo tratamiento control o tratamiento con NH₄⁺. Los datos se muestran en gráficos de cajas (n = 3-4). Las letras indican grupos homogéneos de datos p < 0,05 de acuerdo con el test post hoc LSD (llevado a cabo tras ANOVA).

4.2.3.2 El Ba²⁺ inhibe la entrada de Na⁺ en plantas WT y en plantas *slcipk23*

En estudios previos realizados en arroz (Garcia-deblás et al., 2003) se mostraba que el transporte de Na⁺ mediado tanto por sistemas de transporte no selectivos como transportadores de la familia HKT se inhibían con Ba²⁺. Para evaluar el efecto del Ba²⁺ sobre transporte de Na⁺, se cultivaron plantas WT y *slcipk23* durante 21 días (14 días a 1,4 mM de K⁺ y se ayunaron de K⁺ durante 7 días). A un grupo de plantas se le añadió Ba²⁺ en la solución nutritiva a una concentración de 4 mM durante el tiempo de ayuno. Al igual que en el caso anterior, otro grupo de plantas permanecieron ayunadas de K⁺ pero sin Ba²⁺ en el medio (tratamiento control). Se determinó la concentración de Na⁺ en las raíces. En la raíz, bajo el tratamiento control sin Ba²⁺, se observó el fenotipo de menor concentración de Na⁺ en las plantas *slcipk23*, descrito anteriormente. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría con el tratamiento de NH₄⁺, cuando se

aplicó el tratamiento con 4 mM Ba²⁺, se observó una disminución significativa en la concentración de Na⁺ tanto en las plantas WT como en *slcipk23* (Figura 38A). El contenido relativo de Na⁺ en la raíz de plantas tratadas con Ba²⁺ (Figura 38B) disminuyó aproximadamente un 60 % en plantas WT y un 40 % en las plantas *slcipk23*. Por tanto, los resultados sugerían que el Ba²⁺ estaba inhibiendo un sistema que estaba funcionando en ambos genotipos y por lo tanto no se regulaba por SICIPK23.

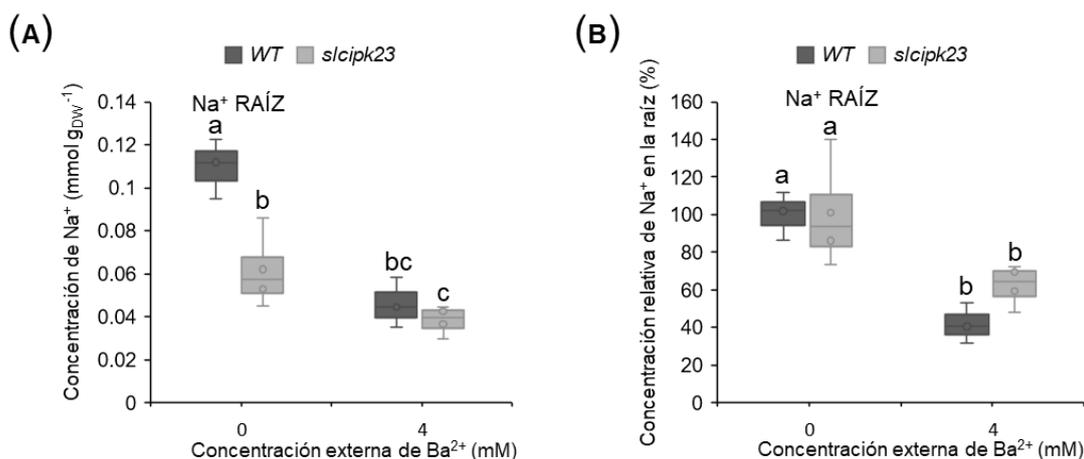


Figura 38: Concentración de Na⁺ en plantas WT y *slcipk23* cultivadas en condiciones de ayuno de K⁺ en presencia (tratamiento) o no (tratamiento control) de 4 mM de Ba²⁺. Las plantas de tomate se crecieron durante 14 días a 1,4 mM de K⁺ y luego se ayunaron de K⁺ durante 7 días. Durante el ayuno a un grupo de plantas se les administró 4 mM de Ba²⁺ mientras que otro grupo de plantas permaneció únicamente en ayuno de K⁺. (A) Concentración de Na⁺ en la raíz de plantas de tomate tratadas con Ba²⁺ y sin tratar. (B) Concentración relativa de Na⁺ en la raíz de plantas bajo tratamiento control o tratamiento con Ba²⁺. Los datos se muestran en gráficos de cajas (n = 3-4) Las letras indican grupos homogéneos de datos p < 0,05 de acuerdo con el test post hoc LSD (llevado a cabo tras ANOVA).

4.2.3.3 El Li⁺ inhibe la entrada de Na⁺ en plantas WT y en plantas *slcipk23*.

El Li⁺ compite con el Na⁺ en diferentes sistemas de transporte (Rodríguez-Navarro & Benito, 2010). La naturaleza similar de ambos iones hace que ciertos transportadores no discriminen entre ellos. Para saber si el sistema regulado por SICIPK23 y encargado de la entrada de Na⁺ en tomate era capaz de transportar

Li⁺, se planteó un experimento en el que se evaluó tanto el efecto del Li⁺ sobre la entrada de Na⁺, como la acumulación del Li⁺ en las raíces de las plantas. Se cultivaron plantas WT y *slcipk23* durante 21 días (14 días a 1,4 mM de K⁺ y se ayunaron de K⁺ durante 7 días). A un grupo de plantas se le añadió Li⁺ en la solución nutritiva a una concentración de 0,1 mM durante el tiempo de ayuno. Como se ha descrito en procedimientos anteriores, otro grupo de plantas permanecieron ayunadas, pero sin Li⁺ en el medio (tratamiento control). Se determinó la concentración de Na⁺ en la raíz. Las raíces de las plantas WT y *slcipk23* presentaron menor concentración de Na⁺ cuando se cultivaron en presencia de Li⁺ que las plantas que permanecieron bajo el tratamiento control (Figura 39A). La disminución en el contenido relativo de Na⁺ de las plantas tratadas con respecto a las plantas control fue similar para ambos genotipos, aproximadamente del 20 % (Figura 39B). Se analizó también la acumulación de Li⁺ en raíces de plantas WT y *slcipk23*. Las raíces de plantas *slcipk23* acumularon menos Li⁺ que las raíces de WT (Figura 39C). Por tanto, los resultados mostraron que el Li⁺ estaba inhibiendo la entrada de Na⁺ en un sistema que estaba activo en ambos genotipos. La menor concentración de Li⁺ en las raíces de plantas *slcipk23* podría deberse a que una parte del Li⁺ estaría entrando por el sistema de entrada de Na⁺ regulado por SICIPK23.

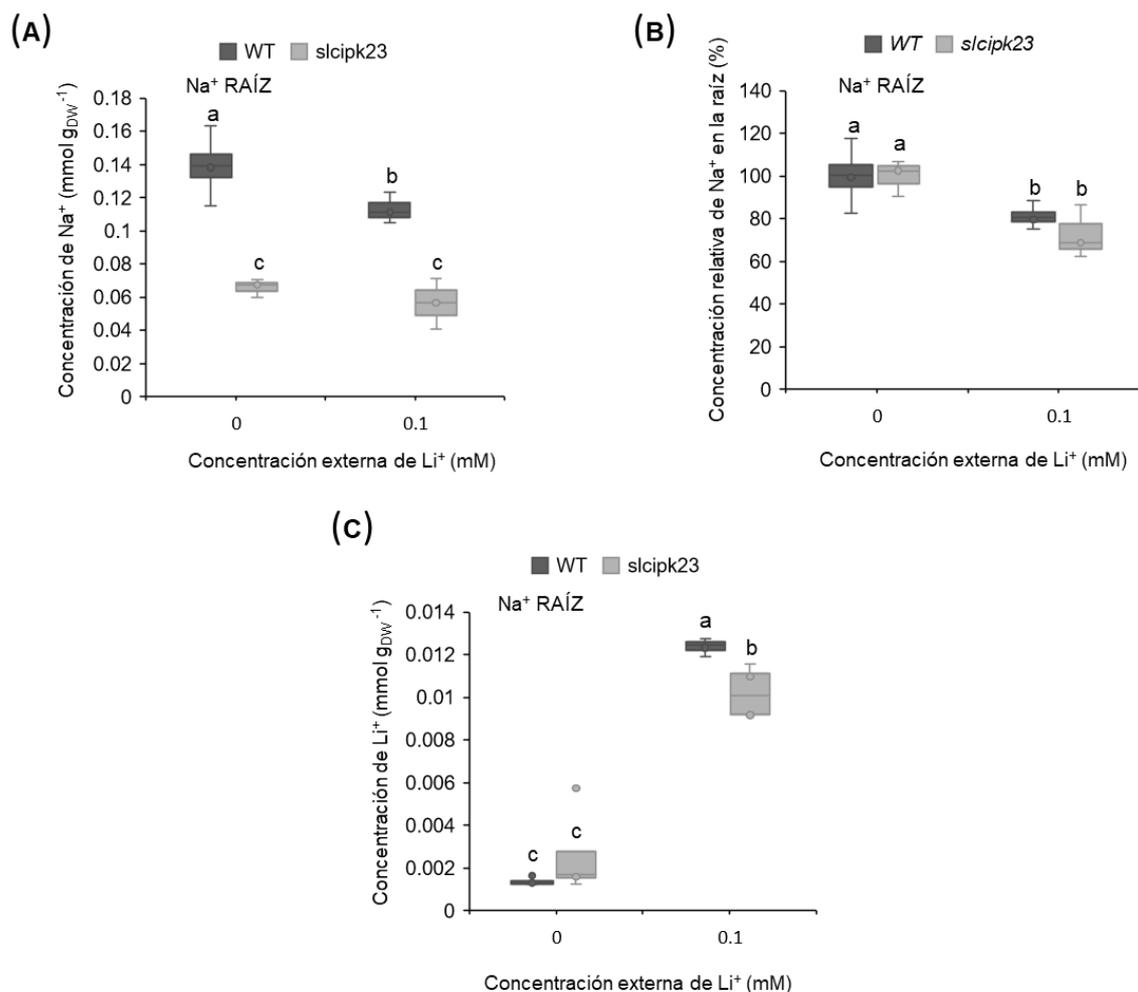


Figura 39: Concentración de Na⁺ en plantas WT y *slc1pk23* cultivadas en condiciones de ayuno de K⁺ en presencia (tratamiento) o no (tratamiento control) de 0,1 mM de Li⁺. Las plantas de tomate se crecieron durante 14 días a 1,4 mM de K⁺ y luego se ayunaron de K⁺ durante 7 días. Durante el ayuno a un grupo de plantas se les administró 0,1 mM de Li⁺ mientras que otro grupo de plantas permaneció creciendo en ayuno de K⁺. (A) Concentración de Na⁺ en la raíz de plantas de tomate bajo tratamiento control y tratadas con 0.1 mM de Li⁺. (B) Concentración relativa de Na⁺ en la raíz de plantas bajo tratamiento control o tratamiento con Li⁺. (C) Concentración de Li⁺ en la raíz de plantas de tomate bajo tratamiento control y crecidas con 0,1 mM de Li⁺. Los datos se muestran en gráficos de cajas (n = 3-4). Las letras indican grupos homogéneos de datos p < 0,05 de acuerdo con el test post hoc LSD (llevado a cabo tras ANOVA).

4.2.3.4 El Ca^{2+} y el La^{3+} inhiben la entrada de Na^+ en plantas *slcipk23*.

Los canales no selectivos de cationes (NSCCs) pueden ser inhibidos cuando se aplica Ca^{2+} en el rango milimolar (Caballero et al., 2012). También se ha descrito que en *Arabidopsis*, el La^{3+} inhibe canales de Ca^{2+} , además de canales iónicos no selectivos (Lewis & Spalding, 1997). Se realizó un experimento para comprobar si el Ca^{2+} o el La^{3+} inhibían la entrada de Na^+ . Para ello se planteó un experimento en el que las plantas WT y *slcipk23* crecieron durante 21 días (14 días a 1,4 mM de K^+ y 7 días en condiciones de ayuno de K^+). A un grupo de plantas se les aplicó un tratamiento de 10 mM de Ca^{2+} o 10 mM de La^{3+} durante el periodo de ayuno, mientras otro grupo de plantas permaneció en condiciones de ayuno de K^+ pero sin la aplicación del tratamiento de Ca^{2+} o La^{3+} (tratamiento control). Tras la cosecha de las plantas, se determinó la concentración de Na^+ en la raíz. No se observaron diferencias en la concentración de Na^+ entre las raíces de las plantas WT crecidas con el tratamiento control y las raíces de plantas WT crecidas en la solución con 10 mM de Ca^{2+} . Sin embargo, la concentración de Na^+ de las raíces de plantas *slcipk23* crecidas a 10 mM de Ca^{2+} fue menor que la concentración observada en las plantas *slcipk23* que crecieron con el tratamiento control (Figura 40A). La determinación de la concentración relativa mostró una disminución del 40 % en las plantas *slcipk23* tratadas con respecto a las no tratadas. No se observaron diferencias en la concentración relativa de Na^+ de las plantas WT por efecto del Ca^{2+} . (Figura 40B) En el caso de las plantas tratadas con La^{3+} , se observó una disminución de la concentración de Na^+ en ambos genotipos, WT y *slcipk23* (Figura 40B). La concentración relativa de Na^+ en las plantas tratadas con La^{3+} respecto a las plantas control fue un 20 % y un 50 % menor en las plantas WT y *slcipk23* respectivamente (Figura 40B).

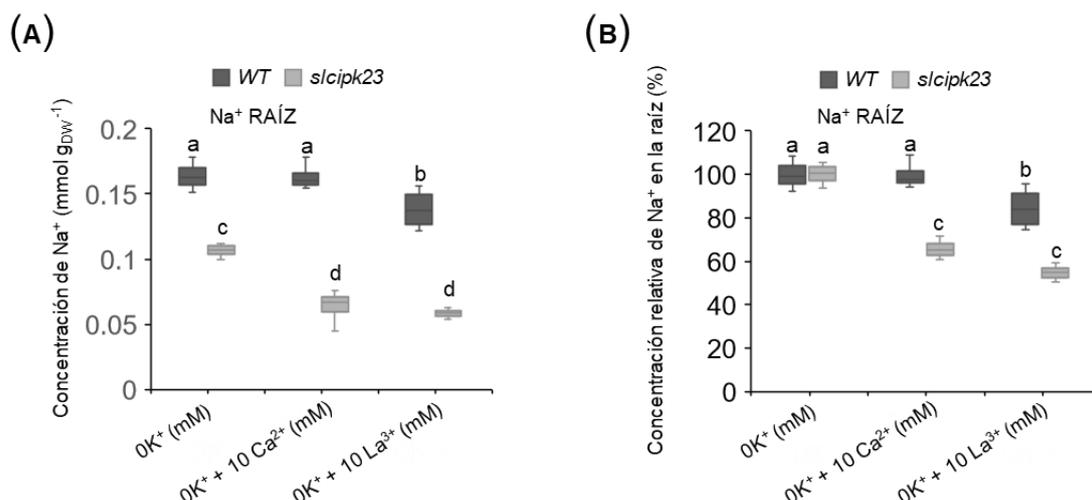


Figura 40: Concentración de Na⁺ en plantas WT y *slcipk23* cultivadas en condiciones de ayuno de K⁺ en presencia (tratamiento) o no (tratamiento control) de 10 mM de Ca²⁺ o La³⁺. Las plantas de tomate se crecieron durante 14 días a 1,4 mM de K⁺ y luego se ayunaron de K⁺ durante 7 días. Durante el ayuno a un grupo de plantas se les administró 10 mM de Ca²⁺ o La³⁺ mientras que otro grupo de plantas permaneció creciendo en ayuno de K⁺. (A) Concentración de Na⁺ en la raíz de plantas de tomate bajo tratamiento control y tratadas con 10 mM de Ca²⁺ o La³⁺. (B) Concentración relativa de Na⁺ en la raíz de plantas bajo tratamiento control y tratamiento con Ca²⁺ o La³⁺. Los datos se muestran en gráficos de cajas (n = 3-4) Las letras indican grupos homogéneos de datos p < 0,05 de acuerdo con el test post hoc LSD (llevado a cabo tras ANOVA).

4.2.4 SICIPK23 no está implicado en la regulación de los transportadores de Na⁺ SIHKT1.1 y SIHKT1.2.

En arroz, la entrada de Na⁺ en plantas ayunadas de K⁺ está mediada por un transportador de la familia HKT, en concreto por OsHKT2;1 (Horie et al., 2007). En tomate, parece no existir un transportador ortólogo, sin embargo, los transportadores de tomate pertenecientes a la familia HKT, SIHKT1.1 y SIHKT1.2 son los más cercanos filogenéticamente a OsHKT2.1. Se realizaron experimentos para determinar si alguna de las proteínas de tomate mencionadas estaba regulada por SICIPK23 y podría mediar la entrada de Na⁺ observada en las plantas de tomate ayunadas de K⁺.

4.2.4.1 Experimentos de sensibilidad a Na⁺ en levaduras

La capacidad de transportar Na⁺ por parte de los transportadores HKT de tomate se evaluó mediante su expresión en levadura (Figura 41). Si el transportador mediaba entrada de Na⁺, se esperaba una inhibición del crecimiento de la levadura debido a la toxicidad de este catión. Debido a que el transportador SIHKT1.2 no es funcional en levaduras (Asins et al., 2013), para los experimentos de sensibilidad a Na⁺ en levaduras se utilizó únicamente SIHKT1.1. Para ello, se utilizó la cepa 9.3 de levadura descrita en el apartado de materiales y métodos. Esta cepa carece de bombas de salida de Na⁺ ENA1 y ENA4 lo que la hace sensible frente a altas concentraciones de Na⁺. AtHKT1.1, que confiere sensibilidad a Na⁺ (Mäser et al., 2002), se usó como control positivo de la expresión de la proteína y de la sensibilidad frente a concentraciones crecientes de Na⁺. Todas las cepas de levadura proliferaron bien en los medios control (50 mM K⁺ y 0 mM Na⁺ o 5 mM K⁺ y 0 mM Na⁺). En el medio suplementado con 25 mM de Na⁺, tanto las levaduras que expresaban sólo el transportador de Arabidopsis AtHKT1.1 o de tomate SIHKT1.1 como las levaduras que coexpresaban el transportador de tomate SIHKT1.1 con el complejo SICIPK23-CBL1 o SICIPK23-CBL9 presentaron mayor sensibilidad frente al Na⁺ que la cepa 9.3 con el vector vacío (empty vector, EV). Además, las levaduras que expresaban la proteína de tomate parecían ser más sensibles a 25 mM de Na⁺ que las que expresaban AtHKT1.1. Todas las levaduras fueron incapaces de crecer a 50 mM de Na⁺.

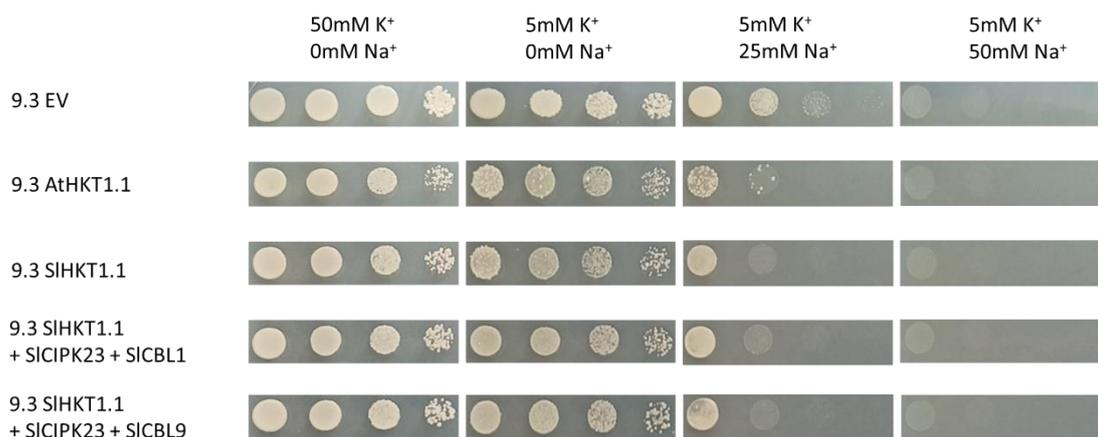


Figura 41: Crecimiento de levaduras que expresan el transportador de Na⁺ AtHKT1.1 y SIHKT1.1 de Arabidopsis y tomate, respectivamente. El transportador SIHKT1.1 se ha expresado en presencia o ausencia de los complejos SICIPK23/SICBL1 o SICIPK23/SICBL9 en medio mínimo AP. La cepa de levadura 9.3 deficiente en bombas de salida de Na⁺ ENA1 y ENA4 se transformó con el vector vacío (EV) o con los vectores que contenían los cADNs de las proteínas indicadas en la columna de la izquierda. Diez microlitros de diluciones seriadas 1/5 (1, 1/5, 1/25 y 1/125) de las suspensiones de levadura fueron pipeteadas en medio mínimo AP suplementado con diferentes concentraciones de Na⁺ (Primera gota a la izquierda, OD₆₀₀= 1).

4.2.4.2 Experimentos de fijación de voltaje en ovocitos de Xenopus

Se realizaron experimentos de fijación de voltaje en ovocitos de *Xenopus* para determinar si la presencia del complejo regulador SICIPK-SICBL tenía efecto sobre el transporte de Na⁺ a través de SIHKT1.2. Para ello, se inyectaron ovocitos de *Xenopus* con cARN que codificaba para SIHKT1.2, SIHKT1.2 + SICIPK23 + SICBL1 y SIHKT1.2 + SICIPK23 + SICBL9, respectivamente. Ovocitos inyectados con agua sirvieron como control negativo del experimento.

Los resultados de estos experimentos (Figura 42) mostraron que la presencia de los complejos reguladores SICIPK23/SICBL1 o SICIPK23/SICBL9 no tenía ningún efecto sobre la actividad de SIHKT1.2. Se observa cómo las curvas I/V tienen la misma pendiente, es decir, que no cambia la conductancia de Na⁺ del sistema de transporte.

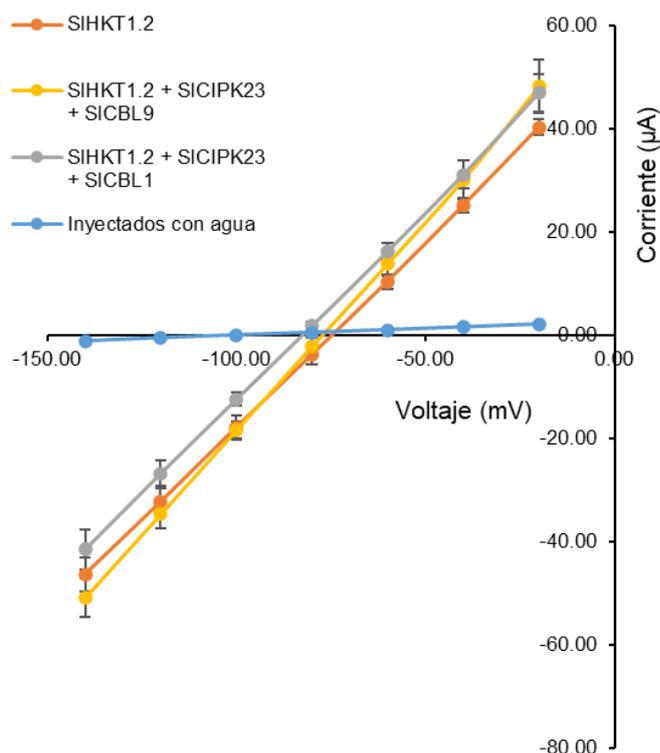


Figura 42: SIHKT1.2 media transporte de Na⁺ que no es regulado por el complejo CIPK23-CBL1/9. Los ovocitos se inyectaron con agua como control negativo o con cARNs de SIHKT1.2, SLCIPK23, SICBL1 y SICBL9 como se indica en la leyenda. Se muestran las curvas corriente-voltaje en estado estacionario. Pulsos de fijación de voltaje comprendidos entre -20 y -140 mV con incrementos de -20 mV. Medias \pm SE (n=5)

4.2.4.3 Experimentos de complementación bimolecular de fluorescencia

Se ha utilizado la complementación bimolecular fluorescente en hojas de *N. benthamiana* como sistema de expresión heteróloga para caracterizar la

interacción entre proteínas. Estos experimentos permitieron comprobar, mediante la reconstitución o no de la proteína fluorescente (Waadt et al., 2008), si existía interacción directa entre las proteínas utilizadas en los experimentos con levaduras (SIHKT1.1, SICIPK23, SICBL1 y SICBL9) o con los ovocitos de *Xenopus* (SIHKT1.2, SICIPK23, SICBL1 y SICBL9) (Figura 43).

Como control positivo del experimento, se utilizó la interacción entre SICIPK23-YFP^N y SICBL1-YFP^C. En apartados anteriores, se ha demostrado que SICIPK23 interacciona con SICBL1 para formar el complejo SICIPK23-SICBL1. De esta manera, cuando SICIPK23-YFP^N y SICBL1-YFP^C interaccionan se observa la fluorescencia que emite YFP al ser excitada por el láser del microscopio. Los resultados mostraron que SICIPK23 no interaccionaba con SIHKT1.2. La proteína SICIPK23 tampoco interaccionó con el transportador SIHKT1.1. Por tanto, la proteína SICIPK23 no estaría implicada en la regulación mediante interacción de los sistemas de transporte de Na⁺ SIHKT1.1 y SIHKT1.2.

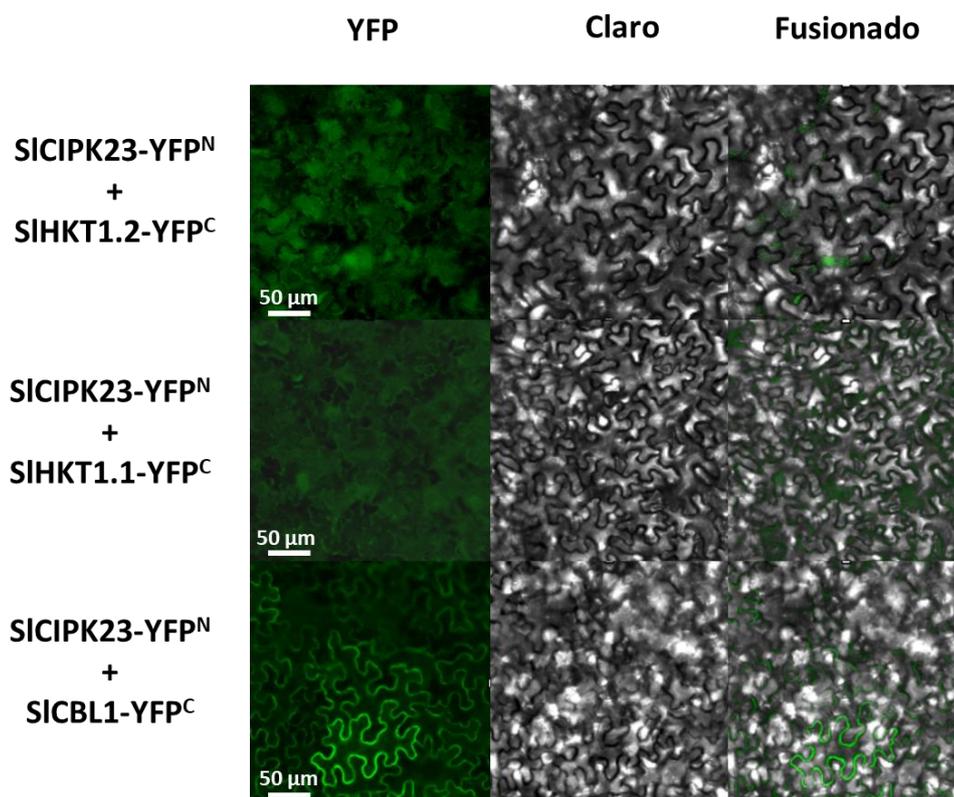


Figura 43: Visualización de la interacción entre proteínas en ensayo de BiFC. Cada proteína se fusionó o al extremo N-terminal (YFP^N) o al extremo C-terminal (YFP^C) de la proteína amarilla fluorescente (YFP), y las interacciones fueron ensayadas mediante la co-expresión de las proteínas de fusión YFP^N e YFP^C en las hojas de *Nicotiana benthamiana* tal y como se ha indicado en el apartado de Materiales y Métodos.

SICIPK23-YFP^N + SICBL1-YFP^C se usó como control positivo. Para cada construcción se muestra la señal YFP, la imagen de campo claro y una fusión de ambas. Barra de escala = 50 μm .

DISCUSIÓN

Al igual que con el Mg^{2+} (Capítulo I), el contenido de Na^+ se ve incrementado notablemente en las plantas ayunadas de K^+ (Figura 32A y Figura 32B). La acumulación de Na^+ en la planta puede ser beneficiosa si el K^+ es limitante, y hay gran cantidad de evidencias en este sentido (F. J. M. Maathuis & Sanders, 1994; M. Nieves-Cordones et al., 2020; Subbarao et al., 2003; Wakeel et al., 2011). La concentración externa de Na^+ en las soluciones nutritivas estándar sin Na^+ añadido utilizadas para los experimentos de esta Tesis Doctoral fue de aproximadamente 90 μM , por lo que, probablemente, en estas condiciones, la entrada de Na^+ podría tener lugar a través de un sistema de transporte que opere en el rango de la alta afinidad de Na^+ . Se ha demostrado que muchas especies de plantas terrestres muestran un transporte de alta afinidad de Na^+ después de un tratamiento de ayuno de K^+ (Garcia-deblás et al., 2003; Rodríguez-Navarro & Benito, 2010). Destaca el hecho de que la concentración de Na^+ no aumentó de forma similar en plantas de *Arabidopsis* (Figura 32C y 32D) y en plantas de tomate (Figura 32A y Figura 32B) después del periodo de ayuno de K^+ , lo que sugirió que el transporte de Na^+ activado por CIPK23 no está conservado en *Arabidopsis*. Además, en tomate, a diferencia de lo que ocurría en *Arabidopsis*, la acumulación de Na^+ en la raíz fue altamente dependiente de la actividad de CIPK23. No obstante, el sistema de transporte que permite a las plantas de tomate acumular Na^+ frente a condiciones de bajo K^+ está pendiente de ser identificado en la actualidad. En trigo, se han descrito corrientes instantáneas de Na^+ en las células de la raíz que se incrementan en respuesta a la retirada de K^+ , pero no se ha identificado el sistema de transporte implicado (Buschmann et al., 2000). En arroz, OsHKT2;1 media la entrada de Na^+ ante condiciones de déficit de K^+ (Horie et al., 2007). Sin embargo, la subfamilia II de los transportadores HKT no está conservada en dicotiledóneas como tomate (Platten et al., 2006). Resulta interesante destacar que la regulación de la salida de Na^+ por CIPKs ha sido previamente descrita en las

plantas de tomate (Huertas et al., 2012). SISOS2 (SICIPK24) junto con SISOS3 (SICBL4), activa SISOS1 para mediar la salida de Na⁺ de la raíz de plantas de tomate bajo condiciones de estrés salino.

De los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral se desprende la idea de que las redes CIPK-CBLs podrían haber evolucionado de forma diferente en las plantas terrestres y, debido a ello, podrían existir variantes interespecíficas en sus vías de regulación. El estudio aquí realizado evidencia roles distintos de una CIPK en dos especies de plantas. Por tanto, son necesarios más estudios acerca de las redes CIPK-CBLs para comprender y aprovechar la diversidad de roles de los sistemas CIPK-CBLs con el fin de obtener en el futuro cultivos más tolerantes a condiciones adversas y más eficientes en el uso de nutrientes.

Los primeros experimentos donde se observó el fenotipo de las plantas *slcipk23* relacionado con el transporte de Na⁺ en la raíz se realizaron con las plantas cultivadas en una solución que contenía alrededor de 90 μM de Na⁺. Por ello, al principio se pensó que el transporte de Na⁺ regulado por SICIPK23 podría estar teniendo lugar a través de un sistema de transporte de alta afinidad. Basado en esta hipótesis, se planteó un experimento en el que las plantas fueron crecidas a 10 mM de Na⁺ para determinar si a esta concentración la entrada de Na⁺ también estaba regulada por SICIPK23 (Figura 34). Los resultados (Figura 34) mostraron que, aunque la concentración de Na⁺ en las plantas *slcipk23* cultivadas a 10 mM de Na⁺ aumentaba significativamente respecto a las plantas WT y *slcipk23* cultivadas en el medio no suplementado con Na⁺, seguía existiendo una diferencia significativa en la concentración de Na⁺ entre ambos genotipos cuando estos crecían en el medio suplementado con 10 mM Na⁺. Por tanto, los datos obtenidos sugieren que la entrada de Na⁺ activada por SICIPK23 no solo tendría lugar en el rango micromolar, sino que también tenía lugar cuando el Na⁺ está presente en concentraciones milimolares. Los resultados también indican que existe una vía de entrada de Na⁺ independiente de SICIPK23. En este sentido, el cálculo de la tasa neta de absorción (Figura 35), confirma que las diferencias entre fenotipos son significativas bajo ambas condiciones de cultivo. Además, conviene mencionar que las raíces de plantas *slcipk23* mostraron una mayor longitud y un menor peso seco con respecto a las plantas WT cuando crecieron a 0,09 mM de Na⁺ y que estas diferencias se

redujeron cuando las plantas crecieron en el medio suplementado con 10 mM de Na^+ . Se observa por tanto un efecto beneficioso del Na^+ , independiente de la concentración interna de K^+ , sobre la biomasa de la raíz en condiciones de deficiencia de K^+ , que depende en gran medida de SICIPK23.

Para obtener más información acerca del sistema que podría estar mediando la entrada de Na^+ regulada por SICIPK23 se realizaron unos experimentos con inhibidores conocidos (Tabla 22) de las familias de sistemas de transporte candidatas para mediar la entrada de Na^+ . Dado que dentro de la familia HAK/KUP/KT encontramos transportadores como SIHAK20, ZmHAK4 o PpHAK13, implicados en los movimientos del Na^+ (Benito et al., 2012; Z. Wang et al., 2020; Ming Zhang et al., 2019) se utilizó el NH_4^+ , un inhibidor conocido de los transportadores de esta familia (Alemán et al., 2011; M. Nieves-Cordones et al., 2007; Rubio et al., 2008) para tratar de determinar si el transporte de Na^+ estaba ocurriendo a través de un transportador de esta familia. Los resultados mostraron que el NH_4^+ inhibía la entrada de Na^+ en plantas WT (aproximadamente un 60 %) mientras que no inhibía en plantas *slcipk23*, donde además se observó un incremento de aproximadamente el 40 % en la concentración relativa de Na^+ en la raíz (Figura 37). Por tanto, los resultados de estos experimentos sugieren que un miembro de la familia HAK/KUP/KT podría estar mediando el transporte de Na^+ regulado por SICIPK23. Tampoco se puede descartar que la inhibición por NH_4^+ de la acumulación de Na^+ en raíces WT se puede deber a efectos indirectos del NH_4^+ sobre el potencial de membrana o el pH de las células de la raíz. Esto se estudiará próximamente.

De manera diferente a lo que ocurría con el aporte de NH_4^+ , durante la aplicación de Ba^{2+} , la entrada de Na^+ se inhibió tanto en plantas WT (aproximadamente un 60 %), como en plantas *slcipk23* (aproximadamente un 40%) (Figura 38). Por tanto, el hecho de que la inhibición por Ba^{2+} se diera en las plantas *slcipk23* estaba apuntando a la existencia de un sistema de entrada de Na^+ sensible a Ba^{2+} independiente de la regulación por SICIPK23. Este mismo comportamiento (inhibición en plantas *slcipk23*) se observó en los experimentos realizados con otros inhibidores como el Li^+ (Figura 39), el Ca^{2+} y La^{3+} (Figura 40). Estos experimentos permiten concluir que el sistema de transporte independiente de SICIPK23 se inhibe por Ba^{2+} , Li^+ , Ca^{2+} y La^{3+} . Un patrón de

inhibición que es compatible con la de los canales no selectivos (NSCCs) (Demidchik & Maathuis, 2007) pero no con transportadores de la familia HKT.

Los estudios realizados en arroz mostraron que OsHKT2.1 mediaba la entrada de Na^+ ante condiciones de ayuno de K^+ (Horie et al., 2007). Como se ha mencionado anteriormente, la subfamilia II de los transportadores HKT no está conservada en dicotiledóneas como tomate. Sin embargo, sí que encontramos dos miembros de esta familia (SIHKT1.1 y SIHKT1.2) que son los más cercanos filogenéticamente a OsHKT2.1 y que podrían estar implicados en la entrada de Na^+ en condiciones de ayuno de K^+ . Con el objetivo de confirmar o descartar la implicación de SIHKT1.1 o SIHKT1.2 en este transporte de Na^+ y su regulación por SICIPK23, se realizaron experimentos en levaduras y ovocitos que expresaban estos sistemas de transporte. Los experimentos con levaduras que expresaban SIHKT1.1 o SIHKT1.1 + SICIPK23+SICBL1, mostraron que eran capaces de transportar Na^+ , sin embargo, no mostraron una mayor sensibilidad a Na^+ para aquellas levaduras que coexpresaban SIHKT1 con el complejo regulador SICIPK23/SICBL1 (Figura 41). Por otra parte, los experimentos realizados con ovocitos que expresaban SIHKT1.2, SIHKT1.2 + SICIPK23 + SICBL1 o SIHKT1.2 + SICIPK23 + SICBL9 mostraron que el sistema de transporte SIHKT1.2 era capaz de transportar Na^+ , sin embargo, su actividad no se vio modificada por la presencia de los complejos reguladores SICIPK23/SICBL1 o SICIPK23/SICBL9 (Figura 42).

Los ensayos BiFC confirmaron que no hay interacción de la proteína SICIPK23 con ninguno de los dos transportadores de tomate de la familia HKT, ya que cuando se coexpresaron en hojas de *N. benthamiana* las construcciones SICIPK23-YFP^N y SIHKT1.1-YFP^C o SICIPK23-YFP^N Y SIHKT1.2-YFP^C, no se produjo la reconstitución de la proteína fluorescente (Figura 43). De esta manera podemos descartar que la entrada de Na^+ regulada por SICIPK23 en tomate en condiciones de ayuno de K^+ se produzca a través de estos transportadores de la familia HKT.

Por tanto, de la información discutida en los párrafos anteriores podemos deducir que deben de realizarse más investigaciones para identificar el sistema implicado en la entrada de Na^+ regulado por SICIPK23. Los experimentos realizados con los inhibidores, junto con los experimentos en levaduras y de

interacción proteína-proteína en *N. benthamiana* ayudan a delimitar el número de candidatos implicados en la entrada de Na⁺. Los datos obtenidos nos llevan a pensar ahora que el sistema bajo estudio podría ser un miembro de la familia HAK/KUP/KT.

4.3 CAPITULO 3: ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE SISKOR POR SICIPK23

4.3.1 SISKOR se expresa mayoritariamente en la estela de la raíz

Con el objetivo de identificar en plantas de tomate el ortólogo del canal SKOR de *Arabidopsis* (Frédéric Gaymard et al., 1998), se realizó un análisis filogenético (Figura 44). El genoma de tomate contiene 11 genes que podrían codificar canales de K⁺ regulados por voltaje, tres de éstos serían canales de salida como SKOR. Sin embargo, ninguno de estos tres se localizó cerca de AtSKOR en el árbol filogenético (Figura 44).

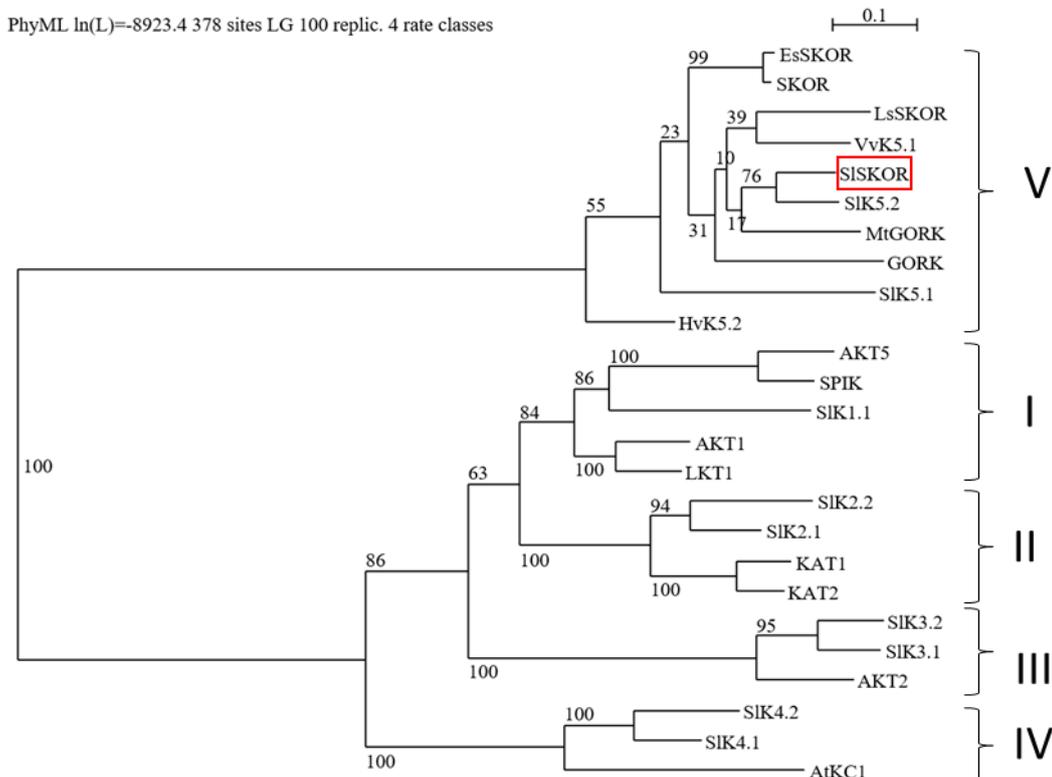


Figura 44: Árbol filogenético de las secuencias de canales de K⁺ activados por voltaje de tomate y Arabidopsis. Se incluyeron también MtGORK, VvK5.1, LsK5.1, EsK5.1 y HvK5.2 como homólogos de SISKOR. La distancia evolutiva entre las secuencias de proteínas es proporcional a la longitud de la rama. Los números romanos indican los grupos filogenéticos dentro de la familia de canales de K⁺ de plantas dependientes de voltaje (Pilot, Pratelli, et al., 2003). El árbol filogenético se construyó con el programa Seaview usando el método Maximum-likelihood como se había descrito previamente (Véry et al 2014). Se usaron las siguientes secuencias: LKT1 (A0A3Q7J386), SIK1.1 (A0A3Q7IKC0), SIK2.1 (A0A3Q7FNG8), SIK2.2 (A0A3Q7HJI3), SIK3.1 (A0A3Q7EQE3), SIK3.2 (A0A3Q7IDF8), SIK4.1 (A0A3Q7ET97), SIK4.2 (A0A3Q7IKY1), SIK5.1 (A0A3Q7FQ84), SIK5.2 (A0A3Q7GNC6), SISKOR (A0A3Q7IRB9), VvK5.1 (F6HSG2), MtGORK (G7KG18), HvK5.2 (BAK07979.1), LsK5.1 (XP_023769988.1) y EsK5.1 (XP_006408375.1).

Se realizó un estudio de expresión génica mediante qPCR para identificar cuál era el canal de salida de K⁺ que más se expresaba en la estela de la raíz de tomate. Para ello, las plantas de tomate se crecieron en cultivo hidropónico con solución 1/5 de Hoagland durante 21 días. Tras este tiempo, se separó el córtex y la estela de las muestras de la raíz (Figura 46). Se cuantificó la expresión génica de los genes de los tres canales de salida en los tejidos obtenidos de la raíz. Se observó que uno de los genes mostraba mayor expresión que los demás tanto en el córtex como en la estela (Figura 45A y 45B).

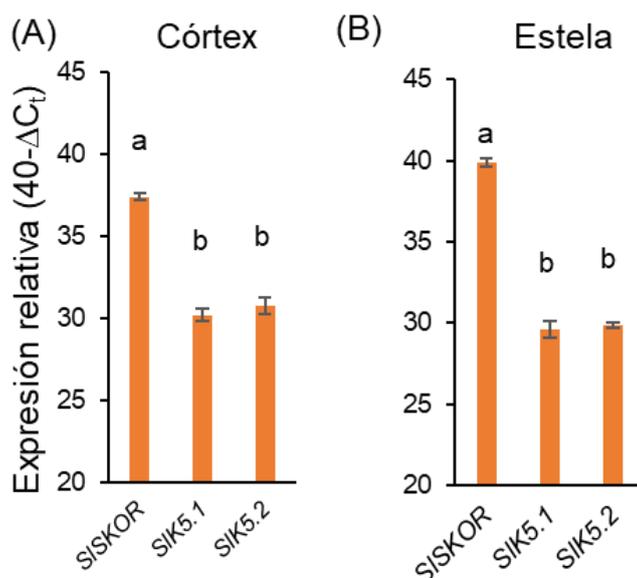


Figura 45: Expresión de *SISKOR*, *SIK5.1* y *SIK5.2* en el córtex (A) y la estela (B) de las raíces de tomate. El nivel de expresión se expresa en $40 - \Delta C_t$ ($n=3$ grupos de raíces de 3 plantas diferentes). Las letras indican grupos homogéneos de datos a $p < 0,05$ según el test post hoc de Tukey (realizado después de ANOVA).

El gen que más se expresaba fue nombrado como *SISKOR* y los otros dos se denominaron *SIK5.1* y *SIK5.2*, de acuerdo con la nomenclatura previamente establecida (Pilot, Pratelli, et al., 2003). Cabe destacar que la expresión de *SISKOR* fue mayor en la estela que en el córtex (Figura 46). Se comprobaron los niveles de expresión de *SISKOR* en otros tejidos de la planta de tomate y se concluyó que éste se expresaba principalmente en la raíz de la planta (Figura 46C). Además, la expresión de *SISKOR* se vio disminuida debido al ayuno de K^+ (7 días) y por la aplicación de ABA ($10 \mu M$ 3h) (Figura 46D y 46E), como ocurre en el caso de *AtSKOR* (Frédéric Gaymard et al., 1998; Pilot, Gaymard, et al., 2003).

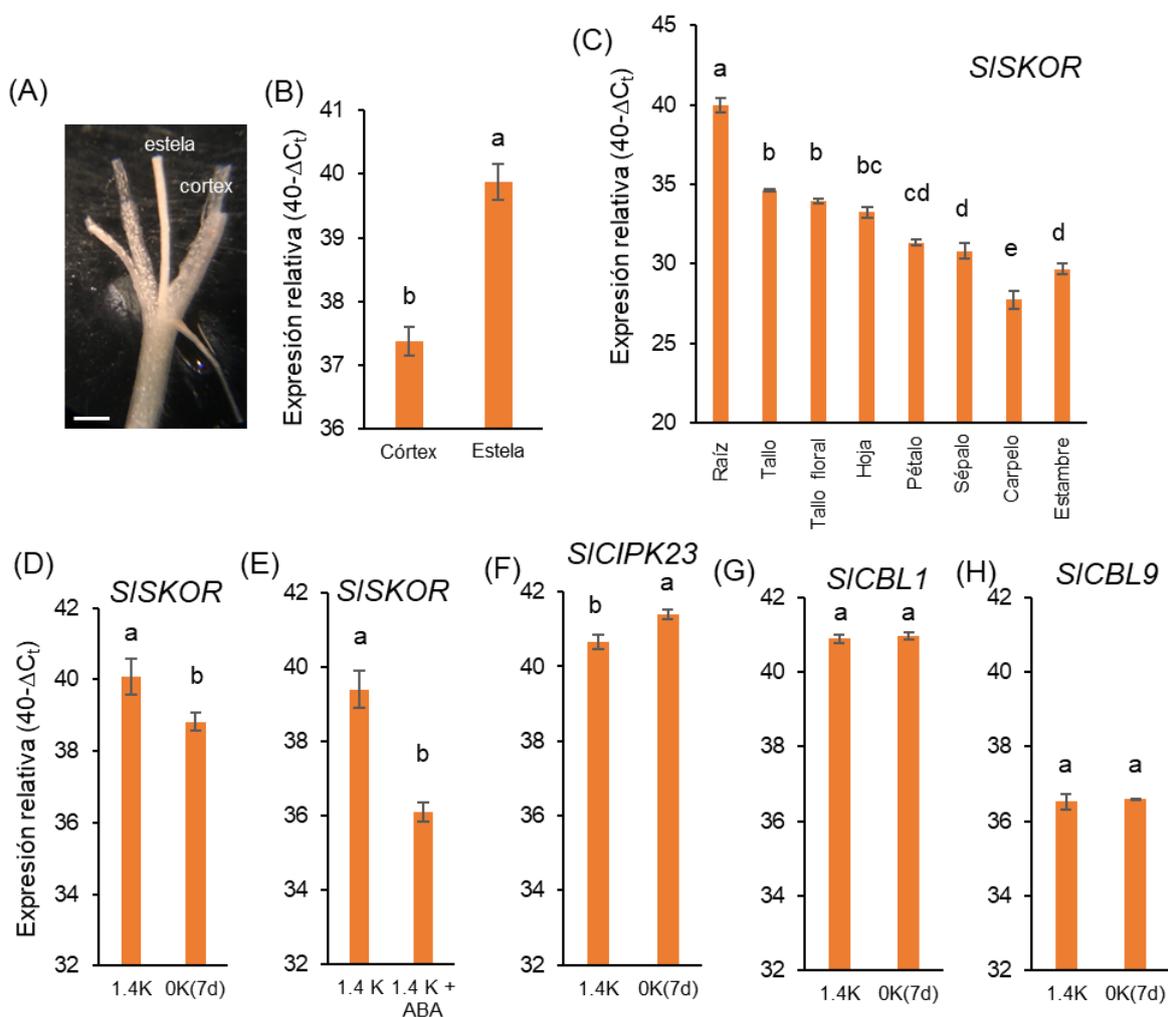


Figura 46 *SISKOR* se expresa en la estela de la raíz de las raíces de tomate. (A) Fotografía de una raíz de tomate donde se puede ver la estela separada del córtex. Barra de escala = 1 mm. (B) Expresión relativa de *SISKOR* medida mediante qRT-PCR en muestras aisladas de la estela y el córtex. El nivel de expresión se expresa como $40-\Delta C_t$ ($n=3$ grupos de raíces de 3 plantas diferentes). (C) Expresión relativa de *SISKOR* en los diferentes tejidos de la planta. El nivel de expresión se expresa como $40-\Delta C_t$ ($n=3$ grupos de raíces de 3 plantas diferentes). (D) Expresión relativa de *SISKOR* en raíces en respuesta al ayuno de K^+ (7 d). (E) Expresión relativa de *SISKOR* en raíces en respuesta al tratamiento con $10 \mu M$ de ácido abscísico (ABA) (3h). De (F) a (H) Expresión relativa en las raíces de *SICIPK23* (F), *SICBL1* (G) y *SICBL9* (H) en respuesta al ayuno de K^+ (7d). Las letras indican grupos homogéneos de datos a $p < 0.05$ de acuerdo con el test post hoc de Tukey (llevado a cabo tras ANOVA).

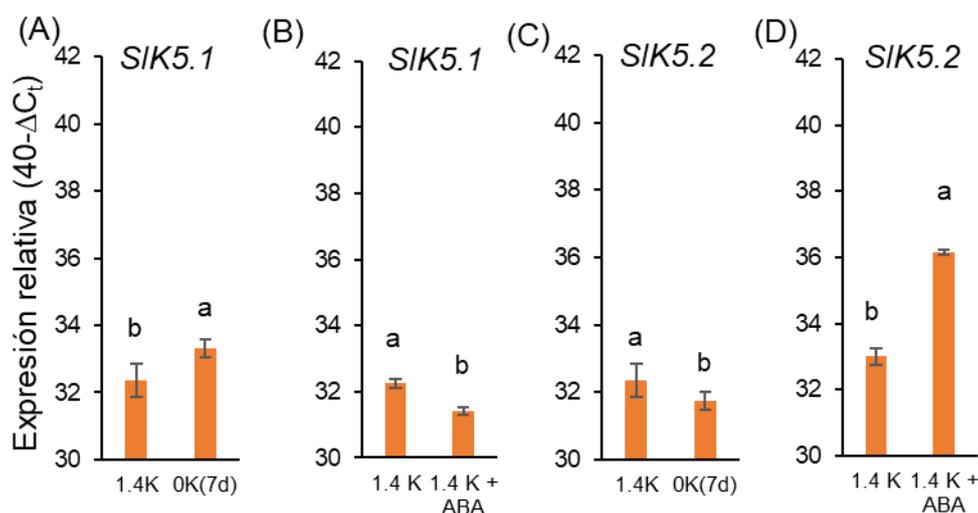


Figura 47 :Expresión de *SIK5.1* en respuesta al ayuno de K^+ (7d) (A) y la aplicación de $10 \mu M$ de ABA durante 3 h (B). Expresión de *SIK5.2* en respuesta al ayuno de K^+ (7d) (C) y la aplicación de $10 \mu M$ de ABA durante 3 h (D). El nivel de expresión se expresa como $40-\Delta C_t$ ($n=3$ grupos de raíces de 3 plantas diferentes). Las letras indican grupos homogéneos de datos a $p < 0,05$ según el test post hoc de Tukey (realizado tras ANOVA).

Por tanto, el patrón de expresión y regulación de *SISKOR* sugiere que es el ortólogo de *AtSKOR* (Frédéric Gaymard et al., 1998). También se analizó la expresión en las raíces de los reguladores de la nutrición de K^+ en tomate como *SICIPK23*, *SICBL1* y *SICBL9* en respuesta al ayuno de K^+ (7 días). *SICIPK23* y *SICBL1* se expresaron más fuertemente en la raíz que *SICBL9* (Figura 46F-46H). Con respecto al tratamiento de ayuno de K^+ , solo *SICIPK23* vio incrementada su

expresión mientras que la expresión de *SICBL1* y *SICBL9* fue similar tanto a 1,4 mM de K^+ como a 0 mM de K^+ (7 días). Por su parte *SIK5.1* y *SIK5.2* no mostraron los mismos cambios que *SISKOR* frente a ABA o condiciones de ayuno de K^+ (Figuras 47A-D).

4.3.2 SISKOR constituye canales selectivos de K^+ en ovocitos de *Xenopus*

La expresión de SISKOR en ovocitos de *Xenopus* ha permitido establecer sus propiedades funcionales. La expresión de SISKOR dio lugar a una corriente de salida activada por la despolarización de la membrana que no se observó en ovocitos inyectados con agua (Figura 48A). Las corrientes mediadas por SISKOR mostraron un fuerte componente dependiente del tiempo con una cinética de activación sigmoideal. El efecto de la concentración externa de K^+ en las corrientes mediadas por SISKOR se estudió comparando las corrientes en estado estacionario con pulsos de fijación de voltaje (desde -80 hasta +60 mV) en gráficas I/V. Se observó que la disminución de la concentración externa de K^+ (de 100 a 30 y 10 mM de K^+) daba lugar a corrientes mayores que se activaban a valores más bajos del potencial de membrana (Figura 48B). Sin embargo, las corrientes a 3 mM de K^+ externo fueron ligeramente menores que a 10 mM de K^+ (Figura 48B). Se calculó la probabilidad relativa de apertura ($P_o/P_{o_{max}}$) de SISKOR a diferentes concentraciones externas de K^+ (Figura 48C). Potenciales de membrana menos negativos y bajas concentraciones externas de K^+ dieron lugar a una mayor población de canales abiertos (mayores valores $P_o/P_{o_{max}}$) (Figura 48C). La concentración externa de K^+ también influía notablemente en la E_{a50} (potencial de semiactivación). El E_{a50} pasó de +61 mV a 100 mM de K^+ a +38 mV a 30 mM de K^+ y a -1 mV a 3 mM de K^+ . La actividad de SISKOR también se vio afectada por el pH externo. Las corrientes a +40 mV fueron dos veces más grandes a pH 7,5 que a pH 5,5 (Figura 48D). La selectividad por K^+ de las corrientes mediadas por SISKOR fue estudiada midiendo los potenciales de reversión (E_{rev}) de las corrientes de cola. La representación de E_{rev} frente a la concentración externa de K^+ reveló que las corrientes mediadas por SISKOR se aproximaron a los potenciales de reversión teóricos para K^+ (E_K) de acuerdo a la

ecuación de Nernst (Figura 48E). Por tanto, las corrientes mediadas por SISKOR fueron principalmente de K^+ . Los cambios en E_{rev} debidos a la sustitución del K^+ por otros cationes (Rb^+ , Cs^+ y Na^+) permitieron determinar la permeabilidad relativa respecto al K^+ (Figura 48F y 48G). Se observó que la permeabilidad relativa por el Rb^+ , Cs^+ y Na^+ fue aproximadamente 0,86, 0,48 y 0,28, respectivamente.

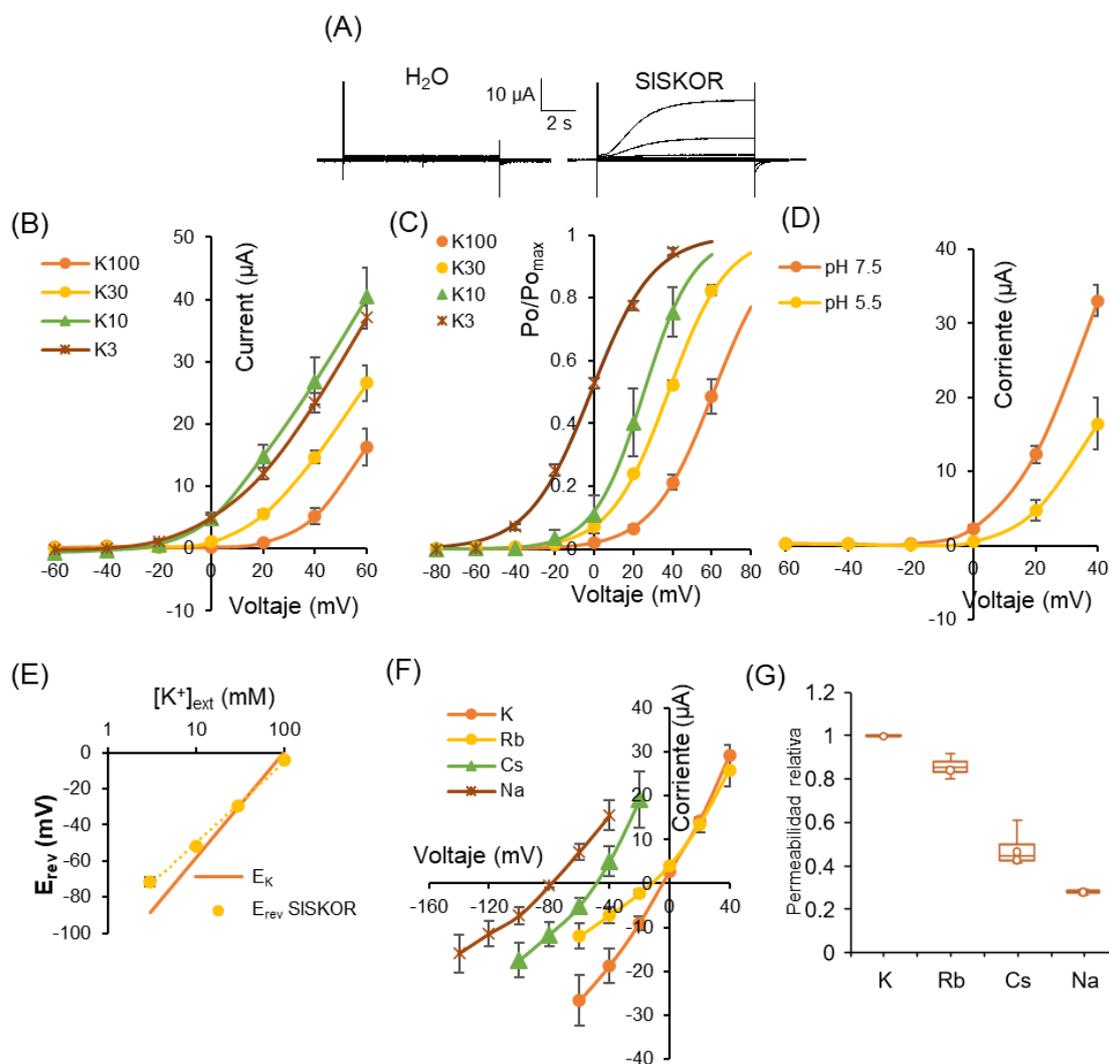


Figura 48: SISKOR forma canales de salida de K^+ en ovocitos de *Xenopus* que son activados por bajas concentraciones externas de K^+ y pH alcalino. (A) Registros representativos de ovocitos de *Xenopus* inyectados con agua (izquierda) y con SISKOR (derecha) en experimentos de fijación de voltaje (TEVC). Pulsos de fijación de voltaje comprendidos entre -80 mV y $+60$ mV (incrementos de 20 mV; potencial de reposo, -60 mV; potencial de desactivación, -60 mV). (B) Curvas corriente-voltaje en estado estacionario. (C) Probabilidades relativas de apertura ($P_o/P_{o_{max}}$) a diferentes concentraciones externas de K^+ y (D) efecto de la alcalinización del medio externo sobre las corrientes en ovocitos que expresan SISKOR. Medias \pm SE ($n = 6-8$, $6-8$, y 4 en (B), (C) y (D), respectivamente). Las curvas corriente-voltaje en estado estacionario de (B)

y (D) se obtuvieron a partir de corrientes en estado estacionario en pulsos de fijación de voltaje (-80 a +60 mV). Los valores $P_o/P_{o_{max}}$ de (C) se obtuvieron a partir de corrientes de cola registradas a potenciales de desactivación (-60 mV). (E) Potenciales de reversión de ovocitos inyectados con SISKOR (E_{rev} SISKOR) a diferentes concentraciones externas de K^+ . La línea continua representa el potencial de equilibrio para el K^+ (E_K). Medias \pm SE (n=4-5). Los potenciales de reversión se calcularon a partir de las corrientes de desactivación con un protocolo a partir de las corrientes de cola (potencial de activación +60 mV, potenciales de desactivación flanqueados E_{rev} en cada concentración de K^+). (F) Corrientes de desactivación de las corrientes en ovocitos que expresan SISKOR en presencia de diferentes cationes monovalentes. Los ovocitos se perfundieron con soluciones que contenían 100 mM de K^+ , Rb^+ , Cs^+ o Na^+ y se sometieron a un protocolo de corrientes de cola como se describe en (E). Medias \pm SE (n=4). (G) Índices de permeabilidad relativa de ovocitos inyectados con SISKOR a K^+ , Rb^+ , Cs^+ y Na^+ . La variación de E_{rev} en las corrientes de desactivación mostradas en (F) se utilizó para calcular los coeficientes de permeabilidad relativa mediante la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz. Medias \pm SE (n=4).

4.3.3 SISKOR se inhibe por SICIPK23-SICBL1/9

Estudios previos mostraron que la entrada de K^+ en la raíz de la planta y su translocación a la parte aérea están estrechamente coordinadas (Kochian et al., 1989; M. Nieves-Cordones et al., 2019). Surgía la pregunta de si los reguladores como SICIPK23-SICBL1, implicados en la entrada de K^+ (Capítulo I), podrían también estar implicados en la regulación del proceso de translocación de K^+ a través de SISKOR en las plantas de tomate. Para comprobar esta hipótesis, se expresó SISKOR en presencia o ausencia de los componentes del complejo SICIPK23-SICBL1/9 en ovocitos de *Xenopus*. La coexpresión de SICIPK23 + SICBL1 o SICIPK23 + SICBL9 llevó a una fuerte reducción de las corrientes en estado estacionario mediadas por SISKOR a 30 mM de K^+ (83 % y 87 %, respectivamente) (Figura 49A y 49B). La expresión de solo uno de los componentes del complejo regulador (SICIPK23 o SICBL1) con SISKOR no afectó a la magnitud de la corriente en comparación con la expresión de SISKOR solo (Figura 49A y 49B). Por tanto, la formación del complejo CIPK-CBL fue necesaria para la inhibición de SISKOR. Posteriormente, se comprobó si la concentración externa de K^+ era importante para la regulación de SISKOR mediada por SICIPK23-SICBL1. Las corrientes en estado estacionario mediadas por SISKOR se registraron a 3 mM y 30 mM de K^+ en presencia o ausencia de SICIPK23-SICBL1. Se observó que las corrientes macroscópicas eran de menor magnitud cuando SISKOR se coexpresaba con el complejo SICIPK23-SICBL1,

tanto a 3 como a 30 mM de K⁺ (Figura 49C). El análisis de las probabilidades relativas de apertura ($P_o/P_{o_{max}}$) reveló que SICIPK23-SICBL1 convertía a los canales SISKOR en menos sensibles al voltaje de membrana y a la concentración de K⁺ externo (Figura 49D). El primer efecto se observó por el desplazamiento de E_{a50} hacia valores más altos del potencial de membrana (un cambio de +63 mV y +34 mV a 3 mM de K⁺ y 30 mM de K⁺, respectivamente) y la reducción de la “gating charge” (descenso del 52% y 28% a 3 mM de K⁺ y 30 mM de K⁺, respectivamente) debido al SICIPK23-SICBL1 (Tabla 23, Figura 49D).

Tabla 23: Potencial de semiactivación (E_{a50}) y “gating charge” (Z_g) para corrientes de ovocitos que expresan SISKOR y SISKOR-SICIPK23-SICBL1 a 3 y 30 mM de K⁺. E_{a50} y Z_g se calcularon ajustando los valores $P_o/P_{o_{max}}$ a la ecuación de Boltzmann. Los valores $P_o/P_{o_{max}}$ se obtuvieron a partir de corrientes de cola registradas a potenciales de desactivación (-60 mV).

	E_{a50} (mV)		Z_g	
	3 mM K ⁺	30 mM K ⁺	3 mM K ⁺	30 mM K ⁺
SISKOR	-3 ± 1	40 ± 5	-1.97 ± 0.14	-1.36 ± 0.17
SISKOR + SICIPK23 + SICBL1	60 ± 7	74 ± 14	-1.02 ± 0.14	-0.98 ± 0.18

La menor sensibilidad a K⁺ de SISKOR debida a SICIPK23-SICBL1 se dedujo de los desplazamientos de E_{a50} causados por un cambio en la concentración externa de K⁺. Cuando la concentración externa de K⁺ se incrementó de 3 mM hasta 30 mM de K⁺, E_{a50} aumentó +43 mV en los ovocitos que expresaban SISKOR y +14 mV en los ovocitos que expresaban SISKOR-SICIPK23-SICBL1 (Tabla 23). Por tanto, la actividad de transporte a través de SISKOR fue muy baja en presencia del complejo SICIPK23-SICBL1, incluso cuando la concentración externa de K⁺ disminuía.

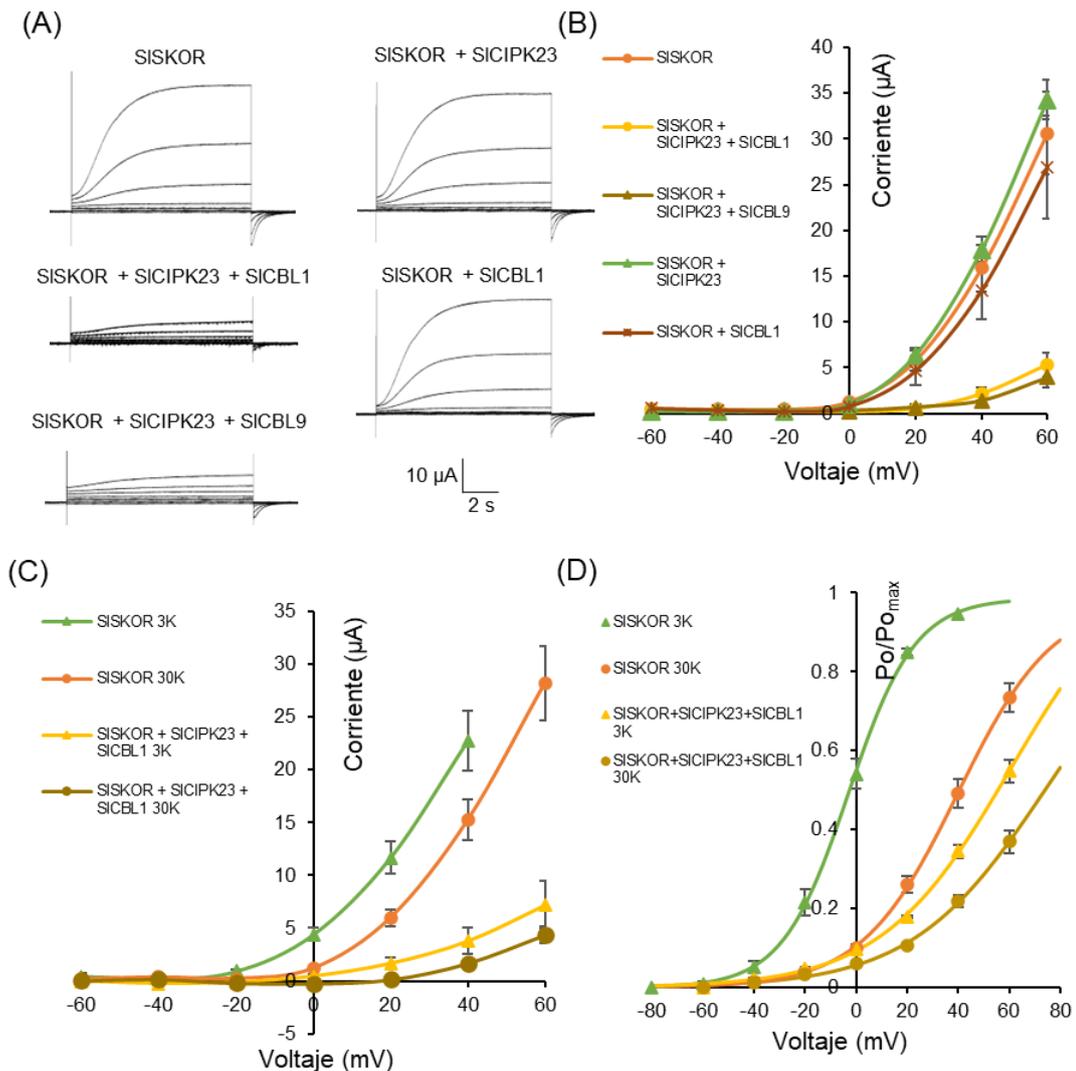


Figura 49: SISKOR es inhibido por los complejos SICIPK23-SICBL1/9. (A) Curvas representativas de las corrientes registradas en ovocitos de *Xenopus* inyectados con SISKOR, SISKOR + SICIPK23 + SICBL1, SISKOR+SICIPK23+SICBL9, SISKOR + SICIPK23 y SISKOR + SICBL1 en experimentos de TEVC realizados con una solución con una concentración de 30 mM de K^+ . (B) Diagramas de corriente- voltaje en estado estacionario de ovocitos inyectados con las construcciones mostradas en (A). Medias \pm SE ($n=4-8$). Diagramas corriente- voltaje en estado estacionario (C) y probabilidades relativas de apertura (D) de ovocitos inyectados con SISKOR y SISKOR + SICIPK23 + SICBL1 a dos concentraciones externas de K^+ (3 mM y 30 mM de K^+). Medias \pm SE ($n=5-6$). Las curvas corriente-voltaje en estado estacionario de (B) y (C) se obtuvieron de las corrientes en estado estacionario de los diferentes pulsos de fijación de voltaje (-80 a +60 mV). Los pulsos de fijación de voltaje fueron desde -80 hasta +60 mV (Incrementos de 20 mV); potencial de reposo, -60 mV; potencial de desactivación, -60 mV).

4.3.4 La inhibición de canales tipo SKOR por parte de CIPK23-CBL1 está conservada en tomate, vid, Medicago y lechuga, pero no en Arabidopsis y *Eutrema salsugineum*.

Se evaluó si el complejo CIPK23-CBL1 regulaba a los canales homólogos a SISKOR en otras especies de plantas. Primero se expresó el canal de K⁺ SKOR de Arabidopsis (AtSKOR), junto con AtCIPK23-AtCBL1 en ovocitos de Xenopus. Inesperadamente, AtCIPK23-AtCBL1 no afectó a las corrientes mediadas por AtSKOR (Figura 50). También se probó el otro canal de salida de K⁺ que está presente en el genoma de Arabidopsis, AtGORK. Al igual que ocurría en el caso de AtSKOR, las corrientes mediadas por AtGORK no fueron moduladas por el complejo AtCIPK23-AtCBL1 en los ovocitos de Xenopus (Figura 50). Por tanto, la regulación de los canales de salida de K⁺ mediada por CIPK23-CBL1 no estaba conservada en Arabidopsis. Estos resultados fueron inesperados ya que la regulación de los sistemas de transporte de K⁺ como HAK5 o AKT1 por parte de los complejos CIPK23-CBL1 sí que está conservada en diferentes especies de plantas (Boscari et al., 2009; Cuéllar et al., 2010; Geiger et al., 2009; Ragel et al., 2015; Xu et al., 2006) (Capítulo I de esta tesis). El modelo actual sobre este tema establece que el éxito de la regulación de un sistema de transporte por parte de un complejo CIPK-CBL depende de la presencia de determinados dominios proteicos (José Sánchez-Barrena et al., 2020) que se han conservado en numerosos ortólogos. Por tanto, la pérdida de la regulación de AtSKOR por parte de AtCIPK23-AtCBL1 podría haberse originado por la pérdida de estos dominios conservados en AtSKOR, en AtCIPK23-CBL1 o en ambos. Se realizó un experimento para determinar si el complejo de Arabidopsis AtCIPK23-CBL1 era capaz de regular el canal de K⁺ SISKOR de tomate. Para ello se expresó SISKOR, SISKOR con AtCIPK23-AtCBL1 y SISKOR con SICIPK23-SICBL1 en ovocitos de Xenopus y se llevó a cabo un análisis de las corrientes macroscópicas obtenidas. Las corrientes relativas en estado estacionario a +60 mV evidenciaron que AtCIPK23-AtCBL1 inhibía SISKOR en una medida similar a SICIPK23-SICBL1 (Figura 50). Por tanto, se pudo deducir que la pérdida de regulación de AtSKOR mediada por AtCIPK23-AtCBL1 estaba originada por cambios en el canal AtSKOR, ya que el complejo regulatorio de Arabidopsis era

efectivo inhibiendo SISKOR. A partir de aquí, se probaron más homólogos del canal SKOR presentes en tomate, pero también en otras especies para ver si eran regulados o no por el complejo CIPK23-CBL1. Para ello, se expresaron SIK5.1 y SIK5.2 de tomate, VvK5.1 de vid (Villette et al., 2019), MtGORK de *Medicago truncatula* (Drain et al., 2020), LsK5.1 de lechuga (*Lactuca sativa*), EsK5.1 de *Eutrema salsugineum* y HvK5.2 de cebada (Véry et al., 2014) en ovocitos de *Xenopus* de forma similar a los experimentos descritos anteriormente. Desafortunadamente, no se observó actividad de los canales de K^+ en los ovocitos que expresaban SIK5.1 y Hv5.2. Sin embargo, se obtuvieron resultados con el resto de los canales de K^+ . Se observó que las corrientes de K^+ mediadas por SIK5.2, VvK5.1, MtGORK y LsK5.1 se redujeron alrededor de 60-70% debido a la expresión de AtCIPK23-AtCBL1 o SICIPK23-SICBL1 (Figura 50). De forma similar a lo ocurrido con AtSKOR y AtGORK, las corrientes de K^+ mediadas por EsK5.1 no se inhibieron por AtCIPK23-AtCBL1 o por SICIPK23-SICBL1 (Figura 50). Por tanto, la regulación de los canales tipo SKOR por los complejos CIPK23-CBL1 está presente en tomate, vid, *Medicago* y lechuga, pero no en *Arabidopsis* y *Eutrema salsugineum*.

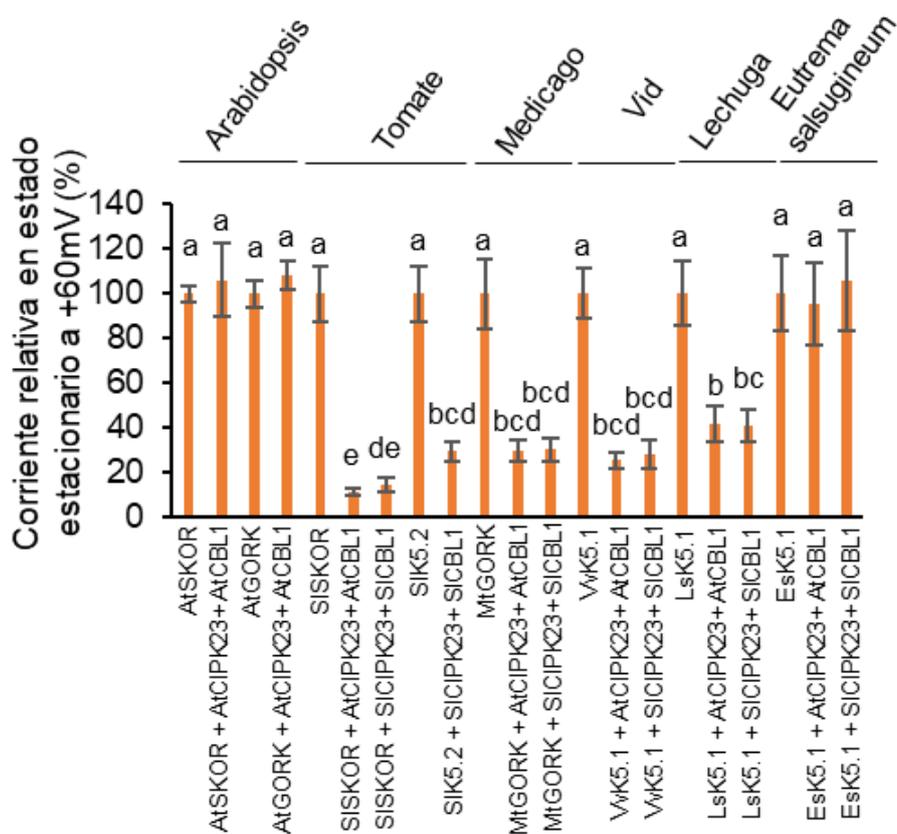


Figura 50: La inhibición de los canales de salida de K⁺ por parte de los complejos CIPK23-CBL1 está conservada en tomate, *Medicago trunculata*, vid (*Vitis vinífera*), lechuga (*Lactuca sativa*) pero no en *Arabidopsis* y *Eutrema salsugineum*. Corriente relativa en estado estacionario a +60 mV (%) de ovocitos inyectados con cARNs que codifican canales de salida de K⁺ de *Arabidopsis*, tomate, *Medicago*, vid, lechuga y *Eutrema salsugineum* en presencia o ausencia de AtCIPK23 + AtCBL1 o SICIPK23 + SICBL1. Los valores relativos se calcularon respecto a la actividad de cada canal sin CIPK23 + CBL1. (todos los canales sin CIPK23 + CBL1 tienen el 100% de actividad relativa). Medias \pm SE (n=5-16). Las letras indican grupos homogéneos de datos a p < 0.05 de acuerdo con el test post hoc LSD (llevado a cabo tras ANOVA).

4.3.5 La inhibición de SISKOR por parte de los complejos CIPK23-CBL1 está mediada por mecanismos dependientes e independientes de fosforilación

SISKOR y AtSKOR muestran un alto grado de homología: un 72% de identidad de secuencia y un 91% de similitud de secuencia. (Figura 60, Material suplementario de la tesis (Anexo III)). Debido a que SISKOR, pero no AtSKOR, era regulado por los complejos CIPK23-CBL1, se pensó que el intercambio de fragmentos entre ambas proteínas podría ayudar a mapear los sitios diana de los complejos CIPK23-CBL1. Como parte de un trabajo previo realizado en el laboratorio por Laura Hurtado-Navarro, se diseñaron y construyeron unas proteínas quiméricas que contenían diversos dominios de SISKOR y AtSKOR, y se evaluó la regulación por parte de los complejos CIPK23-CBL1 mediante su expresión en ovocitos de *Xenopus*. Las quimeras que se obtuvieron como trabajo previo a la realización de esta Tesis Doctoral fueron las siguientes: (i) AtSKOR-(Ct)SISKOR (dominio C-terminal de AtSKOR reemplazado por el de SISKOR), (ii) SISKOR-(Ct)AtSKOR (dominio C-terminal de SISKOR reemplazado por el de AtSKOR) y (iii) (Nt)SISKOR-AtSKOR (dominio N-terminal de AtSKOR reemplazado por el de SISKOR). La quimera del canal AtSKOR-(Ct)SISKOR mostró unas corrientes macroscópicas similares en presencia y en ausencia de AtCIPK23-AtCBL1 (Figura 51A). La quimera SISKOR-(Ct)AtSKOR mostró una reducción del 68 % cuando ésta era coexpresada con AtCIPK23-AtCBL1 (Figura 51B). Los resultados obtenidos con estas quimeras evidenciaban que el dominio C-terminal de SISKOR no contiene ningún sitio diana para AtCIPK23-AtCBL1 y

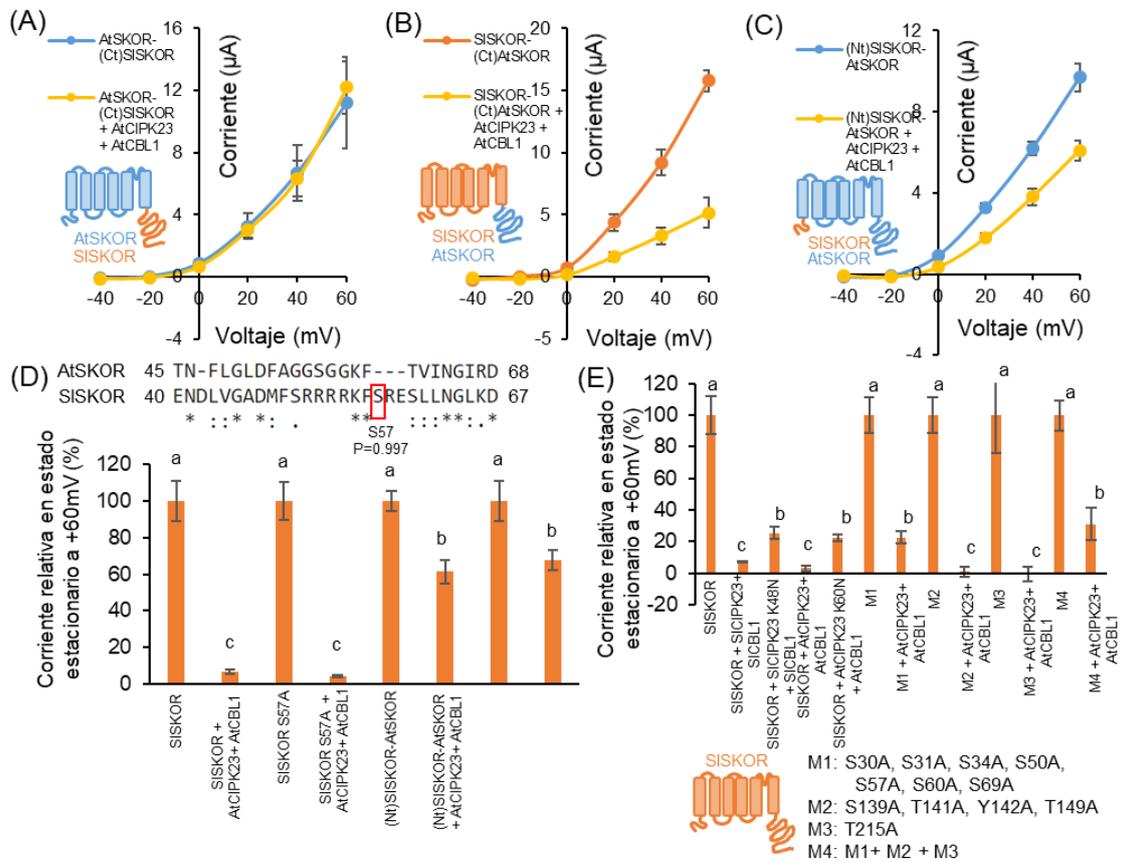
por lo tanto el sitio o sitios implicados en la regulación deben estar localizados en otros dominios de SISKOR (dominios N-terminal o transmembrana). La tercera quimera, (Nt)SISKOR-AtSKOR, se inhibió un 37 % cuando se coexpresó con AtCIPK23-AtCBL1 (Figura 51C). Es importante resaltar que solo el cambio del dominio N-terminal permitió la regulación parcial de AtSKOR por parte de AtCIPK23-AtCBL1. El conjunto de estos resultados indicó que el dominio N-terminal y los dominios transmembrana de SISKOR estaban implicados en su inhibición por el complejo CIPK23-CBL1. Los complejos CIPK23-CBL1 regulan el transporte de K⁺ mediante fosforilación (Ródenas et al., 2021; Xu et al., 2006). Así pues, para comprobar si la fosforilación era importante para la inhibición de SISKOR mediada por los complejos CIPK23-CBL1, se realizó, en primer lugar, un estudio con el servidor NetPhos3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>) sobre la secuencia de la proteína SISKOR, para identificar sitios diana putativos de fosforilación por parte de la quinasa. Debido a que el C-terminal no estaba implicado en la regulación por CIPK23-CBL1/9, se estudiaron los fragmentos citosólicos presentes en el resto de la proteína (Figuras 51 A-C): N-terminal, el segmento de unión S2-S3 (entre los segmentos transmembrana 2 y 3) y el segmento de unión S4-S5 (entre los segmentos transmembrana 4 y 5). Un residuo que revestía especial interés fue la Ser57 en el N-terminal de SISKOR (Figura 51D) que tenía una probabilidad de fosforilación de 0,995. Además, la secuencia de reconocimiento del sitio de fosforilación y esta Ser no estaban conservadas en AtSKOR (Figura 51D). El siguiente paso fue producir un mutante S57A en SISKOR y en la quimera (Nt)SISKOR-AtSKOR. La expresión de los canales WT y del mutante S57A en presencia o ausencia de AtCIPK23-AtCBL1 en ovocitos de *Xenopus* reveló que el complejo CIPK-CBL inhibía de forma similar tanto SISKOR como a (Nt)SISKOR-AtSKOR, independientemente de la mutación S57A (Figura 51D). Por tanto, este residuo no estaba implicado en la inhibición de SISKOR mediada por los complejos CIPK23-CBL1. De este modo, se produjeron múltiples mutantes en los sitios de fosforilación con una probabilidad mayor a 0,5 en la predicción realizada con NetPhos3.1 para el N-terminal (Construcción M1, mutaciones S30A, S31A, S34A, S50A, S57A, S60A, S69A), segmento de unión S2-S3 (Construcción M2, mutaciones S139A, T141A, Y142A, T149A), segmento de unión S4-S5 (Construcción M3, mutación T215A) y una

construcción que contenía todas las mutaciones (Construcción M4). Además, en estos experimentos, también se usó el mutante de AtCIPK23 AtCIPK23 K60N, que no presenta actividad quinasa (Ragel et al., 2015; Xu et al., 2006). La expresión de estas construcciones en ovocitos de *Xenopus* mostró que AtCIPK23 K60N-AtCBL1 podía inhibir SISKOR, pero de forma parcial (Figura 51E). Resultados similares se obtuvieron con el mutante SICIPK23 K48N (mutado en el residuo homólogo a K60 en tomate) comparado con SICIPK23-SICBL1 (Fig 51E). Estos resultados sugieren que aproximadamente un 20 % de la reducción de la actividad de SISKOR era dependiente de fosforilación mientras que el resto de reducción se producía mediante un mecanismo diferente. Es posible especular que, aproximadamente el 80 % de la reducción de la actividad tuvo lugar a través de un mecanismo independiente de la fosforilación y que es dependiente de los dominios transmembrana de SISKOR ya que AtCIPK23-AtCBL1 inhibió en mayor medida a SISKOR-(Ct)AtSKOR (Figura 51B) que a (Nt)SISKOR-AtSKOR (Figura 51C) y la única diferencia entre estas dos construcciones es la presencia de los dominios transmembrana de SISKOR en SISKOR-(Ct)AtSKOR (Figura 51B). Por su parte, los resultados obtenidos con las construcciones mutantes M1, M2, M3 y M4 aportaron algunas ideas acerca de los sitios de fosforilación. Por un lado, M1 y M4 fueron inhibidos por AtCIPK23-AtCBL1 de manera similar a como ocurría con SISKOR + AtCIPK23 K60N-AtCBL1 (Figura 51E). Por otro lado, la inhibición de los mutantes M2 y M3 por parte de AtCIPK23-AtCBL1 fue comparable a la de SISKOR + AtCIPK23-AtCBL1 (Figura 51E). Por tanto, podríamos deducir que los sitios diana de fosforilación deben de localizarse en el dominio N-terminal de SISKOR.

4.3.6 SISKOR, pero no AtSKOR, interacciona con SICIPK23 en ensayos de BiFC

Se llevaron a cabo ensayos de BiFC en hojas de *Nicotiana benthamiana* y en ovocitos de *Xenopus* para determinar la interacción entre las proteínas SKOR, CIPK23 y CBL1 y los posibles dominios de las mismas implicados en dicha interacción. Para ello, se fusionaron SISKOR, AtSKOR, AtSKOR-(Ct)SISKOR, SISKOR-(Ct) AtSKOR y (Nt)SISKOR-AtSKOR al dominio C-

terminal de YFP (YFP^C) y SICIPK23 y AtCIPK23 se fusionaron al dominio N-terminal de YFP (YFP^N). En primer lugar, los ensayos de BiFC se llevaron a cabo en hojas de *N. benthamiana* mediante la expresión de SISKOR, AtSKOR, y SICBL1 en el plásmido pSPYCE(M) y SICIPK23 en el plásmido pSPYNE173. La interacción entre SICIPK23-YFP^N y SICBL1-YFP^C sirvió como control positivo. Se observó que SISKOR, pero no AtSKOR, interaccionaba con SICIPK23 (Figura 51F). Un segundo ensayo de BiFC se llevó a cabo esta vez en ovocitos de *Xenopus*. Para ello, se inyectaron en los ovocitos los cARNs que codificaban para las proteínas mencionadas anteriormente, tal y como se indica en Figuras 51G y 51H. SICBL1-YFP^C + SICIPK23-YFP^N y AtCBL1-YFP^C + AtCIPK23-YFP^N sirvieron como controles positivos y los ovocitos inyectados con agua mostraron el fondo de fluorescencia. La reconstitución de la YFP se observó en los ovocitos que expresaban SICBL1-YFP^C + SICIPK23-YFP^N, SISKOR-YFP^C + SICIPK23-YFP^N, AtCBL1-YFP^C + AtCIPK23-YFP^N, SISKOR-YFP^C + AtCIPK23-YFP^N, SISKOR-(Ct)AtSKOR-YFP^C + AtCIPK23-YFP^N y (Nt)SISKOR-AtSKOR-YFP^C + AtCIPK23-YFP^N pero no se produjo en aquellos que expresaban AtSKOR-YFP^C + SICIPK23-YFP^N, AtSKOR-YFP^C + AtCIPK23-YFP^N y AtSKOR-(Ct)SISKOR-YFP^C + AtCIPK23-YFP^N (Figura 51G y 51H). Se observó actividad del canal AtSKOR en los ovocitos que expresaban AtSKOR-YFP^C + AtCIPK23-YFP^N y AtSKOR-(Ct)SISKOR-YFP^C + AtCIPK23-YFP^N, por lo que la ausencia de fluorescencia YFP no podía atribuirse a un efecto de la fusión YFP^C sobre la expresión de la proteína. Así pues, SISKOR, y no AtSKOR, mostró interacción con SICIPK23 y AtCIPK23. Además, el dominio N-terminal de SISKOR fue suficiente para permitir la interacción de (Nt)SISKOR-AtSKOR con AtCIPK23. Estos resultados concuerdan con la presencia de un sitio de regulación mediante CIPK23 en el dominio N-terminal de SISKOR.



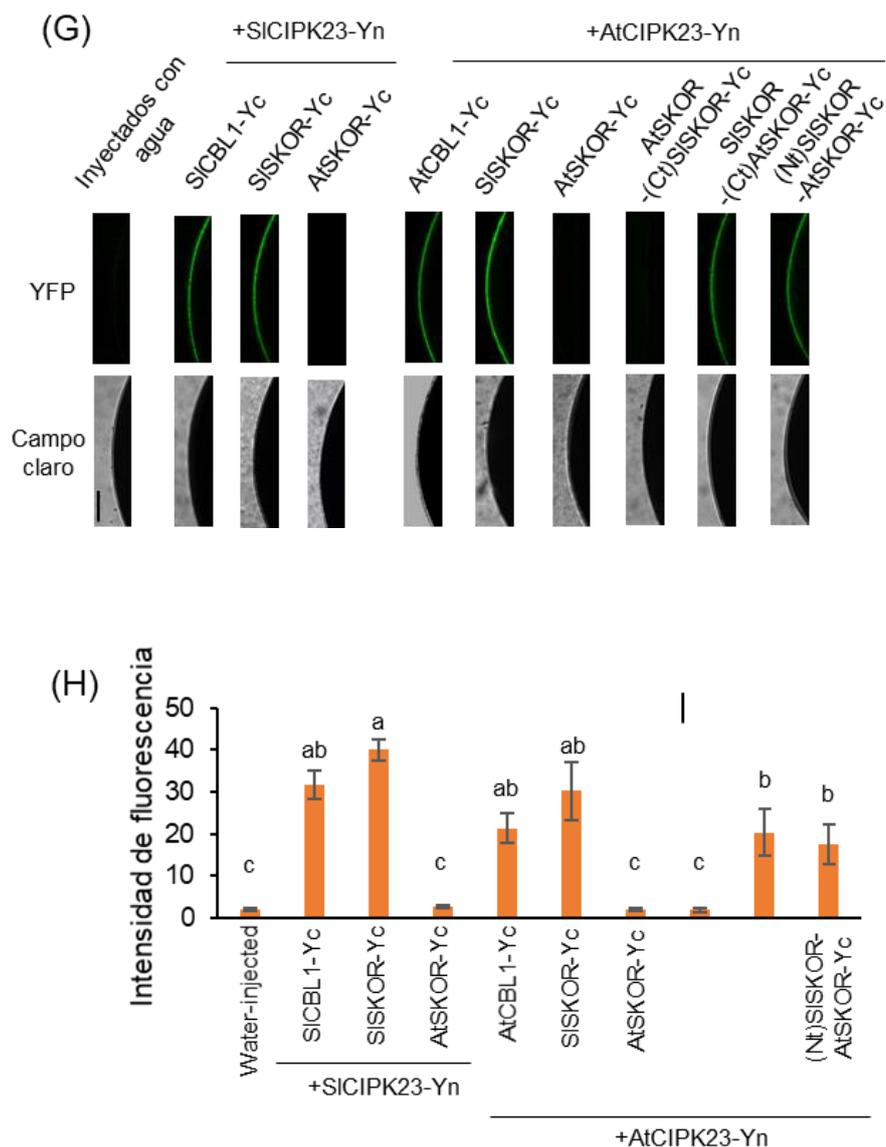


Figura 51: El dominio N-terminal contiene un posible sitio de fosforilación o interacción implicado en la inhibición de SISKOR por los complejos CIPK23-CBL1.

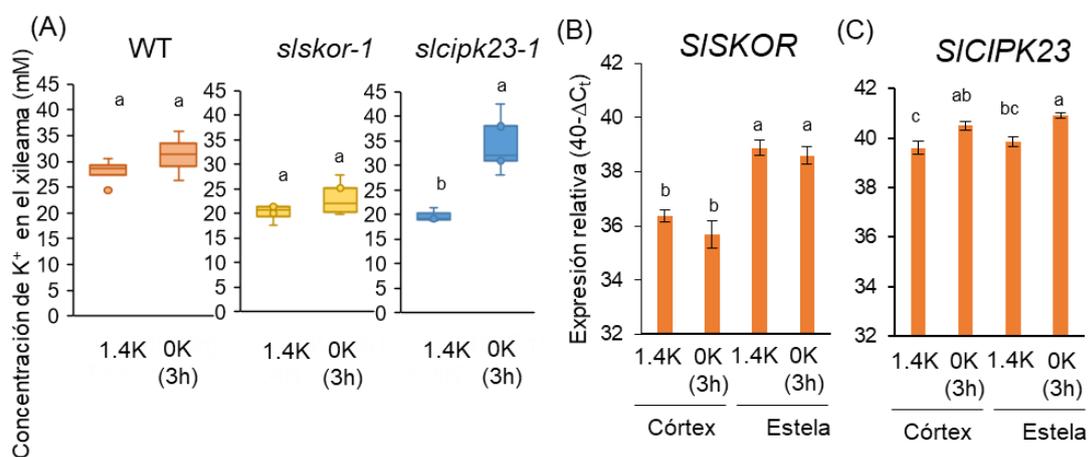
Gráficos de corriente-voltaje en estado estacionario de ovocitos de *Xenopus* inyectados con: (A) AtSKOR-(Ct) SISKOR (Dominio C-terminal de AtSKOR reemplazado por el de SISKOR) +/- AtCIPK23 + AtCBL1, (B) SISKOR-(Ct)AtSKOR (Dominio C-terminal de SISKOR reemplazado por el de AtSKOR), +/- AtCIPK23 + AtCBL1 y (C) (Nt)SISKOR-AtSKOR (Dominio N-terminal de AtSKOR reemplazado por el de SISKOR) +/- AtCIPK23 + AtCBL1. Los pulsos de fijación de voltaje estuvieron comprendidos entre -40 y +60 mV (incrementos de 20 mV; potencial de reposo, -60 mV; potencial de desactivación, -60 mV). Medias \pm SE ($n = 8-10, 4, \text{ y } 9-11$ (A), (B) y (C), respectivamente). (D) Arriba: Alineamiento de los residuos del dominio N-terminal de AtSKOR y SISKOR incluyendo el sitio de fosforilación Ser57 en SISKOR (probabilidad de fosforilación de $p=0.995$ de acuerdo con el servidor NetPhos 3.1). Abajo: corriente relativa en estado estacionario a +60 mV (%) de ovocitos inyectados con cARNs que codifican SISKOR, SISKOR S57A, (Nt)SISKOR-AtSKOR y (Nt)SISKOR-AtSKOR S57A en presencia o ausencia de AtCIPK23 + AtCBL1. Medias \pm SE ($n= 7-12$). (E) Arriba: corriente relativa en estado estacionario a +60 mV (%) de ovocitos inyectados con cARNs que codifican SISKOR, y los mutantes de SISKOR, M1, M2, M3, y M4 en presencia o ausencia de AtCIPK23 +

AtCBL1 o AtCIPK23 K60N (quinasa muerta) + AtCBL1. Abajo: pictograma de SISKOR que indica los sitios de mutación de los mutantes M1, M2 y M3 (N-terminal, segmento de unión S2-S3 y segmento de unión S4-S5) y lista de mutaciones en los sitios de fosforilación de los mutantes SISKOR M1, M2, M3 y M4. Medias \pm SE (n= 7-11). En (D) y (E), los valores relativos fueron calculados con respecto a la actividad de cada canal sin CIPK23 + CBL1 (todos los canales sin CIPK23 + CBL1 tienen 100% de actividad relativa). Las letras indican grupos homogéneos de datos a $p < 0.05$ de acuerdo con el test post hoc de Tukey (llevado a cabo tras ANOVA). (F) Ensayos de BiFC en hojas de *Nicotiana benthamiana*. SICIPK23-YFP^N + SICBL1-YFP^C sirvió como control positivo. Barra de escala = 50 μ m. (G) Ensayos de BiFC en ovocitos de *Xenopus*. Los ovocitos inyectados con agua sirvieron como fondo de fluorescencia y SICIPK23-YFP^N + SICBL1-YFP^C y AtCIPK23-YFP^N + AtCBL1-YFP^C sirvieron como controles positivos. Barra de escala = 100 μ m. (H). Media de la intensidad de fluorescencia obtenida en los ensayos de BiFC en ovocitos de *Xenopus* que expresan las construcciones indicadas. Medias \pm SE (n= 5-10). Las letras indican grupos de datos homogéneos a $p < 0.05$ de acuerdo con el test post hoc de Tukey (llevado a cabo tras ANOVA)

4.3.7 La concentración de K⁺ en el xilema se incrementa en plantas *slcipk23* después del ayuno de K⁺

Quedaba por evaluar si la regulación de SISKOR por parte de SICIPK23 se observaba en planta. Tras la obtención del mutante KO de *slcipk23* con CRISPR-Cas (Capítulo I y Materiales y Métodos de esta Tesis Doctoral), se usaron las plantas *slcipk23-1* en experimentos para caracterizar el fenotipo relacionado con la regulación de SISKOR. Se crecieron plantas WT, *slskor-1* y *slcipk23-1* en medio hidropónico durante 14 días a 1,4 mM de K⁺. Posteriormente, la mitad de las plantas se transfirieron durante 3h a solución nueva también a 1,4 mM de K⁺ (1,4K) y la otra mitad se transfirieron a solución sin K⁺ (0K), también durante 3h. Durante las dos últimas horas del experimento, se recogió la savia del xilema (exudado) para medir su concentración de K⁺. Esta concentración de K⁺ en el xilema de plantas WT y *slskor-1* no se vio alterada en las plantas ayunadas de K⁺ mientras que, bajo este mismo tratamiento, la concentración de K⁺ se incrementó en las plantas *slcipk23-1* respecto a la concentración de aquellas que habían permanecido en la solución con 1,4 mM de K⁺ (Figura 52A).

Entender cómo SISKOR es regulado en estas condiciones por SICIPK23 es un reto, y varios factores, incluyendo el potencial de membrana o las concentraciones citosólicas de K^+ en las células del parénquima del xilema, pueden contribuir a la actividad de SISKOR, aunque estos parámetros no se conocen todavía. Con los datos obtenidos, se podría avanzar una posible explicación. Se propone la hipótesis de que la falta de inhibición de SISKOR por SICIPK23 en las plantas mutantes *slcipk23-1* está detrás del aumento de la concentración de K^+ en el xilema tras el ayuno de K^+ (Figura 52A). Este aumento no se observó ni en las plantas WT ni en las *slskor-1* ya que, o bien SICIPK23 inhibía a SISKOR en las plantas WT tras la privación de K^+ , o bien SISKOR estaba ausente en las plantas *slskor-1*. Finalmente, se comprobó la expresión de los genes *SISKOR* y *SICIPK23* en la corteza y la estela de las raíces WT en las soluciones 1,4K y 0K. Se observó que la expresión de *SISKOR* era similar en las soluciones 1,4K y 0K tanto en el córtex como en la estela y que la de *SICIPK23* aumentó en córtex y estela tras el ayuno de K^+ de 3 h (Figura 52B y 52C).



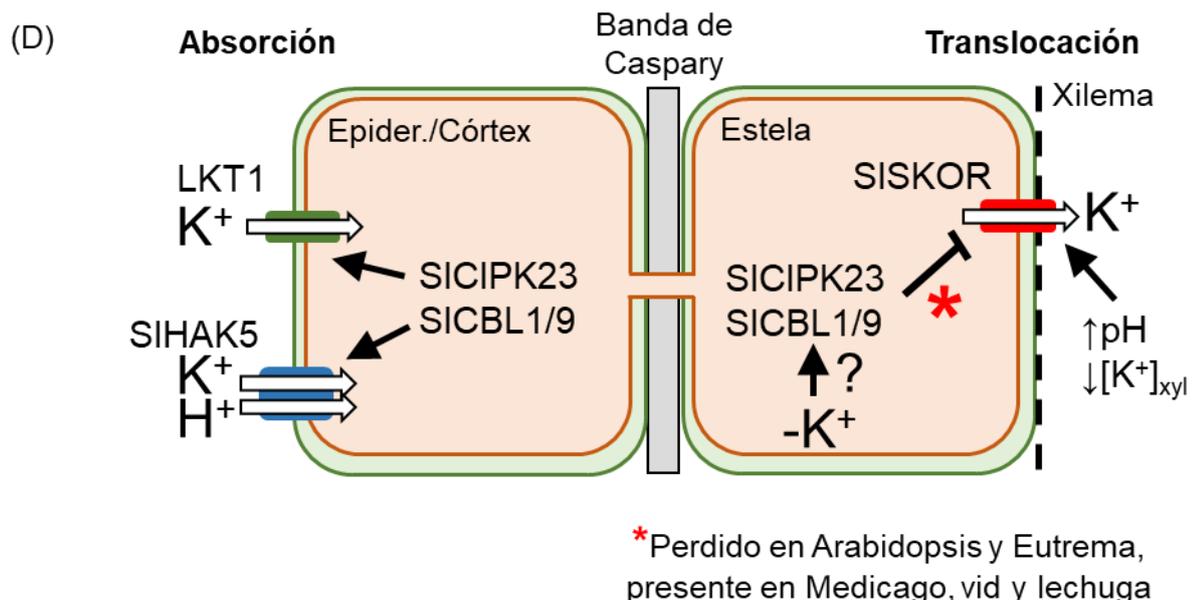


Figura 52: La concentración de K^+ en la savia del xilema se incrementa en las plantas *slc1pk23-1* tras un tratamiento de ayuno de K^+ . (A) Concentración de K^+ en la savia del xilema de plantas WT, *slskor-1*, y *slc1pk23-1*. Las plantas de tomate se crecieron durante 14 días en solución de 1/5 de Hoagland (1,4 mM de K^+) y luego se transfirieron durante 3 horas a soluciones frescas que contenían o bien 1,4 mM de K^+ (1,4K) o 0 mM de K^+ (0K (3h)). Después de una hora todas las plantas fueron decapitadas y se recolectó la savia del xilema durante dos horas. Los datos se muestran en gráficos de cajas (n=4-5). Expresión de *SISKOR* (B) y *SICIPK23* (C) en el córtex y la estela de raíces WT crecidas en soluciones 1,4K o 0K (3h) como se ha indicado. Media \pm SE (n=3). Las letras indican grupos homogéneos de datos a $p < 0,05$ de acuerdo con el test post hoc de Tukey (llevado a cabo tras ANOVA). (D) Modelo propuesto para la regulación de la absorción y translocación de K^+ en plantas de tomate. La absorción de K^+ en la epidermis y el córtex esta mediada por el canal de K^+ LKT1 y el transportador de K^+ SIHAK5, y está potenciada por los complejos SICIPK23-SICBL1/9 (Nieves-Cordones et al 2020; Capítulo I). En la estela, SISKOR media el transporte de K^+ a la parte aérea cargando el K^+ en el xilema. Significativamente, SISKOR está regulado por los complejos SICIPK23-SICBL1/9, el pH externo y la concentración externa de K^+ . Un pH alcalino o una concentración externa baja de K^+ (<30 mM) en el xilema deberían de aumentar la actividad de SISKOR. Sin embargo, los complejos SICIPK23-SICBL1/9 reducen la actividad de SISKOR haciéndola menos sensible a las concentraciones externas de K^+ y a los potenciales de membrana. SICIPK23 es un eje molecular crucial para la nutrición de K^+ en plantas de tomate, ya que puede regular tanto la absorción como la translocación de K^+ a través de transportadores y canales de K^+ . En este sentido, SICIPK23 puede servir como un mecanismo regulador rápido para ajustar la absorción y translocación de K^+ en caso de que los gradientes de K^+ externos (interfaz suelo- raíz) o internos (zonas longitudinales de la raíz) cambien repentinamente. Nuestra hipótesis es que la inhibición de SISKOR por los complejos SICIPK23-SICBL1/9 se inicia en respuesta a la privación de K^+ para evitar el eflujo masivo de K^+ a través de SISKOR al xilema.

DISCUSIÓN

Se ha comprobado que SISKOR es un actor importante para la carga de K^+ en el xilema de plantas de tomate (Figuras 46 y 48). Los experimentos en ovocitos de *Xenopus* mostraron que SISKOR funcionó como un canal selectivo de K^+ que fue activado mediante la despolarización de la membrana, pH externo alcalino y concentraciones bajas de K^+ (<30 mM) (Figura 48). Estas propiedades son típicas de los canales de salida de K^+ de plantas como AtSKOR, AtGORK, MtGORK y Vv5.1 (Ache et al., 2000; Drain et al., 2020; Frédéric Gaymard et al., 1998; Johansson et al., 2006; Lacombe et al., 2000; Villette et al., 2019). De acuerdo con los datos obtenidos en los ovocitos de *Xenopus* (Figura 48), la actividad de SISKOR se puede ajustar eficientemente entre los rangos descritos para pH (5-8) (Wilkinson et al., 1998) y las concentraciones de K^+ (3 – 60 mM) en el xilema de tomate (De Luca et al., 2021; Pérez-Alfocea et al., 2000; Taleisnik & Grunberg, 1994). A pesar de que no hay información disponible sobre el potencial de membrana de las células parenquimáticas del xilema, las plantas *s/skor* mostraron un transporte reducido de K^+ hacia las partes aéreas. Así pues, se espera que el potencial de membrana en estas células se encuentre dentro del rango de actividad de SISKOR.

Se ha comprobado que los complejos SICIPK23-SICBL1/9 regulan los sistemas de transporte implicados en el transporte de K^+ (LKT1 y SIHAK5) (Capítulo I) y los sistemas implicados en la translocación (SISKOR). Por tanto, emerge un modelo interesante en el cual SICIPK23 constituye un eje central para la coordinación de la regulación entre la absorción de K^+ y su translocación en las plantas de tomate (Figura 52D). Una alta actividad de los complejos SICIPK23-SICBL1/9 en la epidermis, córtex y la estela, potenciaría la entrada de K^+ (debido a la activación de LKT1 y SIHAK5) mientras que reduciría su translocación (debido a la inhibición de SISKOR). Dicho escenario favorecería la acumulación de K^+ en las raíces en relación con la parte aérea.

Estreses específicos como el ayuno de K^+ o el estrés hídrico reducen la translocación de K^+ pero no la entrada de K^+ , debido a la menor actividad de los

sistemas de carga de K^+ en el xilema y el incremento de la deposición de suberina (Barberon et al., 2016; Cram & Pitman, 1972; M. Nieves-Cordones et al., 2019; Roberts, 1998; Roberts & Snowman, 2000). La reducción en la expresión de *SISKOR* debida a los tratamientos de ayuno de K^+ y ácido abscísico (ABA) (Figura 46D y 46E), se correspondió con la ya descrita para *SKOR* en *Arabidopsis* (F Gaymard et al., 1998; Pilot, Pratelli, et al., 2003). Es razonable pensar que la regulación de los sistemas implicados en la carga de K^+ en el xilema tuviera lugar a nivel transcripcional a largo plazo, como se observa para *SISKOR* en Figura 46D. En contraste, la regulación postraduccional tendría lugar a corto plazo. Por tanto, después de un cambio en las condiciones ambientales, la inhibición de *SISKOR* mediada por SICIPK23-SICBL1/9 contribuiría a ajustar la carga de K^+ del xilema en una escala de minutos a pocas horas. De hecho, el contenido de K^+ en estado estacionario de las plantas *scipk23* no indicó que la translocación de K^+ estuviera afectada después de un largo periodo en suficiencia o deficiencia de K^+ (Capítulo I). En contraste, *scipk23* mostró un incremento en la concentración de K^+ en la savia del xilema después de un periodo corto de ayuno de K^+ . (Figura 52A). Se puede especular que el papel de SICIPK23 es reducir rápidamente la translocación bajo condiciones de ayuno de K^+ . Se observó que SICIPK2 (Solyc06g007430) y SICIPK9 (Solyc05g047600) junto con SICBL1, también inhibían *SISKOR* (Figura 53). El rol fisiológico de la inhibición de *SISKOR* mediado por otros complejos CIPK-CBLs está todavía por determinar. Sin embargo, es evidente que múltiples CIPKs pueden regular un sistema de K^+ como en el caso de AKT1 o AtHAK5 en *Arabidopsis* (Lara et al., 2020; Sung et al., 2007) y este tema está ganando interés de cara a futuros estudios.

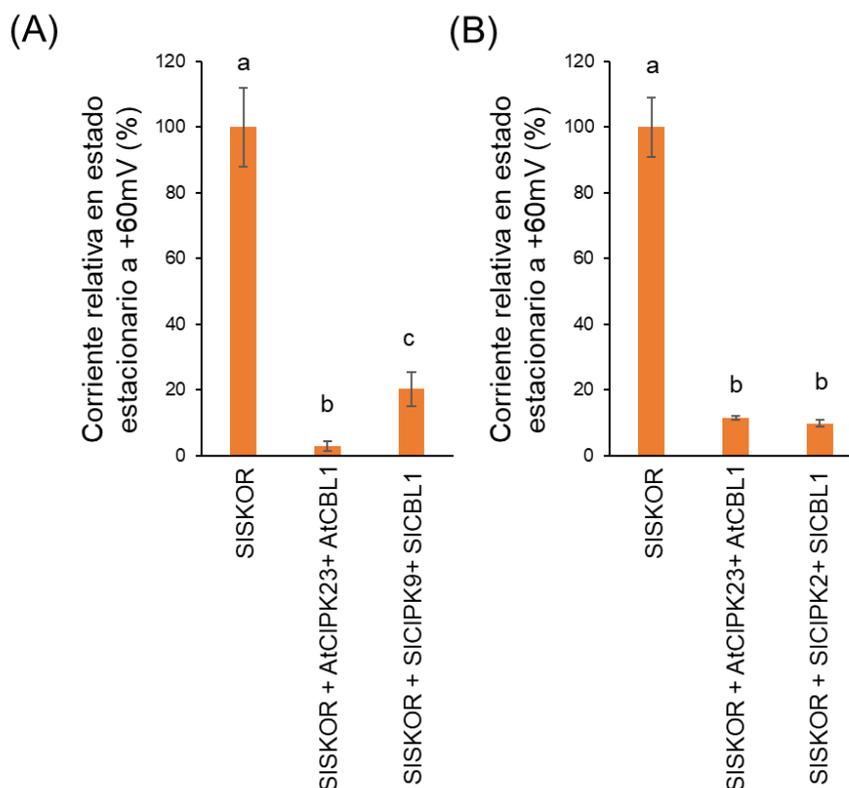


Figura 53: Corriente relativa en estado estacionario a +60 mV (%) de ovocitos inyectados con los cARNs que codifican SISKOR en presencia o ausencia de AtCIPK23 + AtCBL1, SICIPK9 + SICBL1 (en (A)) y SICIPK2 + SICBL1 (en (B)). Los valores relativos son calculados con respecto a la actividad de SISKOR sin CIPK23 + CBL1. Medias \pm SE (n=6-13). Las letras indican grupos homogéneos de datos a $p < 0,05$ de acuerdo con el test post hoc de Tukey (llevado a cabo tras ANOVA).

Desde tiempo atrás, se ha observado la conservación de los sistemas CIPK-CBL de regulación del transporte iónico (Boscari et al., 2009; Cuéllar et al., 2010; Geiger et al., 2009; W. Han et al., 2021; J. Li et al., 2014). Sin embargo, la inhibición de los canales tipo SKOR mediada por CIPK23-CBL1 se observa en tomate, Medicago, vid y lechuga, pero no en *Arabidopsis* y *Eutrema salsugineum* (Figura 50). Una posible explicación para estos resultados es que AtSKOR y EsK5.1 habrían perdido los sitios diana para la regulación por CIPK23-CBL1 en algún punto en el linaje de las Brassicaceas ya que los complejos CIPK23-CBL1 de *Arabidopsis* podían inhibir los canales SISKOR, MtGORK, Vv5.1 y LsK5.1 (Figura 50). Una conclusión importante de estos resultados es que las dianas

para las redes CIPK-CBL han cambiado durante la evolución de las plantas terrestres. Por lo tanto, se puede anticipar que existen variantes interespecíficas de este tipo en las plantas. En el caso que aquí se presenta, parece que es la proteína (SKOR), y no el complejo CIPK-CBL el que ha perdido la capacidad de participar en esta red de regulación en algunas especies de plantas.

Está bien aceptado que las redes de proteínas son entidades dinámicas en las que las conexiones entre proteínas aparecen o desaparecen con el tiempo (un proceso conocido como “recableado de la red”). Algunos investigadores han postulado que el recableado de las redes tiene profundos efectos en la respuesta global de la red y desempeña un papel en la evolución de los organismos vivos (Shou et al., 2011; Zitnik et al., 2019). Por tanto, no sería de extrañar que el recableado de las redes de sistema de transporte-CIPK-CBL tomara parte en la evolución de las plantas terrestres, ya que (i) dichas redes son particularmente relevantes para la adaptación de las plantas al medio ambiente (Ren Jie Tang et al., 2020) y (ii) se expandieron enormemente tras la colonización terrestre (Dreyer et al., 2021; Edel et al., 2017; Edel & Kudla, 2015; Gomez-Porras et al., 2012; Santa-María et al., 2018).

Dado el contexto actual de cambio climático, sería muy interesante estudiar y explotar las conexiones recableadas del sistema de regulación CIPK-CBL-sistemas de transporte de plantas adaptadas a entornos adversos. La función del canal SKOR en plantas de tomate sirvió como punto de partida en el estudio de las redes recableadas CIPK-CBL en plantas. Además, estos resultados, ponen de manifiesto la importancia de realizar estudios en especies de cultivo como el tomate, ya que la especie modelo *Arabidopsis* parece haber perdido mecanismos relevantes relacionados con la regulación de la nutrición de K^+ .

4.4 CAPITULO 4: EXPRESIÓN EN PLANTAS DE SENSORES DE IONES CODIFICADOS GENÉTICAMENTE

4.4.1 Caracterización de las líneas GEPI1.0 de Arabidopsis

Los experimentos para la caracterización de las líneas GEPI1.0 de Arabidopsis se realizaron en la Universidad de Milán, en el laboratorio del Profesor Alex Costa, durante una estancia de tres meses que ha permitido completar parte del trabajo de esta Tesis Doctoral.

A partir de líneas de Arabidopsis que expresan el sensor GEPI1.0, se llevaron a cabo una serie de experimentos que han permitido extraer conclusiones acerca de la utilidad de los sensores de K^+ para el estudio de la dinámica de este catión en las plantas. Estos trabajos también han permitido poner a punto estos sensores para su utilización en otras especies vegetales.

4.4.1.1 La concentración de K^+ en la raíz aumenta al incubar las plántulas en concentraciones elevadas de K^+ .

Se llevó a cabo un experimento para estudiar cambios en la concentración de K^+ en las células de las raíces de plantas GEPI1.0 incubadas a diferentes concentraciones de este nutriente. Se incubaron plántulas de entre 4 y 5 días durante 1 h en una placa de 6 pocillos (Figura 54A). Cada pocillo contenía solución de imagen (descrita en el apartado de Materiales y Métodos) con diferente concentración de K^+ cada uno (0, 0,5, 5, 20, 100 y 250 mM). Después de una hora de incubación, se midió la intensidad de fluorescencia de las proteínas que componen el sensor GEPI1.0 (cpVenus y CFP) y se calculó la ratio cpVenus/CFP. Se determinó que la ratio de las plantas incubadas en la solución con concentraciones de 100 y 200 mM era significativamente superior a la ratio de las plantas incubadas en 0, 0,5, 5 y 20 mM K^+ (Figura 54B). De estos resultados se pudo deducir que el sensor era útil para medir los cambios en la concentración citoplasmática de la raíz cuando ésta expuesta a concentraciones elevadas de K^+ . Además, de los resultados se puede obtener la conclusión de

que la concentración citosólica de K^+ es constante en el rango de concentraciones de K^+ externo de 0 a 20 mM, lo que muestra la capacidad del citosol para mantener la homeostasis de K^+ .

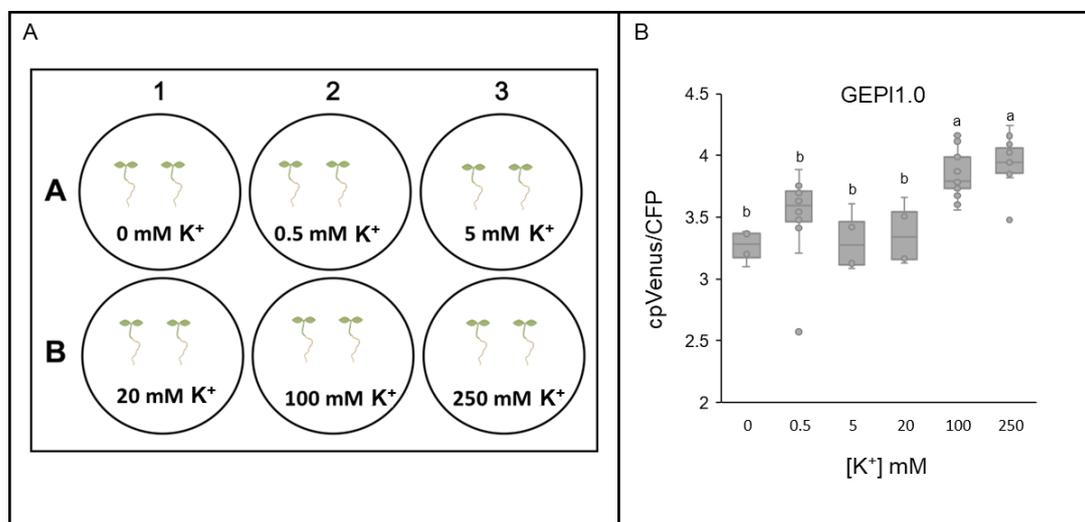


Figura 54 (A) Representación esquemática de plantas GEPI1.0 de Arabidopsis incubadas a 0, 0,5, 5, 20, 100, y 200 mM de K^+ . (B) Ratio cpVenus/CFP de las plantas incubadas a las concentraciones de K^+ mencionadas. Los datos se muestran en gráficos de cajas ($n=4-11$). Las letras indican grupos homogéneos de datos a $p < 0,05$ de acuerdo con el test post hoc de LSD (llevado a cabo tras ANOVA)

Observando estos resultados, surgió la pregunta de si el aumento en la concentración citoplasmática de K^+ podía provocar modificaciones en la concentración de Ca^{2+} o cambios en el pH a largo plazo. Por tanto, para comprobar si la concentración de Ca^{2+} y el pH se encontraban alterados a medida que se modificaba la concentración de K^+ en el medio exterior, plántulas de entre 4-5 días que expresaban el sensor de Ca^{2+} (WT-NES-YC3.6) y plántulas que expresaban el sensor de pH (pH-GFP) se incubaron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Las concentraciones de K^+ utilizadas en este experimento fueron 0, 5 100 y 250 mM. Las plantas que expresaban el sensor de K^+ mostraron un incremento en la concentración de K^+ en el citosol de las células de la raíz de manera similar al experimento anterior (Figura 55A). La concentración de Ca^{2+} en el citosol de las raíces que expresaban el sensor WT-NES no se vio modificada y no había diferencias entre las plantas que se habían incubado en distintas concentraciones de K^+ (Figura 55B). El valor de pH citoplasmático permaneció estable y no varió entre los diferentes tratamientos

(Figura 55C). Como conclusión de estos datos se puede decir que la acumulación de K^+ a largo plazo en el citoplasma no afecta a la concentración de Ca^{2+} a largo plazo y además tampoco altera el pH del citosol. En las condiciones experimentales descritas, las células de la raíz de las plantas son capaces de mantener estables estos dos parámetros independientemente de la concentración externa de K^+ .

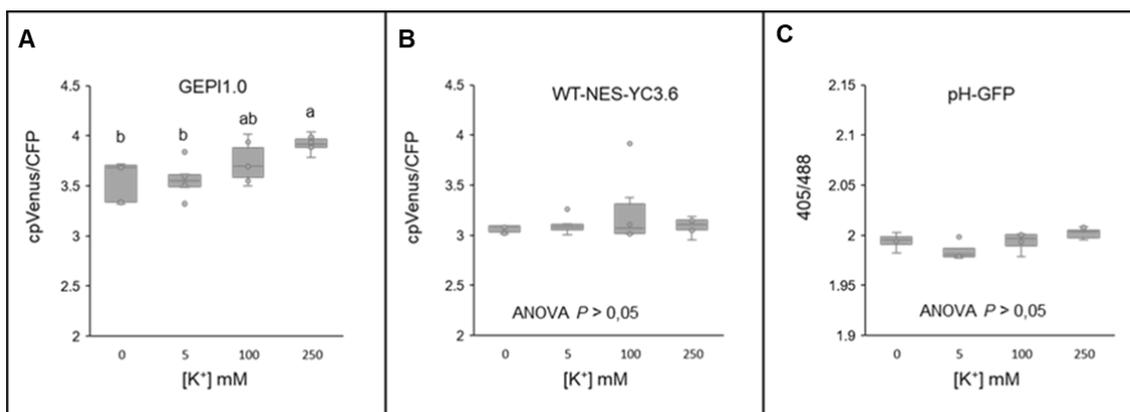


Figura 55: (A) Ratio cpVenus/CFP de plantas GEPI1.0 de Arabidopsis incubadas a 0, 5, 100 y 200 mM de K^+ . (B) Ratio cpVenus/CFP de plantas WT-Nes-YC3.6 de Arabidopsis crecidas a 0, 5, 100 y 200 mM de K^+ . (C) Ratio 405/488 de plantas pH-GFP de Arabidopsis crecidas a 0, 5, 100 y 200 mM de K^+ . Los datos se muestran en gráficos de cajas ($n=4-8$). Las letras indican grupos homogéneos de datos a $p < 0,05$ de acuerdo con el test post hoc de LSD (llevado a cabo tras ANOVA)

4.4.1.2 La concentración de K^+ en el citosol de las células oclusivas es mayor cuando los estomas están abiertos en *Arabidopsis thaliana*

En estudios previos se había descrito que como resultado de la acumulación de K^+ en las células oclusivas de los estomas se produce la apertura de los mismos (Humble & Raschke, 1971). Además, también se observó un descenso en la concentración de K^+ durante el cierre de éstos (MacRobbie, 1987). Sin embargo, los datos sobre los cambios en la concentración de K^+ en las células oclusivas de *Arabidopsis thaliana* son escasos a pesar de que es la especie más estudiada en cuanto los mecanismos moleculares de la regulación de los estomas. Por tanto, dada la relevancia para la planta del proceso de

apertura y cierre estomático, y la del K^+ en este proceso, se decidió estudiar los cambios en las concentraciones de este ion en el citosol de las células oclusivas en respuesta ante diferentes estímulos que puedan conducir al movimiento estomático. Se aislaron los estomas de plantas de *Arabidopsis* que expresaban el sensor GEPI1.0. Para ello, un fragmento de hoja se adhirió a un cubreobjetos con la parte del envés en contacto con el mismo. Para adherir el fragmento al cubreobjetos se hizo uso de un adhesivo compatible con la viabilidad de las células. Una vez bien adherido, se eliminó el mesófilo con ayuda de una cuchilla de manera que sobre el cubreobjetos solo quedase adherida la epidermis inferior de la hoja donde se encuentran los estomas. Se evaluó primero la concentración de K^+ de los estomas recién aislados, mostrando una ratio aproximado de 3,7. (Figura 56). Posteriormente, los estomas se sumergieron durante 3h en solución de imagen (descrita en el apartado de Materiales y Métodos) para inducir la apertura estomática. Posteriormente, los estomas se trataron con ABA a una concentración de 50 μ M para estimular su cierre. Se evaluó la fluorescencia para ambos estados (abierto y cerrado) y se calculó la ratio cpVenus/CFP. Esta ratio cpVenus/CFP fue mayor en la población de estomas abiertos que en la población de estomas cerrados tras la aplicación de ABA. Por tanto, se podía inferir que la concentración de K^+ fue mayor en las células oclusivas cuando los estomas estaban abiertos. La aplicación de ABA indujo el cierre estomático y con ello la disminución en la concentración de K^+ de las células oclusivas. Por tanto, el uso del sensor de K^+ ha revelado que existen cambios en la concentración de K^+ en el citosol de las células oclusivas según el grado de apertura de los estomas en *Arabidopsis thaliana*.

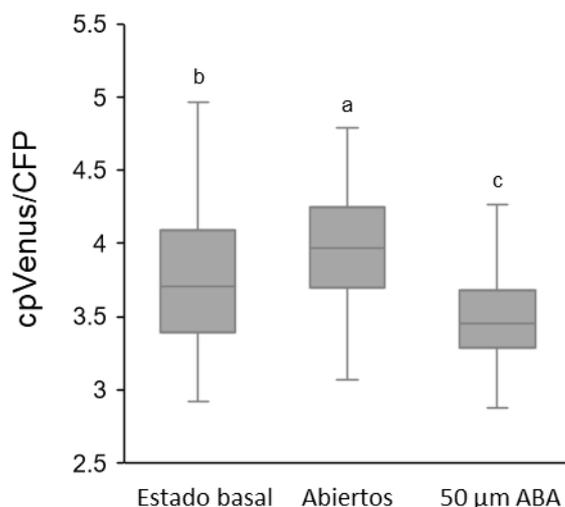


Figura 56: Ratio cpVenus/CFP de estomas de plantas GEPI1.0 de Arabidopsis en estado basal, abierto y cerrado (tras tratamiento con 50 µM de ABA). Los datos se muestran en gráficos de cajas (n=54-92). Las letras indican grupos homogéneos de datos a $p < 0,05$ de acuerdo con el test post hoc de LSD (llevado a cabo tras ANOVA).

4.4.1.3 La administración exógena de ATP produce una disminución transitoria de la concentración de K^+ citosólico

Como se ha mencionado en el apartado de Introducción, se ha descrito que el K^+ podría actuar como segundo mensajero en respuesta a diferentes situaciones de estrés.

Se planteó un experimento en el que plantas de Arabidopsis GEPI1.0 x R-GECO (descritas en el apartado de Materiales y Métodos y que expresan los dos sensores) se trataron con ATP a una concentración de 2 mM con el objetivo de reproducir las condiciones externas que podrían aparecer tras diversas situaciones como, por ejemplo, el ataque de un patógeno. Se había probado que la aplicación de ATP en raíces de plantas R-GECO de Arabidopsis provocaba un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Keinath et al., 2015). En nuestro caso, planteamos comprobar si se producían cambios en la concentración citosólica de K^+ . Para ello, se colocaron las raíces de plántulas GEPI1.0 x R-GECO de Arabidopsis en una cámara de perfusión sumergidas en solución de imagen y se dispuso la preparación en la platina del microscopio confocal. La raíz se perfundió continuamente con solución de imagen utilizando

una bomba de perfusión. Después de esperar entre 5-10 min para permitir la estabilización fisiológica de la muestra, comenzó el experimento. Se administró solución de imagen durante 2 minutos a una velocidad de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$. A los 2 minutos se administró ATP durante 3 minutos. Transcurridos 5 min desde el inicio del experimento, se interrumpió la administración de ATP y se siguió administrando solución de imagen hasta el minuto 12. Se observó un incremento transitorio de Ca^{2+} aproximadamente 1 minuto después de la aplicación de ATP. Además, se observó un descenso transitorio de K^+ que presentó un retraso de aproximadamente 10 s con respecto a la señal de Ca^{2+} . Después de retirar el estímulo de ATP, se recuperaron los niveles basales de K^+ y Ca^{2+} citosólicos (Figura 57A). Por tanto, los resultados de este experimento sugieren la participación del K^+ en los procesos de señalización como segundo mensajero junto con las ya caracterizadas señales de Ca^{2+} . Se observó que la respuesta de K^+ iba precedida de la señal de Ca^{2+} (Figura 57B) y ésta podría tener relación con la disminución de K^+ posterior. Estudios previos mostraron que el canal CNGC2 de Arabidopsis constituía un componente crítico que vincula los receptores de ATP con la señal de Ca^{2+} (L. Wang et al., 2022). Sin embargo, Es necesaria la realización de más experimentos para caracterizar mejor este proceso y entender mejor la relación entre las dinámicas de K^+ y Ca^{2+} y que sistema estaría implicado en la salida de K^+ .

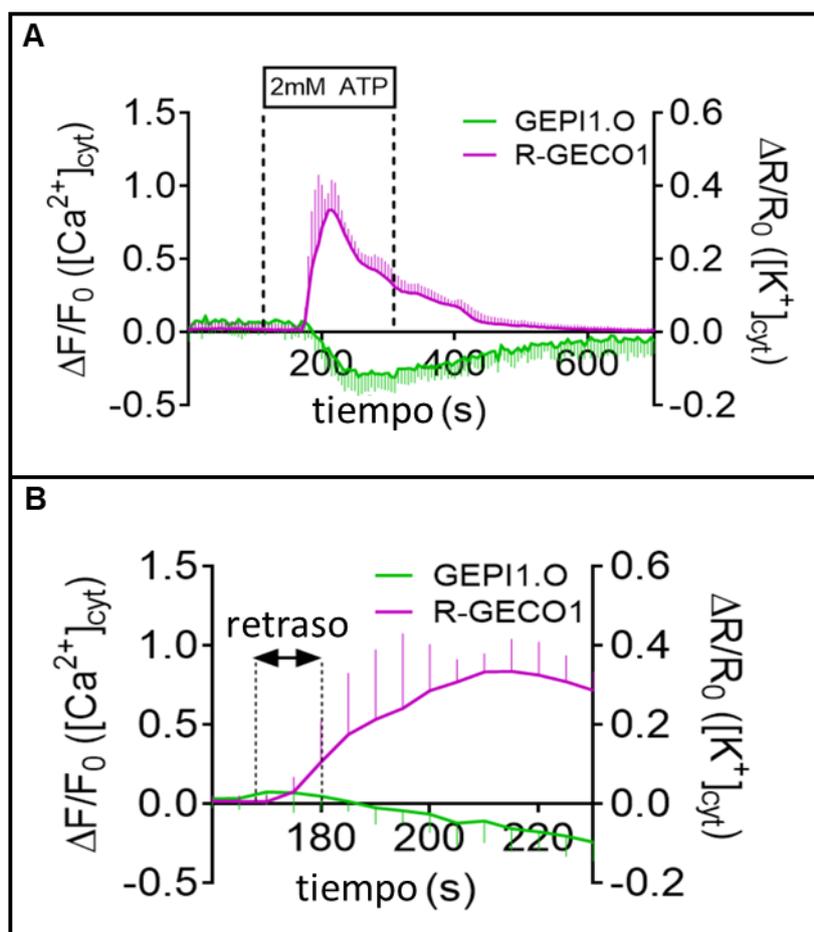


Figura 57: (A) Señal de Ca^{2+} ($\Delta F/F_0$) y de K^+ ($\Delta R/R_0$) de las plantas GEPI1.0XR-GECO tratadas con 2 mM de ATP. (B) Imagen ampliada de las señales de Ca^{2+} y K^+ donde se aprecia la diferencia de tiempo entre la señal de Ca^{2+} (magenta) y la de K^+ (verde). El tiempo de diferencia entre la aparición de la señal de Ca^{2+} y la de K^+ aparece representado en el gráfico como 'retraso'. Media \pm SE (n=3)

4.4.2 Generación de líneas transgénicas GEPI1.0 de tomate.

Se generaron líneas transgénicas GEPI1.0 de tomate. Dado que los estudios realizados con las plantas GEPI1.0 de Arabidopsis pusieron de manifiesto que los sensores de K^+ eran una buena herramienta para estudiar las concentraciones citosólicas y las dinámicas de este ion bajo diferentes tratamientos, se pensó que era buena idea incorporar este sensor en una planta de interés agronómico para estudiar en ella las señales y distribución del K^+ .

Como se explicó en el apartado de Materiales y Métodos, se realizó una reacción de PCR para amplificar la secuencia codificante del sensor a partir del

plásmido pGGZ004-plantGEPI1.0 con unos cebadores que permitieron introducir los sitios de corte para las enzimas de restricción XhoI y BamHI. Al mismo tiempo, con el objetivo de clonar el sensor, se digirió el plásmido pBI321 con las mismas enzimas de restricción y se realizó una reacción de ligamiento entre el producto de PCR y el plásmido digerido (DNA ligase T4 Thermo Fischer). El producto de PCR se insertó en el sitio de clonación múltiple, comprendido entre los sitios RB y LB dando lugar a la construcción 35S::plantGEPI1.0 que constituía el ADN-T. Una vez obtenido, el plásmido 35S::plantGEPI1.0-pBI321 se utilizó para transformar la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* y con ella se infectaron cotiledones de tomate. A partir del callo generado tras la infección, se regeneró la planta completa mediante la inducción primero de la parte aérea y el posterior enraizamiento. Después de la regeneración *in vitro*, las plantas de tomate se transfirieron a macetas donde se llevó a cabo el proceso de aclimatación. Una vez aclimatadas, se comprobó si las plantas regeneradas habían incorporado el ADN-T mediante reacción de PCR. De 16 plantas regeneradas, 11 habían incorporado el ADN-T, por tanto, la efectividad de la transformación fue del 69 %. Posteriormente, se evaluó la presencia de fluorescencia debida a la expresión del sensor en las plantas positivas para la PCR mediante el uso del microscopio de epifluorescencia.

4.4.3 Caracterización de las líneas GEPI1.0 de tomate

Tras seleccionar las plantas que habían incorporado el ADN-T y elegir aquellas que presentaban una buena señal para CFP y cpVenus mediante su observación al microscopio, se comenzó la caracterización de las líneas GEPI1.0 de tomate obtenidas (Figura 58).

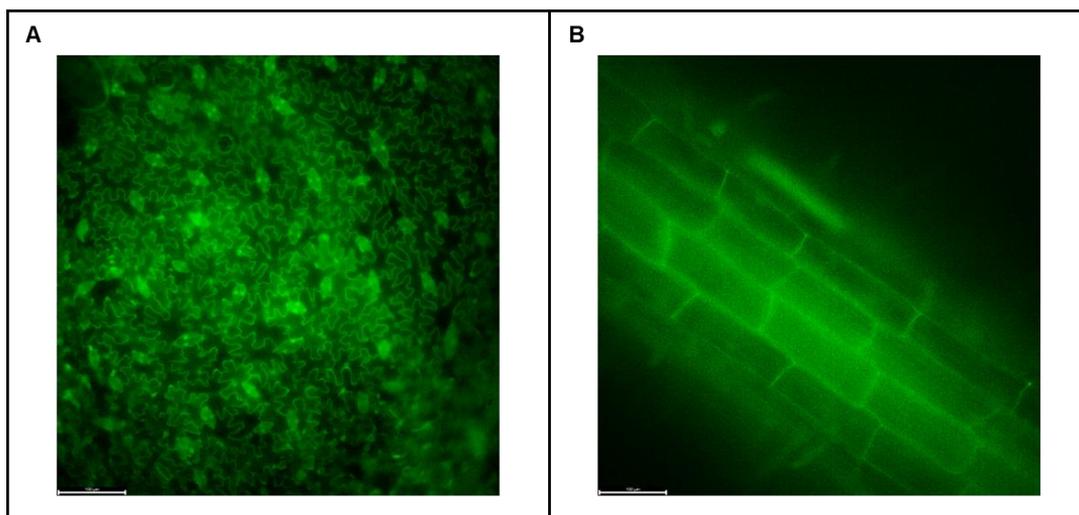


Figura 58: Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia durante la comprobación de las líneas de tomate transformadas. (A) Señal de fluorescencia en la parte aérea de tomate debido a la expresión del sensor de K^+ GEPI1.0. (B) Señal de fluorescencia en la raíz de tomate de una planta transformada con el sensor de K^+ GEPI1.0.

4.4.3.1 La concentración de K^+ en el citosol de las células oclusivas es mayor cuando los estomas están abiertos en *Solanum lycopersicum*

Se realizó un experimento en plantas de tomate similar al realizado con *Arabidopsis*. Se aislaron los estomas mediante la técnica explicada en el apartado 4.4.1.1. Se evaluó primero la fluorescencia y la ratio cpVenus/CFP de los estomas recién aislados. Tras el aislamiento y evaluación, los estomas se sumergieron durante 3 h en solución de imagen para inducir la apertura estomática. Transcurrido este tiempo, se midió la fluorescencia y se calculó la ratio cpVenus/CFP. Posteriormente, los estomas fueron incubados de nuevo en solución de imagen, pero ahora se añadió ABA a una concentración de 50 μM durante 2h. Después de este tiempo en presencia de ABA, se evaluó de nuevo la ratio cpVenus/CFP. Los resultados mostraron que las células oclusivas de la población de estomas abiertos presentaban mayor concentración de K^+ que la población de estomas recién aislados. Además, tras el tratamiento de la muestra con 50 μM de ABA para inducir el cierre estomático, la ratio cpVenus/CFP de las células oclusivas también era menor, comparada con la que mostraban las células de los estomas abiertos (Figura 59).

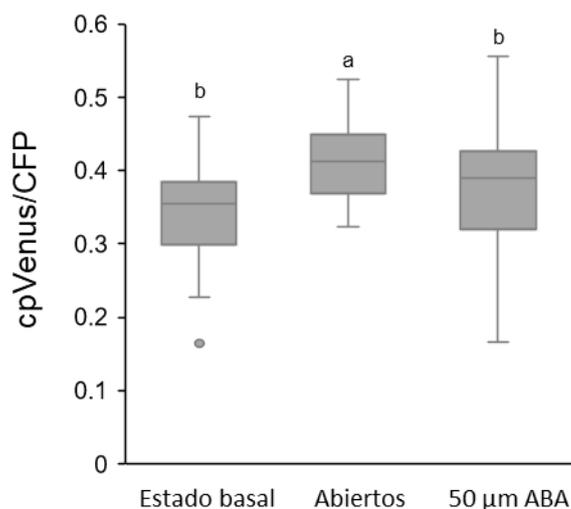


Figura 59: Ratio cpVenus/CFP de estomas de plantas GEPI1.0 de tomate en estado basal, abierto y cerrado (tras tratamiento con 50 µM de ABA). Los datos se muestran en gráficos de cajas (n=37-42). Las letras indican grupos homogéneos de datos a $p < 0,05$ de acuerdo con el test post hoc de LSD (llevado a cabo tras ANOVA)

DISCUSIÓN

Desde que se probaron con éxito en plantas de *Arabidopsis* (Allen et al., 1999) los sensores de iones basados en proteínas fluorescentes y codificados genéticamente han resultado ser herramientas muy potentes para el estudio de fenómenos como las dinámicas citosólicas de Ca^{2+} (sensores GECIs). Por ejemplo, se han estudiado las señales de Ca^{2+} durante el proceso de fecundación (Hamamura et al., 2014; Ngo et al., 2014), la respuesta de las plantas frente al ataque de herbívoros, frente a lesiones producidas por fenómenos mecánicos (como quemaduras o estrés osmótico) o los mecanismos implicados en la respuesta producida tras a la aplicación de aminoácidos (Grenzi et al., 2023). Así, los trabajos realizados hasta la fecha han permitido estudiar el papel del Ca^{2+} como segundo mensajero. Además, el desarrollo de etiquetas que han permitido localizar estos sensores en diferentes orgánulos de las células vegetales (Grenzi et al., 2021) han ayudado a conocer de forma más precisa los nichos donde se acumula el Ca^{2+} y las dinámicas características de este ion dentro de cada uno. Como se ha comentado en el apartado de Introducción,

recientemente se han desarrollado sensores de K^+ (GEPs) (Bischof et al., 2017) que han dado lugar a la identificación en *Arabidopsis* de células que actúan como nicho sensor de los cambios en las concentraciones de K^+ y que serían capaces de actuar en la señalización y adaptación de la planta para mantener la homeostasis de nutrientes como el K^+ (F. L. Wang et al., 2021). Por tanto, el desarrollo de los sensores de K^+ y la aparición de los primeros trabajos que abordan este tema, son un buen precedente para seguir trabajando con el objetivo de caracterizar en profundidad, al igual que se ha hecho para el Ca^{2+} , la homeostasis de K^+ dentro de la planta.

Los experimentos realizados durante esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo con las líneas GEPI1.0 de *Arabidopsis* con el objetivo de profundizar en su caracterización. Los experimentos realizados mediante la incubación de las plantas a diferentes concentraciones externas de K^+ mostraron que este sensor es una herramienta útil para comprobar el estado nutricional de la planta, ya que, gracias a los sensores, se pudieron medir cambios en la concentración citosólica de K^+ de la raíz. Se había descrito que un aumento en la concentración de K^+ en las células oclusivas de los estomas estaba relacionado con la apertura de los mismos (Humble & Raschke, 1971). La aproximación utilizada en esta Tesis Doctoral, basada en utilizar el sensor GEPI1.0 para medir los cambios en las concentraciones citosólicas de K^+ , ha permitido observar que en *Arabidopsis thaliana* las células oclusivas de los estomas en estado abierto (tras la incubación de 3 h en solución de imagen) presentan una mayor concentración de K^+ que las células oclusivas de los estomas cerrados (tras la aplicación de ABA a 50 μ M durante 2h). Además, la utilización de los sensores de K^+ durante este trabajo ha posibilitado también evaluar la utilidad de los mismos para el estudio del posible papel del K^+ como segundo mensajero. Como se ha indicado anteriormente, se había propuesto que el K^+ puede actuar como segundo mensajero frente a diferentes situaciones de estrés (Shabala, 2017). Así, se realizó un experimento utilizando la aplicación ATP sobre plantas GEPI1.0 x R-GECO con el objetivo de mimetizar las moléculas DAMPs que se liberan durante el daño producido por una acción mecánica o durante el ataque de un herbívoro. Los resultados mostraron la producción de un pico de entrada de Ca^{2+} que tuvo lugar 10 s antes del inicio de la disminución de K^+ del citoplasma de la célula. Además, se observó

cómo se recuperaban los niveles de K^+ tras la retirada del estímulo (ATP). Por tanto, el comportamiento coincide con el modelo propuesto por (Shabala, 2017), que se ha explicado en el apartado de Introducción. Cabe destacar que, al modelo propuesto, habría que sumar la aparición de la señal de Ca^{2+} antes de la señal de K^+ . No obstante, se hacen necesarios más estudios para determinar si la señal de Ca^{2+} estaría implicada en la activación de los sistemas de transporte que conducen a la disminución del K^+ citosólico.

Hasta la fecha, la mayoría de los experimentos realizados con sensores de Ca^{2+} se han llevado a cabo en Arabidopsis. De manera similar, hasta la realización de esta Tesis Doctoral, los sensores de K^+ solo se habían expresado en plantas de Arabidopsis (F. L. Wang et al., 2021). Sin embargo, debido a la importancia de trabajar con plantas de interés agrícola, como se ha mencionado en apartados anteriores, se pensó que sería interesante, como parte de esta Tesis Doctoral, expresar el sensor de K^+ en plantas de tomate y realizar una serie de experimentos para probar su correcto funcionamiento. Para ello generaron plantas de tomate que expresaban el sensor GEPI1.0. Se realizó un experimento para comparar si el almacenamiento de K^+ en los estomas respondía de forma similar en tomate y en Arabidopsis. Para ello se siguió el protocolo descrito en el apartado 4.4.3.1 y se evaluó la concentración de K^+ presenten en las células oclusivas tanto de estomas abiertos como cerrados. Al igual que en el caso de Arabidopsis, las células oclusivas de los estomas abiertos presentaban una mayor concentración de K^+ que la que presentaban las células oclusivas de los estomas cerrados. Por tanto, este experimento confirmó que la entrada de K^+ es importante para la apertura de los estomas en ambas especies y que, además, el sensor de K^+ expresando en plantas de tomate, estaba funcionando correctamente. Estos sensores codificados genéticamente presentan grandes ventajas respecto a otras técnicas para monitorizar iones dentro de las células como los electrodos ion selectivos o los tintes. Por ejemplo, un gran número de células y tejidos poco accesibles pueden ser estudiados fácilmente con los sensores.

Los resultados obtenidos durante este trabajo abren la posibilidad de seguir investigando sobre el papel del K^+ como segundo mensajero. Además, confirman la posibilidad de poder estudiar las señales de K^+ en plantas de interés

agronómico. Hay que resaltar que este tema está emergiendo en la actualidad y que aún quedan muchas posibilidades en torno a estos sensores, como, por ejemplo, su expresión con etiquetas que permitan localizarlos específicamente en los diferentes orgánulos de las células vegetales. El trabajo con estas herramientas permitirá estudiar las señales de K^+ al nivel que se han estudiado las de Ca^{2+} .

V. CONCLUSIONS

1. The K⁺ uptake model of Arabidopsis is conserved in tomato plants regarding the main actors involved, SIHAK5, LKT1, and SICIPK23. However, some differences can be observed regarding to the ranges of K⁺ concentrations where these actors are relevant for K⁺ nutrition.
2. Tomato plants require a correct K⁺ nutrition under high Mg²⁺ supply which explains that the *lkt1* plants are hypersensitive to high external Mg²⁺ concentrations.
3. The Na⁺ uptake in K⁺-starved tomato plants is to a great extent mediated by a transport system that is regulated by SICIPK23. This system can operate at low and high Na⁺ concentrations. A SICIPK23-independent pathway also contributes to Na⁺ uptake at high concentrations.
4. The use of inhibitors suggests that the SICIPK23-regulated Na⁺ transport system observed in K⁺-starved plants is inhibited by NH₄⁺. The SICIPK23-independent system is inhibited by Ba²⁺, Ca²⁺, Li⁺ and La³⁺.
5. The Na⁺ transport mediated by the two HKT members present in tomato (SIHKT1.1 and SIHKT1.2) is not regulated by SICIPK23-SICBL complexes.
6. In tomato, SISKOR is inhibited by SICIPK23-SICBL1/9. This regulatory pathway is present in Medicago, grapevine and lettuce and lost in Arabidopsis or *Eutrema salsugineum*.
7. The N-terminus and transmembrane domains of SISKOR are involved in SICIPK23-mediated inhibition. Around 20 % of regulation is due to phosphorylation and 80 % is due to another mechanism.

8. The use of Genetically Encoded Potassium Indicators (GEPIs) allowed us to show that the cytosolic K^+ homeostasis in Arabidopsis is maintained in the 0-20 mM range of external K^+ concentrations.
9. Studies carried out with GEPI showed that external ATP leads to a transient decrease in cytosolic K^+ in Arabidopsis. This could constitute a cellular signal for downstream processes.

VI. SUMMARY

6.1 INTRODUCTION

Plants require 14 essential elements to develop and complete their life cycle. Among these elements, K^+ is one of the most important to achieve correct plant growth. K^+ is the most abundant cation in plant tissues and its nature as a positive ion is responsible for its different functions inside plants. K^+ is absorbed by the roots through different transporters and channels. Usually, these transport systems are regulated by CIPK-CBL complexes, and this regulation is very important to ensure the correct plant nutrition. Moreover, regulatory systems such as CIPK-CBL complexes constitute a target that should be taken into account as a tool to improve crops.

Although it is not an essential element, Na^+ is present in plant tissues too. High amounts of external Na^+ are related to different problems such as salinity. However, it has been proved that under certain conditions, Na^+ accumulation can be beneficial to plants by contributing to maintenance some biological functions. As K^+ , Na^+ is also absorbed by the roots through transporters and channels which could be also regulated by CIPK-CBL complexes.

6.2 OBJECTIVES

As K^+ is an indispensable element for plant growth and development, proper K^+ nutrition is essential to ensure crop quality and production. Na^+ can also play an important role in the plant and could be beneficial for the plants under some conditions.

The specific objectives that have been proposed for this Doctoral Thesis are the following:

1. Study of the role of SIHAK5, LKT1, and SICIPK23 in the uptake and translocation of K^+ in the tomato plant.
2. Characterization of the role of SICIPK23 in the regulation of Na^+ uptake in the root.

3. Study of the regulation of SISKOR by SICIPK23.
4. Expression of genetically encoded ion sensors in plants.

6.3 METHODOLOGY

6.3.1 Bacterial and yeast strains and media

The strain Top10 of *Escherichia coli* (Edwards et al., 2011) has been used for the storage and propagation of the DNA constructs used during the development of the Doctoral Thesis. The medium used to grow bacteria was LB.

Agrobacterium rhizogenes strain ATCC 15834 (Ron et al., 2014) was used to produce transgenic roots. The medium used to grow bacteria was NA.

Agrobacterium tumefaciens strain GV3101 (Koncz & Schell, 1986) has been used to produce transgenic plants, allowing the constitutive expression of genes in *Solanum lycopersicum* plants or transitory expression in *Nicotiana benthamiana* plants. The medium used to grow bacteria was LB.

In all cases, the required antibiotic was added to the medium to select the bacteria that had incorporated the plasmid of interest.

Saccharomyces cerevisiae strain 9.3 was employed for functional complementation experiments. Cells were grown on SD medium (Sherman, 1991) and AP medium.

6.3.2 Plant material and growth conditions

Arabidopsis, tomato, and *Nicotiana benthamiana* plants were used for experiments. All seeds were sterilized before the experiments.

Arabidopsis and tomato plants were grown in hydroponic in 1/5 Hoagland modified solution. The solution pH was 5.5 and the solution was renewed every week. For Arabidopsis culture, the grow chamber conditions were the following:

a photoperiod of 8 h of light, 22 °C of temperature, and relative humidity of 65 %. By contrast, for tomato culture, the grow chamber conditions consisted of a photoperiod of 16 h of light, 25 °C daytime temperature, 22 °C at night, and a relative humidity of 45 % during the day and 50 % at night.

Nicotiana benthamiana plants were grown in pots with soil and the grow chamber conditions were similar to conditions for tomato culture.

6.3.3 KO plants generation with CRISPR tools

The CRISPR-CAS system allows for gene inactivation. During this Doctoral Thesis, it has been used to produce *slcipk23* plants. A sequence of 20 base pairs, which is part of an RNA guide (sgRNA) directed against *SICIPK23* exon 2, was designed by using the Breaking Cas tool from Spain National Biotechnology Center (Oliveros et al., 2016). The sgRNA was cloned in a plasmid in frame with endonuclease CAS9. The plasmid was used to transform tomato cotyledons with *Agrobacterium tumefaciens*. After transformation, tomato plants were regenerated and genotyped.

Plants that contained mutations for *SICIPK23* were selected for carrying out experiments.

6.3.4 Membrane potential determination

The determination of membrane potential of epidermal and cortex root cells was carried out with borosilicate microelectrodes (1B120F-4, World Precision Instruments Inc. Sarasota, FL) (F. J. M. Maathuis & Sanders, 1994) .

The microelectrodes were introduced into the root until a stable potential was achieved. After that, different experimental solutions were perfused and changes in root membrane potentials were recorded.

6.3.5 Determination of ion and anion contents

Plants were harvested after experiments. Shoots and roots were dried in an oven at 65 °C for 4 days. The dry material was digested using HNO₃:H₂O₂ (5:3 v:v) in a microwave (CERM Mars Xpress, North Carolina). The ion content was determined by analysis in ICP-OES (Iris Interpid II, Thermo Electron Corporation, Franklin)

For the anion content, 50 mg of plant dry-weight material was collected. 10 ml of milliQ water was added to the dry material and the solution was shaken for 30 min. After shaking, samples were centrifuged, the supernatant was collected and the resulting solution was used to determine the anion content by analysis with a Dionex Aquion ion chromatograph. (Thermo Fischer Scientific)

6.3.5 Transgenic roots generation

Transgenic roots were produced by using the *Agrobacterium rhizogenes* strain ATCC15834. The empty pBI321 plasmid was used to transform the cotyledons of WT plants. The pBI321 plasmid containing the *SICIPK23* gene (35S::*SICIPK23*-pBI321) was employed to transform the cotyledons of *slcipk23* plants. After 10- 14 days, the roots emerged from cotyledons.

The emerged roots were grown for 14 days in glass jars containing 1/5 Hoagland solid medium. After this time roots were collected and their ion content was determined.

6.3.6 BiFC assays in *Nicotiana benthamiana* and *Xenopus laevis*

6.3.6.1 BiFC assays in *Nicotiana benthamiana*

BiFC assays were carried out to determine protein-protein interactions. For this purpose, the following group of proteins: LKT1, SISKOR, AtSKOR, SIHKT1.1, SIHKT1.2, SICBL1, SICBL9, AtCBL1 y AtCBL9 were cloned in pSPYCE(M)

plasmid, in frame with the C-terminal half of YFP (YFP^C). Meanwhile, SICIPK23 and AtCIPK23 were cloned in pSPYNE173, in frame with the N-terminal half of YFP (YFP^N). In this way, different constructs were generated, and they were used to transform *Agrobacterium tumefaciens*. Different combinations of *A. tumefaciens* suspensions were used to infiltrate *N. benthamiana* leaves. The reconstitution or not of YFP and thus the presence or not of the fluorescent signal indicates the interaction or non-interaction of the proteins tested.

6.3.6.2 BiFC assays in *Xenopus oocytes*

In addition to *N. benthamiana* leaves, it is possible to perform fluorescent bimolecular assays in *Xenopus oocytes*. In this way, a PCR was performed using as a template the generated constructs described in the previous section. Primers were designed to introduce the T7 promoter at the 5' end of the coding sequences for the protein of interest. In addition, by using the reverse primer, it was possible to amplify the YFP^C and the YFP^N fragments. From these PCR products, cRNAs synthesis was carried out, which were injected into oocytes (in different combinations) to express proteins and check protein-protein interactions under a confocal microscope.

6.3.7 Two-electrode-voltage-clamp in *Xenopus oocytes*

cDNAs for *LKT1*, *SISKOR*, *SIHKT1.2*, *SICIPK23*, *SICBL1* y *SICBL9* were obtained by PCR from tomato roots samples. The amplified fragments were cloned into PCR2.1 TOPO plasmid (Invitrogen) and correct sequences confirmed by Sanger sequencing. The obtained cDNA sequences were amplified by PCR with specific primers to introduce the sequence of the T7 promoter at the 5' end as has been described in the previous section. cRNAs were synthesized from these PCR products.

Different concentrations of cRNAs coding for the mentioned proteins were injected into *Xenopus oocytes* using the microinjector Nanoliter 2010 (World Precision Instrument). The oocyte membrane potential was fixed by using the

amplifier Axoclamp 900 A (Molecular Devices). After applying different solutions, data were collected and analyzed with Henry Suite EP software.

6.3.8 Yeast complementation assays

The *Saccharomyces cerevisiae* strain 9.3 was used for these experiments. After overnight culture incubation at 28 °C, serial dilutions were performed in sterile water to obtain suspensions with optical densities (OD₆₀₀) of 1, 0.1, 0.01, and 0.001 in the case of K⁺ uptake complementation experiments and 1, 0.2, 0.04 and 0.008 for Na⁺ sensitivity experiments. Once the dilutions were made, 10 µl drops of each of them were inoculated into square culture plates with solidified AP medium.

For K⁺ uptake complementation experiments, the yeast strain 9.3 was transformed with different combinations of cDNAs coding for *SIHAK5*, *qSIHAK5*, *SICIPK23*, *SICBL1*, and *SICBL9*.

For Na⁺ sensitivity experiments, yeast strain 9.3 was transformed with different combinations of cDNAs coding for *SIHKT1.1*, *AtHKT1.1*, *SICIPK23*, *SICBL1*, and *SICBL9*.

6.3.9 Microscopy

Different microscopes were used in this Doctoral Thesis work.

For BiFC assays in *N. benthamiana* leaves, the LEICA DM6 epifluorescence microscope was used. The samples were prepared in slides with the leaf abaxial side facing upwards. A coverglass was placed over the sample and the space between the slide and the coverglass was filled with water.

For experiments with GEPI1.0 plants, two types of microscopes were used. The Ti-E Nikon inverted fluorescence microscope (Widefield) was used in ATP and ABA experiments. The LEICA THUNDER DMi8 widefield microscope

was also used in these kinds of experiments. The Nikon AX R confocal microscope was used for experiments with GEPI1.0XR-GECO plants.

Individual ratiometric images were analyzed using Fiji software. The fluorescence intensity was determined independently for each of the two channels (CFP emission channel and cpVenus channel) over the regions of interest (ROIs) using a Fiji plugin (ROI Manager).

6.4 RESULTS AND DISCUSSION

6.4.1 LKT1 contributes to K⁺ uptake at millimolar concentrations

Several experiments were carried out to determine whether the low K⁺ content in the roots and shoots of *lkt1* plants was due to a lower K⁺ uptake capacity of the root. WT, *lkt1-1*, and *lkt1-2* plants, which had grown at 1.4 mM K⁺, were harvested at two different times to determine the net K⁺ uptake rate. Results of the experiments showed that the net K⁺ uptake rate of *lkt1* plants was approximately 50 % lower than that of WT plants (Figure 25A). A more detailed analysis of LKT1 function in the root was carried out at the cellular level, using simple microelectrodes which were introduced into individual root cells to determine their membrane potential. The membrane depolarizations induced in root cells by K⁺ were smaller in magnitude in *lkt1-1* and *lkt1-2* plants than in WT plants under all administered K⁺ concentrations (Figure 25B). The fit of the membrane depolarization data relative to external K⁺ concentration was carried out using the Michaelis-Menten equation. From these adjustments, apparent K_m values of 1.3 ± 0.3 mM, 13 ± 3.7 mM and 6.4 ± 1.9 mM K⁺ were deduced for WT, *lkt1-1*, and *lkt1-2* roots, respectively. Thus, the *lkt1* mutation significantly decreased the apparent affinity of K⁺ transport in tomato roots.

6.4.2 *lkt1* plants are hypersensitive to high Mg^{2+} concentrations

lkt1 plants showed higher concentrations of Mg^{2+} in roots than WT plants. Plants were grown under three different Mg^{2+} concentrations: 0.05, 0.35, and 20 mM. In all cases, the K^+ concentration in the medium was 1.4 mM. Ion content analysis showed that K^+ content was similar in the shoots of WT and *lkt1* plants when the plants were grown on the medium containing 0.05 mM Mg^{2+} (Figure 26A). However, when plants were cultivated in media containing 0.35 and 20 mM Mg^{2+} , K^+ content in the shoot was lower in *lkt1* plants than in WT plants (Figure 26A). As in the case of the shoot, a lower K^+ content in roots was observed when plants were grown at 20 mM Mg^{2+} and this occurred for both WT and *lkt1* plants (Figure 26B). Therefore, the conclusion is that when the external Mg^{2+} concentration is very low, *lkt1* plants can accumulate more K^+ in both the shoot and root.

At 20 mM Mg^{2+} , *lkt1* plants showed an important decrease in shoot and root dry weight. In contrast to WT plants, *lkt1* plants developed chlorosis in leaf margins (Figure 26G). Thus, LKT1 presence is essential to cope with the presence of high Mg^{2+} concentrations.

6.4.3 LKT1 activity is enhanced by SICIPK23-SICBL1/9 complexes

To deepen our understanding on the regulation mechanisms of the LKT1 channel, two heterologous expression systems were used. In previous studies carried out in Arabidopsis, barley, and rice, it had been described that CIPK23-CBL1/9 activated K^+ transport through LKT1-like proteins (Boscari et al., 2009; Cuéllar et al., 2010; Geiger et al., 2009; J. Li et al., 2014; Xu et al., 2006). To verify that a similar pathway was operating in tomato, the LKT1 channel and several regulatory proteins of the CIPK-CBL complex were expressed in *Xenopus* oocytes. When LKT1 was expressed in absence of CIPK-CBL complexes, currents were observed to be slowly activated over time. (Figures 27A and 27D). However, when the LKT1 was expressed in combination with SICIPK23-SICBL1 and SICIPK23-SICBL9, an increase in the magnitude of the currents took place.

Another heterologous system that has been used to characterize protein-protein interactions has been the bimolecular fluorescent complementation (BiFC) in *N. benthamiana* leaves. The results showed that LKT1 interacted with SICIPK23, but not with either SICBL1 or SICBL9 (Figure 28). Moreover, it was also observed that SICIPK23 could interact with SICBL1 and SICBL9. Thus, SICIPK23 can act as a bridge in the CIPK-CBL-channel system and carry out the channel phosphorylation.

6.4.4 SIHAK5 is activated by SICIPK23-SICBL1/9 complexes

The K⁺ transporter AtHAK5 was shown to be activated by AtCIPK23-AtCBL1/9 in yeast (Ragel et al., 2015). Therefore, to check whether the tomato homologs SICIPK23-SICBL1/9 regulated SIHAK5, complementation of the yeast strain 9.3 at low K⁺ was assayed (Figure 29). The native transporter SIHAK5 has not been shown functional in yeast. However, a SIHAK5 chimera, qSIHAK5, is functional in yeast (M. Nieves-Cordones et al., 2008). Yeast expressing qSIHAK5 with the SICIPK23-SICBL1/9 complex grew in low K⁺ medium (0.1 mM K⁺), while no growth was observed for the rest of the constructs (Figure 29). It should be noted that yeast expressing qSIHAK5 transporter together SICIPK23-SICBL9 complex experimented faster growth than yeast expressing qSIHAK5 together SICIPK23-SICBL1 complex (Figure 29).

6.4.5 SICIPK23 regulates plant K⁺ uptake mediated by LKT1 and SIHAK5

To demonstrate the role of SICIPK23 in the activation of both the LKT1 and SIHAK5 transport systems, a knock-out *scipk23* mutant was obtained by using the CRISPR-Cas tool and characterized. The study showed that K⁺ content was similar in the shoot and root of WT and *scipk23* plants when plants were grown in K⁺ starving conditions for one week (Figure 30A and 30B). However, K⁺ content was different in both organs between WT and *scipk23* plants when plants were grown in 1.4 mM K⁺, being lower in *scipk23* shoots and roots (Figure 30A and 30B). After analyzing K⁺ content, Mg²⁺ was also analyzed. In this case, the

Mg²⁺ content was higher in *slcipk23* shoots than in WT shoots (Figure 30C). No differences in Mg²⁺ concentration were observed in the root when plants were grown under K⁺ starving conditions. However, differences were observed in root Mg²⁺ content when plants grew at 1.4 mM K⁺. In this case, Mg²⁺ was higher in *slcipk23* roots, up to 60%, than in the roots of WT plants (Figure 30D).

The SIHAK5 activation by SICIPK23 *in planta* has been studied by Rb⁺ transport experiments. The results of the experiments revealed that *slcipk23* plants show a 40 % reduction in Rb⁺ transport ratio in comparison to WT plants (Figure 30F). Therefore, it was concluded that SICIPK23 promotes the activation of SIHAK5 in tomato roots, although SIHAK5 retains some of its activity in the absence of SICIPK23.

6.4.6 Na⁺ entry in K⁺ starved plants is dependent on SICIPK23 activity

Na⁺ content was analyzed in WT and *slcipk23* plants. Both, WT and *slcipk23* plants showed similar Na⁺ content in shoot and root when plants were grown in a medium with sufficient K⁺ (Figure 32A and 32B). However, under starving K⁺ conditions, WT plants increased Na⁺ content in the shoot and root by 100 % and 550 %, respectively (Figure 32A and 32B). The behavior of *slcipk23* plants starved of K⁺ was different. While the increase in shoot content remained similar to the increase observed in the WT plants, the increase in root Na⁺ content was only 90 %. These results showed that SICIPK23 was necessary for tomato plants for Na⁺ entry under low K⁺ concentrations.

Compared to tomato plants, Arabidopsis had a reduced ability to accumulate Na⁺ under K⁺ starving conditions and AtCIPK23 was not involved in Na⁺ influx in Arabidopsis plants.

6.4.7 SICIPK23 – mediated regulation of Na⁺ uptake under K⁺ starving conditions is maintained at high Na⁺ concentrations.

To check whether *slcipk23* plants were able to reach the Na⁺ contents of WT plants by increasing external Na⁺ concentration, the following experiment was carried out. A group of plants was grown the last 12 days under limiting K⁺ conditions (0.003 mM) and at 0.09 mM Na⁺, while another group of plants was grown at the same time in a medium supplemented with 10 mM Na⁺. Roots of *slcipk23* plants showed lower dry weight than the rest of genotypes studied. In this case, the roots of *slhak5* plants also showed a low dry weight due to K⁺ starvation. In general, the root dry weight of *slcipk23* and *slhak5* plants increased when plants were grown in the 10Na solution. Then, the Na⁺ and K⁺ contents in plant roots of different genotypes growing under mentioned treatments (0Na and 10Na) were determined. Under both, 0Na and 10Na treatments, *slcipk23* plants showed lower root Na⁺ contents than rest of genotypes (Figure 34). K⁺ content was similar in all genotypes when plants were grown in 0Na. Therefore, from these results, it can be concluded that: first, the dry weight of K⁺-starved *slcipk23* and *slhak5* plants increased in plants supplemented with 10 mM Na⁺. Second, the Na⁺ uptake system regulated by SICIPK23 can mediate Na⁺ uptake at both low and high Na⁺ concentrations. In addition, a SICIPK23-independent pathway for Na⁺ uptake was also observed.

The root length of WT, *slcipk23*, *lkt1*, and *slhak5* was also evaluated (Figure 36). When plants were grown in 0,09Na, the roots of *slcipk23*, *lkt1*, and *slhak5* were longer than WT. However, when plants were grown in 10Na, the difference in length between WT and *slcipk23* disappeared. Thus, these results suggest that characteristics such as longer roots can be related to a response of the plant to explore the medium in the search of Na⁺ or K⁺ in a situation of K⁺ shortage.

6.4.8 Use of inhibitors contribute to identify candidates for SICIPK23-mediated Na⁺ transport.

Different compounds that had been described as relatively specific inhibitors of each family of plant K⁺ or Na⁺ transport systems (Table 22) were used to identify the family to which the protein involved in Na⁺ uptake belonged. NH₄⁺ is considered to be an inhibitor of ion transport mediated by proteins of the HAK/KUP/KT family (Alemán et al., 2011; M. Nieves-Cordones et al., 2007; Rubio et al., 2008). By contrast, previous studies carried out in rice showed that transporters of the HKT family were inhibited by Ba²⁺.

The relative root Na⁺ content of WT plants treated with 4 mM NH₄⁺ decreased by 50 % with respect to non-treated plants. In contrast, the relative root Na⁺ content of *slcipk23* plants increased by approximately 40 % (Figure 37). Therefore, these results showed that NH₄⁺ was inhibiting a system whose function was activated in WT plants but not in *slcipk23* plants.

In experiments carried out with Ba²⁺, when it was applied, a significant decrease in root relative Na⁺ content was observed in both WT and *slcipk23* plants (Figure 38). Thus, Ba²⁺ was inhibiting a system that was working in both genotypes and therefore was not regulated by SICIPK23.

Other inhibitors such as Li⁺, Ca²⁺, and La³⁺ were tested. When plants were grown at 0.1 mM Li⁺, root relative Na⁺ content decreased by 20 % in both WT and *slcipk23* plants. However, with Ca²⁺ and La³⁺, a decrease in root relative Na⁺ content was only observed in *slcipk23* plants.

6.4.9 SICIPK23 is not involved in SIHKT1.1 and SIHKT1.2 regulation.

To determine whether the Na⁺ transport capacity under K⁺ starvation observed for the rice OsHKT2.1 (Horie et al., 2007) was conserved in any of the tomato proteins belonging to the HKT family, different experiments were performed.

The Na⁺ transport capacity of tomato HKT transporters was evaluated by their expression in the 9.3 yeast strain. In medium with 25 mM Na⁺, yeast expressing the Arabidopsis AtHKT1.1, the tomato SIHKT1.1, SIHKT1.1 together with SICIPK23-SICBL1 or with SICIPK23-SICBL9 showed a higher sensitivity to Na⁺ than 9.3 transformed with the empty vector. Therefore (Figure 41) it can be concluded that SICIPK23 was not regulating Na⁺ transport mediated SIHKT1.1.

Data about SIHKT1.2 expressed in oocytes showed that the SICIPK23/SICBL1/9 complex did not regulate this transport system. Although Na⁺ transport through SIHKT1.2 could be observed in these experiments, no differences between the oocytes expressing SIHKT1.2 alone or together regulatory complexes were observed.

In addition, fluorescent bimolecular complementation in *N. benthamiana* leaves has been used to study protein-protein interactions. The results showed that SICIPK23 did not interact with SIHKT1.2 or with SIHKT1.1. Therefore, the SICIPK23 protein is not involved in the regulation of the Na⁺ transport systems SIHKT1.1 and SIHKT1.2 (Figure 43).

6.4.10 SISKOR is inhibited by SICIPK23-SICBL1/9 complexes

Previous studies showed that K⁺ uptake and its translocation are closely coordinated (Kochian et al., 1989; M. Nieves-Cordones et al., 2019). The question arose whether regulatory complexes such as SICIPK23-SICBL1 involved in K⁺ transport (Chapter I), could also be involved in regulating the K⁺ translocation process through SISKOR in tomato plants. To check this hypothesis, SISKOR was expressed in *Xenopus* oocytes with or without SICIPK23-SICBL1/9 complexes. The co-expression of SICIPK23 + SICBL1 or SICIPK23 + SICBL9 led to a strong reduction of steady-state currents mediated by SISKOR at 30 mM K⁺ (83 % and 87 %, respectively) (Figure 49A and 49B).

6.4.11 Inhibition of SKOR-like channels by CIPK23-CBL1 is conserved in tomato, grapevine, Medicago, and lettuce but not in Arabidopsis and saltwater cress.

It was assessed whether the CIPK23-CBL1 complex regulates channels homologous to SISKOR in other plant species. The Arabidopsis SKOR K⁺ channel (AtSKOR) was expressed in *Xenopus* oocytes together with AtCIPK23-AtCBL1. Surprisingly, AtCIPK23-CBL1 did not affect currents mediated by AtSKOR. The current model about this subject states that the success of the regulation of the transport system by the CIPK-CBL complex is dependent on the presence of certain protein domains (José Sánchez-Barrena et al., 2020) which have been conserved in many orthologs. Therefore, the loss of AtSKOR regulation by AtCIPK23-AtCBL1 complexes could have been caused by the loss of these conserved domains in AtSKOR, AtCIPK23-CBL1, or both. The relative steady-state currents showed that AtCIPK23-AtCBL1 inhibited SISKOR, thus, the loss of AtSKOR regulation mediated by AtCIPK23-AtCBL1 should have been caused by changes in AtSKOR because AtCIPK23-AtCBL1 was able to inhibit SISKOR. Then, more SKOR homologs present in tomato (SIK5.1 and SIK5.2), but also homologs present in other species (VvK5.1, MtGORK, Ls5.1, EsK5.1, and HvK5.2) were expressed in *Xenopus* oocytes to check whether they were regulated by CIPK23 complex or not. It was observed that K⁺ currents mediated by SIK5.2, VvK5.1, MtGORK, and LsK5.1 were reduced by around 60-70 % due to AtCIPK23-AtCBL1 or SICIPK23-SICBL1 expression (Figure 50). The K⁺ currents mediated by EsK5.1 were not inhibited by AtCIPK23-AtCBL1 (Figure 50). Therefore, the regulation of SKOR-like channels by CIPK23-CBL1 complexes is present in tomato, grapevine, Medicago, and lettuce, but not in Arabidopsis and saltwater cress.

6.4.12 SISKOR inhibition by CIPK23-CBL1 is mediated by dependent and non-dependent phosphorylation mechanisms.

Because SISKOR, but not AtSKOR was regulated by CIPK23-CBL1 complexes, domain swapping between SISKOR and AtSKOR could help to map the target sites of the CIPK23-CBL1 complexes. As part of previous work carried out in the laboratory, chimeric proteins containing domains of SISKOR and AtSKOR were designed and constructed and regulation by CIPK23-CBL1 complexes was evaluated through their expression in *Xenopus* oocytes. It is important to note that only the presence of the N-terminal domain of SISKOR allowed the partial regulation of AtSKOR by AtCIPK23-AtCBL1 (Figure 51). Moreover, the results with other chimera indicated that the N-terminal domain and transmembrane domains of SISKOR were involved in its inhibition by the CIPK23-CBL1. Moreover, the results suggested that approximately 20 % of the reduction in SISKOR activity was phosphorylation-dependent while the rest of the reduction (80 %) occurred by a different mechanism.

6.4.13 Xylem K⁺ concentration is increased in *slcipk23* plants after K⁺ deprivation

After obtaining the KO mutant of *slcipk23* using CRISPR-Cas (Chapter I and Methods of this Doctoral Thesis) *slcipk23-1* plants were used to carry out experiments to characterize the of SICIPK23 in the regulation of SISKOR. The K⁺ concentration in xylem of WT and *slskor-1* plants was not altered in plants starved for K⁺ for 3h, while under this treatment, the xylem K⁺ concentration was increased in *slcipk23-1* plants compared to plants kept at 1,4 mM K⁺ (Figure 52).

6.4.14 Characterization of Arabidopsis GEPI1.0 lines

Experiments were conducted with Arabidopsis plants expressing the K⁺ sensor GEPI1.0. These experiments made it possible to obtain information on K⁺ dynamics in plant cells.

Changes in the K^+ content were estimated in the roots of GEPI1.0 plants which had been incubated under increasing K^+ concentrations. The ratio (cpVenus/CFP) of plants that were grown in 100 and 200 mM K^+ was higher than the ratio of plants that were grown in 0, 0.5, 5, and 20 mM K^+ (Figure 54B). From these results, it could be deduced that the K^+ sensor was useful for measuring changes in root concentration under high K^+ concentrations. We can also see that K^+ concentrations in cytosol are stable in a wide range of concentrations which is indicative of proper homeostasis. Moreover, data acquired in experiments showed that the long-term K^+ accumulation in cytosol does not affect the long-term Ca^{2+} concentration and does not alter the pH of the cytosol (Figure 55).

The K^+ content was also analyzed in guard cells. The fluorescence was studied in both open and closed states of stomata and then the ratio cpVenus/CFP was calculated. The cpVenus/CFP ratio was higher in cytosol of guard cells in open state than in the closed state after applying ABA. Therefore, it could be concluded that K^+ content was higher in open stomata (Figure 56).

As mentioned in the introduction section, it has been described that K^+ could act as a second messenger in response to different stress situations. An experiment with GEPI1.0 x R-GECO Arabidopsis plants was performed. GEPI1.0 x R-GECO plants were treated with 2 mM ATP in order to reproduce the external conditions that could occur after a pathogen attack. The results of these experiments showed a K^+ release after ATP supply, suggesting that K^+ may be involved in a signaling processes as a second messenger in addition to the already characterized Ca^{2+} signals. It was observed that the K^+ signal was preceded by the Ca^{2+} signal (Figure 57). This fact led us to think that the Ca^{2+} signal could lead to the activation of the mechanisms involved in K^+ decrease in the cytosol. More studies should be done to further characterize the process.

6.4.15 Generation of GEPI1.0 transgenic lines of tomato.

Since the studies using the Arabidopsis GEPI1.0 plants showed that K^+ sensors were a good tool to study K^+ cytosolic concentrations and K^+ dynamics

under different treatments, we thought that it would be interesting to do similar experiments with tomato and tomato plants expressing GEPI1.0 were generated. In this way, a PCR was performed to amplify the sensor coding sequence from the pGGZ004-plantGEPI1.0 plasmid. The amplified sequence was introduced into the pBI321 plasmid resulting in the 35S::plantGEPI1.0 construct. Once obtained, the 35S::plantGEPI1.0-pBI321 was used to transform *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101, and then, tomato cotyledons were infected with it and putative transgenic plants were generated.

As result, 16 plants were obtained, and of 16 plants, 11 showed to have the T-DNA. Therefore, the transformation effectivity was 69 %. Finally, the presence of fluorescence was checked using the microscope.

6.4.16 Characterization of tomato GEPI1.0 lines

Tomato GEPI1.0 lines were used in some experiments to check the sensor functionality. Similarly to the experiment performed with Arabidopsis, the ratio cpVenus/CFP was analyzed in the cytosol of guard cells in both open and closed states. The results showed that the ratio was higher in guard cells in open state than in closed state (after applying ABA).

VII. ANEXOS

7.1 Anexo I. Abreviaturas y símbolos

ABA	Ácido abscísico (del inglés, 'Abscisic Acid')
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP	Fosfato de arginina (del inglés, 'Arginine Phosphate')
ARN	Ácido ribonucleico
ARNc	Ácido ribonucleico codificante
ATP	Adenosin trifosfato
BiFC	Complementación bimolecular fluorescente
CaMs	Calmodulinas
CBLs	Proteínas de tipo calcineurina B
CDPKs	Proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+}
CFP	Proteína azul fluorescente (del inglés, 'Cyan Fluorescent Protein')
CIPKs	Proteínas quinasas que interactúan con CBLs
cm	Centímetro
CMLs	Proteínas similares a calmodulinas
CNGCs	Canales activados por nucleótidos cíclicos (del inglés, 'Cyclic nucleotide gated channels')
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> , ecotipo Columbia 0
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (del inglés, 'Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats')
DAMPS	Moléculas asociadas al daño (del inglés, 'Damage-Associated Molecular Patterns')
D_{max}	Velocidad máxima de despolarización
DO₆₀₀	Densidad óptica
Ea₅₀	Potencial de activación
EC	Conductividad eléctrica
F	Constante de Faraday
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia

G	Glicina
g	Gramo
GECIs	Indicadores de calcio codificados genéticamente (del inglés, 'Genetically Encoded Calcium Indicators')
GEPIs	Indicadores de potasio codificados genéticamente (del inglés, 'Genetically Encoded Potassium Indicators')
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés, 'Green Fluorescent Protein')
h	Horas
H⁺	Protones
ha	Hectáreas
ICP	Espectrofotómetro de iones acoplado a plasma
JA	Ácido jasmónico (del inglés, 'Jasmonic Acid')
kDa	Kilodalton
K_m	Constante de Michaelis-Menten
KO	Mutante de pérdida de función (del inglés, 'Knock Out')
L	Litro
LB	Medio de cultivo Luria-Broth
LysM	Motivo de lisina
M	Segmento transmembrana
MES	Ácido 2- (N-morfolino) etanosulfónico
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Millimolar
MS	Medio Murashige y Skoog
mV	Milivoltio
NA	Medio de cultivo (del inglés, 'Nutrient Agar')
ng	Nanogramo
NH₄⁺	Ion amonio
nm	Nanometro
NSCCs	Canales no selectivos de cationes (del inglés, 'Non-Selective Cation Channels')

P	Dominio loop-poro
p/p	Porcentaje peso soluto/peso solución
p/v	Peso/volumen
pb	Par/es de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Po	Probabilidad de apertura
PS	Peso seco
R	Constante de los gases ideales
ROI	Región de interés (del inglés, 'Region of Interest')
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés, 'Reactive Oxygen Species')
S	Serina
s	Segundo
SD	Medio de cultivo (del inglés, 'Sherman Dextrose')
sgARNs	Secuencias guía de ARN
SOS	'Salt Overly Sensitive pathway
T	Temperatura
T-ADN	ADN de transferencia
TEVC	Fijación de voltaje con dos electrodos (del inglés, 'Two-electrode voltage clamp')
TM	Transmembrana
UN	Naciones Unidas (del inglés, 'United Nations')
V_{max}	Velocidad máxima de la reacción
WT	Variedad silvestre (del inglés, 'Wild type')
YFP	Proteína amarilla fluorescente (del inglés, 'Yellow Fluorescent Protein')
YPD	Medio de cultivo (del inglés, Yeast Peptone Dextrose)
Z_g	Carga de Puerta equivalente (en inglés, 'gating charge')
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	micromolar

7.2 Anexo II. Cebadores

Tabla 24: Tabla de cebadores utilizados durante la Tesis Doctoral.

Nombre del cebador	Secuencia	Uso
LKT1 g3009-3031-F	GTCCTGCTCGTCGTTTAGTAATG	Secuenciación del ADN genómico de la región diana del sgARN1
LKT1 g4034-4054-R	CCGTGCACAACCAAGTTAGTC	Secuenciación del ADN genómico de la región diana del sgARN1
SISKORg2967-2988-F	CACACCAATGGAGTTCGCTTTC	Secuenciación del ADN genómico de la región diana del sgARN1
SISKORg3706-3728-R	CTACCAATCCATGTGTACCCTTC	Secuenciación del ADN genómico de la región diana del sgARN1
SISKORg3446-3467-F	GAACTCTTAGCTCTTTAACCG	Secuenciación del ADN genómico de la región diana del sgARN2
gLKT1-3413-3434-F	GCGCTCTAAGAAGAGTTAGTGC	Secuenciación del ADN genómico de la región diana del sgARN2
gSICIPK23-762-784-F	GAATCTGATGCTTTCTAGTGTTG	Secuenciación del ADN genómico de la región diana del sgARN1
gSICIPK23-1862-1882-R	CATTCGCTCTGTAGAATCTCC	Secuenciación del ADN genómico de la región diana del sgARN1
SICIPK23-UTR5-F	CAAGTCCCAGGTTTGCAACC	PCR
SICIPK23-UTR3-R	GGTAACCCACGGACATCACAC	PCR
SISKOR-UTR5-F	CGAAAACCTCAAATTTTTGAATTTTCGTATTACGAGAGAG	PCR
SISKOR-UTR3-R	CATCCAAGAGATACAACAAGAACTACATGAAGG	PCR
SICBL4-ATG-F	ATGGGCTGCTTTAATTCTAAGGTG	PCR
SICBL4-STOP-R	TTATGTAGCAACTTCATCAACTTCAGAA	PCR
SICBL4-UTR5-F	GTGAAGCTGTTTTCTAGGCGC	PCR
SICBL4-UTR3-R	ATCGAACAACACTTCACACGTCG	PCR
SICBL9-ATG-F	ATGGGCTGTTTTAGCTCTAAGGTG	PCR
SICBL9-STOP-R	TCAAGTAGCTCCTTCATCAACTTCTG	PCR
SICIPK23-T7-F	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGGTTCAAGA TCAAATAATGGAAGTGG	Síntesis de cARN
SICIPK23-BP-R	CTTGATCTTGTCAAGTTGAGACAATACCATCTTTACTTCC	Síntesis de cARN
SISKOR T7-F	gcgaaattaatacactcactatagggagaATGACGAGAGGTGAGGAAGTA CTGGAG	Síntesis de cARN
SISKOR BP-R	cttgatcttgTCAAGTTGATTCATTGATCAAGTAC	Síntesis de cARN
SICBL1-T7-F	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGGCTGCTTT AATTCTAAGGTG	Síntesis de cARN
SICBL1-BP-R	CTTGATCTTGTATGTAGCAACTTCATCAACTTCAGAA	Síntesis de cARN
SICBL9-T7-F	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGGCTGTTTTA GCTCTAAGGTG	Síntesis de cARN
SICBL9-BP-R	CTTGATCTTGTCAAGTAGCTCCTTCATCAACTTCTG	Síntesis de cARN
LKT1-T7-F	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGGAGATAAT AGAGGATTAGGTG	Síntesis de cARN
LKT1-BP-R	CTTGATCTTGTATGATGATTTAGCTTCATCGATATTG	Síntesis de cARN
AtCIPK23-T7-F	gcgaaattaatacactcactatagggagaATGGCTTCTCGAACAACGCCT TC	Síntesis de cARN
AtCIPK23-BP-R	cttgatcttgTTATGTGCTGACTGTTTTGCAATTGTCCGG	Síntesis de cARN
AtCBL1-T7-F	gcgaaattaatacactcactatagggagaATGGGCTGCTTCCACTCAAAG GC	Síntesis de cARN
AtCBL1-BP-R	cttgatcttgTCATGTGGCAATCTCATCGACCTCC	Síntesis de cARN
AtSKOR-T7-F	gcgaaattaatacactcactatagggagaATGGGAGGTAGTAGCGGCGG C	Síntesis de cARN
AtSKOR-BP-R	cttgatcttgTTATGTTTTCAACAGCCAAATACAGTTTTTTGTCC	Síntesis de cARN
GORK-T7-F	gcgaaattaatacactcactatagggagaATGGGACGTCTCCGAGACG GC	Síntesis de cARN
GORK-BP-R	cttgatcttgTTATGTTTATGATCAGTAGTACTGATC	Síntesis de cARN
VvK5.1 T7-F	gcgaaattaatacactcactatagggagaATGAATCGCTTCATGTATTTGG TTGGG	Síntesis de cARN
VvK5.1 BP-R	cttgatcttgCTAAATATCTAGTGTTCACATAACAAATATAGC	Síntesis de cARN

MtGORK T7-F	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGAAGATGAAG GAGGAAGAGGATGAAGGTG	Síntesis de cARN
MtGORK BP-R	CTTGATCTTGCTAATGCGTTTCATTGACTAAATACAG	Síntesis de cRNA
SISKOR qPCR-F	CTATAAGGCTGTTGGCAGCAAAA	qPCR
SISKOR qPCR-F	TGCCCTGCTCAACCGAAT	qPCR
SIK5.1 qPCR-F	TTTGGCCAACGGCATCA	qPCR
SIK5.1 qPCR-R	AGGTGAAGTGGTGTTCGAAAATC	qPCR
SIK5.2 qPCR-F	GAAAGGATCTTCGTGTAAGCA	qPCR
SIK5.2 qPCR-R	CAAAGCAAGCTCAGCCTCTTG	qPCR
SINRT1.5 qPCR-F	attgtggagtgtctacaggct	qPCR
SINRT1.5 qPCR-R	gagccttcacagtggttga	qPCR
SISLAH1-1 qPCR-F	ACAAAGGGCAAGCGTTTTCT	qPCR
SISLAH1-1 qPCR-R	CCATCCCATTTCAGCAGCTG	qPCR
SISLAH1-2 qPCR-F	gtttgcaggccagcactatt	qPCR
SISLAH1-2 qPCR-R	gcaacatcagcccattagca	qPCR
SISLAH2-1 qPCR-F	agcttgagccaacaggatct	qPCR
SISLAH2-1 qPCR-R	ccatgctgtcgttcagtagc	qPCR
SISLAH2-2 qPCR-F	aagcaaatctggcctgtgg	qPCR
SISLAH2-2 qPCR-R	actctcgacgaacagcttca	qPCR
SISLAH2-3 qPCR-F	TCTCACTGGCTGTTCCGATT	qPCR
SISLAH2-3 qPCR-R	TTGATCGTGGCAATAGCAGC	qPCR
SISLAH4 qPCR-F	tgccaagaggtttccgtttg	qPCR
SISLAH4 qPCR-R	cgatagcccgctgatacaacg	qPCR
SISLAC1 qPCR-F	caaaggttgccaacgagtgga	qPCR
SISLAC1 qPCR-F	ggttcttgccaagccatcaa	qPCR
qSICIPK23-F	CACAGAGACCTCAAGCCTGA	qPCR
qSICIPK23-R	AGCGCACTCAATCCGAAATC	qPCR
SISKOR S57A-F	gttagtgcgcccggagaagaaaattgcccggaagtttac	Sitio para mutagénesis dirigida
SISKOR S57A-R	gtaaactttcccgggcaaatttcttccgcccactaaac	Sitio para mutagénesis dirigida
LKT1-Spe-F	CCCCTAGTATGGGAGATAATAGAGGATTAGGTG	Clonaje en pSPYCE
LKT1-Xma-R	AAACCCGGGTGATGATTAGCTTCATCGATATTG	Clonaje en pSPYCE
SICPK23-Spe-F	CCCCTAGTATGGGTTCAAGATCAAATAATGGAAG	Clonaje en pSPYNE
SICPK23-Xho-R	CCCCTCGAGAGTTGAGACAATACCATCTTTTA	Clonaje en pSPYNE
SICBL4-Sal-F	CCCGTCGACATGGGCTGCTTAATTCTAAGGTG	Clonaje en pSPYCE
SICBL4-Xma-R	AAACCCGGGTGTAGCAACTTCATCAACTTCAGAA	Clonaje en pSPYCE
SICBL9-Sal-F	AAACCCGGGAGTAGCTCCTTCATCAACTTCTG	Clonaje en pSPYCE
SICBL9-Xma-R	AAACCCGGGAGTAGCTCCTTCATCAACTTCTG	Clonaje en pSPYCE
YFP-Cter-BP-R	cttgatcttgTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	Síntesis de cARN
YFP-Nter-BP-R	cttgatcttgCTACTCGATGTTGTGGCGGATC	Síntesis de cARN
SIK5.1-T7-F	gcgaaattaatacgaactcactatagggagaatggatagaggaaaacgaagatccg	Síntesis de cARN
SIK5.1-BP-R	cttgatcttgatgtgtattcgttactaaaaaacag	Síntesis de cARN
SIK5.2-T7-F	gcgaaattaatacgaactcactatagggagaatgtcgatgaagagagaattacgag	Síntesis de cARN
SIK5.2-BP-R	cttgatcttgcaaggtgttctactgcaagtagc	Síntesis de cARN
LsK5.1 T7-F	gcgaaattaatacgaactcactatagggagaATGAGGATTGGATCGACGGC G	Síntesis de cARN
LsK5.1 BP-R	cttgatcttgTCATTCTTCACTAATCAAATACAACCTTTTGTCC	Síntesis de cARN
EsK5.1 T7-F	gcgaaattaatacgaactcactatagggagaATGGGAGGTAGCAGCGGC	Síntesis de cARN
EsK5.1 BP-R	cttgatcttgTTATGTTTCAACAGTCAAATACAGTTTTTGTCC	Síntesis de cARN
HvK5.2 T7-F	gcgaaattaatacgaactcactatagggagaATGGCGAGGGGGGCAAGG	Síntesis de cARN
HvK5.2 BP-R	cttgatcttgCTACTTGCTATGACCGGTGTCC	Síntesis de cARN
SICIPK2-T7-F	gcgaaattaatacgaactcactatagggagaATGGCCAATAAAGGAAGCATA CTG	Síntesis de cARN
SICIPK2-BP-R	cttgatcttgTCAAGGTAAGTCTCTTGCTG	Síntesis de cARN
SICIPK9-T7-F	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGAGTAGCTCA ACGTCAACGTCAATC	Síntesis de cARN
SICIPK9-BP-R	CTTGATCTTGTTAAGACCTTTTTCTTCAGAGGGTTG	Síntesis de cARN
qSICBL1-F	CGTTGTCTAGTCGTGCTTC	qPCR
qSICBL1-R	GTGTCCACGGAAGTCTTTT	qPCR
qSICBL9-F	AAGGTGGCAAGAGGACATCA	qPCR
qSICBL9-R	GCTGTTTTGGATGCCAGGAA	qPCR
SICIPK23 K48N-F	aaactggtgataatgtagccataaatattcttgataaagagaaggtc	Sitio para mutagénesis dirigida
SICIPK23 K48N-R	gaccttctttatcaagaatattatggtctacattaccagttt	Sitio para mutagénesis dirigida

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G., & Hedrich, R. (2000). GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Letters*, *486*(2), 93–98. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02248-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02248-1)
- Adem, G. D., Roy, S. J., Zhou, M., Bowman, J. P., & Shabala, S. (2014). Evaluating contribution of ionic, osmotic and oxidative stress components towards salinity tolerance in barley. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-113/TABLES/1>
- Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V., & Rubio, F. (2011). Root K⁺ Acquisition in Plants: The *Arabidopsis thaliana* Model. *Plant and Cell Physiology*, *52*(9), 1603–1612. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCR096>
- Ali, A., Raddatz, N., Pardo, J. M., & Yun, D. J. (2021). HKT sodium and potassium transporters in *Arabidopsis thaliana* and related halophyte species. *Physiologia Plantarum*, *171*(4), 546–558. <https://doi.org/10.1111/PPL.13166>
- Allen, G. J., Kwak, J. M., Chu, S. P., Llopis, J., Tsien, R. Y., Harper, J. F., & Schroeder, J. I. (1999). Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Journal*, *19*(6), 735–747. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.1999.00574.X>
- Amtmann, A., Armengaud, P., & Volkov, V. (2018). Potassium Nutrition and Salt Stress. *Annual Plant Reviews Online*, 328–379. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.APR0151>
- Amtmann, A., Troufflard, S., & Armengaud, P. (2008). The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia Plantarum*, *133*(4), 682–691. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.2008.01075.X>
- Armengaud, P., Breitling, R., & Amtmann, A. (2004). *The Potassium-Dependent Transcriptome of Arabidopsis Reveals a Prominent Role of Jasmonic Acid in Nutrient Signaling 1[w]*. <https://doi.org/10.1104/pp.104.046482>
- Asins, M. J., Villalta, I., Aly, M. M., Olías, R., Álvarez De Morales, P., Huertas, R., Li, J., Jaime-Pérez, N., Haro, R., Raga, V., Carbonell, E. A., & Bover, A. (2013). Two closely linked tomato HKT coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in Na⁺/K⁺ homeostasis. *Plant*,

- Cell and Environment*, 36(6), 1171–1191.
<https://doi.org/10.1111/PCE.12051>
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., & Smith, J. A. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology Kevin Struhl (eds.) Current Protocols in Molecular Biology*.
- Bañuelos, M. A., Quintero, F. J., & Rodríguez-Navarro, A. (1995). Functional expression of the ENA1(PMR2) - ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* in *Schizosaccharomyces pombe*. *BBA - Bioenergetics*, 1229(2), 233–238.
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(95\)00006-5](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00006-5)
- Barberon, M., Vermeer, J. E. M., De Bellis, D., Wang, P., Naseer, S., Andersen, T. G., Humbel, B. M., Nawrath, C., Takano, J., Salt, D. E., & Geldner, N. (2016). Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. *Cell*, 164(3), 447–459.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.12.021>
- Behera, S., Long, Y., Schmitz-Thom, I., Wang, X. P., Zhang, C., Li, H., Steinhorst, L., Manishankar, P., Ren, X. L., Offenborn, J. N., Wu, W. H., Kudla, J., & Wang, Y. (2017). Two spatially and temporally distinct Ca²⁺ signals convey *Arabidopsis thaliana* responses to K⁺ deficiency. *New Phytologist*, 213(2), 739–750. <https://doi.org/10.1111/NPH.14145>
- Benito, B., Garciadeblas, B., & Rodriguez-Navarro, A. (2012). *HAK Transporters from Physcomitrella patens and Yarrowia lipolytica Mediate Sodium Uptake*.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcs056>
- Berardini, T. Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E., & Huala, E. (2015). The arabidopsis information resource: Making and mining the 'gold standard' annotated reference plant genome. *Genesis*, 53(8), 474–485.
<https://doi.org/10.1002/DVG.22877>
- Bischof, H., Rehberg, M., Stryeck, S., Artinger, K., Eroglu, E., Waldeck-Weiermair, M., Gottschalk, B., Rost, R., Deak, A. T., Niedrist, T., Vujic, N., Lindermuth, H., Prassl, R., Pelzmann, B., Groschner, K., Kratky, D., Eller, K., Rosenkranz, A. R., Madl, T., ... Malli, R. (2017). *Novel genetically encoded fluorescent probes enable real-time detection of potassium in vitro and in*

- vivo*. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01615-z>
- Bolker, J. A. (1995). Model systems in developmental biology. *BioEssays*, 17(5), 451–455. <https://doi.org/10.1002/BIES.950170513>
- Boscari, A., Clément, M., Volkov, V., Gollack, D., Hybiak, J., Miller, A. J., Amtmann, A., & Fricke, W. (2009). Potassium channels in barley: Cloning, functional characterization and expression analyses in relation to leaf growth and development. *Plant, Cell and Environment*, 32(12), 1761–1777. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2009.02033.X>
- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., & Van Eck, J. (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiology*, 166(3), 1292–1297. <https://doi.org/10.1104/pp.114.247577>
- Brunelli, J. P., & Pall, M. L. (1993). A series of yeast shuttle vectors for expression of cDNAs and other DNA sequences. *Yeast*, 9(12), 1299–1308. <https://doi.org/10.1002/YEA.320091203>
- Burnstock, G. (1972). Purinergic Nerves. *Pharmacological Reviews*, 24(3).
- Buschmann, P. H., Vaidyanathan, R., Gassmann, W., & 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(4), 1387–1397. <https://doi.org/10.1104/PP.122.4.1387>
- Caballero, F., Botella, M. A., Rubio, L., Fernández, J. A., Martínez, V., & Rubio, F. (2012). A Ca²⁺-sensitive system mediates low-affinity K⁺ uptake in the absence of AKT1 in arabidopsis plants. *Plant and Cell Physiology*, 53(12), 2047–2059. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs140>
- Cheeseman, J. M., & Hanson, J. B. (1979). Energy-linked Potassium Influx as Related to Cell Potential in Corn Roots'. *Plant Physiol*, 64, 842–845.
- Cheng, Y., Wang, X., Cao, L., Ji, J., Liu, T., & Duan, K. (2021). Highly efficient *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation for gene functional and gene editing analysis in soybean. *Plant Methods*, 17(1), 1–12.

<https://doi.org/10.1186/S13007-021-00778-7/FIGURES/7>

- Corratgé-Faillie, C., Jabnoute, M., Zimmermann, S., Véry, A. A., Fizames, C., & Sentenac, H. (2010). Potassium and sodium transport in non-animal cells: The Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(15), 2511–2532. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0317-7>
- Coskun, D., Britto, D. T., Li, M., Oh, S., & Kronzucker, H. J. (2013). Capacity and plasticity of potassium channels and high-affinity transporters in roots of barley and arabidopsis. *Plant Physiology*, 162(1), 496–511. <https://doi.org/10.1104/pp.113.215913>
- Costa, A., Luoni, L., Marrano, C. A., Hashimoto, K., Köster, P., Giacometti, S., De Michelis, M. I., Kudla, J., & Bonza, M. C. (2017). Ca²⁺-dependent phosphoregulation of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase ACA8 modulates stimulus-induced calcium signatures. *Journal of Experimental Botany*, 68(12), 3215–3230. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx162>
- Cotsaftis, O., Plett, D., Shirley, N., Tester, M., & Hrmova, M. (2012). A Two-Stage Model of Na⁺ Exclusion in Rice Explained by 3D Modeling of HKT Transporters and Alternative Splicing. *PLOS ONE*, 7(7), e39865. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0039865>
- Cram, W. J., & Pitman, M. G. (1972). The action of abscisic acid on ion uptake and water flow in plant roots. *Australian Journal of Biological Sciences*, 25(6), 1125–1132. <https://doi.org/10.1071/BI9721125>
- Cuéllar, T., Pascaud, F., Verdeil, J. L., Torregrosa, L., Adam-Blondon, A. F., Thibaud, J. B., Sentenac, H., & Gaillard, I. (2010). A grapevine Shaker inward K⁺ channel activated by the calcineurin B-like calcium sensor 1-protein kinase CIPK23 network is expressed in grape berries under drought stress conditions. *Plant Journal*, 61(1), 58–69. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2009.04029.X>
- Daliparthi, J., Barker, A. V., & Mondal, S. S. (1994). Potassium fractions with other nutrients in crops: A review focusing on the tropics. *Journal of Plant Nutrition*, 17(11), 1859–1886. <https://doi.org/10.1080/01904169409364852>
- Davies, C., Shin, R., Liu, W., Thomas, M. R., & 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.* <https://doi.org/10.1093/jxb/erl091>
- De Luca, A., Corell, M., Chivet, M., Parrado, M. A., Pardo, J. M., & Leidi, E. O. (2021). *Reassessing the Role of Potassium in Tomato Grown with Water Shortages.* <https://doi.org/10.3390/horticulturae7020020>
- Deeken, D., Geiger AE Jo, R. A., & Fromm Olga Koroleva Peter Ache Rosemarie Langenfeld-Heyser AE Norbert Sauer Sean T May AE Rainer Hedrich, rg A. (2002). *Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of Arabidopsis.* <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0895-1>
- Dehairs, J., Talebi, A., Cherifi, Y., & Swinnen, J. V. (2016). CRISP-ID: decoding CRISPR mediated indels by Sanger sequencing. *Nature Publishing Group.* <https://doi.org/10.1038/srep28973>
- Demidchik, V., Cui, T. A., Svistunenko, D., Smith, S. J., Miller, A. J., Shabala, S., Sokolik, A., & Yurin, V. (2010). Arabidopsis root K⁺-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: Single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science*, 123(9), 1468–1479. <https://doi.org/10.1242/JCS.064352>
- Demidchik, V., Davenport, R. J., & Tester, M. (2002). Nonselective cation channels in plants. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 53, pp. 67–107). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091901.161540>
- Demidchik, V., & Maathuis, F. J. M. (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: From salt stress to signalling and development. *New Phytologist*, 175(3), 387–404. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2007.02128.X>
- Drain, A., Thouin, J., Wang, L., Boeglin, M., Pauly, N., Gaillard, I., Véry, A.-A., & Sentenac, H. (2020). *Functional characterization and physiological roles of the single Shaker outward K⁺ channel in Medicago truncatula*. *Running title The single outward Shaker channel in Medicago.* <https://doi.org/10.1111/tpj.14697>
- Dreyer, I., Susmilch, F. C., Fukushima, K., Riadi, G., Becker, D., Schultz, J., &

- Hedrich, R. (2021). How to Grow a Tree: Plant Voltage-Dependent Cation Channels in the Spotlight of Evolution. *Trends in Plant Science*, 26(1), 41–52. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2020.07.011>
- Duby, G., Hosal, E., Fizames, C., Alcon, C., Costa, A., Sentenac, H., & Thibaud, J. B. (2008). AtKC1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K⁺ channels. *Plant Journal*, 53(1), 115–123. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2007.03324.X>
- Durrant, M. J., Draycott, A. P., & Milford, G. F. J. (1978). Effect of sodium fertiliser on water status and yield of sugar beet. *Annals of Applied Biology*, 88(2), 321–328. <https://doi.org/10.1111/J.1744-7348.1978.TB00713.X>
- Eck, J. Van, Keen, P., & Tjahjadi, M. (2019). *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Tomato. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8778-8_16
- Edel, K. H., & Kudla, J. (2015). Increasing complexity and versatility: How the calcium signaling toolkit was shaped during plant land colonization. *Cell Calcium*, 57(3), 231–246. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2014.10.013>
- Edel, K. H., Marchadier, E., Brownlee, C., Kudla, J., & Hetherington, A. M. (2017). The Evolution of Calcium-Based Signalling in Plants. *Current Biology*, 27(13), R667–R679. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2017.05.020>
- Edwards, A. N., Patterson-Fortin, L. M., Vakulskas, C. A., Mercante, J. W., Potrykus, K., Vinella, D., Camacho, M. I., Fields, J. A., Thompson, S. A., Georgellis, D., Cashel, M., Babitzke, P., & Romeo, T. (2011). Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems. *Molecular Microbiology*, 80(6), 1561–1580. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2011.07663.X>
- Fernandez-Pozo, N., Menda, N., Edwards, J. D., Saha, S., Tecle, I. Y., Strickler, S. R., Bombarely, A., Fisher-York, T., Pujar, A., Foerster, H., Yan, A., & Mueller, L. A. (2015). The Sol Genomics Network (SGN)-from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Research*, 43. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1195>
- Fu, H. H., & Luan, S. (1998). AtKUP1: A dual-affinity K⁺ transporter from

- arabidopsis. *Plant Cell*, 10(1), 63–73. <https://doi.org/10.1105/TPC.10.1.63>
- Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., Martinelli, L. A., Seitzinger, S. P., & Sutton, M. A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 320(5878), 889–892. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1136674/SUPPL_FILE/GALLOWAY_SOM.M.PDF
- Gao, Y., & Cabrera Serrenho, A. (2023). Greenhouse gas emissions from nitrogen fertilizers could be reduced by up to one-fifth of current levels by 2050 with combined interventions. *Nature Food* 2023 4:2, 4(2), 170–178. <https://doi.org/10.1038/s43016-023-00698-w>
- Garciadeblas, B., Barrero-Gil, J., Benito, B., & Rodríguez-Navarro, A. (2007). Potassium transport systems in the moss *Physcomitrella patens*: pphak1 plants reveal the complexity of potassium uptake. *Plant Journal*, 52(6), 1080–1093. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03297.x>
- Garciadeblás, B., Senn, M. E., Bañuelos, M. A., & Rodríguez-Navarro, A. (2003). Sodium transport and HKT transporters: The rice model. *Plant Journal*, 34(6), 788–801. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2003.01764.X>
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J. B., & Sentenac, H. (1998). Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell*, 94(5), 647–655. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9741629>
- Gaymard, Frédéric, Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J. B., & Sentenac, H. (1998). Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell*, 94(5), 647–655. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81606-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81606-2)
- Geiger, D., Becker, D., Vosloh, D., Gambale, F., Palme, K., Rehers, M., Anschuetz, U., Dreyer, I., Kudla, J., & Hedrich, R. (2009). Heteromeric AtKC1-AKT1 channels in Arabidopsis roots facilitate growth under K⁺

- limiting conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 284(32), 21288–21295. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.017574>
- Gibeaut, D. M., Hulett, J., Cramer, G. R., & Seemann, J. R. (1997). Maximal Biomass of *Arabidopsis fha/iana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions'. *Plant Physiol*, 115, 317–319.
- Gierth, M., Mäser, P., & 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* 1[w]. <https://doi.org/10.1104/pp.104.057216>
- Gilroy, S., Fricker, M. D., Read, N. D., & Trewavas, A. J. (1991). Role of Calcium in Signal Transduction Guard Cells of *Commelina*. *The Plant Cell*, 3, 333–344. <https://academic.oup.com/plcell/article/3/4/333/5984168>
- Gobert, A., Park, G., Amtmann, A., Sanders, D., & Maathuis, F. J. M. (2006). *Arabidopsis thaliana Cyclic Nucleotide Gated Channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj064>
- Gomez-Porras, J. L., Riaño-Pachón, D. M., Benito, B., Haro, R., Sklodowski, K., Rodríguez-Navarro, A., & Dreyer, I. (2012). Phylogenetic analysis of K⁺ transporters in bryophytes, lycophytes, and flowering plants indicates a specialization of vascular plants. *Frontiers in Plant Science*, 3(AUG), 167. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2012.00167/ABSTRACT>
- Grefen, C., & Blatt, M. R. (2012). Scientific Correspondence Do Calcineurin B-Like Proteins Interact Independently of the Serine Threonine Kinase CIPK23 with the K⁺ Channel AKT1? Lessons Learned from a Ménage à Trois. *Plant Physiology*, 159, 915–919. <https://doi.org/10.1104/pp.112.198051>
- Grenzi, M., Buratti, S., Parmagnani, A. S., Abdel Aziz, I., Bernacka-Wojcik, I., Resentini, F., Šimura, J., Doccula, F. G., Alfieri, A., Luoni, L., Ljung, K., Bonza, M. C., Stavrinidou, E., & Costa, A. (2023). Long-distance turgor pressure changes induce local activation of plant glutamate receptor-like channels. *Current Biology*, 33(6), 1019-1035.e8.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.01.042>

- Grenzi, M., Resentini, F., Vanneste, S., Zottini, M., Bassi, A., & Costa, A. (2021). *Illuminating the hidden world of calcium ions in plants with a universe of indicators*. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab339>
- Hamamura, Y., Nishimaki, M., Takeuchi, H., Geitmann, A., Kurihara, D., & Higashiyama, T. (2014). *ARTICLE Live imaging of calcium spikes during double fertilization in Arabidopsis*. <https://doi.org/10.1038/ncomms5722>
- Han, M., Wu, W., Wu, W. H., & Wang, Y. (2016). Potassium Transporter KUP7 Is Involved in K⁺ Acquisition and Translocation in Arabidopsis Root under K⁺-Limited Conditions. *Molecular Plant*, 9(3), 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.01.012>
- Han, W., Ji, Y., Wu, W., Cheng, J. K., Feng, H. Q., & Wang, Y. (2021). ZMK1 Is Involved in K⁺ Uptake and Regulated by Protein Kinase ZmCIPK23 in Zea mays. *Frontiers in Plant Science*, 12, 517742. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.517742/FULL>
- Hartje, S., Zimmermann, S., Klonus, D., & 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(5), 723–731. <https://doi.org/10.1007/s004250050673>
- Hauser, F., & Horie, T. (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: A mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, Cell and Environment*, 33(4), 552–565. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2009.02056.X>
- Helliwell, K. E., Chrachri, A., Koester, J. A., Wharam, S., Taylor, A. R., Wheeler, G. L., & Brownlee, C. (2020). A novel single-domain Na⁺-selective voltage-gated channel in photosynthetic eukaryotes. *Plant Physiology*, 184(4), 1674–1683. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00889>
- Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P., & Sussman, M. R. (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science*, 280(5365), 918–

921. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.280.5365.918/ASSET/DAB8E2DE-6748-421E-A1AD-49D2A9930C52/ASSETS/GRAPHIC/SE1986494004.JPEG>

Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). *THE WATER-CULTURE METHOD FOR GROWING PLANTS WITHOUT SOIL* Hoagland 1 Professor of Plant Nutrition and Chemist in the Experiment Station. 2 Instructor in Truck Crops and Junior Plant Physiologist in the Experiment.

Honsbein, A., Sokolovski, S., Grefen, C., Campanoni, P., Pratelli, R., Paneque, M., Chen, Z., Johansson, I., & Blatt, M. R. (2009). A tripartite SNARE-K⁺ channel complex mediates in channel-dependent K⁺ nutrition in arabidopsis. *Plant Cell*, 21(9), 2859–2877. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066118>

Horie, T., Costa, A., Kim, T. H., Han, M. J., Horie, R., Leung, H. Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G., & Schroeder, J. I. (2007). Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. *EMBO Journal*, 26(12), 3003–3014. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601732>

Horie, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Yamada, K., Oiki, S., & Shinmyo, A. (2001). Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant Journal*, 27(2), 129–138. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2001.01077.X>

Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Porée, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Véry, A. A., Simonneau, T., Thibaud, J. B., & Sentenac, H. (2003). The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5549–5554. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0733970100>

Huertas, R., Olías, R., Eljakaoui, Z., Gálvez, F. J., Li, J., De Morales, P. A., Belver, A., & Rodríguez-Rosales, M. P. (2012). Overexpression of SISOS2 (SICIPK24) confers salt tolerance to transgenic tomato. *Plant, Cell & Environment*, 35(8), 1467–1482. <https://doi.org/10.1111/J.1365->

3040.2012.02504.X

- Humble, G. D., & Raschke, K. (1971). Stomatal Opening Quantitatively Related to Potassium Transport EVIDENCE FROM ELECTRON PROBE ANALYSIS'. In *Plant Physiol* (Vol. 48).
- Irigoyen, S., Ramasamy, M., Pant, S., Niraula, P., Bedre, R., Gurung, M., Rossi, D., Laughlin, C., Gorman, Z., Achor, D., Levy, A., Kolomiets, M. V, Sétamou, M., Badillo-Vargas, I. E., Avila, C. A., Irey, M. S., & Mandadi, K. K. (2020). *Plant hairy roots enable high throughput identification of antimicrobials against Candidatus Liberibacter spp.* <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19631-x>
- Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H. H., & Hedrich, R. (2001). K⁺ channel profile and electrical properties of Arabidopsis root hairs. *FEBS Letters*, 508(3), 463–469. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03114-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03114-3)
- Jaffe, M. J. (1973). The Role of ATP in Mechanically Stimulated Rapid Closure of the Venus's Flytrap. *Plant Physiology*, 51(1), 17–18. <https://doi.org/10.1104/PP.51.1.17>
- Jeanguenin, L., Alcon, C., Duby, G., Boeglin, M., Chérel, I., Gaillard, I., Zimmermann, S., Sentenac, H., & Véry, A. A. (2011). AtKC1 is a general modulator of Arabidopsis inward Shaker channel activity. *Plant Journal*, 67(4), 570–582. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2011.04617.X>
- Jegla, T., Busey, G., & Assmann, S. M. (2018). Evolution and structural characteristics of plant voltage-gated K⁺ channels. *Plant Cell*, 30(12), 2898–2909. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00523>
- Jeschke, W. D. (1972). Wirkung von K⁺ auf die Fluxe und den Transport von Na⁺ in Gerstenwurzeln, K⁺-stimulierter Na⁺-Efflux in der Wurzelrinde. *Planta*, 106(1), 73–90. <https://doi.org/10.1007/BF00385474>
- Jin, Y., Jing, W., Zhang, Q., & Zhang, W. (2015). Cyclic nucleotide gated channel 10 negatively regulates salt tolerance by mediating Na⁺ transport in Arabidopsis. *J Plant Res*, 128, 211–220. <https://doi.org/10.1007/s10265-014-0679-2>

- Johansson, I., Wulfetange, K., Porée, F., Michard, E., Gajdanowicz, P., Lacombe, B., Sentenac, H., Thibaud, J. B., Mueller-Roeber, B., Blatt, M. R., & Dreyer, I. (2006). External K⁺ modulates the activity of the Arabidopsis potassium channel SKOR via an unusual mechanism. *Plant Journal*, *46*(2), 269–281. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2006.02690.X>
- José Sánchez-Barrena, M., Chaves-Sanjuan, A., Raddatz, N., Mendoza, I., Cortés, Á., Gago, F., María González-Rubio, J., Benavente, J. L., Quintero, F. J., Pardo, J. M., & Albert, A. (2020). *Recognition and Activation of the Plant AKT1 Potassium Channel by the Kinase CIPK23 1[OPEN]*. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01084>
- Ju, X. T., Xing, G. X., Chen, X. P., Zhang, S. L., Zhang, L. J., Liu, X. J., Cui, Z. L., Yin, B., Christie, P., Zhu, Z. L., & Zhang, F. S. (2009). Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(9), 3041–3046. https://doi.org/10.1073/PNAS.0813417106/SUPPL_FILE/0813417106SI.PDF
- Jung, J. Y., Shin, R., & Schachtman, D. P. (2009). Ethylene mediates response and tolerance to potassium deprivation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *21*(2), 607–621. <https://doi.org/10.1105/TPC.108.063099>
- Kabu, K. L., & Toop, E. W. (1970). PLANT GROWTH For personal use only. *Can. J. Plant Sci. Downloaded from Cdnsciencepub*, *50*, 7.
- Kaplan, B., Sherman, T., & Fromm, H. (2007). Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Letters*, *581*(12), 2237–2246. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2007.02.017>
- Karley, A. J., & White, P. J. (2009). Moving cationic minerals to edible tissues: potassium, magnesium, calcium. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(3), 291–298. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2009.04.013>
- Keinath, N. F., Waadt, R., Brugman, R., Schroeder, J. I., Grossmann, G., Schumacher, K., & Krebs, M. (2015). Live Cell Imaging with R-GECO1 Sheds Light on flg22- and Chitin-Induced Transient [Ca²⁺]_{cyt} Patterns in

- Arabidopsis. *Molecular Plant*, 8(8), 1188–1200.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2015.05.006>
- Kim, B. G., Waadt, R., Cheong, Y. H., Pandey, G. K., Dominguez-Solis, J. R., Schültke, S., Lee, S. C., Kudla, J., & Luan, S. (2007). The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in Arabidopsis. *Plant Journal*, 52(3), 473–484. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2007.03249.X>
- Kim, E. J., Kwak, J. M., Uozumi, N., & Schroeder, J. I. (1998). AtKUP1: An arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell*, 10(1), 51–62. <https://doi.org/10.1105/TPC.10.1.51>
- Knight, M. R., Campbell, A. K., Smith, S. M., & Trewavas, A. J. (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 1991 352:6335, 352(6335), 524–526. <https://doi.org/10.1038/352524a0>
- Kobayashi, N. I., & Tanoi, K. (2015). Critical issues in the study of magnesium transport systems and magnesium deficiency symptoms in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 23076–23093. <https://doi.org/10.3390/ijms160923076>
- Koch, M., Busse, M., Naumann, M., Jáklí, B., Smit, I., Cakmak, I., Hermans, C., & Pawelzik, E. (2019). Differential effects of varied potassium and magnesium nutrition on production and partitioning of photoassimilates in potato plants. *Physiologia Plantarum*, 166(4), 921–935. <https://doi.org/10.1111/ppl.12846>
- Kochian, L. V, Shaff, J. E., & Lucas, W. J. (1989). High Affinity K⁺ Uptake in Maize Roots A Lack of Coupling with H⁺ Efflux. *Plant Physiol*, 91, 1202–121.
- Kocourková, D., Krčková, Z., Pejchar, P., Kroumanová, K., Podmanická, T., Daněk, M., & Martinec, J. (2020). Phospholipase Dα1 mediates the high-Mg²⁺ stress response partially through regulation of K⁺ homeostasis. *Plant Cell and Environment*, 43(10), 2460–2475. <https://doi.org/10.1111/pce.13831>
- Koncz, C., & Schell, J. (1986). *The promoter of TL-DNA gene 5 controls the*

tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. 204, 383–396.

- Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, 2015(4). <https://doi.org/10.7554/eLife.06100.001>
- Krebs, M., Held, K., Binder, A., Hashimoto, K., Den Herder, G., Parniske, M., Kudla, J., & Schumacher, K. (2012). FRET-based genetically encoded sensors allow high-resolution live cell imaging of Ca²⁺ dynamics. *Plant Journal*, 69(1), 181–192. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2011.04780.X>
- Kudla, J., Batistič, O., & Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: The Lead Currency of plant information processing. In *Plant Cell* (Vol. 22, Issue 3, pp. 541–563). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072686>
- Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H., & Thibaud, J.-B. (2000). A Shaker-like K Channel with Weak Rectification Is Expressed in Both Source and Sink Phloem Tissues of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 12, 837–851. <https://academic.oup.com/plcell/article/12/6/837/6008840>
- Lara, A., Ródenas, R., Andrés, Z., Martínez, V., Quintero, F. J., Nieves-Cordones, M., Angeles Botella, M., & Rubio, F. (2020). Arabidopsis K⁺ transporter HAK5-mediated high-affinity root K⁺ uptake is regulated by protein kinases CIPK1 and CIPK9. *Journal of Experimental Botany*, 71(16), 5053–5060. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa212>
- Lebaudy, A., Pascaud, F., Véry, A. A., Alcon, C., Dreyer, I., Thibaud, J. B., & Lacombe, B. (2010). Preferential KAT1-KAT2 heteromerization determines inward K⁺ current properties in Arabidopsis guard cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(9), 6265–6274. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.068445>
- Leigh, R. A., & Wyn Jones, R. G. (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), 1–13. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.1984.TB04103.X>
- Leng, Q., Mercier, R. W., Yao, W., & Berkowitz, G. A. (1999). *Cloning and First*

- Functional Characterization of a Plant Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel 1.* www.plantphysiol.org
- Lewis, B. D., & Spalding, E. P. (1997). *Nonselective Block by La³⁺ of Arabidopsis Ion Channels Involved in Signal Transduction.*
- Li, J., Yu, L., Qi, G. N., Li, J., Xu, Z. J., Wu, W. H., & Yi, W. (2014). The Os-AKT1 channel is critical for K⁺ uptake in rice roots and is modulated by the rice CBL1-CIPK23 complex. *Plant Cell*, 26(8), 3387–3402. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.123455>
- Li, X., Borsics, T., Harrington, H. M., & Christopher, D. A. (2005). Arabidopsis AtCNGC10 rescues potassium channel mutants of E. coli, yeast and Arabidopsis and is regulated by calcium/calmodulin and cyclic GMP in E. coli. *Functional Plant Biology*, 32(7), 643–653. <https://doi.org/10.1071/FP04233>
- Lin, M. H., Gresshoff, P. M., Indrasumunar, A., & Ferguson, B. J. (2011). PHairyRed: A novel binary vector containing the DsRed2 reporter gene for visual selection of transgenic hairy roots. *Molecular Plant*, 4(3), 537–545. <https://doi.org/10.1093/MP/SSQ084>
- Loro, G., Drago, I., Pozzan, T., Schiavo, F. Lo, Zottini, M., & Costa, A. (2012). Targeting of Cameleons to various subcellular compartments reveals a strict cytoplasmic/mitochondrial Ca²⁺ handling relationship in plant cells. *Plant Journal*, 71(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2012.04968.X>
- Loro, G., Wagner, S., Doccula, F. G., Behera, S., Weinl, S., Kudla, J., Schwarzländer, M., Costa, A., & Zottini, M. (2016). Chloroplast-Specific in Vivo Ca²⁺ Imaging Using Yellow Cameleon Fluorescent Protein Sensors Reveals Organelle-Autonomous Ca²⁺ Signatures in the Stroma. *Plant Physiology*, 171(4), 2317–2330. <https://doi.org/10.1104/PP.16.00652>
- Maathuis, F. J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 250–258. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2009.04.003>
- Maathuis, F. J. M., & Sanders, D. (1994). *Cell Biology Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of Arabidopsis thaliana (energized K⁺*

- transport/K⁺-H⁺ cotaspWrt/current/voltage analysis*. 91, 9272–9276.
<https://www.pnas.org>
- MacRobbie, E. A. C. (1987). Ionic relations of guard cells. *Stomatal Function*, 125–162.
- Marschner, P. (2011). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.X0001-5>
- Marti, E., Gisbert, C., Bishop, G. J., Dixon, M. S., & García-Martínez, J. L. (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany*, 57(9), 2037–2047.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erj154>
- Mäser, P., Hosoo, Y., Goshima, S., Horie, T., Eckelman, B., Yamada, K., Yoshida, K., Bakker, E. P., Shinmyo, A., Oiki, S., Schroeder, J. I., & Uozumi, N. (2002). Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 6428–6433.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.082123799/ASSET/62D26D2E-72A0-40AB-8AAC-72435845CDD0/ASSETS/GRAPHIC/PQ0821237007.JPEG>
- Mcaish, M. R., Brownlee, C., & Hetherington, A. M. (1990). *Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca²⁺ + precedes stomatal closure*.
- Meyerowitz, E. M. (2003). ARABIDOPSIS THALIANA. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Ge.21.120187.000521>, 21, 93–111.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GE.21.120187.000521>
- Michaelis, P., & Bennett, V. (1992). The ANK repeat: a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition. *Trends in Cell Biology*, 2(5), 127–129.
[https://doi.org/10.1016/0962-8924\(92\)90084-Z](https://doi.org/10.1016/0962-8924(92)90084-Z)
- Michard, E., Dreyer, I., Lacombe, B., Sentenac, H., & Thibaud, J. B. (2005). Inward rectification of the AKT2 channel abolished by voltage-dependent phosphorylation. *Plant Journal*, 44(5), 783–797.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02566.x>

- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., Mccaffery, J. M., Adams, J. A., Ikurak, M., & Tsien, R. Y. (1997). *Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin*.
- Mogami, J., Fujita, Y., Yoshida, T., Tsukiori, Y., Nakagami, H., Nomura, Y., Fujiwara, T., Nishida, S., Yanagisawa, S., Ishida, T., Takahashi, F., Morimoto, K., Kidokoro, S., Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Two Distinct Families of Protein Kinases Are Required for Plant Growth under High External Mg²⁺ Concentrations in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 167(3), 1039. <https://doi.org/10.1104/PP.114.249870>
- Mori, I. C., Ma, J., Murata, Y., Yang, Y., Munemasa, S., Wang, Y.-F., Andreoli, S., Tiriác, H., Alonso, J. M., Harper, J. F., Ecker, J. R., Kwak, J. M., & Schroeder, J. I. (2006). *CDPKs CPK6 and CPK3 Function in ABA Regulation of Guard Cell S-Type Anion- and Ca²⁺-Permeable Channels and Stomatal Closure*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040327>
- Mouline, K., Véry, A. A., Gaymard, F., Boucherez, J., Pilot, G., Devic, M., Bouchez, D., Thibaud, J. B., & Sentenac, H. (2002). Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in Arabidopsis. *Genes & Development*, 16(3), 339–350. <https://doi.org/10.1101/GAD.213902>
- Mumberg, D., Müller, R., & Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, 156(1), 119–122. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00037-7](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(95)00037-7)
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Murphy, A., & Taiz, L. (1997). Correlation between potassium efflux and copper sensitivity in 10 Arabidopsis ecotypes. *New Phytologist*, 136(2), 211–222. <https://doi.org/10.1046/J.1469-8137.1997.00738.X>
- Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M., Miyawaki, A., & Tsien, R. Y. (2004). *Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by*

circularly permuted yellow fluorescent proteins.

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0400417101

Newman, I. A., Kochian, L. V., Grusak, M. A., & Lucas, W. J. (1987). Fluxes of H⁺ and K⁺ in Corn Roots' CHARACTERIZATION AND STOICHIOMETRIES USING ION-SELECTIVE MICROELECTRODES. *Plant Physiol*, *84*, 1177–1184. <https://academic.oup.com/plphys/article/84/4/1177/6084765>

Ngo, Q. A., Vogler, H., Lituiev, D. S., Nestorova, A., & Grossniklaus, U. (2014). A calcium dialog mediated by the FERONIA signal transduction pathway controls plant sperm delivery. *Developmental Cell*, *29*(4), 491–500. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2014.04.008>

Nieves-Cordones, M., Al Shiblawi, F. R., & Sentenac, H. (2016). Roles and Transport of Sodium and Potassium in Plants. In *Metal Ions in Life Sciences* (Vol. 16, pp. 291–324). Walter de Gruyter GmbH. https://doi.org/10.1007/978-3-319-21756-7_9

Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Martínez, V., & Rubio, F. (2010). The *Arabidopsis thaliana* HAK5 K⁺ transporter is required for plant growth and K⁺ acquisition from low K⁺ solutions under saline conditions. *Molecular Plant*, *3*(2), 326–333. <https://doi.org/10.1093/MP/SSP102>

Nieves-Cordones, M., Andrianteranagna, M., Cuéllar, T., Chérel, I., Gibrat, R., Boeglin, M., Moreau, B., Paris, N., Verdeil, J. L., Zimmermann, S. D., & Gaillard, I. (2019). Characterization of the grapevine Shaker K⁺ channel VvK3.1 supports its function in massive potassium fluxes necessary for berry potassium loading and pulvinus-actuated leaf movements. *New Phytologist*, *222*(1), 286–300. <https://doi.org/10.1111/nph.15604>

Nieves-Cordones, M., Azeem, F., Long, Y., Boeglin, M., Duby, G., Mouline, K., Hosy, E., Vavasseur, A., Chrel, I., Simonneau, T., Gaymard, F., Leung, J., Gaillard, I., Thibaud, J. B., Vry, A. A., Boudaoud, A., & Sentenac, H. (2022). Non-autonomous stomatal control by pavement cell turgor via the K⁺ channel subunit AtKC1. *The Plant Cell*, *34*(5), 2019–2037. <https://doi.org/10.1093/PLCELL/KOAC038>

Nieves-Cordones, M., Caballero, F., Martínez, V., & Rubio, F. (2012). Disruption

- of the *Arabidopsis thaliana* inward-rectifier K⁺ channel AKT1 improves plant responses to water stress. *Plant & Cell Physiology*, 53(2), 423–432. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCR194>
- Nieves-Cordones, M., Lara, A., Silva, M., Amo, J., Rodríguez-Sepulveda, P., Rivero, R. M., Martínez, V., Botella, M. A., & Rubio, F. (2020). Root high-affinity K⁺ and Cs⁺ uptake and plant fertility in tomato plants are dependent on the activity of the high-affinity K⁺ transporter SIHAK5. *Plant, Cell & Environment*, 43(7), 1707–1721. <https://doi.org/10.1111/PCE.13769>
- Nieves-Cordones, M., Martínez-Cordero, M. A., Martínez, V., & Rubio, F. (2007). An NH₄⁺-sensitive component dominates high-affinity K⁺ uptake in tomato plants. *Plant Science*, 172(2), 273–280. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2006.09.003>
- Nieves-Cordones, M., Miller, A. J., Alemán, F., Martínez, V., & 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(6), 521–532. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9388-3>
- Nieves-Cordones, M., Mohamed, S., Tanoi, K., Kobayashi, N. I., Takagi, K., Vernet, A., Guiderdoni, E., Périn, C., Sentenac, H., & Véry, A.-A. (2017). Production of low-Cs⁺ rice plants by inactivation of the K⁺ transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 92(1), 43–56. <https://doi.org/10.1111/tpj.13632>
- Nieves-Cordones, M. N., Martínez, V., Benito, B., & Rubio, F. (2016). *Comparison between Arabidopsis and Rice for Main Pathways of K⁺ and Na⁺ Uptake by Roots*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00992>
- Nieves-Cordones, M., Ródenas, R., Chavanieu, A., Rivero, R. M., Martínez, V., Gaillard, I., & Rubio, F. (2016). Uneven HAK/KUP/KT protein diversity among angiosperms: Species distribution and perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00127>
- Nunes, M. A., Dias, M. A., Correia, M. M., & Oliveira, M. M. (1984). Further Studies on Growth and Osmoregulation of Sugar Beet Leaves under Low

- Salinity Conditions. *Journal of Experimental Botany*, 35(3), 322–331.
<https://doi.org/10.1093/JXB/35.3.322>
- Núñez-Ramírez, R., Sánchez-Barrena, M. J. O., Villalta, I., Vega, J. F., Pardo, J. M., Quintero, F. J., Martínez-Salazar, J., & Albert, A. (2012). Structural Insights on the Plant Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) Na⁺/H⁺ Antiporter. *Journal of Molecular Biology*, 424(5), 283–294.
<https://doi.org/10.1016/J.JMB.2012.09.015>
- Oliveros, J. C., Franch, M., Tabas-Madrid, D., San-León, D., Montoliu, L., Cubas, P., & Pazos, F. (2016). Breaking-Cas—interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W267–W271. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw407>
- Osakabe, Y., Arinaga, N., Umezawa, T., Katsura, S., Nagamachi, K., Tanaka, H., Ohiraki, H., Yamada, K., Seo, S. U., Abo, M., Yoshimura, E., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25(2), 609–624. <https://doi.org/10.1105/TPC.112.105700>
- Peralta, I. E., Knapp, S., Spooner, D. M., & Lammers, T. G. (2005). New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, 30(2), 424–434.
<https://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=2616&content=PDF>
- Perera, L. K. R. R., De Silva, D. L. R., & Mansfield, T. A. (1997). Avoidance of sodium accumulation by the stomatal guard cells of the halophyte *Aster tripolium*. *Journal of Experimental Botany*, 48(308), 707–711.
<https://academic.oup.com/jxb/article/48/3/707/447764>
- Pérez-Alfocea, F., Balibrea, M. E., Alarcón, J. J., & Bolarín, M. C. (2000). Composition of xylem and phloem exudates in relation to the salt-tolerance of domestic and wild tomato species. *Journal of Plant Physiology*, 156(3), 367–374. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80075-9](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80075-9)
- Pilon-Smits, E. A., Quinn, C. F., Tapken, W., Malagoli, M., & Schiavon, M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant*

- Biology*, 12(3), 267–274. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2009.04.009>
- Pilot, G., Gaymard, F., Mouline, K., Chérel, I., & Sentenac, H. (2003). Regulated expression of Arabidopsis Shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. *Plant Molecular Biology*, 51(5), 773–787. <https://doi.org/10.1023/A:1022597102282>
- Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Chérel, I., Boucherez, J., Thibaud, J. B., & Sentenac, H. (2001). Guard Cell Inward K⁺ Channel Activity in Arabidopsis Involves Expression of the Twin Channel Subunits KAT1 and KAT2. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3215–3221. <https://doi.org/10.1074/JBC.M007303200>
- Pilot, G., Pratelli, R., Gaymard, F., Meyer, Y., & Sentenac, H. (2003). Five-Group Distribution of the Shaker-like K⁺ Channel Family in Higher Plants. *Journal of Molecular Evolution*, 56(4), 418–434. <https://doi.org/10.1007/s00239-002-2413-2>
- Platten, J. D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R. J., Fairbairn, D. J., Horie, T., Leigh, R. A., Lin, H. X., Luan, S., Mäser, P., Pantoja, O., Rodríguez-Navarro, A., Schachtman, D. P., Schroeder, J. I., Sentenac, H., Uozumi, N., Véry, A. A., Zhu, J. K., ... Tester, M. (2006). Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends in Plant Science*, 11(8), 372–374. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.06.001>
- Pujos, A., & Morard, P. (1997). Effects of potassium deficiency on tomato growth and mineral nutrition at the early production stage. In *Plant and Soil* (Vol. 189). Kluwer Academic Publishers.
- Pyo, Y. J., Gierth, M., Schroeder, J. I., & Cho, M. H. (2010). High-Affinity K⁺ Transport in Arabidopsis: AtHAK5 and AKT1 Are Vital for Seedling Establishment and Postgermination Growth under Low-Potassium Conditions 1[C][W][OA]. <https://doi.org/10.1104/pp.110.154369>
- Qadir, M., Schubert, S., Oster, J. D., Sposito, G., Minhas, P. S., Cheraghi, S. A. M., Murtaza, G., Mirzabaev, A., & Saqib, M. (2018). High-magnesium waters and soils: Emerging environmental and food security constraints. *Science of*

- the Total Environment*, 642, 1108–1117.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.090>
- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S., & Zhu, J.-K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na H exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *PNAS*, 99(12), 8436–8441.
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.122224699
- Ragel, P., Ródenas, R., García-Martín, E., Andrés, Z., Villalta, I., Nieves-Cordones, M., Rivero, R. M., Martínez, V., Pardo, J. M., Quintero, F. J., & Rubio, F. (2015). The CBL-interacting protein kinase CIPK23 regulates HAK5-mediated high-affinity K⁺ uptake in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*, 169(4), 2863–2873. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01401>
- Raghavendra, A. S., Rao, I. M., & Das, V. S. R. (1976). Replacibility of Potassium by Sodium for Stomatal Opening in Epidermal Strips of *Commelina benghalensis*. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 80(1), 36–42.
[https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(76\)80048-7](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(76)80048-7)
- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K., & Hedrich, R. (2002). AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel α -subunit modulates root hair K⁺ influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 4079–4084.
<https://doi.org/10.1073/pnas.052677799>
- Rengel, Z., & Damon, P. M. (2008). *Crops and genotypes differ in efficiency of potassium uptake and use*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01079.x>
- Rigas, S., Debrosses, G., Haralampidis, K., Vicente-Agullo, F., Feldmann, K. A., Grabov, A., Dolan, L., & Hatzopoulos, P. (2001). TRH1 Encodes a Potassium Transporter Required for Tip Growth in *Arabidopsis* Root Hairs. *The Plant Cell*, 13, 139–151. www.plantcell.org
- Roberts, S. K. (1998). Regulation of K⁺ Channels in Maize Roots by Water Stress and Abscisic Acid. *Plant Physiology*, 116(1), 145. [/pmc/articles/PMC35152/](http://pmc/articles/PMC35152/)
- Roberts, S. K., & Snowman, B. N. (2000). The effects of ABA on channel-mediated K⁽⁺⁾ transport across higher plant roots. *Journal of Experimental*

- Botany*, 51(350), 1585–1594. <https://doi.org/10.1093/JEXBOT/51.350.1585>
- Ródenas, R., Ragel, P., Nieves-Cordones, M., Martínez-Martínez, A., Amo, J., Lara, A., Martínez, V., Quintero, F. J., Pardo, J. M., & Rubio, F. (2021). Insights into the Mechanisms of Transport and Regulation of the Arabidopsis High-affinity K⁺ Transporter HAK5. *Plant Physiology*, 1860–1874. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab028>
- Rodríguez-Navarro, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1469(1), 1–30. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(99\)00013-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(99)00013-1)
- Rodríguez-Navarro, A., & Benito, B. (2010). Sodium or potassium efflux ATPase: A fungal, bryophyte, and protozoal ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1798(10), 1841–1853. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2010.07.009>
- Rodríguez-Navarro, A., & Ramos, J. (1984). Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 159(3), 940–945. <https://doi.org/10.1128/JB.159.3.940-945.1984>
- Rodríguez-Navarro, A., & Rubio, F. (2006). *High-affinity potassium and sodium transport systems in plants*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj068>
- Ron, M., Kajala, K., Pauluzzi, G., Wang, D., Reynoso, M. A., Zumstein, K., Garcha, J., Winte, S., Masson, H., Inagaki, S., Federici, F., Sinha, N., Deal, R. B., Bailey-Serres, J., & Brady, S. M. (2014). Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model. *Plant Physiology*, 166(2), 455–469. <https://doi.org/10.1104/pp.114.239392>
- Rubartelli, A., & Lotze, M. T. (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in Immunology*, 28(10), 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.08.004>
- Rubio, F., Alemán, F., Nieves-Cordones, M., & Martínez, V. (2010). Studies on Arabidopsis *athak5*, *atakt1* double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K⁺ uptake. *Physiologia Plantarum*, 139(2), 220–228.

<https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.2010.01354.X>

Rubio, F., Fon, M., Ródenas, R., Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Rivero, R. M., & Martínez, V. (2014). A low K⁺ signal is required for functional high-affinity K⁺ uptake through HAK5 transporters. *Physiologia Plantarum*, *152*(3), 558–570. <https://doi.org/10.1111/ppl.12205>

Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Alemán, F., & Martínez, V. (2008). Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiologia Plantarum*, *134*(4), 598–608. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01168.x>

Saito, S., & Uozumi, N. (2020). *Calcium-Regulated Phosphorylation Systems Controlling Uptake and Balance of Plant Nutrients*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00044>

Santa-María, G. E., Oliferuk, S., & Moriconi, J. I. (2018). KT-HAK-KUP transporters in major terrestrial photosynthetic organisms: A twenty years tale. *Journal of Plant Physiology*, *226*(October 2017), 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.04.008>

Scherzer, S., Böhm, J., Krol, E., Shabala, L., Kreuzer, I., Larisch, C., Bemm, F., Al-Rasheid, K. A. S., Shabala, S., Rennenberg, H., Neher, E., & Hedrich, R. (2015). Calcium sensor kinase activates potassium uptake systems in gland cells of Venus flytraps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(23), 7309–7314. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507810112>

Schimpl, S., Fauser, F., & Puchta, H. (2016). Chapter 8 CRISPR/Cas-Mediated Site-Specific Mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* Using Cas9 Nucleases and Paired Nickases. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4931-1_8

Shabala, S. (2017). Signalling by potassium: another second messenger to add to the list? *Journal of Experimental Botany*, *68*(15), 4003–4007. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERX238>

Shabala, S., & Pottosin, I. (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance.

- Physiologia Plantarum*, 151(3), 257–279. <https://doi.org/10.1111/PPL.12165>
- Shaul, O. (2002). Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *BioMetals*, 15, 309–323.
- Shen, Y., Shen, L., Shen, Z., Jing, W., Ge, H., Zhao, J., & Zhang, W. (2015). The potassium transporter OsHAK21 functions in the maintenance of ion homeostasis and tolerance to salt stress in rice. *Plant Cell and Environment*, 38(12), 2766–2779. <https://doi.org/10.1111/PCE.12586>
- Sherman, F. (1991). Getting Started with Yeast. *Methods in Enzymology*, 194(C), 3–21. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)94004-V](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94004-V)
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., & Zhu, J.-K. (2000). *The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na H antiporter.* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.120170197
- Shimomura, O., JOHNSON, F. H., & SAIGA, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59, 223–239. <https://doi.org/10.1002/JCP.1030590302>
- Shou, C., Bhardwaj, N., Lam, H. Y. K., Yan, K. K., Kim, P. M., Snyder, M., & Gerstein, M. B. (2011). Measuring the Evolutionary Rewiring of Biological Networks. *PLoS Computational Biology*, 7(1), 1001050. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1001050>
- Smith, G. S., & Middleton, K. R. (1978). New Zealand Journal of Experimental Agriculture Sodium and potassium content of topdressed pastures in New Zealand in relation to plant and animal nutrition Sodium and potassium content of topdressed pastures in New Zealand in relation to plant and animal nutrition. *Journal of Experimental Agriculture*, 6, 217–242. <https://doi.org/10.1080/03015521.1978.10426046>
- Subbarao, G. V, Ito, O., Berry, W. L., Wheeler, R. M., & Pessaraki, M. (2003). Critical Reviews in Plant Sciences Sodium-A Functional Plant Nutrient Sodium-A Functional Plant Nutrient *. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(5), 363–384. <https://doi.org/10.1080/07352680390243495>

- Sung, C. L., Lan, W. Z., Kim, B. G., Li, L., Yong, H. C., Pandey, G. K., Lu, G., Buchanan, B. B., & Luan, S. (2007). A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(40), 15959–15964. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707912104>
- Taleisnik, E., & Grunberg, K. (1994). Ion balance in tomato cultivars differing in salt tolerance. I. Sodium and potassium accumulation and fluxes under moderate salinity. *Physiologia Plantarum*, *92*(3), 528–534. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1994.TB08847.X>
- Tanaka, K., Choi, J., Cao, Y., & Stacey, G. (2014). Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Frontiers in Plant Science*, *5*(SEP), 446. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00446/BIBTEX>
- Tang, R J, Zhao, F. G., Yang, Y., Wang, C., Li, K., Kleist, T. J., Lemaux, P. G., & Luan, S. (2020). A calcium signalling network activates vacuolar K(+) remobilization to enable plant adaptation to low-K environments. *Nat Plants*. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0621-7>
- Tang, Ren Jie, Wang, C., Li, K., & Luan, S. (2020). The CBL–CIPK Calcium Signaling Network: Unified Paradigm from 20 Years of Discoveries. *Trends in Plant Science*, *25*(6), 604–617. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2020.01.009>
- Tang, Ren Jie, Zhao, F. G., Garcia, V. J., Kleist, T. J., Yang, L., Zhang, H. X., & Luan, S. (2015). Tonoplast CBL-CIPK calcium signaling network regulates magnesium homeostasis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(10), 3134–3139. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420944112>
- Tester, M., & Blatt, M. R. (1989). Direct Measurement of K⁺ Channels in Thylakoid Membranes by Incorporation of Vesicles into Planar Lipid Bilayers. *Plant Physiology*, *91*(1), 249–252. <https://doi.org/10.1104/PP.91.1.249>
- Thorne, S. J., & M Maathuis, F. J. (2022). *Reducing potassium deficiency by*

- using sodium fertilisation*. 2, 45. <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00070-1>
- Tomato Genome Consortium, T., DNA Research Institute, K., Sciences, L., company, R., Express Inc, A., Academy of Agriculture, B., Sciences, F., SrL, B.-G., Thompson Institute for Plant Research, B., for BioSystems Genomics, C., Nacional de Análisis Genómico, C., Agricultural University, C., Academy of Agricultural Sciences, C., Academy of Sciences, C., Spring Harbor Laboratory, C., States Department of Agriculture - Agricultural Research Service, U., State University, C., University, C., Bioinformatics Laboratory GRIB-IMIM, G., ... SrL, Y. (2012). *The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution*. <https://doi.org/10.1038/nature11119>
- Tripathi, D., Zhang, T., Koo, A. J., Stacey, G., & Tanaka, K. (2018). Extracellular ATP Acts on Jasmonate Signaling to Reinforce Plant Defense. *Plant Physiology*, 176(1), 511. <https://doi.org/10.1104/PP.17.01477>
- Tsien, R. Y. (1980). New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity Against Magnesium and Protons: Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structures. *Biochemistry*, 19(11), 2396–2404. https://doi.org/10.1021/BI00552A018/ASSET/BI00552A018.FP.PNG_V03
- Véry, A.-A., Nieves-Cordones, M., Daly, M., Khan, I., Fizames, C., & Sentenac, H. (2014). Molecular biology of K⁺ transport across the plant cell membrane: What do we learn from comparison between plant species? *Journal of Plant Physiology*, 171(9), 748–769. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2014.01.011>
- Vicente-Agullo, F., Rigas, S., Desbrosses, G., Dolan, L., Hatzopoulos, P., & Grabov, A. (2004). *Potassium carrier TRH1 is required for auxin transport in Arabidopsis roots*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02230.x>
- Villette, J., Cuéllar, T., Zimmermann, S. D., Verdeil, J. L., & Gaillard, I. (2019). Unique features of the grapevine VvK5.1 channel support novel functions for outward K⁺ channels in plants. *Journal of Experimental Botany*, 70(21), 6181. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERZ341>
- Waadt, R., Schmidt, L. K., Lohse, M., Hashimoto, K., Bock, R., & Kudla, J. (2008). Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous

- formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *Plant Journal*, *56*(3), 505–516. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2008.03612.X>
- Wakeel, A., Farooq, M., Qadir, M., & Schubert, S. (2011). Potassium Substitution by Sodium in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *30*, 401–413. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.587728>
- Wakeel, A., Steffens, D., & Schubert, S. (2010). Potassium substitution by sodium in sugar beet (*Beta vulgaris*) nutrition on K-fixing soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *173*(1), 127–134. <https://doi.org/10.1002/JPLN.200900270>
- Wang, F. L., Tan, Y. L., Wallrad, L., Du, X. Q., Eickelkamp, A., Wang, Z. F., He, G. F., Rehms, F., Li, Z., Han, J. P., Schmitz-Thom, I., Wu, W. H., Kudla, J., & Wang, Y. (2021). A potassium-sensing niche in Arabidopsis roots orchestrates signaling and adaptation responses to maintain nutrient homeostasis. *Developmental Cell*, *56*(6), 781-794.e6. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2021.02.027>
- Wang, F., Shi, Z., Biswas, A., Yang, S., & Ding, J. (2020). Multi-algorithm comparison for predicting soil salinity. *Geoderma*, *365*. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2020.114211>
- Wang, F., Yang, S., Wei, Y., Shi, Q., & Ding, J. (2021). Characterizing soil salinity at multiple depth using electromagnetic induction and remote sensing data with random forests: A case study in Tarim River Basin of southern Xinjiang, China. *Science of the Total Environment*, *754*. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.142030>
- Wang, L., Ning, Y., Sun, J., Wilkins, K. A., Matthus, E., McNelly, R. E., Dark, A., Rubio, L., Moeder, W., Yoshioka, K., Véry, A. A., Stacey, G., Leblanc-Fournier, N., Legué, V., Moulia, B., & Davies, J. M. (2022). Arabidopsis thaliana CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL2 mediates extracellular ATP signal transduction in root epidermis. *New Phytologist*, *234*(2), 412–421. <https://doi.org/10.1111/NPH.17987>
- Wang, Y.-H., Garvin, D. F., & 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 1.* <https://doi.org/10.1104/pp.008854>
- Wang, Y., He, L., Li, H. D., Xu, J., & Wu, W. H. (2010). Potassium channel α -subunit AtKC1 negatively regulates AKT1-mediated K⁺ uptake in Arabidopsis roots under low-K⁺ stress. *Cell Research*, 20(7), 826–837. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.74>
- Wang, Z., Hong, Y., Zhu, G., Li, Y., Niu, Q., Yao, J., Hua, K., Bai, J., Zhu, Y., Shi, H., Huang, S., & Zhu, J. (2020). Loss of salt tolerance during tomato domestication conferred by variation in a Na⁺ /K⁺ transporter . *The EMBO Journal*, 39(10). <https://doi.org/10.15252/emboj.2019103256>
- White, P. J. (2012). Chapter 3 - Long-distance Transport in the Xylem and Phloem. In P. Marschner (Ed.), *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition)* (Third Edit, pp. 49–70). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00003-0>
- Wilkinson, S., Corlett, J. E., Oger, L., & Davies, W. J. (1998). *Rapid Communication Effects of Xylem pH on Transpiration from Wild-Type and flacca Tomato Leaves 1 A Vital Role for Abscisic Acid in Preventing Excessive Water Loss Even from Well-Watered Plants.* <https://academic.oup.com/plphys/article/117/2/703/6085760>
- Xicluna, J., Lacombe, B., Dreyer, I., Alcon, C., Jeanguenin, L., Sentenac, H., Thibaud, J. B., & Chérel, I. (2007). Increased functional diversity of plant K⁺ channels by preferential heteromerization of the Shaker-like subunits AKT2 and KAT2. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 486–494. <https://doi.org/10.1074/JBC.M607607200>
- Xu, J., Li, H. D., Chen, L. Q., Wang, Y., Liu, L. L., He, L., & Wu, W. H. (2006). A Protein Kinase, Interacting with Two Calcineurin B-like Proteins, Regulates K⁺ Transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell*, 125(7), 1347–1360. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.06.011>
- Zhang, Mei-Ling, Huang, P., Ji, Y., Wang, S., Wang, S., Li, Z., Guo, Y., Ding, Z., Wu, W., & Wang, Y. (2020). KUP 9 maintains root meristem activity by regulating K⁺ and auxin homeostasis in response to low K⁺ . *EMBO Reports*,

21(6). <https://doi.org/10.15252/EMBR.202050164>

Zhang, Ming, Liang, X., Wang, L., Cao, Y., Song, W., Shi, J., Lai, J., & Jiang, C. (2019). A HAK family Na⁺ transporter confers natural variation of salt tolerance in maize. *Nature Plants*, 5(12), 1297–1308. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0565-y>

Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang, Y.-F., Nakano, M., Abdelfattah, A. S., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T., & Campbell, R. E. (2011). An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca²⁺ Indicators. *Science*, 333(6051), 1888–1891. <https://doi.org/10.1126/science.1208592>

Zitnik, M., Sosič, R., Feldman, M. W., & Leskovec, J. (2019). Evolution of resilience in protein interactomes across the tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(10), 4426–4433. https://doi.org/10.1073/PNAS.1818013116/SUPPL_FILE/PNAS.1818013116.SAPP.PDF

Zouine, M., Maza, E., Djari, A., Lauvernier, M., Frasse, P., Smouni, A., Pirrello, J., & Bouzayen, M. (2017). TomExpress, a unified tomato RNA-Seq platform for visualization of expression data, clustering and correlation networks. *Plant Journal*, 92(4), 727–735. <https://doi.org/10.1111/TPJ.13711>