



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

SISTEMAS DE TRANSPORTE DE  $K^+$  DE BAJA  
AFINIDAD EN *Arabidopsis thaliana* L.  
ABSORCIÓN DE  $K^+$  POR LA RAÍZ  
Y PAPEL DE AKT1 EN LA TRANSPIRACIÓN

Fernando Caballero Castillo

2012



# Sistemas de transporte de $K^+$ de baja afinidad en *Arabidopsis thaliana* L. Absorción de $K^+$ por la raíz y papel de AKT1 en la transpiración

Memoria presentada para aspirar al grado de  
Doctor por la Universidad de Murcia

Fernando Caballero Castillo

2012

## **Directores de la Tesis:**

Francisco Rubio Muñoz  
Investigador Científico CEBAS-CSIC

M Angeles Botella Marrero  
Profesora Titular Universidad Miguel Hernández de Elche

## **Tutor:**

José Antonio Teruel Puche  
Profesor Titular Universidad de Murcia

# Índice



---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
1.1. Nutrición mineral de las plantas y fertilización de los cultivos .....	3
1.2. El K <sup>+</sup> en la agricultura .....	4
1.3. Funciones del K <sup>+</sup> en las plantas.....	7
1.3.1. Deficiencia de K <sup>+</sup> .....	10
1.4. Absorción y transporte de K <sup>+</sup> .....	12
1.5. Caracterización molecular de la absorción de K <sup>+</sup> .....	16
1.5.1. Canales de K <sup>+</sup> .....	16
1.5.2. Transportadores de K <sup>+</sup> .....	19
1.6. Relevancia fisiológica de AtHAK5, AtAKT1 y otros sistemas en la absorción de K <sup>+</sup> .....	25
1.7. Papel de los canales de K <sup>+</sup> en la apertura y cierre de los estomas.....	32
1.7.1. Canales de K <sup>+</sup> presentes en las células oclusivas. ....	33
1.7.2. Apertura y cierre estomáticos en condiciones de estrés hídrico... 35	
1.8. Salinidad.....	40
1.8.1. Relación K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> como factor clave en la tolerancia.....	42
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
2.1. Objetivos .....	47
2.2. Plan de trabajo.....	49
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
3.1. Material vegetal .....	53
3.2. Reactivos químicos .....	53
3.3. Sistemas de cultivo y condiciones de crecimiento. ....	54
3.4. Papel de AtAKT1 frente al estrés hídrico .....	57

3.4.1.	Pérdida de agua en las rosetas .....	57
3.4.2.	Crecimiento con PEG .....	58
3.4.3.	Ensayos de apertura estomática .....	59
3.4.4.	Crecimiento en macetas con suelo.....	60
3.5.	Estudio de los sistemas de absorción de K <sup>+</sup> de baja afinidad. ....	61
3.5.1.	Estudio farmacológico de la entrada de K <sup>+</sup> . Experimentos de absorción por desaparición en el medio. ....	61
3.5.2.	Estudios de crecimiento y absorción de K <sup>+</sup> a largo plazo. Efecto del Ca <sup>2+</sup> , del Cs <sup>+</sup> , y del Na <sup>+</sup> . ....	64
3.6.	Técnicas Analíticas.....	70
3.6.1.	Estudio de la expresión genética mediante PCR semicuantitativa	70
3.6.2.	Estudio del potencial de membrana.....	73
3.6.3.	Análisis del contenido mineral interno de las plantas.....	74
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
4.1.	Papel de AtAKT1 en la regulación de la transpiración .....	77
4.1.1.	Pérdida de agua en rosetas cortadas .....	77
4.1.2.	Respuesta al estrés hídrico en plantas bajo cultivo hidropónico ...	78
4.1.3.	Respuesta al estrés hídrico en plantas cultivadas en suelo .....	86
4.1.4.	Respuesta de los estomas a la aplicación de ABA.....	88
4.1.5.	Discusión .....	91
4.2.	Entrada de K <sup>+</sup> de baja afinidad en plantas <i>athak5, atakt1 (2M)</i> .....	99
4.2.1.	Estudio farmacológico de la entrada de K <sup>+</sup> .....	99
4.2.2.	Determinación de los potenciales eléctricos de la membrana plasmática en células de raíz .....	105
4.2.3.	Respuesta de las plantas a altas concentraciones de Ca <sup>2+</sup> y Cs <sup>+</sup> en experimentos a largo plazo .....	106

4.2.4. Respuesta de las plantas a altas concentraciones de Na <sup>+</sup> en experimentos a largo plazo .....	120
4.2.5. Efecto de cAMP sobre la absorción de K <sup>+</sup> .....	128
4.2.6. Expresión de los genes CNGC3, CNGC10, CNGC13, CHX13 y GRL2.2 .....	131
4.2.7. Discusión .....	133
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>147</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>151</b>





# 1. Introducción



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Nutrición mineral de las plantas y fertilización de los cultivos

Además de oxígeno, dióxido de carbono y agua, las plantas requieren al menos 14 elementos minerales para una nutrición adecuada. Son los denominados elementos esenciales (Marschner, 1995; Mengel y col., 2001). La deficiencia de alguno de ellos reduce el crecimiento de la planta y el rendimiento en las cosechas. Las plantas generalmente adquieren los minerales de la solución del suelo. Algunos elementos minerales se requieren en mayores cantidades, son los denominados macronutrientes: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), mientras que otros, los denominados micronutrientes, se requieren en cantidades más pequeñas: cloro (Cl), boro (B), hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), níquel (Ni) y molibdeno (Mo).

Existen áreas geográficas con baja disponibilidad de estos elementos minerales esenciales, por lo que han de ser suplidos mediante el aporte de fertilizantes para obtener una mayor producción en las cosechas, si bien hay que tener en cuenta que el uso de fertilizantes en la agricultura también puede contribuir a la contaminación del medio ambiente. El aumento de la demanda de estos elementos minerales esenciales debido al continuo crecimiento de la población mundial, así como la expansión de la agricultura a zonas menos productivas, ha aumentado el coste de los fertilizantes y disminuido el uso eficiente de los mismos (Rengel y Damon, 2008).

Independientemente de los efectos beneficiosos de la aplicación de estos fertilizantes, los costes económico y medioambientales de su aplicación (Galloway y col., 2008; Ju y col., 2009) hacen necesario optimizar la eficiencia en su uso. Esto se puede conseguir a través de una mejora en las prácticas de la gestión de los fertilizantes y/o genéticamente, usando cultivos que adquieran y/o utilicen los elementos minerales de una forma más eficaz (Hirel y col., 2007; Ju y col., 2009; Rengel y Damon, 2008).

Los fertilizantes inorgánicos nitrogenados son producidos generalmente a partir de nitrógeno gaseoso mediante el proceso de Haber-Bosch; la mayoría de los fertilizantes inorgánicos relacionados con el fósforo son producidos a partir de rocas fosfatadas usando

ácido sulfúrico, y los potásicos son obtenidos a partir de minerales de origen marino (Laegreid, 1999). Algunos estudios indican que las reservas de rocas sulfatadas y fosfatadas susceptibles de ser aprovechadas se están usando tan rápido que pueden verse agotadas en los próximos 25 – 100 años (Kesler y Wilkinson, 2007). La fluctuación en los costes de la energía y de la materia prima causa aumentos drásticos e incertidumbre en los costes de los fertilizantes usados en la agricultura, con impactos muy negativos en la sostenibilidad de la misma. Además, la síntesis de fertilizantes nitrogenados contribuye significativamente a la producción de gases de efecto invernadero, siendo estos fertilizantes la principal fuente de emisión de los mismos en la agricultura (Galloway y col., 2008; Smith y col., 2008). El uso de fertilizantes nitrogenados y fosfatados en la agricultura contribuye en gran medida a los procesos de eutrofización en aguas tanto en los países desarrollados como en aquellos que se encuentran en vías de desarrollo (Conley y col., 2009; White y Hammond, 2009).

De forma global, la materia vegetal que se recoge en los cultivos contiene 75, 14 y 60 millones de toneladas de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) respectivamente. Mientras que la aplicación de N y P se encuentra en niveles muy similares a los que son retirados del suelo por los cultivos (80 y 14 millones de toneladas respectivamente), el  $K^+$  se aplica a un nivel bastante inferior, reponiendo solo el 35% del  $K^+$  retirado (Römheld y Kirkby, 2010), valores que pueden llegar a ser mucho menores en países en vías de desarrollo.

## **1.2. El $K^+$ en la agricultura**

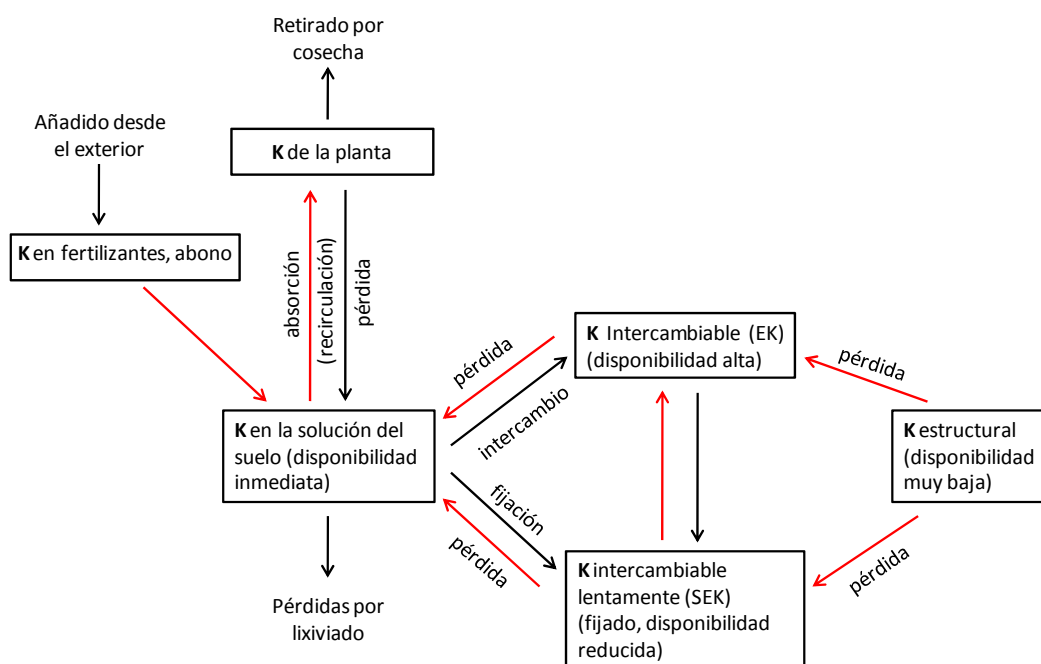
El consumo global de  $K^+$  aumentó de media un 4.4% por año en el periodo 1999-2005 (IFA 2005). Tomando como ejemplo el arroz (4-8 t ha<sup>-1</sup> de grano suponen la retirada de 56-112 kg de  $K^+$  del suelo (Yang y col., 2004)), se estima que la demanda anual de  $K^+$  que se necesitará en el año 2025 ascenderá a 9-15 Mt, o lo que es lo mismo, aproximadamente 1.7 veces el requerimiento de  $K^+$  de 1990 (Dobermann y col., 1998). Aunque las reservas globales de  $K^+$  parece que son suficientes para cientos o incluso miles de años de agricultura (Sheldrick y col., 1985), la rentabilidad de la producción agrícola en suelos marginales o en condiciones de

estrés biótico y abiótico dependerá, cada vez más, de una mejora en el uso eficiente del  $K^+$  y de los otros nutrientes (Rengel y Damon, 2008).

Un ejemplo de esta demanda de  $K^+$  lo tenemos en el continente asiático. Actualmente, alrededor de un cuarto de los suelos cultivables y tres cuartas partes de los arrozales en China son deficientes en  $K^+$  para el cultivo del arroz (Yang y col., 2004). Experimentos a largo plazo realizados en cinco países asiáticos indicaron un balance negativo de  $K^+$  en cultivos de arroz. Por ejemplo, en el delta del río Mekong, en Vietnam, estos balances negativos llegaban a valores de -86 Kg de  $K^+$  por hectárea y año. Otro ejemplo claro lo encontramos en el suroeste de Australia, donde la incidencia de la deficiencia de  $K^+$  en cultivos de trigo ha aumentado de forma constante, con dos tercios de los suelos cultivados avocados al agotamiento del  $K^+$  debido a la retirada continua de este elemento en el grano y la paja (Rengel y Damon, 2008).

La solución del suelo es la fuente fundamental de  $K^+$  para la absorción del mismo por parte de las raíces de la planta. Aunque esta fuente tiene un bajo contenido en este mineral, representando solo el 5% de la demanda total del cultivo, o el 0.1-0.2% del  $K^+$  total del suelo, está disponible de forma inmediata y es repuesto continuamente tanto por el  $K^+$  intercambiable (EK, del inglés exchangeable potassium,  $K^+$  de alta disponibilidad para la planta) como por el  $K^+$  intercambiable lentamente o no intercambiable (SEK, del inglés slowly exchangeable potassium,  $K^+$  de baja disponibilidad para la planta). Estas dos últimas fuentes, EK y SEK, suponen alrededor del 1–2% y del 1–10% del  $K^+$  total respectivamente, y son las principales fuentes de  $K^+$  para la absorción por parte de la planta. La fracción intercambiable (EK), esto es, el  $K^+$  retenido por las cargas negativas de las arcillas y la materia orgánica del suelo, se equilibra rápidamente con el  $K^+$  de la solución del suelo, y se considera que está inmediatamente disponible para la planta. El  $K^+$  se libera de la fracción lentamente intercambiable o no intercambiable (SEK) al erosionarse los minerales arcillosos micáceos que retienen selectivamente iones de  $K^+$  (Mengel y col., 2001). La última fuente de  $K^+$ , que soporta el 90–98% del  $K^+$  total presente en el suelo, se encuentra en la estructura de los minerales ricos en este elemento, como micas y feldespatos. Este  $K^+$  va reponiendo lentamente las otras dos fuentes de  $K^+$  (EK y SEK), como se indica en la Figura 1 (Römheld y Kirkby, 2010) (Figura 1.1).

En relación a la nutrición potásica, un término de gran interés es la **Eficiencia de  $K^+$** , definida como la capacidad de un genotipo para crecer y ofrecer un buen rendimiento en suelos con poca disponibilidad de  $K^+$ . Están implicados tanto la eficiencia en la absorción de  $K^+$  como su utilización por parte de la planta (Rengel y Damon, 2008). Otra definición bastante utilizada para este término haría referencia a la producción de materia seca por unidad de nutriente absorbido (en este caso  $K^+$ ).



**Figura 1.1. El ciclo del  $K^+$  en el suelo.** Modificado de Römheld 2010.

El desarrollo de variedades de plantas que dispongan de una capacidad de absorción de  $K^+$  incrementada podría contribuir a aumentar el uso eficiente del  $K^+$  y a reducir los efectos negativos derivados de la fertilización, que cada vez son más importantes y tienen consecuencias socioeconómicas y medioambientales (Medrano, 2004). La caracterización de los sistemas relacionados con la absorción de  $K^+$  por parte de la planta, cómo son regulados y el efecto que los estreses abióticos tienen sobre su funcionamiento, serán de gran utilidad para obtener nuevas variedades de plantas más eficientes en el uso del  $K^+$  (Fedoroff y col., 2010).

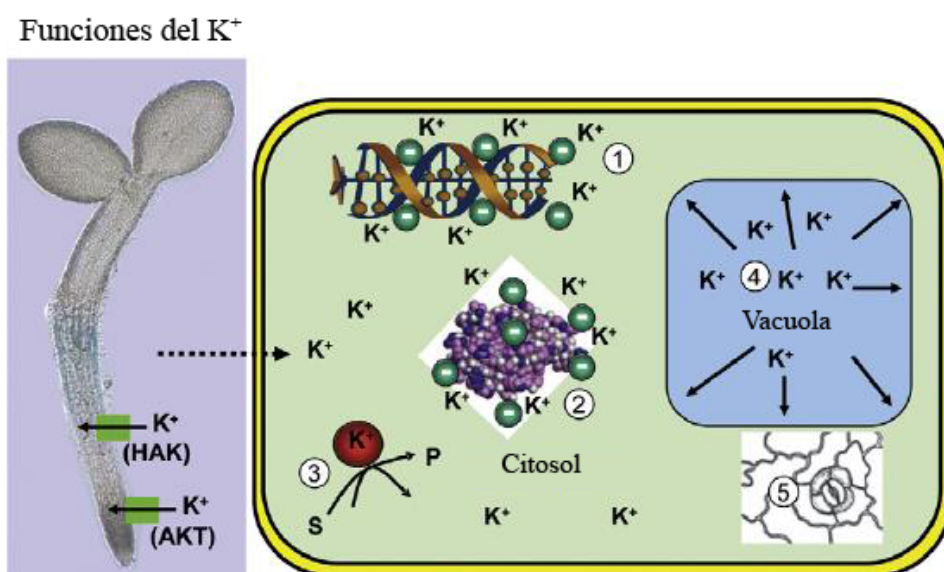
### **1.3. Funciones del $K^+$ en las plantas**

De todos los cationes presentes en el mar, donde tuvo lugar el inicio de la evolución de la vida, el  $K^+$  fue seleccionado por las células como el mayor catión de su medio interno. En este medio interno rico en  $K^+$ , la evolución de algunos procesos bioquímicos requieren al  $K^+$  como elemento regulador, mientras que en otros casos el  $K^+$  es necesario para la funcionalidad de las proteínas. Debido a que estas funciones no pueden ser realizadas por el  $Na^+$  ni por ningún otro catión, el  $K^+$  ha terminado siendo absolutamente necesario para las células vivas (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). Esta dependencia del  $K^+$  no solo engloba la evolución de la vida en el mar, donde siempre ha sido abundante. Al contrario, la aparición de las plantas terrestres en la era Cámbrica (Heckman y col., 2001; Sanderson, 2003), y su evolución desde Briofitas hasta las actuales plantas con flores (Nickrent y col., 2000; Qiu y Palmer, 1999) tuvo lugar en ambientes oligotróficos, donde el  $K^+$  se encontraba a concentraciones mucho más bajas que las marinas. Las plantas terrestres no solo mantuvieron su dependencia del  $K^+$ , sino que desarrollaron nuevas funciones para este catión (Blatt, 2000). La corteza terrestre contiene alrededor del 2,6 % de  $K^+$ . Como se ha mencionado anteriormente, las plantas deben tomar el  $K^+$  desde la solución del suelo, donde las concentraciones del mismo varían entre 0,1 mM y 1 mM de  $K^+$  (Maathuis, 2009). Esto contrasta con la concentración de  $K^+$  en el citoplasma celular que, como se ha visto, se mantiene constante en torno a un valor de 100 mM. La elevada demanda de  $K^+$  por parte de la planta ha de estar en consonancia con una eficiente absorción y traslocación a la parte aérea.

El  $K^+$  puede suponer hasta el 10% del peso seco de una planta, por lo que, como se ha mencionado anteriormente, es considerado como un macronutriente (Leigh y Jones, 1984). En cuanto a las funciones del  $K^+$  en las plantas, éste juega un papel biofísico y bioquímico fundamental. Al estar cargado positivamente y ser tan abundante, es un estabilizador de moléculas cargadas negativamente como los ácidos nucleicos y las proteínas (Figura 1.2).

El  $K^+$  muestra una alta movilidad en las plantas, traslocándose entre raíz y parte aérea por el xilema y el floema, y dentro de la parte aérea de unas hojas a otras (Karley, A. J. y White, P. J. 2009). El  $K^+$  se acumula en la vacuola, lo que permite los movimientos de la planta, tales como la apertura y cierre de los estomas, el movimiento de las hojas, y otros tropismos de las

plantas que se producen por la presión de turgor generada por el  $K^+$  (Maathuis y Sanders, 1996; Philippar y col., 1999) (Figura 1.2). La presión osmótica originada por la acumulación de  $K^+$  es también utilizada para conducir la expansión celular y de las hojas (Elumalai y col., 2002; Maathuis y Sanders, 1996; Ruan y col., 2001). El  $K^+$  también es considerado un osmolito compatible que contribuye al mantenimiento del estado hídrico de la planta, lo que es fundamental en la mayoría de estreses abióticos (Mahouachi y col., 2006).



**Figura 1.2. Funciones del  $K^+$ .** El  $K^+$  se absorbe a través de los transportadores (HAK) y canales (AKT). Dentro de la planta, las características intrínsecas del  $K^+$  lo hacen idóneo para neutralizar las cargas negativas de los ácidos nucleicos (1) y las proteínas (2). Además, El  $K^+$  activa enzimas específicas (3) actuando como cofactor en reacciones enzimáticas entre el sustrato (S) y el producto (P). Al ser el principal catión en las vacuolas (4), el  $K^+$  genera presión de turgor al arrastrar agua, para proporcionar una estructura definida y conducir la expansión celular el crecimiento de la planta y los movimientos de ésta, como la regulación de la apertura y cierre de los estomas (5). Modificado de Maathuis 2009.

El  $K^+$  es necesario para las reacciones metabólicas por su capacidad de activar numerosas enzimas (Figura 1.2). Las concentraciones más altas de  $K^+$  se encuentran en tejidos jóvenes en desarrollo y órganos reproductores, indicando su importancia en el metabolismo celular y en el crecimiento. *In vitro*, la activación enzimática se lleva a cabo a concentraciones de 50-100 mM de  $K^+$ , unos valores que están de acuerdo con los determinados en el



citoplasma celular (Britto y Kronzucker, 2008; Maathuis y Sanders, 1993; Walker y col., 1996b). La unión del  $K^+$  a las enzimas se realiza en su forma deshidratada, probablemente coordinado con 6 oxígenos que derivan de grupos carboxilo, carbonilo e hidroxilo y moléculas de agua (Maathuis, 2009). Esta unión es muy selectiva, y el  $K^+$  no puede ser sustituido por otros iones similares como el  $Na^+$  o el  $Li^+$ . De entre las enzimas que se activan por  $K^+$  encontramos varias isoformas de la pirofosfatasa (PPasa) vacuolar que acumula protones en el lumen de la vacuola. Además hay otras enzimas relacionadas con el metabolismo del carbono como la piruvato quinasa, la fosfofructoquinasa, y la ADP-glucosa almidón sintasa (Marschner, 1995) que también se activan por  $K^+$ . La síntesis de proteínas mediada por el ribosoma es otro proceso clave que requiere altas concentraciones de  $K^+$  (Maathuis y Sanders, 1994; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). Por otro lado, el aumento de  $K^+$  genera un aumento en la fotosíntesis, y una traslocación más efectiva de fotoasimilados y compuestos amino nitrogenados hacia órganos reproductores vía floema.

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

El  $K^+$  también juega un papel importante en la señalización del estrés (Römheld y Kirkby, 2010; Wang y Wu, 2010), ya que la deficiencia de  $K^+$  induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y ácido jasmónico (JA), relacionadas con la tolerancia a enfermedades y pesticidas, así como la producción de etileno y auxinas. Por todo ello, la optimización del estado nutricional de  $K^+$  es importante para reducir los efectos negativos de los distintos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos (Amtmann y col., 2008; Troufflard y col., 2010).

### 1.3.1. Deficiencia de $K^+$

En condiciones de deficiencia de  $K^+$  las raíces responden mediante dos mecanismos de adaptación. El primero consiste en la activación de los sistemas de adquisición y movilización del nutriente. El segundo se refiere a procesos del desarrollo de la raíz, lo que incluye aumento de la raíz primaria, formación de raíces laterales y elongación de los pelos radiculares (Jung y col., 2009).

La deficiencia de  $K^+$  se manifiesta inicialmente como una necrosis que se desarrolla en primer lugar en las puntas y márgenes de las hojas y entre las venas, y que posteriormente se desarrolla hacia la base de la hoja. Ya que el  $K^+$  puede ser movilizado a las hojas jóvenes, estos síntomas aparecen en primer lugar en las hojas viejas (Marschner, 1995).

La deficiencia de  $K^+$  conlleva efectos muy importantes en la fisiología de las plantas, como una expansión celular limitada o una reducción en la actividad fotosintética, lo que termina resultando en una reducción en el crecimiento y una alteración del desarrollo. Cuando el  $K^+$  externo es deficiente, su translocación desde las hojas más antiguas y desde el tallo se activa, y cuando la deficiencia de  $K^+$  es severa, estos órganos pasan a desarrollar clorosis e incluso necrosis. A niveles celulares y metabólicos también se observan efectos negativos. Se ha demostrado en cebada que condiciones limitantes de  $K^+$  dan lugar a una disminución tanto de la actividad del  $K^+$  como del pH del citosol en las células de la raíz (Walker y col., 1996a). Estas reducciones se correlacionan con un descenso en la síntesis de proteínas y la subsecuente disminución del crecimiento (Walker y col., 1998). La deficiencia de  $K^+$  conduce a una disminución de la fotosíntesis debido a una acumulación de glucosa en hojas (Deeken y col., 2002; Hermans y col., 2006; Mengel y col., 2001; White, 2010). Debido a esto, el  $K^+$  tiene un impacto importante en la calidad de los frutos (Römheld y Kirkby, 2010) y en la productividad del cultivo. Las diversas manifestaciones fisiológicas de la deficiencia de  $K^+$ , como la limitada expansión celular, la reducción de la fotosíntesis, y la alteración en la regulación de la transpiración pueden ser fácilmente explicadas por las funciones del  $K^+$  descritas anteriormente, pero en muchos casos es difícil saber cuál de estos procesos celulares dependientes de  $K^+$  es el que está afectado en particular (Amtmann y col., 2004). Además, las plantas deficientes en  $K^+$  son más susceptibles a los estreses bióticos y abióticos como sequía,

frío, salinidad o ataques fúngicos (Marschner, 1995). Los cultivos que están expuestos a estos estreses medioambientales muestran una elevada tasa de formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Cakmak, 2005), como ya se ha mencionado previamente en las funciones del  $K^+$ . La formación de estas ROS se produce principalmente durante el transporte fotosintético de electrones, así como por la activación de oxidasas NAD(P)H unidas a la membrana (Jones y col., 2000). Esta formación de ROS desencadenaría que se produjera un flujo de  $Ca^{2+}$ , que actuaría como segundo mensajero, favoreciendo la absorción de  $K^+$  a través de las raíces y participando en la regulación de la apertura y cierre de los estomas (Figura 1.3).

Hay evidencias cada vez más claras de que la optimización del estado nutricional de  $K^+$  de las plantas puede reducir esta producción de ROS, tanto mejorando el transporte fotosintético de electrones como inhibiendo las oxidasas NAD(P)H unidas a la membrana (Figura 1.3).

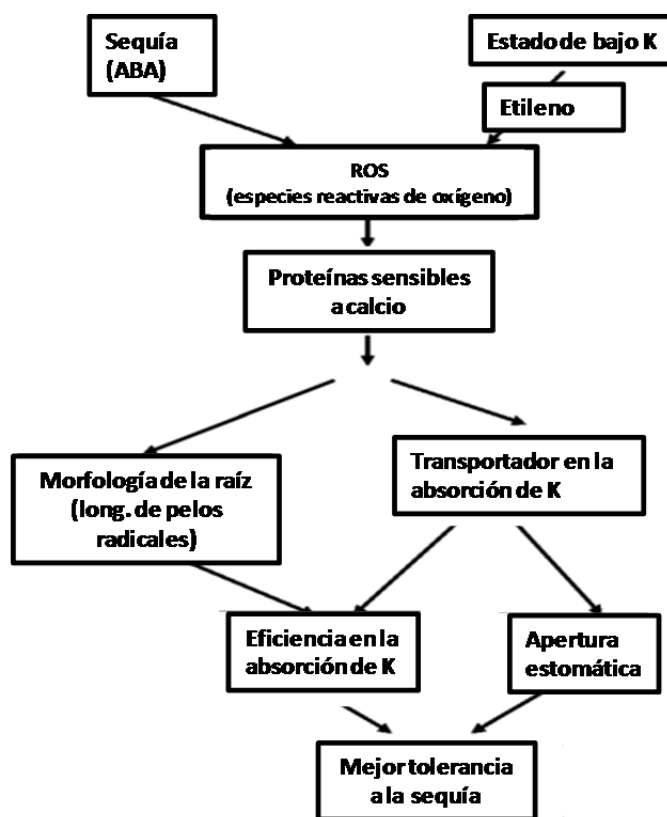
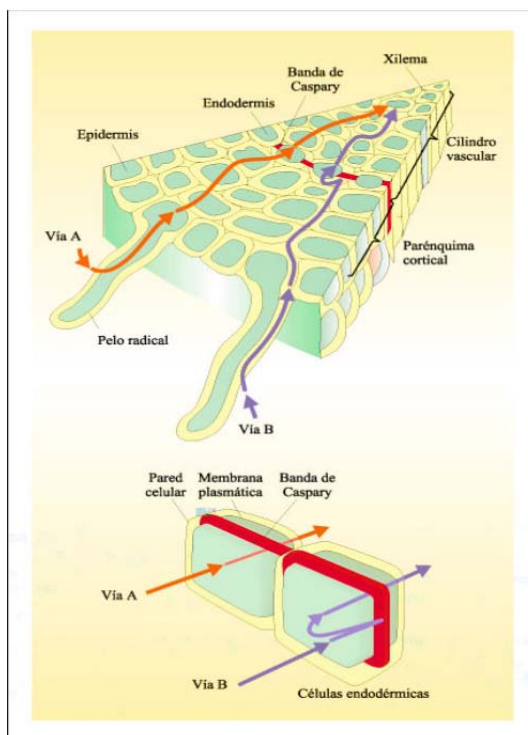


Figura 1.3. Esquema de una ruta de señalización inducida por sequía y/o un estado nutricional de bajo  $K^+$  en plantas, finalizando con una mejora en la absorción de  $K^+$  y en la tolerancia a sequía. Modificado de Römheld 2010.

#### 1.4. Absorción y transporte de $K^+$

La absorción de  $K^+$  por la raíz se produce a través de los pelos radicales, que son células epidérmicas especializadas que aumentan la superficie de contacto con la solución del suelo, así como a través de las células de la epidermis y del córtex de la raíz (Figura 1.4). Una vez que el  $K^+$  ha alcanzado la superficie de la raíz, éste ha de llegar hasta la estela donde se encuentran los vasos xilemáticos y traqueidas. Estos elementos del xilema son los encargados del transporte del  $K^+$  hacia la parte aérea, donde nuevamente tendrá que ser conducido a través de los distintos tejidos a todas las células de la planta.

Para llegar a la estela, el  $K^+$  atraviesa los tejidos de la raíz camino del xilema por dos posibles rutas paralelas (Figura 1.4): una de ellas es la denominada ruta apoplástica, que es aquella en la que el  $K^+$  circula por el espacio denominado apoplasto, que corresponde a la parte de la planta fuera de la membrana plasmática de las células vivas, es decir, la pared celular y los espacios intercelulares. Esta ruta quedaría interrumpida al llegar a la endodermis, debido a la banda de Caspary. Esta banda, que se extiende longitudinalmente alrededor de la estela y que está compuesta mayoritariamente de lignina y suberina, ejerce la función de barrera hidrofóbica impermeable en la matriz intercelular, limitando por tanto el paso de  $K^+$  vía apoplasto hasta el xilema. La otra ruta es la denominada ruta simplástica, que se denomina así porque transcurre por el simplasto, es decir, el *continuum* de los citoplasmas interconectados por plasmodesmos y excluyendo las grandes vacuolas de las células vegetales. Ya que en el camino hacia la estela la banda de Caspary impide la ruta apoplástica, la única posibilidad para que el  $K^+$  llegue a los vasos del xilema es por la vía simplástica. Esto implica que en algún punto el nutriente debe atravesar una membrana plasmática, ya sea en la rizodermis, en el parénquima cortical o, en última instancia, en la endodermis. Debido a que la bicapa lipídica es impermeable al  $K^+$ , la entrada de éste en el simplasto se produce a través de proteínas de membrana que constituyen los sistemas de transporte de  $K^+$ . Estos sistemas son el primer punto de control de la absorción de  $K^+$  y son fundamentales, por lo tanto, para la correcta nutrición de las plantas.



**Figura 1.4. Esquema de un corte transversal de una raíz que muestra las dos vías de absorción de sustancias.** Parte de los solutos y del agua que entra en la raíz siguen la vía apoplástica (B). Los solutos también pueden entrar al interior de la planta por la vía simplástica (A), y para atravesar la banda de Caspary, tanto el agua como los solutos tienen que ser transportados a través de las membranas celulares de las células endodérmicas.

Debido a que el requerimiento de  $K^+$  afecta a todas las células de un organismo, tras entrar a la planta, éste tiene que transportarse a los distintos órganos a través del xilema, atravesando para ello distintos tipos de células. Como se dijo anteriormente, en la mayoría de las células la concentración de  $K^+$  en el citoplasma es bastante similar en condiciones no estresantes, alrededor de 100 mM (Cuin y col., 2003; Walker y col., 1996a). Sin embargo, la concentración externa de  $K^+$  y los valores de pH a los que están expuestas las distintas células son muy variables (Leigh y Jones, 1984). Por ello, no es sorprendente que exista un elevado número de genes que codifiquen transportadores de  $K^+$  y canales, que permitan el transporte de  $K^+$  en distintas condiciones, tejidos y tipos de células (Maser y col., 2002; Maser y col., 2001; Very y Sentenac, 2002, 2003).

En la década de los 50 del siglo pasado, Epstein propuso considerar los sistemas de transporte de iones como enzimas y utilizar análisis cinéticos para su estudio (Epstein y Hagen, 1952). Aplicando el concepto de cinética enzimática para estudiar la absorción de  $K^+$  por la raíz de plantas de cebada y usando  $Rb^+$  como análogo al  $K^+$ , observó que la velocidad de absorción de  $K^+$  exhibía una cinética bifásica en respuesta al incremento en la concentración de  $K^+$  en el medio externo (Epstein y col., 1963) (Figura 1.5). Estos estudios pusieron de manifiesto que al menos existían dos sistemas de transporte de  $K^+$  implicados en la absorción del mismo. El primero era un sistema de *alta afinidad* que mostraba una  $K_m$  por  $K^+$  de 21  $\mu M$ , se saturaba a concentraciones de  $K^+$  en el rango micromolar, era selectivo por  $K^+$  y  $Rb^+$ , y no se veía prácticamente afectado por el  $Na^+$ . El segundo era un sistema de *baja afinidad*, que mediaba la absorción de  $K^+$  a concentraciones más altas de este catión, mostraba una  $K_m$  por  $K^+$  de 11,4 mM, era saturable y se inhibía por  $Na^+$  (Epstein y col., 1963) (Figura 1.5). Esta cinética bifásica se ha descrito posteriormente en otras especies vegetales y parece ser un modelo universal. Sin embargo algunas especies muestran diferencias en el sistema de transporte de baja afinidad. Mientras que en cebada el componente de la baja afinidad se satura a concentraciones milimolares de  $K^+$ , Kochian y Lucas en 1982 (Kochian y Lucas, 1982) encontraron que en maíz este componente era lineal.

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

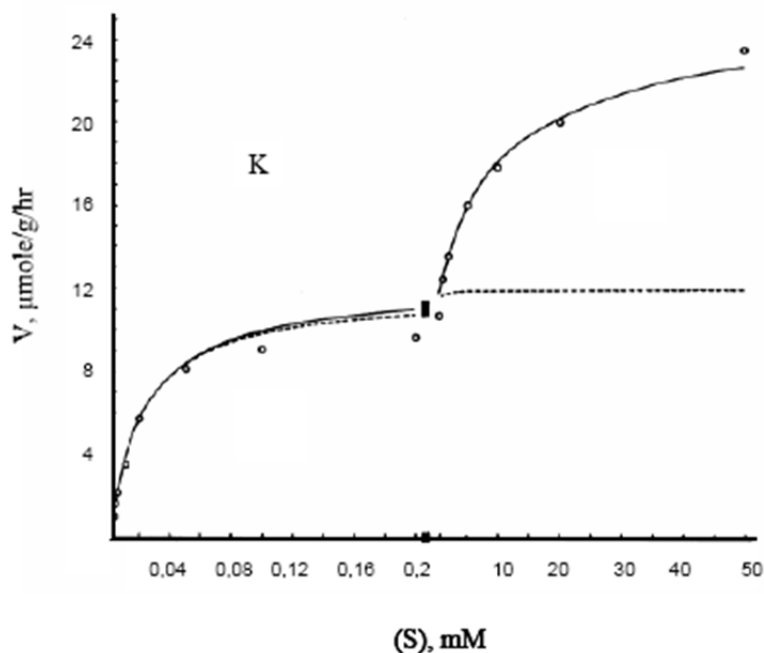


Figura 1.5. La absorción de  $K^+$  por raíces de cebada sigue una cinética bifásica, en la cual el primer componente (I) muestra una absorción en el rango micromolar denominada de alta afinidad y un segundo componente (II) con una absorción predominante en el rango de concentraciones milimolares denominada de baja afinidad. Modificado de Epstein 1963.

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

## 1.5. Caracterización molecular de la absorción de K<sup>+</sup>

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

### 1.5.1. Canales de K<sup>+</sup>

En 1992, la complementación funcional en una levadura mutada en *TRK1* con una genoteca de cDNA de *A. thaliana* permitió el aislamiento de dos cDNAs, *AKT1* y *KAT1* (Schachtman, 1992; Sentenac y col., 1992). Las proteínas deducidas de la secuencia de estos cDNAs mostraron gran homología con canales de K<sup>+</sup> de la familia *Shaker* de *Drosophila melanogaster*. La expresión en oocitos de *Xenopus laevis* demostró que *KAT1* funcionaba como un canal de K<sup>+</sup> rectificador de entrada con alta permeabilidad al K<sup>+</sup>, moderada al Rb<sup>+</sup> y baja a Cs<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup>. La expresión en células de insecto mostró que *AKT1* era también un canal de K<sup>+</sup> (Gaymard y col., 1996). Se sugirió que tanto *AKT1* como *KAT1* podrían participar en el aporte de K<sup>+</sup> a lo largo del tiempo (Gaymard y col., 1996; Schachtman, 1992) y por lo tanto eran buenos candidatos para mediar el transporte de K<sup>+</sup> de baja afinidad.

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



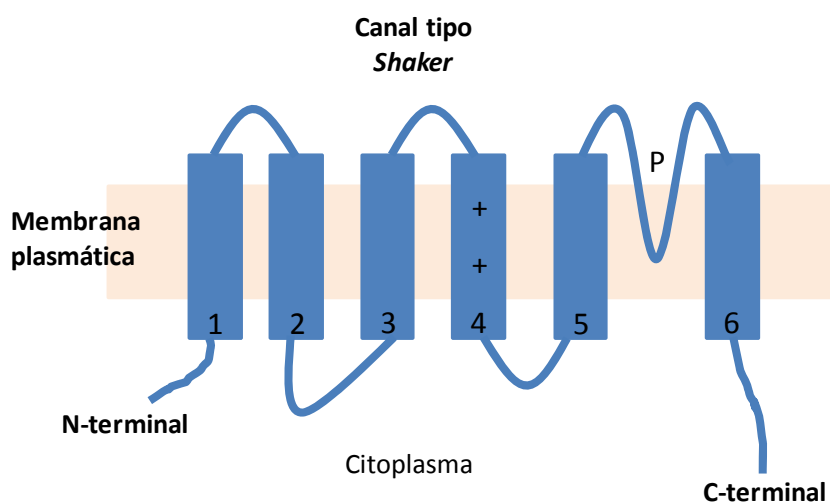
En 1998, se demostró que la pérdida de función de AKT1 en *A. thaliana* reducía el crecimiento de la planta incluso a una concentración externa de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  en el ecotipo Wassilewskija (Hirsch y col., 1998). Este estudio se llevó a cabo usando el mutante de inserción de T-DNA, *akt1-1*, y arrojó algunas dudas sobre la idea tradicional de que la absorción de  $\text{K}^+$  en el rango de la alta afinidad era llevada a cabo exclusivamente por transportadores. Las membranas plasmáticas de las células de la raíz del mutante *akt1-1* mostraron despolarizaciones de la membrana inducidas por  $\text{K}^+$  externo en el rango de 10 a 1000  $\mu\text{M}$ , menores que en las plantas silvestres. Analizando el efecto del  $\text{NH}_4^+$  externo en el transporte de  $\text{K}^+$  en el rango de alta afinidad en el mutante *akt1-1* y en plantas silvestres del ecotipo Wassilewskija, aparecieron dos componentes (Spalding y col., 1999). El primer componente, que era insensible al  $\text{NH}_4^+$  externo, estaba reducido en gran medida en el mutante *akt1-1* y se pensó que estaba mediado por AKT1. El segundo componente, que era sensible al  $\text{NH}_4^+$  externo, no fue afectado por la mutación en AKT1 y se pensó que estaba mediado por proteínas diferentes.

En Arabidopsis, el nivel de transcripción de *AKT1* es insensible a las concentraciones de  $\text{K}^+$  externo (Lagarde y col., 1996; Pilot y col., 2003), sin embargo la actividad del canal parece estar regulada por fosforilación. En condiciones de deficiencia de  $\text{K}^+$ , se registra una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  por los sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  CBL1 y CBL9 (proteínas similares a la Calcineurina-B, del inglés, Calcineurin-B LikeProteins) que activan la proteína quinasa CIPK23 (Proteína quinasa de interacción con CBLs, del inglés, CBL-Interactin Protein Kinase). Ésta fosforila a AKT1 e incrementa la absorción de  $\text{K}^+$  a través de este canal (Cheong y col., 2007; Li y col., 2006; Luan y col., 2009; Xu y col., 2006).

Debido a que los canales *Shaker* funcionales están formados por tetrámeros, la actividad AKT1 podría estar regulada por su interacción con otras subunidades, generando proteínas heterotetraméricas que aumentan la diversidad de sus funciones (Lebaudy y col., 2007; Very y Sentenac, 2003). En particular, AKT1 está regulado por la subunidad reguladora AtKC1, cuyo gen está altamente expresado en raíz (Reintanz y col., 2002), y cuya expresión se ve aumentada por el ayuno de  $\text{K}^+$  (Shin y Schachtman, 2004) y por el estrés salino en la parte aérea (Pilot y col., 2003). Cuando AtKC1 se coexpresa junto a AtAKT1 en protoplastos de mesófilo de tabaco se observa un cambio en el potencial de activación hacia valores más negativos (Duby y col., 2008), permitiendo a las células regular la conductancia de su

membrana en respuesta a cambios en las concentraciones externas de  $K^+$ , y por tanto impidiendo que AKT1 medie salida de  $K^+$  (Geiger y col., 2009).

En estudios a largo plazo se ha mostrado que el tratamiento con NaCl reduce la expresión de AKT1 (Kaddour y col., 2009), mientras que en otros estudios la aplicación de NaCl en menores periodos de tiempo no tuvo efecto sobre la expresión del gen (Maathuis y col., 2003; Pilot y col., 2003). Además, se han estudiado los cambios producidos por distintas hormonas sobre la expresión de AKT1 (Pilot y col., 2003). La exposición a la citoquinina benziladenina y a la auxina sintética 2,4 D reduce los niveles de expresión de *AKT1* y de su subunidad reguladora *AtKC1*. Aún así, el estudio muestra que entre todos los genes que codifican canales de  $K^+$  de tipo Shaker, el transcrito *AKT1* es el menos sensible frente a las hormonas probadas, mientras que el canal rectificador de salida de  $K^+$  en *Arabidopsis*, *SKOR*, es el más sensible, sugiriendo que la modulación transcripcional de AKT1 no es muy importante para su regulación (Alemán y col., 2011).



**Figura 1.6. Esquema de una de las cuatro subunidades que conforman un canal Shaker de plantas, consistente en seis segmentos transmembrana, actuando el cuarto de ellos como sensor de voltaje. Entre los segmentos 5 y 6 se encuentra el poro (P), en el cual reside el filtro de especificidad frente a los distintos iones. Modificado de Very 2003.**

### 1.5.2. Transportadores de K<sup>+</sup>

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

En 1995 se describió en la levadura *Schwanniomyces occidentalis*, un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad, SoHAK1 (Bañuelos y col., 1995). Este transportador era homólogo al transportador Kup de *Escherichia coli* y fue caracterizado funcionalmente en el doble mutante *trk1<sup>-</sup>, trk2<sup>-</sup>* de *S. cerevisiae*. En este sistema heterólogo de expresión, SoHAK1 mediaba transporte de K<sup>+</sup> de alta afinidad, no discriminaba entre K<sup>+</sup> y Rb<sup>+</sup> y era capaz de concentrar el K<sup>+</sup> más de 6 órdenes de magnitud. Considerando las características cinéticas de SoHAK1 era probable que un homólogo de plantas de este transportador fuera el responsable del transporte de K<sup>+</sup> de alta afinidad de las mismas. Para comprobar esta hipótesis, se diseñaron cebadores degenerados de las regiones conservadas entre *SoHAK1* y *kup* para llevar a cabo experimentos de RT-PCR con el objetivo de encontrar un homólogo a estos transportadores en plantas. Como resultado, en 1997, se clonó un cDNA de cebada, *HvHAK1* (Santa-María y col., 1997). La traducción del cDNA mostró homología con los transportadores de K<sup>+</sup> de *E. coli* y *S. occidentalis*. La expresión en levadura de HvHAK1 demostró que era un transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidad, que no discriminaba entre K<sup>+</sup> y Rb<sup>+</sup> y que era inhibido por Na<sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. El gen *HvHAK1* se inducía de forma específica en las raíces de cebada ayunadas de K<sup>+</sup>. Recientemente se ha observado que la fosfatasa PPZ1 y las quinasas HAL4 y 5 controlan el transporte de Rb<sup>+</sup>

mediado por HvHAK1 en células de levadura (Fulgenzi y col., 2008), lo que representa un posible mecanismo de regulación postraduccional de este tipo de transportadores en plantas.

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

En el año 2000, se aisló otro cDNA de *A. thaliana*, *AtHAK5*, cuya proteína mostró gran homología con HvHAK1, y que al ser expresado en levadura exhibía un transporte de K<sup>+</sup> de alta afinidad que no discriminaba entre K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup> (Rubio y col., 2000). Mediante fusiones del promotor de *AtHAK5* al gen delator GUS se observó que el gen se expresaba en la epidermis, el córtex y la estela de raíces de plantas ayunadas de K<sup>+</sup> y mediante fusiones con GFP en la epidermis y la estela de la raíz (Gierth y col., 2005).

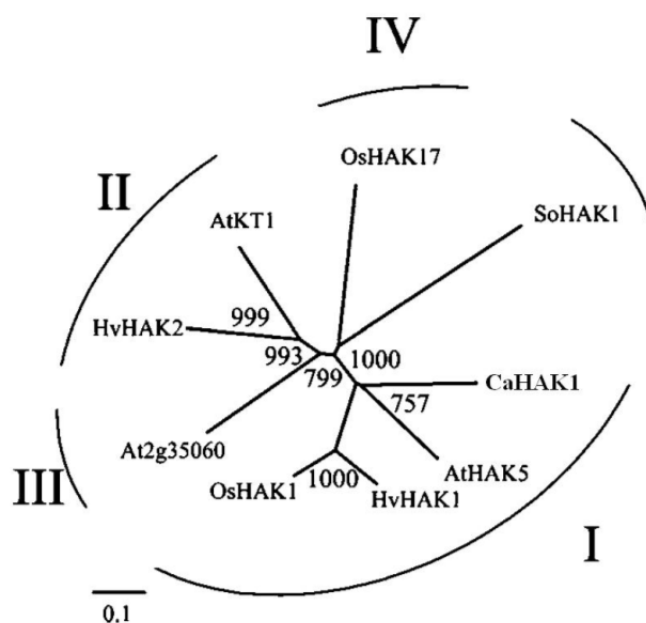
Un análisis filogenético de los diferentes miembros de la familia de transportadores de K<sup>+</sup> KT/HAK/KUP propone la existencia de 4 grupos (Figura 1.7) (Rubio y col., 2000). El grupo 1 incluye los transportadores de K<sup>+</sup> de alta afinidad como el HvHAK1 de cebada (Santa-María y col., 1997), o *AtHAK5* de *A. thaliana* (Rubio y col., 2000). El grupo 2 engloba a KT1/KUP1 (Fu y Luan, 1998; Kim y col., 1998; Quintero y Blatt, 1997) y a KT2/KUP2 de *A. thaliana* (Kim y col., 1998; Quintero y Blatt, 1997). El grupo 3 incluye secuencias genómicas de *A. thaliana* y el grupo 4 una secuencia traducida de cDNA incompleto de arroz, que fue posteriormente completado, aunque no se conoce todavía la función de los transportadores de los grupos 3 y 4.

Tras el clonaje de *AtHAK5*, se identificaron varios genes que codifican transportadores de K<sup>+</sup> de la familia KT/HAK/KUP en otras especies de plantas: 17 genes en arroz (Bañuelos y col., 2002), *GsKT1* en algodón (Ruan y col., 2001), *LeHAK5* en tomate (Nieves-Cordones y col., 2007; Nieves-Cordones y col., 2008), *CnHAK1* y *CnHAK2* en *Cymodocea nodosa* (Garcia-deblas y col., 2002), 4 genes de *Mesembrianthemum crystallinum* (Su y col., 2002), *LjKUP* en *Lotus japonica* (Desbrosses y col., 2004), *VvKUP1* y *VvKUP2* en *Vitis vinifera* (Davies y col., 2006), *AlHAK* en *Aeluropus littoralis* (Su y col., 2007), 5 genes en *Phragmites australis* (Takahashi y

col., 2007a; Takahashi y col., 2007b), *CaHAK1* en pimiento (Martínez-Cordero, M. A. y col. 2004), *NrHAK1* en *Nicotiana rustica* (Guo y col., 2008b) y 4 genes de la familia HAK en *Physcomitrella patens* (Garcia-deblas y col., 2007).

Estos transportadores parecen cumplir diferentes funciones fisiológicas. Por ejemplo, GsKT1, junto a un transportador de glucosa está implicado en la elongación de la fibra en el algodón (Ruan y col., 2001), y VvKUP1 y VvKUP2 participan en el crecimiento de los frutos de uva (Davies y col., 2006). Ambos tipos de transportadores inducen un importante influjo de agua a las células a causa de la absorción de  $K^+$ , lo que desemboca en el incremento del tamaño celular. Se le puede atribuir un papel similar a AtKT2/AtKUP2 ya que una mutación puntual en este gen provoca defectos en el desarrollo de la planta y un hipocotilo más corto (Elumalai y col., 2002).

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



**Figura 1.7. Árbol filogenético representativo de los transportadores de  $K^+$  de la familia HAK.** Están incluidos los transportadores de cebada, arroz, *Arabidopsis*, pimiento y el hongo *S. occidentalis*. Los números romanos representan los cuatro grupos filogenéticos identificados para la familia. La barra de escala representa la distancia equivalente a 10 cambios por cada 100 aminoácidos. Los valores indican el número de veces de cada 1000 árboles calculados en los que la rama se debe colocar en ese lugar. Números de acceso: CaHAK1, AY560009; AtHAK5, AF129478; HvHAK1, AF025292; OsHAK1, AJ427970; HvHAK2, AF129479; AtKT1, AF012656; OsHAK17, AJ427975; SoHAK1, U22945. Tomado de Martínez-Cordero, 2004.

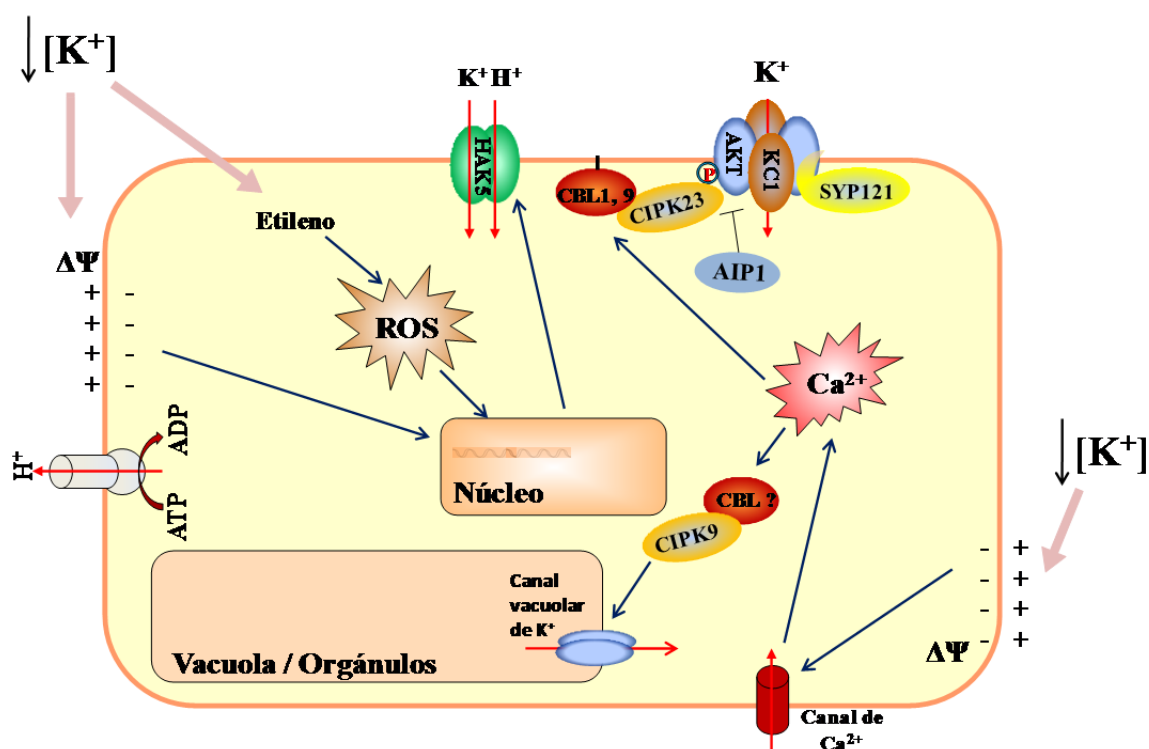
Los transportadores del grupo I de la familia KT/HAK/KUP (Figura 1.7) como HvHAK1, OsHAK1, AtHAK5, CaHAK1 o LeHAK5 están probablemente implicados en la absorción de  $K^+$  de alta afinidad y los genes que los codifican se sobreexpresan cuando se suprime el aporte de  $K^+$  (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006), mientras que la restauración del mismo reduce rápidamente la cantidad de su mRNA (Ahn y col., 2004; Armengaud y col., 2004; Nieves-Cordones y col., 2008). Todos estos transportadores muestran unas características cinéticas de transporte de  $K^+$  al expresarlos en levadura similares a las mostradas por las respectivas plantas. Esto indica que estos transportadores median la absorción de  $K^+$  de alta afinidad en las raíces o, al menos, son los componentes principales de esta absorción (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). Estudios con líneas de inserción de T-DNA en *AtHAK5* han permitido demostrar que este transportador contribuye en gran medida al transporte de  $K^+$  de alta afinidad en

*Arabidopsis*, siendo el responsable del componente sensible al  $\text{NH}_4^+$  (Gierth y col., 2005; Rubio y col., 2008).

Son numerosos los estudios que han profundizado en el estudio de la regulación de los genes tipo *HAK1*, entre ellos *AtHAK5*, descubriendo una regulación mucho más compleja de lo esperado (Figura 1.8). La concentración de  $\text{K}^+$  en el apoplasto y el potencial de membrana se han propuesto como los primeros pasos en la ruta de señalización para la aclimatación frente a bajas concentraciones de  $\text{K}^+$  (Amtmann y col., 2006). Esto es debido a que las concentraciones externas de  $\text{K}^+$  tienen una influencia relativamente pequeña en la concentración de  $\text{K}^+$  en el citosol, ya que son controladas eficientemente por el  $\text{K}^+$  vacuolar (Walker y col., 1998; Walker y col., 1996a). Uno de los primeros efectos hallados durante la deficiencia de  $\text{K}^+$  es la hiperpolarización del potencial de membrana celular de la raíz, la cual aparece tras solo unos minutos del descenso del  $\text{K}^+$  externo (Maathuis y Sanders, 1993; Wang y Wu, 2010). En estudios con tomate se ha relacionado directamente el potencial de membrana de las células de la raíz con la expresión de *LeHAK5* en las mismas, sugiriendo que la hiperpolarización de la membrana está directamente relacionada con el aumento de la expresión del transportador (Nieves-Cordones y col., 2008). Por el contrario, no se halló ninguna relación directa entre la expresión de *LeHAK5* y la concentración de  $\text{K}^+$  en el interior de las células de la raíz (Nieves-Cordones y col., 2008). Además, las líneas de plantas mutantes *akt1* de *Arabidopsis* muestran una hiperpolarización de las células de la raíz (Spalding y col., 1999) y un aumento en la expresión de *AtHAK5* (Qi y col., 2008; Rubio y col., 2008). Por otro lado, la inducción por ayuno de  $\text{K}^+$  de los genes que codifican estos transportadores se ve afectada por el crecimiento en presencia de  $\text{NH}_4^+$ . Este efecto parece depender de la especie porque mientras que en *Arabidopsis* o pimiento el  $\text{NH}_4^+$  reduce la expresión de estos genes, en tomate tiene un efecto contrario (Martínez-Cordero y col., 2005; Nieves-Cordones y col., 2007; Rubio y col., 2008).

Otro factor importante que afecta a la expresión de estos genes es la salinidad, ya que altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  despolarizan el potencial de la membrana plasmática y reprimen la expresión de los genes tipo *HAK1*. Esto se ha demostrado con el descenso de los transcritos de *LeHAK5* (Nieves-Cordones y col., 2007; Nieves-Cordones y col., 2008), *AtHAK5* (Nieves-Cordones y col., 2010) y *ThHAK5* (Alemán y col., 2009b) cuando se aplicaba ayuno de  $\text{K}^+$  a las plantas en presencia de  $\text{Na}^+$ .

Otros elementos muy importantes en la regulación de los genes tipo *HAK1* son las ROS y las hormonas. Las ROS y el etileno aumentan cuando las plantas son ayunadas de  $K^+$ , favoreciendo el etileno la producción de ROS (Jung y col., 2009; Shin y Schachtman, 2004). En paralelo, la expresión de *AtHAK5* es dependiente del etileno y de las ROS, ya que líneas mutantes afectadas en las vías de estos compuestos, mostraban patrones de expresión de *AtHAK5* alterados.



**Figura 1.8. Señalización frente a bajas concentraciones de  $K^+$  en las células de las plantas.** Las bajas concentraciones de  $K^+$  inducen una hiperpolarización de la membrana plasmática, lo que puede ser uno de los primeros pasos en esta señalización. La membrana plasmática hiperpolarizada activa la expresión de *AtHAK5*. Además, el bajo  $K^+$  activa una señalización etileno – ROS que termina produciendo la inducción de *AtHAK5*. Esta baja concentración de  $K^+$  también desencadena una señalización por  $Ca^{2+}$ , probablemente a través de la activación de canales de  $Ca^{2+}$  de la membrana plasmática y de las endomembranas, que llevan a la activación de *AKT1* a través del complejo *CBL1/9-CIPK23*, así como la activación de canales vacuolares mediante la interacción de algún miembro de la familia *CBL* con *CIPK9*, conduciendo el  $K^+$  hacia el citosol. *AKT1* es activado mediante una fosforilación llevada a cabo por *CIPK23*, e inactivado por una defosforilación mediada por *AIP1*. La actividad de *AKT1* está además regulada por la interacción con la subunidad *AtKCI* y la sintaxina *SYP121*. Modificado de Alemán 2011.



## 1.6. Relevancia fisiológica de AtHAK5, AtAKT1 y otros sistemas en la absorción de K<sup>+</sup>.

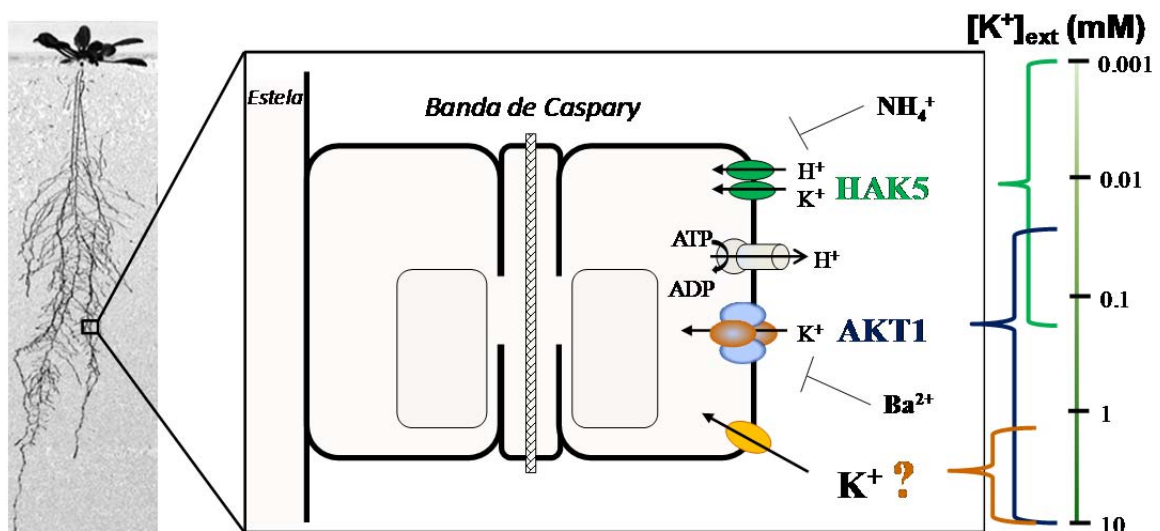
Como se ha mencionado anteriormente, la relevancia fisiológica de los transportadores tipo HAK1 y los canales tipo AKT1 en la absorción de K<sup>+</sup> por parte de la raíz se estableció por primera vez de manera indirecta. La comparación de las características del transporte de K<sup>+</sup> mediado por estos sistemas en organismos heterólogos y los patrones de expresión de los genes que los codifican, con las características del transporte de K<sup>+</sup> de las plantas, permitió establecer hipótesis sobre su función. Sin embargo, una clara demostración de la contribución de cada sistema a la absorción de K<sup>+</sup> no ha sido posible hasta recientemente, cuando se han podido usar líneas de inserción de T-DNA e inhibidores selectivos en la planta modelo *Arabidopsis* (Gierth y col., 2005; Hirsch y col., 1998; Nieves-Cordones y col., 2010; Pyo y col., 2010; Qi y col., 2008; Rubio y col., 2010a; Rubio y col., 2008; Spalding y col., 1999). La secuenciación completa del genoma de *Arabidopsis* y los métodos altamente eficaces de transformación con *Agrobacterium*, junto con el corto ciclo de vida de *Arabidopsis* han posibilitado múltiples aproximaciones al estudio de la función génica.

Los estudios con líneas de inserción de T-DNA muestran que AtHAK5 es el único sistema que media en la absorción de K<sup>+</sup> cuando la concentración externa de éste es menor de 10 µM (Nieves-Cordones y col., 2010; Qi y col., 2008; Rubio y col., 2010b) (Figura 1.9). Por ello, es bastante posible que AtHAK5 lleve a cabo el simporte K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> sugerido por los estudios *in vivo* (Maathuis y Sanders, 1994). A concentraciones más altas, la absorción de K<sup>+</sup> también se realiza a través del canal AKT1, siendo ambos sistemas los que contribuyen a la adquisición de K<sup>+</sup> por parte de la planta a concentraciones de entre 10 y 200 µM de K<sup>+</sup> (Rubio y col., 2010a) (Figura 1.9). De hecho, se ha demostrado que la línea *athak5* no muestra un fenotipo deficiente en el crecimiento en placas con agar que contienen una concentración de K<sup>+</sup> de 30µM (Pyo y col., 2010), sugiriendo que la pérdida de AtHAK5 se puede compensar completamente con AKT1. Que un canal medie la absorción de K<sup>+</sup> a tan bajas concentraciones puede ser sorprendente, pero los potenciales de membrana registrados en células de raíz son lo suficientemente negativos como para poder permitir este proceso (Spalding y col., 1999). A concentraciones externas mayores de 500 µM, AtHAK5 no es relevante, siendo la contribución de AKT1 a la absorción de K<sup>+</sup> fundamental (Figura 1.9). La línea *atakt1* crece en menor medida que la línea

silvestre y que la línea *athak5*, las cuales crecen de forma similar, a una concentración externa de  $K^+$  de  $500\mu M$  (Rubio y col., 2010a). Estos estudios también han permitido determinar que el componente sensible al  $NH_4^+$  corresponde con el transportador AtHAK5, siendo AtAKT1 el componente sensible a  $Ba^{2+}$ .

La demostración definitiva de los resultados indicados se obtuvo mediante el estudio de la línea doble mutante *athak5,atakt1* (Pyo y col., 2010; Rubio y col., 2010a). Este doble mutante no absorbe  $Rb^+$  a concentraciones menores de  $100\mu M$ , demostrando que AtHAK5 y AKT1 son los únicos sistemas que operan en el rango de concentraciones de alta afinidad (Alemán y col., 2011).

A concentraciones de  $K^+$  superiores a  $100\mu M$ , otros sistemas hasta ahora no identificados parecen estar implicados en la absorción de  $K^+$  en las plantas *athak5,atakt1*. Esta absorción no es suficiente a una concentración de  $0.5\text{ mM}$  de  $K^+$ , ya que las plantas *athak5,atakt1* muestran una menor absorción de  $K^+$ , menor biomasa y concentraciones de  $K^+$  también menores que las plantas silvestres. Debido a que únicamente cuando las plantas poseen el canal AKT1 funcional son similares a las plantas silvestres, se puede deducir que AKT1 el sistema más importante que opera a estas concentraciones. A una concentración de  $10\text{ mM}$  de  $K^+$ , otros sistemas son capaces de absorber suficiente  $K^+$  para permitir un crecimiento normal, ya que en estas condiciones las plantas mutantes *athak5,atakt1* no muestran un fenotipo deficiente (Rubio y col., 2010a).



**Figura 1.9. Adquisición de  $K^+$  en la raíz de *A. thaliana*.** *AtHAK5* es el único sistema que absorbe  $K^+$  a concentraciones externas del mismo menores de  $10 \mu M$ , probablemente mediante un simporte  $K^+/H^+$ . A concentraciones más elevadas, la absorción de  $K^+$  también se produce a través del canal *AKT1*, siendo ambos sistemas los responsables de esta absorción entre  $10$  y  $200 \mu M$ . A concentraciones superiores a  $500 \mu M$ , *AKT1* es el único sistemas encargado de la absorción de  $K^+$ . *AtHAK5* es el componente sensible a  $NH_4^+$  de la absorción de  $K^+$ , mientras que *AKT1* es el componente sensible a  $Ba^{2+}$ . En ausencia de *AtHAK5* y *AtAKT1*, sistemas no identificados son los encargados de la absorción de  $K^+$  que permiten el crecimiento de la planta a concentraciones mayores de  $1 mM$ . Tomado de Alemán 2011.

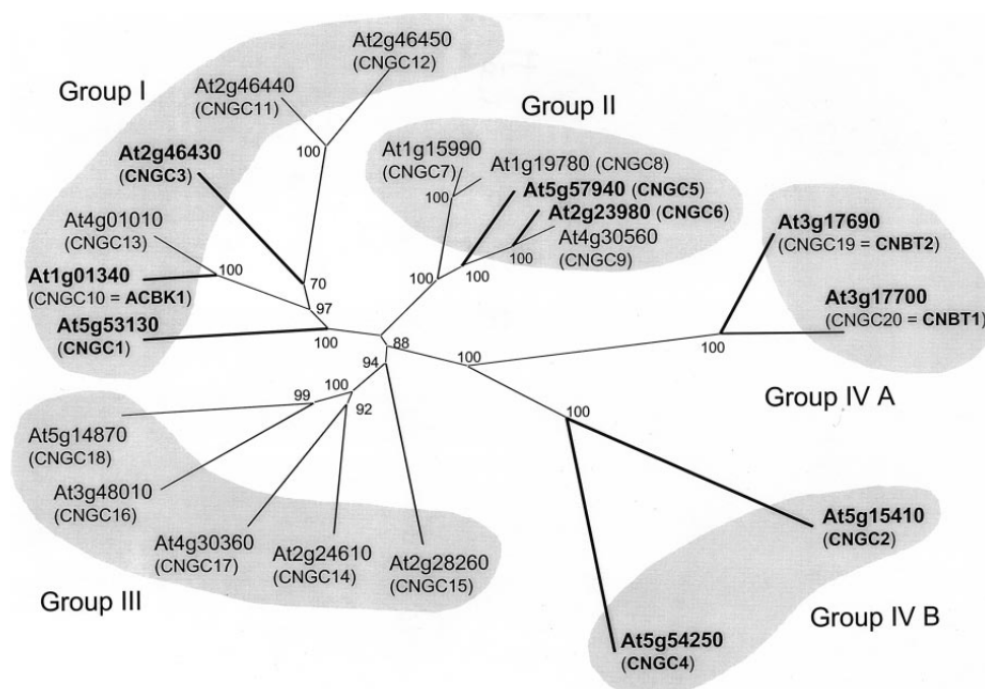
Los sistemas candidatos implicados en esta absorción observada en las plantas doble mutantes *athak5, atakt1* podrían pertenecer a la familia CHX (Zhao y col., 2008), a la familia de canales no selectivos regulados por nucleótidos cíclicos (CNGCs) (Kaplan y col., 2007; Li y col., 2005), o a la familia de los canales regulados por glutamato (GLR) (Dietrich y col., 2010; White, 2010).

Dentro de la familia CHX existen varios miembros relacionados con el transporte de  $K^+$  en la membrana celular. Por ejemplo, *AtCHX17* muestra bastantes similitudes con antiportadores  $Na^+, K^+-H^+$  de otros organismos, en concreto *KHA1* de *S. cerevisiae*. *KHA1* se ha propuesto como un antiportador  $K^+-H^+$ , localizado en la membrana plasmática, relacionado con la regulación intracelular de pH, salida de  $K^+$ , y control del volumen celular. Estas homologías sugieren que *AtCHX17* funcione como un antiportador  $Na^+, K^+-H^+$  (Cellier y col., 2004). En cuanto a *AtCHX13*, que se encuentra en la membrana plasmática, podría constituir una vía de absorción de  $K^+$  por parte de la raíz debido a que da lugar a complementación funcional en

levadura, mediando absorción de  $K^+$  con una  $K_m$  para el mismo de  $136 \mu M$  (Zhao y col., 2008). Sin embargo, su alta sensibilidad frente a  $Cs^+$  y  $Na^+$  resta peso a esta teoría, ya que la absorción de  $K^+$  por parte de la raíz no muestra una alta sensibilidad frente a estos inhibidores (Rubio y col., 2010b). Además, un sistema de absorción de  $K^+$  con una  $K_m$  de  $136 \mu M$  para el  $K^+$  no se observa en el doble mutante *athak5, atakt1* (Rubio y col., 2010a), y la expresión de AtCHX13 en raíz solo se produce en el ápice de ésta en condiciones de bajo  $K^+$ , lo que no explicaría el crecimiento experimentado por las plantas mutantes *athak5, atakt1* con altas concentraciones de  $K^+$  externas.

La familia de los canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNGCs) ha sido identificada en plantas, encontrándose 20 miembros de esta familia en el genoma de *Arabidopsis* (Maser y col., 2001) (Figura 1.10), si bien la función que cumplen en las plantas no está del todo clara. Se ha sugerido que los genes CNGC codifican canales no selectivos que regulan corrientes de cationes (Demidchik y col., 2002; Demidchik y Maathuis, 2007; Very y Sentenac, 2002), pudiendo estar implicados en la absorción de iones y su translocación (Li y col., 2005). Algunos de estos canales (AtCNGC1, AtCNGC3 y AtCNGC13) muestran una mayor expresión si la planta se expone a concentraciones de  $150 \text{ mM}$  de NaCl, mientras que otros (AtCNGC7 y AtCNGC16) muestran una menor expresión en esas condiciones (Maathuis y col., 2003), sugiriendo un papel de los CNGCs en la adaptación frente a ambientes salinos. AtCNGC1 y AtCNGC4 pueden transportar cationes como  $Na^+$  o  $K^+$  (Balague y col., 2003). Algunos estudios de otros miembros de esta familia (AtCNGC2, AtCNGC11 o AtCNGC12) han mostrado su relevancia en distintas respuestas de defensa frente a patógenos. Otros, como AtCNGC18, parecen estar relacionados con el crecimiento polarizado de los tubos polínicos (Frietsch y col., 2007). AtCNGC10 está localizado en la membrana plasmática de diversas células en las plantas, y se expresa en mayor medida en raíz que en la parte aérea (Christopher y col., 2007). Además, se ha demostrado la capacidad de este canal de mediar corrientes catiónicas en la membrana plasmática en ambos sentidos en células HEK293 (Christopher y col., 2007). Transporta tanto  $K^+$  como  $Na^+$ , y rescata parcialmente la línea mutante *akt1* de *Arabidopsis* (Kaplan y col., 2007). Los resultados obtenidos con líneas antisentido de este canal, las cuales muestran una menor expresión de *AtCNGC10* que la mostrada por las plantas silvestres, sugieren un papel de este canal en el mantenimiento de la homeostasis  $Na^+/K^+$  de la raíz (Guo y col., 2008a). Estudios más recientes han identificado la posible relación de este canal con el transporte interno de  $Ca^{2+}$  (y

posiblemente de  $Mg^{2+}$ ), que a su vez regula la actividad de los transportadores de  $K^+$  (Guo y col., 2010). En el caso de AtCNGC3 se han obtenido resultados similares. La mutación de este canal altera tanto los sistemas de absorción de  $Na^+$  como los de  $K^+$  a corto plazo en condiciones de altas concentraciones externas de  $K^+$ , sugiriendo que este canal puede contribuir a la absorción no selectiva de cationes monovalentes a nivel de la membrana plasmática (Gobert y col., 2006).

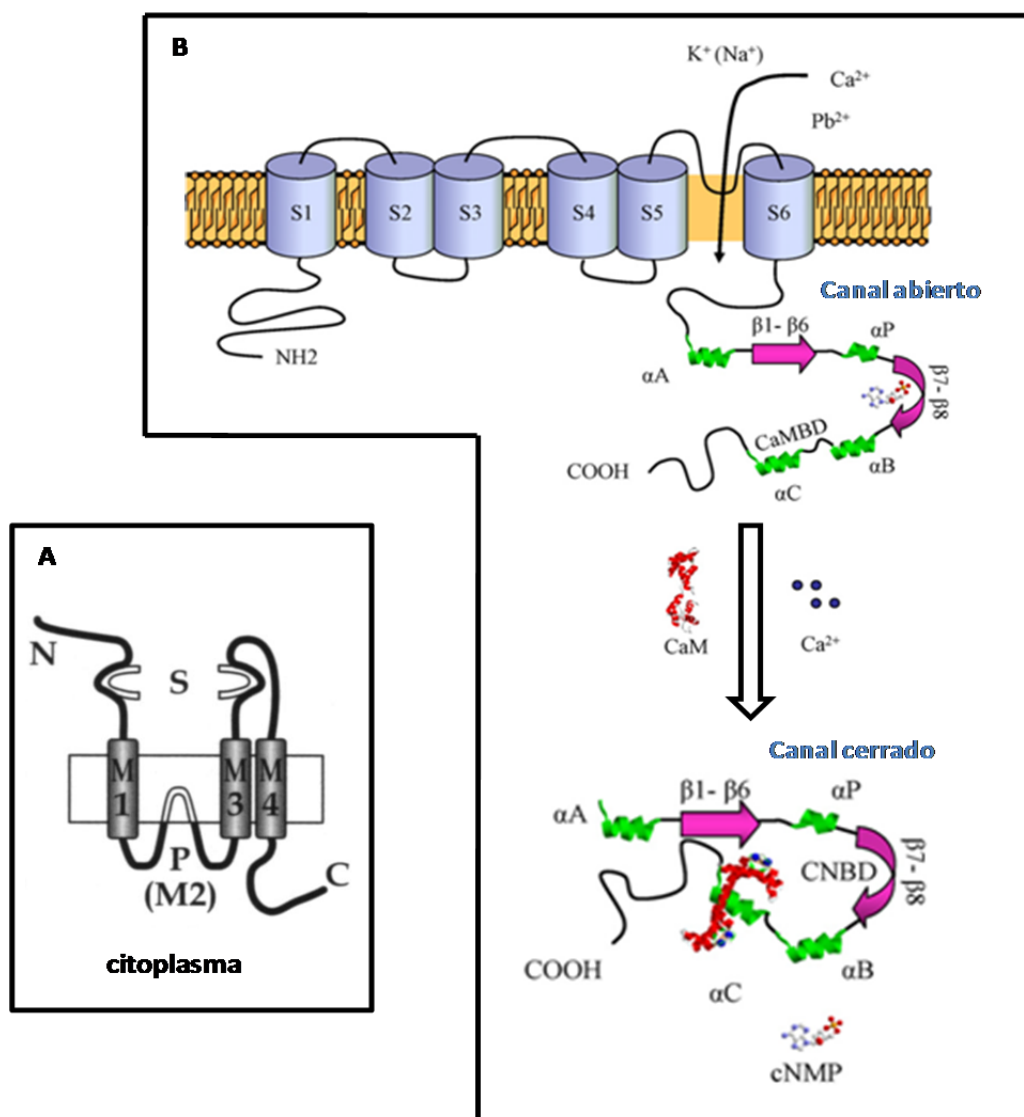


**Figura 1.10: Árbol filogenético de la familia de los canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNGC) en Arabidopsis.** Tomado de Maser 2001.

Como últimos candidatos estudiados encontramos a la familia de los GLR. Debido a sus propiedades químicas y bioquímicas únicas, el glutamato muestra un amplio rango de funciones biológicas: funciona como metabolito, fuente de energía y nutriente, determina la estructura de proteínas y actúa como molécula señalizadora (Forde y Lea, 2007). El genoma de Arabidopsis codifica 20 miembros de posibles canales asociados a ligando llamados receptores de glutamato (GLRs). El receptor GluR0 de la cianobacteria *Synechocystis* contiene dos sitios de

unión para glutamato, así como dos dominios transmembrana unidos por una región que forma un poro, la cual contiene un motivo TVGVG. Este último recuerda al existente en los canales rectificadores de la entrada de  $K^+$ , sugiriendo una relación entre los canales de  $K^+$  procariotas y los receptores de glutamato selectivos de cationes (Dietrich y col., 2010). La unión del agonista(s) conduce a una apertura del canal y, dependiendo de los gradientes electroquímicos y la selectividad del canal, a la despolarización de la membrana y/o a la entrada de  $Ca^{2+}$  (Dietrich y col., 2010). Estudios de “patch-clamp” en protoplastos de raíz revelan una activación instantánea de corrientes de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes de glutamato, e identifican células corticales y epidérmicas de la raíz como las responsables de la sensibilidad a éste (Demidchik, 2004). Recientemente se han hallado evidencias de que los receptores de glutamato en plantas podrían actuar como canales de cationes no selectivos. Tapken y Hollmann (Tapken y Hollmann, 2008) encontraron que AtGLR1.1 y AtGLR1.4 tienen dominios que conforman poros permeables a  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ . Por otra parte, se ha relacionado a los GLRs con los procesos de señalización dependientes de la luz, así como en distintos procesos de crecimiento (Lam y col., 1998), o con respuestas frente a estreses bióticos y abióticos (Kang y col., 2006). Finalmente, los canales GLR podrían ser considerados responsables de la absorción de  $K^+$  en la raíz, ya que varios miembros de esta familia se expresan en raíces y, junto con los CNGCs, constituyen los canales de cationes independientes de voltaje en plantas (White, 2010). Los canales GLR permiten, como los CNGCs, un transporte no selectivo de iones, incluyendo el de  $K^+$  en las células radicales, si bien mantener la homeostasis citosólica del  $Ca^{2+}$  y regular su señalización parecen ser las principales funciones de estos canales (Demidchik y Maathuis, 2007).

En la figura 1.11 se presenta la estructura secundaria de una subunidad de un receptor de glutamato (A) y de un canal asociado a nucleótidos cíclicos (B), así como su posible regulación.



**Figura 1.11. Estructura secundaria general de una subunidad de un receptor de glutamato (A) y de un canal asociado a nucleótidos cíclicos (B) en planta, que muestran los dominios transmembrana y la región que conforma el poro, donde reside la selectividad de la estructura. En el caso de GLR, contiene dos posibles lugares de unión al sustrato extracelulares (S). En el caso de los CNGCs, la unión de los nucleótidos cíclicos monofosfato (cNMPs) a su sitio de unión (CNBD) del CNGC, dan lugar a la apertura del canal, y los cationes pueden pasar a través del poro que existe entre las hélices transmembrana 5 y 6. Cuando se produce una elevación en la concentración del Ca<sup>2+</sup> citoplasmático, este Ca<sup>2+</sup> se une a la calmodulina, y este complejo Ca<sup>2+</sup>/CaM se une a su lugar de unión (CaMBD) del CNGC, previniendo probablemente la unión de los cNMPs al canal, forzándolo a cerrarse. Este modelo se basa en distintos estudios de CNGCs de diferentes plantas, por lo que podría no ser aplicable a todos los CNGCs. Se cree que los CNGCs están compuestos por cuatro subunidades como esta, mientras que los GLRs estarían compuestos por 4 o 5 subunidades. Modificado de Demidchik 2007 (A) y Kaplan 2007 (B).**

### 1.7. Papel de los canales de $K^+$ en la apertura y cierre de los estomas

La capacidad de los estomas de abrirse o cerrarse, se basa en las deformaciones que pueden experimentar las células oclusivas de acuerdo con su contenido hídrico. Los movimientos estomáticos están provocados por los cambios de turgencia de las células oclusivas, de manera que cuando éstas están turgentes, se arquean, y el orificio se abre. Cuando pierden agua, se vuelven flácidas y el ostiolo se cierra. Para que se produzca la entrada o salida de agua en las células oclusivas debe generarse una diferencia de potencial hídrico. Así, la acumulación de solutos provoca un movimiento de agua hacia el interior de las células oclusivas, y la disminución de la concentración de solutos en éstas produce el movimiento del agua hacia el exterior. El soluto que más influye en el movimiento osmótico del agua es el ión potasio ( $K^+$ ). El aumento muy marcado de la concentración de  $K^+$  en las células oclusivas ocasiona una disminución del potencial hídrico de éstas, lo que conduce a una entrada de agua, y el estoma se abre. Con un descenso de  $K^+$ , el estoma se cierra. El fenómeno clave que conduce a la absorción de  $K^+$  en las células oclusivas es el bombeo activo de protones hacia fuera de las células oclusivas, mediante una ATPasa de protones ( $H^+$ -ATPasa) ligada a membrana. El gradiente electroquímico generado en la membrana de las células oclusivas como consecuencia de la salida de protones permite la entrada del  $K^+$  hacia el interior, a lo largo de un gradiente de carga eléctrica. Como contrapartida, también se produce un aumento de cargas negativas, concretamente los aniones cloruro ( $Cl^-$ ) y malato. Los iones  $K^+$  y  $Cl^-$  proceden del exterior de la célula, mientras que el malato se genera en la célula oclusiva, por disociación del ácido málico derivado de la hidrólisis del almidón. El agua que entra en las células, debido a la caída de su potencial hídrico, produce un aumento de la presión de turgencia, que causa su deformación. Cuando el estoma se cierra, el  $K^+$  y el  $Cl^-$  que habían entrado abandonan la célula, y la concentración de malato disminuye.

En la Figura 1.12 se presenta el movimiento de iones y el metabolismo en las células oclusivas durante la apertura y cierre estomáticos.



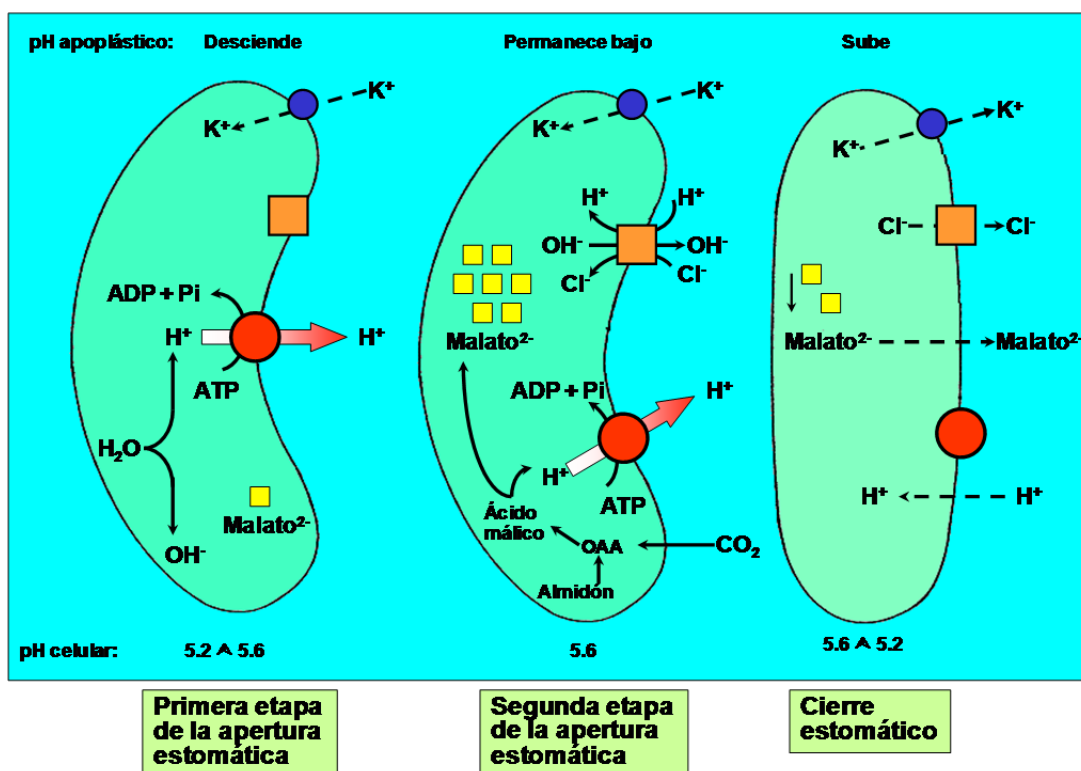


Figura 1.12. Movimiento de iones y metabolismo en las células oclusivas durante la apertura y cierre estomáticos (según Ridge 1991. Adaptado de Azcón-Bieto y Talón, 1993).

### 1.7.1. Canales de K<sup>+</sup> presentes en las células oclusivas.

Se han descrito los siguientes canales de K<sup>+</sup> presentes en las células oclusivas, que podrían estar implicados en los movimientos estomáticos:

- Canales tipo *Shaker* de salida de K<sup>+</sup>: activados por despolarización del potencial de membrana. El primer canal de K<sup>+</sup> activado por despolarización descrito fue SKOR (del inglés stelar K<sup>+</sup> outward rectifier) de *A. thaliana* (Gaymard y col., 1998). Un canal relacionado con este último, también de *A. thaliana*, es el canal GORK (del inglés guard cell outward-rectifying K<sup>+</sup> channel) (Ache y col., 2000), que es el canal de salida de K<sup>+</sup> más importante en las células oclusivas, contribuyendo al cierre estomático. La despolarización de las células oclusivas debida a la salida de aniones activa el canal GORK, resultando por tanto en una salida de K<sup>+</sup> a

través del mismo, que contribuye al cierre estomático. GORK también se expresa en los pelos radiculares (Ivashikina y col., 2001).

- Canales tipo *Shaker* de entrada de  $K^+$ : activados por la hiperpolarización del potencial de membrana (Kourie y Goldsmith, 1992; Schachtman, 1992; Schroeder y col., 1987). Esta familia contiene los primeros canales de  $K^+$  identificados en plantas: AKT1 y KAT1 de *Arabidopsis*. AKT1 se expresa en las raíces de *Arabidopsis*, y las plantas mutantes carentes de él tienen afectado el crecimiento cuando la concentración de  $K^+$  externa es baja, lo que demuestra su papel en la absorción de  $K^+$  del suelo (Hirsch y col., 1998). Las células oclusivas de *Arabidopsis* expresan algunos de los canales pertenecientes a esta familia como AKT1, AKT2, KAT1, KAT2, y la subunidad reguladora KC1 (Szyroki y col., 2001). Estos canales median en la entrada de  $K^+$  debida a la hiperpolarización de la membrana, generando la entrada de agua y la apertura estomática, en respuesta a señales como la luz solar.

- Canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGC): estos canales son menos selectivos, llegando a transportar incluso cationes divalentes. El AMP cíclico genera corrientes de  $Ca^{2+}$  dependientes de hiperpolarizaciones en las células oclusivas, mientras que el GMP cíclico no (Lemtiri-Chlieh y Berkowitz, 2004). Estas corrientes generadas debido al AMP cíclico podrían indicar la presencia de estos canales en las células oclusivas, y su relación con las distintas corrientes iónicas desarrolladas en estas células.

- Canales vacuolares: los canales VK (vacuolar  $K^+$ ) se identificaron por primera vez en las vacuolas de las células oclusivas. Son activados por concentraciones elevadas de  $Ca^{2+}$  citosólico, son bastante selectivos para el  $K^+$ , y su actividad se ve aumentada también por un pH bajo en el citosol (Allen y Sanders, 1996; Ward y Schroeder, 1994). Han sido propuestos como la vía de salida del  $K^+$  de la vacuola al citosol en respuesta a altas concentraciones de  $Ca^{2+}$  citoplasmático durante el cierre estomático (Ward y Schroeder, 1994). Un ejemplo de ellos es el canal TPK1 de *Arabidopsis*. Dentro de los canales vacuolares se encuentran también los canales SV (del inglés slow vacuolar). Son canales de cationes no selectivos activados por  $Ca^{2+}$  y voltajes positivos en el lado citoplasmático de la membrana vacuolar. Se ha visto que en las células oclusivas son permeables al  $Ca^{2+}$  (Ward y Schroeder, 1994), por lo que estos canales podrían estar relacionados con la señalización por  $Ca^{2+}$  al transportarlo hacia el exterior de la vacuola (Ward y col., 2009). En 2005, Peiter y colaboradores (Peiter y col., 2005) identificaron

el gen *TPC1* que codifica un canal SV en *Arabidopsis*. Por último, dentro de los canales vacuolares están los canales FV (del inglés fast vacuolar). Son canales catiónicos no selectivos, inhibidos por altas concentraciones citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , y dependientes de voltaje. Los genes que codifican estos canales no han sido aún identificados. Una concentración de  $\text{K}^+$  elevada en la vacuola aumenta la probabilidad de apertura de estos canales (Pottosin y Martínez-Estevéz, 2003), por lo que los canales FV podrían funcionar como una vía para el flujo de  $\text{K}^+$  desde la vacuola hacia el citoplasma durante el cierre estomático independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  (Ward y col., 2009).

### 1.7.2. Apertura y cierre estomáticos en condiciones de estrés hídrico

El estrés hídrico es el factor ambiental que más limita la producción vegetal a escala mundial. De hecho, existe una elevada correlación entre la productividad de los diferentes ecosistemas y su precipitación característica (Figura 1.13). En el conjunto de zonas cultivadas a escala mundial, se estima que el rendimiento potencial de los cultivos se reduce en más del 70% debido a las limitaciones ambientales. De este 70%, el estrés hídrico constituye hasta un 35% (Boyer, 1982).

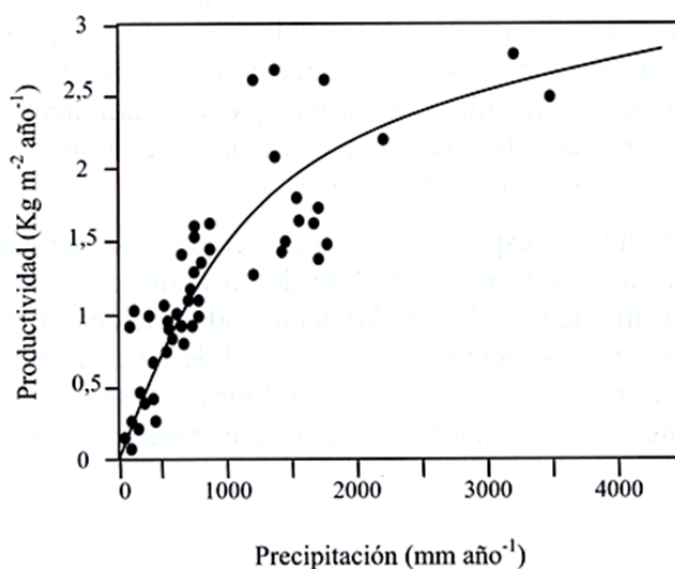


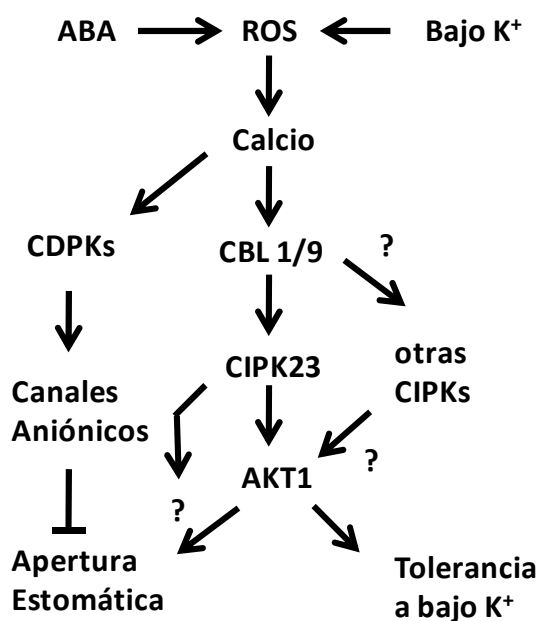
Figura 1.13. Correlación entre la producción primaria neta y la precipitación en los ecosistemas mundiales más importantes (según Lieth, 1975). Tomado de Medrano y Flexas 2004.

Este hecho resulta de especial relevancia en condiciones de clima árido y semiárido, las cuales abundan en España y en especial en el sureste. Desde un punto de vista ecofisiológico, se entiende por estrés hídrico cualquier limitación al funcionamiento óptimo de las plantas impuesta por una insuficiente disponibilidad de agua. Éste puede presentarse con distinta intensidad y duración, teniendo la respuesta de las plantas diferente carácter y magnitud. Así, según Medrano y Flexas, en 2004, (Medrano, 2004) distinguimos entre (i) respuestas inmediatas, que son modificaciones del funcionamiento de la planta en respuesta al estrés que ocurren en poco tiempo (de minutos a días), que no requieren expresión de nuevos genes ni se acompañan de cambios morfológicos; (ii) aclimatación, referente a respuestas al estrés que ocurren en periodos más largos (de semanas a años) y que requieren la expresión de nuevos genes y la aparición de cambios morfológicos temporales, y (iii) adaptación, atendiendo a un concepto evolutivo que hace referencia a modificaciones morfológicas y genéticas que ocurren durante varias generaciones, que favorecen la supervivencia y crecimiento de la especie.

Una de las respuestas inmediatas al estrés hídrico mejor caracterizada consiste en la reducción de las pérdidas de agua por transpiración, siendo el cierre estomático un mecanismo crucial en este proceso. El transporte de iones y agua a través de canales de las membranas celular y vacuolar regulan el turgor y el volumen de las células oclusivas de los estomas, regulando por tanto la apertura y cierre de éstos (Pandey y col., 2007b; Schroeder y col., 2001). Las células oclusivas reciben continuamente información del exterior, incluyendo distintos estímulos bióticos y abióticos, así como señales de larga distancia que llegan desde las raíces. Estas células integran todas estas señales, generando cambios en su turgor. Algunos de estos factores ambientales que influyen en los cambios de turgor son la humedad o la concentración de CO<sub>2</sub> en el aire, así como la actividad fotosintética de las hojas.

La sequía genera en la planta la producción de ácido abscísico (ABA), el cual promueve el cierre estomático, reduciendo la pérdida de agua por esta vía. Cuando las células oclusivas perciben niveles altos de ABA, reducen su turgor y volumen mediante la salida de aniones y de iones K<sup>+</sup>, así como a través de la conversión gluconeogénica de malato en almidón, produciendo el cierre estomático (MacRobbie, 1998). El ABA conduce a un aumento del Ca<sup>2+</sup> citosólico y eleva la sensibilidad hacia el mismo (Siegel y col., 2009). Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas CBL actúan como sensores de Ca<sup>2+</sup> y cumplen funciones muy importantes en diversos procesos dependientes del mismo (Cheong y col., 2007; Hwang y col.,

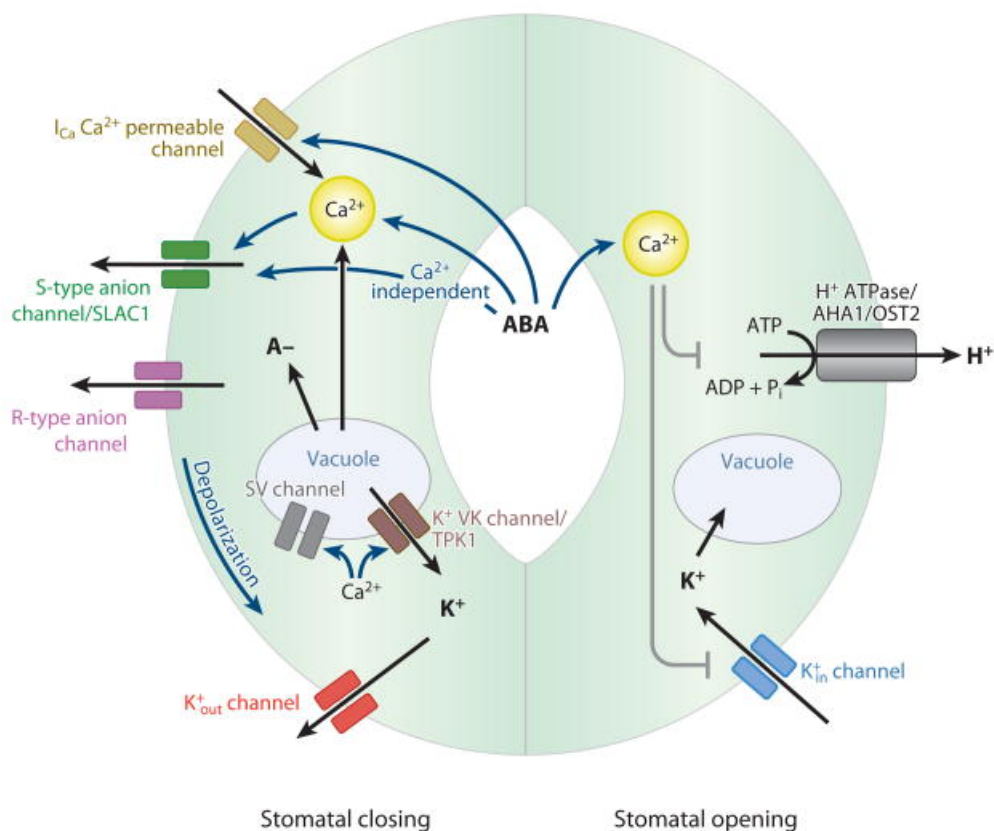
2005; Kolukisaoglu y col., 2004; Pandey y col., 2004). Estos sensores se unen a diversas CIPKs (Albrecht y col., 2001; Hrabak y col., 2003; Kim y col., 2000) para regular diversas rutas metabólicas. Así, se ha identificado a CIPK23 como un componente mayoritario en la regulación de la tolerancia a sequía en *Arabidopsis* mediada por ABA (Cheong y col., 2007). Esta quinasa cumple su función mediante la interacción con los sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  CBL1 y CBL9, los cuales parecen ser los encargados de su regulación. También se ha visto, como mencionamos en puntos anteriores, que los complejos CBL1/CBL9-CIPK23 tienen relación con la absorción de  $\text{K}^+$  en la raíz, regulando el canal de  $\text{K}^+$  AKT1 (Li y col., 2006; Xu y col., 2006). Teniendo todo esto en cuenta, se podría sugerir que esta ruta CBL1/CBL9-CIPK23 regula las respuestas tanto a sequía como a bajas concentraciones de  $\text{K}^+$  en *Arabidopsis*. (Figura 1.14).



**Figura 1.14. La ruta CBL-CIPK regula tanto los movimientos estomáticos como la tolerancia a bajas concentraciones de  $\text{K}^+$ .** El ABA (con la sequía como factor desencadenante) y las bajas concentraciones de  $\text{K}^+$  podrían producir especies reactivas de oxígeno (ROS), dando lugar a fluctuaciones en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este  $\text{Ca}^{2+}$  se une a las CBLs, interaccionando con CIPK23 y activando al canal AKT1 (y posiblemente a otros canales “?”) relacionados con la absorción de  $\text{K}^+$  y la regulación del turgor de las células. Otras CIPKs podrían estar también relacionadas con la regulación de AKT1. La otra rama de la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  en las células oclusivas de la figura está relacionada con las CDPKs, las cuales activan canales aniónicos, inhibiendo la apertura estomática. Tomado de Cheong y col. 2007.

Tanto el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico como el aumento de sensibilidad hacia el mismo activan dos canales de aniones distintos: los canales de tipo S (de activación lenta: slow-activating) y de tipo R (de activación rápida: rapid-transient) (Hedrich y col., 1990; Schroeder y Hagiwara, 1989; Schroeder y Keller, 1992) (Figura 1.15). Mientras que los canales tipo S generan una salida de aniones lenta y constante, los canales tipo R se activan transitoriamente en un margen de 50 ms (Schroeder y Keller, 1992). La activación de estos canales en la membrana plasmática de las células oclusivas ha sido señalada como un paso crítico en el mecanismo de cierre estomático (Grabov y col., 1997; Pei y col., 1997; Schmidt y col., 1995). La salida de aniones mediante los canales aniónicos causa una despolarización de la membrana, lo que conduce a una salida de  $\text{K}^+$  de las células oclusivas a través de los canales rectificadores de la salida de  $\text{K}^+$  (Hosy y col., 2003; Schroeder y col., 1984; Schroeder y col., 1987; Thiel y col., 1992) (Figura 1.15). De todos los solutos liberados de las células oclusivas, más del 90% proceden de las vacuolas (MacRobbie, 1998), siendo los canales vacuolares activados por calcio citosólico (VK) parte importante en la salida de  $\text{K}^+$  de la vacuola (Gobert y col., 2007; Ward y Schroeder, 1994) (Figura 1.15).

La apertura estomática requiere la activación de las ATPasas de  $\text{H}^+$  en la membrana plasmática de las células oclusivas (Assmann y col., 1985; Shimazaki y col., 1986) (Figura 1.15). La hiperpolarización de la membrana producida por las ATPasas de  $\text{H}^+$  induce la absorción de  $\text{K}^+$  a través de los canales rectificadores de entrada de  $\text{K}^+$  (Kwak y col., 2001; Lebaudy y col., 2007; Schroeder y col., 1984; Schroeder y col., 1987). Así, la entrada de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , y la producción de malato a partir de almidón osmóticamente inactivo aumenta el turgor y el volumen de la célula oclusiva e induce la apertura estomática. En estas células, el  $\text{K}^+$  se acumula en las vacuolas mediante la actividad antiportadora  $\text{H}^+/\text{K}^+$ , mientras que los aniones se transportan hacia las vacuolas a través tanto de canales aniónicos de baja afinidad como de mecanismos intercambiadores  $\text{H}^+/\text{anión}$  (De Angeli y col., 2006; Hafke y col., 2003) (Kovermann y col., 2007; Pei y col., 1996). El ABA inhibe la apertura estomática a través de la reducción de la actividad de los canales de  $\text{K}^+$  y de las ATPasas de  $\text{H}^+$  (Kinoshita y col., 1995; Schroeder y Hagiwara, 1989) (Figura 1.15).



**Figura 1.15. Señalización y regulación de los canales iónicos en una célula oclusiva.** Se muestran las funciones de los canales iónicos de una célula oclusiva y la transducción de señales inducidas por ABA en la membrana plasmática y membranas vacuolares. La señalización durante el cierre estomático se muestra en la célula oclusiva de la izquierda, mientras que los pasos más generales de la inhibición por ABA de la apertura estomática se muestran en la célula oclusiva de la derecha. Abreviaciones: ABA, ácido abscísico;  $I_{Ca}$ , corriente de  $Ca^{2+}$  hacia el interior; S-type, tipo lento; SLAC1, canal lento asociado a aniones 1; R-type, tipo rápido; SV, vacuolar lento; VK, vacuolar selectivo de  $K^+$ ; TPK1, canal de  $K^+$  de dos poros 1; AHA1,  $H^+$ -ATPasa de Arabidopsis; OST2, estoma abierto.

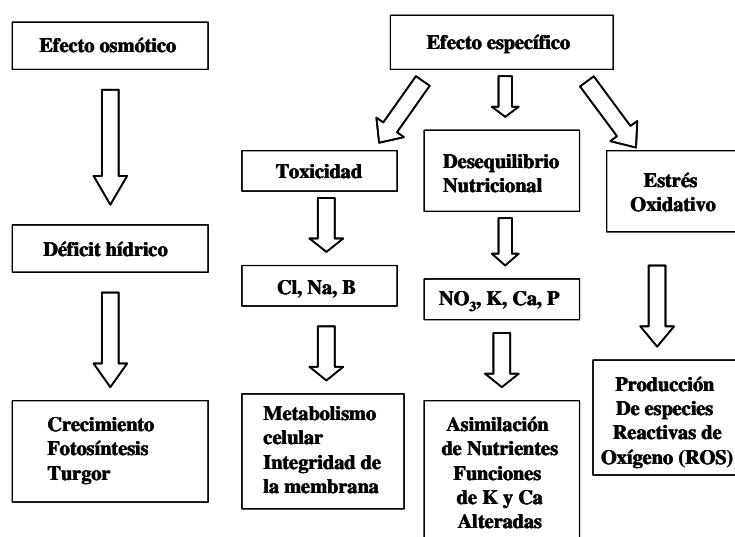
Todos los mecanismos implicados en los movimientos estomáticos descritos anteriormente forman parte de las respuestas inmediatas de la planta frente al estrés hídrico. Junto a este tipo de respuestas a corto plazo, la planta desarrolla una serie de mecanismos de aclimatación y adaptación encaminados a cumplir básicamente dos principios: reducir el gasto de agua y mantener el abastecimiento de agua.

## 1.8. Salinidad

Los efectos negativos producidos por el estrés salino en el crecimiento de los cultivos son un problema cada vez mayor en la agricultura, particularmente en la de regadío (Shabala y Cuin, 2008). En el año 2008, más de 800 millones de hectáreas de tierra en el mundo eran salinas (FAO), lo que supone más del 6% de la tierra total del planeta. La salinidad de muchas de estas tierras tiene su origen en causas naturales, por la acumulación de sales durante largos periodos de tiempo en zonas áridas y semiáridas (Munns y Tester, 2008). El agua de la lluvia contiene de 6 a 50 mg de NaCl por kg de agua, disminuyendo su concentración conforme se aleja de la costa. Una lluvia que contenga 10 mg Kg<sup>-1</sup> de cloruro sódico depositaría 10 kg de sal por hectárea por cada 100 mm de lluvia y por año. A parte de la salinidad natural, una gran parte de las tierras agrícolas recientemente cultivadas se han transformado en salinas debido a su riego, dando lugar a una acumulación de sal en la zona ocupada por las raíces (Munns y Tester, 2008). De las 1500 millones de hectáreas de tierra dedicada a la agricultura de secano, 32 millones de hectáreas (un 2%) están afectadas por salinidad secundaria en distinto grado. De los 230 millones de hectáreas de tierra irrigada, 45 millones (un 20%) están afectadas por salinidad (FAO 2008).

Los principales iones que contribuyen a la salinidad son los cloruros, los sulfatos, los carbonatos, el sodio, el calcio y el magnesio, siendo el NaCl la sal más abundante. La sal disuelta en el agua del suelo produce dos efectos sobre las plantas: un efecto osmótico y un efecto específico. El efecto osmótico es consecuencia del bajo potencial hídrico de las soluciones con altas concentraciones de sales, que dificulta la entrada de agua a la planta. El efecto específico es debido a la acumulación excesiva de sales en los tejidos de la planta, que da lugar a toxicidad por las altas concentraciones de los iones, desequilibrios nutricionales y estrés oxidativo (Figura 1.16).





**Figura 1.16. Efectos causados por la salinidad sobre las plantas.**

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

Uno de los procesos fisiológicos clave afectado por las altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  es el mantenimiento de la homeostasis del  $\text{K}^+$  tanto en la célula como en la planta completa (Cakmak, 2005; Flowers y col., 1983; Gaxiola y col., 1992; Kader y Lindberg, 2008; Kronzucker y col., 2006; Peng y col., 2004; Rains y Epstein, 1967; Santa-Marla y Epstein, 2001; Zhu y col., 1998). La reducción en la concentración tisular de  $\text{K}^+$  puede ser consecuencia de la inhibición de la absorción del  $\text{K}^+$  por el  $\text{Na}^+$  (Alemán y col., 2009a; Kronzucker y col., 2006) debido a la competición que existe entre el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$  en los sistemas de absorción. También puede deberse a una estimulación de la salida de  $\text{K}^+$  en la raíz (Nieves-Cordones y col., 2010; Shabala y col., 2006), a causa de la activación de los canales rectificadores de salida de  $\text{K}^+$ , inducidos por la fuerte despolarización de la membrana provocada por altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  (Alemán y col., 2011; Nieves-Cordones y col., 2008).

La salinidad también interfiere en el proceso de percepción de bajo  $K^+$ , y se ha observado que las altas concentraciones de  $Na^+$  inhiben la inducción de los sistemas de absorción de  $K^+$  de alta afinidad que se activan por bajas concentraciones de  $K^+$  (Alemán y col., 2009b; Nieves-Cordones y col., 2010; Nieves-Cordones y col., 2007). Además, la reducción en el  $K^+$  tisular debido a la salinidad lleva a una redistribución de este macronutriente para mantener su concentración en las células metabólicamente activas.

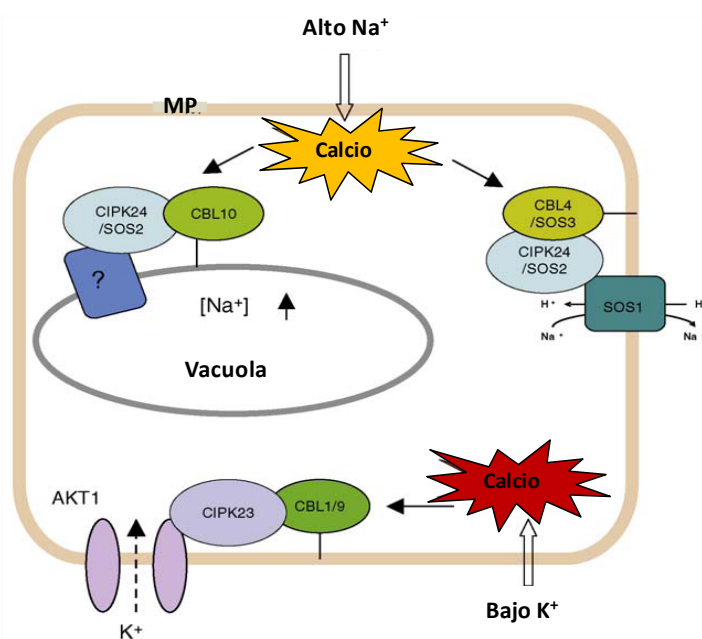
En condiciones de salinidad, el cierre estomático y la disminución de la actividad fotosintética, debidos ambos, entre otras cosas, al bajo estado nutricional de  $K^+$ , aumentan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la actividad de las enzimas encargadas de neutralizar las mismas, como la superóxidodismutasa, la ascorbatoperoxidasa (así como otras peroxidases) y la catalasa (Apel y Hirt, 2004; Munns y Tester, 2008). Las plantas se adaptan cambiando la morfología de la hoja, la composición de los pigmentos de los cloroplastos, y la actividad de procesos bioquímicos que previenen el daño oxidativo.

#### 1.8.1. Relación $K^+/Na^+$ como factor clave en la tolerancia

Gran parte de la toxicidad del  $Na^+$  intracelular es consecuencia del desplazamiento del  $K^+$  en sus funciones de activación de enzimas y la biosíntesis proteica. Por lo tanto, es obvio pensar que no es solo la cantidad de  $Na^+$  *per se*, si no más bien la proporción citosólica  $K^+/Na^+$  la que determine las capacidades del metabolismo celular, y en última instancia la capacidad de la planta para sobrevivir en ambientes salinos. De hecho, el cociente citosólico  $K^+/Na^+$  ha sido nombrado repetidamente como un factor clave en la tolerancia a la salinidad (Colmer y col., 2006; Cuin y col., 2003; Gorham y col., 1991; Maathuis y Amtmann, 1999). Por lo tanto, para poder mejorar la tolerancia de los cultivos a la salinidad, es importante no solo reducir la acumulación de  $Na^+$  en los tejidos de la planta, si no aumentar también la relación  $K^+/Na^+$  (Rubio y col., 2010c; Shabala y Cuin, 2008), lo que se puede conseguir aumentando la absorción de  $K^+$  en condiciones salinas.

Además de la selectividad  $K^+/Na^+$  de los transportadores, la regulación de su actividad también puede ser determinante. Se ha descrito que tanto la deficiencia de  $K^+$  como el elevado  $Na^+$  externo pueden inducir cambios en el  $Ca^{2+}$  celular que a su vez activan complejas redes de

señalización. Una de estas redes que comparten los estreses de deficiencia de  $K^+$  y elevado  $Na^+$  es la de las CBLs, mencionadas anteriormente, que a su vez interaccionan con las proteínas quinasas CIPKs. El complejo CBL1/9-CIPK23 interacciona y regula la actividad del canal AKT1 implicado en la absorción de  $K^+$  (Figura 1.17). Por otro lado, un elevado estrés salino activa los CBL10/4 (también llamado SOS3) y éstos a su vez interaccionan con CIPK24 (también llamado SOS2). El complejo SOS3/SOS2 o CBL4/CIPK24 fosforila a su vez al antiportador  $Na^+/H^+$  de la membrana plasmática (SOS1) activando la salida de  $Na^+$  de la célula (Luan y col., 2009). Es importante mencionar que los tres únicos genes fundamentales para tolerar la salinidad en *Arabidopsis*, *SOS1*, *SOS2* y *SOS3*, en un rastreo de mutantes sensibles al  $Na^+$ , resultaron estar también implicados en la nutrición de  $K^+$  especialmente en condiciones de bajo  $K^+$  externo (Zhu y col., 1998). Por tanto, aunque hoy en día se desconoce el papel de las proteínas SOS en la nutrición de  $K^+$ , cabe la posibilidad de que los sistemas de transporte de  $K^+$  y  $Na^+$  compartan alguno de los elementos de las cascadas de regulación CIPK/CBL mencionadas anteriormente.



**Figura 1.17. Conexión entre el  $K^+$ , el  $Na^+$  y el  $Ca^{2+}$  en la percepción de señales externas.** Tanto el elevado  $Na^+$  externo como el bajo  $K^+$  inducen señales de  $Ca^{2+}$  que activan a los CBLs. Diferentes CBLs pueden interaccionar con el mismo o con diferentes CIPKs que a su vez fosforilan y activan transportadores de  $K^+$  y  $Na^+$  manteniendo la homeostasis de estos cationes bajo condiciones adversas. Tomado de Luan 2009.



## 2. Objetivos



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos

Uno de los aspectos más importantes en la agricultura es la optimización de la aplicación de fertilizantes para una correcta nutrición de la planta. El  $K^+$  es uno de los nutrientes más importantes y el catión mineral más abundante respecto al peso seco de la planta, por lo que la nutrición de  $K^+$  es un factor clave en el cultivo de cualquier planta. En condiciones de salinidad o de riego con aguas de mala calidad, como es el caso de la Región de Murcia, la nutrición de  $K^+$  se puede ver afectada negativamente, ya que las altas concentraciones de  $Na^+$ , así como la presencia de otros elementos que puedan interferir negativamente con la nutrición de  $K^+$ , pueden desencadenar en procesos de toxicidad. Por ello, es necesario conocer de una forma exhaustiva los sistemas de absorción de  $K^+$  que se encuentran en las raíces de las plantas, y caracterizarlos fisiológica, farmacológica y molecularmente. En el caso de especies de interés agronómico existe muy poca información sobre los aspectos relacionados con la absorción de  $K^+$  desde un punto de vista molecular. Sin embargo, existen especies modelo con las que trabajar con el objetivo de una posterior extrapolación de los resultados a las especies cultivadas. Hasta la fecha existen descritos de una forma más o menos completa los dos sistemas más importantes de absorción de  $K^+$  por parte de la raíz en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*: el transportador de  $K^+$  AtHAK5 y el canal rectificador de la entrada de  $K^+$  AtAKT1. Sin embargo, existen evidencias de que existen otros sistemas que se encargan de absorber el  $K^+$  presente en el medio de crecimiento cuando AtHAK5 y AtAKT1 no están presentes, por lo que sería muy interesante poder conocerlos y caracterizarlos.

Otro factor muy importante a tener en cuenta en cuanto al correcto crecimiento de las plantas en zonas áridas o semiáridas como es la Región de Murcia, es la resistencia de las plantas frente al estrés hídrico. Los canales de  $K^+$  tienen un papel fundamental en el proceso de apertura y cierre estomático, al gobernar el flujo neto de entrada y salida de  $K^+$ , y por lo tanto contribuir a regular el turgor de las células oclusivas de los estomas. Sería interesante conocer en detalle los canales que toman parte en esta regulación, con el objetivo de mejorar la tolerancia de las plantas frente a condiciones de sequía.

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

**1. Estudio de la relevancia fisiológica del canal AtAKT1 en la respuesta frente al estrés hídrico en plantas de *A. thaliana*.**

- 1.1. Medidas de conductancia estomática (transpiración foliar) en plantas silvestres y mutantes *atakt1* y *atcipk23*.
- 1.2. Medidas de contenido interno de agua en plantas silvestres y mutantes *atakt1* y *atcipk23*.
- 1.3. Medidas de apertura y cierre de los estomas frente a ABA en plantas silvestres y mutantes *atakt1* y *atcipk23*.

**2. Estudio de la relevancia fisiológica de la absorción de  $K^+$  por parte de raíces de *A. thaliana*, a través de sistemas distintos de AtHAK5 y AtAKT1 en el rango de concentraciones de la baja afinidad.**

- 2.1. Estudio farmacológico de la entrada de  $K^+$  en raíces de plantas de *A. thaliana* deficientes en AtHAK5 y AtAKT1 en el rango de baja afinidad.
- 2.2. Estudio del crecimiento y la absorción de  $K^+$  a largo plazo en plantas de *A. thaliana* deficientes en AtHAK5 y AtAKT1 en el rango de baja afinidad cuando crecen en presencia de inhibidores de la absorción de  $K^+$ .
- 2.3. Estudio del crecimiento y la absorción de  $K^+$  a largo plazo en plantas de *A. thaliana* deficientes en AtHAK5 y AtAKT1 en el rango de baja afinidad cuando crecen en condiciones de salinidad.
- 2.4. Efecto de los nucleótidos cíclicos en el crecimiento y la absorción de  $K^+$  en plantas de *A. thaliana* deficientes en AtHAK5 y AtAKT1 en el rango de baja afinidad.
- 2.5. Estudio de la expresión génica de genes candidatos a codificar el sistema alternativo de entrada de  $K^+$  en plantas de *A. thaliana* deficientes en AtHAK5 y AtAKT1 en el rango de baja afinidad.



## 2.2. Plan de trabajo

Para la consecución de los objetivos indicados anteriormente se llevaron a cabo una serie de experimentos.

Para estudiar el papel que desempeña el canal AtAKT1 de *Arabidopsis thaliana* en la respuesta frente al estrés hídrico, se realizaron una serie de experimentos donde se calculó la pérdida de agua de rosetas, el contenido de agua de la parte aérea y la raíz, la conductancia estomática, y los movimientos de apertura y cierre estomáticos frente a distintas concentraciones de ABA. Se usaron los ecotipos Col-0 y Wassilewskija (WS), líneas WT, que expresaban todos los sistemas de absorción de  $K^+$ , entre los que se encuentra AtAKT1, y líneas *atakt1* y *atcipk23-5*, las cuales no expresaban el canal rectificador de la entrada de  $K^+$  AtAKT1 o la quinasa encargada de fosforilar y activar a dicho canal AtCIPK23, respectivamente. Estos estudios se llevaron a cabo en condiciones de cultivo hidropónico y en cultivo en suelo.

Para estudiar la relevancia fisiológica de la absorción de  $K^+$  por parte de raíces de *A. thaliana*, a través de sistemas distintos de AtHAK5 y AtAKT1 en el rango de concentraciones de la baja afinidad, se utilizaron una serie de aproximaciones fisiológicas, farmacológicas y moleculares, llevadas a cabo en experimentos a corto y a largo plazo. Se utilizaron plantas de *A. thaliana*, ecotipo Col-0, líneas WT y doble mutante *athak5,atakt1* (2M), que no expresaban los sistemas de absorción de  $K^+$  AtHAK5 y AtAKT1. Se comparó el crecimiento, la absorción de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cs^+$  y  $Na^+$ , y las concentraciones alcanzadas de todos ellos en el interior de la planta, entre las dos líneas de plantas descritas anteriormente. Asimismo, se llevó a cabo el estudio de la interacción del nucleótido cíclico N 6,2'-O-Dibutiriladenosin 3'-5'-monofosfato cíclico (NC) con estas dos mismas líneas de plantas. Por último, se estudió la expresión génica de posibles candidatos de mediar el transporte de  $K^+$  en las plantas 2M.



# 3. Materiales y Métodos



### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Material vegetal

El trabajo experimental se ha realizado con plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipos Columbia (Col-0) y Wassilewskija (WS). Del ecotipo Columbia, se emplearon plantas de la variedad silvestre (Col-0), plantas homocigotas del mutante *atakt1-2* (línea con una inserción de T-DNA en el gen *AtAKT1* y que no expresa el gen del canal AKT1), plantas homocigotas del mutante *atcipk23-5* (línea con una inserción de T-DNA en el gen *AtCIPK23* y que no expresa la proteína CIPK23), y plantas homocigotas “doble mutante *athak5,atakt1* (2M)”, resultantes del cruzamiento de plantas del mutante *athak5-3* (línea de inserción de T-DNA en el gen *AtHAK5* y que no expresa el gen del transportador HAK5) y del mutante *atakt1-2* (línea con una inserción de T-DNA en el gen *AtAKT1* y que no expresa el gen del canal AKT1). Las semillas se obtuvieron del “Arabidopsis Biological Research Center” en el caso de las mutantes *atakt1-2* y *atcipk23*, mientras que las 2M se obtuvieron en el laboratorio del Doctor Rubio. Del ecotipo WS, se emplearon plantas de la variedad silvestre (WS) y plantas homocigotas del mutante *atakt1-1* (línea con una inserción de T-DNA en el gen *AtAKT1* y que no expresa el gen del canal AKT1). Éstas últimas se obtuvieron del laboratorio del Doctor Kim, de la Universidad de California, San Diego.

#### 3.2. Reactivos químicos

Se han utilizado reactivos procedentes de las firmas Merck, Panreac Química, Sigma Chemicalco, FlukaBiochemika, GE LifeSciences, AppliedBiosystems, Pronadisa, Roche, Invitrogen y Qiagen.

Para la elaboración de la solución hidropónica de crecimiento se utilizaron sales minerales de la marca Panreac, con una pureza de calidad “PA” (para análisis).

La extracción del RNA de las plantas de *A. thaliana* se realizó mediante el RNeasy Plant mini kit de Qiagen (Qiagen Science, Maryland, USA ). La posterior eliminación del posible DNA remanente se realizó con el kit DNA-free™ de (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX). La obtención del correspondiente cDNA a partir del RNA se realizó mediante el kit “High capacity cDNA reverse transcription kit™” (Applied Biosystems), usando como transcriptasa inversa “Multiscribe reverse transcriptase”, proporcionada por el propio kit.

Las reacciones de PCR semicuantitativa se llevaron a cabo con reactivos de las marcas GE LifeSciences y Roche.

### **3.3. Sistemas de cultivo y condiciones de crecimiento.**

Las semillas de los distintos ecotipos de *A. thaliana* fueron brevemente esterilizadas superficialmente en cabina de flujo laminar (TELSTAR Mini-H) con una mezcla desinfectante de etanol al 70%, seguido de lejía comercial al 10% y SDS al 10%, durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron cinco veces con agua esterilizada para eliminar la mezcla desinfectante, quedando suspendidas en el agua usada para el quinto lavado, a 4 °C durante 72 horas y en condiciones de oscuridad para su hidratación.

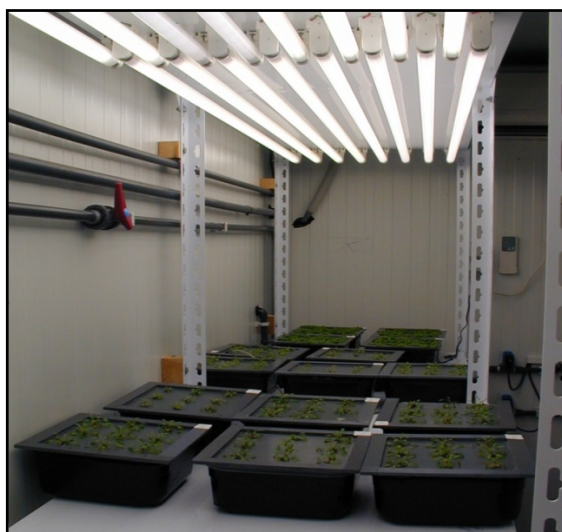
El desarrollo de las plántulas se llevó a cabo, en el caso de los experimentos realizados en medio líquido, en cultivo hidropónico (Gibeaut y col., 1997), en una cámara de cultivo de condiciones controladas. Una vez esterilizadas las semillas se germinaron sobre lana de roca, material inerte que permite un fácil crecimiento de la raíz a través del mismo. La lana se insertó en microtubos de 1,5 mL y para ello se cortaron la tapa y la punta de tantos tubos como plantas se requería germinar, y se esterilizaron en autoclave. Estos microtubos se insertaron en planchas de PVC, a las que previamente se habían realizado perforaciones con el diámetro de los microtubos. A continuación se encajaron las planchas sobre cubetas opacas de 2,5 L que contenían la solución nutritiva, cuya composición dependía del experimento a realizar, y se indicará en cada caso. En la figura 3.1 se presenta un detalle del sistema de cultivo. La solución nutritiva se renovaba cada 7 días durante las primeras 3 semanas, pasando a renovarse 2 veces por semana a partir de la cuarta semana de crecimiento. El pH se ajustaba a 5,5 mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

La distintas soluciones nutritivas utilizadas para el crecimiento de *A. thaliana* previas a la adición de los tratamientos son las descritas en la Tabla 3.1, variando únicamente en la concentración final de  $K^+$  en la solución (0,5 mM, 1,4 mM y 10 mM), dependiendo del experimento que se realice y que se desarrollará en las secciones siguientes.

Los experimentos en medio semisólido se llevaron a cabo en placas Petri de dimensiones 12 cm x 12 cm, que contenían en su interior el medio de cultivo autoclavado y solidificado con agarosa al 0,8% (p/v). Las placas se disponían en orientación vertical, y sellaban con esparadrapo hipoalergénico (Micropore TM), evitando así la contaminación del medio y permitiendo a su vez el paso de aire.

En los experimentos llevados a cabo en suelo, las semillas se depositaron sobre 90 gramos de una mezcla homogeneizada de turba y vermiculita, en proporciones (1:1), en macetas de plástico de dimensiones 8cm X 8cm, con una profundidad de 10cm. El conjunto de macetas se disponen sobre una bandeja, que hace de recipiente para albergar la solución de riego.

Para los tres medios de crecimientos descritos, se fijó un fotoperiodo de 8 horas de luz, con una temperatura y humedad relativa de 21,5°C y 65% respectivamente. Como sistema de iluminación se emplearon tubos fluorescentes (Philips TLD 36/W 83, Silvana F 36WGRO), consiguiendo una densidad homogénea de flujo de fotones de  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Detalle de los sistemas de crecimiento de *A. thaliana* en cultivo hidropónico y cámara de cultivo con iluminación y humedad controlada.

**Tabla 3.1.** Composición de la disolución nutritiva 1/5 Hoagland modificada con las distintas concentraciones de  $K^+$ .

Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración
KCl	0,5 / 1,4 / 10 mM	MnSO <sub>4</sub>	2 μM
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,4 mM	ZnSO <sub>4</sub>	2 μM
Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,1 mM	CuSO <sub>4</sub>	0,5 μM
MgSO <sub>4</sub>	0,35 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,5 μM
Fe-EDDHA	20 μM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	25 μM



### 3.4. Papel de AtAKT1 frente al estrés hídrico

#### 3.4.1. Pérdida de agua en las rosetas

Se utilizaron plantas de *A. thaliana*, ecotipo Columbia, variedades Col-0, *atakt1-2* (mutante con inserción de T-DNA en el gen ATAKT1) y *atcipk23-5* (mutante con inserción de T-DNA en el gen ATCIPK23) y plantas de *A. thaliana*, ecotipo WS, variedades WS y *atakt1-1* (mutante con inserción de T-DNA en el gen ATAKT1).

Estos experimentos se llevaron a cabo en la cámara de cultivo, bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad (Figura 3.1). Consistieron en crecer las plantas durante 60 días en recipientes de 2,5 litros que contenían la solución de crecimiento 1/5 Hoagland modificada con una concentración final de K<sup>+</sup> de 1,4 mM (Tabla 3.1). Al cabo de los 60 días de crecimiento, se cortaron las rosetas y se expusieron a desecación, dejándolas sobre la poyata del laboratorio con el envés de las hojas hacia arriba para facilitar la pérdida de agua estomática. En el punto del corte realizado para separarlas de las raíces, se colocó una tira de parafina (Parafilm™) para así evitar la pérdida de agua ocasionada por el corte. Las rosetas se fueron pesando a lo largo del tiempo, anotando los diferentes pesos frescos, y calculando la pérdida de agua como la diferencia entre cada peso y su peso inicial.

$$\text{Pérdida de agua} = \frac{P_{\text{I órgano}} - P_{\text{X órgano}}}{P_{\text{I órgano}}} \times 100$$

Donde P<sub>I</sub> es el peso inicial del órgano y P<sub>X</sub> es el peso del mismo órgano en el punto del tiempo X.

### 3.4.2. Crecimiento con PEG

En este estudio se utilizaron los mismos ecotipos y líneas que los mencionados en el punto 3.4.1.

Estos experimentos se llevaron a cabo en la cámara de cultivo, bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad (Figura 3.1). Consistían en crecer las plantas durante 60 días en recipientes de 2,5 litros que contenían la solución de crecimiento 1/5 Hoagland modificada con una concentración final de K<sup>+</sup> de 1,4 mM o de 10 mM de K<sup>+</sup> (Tabla 3.1). Al cabo de los 60 días, la mitad de las plantas se pasaron a recipientes con la misma solución en la que habían crecido (tratamiento control), mientras que la otra mitad se pasaron a recipientes que contenían esa misma solución de crecimiento con poly(ethylene glycol) (PEG, MW= 8000) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Munich, Germany) disuelto en ella hasta alcanzar un  $\Psi\pi = -0,6$  MPa. Cuando habían transcurrido 3 horas desde que las plantas se encontraban en estas soluciones, se procedió a medir la conductancia estomática de las hojas intactas con un porómetro portátil (AP4 model, Delta-T Devices, Cambridge, UK).

A las 24 horas, se procedió a lavar las raíces con agua fría, separando la parte aérea de la raíz para así obtener los pesos frescos de cada órgano vegetal. Se introdujeron en un horno a 65°C durante una semana, y se obtuvieron los pesos secos. Para determinar las concentraciones internas de iones en partes aéreas y raíces se hizo de acuerdo a lo citado en el punto 3.6.3

El porcentaje de contenido de agua interno se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Contenido agua interno} = \frac{PF_{\text{órgano}} - PS_{\text{órgano}}}{PF_{\text{órgano}}} \times 100$$

*Donde PF es el peso fresco del órgano, y PS es el peso seco.*

### 3.4.3. Ensayos de apertura estomática

En este estudio se utilizaron los mismos ecotipos y líneas que los mencionados en el punto 3.4.1.

Se crecieron las plantas de *A. thaliana* en solución nutritiva 1/5 Hoagland modificada con una concentración final de  $K^+$  de 10 mM (Tabla 3.1) durante 60 días. Al cabo de este tiempo, se realizó un peeling del envés de las hojas ayudándonos de unas pinzas, para obtener la epidermis de las mismas. Las tiras de epidermis obtenidas se dispusieron en placas de Petri que contenían la solución de incubación (50 mM KCl, 10 mM MES-KOH, pH 6.5, 10  $\mu$ M  $CaCl_2$ ), y se dejaron durante 3 horas en la cámara de cultivo bajo condiciones de temperatura, humedad y luz controladas.

Al cabo de las 3 horas, las tiras de epidermis se transfirieron a otras placas que contenían la misma solución de incubación, con la salvedad de que algunas de ellas contenían ácido abscísico (ABA, Sigma Aldrich) a concentraciones de 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M, mientras que otras solo contenían la solución de incubación (control). El ABA se preparó disolviéndolo a una concentración de 100 mM en metanol, para que así la concentración final del alcohol no superara el 0,01% en la solución final. Estas placas se dejaron durante 30 minutos en las mismas condiciones antes mencionadas, bajo la luz, y al cabo de este tiempo se comenzó a hacer mediciones de la apertura estomática (tamaño del poro). Las medidas se realizaron a los 30, 60, 120 y 180 minutos desde que se añade el ABA, con un microscopio óptico (Olympus CKX41) unido a un ordenador a través de una cámara fotográfica (ALTRA 20).

Durante el tiempo transcurrido entre la primera medición y la última, las tiras de epidermis estuvieron bajo las mismas condiciones de luz que en la cámara de cultivo, para así no variar las condiciones de crecimiento.

Cada experimento se realizó por triplicado, usando al menos 5 tiras de epidermis de distintas hojas, que a su vez son de distintas plantas, para cada tratamiento. En cada punto del tiempo, se realizan al menos 100 medidas de apertura estomática.

La medida de la apertura del poro del estoma se realizó mediante el software Image J.

#### 3.4.4. Crecimiento en macetas con suelo

Este experimento se llevó a cabo con plantas de *A. thaliana*, ecotipo Columbia, variedades Col-0 y *atakt1-2* (mutante con inserción de T-DNA en el gen AtAKT1).

Las plantas se sembraron en macetas que contenían 90 gramos de una mezcla 1:1 de vermiculita y turba. Estas macetas se separaron en grupos de 12, puestas en bandejas, y regadas con 500 ml de solución Hoagland modificada con una concentración de  $K^+$  de 10 mM (Tabla 3.1) a la semana, durante 60 días. Todo este proceso se llevó a cabo en la cámara de cultivo, bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad, como indicamos en los puntos anteriores.

Antes de detener el riego, se regaron las macetas hasta saturación (50 ml de solución de riego en cada maceta), para a continuación retirar la solución sobrante dos veces, con una hora de intervalo entre cada una.

Durante el periodo en el que se retiró el riego, se dejaron algunas macetas sin plantas, para así poder calcular la evaporación que se produce en el sustrato. El consumo de agua por parte de las plantas se calculó como la diferencia entre la pérdida de agua de las macetas con plantas menos la media de la pérdida de agua de las macetas sin plantas, para los periodos indicados. Un grupo de plantas no dejó de ser regado (plantas control).

Se hicieron cosechas de plantas a los 0, 14 y 29 días para determinar sus pesos frescos y pesos secos tras secarlas en estufa de 65°C durante una semana, y procedimos a digerirlas con una mezcla ácida de  $HNO_3:HClO_4$  (2:1, v:v), para determinar la concentración de  $K^+$  por espectrometría de absorción atómica en un espectrómetro AAnalyst 400 Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA).

A los 14 días se midió la conductancia estomática de las hojas intactas de cada una de nuestras variedades con un porómetro portátil (AP4 model, Delta-T Devices, Cambridge, UK).

### 3.5. Estudio de los sistemas de absorción de $K^+$ de baja afinidad.

#### 3.5.1. Estudio farmacológico de la entrada de $K^+$ . Experimentos de absorción por desaparición en el medio.

Se utilizaron plantas de *A. thaliana*, ecotipo Columbia, variedades Col-0 y 2M (doble mutante, con inserciones de T-DNA en los genes ATHAK5 y ATAKT1).

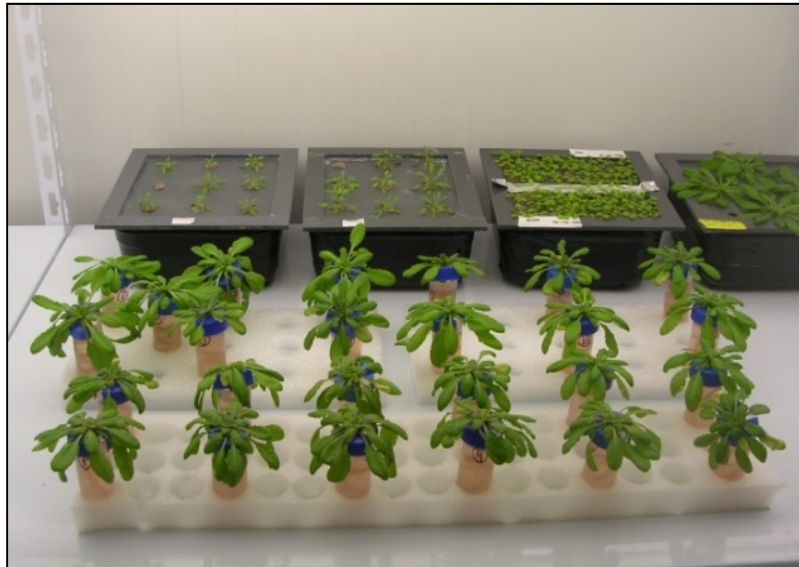
Los experimentos de absorción de  $K^+$  por desaparición en el medio se realizaron en la cámara de cultivo, bajo condiciones controladas utilizando siempre el mismo sistema de cultivo (Figura 3.1). Consistían en crecer las plantas durante 30 días en una solución de 1/5 Hoagland modificado con un suplemento de 10 mM de  $K^+$  (Tabla 3.1), para así evitar diferencias en el crecimiento debidas a la ausencia de los distintos sistemas de absorción de  $K^+$  en las plantas 2M. A los 30 días, tanto las plantas silvestres como las mutantes se transfirieron a barreños con solución 1/5 Hoagland modificado con una concentración final de  $K^+$  de 0,5 mM (Tabla 3.1), para que así las plantas consumiesen el exceso de  $K^+$  que almacenaban en su interior. Se mantuvieron durante 8 días, al cabo de los cuales se tomó un muestreo inicial  $M_0$ . A continuación, las plantas se lavaron con solución 1/5 Hoagland fría sin  $K^+$  para eliminar los restos de cationes que pudiesen quedar en la raíz, y se introdujeron en tubos Falcon que contenían la solución nutritiva para determinar la absorción de  $K^+$ : 11 ml de 1/5 Hoagland modificado con una concentración de  $K^+$  de 1 mM, así como distintos inhibidores (Tabla 3.4). En un grupo de plantas no se adicionó ningún inhibidor, constituyendo el grupo control de la absorción de  $K^+$ . Las plantas se mantuvieron en estas condiciones durante 72 horas, en las cuales se añadía agua destilada para reponer el agua perdida por evapotranspiración, para así evitar la concentración de los distintos iones que había en la misma, manteniendo un volumen constante de 11 ml (Figura 3.2).

Asimismo, se realizó un experimento similar en el que se estudió la absorción de  $K^+$  por parte de estas dos líneas de plantas en solución nutritiva 1/5 de Hoagland modificada con una concentración final de 1 mM de  $K^+$ , con la presencia o no del nucleótido cíclico N 6,2'-O-Dibutiriladenosin 3'-5'-monofosfato cíclico (NC), a concentraciones de 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M.

Al cabo de las 72 horas con los distintos tratamientos, se determinaron las concentraciones de  $K^+$  de las soluciones por espectrometría de emisión atómica usando un espectrofotómetro Perkin- Elmer modelo *A Analyst 400*. Se utilizaron al menos cinco plantas por ecotipo, tratamiento y experimento.

**Tabla 3.2. Concentración de los distintos inhibidores añadidos a la solución utilizados para estudiar la absorción de  $K^+$ .**

Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración
NH <sub>4</sub> Cl	0,5 mM	CaCl <sub>2</sub>	5 mM
	1 mM		10 mM
	5 mM		20 mM
	10 mM		
Ácido Glutámico	1 mM	BaCl <sub>2</sub>	0,5 mM
	5 mM		1 mM
NaCl	10 mM	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	20 mM		5 mM
	30 mM		10 mM
	50 mM		
CsCl	0,25 mM	LaCl <sub>3</sub>	5 mM
	0,5 mM		10 mM
	0,75 mM		



**Figura 3.2. Detalle del experimento de absorción de  $K^+$  por desaparición en el medio en tubos Falcon bajo condiciones controladas.**

Al finalizar el experimento de absorción de  $K^+$ , se separó la parte aérea de la raíz de todas las plantas, lavándose la raíz con agua destilada fría para eliminar los cationes externos. Se secaron tanto parte aérea como raíz y se determinaron los pesos frescos. El material se secó a continuación en una estufa a 65° C durante 7 días y se halló el peso seco.

Para determinar las concentraciones internas de iones en partes aéreas y raíces se hizo un análisis mineral de los órganos de la planta, de acuerdo con lo expuesto en el punto 3.6.3.

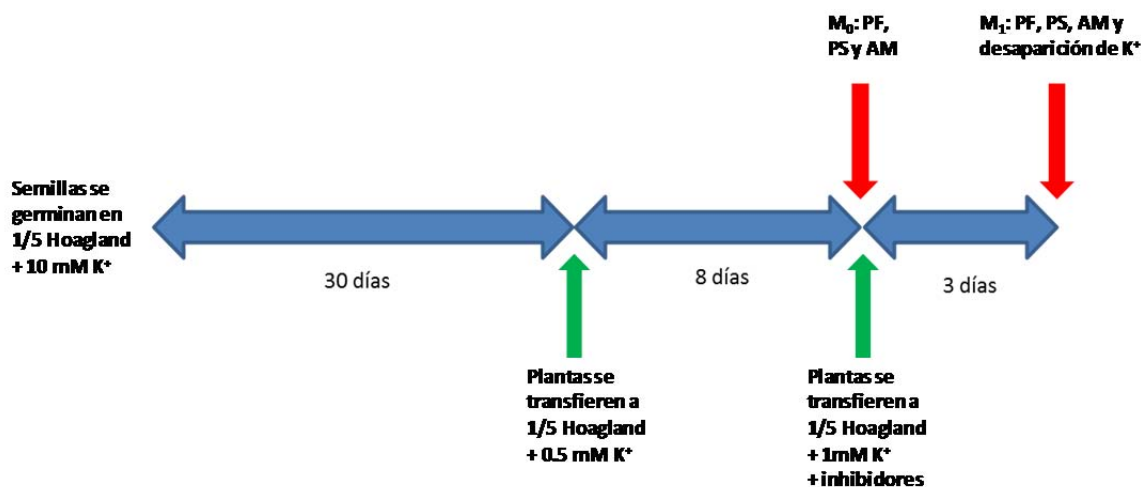


Figura 3.3. Diseño experimental empleado para estudiar el efecto de distintos inhibidores en la absorción de  $K^+$  en plantas de *A. thaliana*, ecotipo Columbia, variedades Col-0 y 2M. Las flechas rojas indican los momentos en los que se cosecharon plantas para obtener pesos frescos (PF), pesos secos (PS), análisis mineral (AM) y desaparición de  $K^+$  de la solución externa.

### 3.5.2. Estudios de crecimiento y absorción de $K^+$ a largo plazo. Efecto del $Ca^{2+}$ , del $Cs^+$ , y del $Na^+$ .

Con el fin de determinar el crecimiento y la absorción de  $K^+$  a largo plazo de las líneas de *A. thaliana* mencionadas en el punto anterior (Col-0 y 2M), se llevaron a cabo dos aproximaciones: una consistente en el estudio del crecimiento y la velocidad de crecimiento de estas plantas, llevado a cabo en placas, con un medio de crecimiento semisólido, y otra consistente en el estudio del crecimiento, la absorción de  $K^+$ , y la concentración alcanzada en el interior de las plantas WT y 2M llevada a cabo en cultivo hidropónico.



### 3.5.2.1. Crecimiento en placa

Estos experimentos de crecimiento en placa se realizaron en la cámara de cultivo, bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad relativa, como se indica en el punto 3.3.1.

La germinación y el crecimiento de las semillas esterilizadas (según punto 3.3.1.) de *A. thaliana* se realizó en placas con solución 1/5 Hoagland modificada con una concentración de  $K^+$  de 10 mM (Tabla 3.1), solidificadas con agarosa (Agarose D1 Low EEO, Pronadisa) hasta obtener una concentración de la misma de 0,8% (p/v), para así evitar diferencias en el crecimiento entre las plantas silvestres y las mutantes.

Al cabo de los 7 días creciendo en estas condiciones, se transfirieron las plantas de porte similar, siempre en condiciones de esterilidad, a unas nuevas placas Petri de 12 cm x 12 cm, pero esta vez con un medio distinto: 1/5 Hoagland modificado con una concentración final de  $K^+$  de 1 mM, que a su vez contenía el inhibidor de la absorción de  $K^+$  objeto de estudio, autoclavadas y solidificadas con agarosa al 0,8% (p/v). En un grupo de plantas no se adicionó ningún inhibidor, actuando como grupo control del crecimiento y la absorción de  $K^+$  (Figura 3.4 A).

Las placas se mantuvieron en la cámara de cultivo durante al menos 30 días, orientadas verticalmente para así poder estudiar cómo afectaban los distintos inhibidores usados a la velocidad de crecimiento de la raíz a lo largo del tiempo. Este estudio se llevó a cabo escaneando las placas periódicamente, para medir la longitud de las raíces a distintos tiempos, procesando las imágenes con el programa *Image J* (Figura 3.4 A).

Además, se realizó un experimento similar en el que las plantas de las dos variedades crecidas durante 7 días en placas con solución 1/5 Hoagland modificada con una concentración de  $K^+$  de 10 mM (Tabla 3.1), como se indica en esta página, se transfirieron a placas que contenían solución nutritiva 1/5 de Hoagland modificado con una concentración final de  $K^+$  de 1 mM, al que se le adicionaba el nucleótido cíclico N 6,2'-O-Dibutiriladenosin 3'-5'-monofosfato cíclico (NC), a concentraciones de 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M, durante 7 días. En un grupo de plantas no se adicionó ningún inhibidor, actuando como grupo control del crecimiento y la absorción de  $K^+$  (Figura 3.4 B).

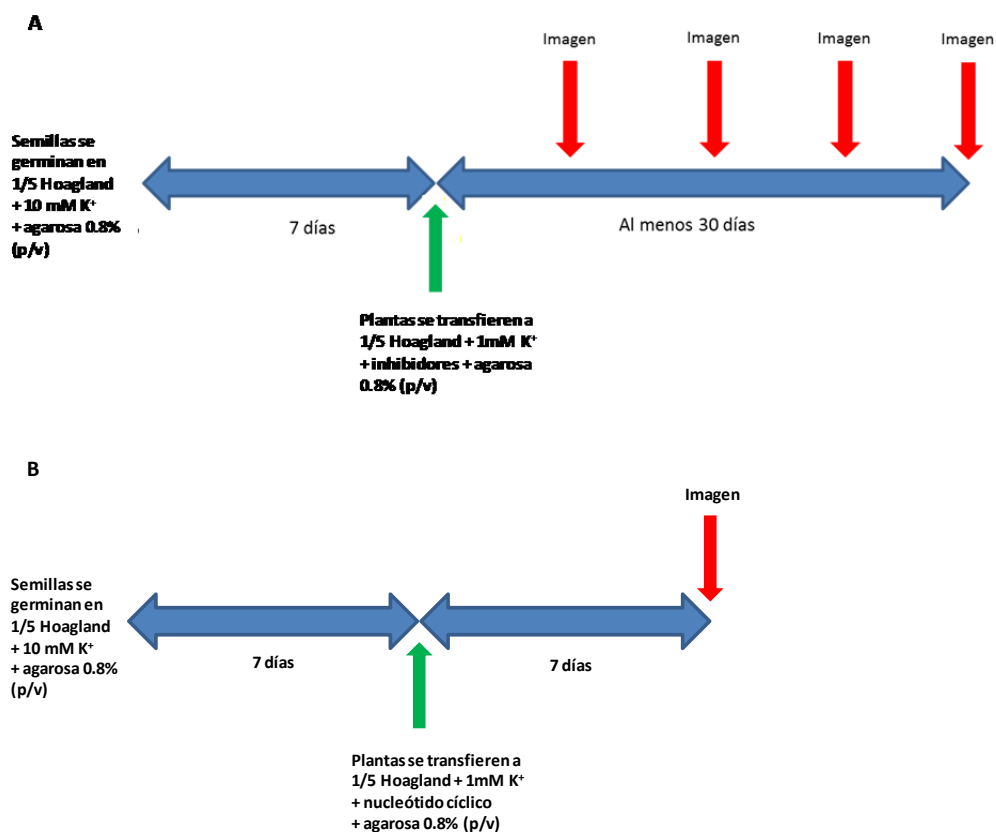


Figura 3.4. Diseño experimental empleado para estudiar el efecto de distintos inhibidores (A) y del nucleótido cíclico N 6,2'-O-Dibutiriladenosin 3'-5'-monofosfato cíclico (B) en el crecimiento y la velocidad de crecimiento de plantas de *A. thaliana*, ecotipo Columbia, variedades Col-0 y 2M, en placa. Las flechas rojas indican los momentos en los que se toman imágenes de la placa y se mide la longitud de la raíz.

### 3.5.2.2. Crecimiento en solución nutritiva

Los experimentos de crecimiento se realizaron en la cámara de cultivo, bajo condiciones controladas como se ha indicado anteriormente en el punto 3.3.1. Estos experimentos consistieron en crecer las plantas durante 30 días en una solución de 1/5 Hoagland modificado con una concentración final de K<sup>+</sup> de 10 mM (Tabla 3.1), para así evitar diferencias en el crecimiento debidas a la ausencia de los distintos sistemas de absorción de K<sup>+</sup>

en las plantas 2M. A los 30 días, tanto las plantas silvestres como las mutantes se transferían a barreños con solución 1/5 Hoagland modificado con una concentración final de  $K^+$  de 0,5 mM (Tabla 3.1), para que así las plantas consumiesen el exceso de  $K^+$  que almacenaban en su interior. Se mantuvieron en ellas durante 8 días, al cabo de los cuales se tomó un muestreo inicial  $M_0$ . A continuación, las plantas se transfirieron a barreños que contenían 1/5 Hoagland modificado con una concentración de  $K^+$  de 1 mM. A esta solución se le añadieron los distintos inhibidores en cada caso, manteniendo un grupo de plantas sin ningún inhibidor, actuando como control, y se mantuvieron durante 21 días, en los cuales se fueron tomando muestreos de plantas cada 7 días para poder estudiar el efecto de los inhibidores en el crecimiento de la planta, así como la velocidad de absorción de  $K^+$  por parte de la planta en presencia de estos inhibidores, y las concentraciones minerales alcanzadas en el interior de las mismas. La solución se renovó 2 veces por semana. Se utilizaron al menos cinco plantas por ecotipo, tratamiento y tiempo de muestreo.

**Tabla 3.3. Concentración de los distintos inhibidores utilizados para estudiar la absorción de  $K^+$  y el crecimiento de las plantas.**

Compuesto	Concentraciones
CaCl <sub>2</sub>	15 mM
	25 mM
CsCl	0,1 mM
	0,25 mM
CaCl <sub>2</sub> + CsCl	15 mM + 0,25 mM
	25 mM + 0,1 mM
NaCl	20 mM
CaCl <sub>2</sub> + NaCl	15 mM + 20 mM

Como en las aproximaciones anteriores, se realizó un estudio similar para observar el efecto del nucleótido cíclico N 6,2'-O-Dibutiriladenosin 3'-5'-monofosfato cíclico (NC), en este caso sobre el flujo neto de K<sup>+</sup> existente en las plantas de ambas líneas durante un periodo de tiempo mayor. Las plantas se crecieron durante 30 días en solución nutritiva 1/5 Hoagland con 10 mM de K<sup>+</sup>. Posteriormente se pasaron durante 8 días a esta misma solución, pero con una concentración de K<sup>+</sup> de 0,5 mM, y finalmente crecieron durante 7 días en solución nutritiva 1/5 Hoagland modificada con una concentración de K<sup>+</sup> de 1 mM, en presencia o no del NC a concentraciones de 100 µM o 200 µM.

Al finalizar los experimentos, se separó la parte aérea de la raíz de todas las plantas, lavándose la raíz con agua destilada fría para eliminar los cationes externos y se determinaron los pesos frescos tanto de la parte aérea como de la raíz. El material se secó a continuación en una estufa a 65° C durante 7 días y se halló el peso seco. Para determinar las concentraciones internas de iones en partes aéreas y raíces se hizo de acuerdo a lo citado anteriormente en el punto 3.5.1.

La absorción por parte de la raíz de cada catión se calculó como:

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

*donde R es el peso seco de la raíz, C es el contenido total del catión de la planta entera y t es el tiempo.*

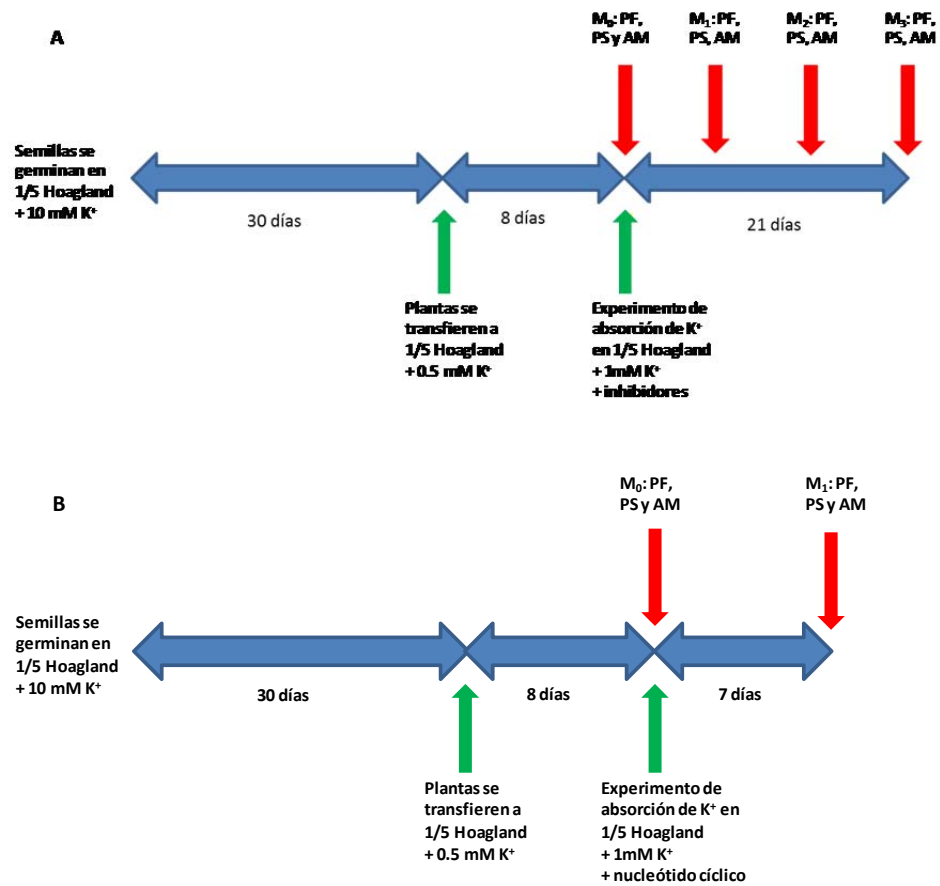


Figura 3.5. Diseño experimental empleado para estudiar el efecto de distintos inhibidores (A) y del nucleótido cíclico (B) N 6,2'-O-Dibutiriladenosin 3'-5'-monofosfato cíclico en el crecimiento, la absorción y la concentración interna de K<sup>+</sup> en plantas de *A. thaliana*, ecotipo Columbia, variedades Col-0 y 2M. Las flechas rojas indican los momentos en los que se cosecharon plantas para obtener pesos frescos (PF), pesos secos (PS) y análisis mineral (AM) de las dos variedades.

### **3.6. Técnicas Analíticas**

#### **3.6.1. Estudio de la expresión genética mediante PCR semicuantitativa**

Para abordar el estudio de posibles genes responsables de la absorción de  $K^+$  en plantas que carecen de los sistemas de absorción de  $K^+$  AtAKT1 y AtHAK5, se eligió la técnica de la PCR semicuantitativa.

Cuando las plantas objeto de estudio superaban su fase de crecimiento en 1/5 de Hoagland modificado con una concentración de 10 mM de  $K^+$  (30 días) y la fase de crecimiento en 1/5 de Hoagland modificado con una concentración de 0,5 mM de  $K^+$  (8 días), la mayoría de las plantas pasaban a soluciones con los distintos inhibidores de la absorción de  $K^+$ , si bien algunas de ellas eran congeladas a  $-80^{\circ}C$ . Estas plantas fueron posteriormente introducidas en nitrógeno líquido y sometidas a una serie de técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos, para poder observar la expresión de los genes de interés. El orden de estas técnicas fue el siguiente:

##### **3.6.1.1. Extracción de RNA total en plantas de *A. thaliana***

La extracción del RNA de las plantas de *A. thaliana* se realizó mediante el RNeasyPlant mini kit de Qiagen (QiagenScience, Maryland, USA ) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se pasaron 100 mg de material vegetal en polvo previamente triturado en un mortero con nitrógeno líquido a un microtubo de 1,5 mL con 450  $\mu$ L de tampón RLT y 4,5  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol. Se mezcló varias veces con un agitador y se transfirió la mezcla a las columnas suministradas por el fabricante. Tras centrifugar las columnas, se precipitó el RNA que estaba en el efluente con alcohol etílico y se transfirieron a otras columnas. Tras sucesivas centrifugaciones en presencia de tampones de lavado, se eluyó el RNA de la columna con agua libre de RNAsa hasta un volumen adecuado. Posteriormente, se trató el RNA con DNA-free™ (AppliedBiosystems/Ambion, Austin, TX) siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar el DNA presente en las muestras. Seguidamente, se cargaron 2  $\mu$ L de la solución con el RNA en un gel de agarosa (gel y cubeta previamente tratados con SDS al 10%) para comprobar

la integridad del ácido nucleico. A continuación, se realizaron PCRs para comprobar la completa eliminación de DNA.

La medida de concentración de RNA se realizó de dos formas: la primera consistió en cargar 2  $\mu$ L de RNA en un gel de agarosa (gel y cubeta previamente tratados con SDS al 10%), estimando la concentración de RNA por comparación con patrones de peso molecular de masa conocida sometidos a electroforesis en el mismo gel; la segunda consistió en la técnica de espectrometría a través de un Nanodrop 1000 Spectrophotometer THERMO SCIENTIFIC.

#### 3.6.1.2. Síntesis de cDNA

La primera cadena de cDNA se sintetizó a partir del RNA total extraído de las plantas. Para ello se utilizó el kit “High capacity cDNA reverse transcription kit <sup>TM</sup>” (Applied Biosystems), partiendo de 2  $\mu$ g de RNA y usando como transcriptasa inversa “Multiscribe reverse transcriptase”, proporcionada por el propio kit. Una vez obtenida la primera cadena de cDNA, la síntesis del cDNA de cadena doble se obtuvo mediante PCR utilizando cebadores apropiados.

#### 3.6.1.3. Amplificación por PCR de fragmentos de DNA

Para cada reacción se utilizaron distintas cantidades de cDNA, 0,2 mM dNTP (dATP + dCTP + dGTP + dTTP, Roche), tampón de PCR, 1 U de Taq I DNA polimerasa (GE Life Sciences) y dos cebadores, uno sentido y otro antisentido en un volumen de 50  $\mu$ L. Las reacciones se llevaron a cabo usando el Termociclador PTC 200 (MJ Research). En cada grupo de reacciones se introducía un control negativo sin cDNA. Se analizaron todas las reacciones mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar que se había producido la amplificación del DNA y que los productos de PCR tenían el tamaño adecuado. La Tabla 3.6 muestra con detalle las proporciones de reactivos para la PCR.

**3.6.1.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

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

**Tabla 3.6. Composición detallada de la mezcla de reacción utilizada para cada PCR.**

Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración
cDNA	Variable	Cebadores	Variable
dCTC	0,2 mM	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dTTP	0,2 mM	KCl	50 mM
dATP	0,2 mM	Taq Polimerasa	1
dGTP	0,2 mM	V. Final	50
		Nº ciclos	Variable



### 3.6.2. Estudio del potencial de membrana

Se llevó a cabo el estudio de la actividad eléctrica registrada en la membrana plasmática de células epidérmicas y corticales de plantas de *A. thaliana*, ecotipo Columbia, variedades Col-0 y 2M (doble mutante, con inserciones de T-DNA en los genes ATHAK5 y ATAKT1).

Las plantas se cultivaron en medio semisólido, en placas en posición vertical con solución de crecimiento 1/5 Hoagland modificada con una concentración final de  $K^+$  de 10 mM durante 10 días. A continuación, las plántulas se montaron en una cámara de perfusión acoplada a la pletina de un microscopio. La cámara era bañada con una solución tampón control (5 mM MES-Ca pH 6.1, con una concentración de  $K^+$  de 1  $\mu$ M) con una velocidad de perfusión de 10 ml  $min^{-1}$ . Con la ayuda de un micromanipulador, los microelectrodos de borosilicato eran introducidos en las primeras capas de células de la raíz hasta obtener un potencial estable. Una vez estabilizado el registro del potencial, se procedió a cambiar la solución de perfusión, variando únicamente la concentración final de KCl, para poder comparar los registros de potencial eléctrico de membrana en las plantas silvestres como en las mutantes.



**Figura 3.6.** *Cabina de Faraday en la que se llevaron a cabo los registros de potencial de membrana con microelectrodos simples.*

### 3.6.3. Análisis del contenido mineral interno de las plantas

Al finalizar los experimentos, y en el caso que fuese necesario, se separó la parte aérea de la raíz de las plantas, lavándose la raíz con agua destilada fría para eliminar los cationes externos. A continuación, tanto parte aérea como raíz se secaron en una estufa a 65° C durante 7 días. Tras este periodo de tiempo, se realizaron digestiones ácidas con una solución HNO<sub>3</sub> -HClO<sub>4</sub> (2:1). Para ello se pesaron 0,1 g de material vegetal o en su defecto, si la muestra no llegaba a este peso, la cantidad de material vegetal total obtenida. Se adicionaron 3 ml de la solución de ácido nítrico – ácido perclórico, tapando la boca del tubo con canicas de cristal para evitar la evaporación del ácido, dejándolas durante toda la noche a temperatura ambiente para que comenzara a digerirse la materia orgánica. Seguidamente se colocaron los tubos en un digestor a 120°C durante 3 horas, tras lo cual se subió la temperatura a 180°C durante 2 horas. Finalmente se aumentó la temperatura a 210°C entre 4 y 6 horas hasta la decoloración de la muestra y volumen final inferior a 0,5 ml. Posteriormente y después de enfriarse, se llevó con agua bidestilada hasta 25 ml.

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

# 4. Resultados y Discusión



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Papel de AtAKT1 en la regulación de la transpiración

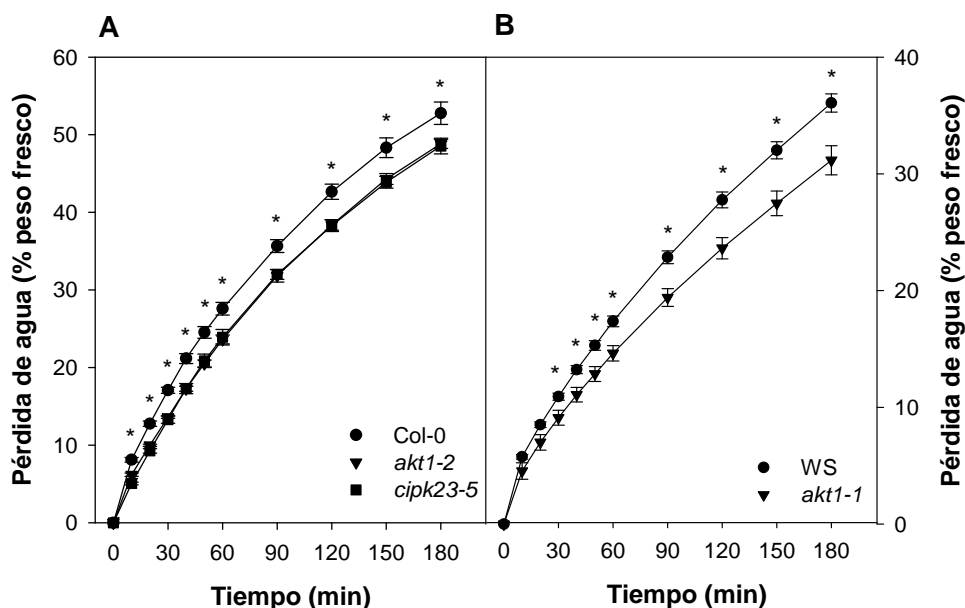
#### 4.1.1. Pérdida de agua en rosetas cortadas

Estudios previos han demostrado que la proteínquinasa CIPK23 regula la absorción de  $K^+$  a través de la fosforilación de AKT1 (Li y col., 2006; Xu y col., 2006), entrando en juego el complejo CBL1/CBL9 – CIPK23 previamente descrito en la introducción de esta tesis. Por otro lado, también está demostrado que las plantas mutantes *atcipk23* muestran una transpiración diferente a la que experimentan las plantas silvestres de su mismo ecotipo (Cheong y col., 2007). Bajo las condiciones de sequía usadas en el estudio que realizaron estos autores, aproximadamente el 70% de las plantas mutantes *atcipk23* sobrevivieron, mientras que las plantas WT experimentaron una tasa de supervivencia mucho menor, de aproximadamente un 20%. Con estos resultados podían afirmar que la pérdida del gen CIPK23 incrementa la tolerancia frente a la sequía (Cheong y col., 2007). Teniendo en cuenta estos dos factores, se decidió comprobar si AKT1 podría también estar relacionado en el control de la transpiración foliar.

Como primera aproximación, se comprobó la pérdida de peso (principalmente debido a la pérdida de agua) en rosetas cortadas de plantas WT y *atakt1-2* del ecotipo Col-0, así como de plantas WT y *atakt1-1* pertenecientes al ecotipo WS. Como control experimental se utilizaron plantas mutantes *atcipk23* en el ecotipo Col-0, que se obtuvieron del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), línea Salk\_138057 homocigota, denominada *cipk23-5* (Col-0).

En los experimentos se observó que en las plantas del ecotipo Col-0, aquellas pertenecientes a la línea WT perdieron aproximadamente el 50% de su peso fresco al cabo de 3 horas, mientras que las plantas de las líneas *atakt1-2* y *atcipk23-5* mostraron porcentajes significativamente más bajos de pérdida de agua durante el experimento (Figura 4.1 A).

Algo similar ocurre en las rosetas de las plantas del ecotipo WS, donde las correspondientes a la línea WT pierden cerca de un 40% de su peso fresco al ser cortadas de su raíz y expuestas a desecación, mientras que las plantas mutantes *atakt1-1* siempre presentaron valores más bajos de pérdida de agua que los que presentaban las plantas control (Figura 4.1 B).

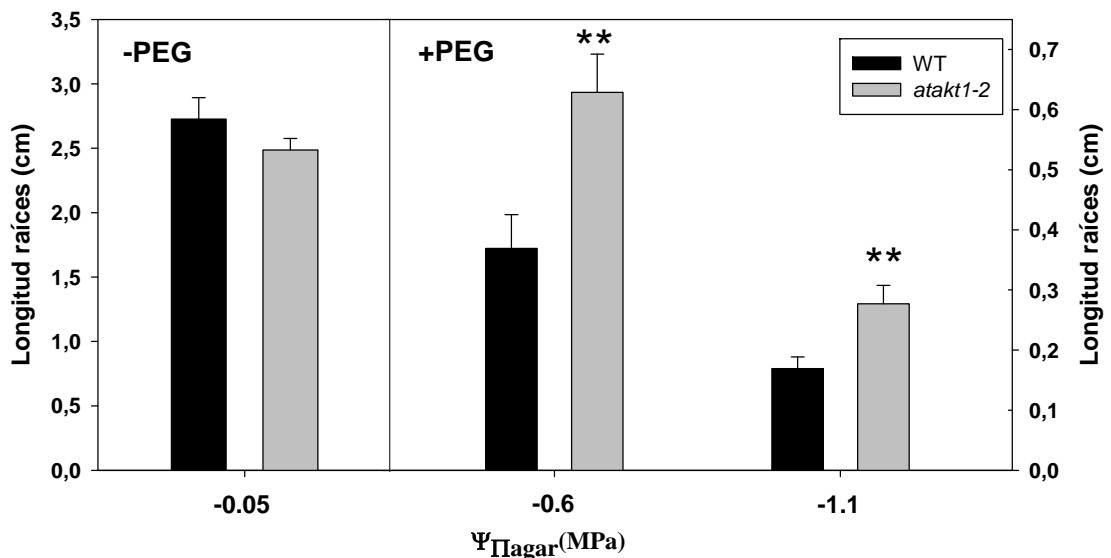


**Figura 4.1.** Las rosetas escindidas de las plantas *atakt1* mostraron menor pérdida de agua que las correspondientes a las plantas WT. Las plantas se crecieron durante 60 días en cultivo hidropónico, para a continuación cortarles las rosetas y depositarlas en bandejas en el laboratorio. La pérdida de peso (principalmente agua) de las rosetas se siguió a lo largo del tiempo y se representó como el porcentaje del peso inicial de cada roseta. Los datos correspondientes a las plantas WT (círculos), *atakt1-2* (triángulos) y *atcipk23-5* (cuadrados) en Col-0 (A) y a las plantas WT (círculos), y *atakt1-1* (triángulos) en WS (B) se muestran como promedios  $\pm$  SE ( $n = 5-7$ ). \* Indica diferencias significativas en ANOVA ( $P < 0.05$ ) entre las rosetas mutantes y las WT.

#### 4.1.2. Respuesta al estrés hídrico en plantas bajo cultivo hidropónico

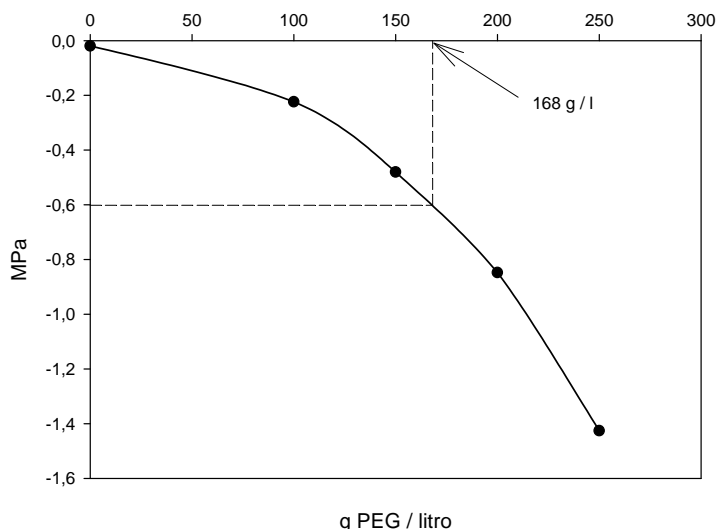
Para poder confirmar el fenotipo referente a la desecación de las plantas *atakt1*, las líneas de los dos ecotipos mencionadas en el punto anterior se sometieron a un estrés hídrico inducido por la adición de PEG a la solución de crecimiento utilizada para el cultivo hidropónico de las plantas.

En experimentos preliminares en placas que contenían el medio de cultivo solidificado con agarosa, con distintas concentraciones de PEG, se observaron respuestas muy distintas entre las plantas WT y las plantas mutantes (Figura 4.2). En ausencia de estrés hídrico ( $\Psi_{\pi} = -0,05$  MPa), la longitud de las raíces de ambas líneas no mostraban diferencias significativas, mientras que al aplicar PEG la respuesta entre plantas silvestre y mutantes difería: cuando el potencial hídrico del medio de crecimiento disminuía hasta valores de  $-0,6$  MPa, la longitud de las raíces de las plantas *atakt1-2* era significativamente mayor que la mostrada por las plantas WT. Los mismos resultados se obtenían cuando se aplicaba PEG hasta alcanzar un potencial hídrico de  $-1,1$  MPa (Figura 4.2). De estos experimentos preliminares se seleccionó el tratamiento de PEG que daba lugar a un potencial hídrico ( $\Psi_{\pi}$ ) de  $-0,6$  MPa para los estudios posteriores, ya que aumentar la cantidad de PEG añadido al medio de crecimiento hasta valores de  $-1,1$  MPa podría ser un estrés que las plantas no pudiesen soportar durante el periodo de tiempo que durase el experimento.



**Figura 4.2.** Las raíces de las plantas mutantes de *Arabidopsis atakt1-2* mostraron un mayor crecimiento cuando se añadía PEG hasta alcanzar potenciales hídricos de  $-0,6$  MPa y  $-1,1$  MPa. En ausencia de estrés hídrico ( $\Psi_{\pi}$  medio de crecimiento =  $-0,05$ MPa), no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de las raíces de ambas líneas. Las columnas correspondientes a WT y *atakt1-2* se muestran como promedios  $\pm$  SE ( $n = 5-7$ ). \* Indica diferencias significativas en ANOVA ( $P < 0.01$ ) entre las longitudes de las raíces de las plantas mutantes y las de las WT.

Para calcular la cantidad de PEG que era necesario añadir a un volumen determinado de solución de crecimiento para llegar al potencial hídrico deseado, se construyó una curva patrón que relacionaba el PEG añadido con el potencial hídrico ( $\Psi_{\pi}$ ). Mediante interpolación en dicha curva patrón se obtuvieron los gramos de PEG necesarios para tener un potencial hídrico de -0,6 MPa (Figura 4.3).



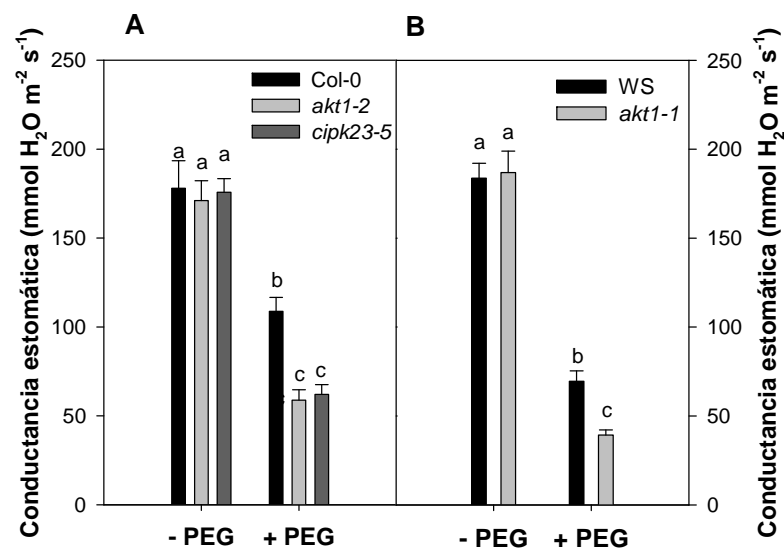
**Figura 4.3. Curva-patrón donde relacionamos los g PEG/l con el potencial hídrico.** Para un potencial hídrico de -0,6 MPa, es necesario añadir 168 gramos de PEG ( $M_w=8000$ ) a un litro de solución nutritiva 1/5 Hoagland modificada con una concentración final de  $K^+$  de 1,4 mM.

Así, las plantas se crecieron durante 60 días bajo condiciones normales (1/5 Hoagland modificado con una concentración final de  $K^+$  de 1,4 mM). A continuación, la mitad de las plantas se transferían a una solución igual a la mencionada anteriormente, a la que además se adicionaba PEG para bajar el potencial hídrico hasta -0,6 MPa. La otra mitad de las plantas se mantuvieron en la solución de crecimiento, sin adicionar PEG, como control experimental.

Tras 3 horas de tratamiento con estrés hídrico, se realizaron medidas de conductancia estomática en los dos grupos de plantas, sin causar daños fisiológicos en las mismas. Las plantas se mantuvieron en estas mismas condiciones durante 24 horas más, pasando a medir su contenido en agua.



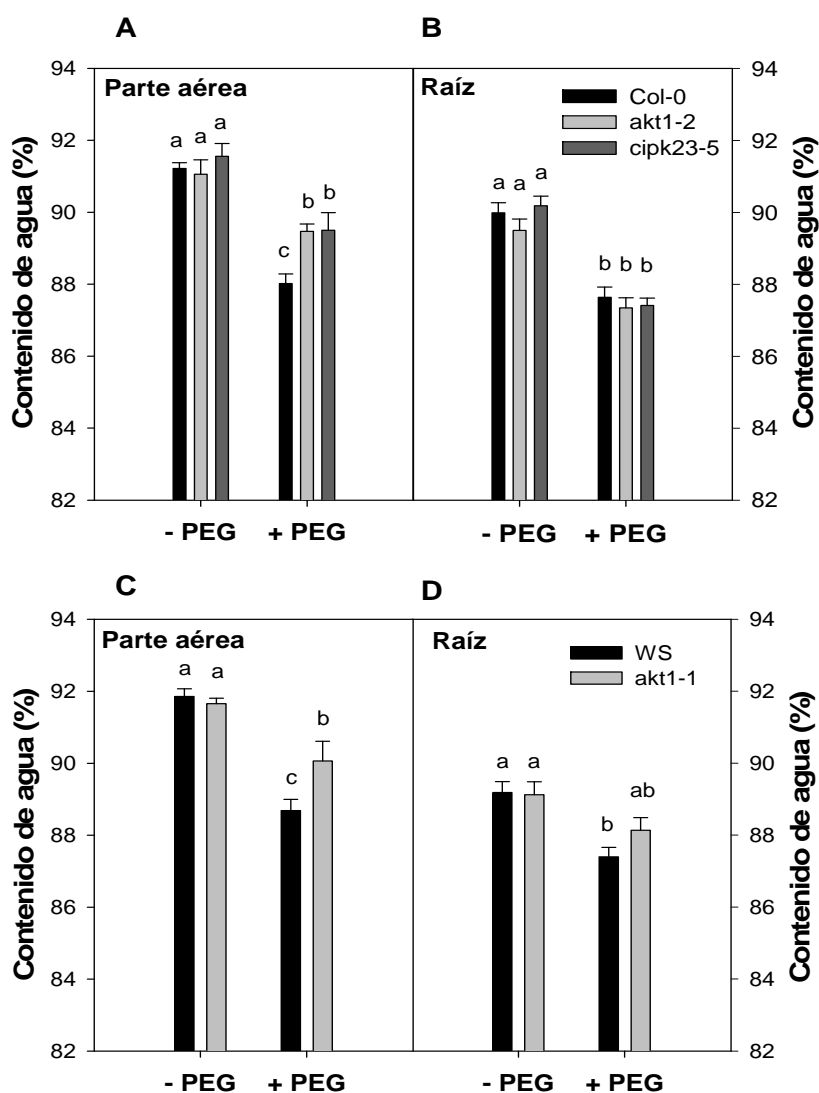
En ausencia de PEG, tanto las plantas WT, *atakt1-2* y *atcipc23-5* del ecotipo Col-0, como WT y *atakt1-1* del ecotipo WS, presentaban una conductancia estomática muy similar, sin observarse diferencias significativas en este parámetro debido a las mutaciones (Figura 4.4). El tratamiento con PEG dio lugar a una importante reducción en la conductancia estomática, que era mucho más marcada en las plantas mutantes que en las correspondientes WT (Figura 4.4).



**Figura 4.4. Las plantas *atakt1* y *atcipc23-5* mostraron menor transpiración que las plantas WT tras un estrés hídrico inducido por PEG.** Las plantas crecidas durante 60 días en una solución Hoagland con una concentración de 1,4 mM de  $K^+$  se transfirieron a barreños con PEG ( $\Psi_{\pi} = -0,6$  MPa). Un grupo de plantas control no se sometieron a este estrés hídrico (-PEG). La transpiración se midió en hojas intactas con un porómetro, 3 horas después de añadir el PEG. Los datos de WT (barras negras), *atakt1-2* (barras grises) y *atcipc23-5* (barras gris oscuro) pertenecientes al ecotipo Col-0 (A), como de WT (barras negras) y *atakt1-1* (barras grises) del ecotipo WS (B) se muestran como medias  $\pm$  SE ( $n = 5-7$ ). Las letras indican grupos diferentes obtenidos por el test de Tukey ( $P < 0.05$ ).

En cuanto al contenido de agua de todas las plantas estudiadas, tampoco se observaron grandes diferencias entre las diferentes líneas ni en la parte aérea ni en la raíz de las plantas crecidas bajo condiciones control. Al aplicar el estrés hídrico mediante la adición de PEG, se produjo una notable disminución en el contenido de agua, tanto en la parte aérea como en la raíz en todas las líneas estudiadas (Figura 4.5). Esta reducción era

significativamente menor en las partes aéreas de las plantas mutantes *atakt1* y *atcipk23-5* con respecto a las plantas WT (Figura 4.5 A y C). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en cuanto a una posible reducción del contenido de agua en las raíces de las plantas WT y mutantes al aplicar el estrés hídrico (Figura 4.5 B y D).



**Figura 4.5. Las plantas *atakt1* y *atcipk23-5* mostraron un mayor contenido en agua que las plantas WT tras un estrés hídrico inducido por PEG.** Las plantas crecidas durante 60 días en una solución Hoagland con una concentración de 1,4 mM de  $K^+$  se transfirieron a barreños con PEG ( $\Psi_{\pi} = -0,6$  MPa). Un grupo de plantas control no se sometieron a este estrés hídrico (-PEG). Tras 24 horas, se determinó el contenido de agua tanto en parte aérea (A, C) como en raíz (B, D). Los datos de WT (barras negras), *atakt1-2* (barras grises) y *atcipk23-5* (barras gris oscuro) pertenecientes al ecotipo Col-0 (A, B), como de WT (barras negras) y *atakt1-1* (barras grises) del ecotipo WS (C, D) se muestran como medias  $\pm$  SE ( $n = 5-7$ ). Las letras indican grupos diferentes obtenidos por el test de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Los experimentos descritos hasta ahora se realizaron con plantas crecidas con una concentración final de  $K^+$  en la solución de crecimiento de 1,4 mM. Sin embargo, resultados previos del grupo indican que a esta concentración externa de  $K^+$ , las concentraciones de  $K^+$  en las plantas de la línea *atakt1* son menores que en las plantas WT, y el crecimiento está limitado. De hecho las concentraciones de  $K^+$  en las partes aéreas y las raíces de las líneas *atakt1-2* y *atcipk23-5* de las plantas de los experimentos citados anteriormente, eran inferiores en comparación con aquellas de la línea WT (Col-0), al igual que las partes aéreas de las plantas *atakt1-1* en comparación con sus plantas WT (WS) (Tabla 4.1).

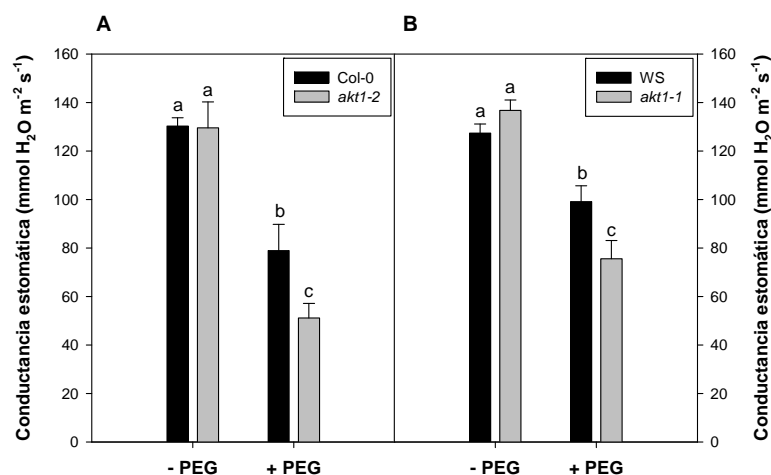
Para descartar que el fenotipo referente a la transpiración de las plantas de la línea *atakt1* se debiera a un estado de deficiencia de  $K^+$  en la planta, se decidió realizar el mismo experimento con plantas crecidas en presencia de 10 mM  $K^+$ , que es una concentración a la que no se observan diferencias de crecimiento ni de concentraciones de  $K^+$  entre las plantas WT y las mutantes *atakt1*. A esta concentración externa de  $K^+$ , las plantas *atakt1* no muestran ninguna diferencia de fenotipo dependiente de  $K^+$ , así como tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a las concentraciones tisulares de  $K^+$  entre las plantas *atakt1-2* y WT (Col-0) (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1. Concentraciones de  $K^+$  en parte aérea y raíz obtenidas de plantas crecidas en cultivo hidropónico bajo un estrés hídrico (+PEG) o en condiciones control (-PEG). Los datos corresponden a promedios  $\pm$  errores estándar (n= 5-7).**

$K^+$ externo (mM)	Tejido	Tratamiento con PEG	WT (Col-0)	<i>akt1-2</i>	<i>cipk23-5</i>	WT (WS)	<i>akt1-1</i>
1,4	Parte aérea	-	0,75 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,02
		+	0,71 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,03	0,83 $\pm$ 0,02
	Raíz	-	1,34 $\pm$ 0,10	0,95 $\pm$ 0,05	1,03 $\pm$ 0,06	1,14 $\pm$ 0,04	0,99 $\pm$ 0,04
		+	0,66 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,03	0,64 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,05	0,76 $\pm$ 0,02
10	Parte aérea	-	1,74 $\pm$ 0,05	1,79 $\pm$ 0,09			
		+	1,64 $\pm$ 0,03	1,58 $\pm$ 0,03			
	Raíz	-	1,92 $\pm$ 0,07	1,96 $\pm$ 0,09			
		+	0,92 $\pm$ 0,04	0,94 $\pm$ 0,09			

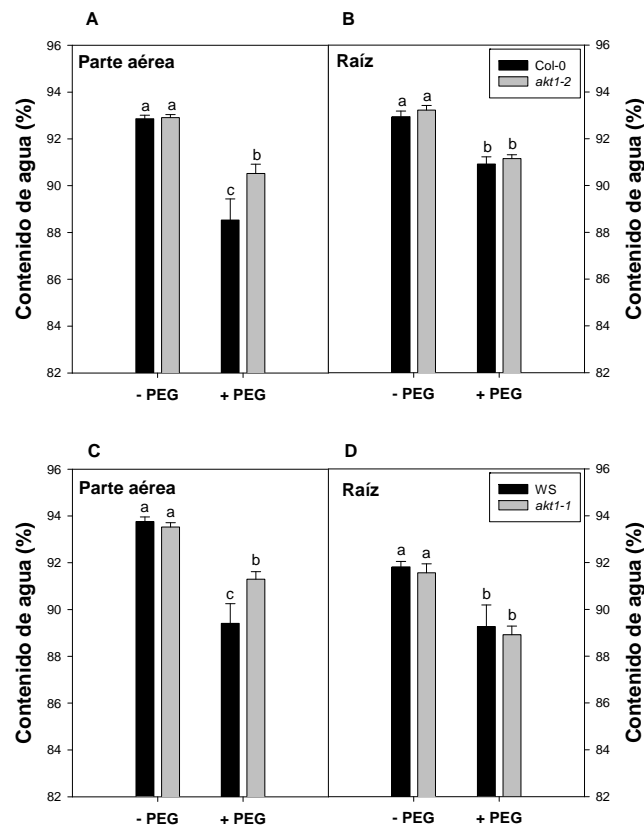
Tras crecer las plantas durante 60 días en condiciones estándar, y en presencia de una concentración de 10 mM  $K^+$ , la mitad de las plantas se transfirieron a contenedores con solución nutritiva más PEG ( $\Psi_{\pi} = -0,6$  MPa) durante 24 horas, mientras que a la otra mitad de las plantas permanecieron en la solución de crecimiento sin PEG (tratamiento control). La conductancia estomática se determinó, como en los experimentos anteriores, a las 3 horas de adicionar el PEG, mientras que el contenido de agua se calculó después de 24 h de tratamiento.

Las medidas tomadas de conductancia estomática volvieron a mostrar diferencias significativas entre las plantas WT y las plantas mutantes. Como en el caso de los experimentos llevados a cabo con concentraciones de  $K^+$  de 1,4 mM, en condiciones control sin estrés (sin PEG), las plantas de las líneas *atakt1* y WT mostraron valores similares de transpiración (Figura 4.6). La exposición a un bajo potencial hídrico (adición de PEG) redujo la conductancia estomática en la dos líneas, observándose que en las líneas *atakt1* de los dos ecotipos, Col-0 y WS, este parámetro se vio significativamente más disminuido que en las plantas de la línea WT (Figura 4.6).



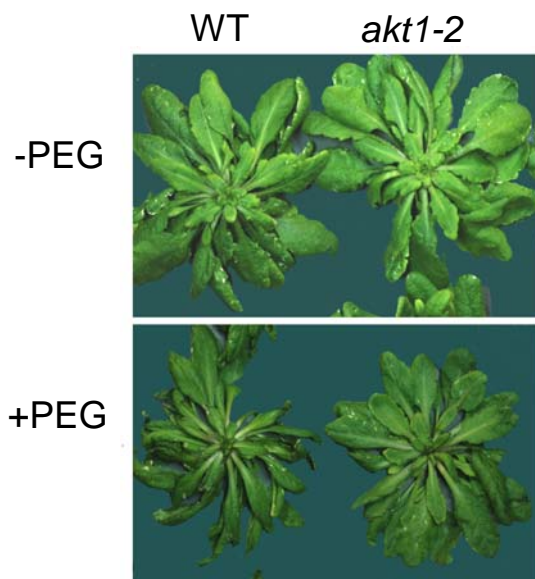
**Figura 4.6. Las plantas de la línea *atakt1* muestran una menor transpiración que las de la línea WT tras aplicar un estrés hídrico (PEG) de 3 horas cuando se crecen con una concentración de  $K^+$  de 10 mM.** Las plantas de 60 días crecidas con este suplemento de  $K^+$  se transfirieron a contenedores con PEG ( $\Psi_{\pi} = -0,6$  MPa) como se ha descrito anteriormente en la Figura 4.4. Tras 3 horas de estrés, se determinó la conductancia estomática en las hojas intactas usando un porómetro portátil, tanto en el ecotipo Col-0 (A) como en el WS (B). Los datos de WT (barras negras) y *atakt1* (barras grises) se muestran como medias  $\pm$  SE ( $n = 5-7$ ). Las letras indican los diferentes grupos obtenidos mediante el test de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Al final del experimento, los contenidos de agua de las plantas de las líneas *atakt1* y WT en condiciones control sin estrés (-PEG) fueron similares (Figura 4.7). Por el contrario, cuando se sometieron las plantas a este estrés (+PEG), los contenidos de agua tanto de raíz como de parte aérea disminuyeron significativamente en ambas líneas (*atakt1* y WT). El contenido de agua de la parte aérea de las plantas *atakt1-2* y *atakt1-1* se vio significativamente menos afectado por el estrés hídrico que el referente a sus correspondientes plantas WT, observándose valores mayores de contenido de agua en las plantas mutantes. En la raíz no se observaron diferencias significativas entre las líneas WT y mutantes cuando se aplicó el estrés hídrico (Figura 4.7).



**Figura 4.7. Las plantas *atakt1* mostraron un mayor contenido en agua que las plantas WT tras un estrés hídrico inducido por PEG.** Las plantas crecidas durante 60 días en una solución Hoagland con una concentración de 10 mM de  $K^+$  se transfirieron a barreños con PEG ( $\Psi_{\pi} = -0,6$  MPa). Un grupo de plantas control no se sometieron a este estrés hídrico (-PEG). Tras 24 horas, se determinó el contenido de agua tanto en parte aérea (A, C) como en raíz (B, D). Los datos de WT (barras negras) y *atakt1-2* (barras grises) pertenecientes al ecotipo Col-0 (A, B), como de WT (barras negras) y *atakt1-1* (barras grises) del ecotipo WS (C, D) se muestran como medias  $\pm$  SE ( $n = 5-7$ ). Las letras indican grupos diferentes obtenidos por el test de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Los cambios en el contenido de agua también se vieron reflejados en la apariencia macroscópica de la planta. Ambas líneas crecieron de forma similar bajo condiciones control (Figura 4.8, arriba), mientras que en presencia de PEG, las plantas WT se vieron más afectadas que las plantas *atakt1-2*, pudiéndose observar síntomas de marchitez (Figura 4.8, abajo).



**Figura 4.8. Aspecto macroscópico de rosetas de plantas de las líneas WT y *atakt1-2* tras aplicar un estrés hídrico (PEG) de 24 horas cuando se crecen con una concentración de  $K^+$  de 10 mM.** Las plantas de 60 días crecidas con este suplemento de  $K^+$  se transfirieron a contenedores con PEG ( $\Psi_{\pi} = -0,6$  MPa) como se ha descrito anteriormente en la Figura 4.4. Transcurridas 24 horas, se tomaron imágenes de las rosetas y se muestran algunas de las más representativas.

#### 4.1.3. Respuesta al estrés hídrico en plantas cultivadas en suelo

Otro abordaje del estudio del efecto del estrés hídrico en plantas adultas se llevó a cabo con plantas de las líneas WT y *atakt1-2* del ecotipo Col-0 cultivadas en suelo.

Las semillas de las distintas líneas se sembraron individualmente en macetas que se regaron durante 60 días con 1/5 de solución Hoagland modificada, que contenía una concentración final de  $K^+$  de 10 mM, para así evitar una posible deficiencia de  $K^+$  en la línea *atakt1-2*. A continuación se interrumpió el riego durante 29 días a un grupo de plantas,

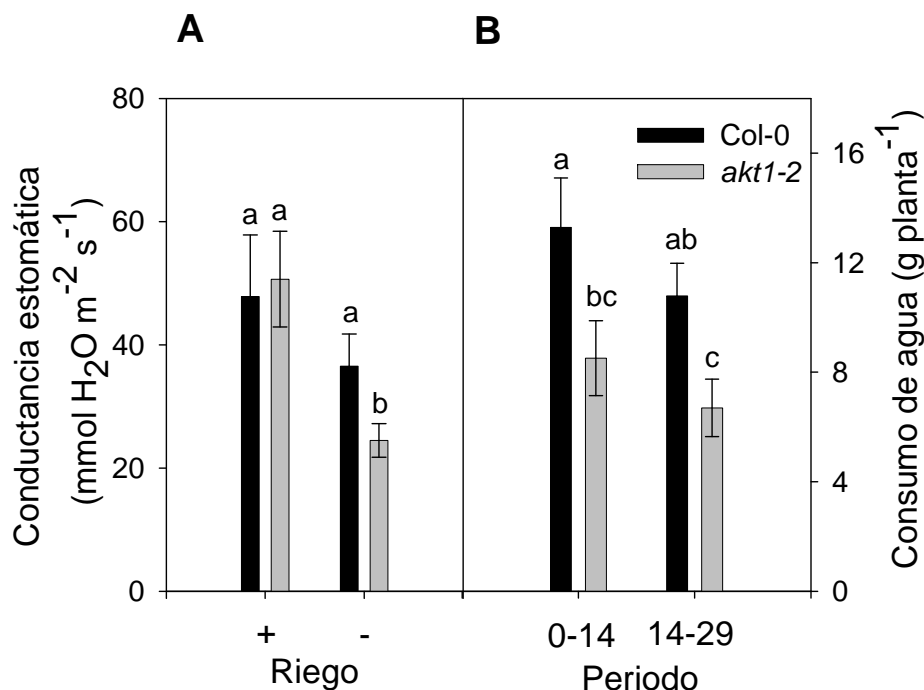
mientras que otro grupo fue regado regularmente, sirviendo como control del experimento. Durante este periodo, se realizaron los distintos análisis fisiológicos.

En las plantas control regadas regularmente, el crecimiento, la concentración de  $K^+$  en la parte aérea y el contenido de agua en este órgano no mostraron diferencias entre las líneas WT y *atakt1-2* (Tabla 4.2). En las plantas control, la conductancia estomática tampoco mostró diferencias significativas entre los dos grupos de plantas (Figura 4.9 A). Por el contrario, cuando se aplicó el estrés hídrico mediante la supresión del riego, las plantas pertenecientes a la línea *atakt1-2* mostraron una menor conductancia estomática que las de la línea WT (Figura 4.9 A).

**Tabla 4.2. Peso seco de la parte aérea, contenido de agua y concentración de  $K^+$  obtenidos de plantas WT y *atakt1-2* expuestas a estrés hídrico en suelo. Un grupo de plantas se mantuvo bien regado, actuando como grupo control. Datos mostrados como medias  $\pm$  SE ( $n = 5-7$ ).**

Parámetro	Días sin ser regadas	No regadas		Regadas	
		WT	<i>akt1-2</i>	WT	<i>akt1-2</i>
Peso seco (g)	0	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,03
	14	0,34 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,04	0,37 $\pm$ 0,05
	29	0,29 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,04	0,48 $\pm$ 0,06	0,46 $\pm$ 0,07
Contenido de agua (%)	0	89,34 $\pm$ 0,48	88,63 $\pm$ 0,53	89,34 $\pm$ 0,48	88,63 $\pm$ 0,53
	14	84,47 $\pm$ 0,18	84,27 $\pm$ 0,36	89,52 $\pm$ 0,71	88,92 $\pm$ 0,28
	29	45,80 $\pm$ 7,00	49,96 $\pm$ 10,6	90,80 $\pm$ 0,46	90,71 $\pm$ 1,12
Concentración de $K^+$ (mmol g DW <sup>-1</sup> )	0	1,16 $\pm$ 0,12	1,01 $\pm$ 0,10	1,16 $\pm$ 0,12	1,01 $\pm$ 0,10
	14	0,66 $\pm$ 0,07	0,54 $\pm$ 0,05	1,29 $\pm$ 0,14	1,20 $\pm$ 0,07
	29	0,79 $\pm$ 0,07	0,71 $\pm$ 0,11	1,60 $\pm$ 0,14	1,64 $\pm$ 0,16

Se calculó también el consumo de agua en las sometidas al estrés hídrico, observándose unos valores mayores de consumo en las plantas WT con respecto a las *atakt1-2*, tanto para los primeros 14 días de supresión del riego (0-14 días) como para los segundos 14 días (14-29 días) (Figura 4.9 B).



**Figura 4.9. Las plantas *atakt1-2* mostraron una mejor adaptación al estrés hídrico que las plantas WT crecidas en suelo.** Las plantas se crecieron durante 60 días en macetas con suelo, siendo regadas regularmente con solución Hoagland con una concentración de K<sup>+</sup> de 10 mM. Tras regar las macetas hasta saturación, se detuvo el riego (t=0) durante 29 días a un grupo de plantas (- Riego), mientras que otro grupo continuó siendo regado (+ Riego). Durante este periodo se midió la conductancia estomática en hojas intactas con un porómetro portátil (A). Se determinó también el consumo de agua durante el estrés hídrico, calculándolo como se indica en el apartado de Material y Métodos para los periodos 0-14 y 0-29 días (B). Los datos para las plantas WT (barras negras) y para las plantas *atakt1-2* (barras grises) se muestran como medias ± SE (n = 5-7). Las letras indican los diferentes grupos obtenidos a partir del test de Tukey (P<0.05).

#### 4.1.4. Respuesta de los estomas a la aplicación de ABA

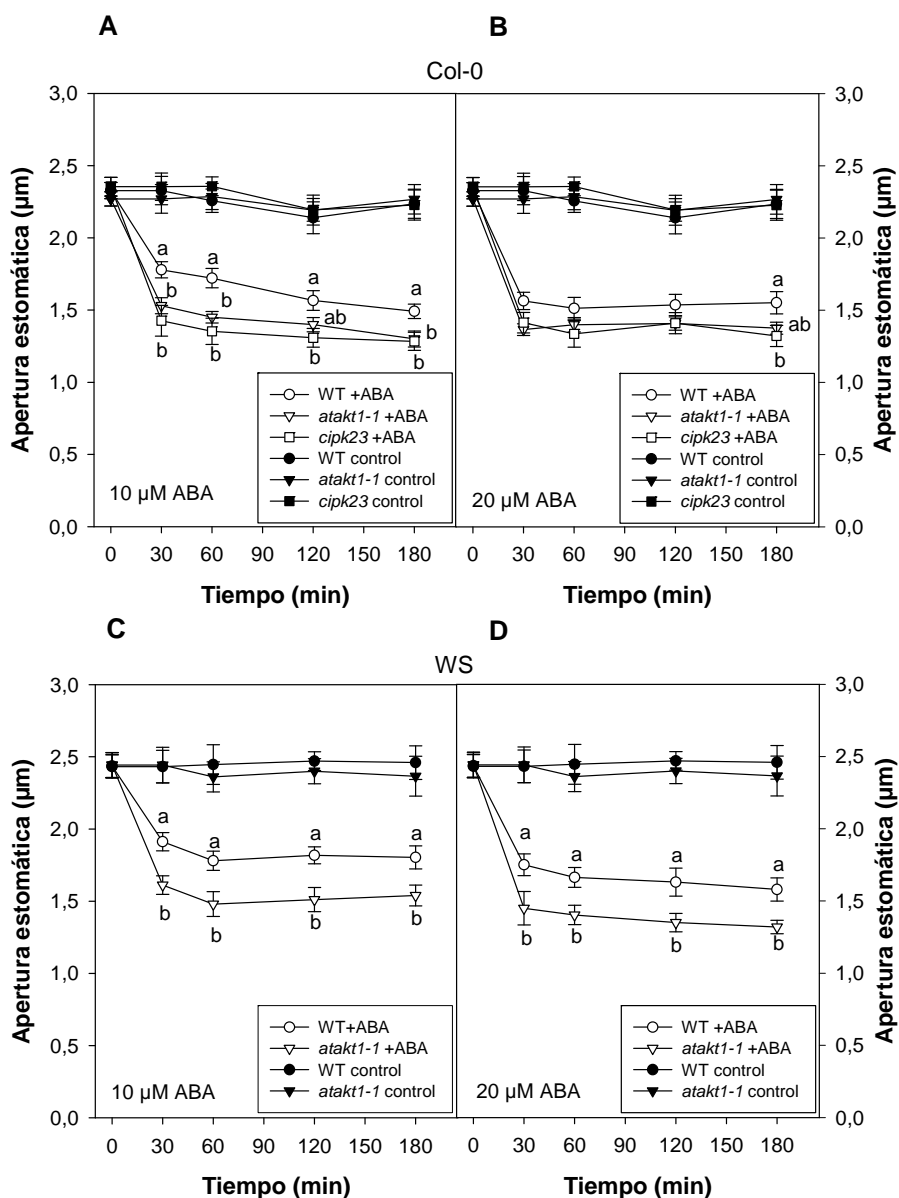
Para profundizar en el estudio del papel de AKT1 en la regulación de los movimientos estomáticos, se estudió la respuesta a ABA de los estomas de la epidermis de hojas de las plantas WT, *atakt1-2* y *atcipk23-5* del ecotipo Col-0, así como de plantas WT y *atakt1-1* del ecotipo WS.



Las plantas se crecieron en cultivo hidropónico, en solución nutritiva Hoagland modificada con una concentración final de  $K^+$  de 10 mM, para así evitar posibles limitaciones en el crecimiento de las líneas mutantes por falta de  $K^+$ . El experimento comenzó con una inducción de la apertura estomática al poner la epidermis de las hojas en una solución que contenía KCl a una concentración de 50 mM, en presencia de luz. Transcurridas 3 horas, la mitad de las muestras de epidermis se transfirieron a otras placas que contenían el mismo medio en el que se encontraban (control), mientras que la otra mitad de las epidermis se transfirieron al mismo medio en presencia de ABA a dos concentraciones distintas: 10 y 20  $\mu$ M. Las muestras de epidermis se mantuvieron en estas condiciones durante 3 horas adicionales, también en presencia de luz. Durante este periodo, se observaron los estomas a distintos tiempos mediante un microscopio óptico.

Los estomas de las plantas control (sin adicionar ABA) correspondientes al ecotipo Col-0 mostraron una apertura estomática similar en todas las líneas: WT, *atakt1-2* y *atcipk23-5* (Figura 4.10 A y B, símbolos rellenos). Cuando la epidermis era expuesta a la acción del ABA, los estomas reaccionaban cerrándose en las tres líneas, siendo esta respuesta más pronunciada en las plantas *atakt1-2* y en *atcipk23-5* que en las plantas WT. Cuando se aplicó una concentración de 10  $\mu$ M de ABA, las líneas mutantes mostraron unos valores menores de apertura estomática que en las plantas WT (Figura 4.10 A, símbolos sin relleno). Al aplicar una concentración de 20  $\mu$ M de ABA, se obtuvieron resultados similares (Figura 4.10 B, símbolos sin relleno). Cabe señalar que al aplicar ABA a la concentración de 10  $\mu$ M, los estomas de la línea WT se cerraban de una forma más lenta (Figura 4.10 A, 30 y 60 minutos) que cuando se añadía el ABA a una concentración de 20  $\mu$ M (Figura 4.10 B). Por el contrario, los estomas de las plantas mutantes no mostraban esta diferente velocidad de cierre en función de la concentración de ABA aplicado.

Con respecto a las plantas del ecotipo WS, la apertura estomática se mantuvo constante en el tiempo en ambas líneas (tanto en WT como en *atakt1-1*) en condiciones control (sin adición de ABA) (Figura 4.10 C y D, símbolos rellenos). La exposición a concentraciones micromolares de ABA condujo a una pronunciada disminución de la apertura estomática tanto en la línea WT como en la mutante (Figura 4.10 C y D, símbolos sin relleno), si bien se observó un mayor cierre de los estomas de la línea mutante con respecto a los de la línea silvestre, tanto a una concentración de 10  $\mu$ M de ABA como de 20  $\mu$ M.



**Figura 4.10. Los estomas de las plantas *atakt1* mostraron menores valores de apertura estomática que las plantas WT tras su exposición a ABA.** Se aislaron epidermis de la parte abaxial de plantas WT (círculos), *atakt1-2* (triángulos) y *atcipk23-5* (cuadrados) del ecotipo Col-0 (A y B), y de plantas WT (círculos) y *atakt1-1* (triángulos) del ecotipo WS (C y D), que se transfirieron a una solución que contenía KCl 50 mM durante 3 horas para inducir la apertura estomática. A continuación, se transfirieron las epidermis a la misma solución renovada en ausencia (símbolos rellenos) o en presencia de ABA (símbolos sin relleno), a concentraciones de 10 μM (A, C) o 20 μM (B, D), durante otras 3 horas para inducir el cierre estomático. Se tomaron fotografías a distintos tiempos del poro estomático. Cada experimento se realizó por triplicado, usando al menos 4 tiras de epidermis de diferentes hojas y plantas y realizando al menos 100 medidas por tratamiento, tiempo y línea. Se muestran las medias de esas medidas y sus errores estándar. Las letras indican los diferentes grupos obtenidos al realizar un test de Tukey ( $P < 0.05$ ).

#### 4.1.5. Discusión

El primer sistema de transporte de  $K^+$  descrito en plantas fue el canal de entrada de  $K^+$  AKT1 de *Arabidopsis* (Sentenac y col., 1992). La mayor parte de las investigaciones sobre la función de este canal se han centrado en demostrar su papel en la nutrición de  $K^+$  de la plantas ya que AKT1 constituye una vía muy importante de absorción de  $K^+$  en la raíz (Aleman y col., 2011; Gierth y col., 2005; Hirsch y col., 1998; Rubio y col., 2010a; Rubio y col., 2008; Spalding y col., 1999). Tradicionalmente siempre se ha pensado que este canal está implicado en la absorción de  $K^+$  en el rango de la baja afinidad, pero una serie de estudios realizados recientemente han indicado su papel en la absorción de  $K^+$  en el rango de la alta afinidad junto con el transportador de  $K^+$  HAK5. La entrada de  $K^+$  a través de AKT1 está modulada por un complejo CBL-CIPK (Xu y col., 2006) regulado por calcio, siendo CIPK23, CBL1 y CBL9 las proteínas que lo constituyen. Se ha postulado que en situaciones de bajo  $K^+$  se producen señales de calcio en el citosol que son registradas por los sensores de  $Ca^{2+}$  CBL1 y CBL9, dando lugar a la activación de la proteína quinasa CIPK23. Ésta fosforila a AKT1 e incrementa la absorción de  $K^+$  a través de este canal (Cheong y col., 2007; Li y col., 2006; Luan y col., 2009). Otro punto de regulación de AKT1 tiene lugar a través de la interacción con la subunidad reguladora AtKC1, cuyo gen está altamente expresado en raíz (Reintanz y col., 2002) y cuya expresión se ve aumentada por el ayuno de  $K^+$  (Shin y Schachtman, 2004). Se ha observado que cuando AtKC1 se coexpresa junto a AtAKT1 en protoplastos de mesófilo de tabaco, se produce un cambio en el potencial de activación hacia valores más negativos (Dubey y col., 2008), e impide que AKT1 medie en la salida de  $K^+$  (Geiger y col., 2009). Por otra parte, la syntaxina SYP121 forma un complejo terciario junto con AKT1 y AtKC1, probablemente favoreciendo la unión de AtKC1 con el canal (Honsbein y col., 2009). Por último, encontramos otro elemento regulador en todo este sistema de activación-desactivación del canal AKT1: la fosfatasa AIP1, encargada de desfosforilar el canal, y por lo tanto reducir su actividad. Estos complejos son clave en la absorción de  $K^+$  a través de AKT1, ya que, por ejemplo, las plantas mutantes *atcipk23* o *atcbl1/atcbl9* están afectadas en la absorción de  $K^+$  en la raíz y resultan ser fenocopias de las plantas mutantes *atakt1* (Xu y col., 2006).

Además del fenotipo de adquisición de  $K^+$  a través de la raíz, se ha demostrado que las plantas mutantes *atcipk23* y *atcbl1/atcbl9* son también más resistentes frente al estrés hídrico (Cheong y col., 2007). Esto es debido al hecho de que sus estomas muestran una hipersensibilidad frente al ABA, exhibiendo cierres estomáticos más acusados en presencia de ABA exógeno, resultando en plantas con una menor transpiración y más tolerantes a la sequía.

En el trabajo de Cheong y colaboradores en 2007 se presenta un posible esquema para explicar el fenotipo de tolerancia a sequía de los mutantes *atcipk23* y *atcbl1/atcbl9* (Figura 1.14). Según estos autores, la producción de ABA en las plantas sometidas a estrés hídrico desencadena una serie de reacciones a través de distintas especies reactivas de oxígeno, como  $H_2O_2$ , que conducen a un aumento del  $Ca^{2+}$  citosólico. Las proteínas CBL1 y CBL9 detectarían estos cambios de  $Ca^{2+}$ , uniéndose a la quinasa CIPK23. La quinasa daría lugar a la activación de alguna vía que resultaría en el cierre estomático. La diana de esta quinasa en los estomas se desconoce. Debido a que Xu y colaboradores en 2006 (Xu y col., 2006) demostraron que CIPK23 activa AKT1 en la raíz, modulando la entrada de  $K^+$  en la planta, Cheong y colaboradores (2007) proponen en su esquema que en los estomas, CIPK23 también fosforilaría y activaría AKT1, dando lugar el cierre estomático. Otra posibilidad sería que CIPK23 condujera al cierre estomático a través la activación de una diana distinta de AKT1. Por otra parte, Cheong y colaboradores en 2007 también proponen la interacción de CBL1/CBL9 con otras CIPKs no identificadas que a su vez regularan AKT1. En definitiva, todos estos trabajos proponen que el canal AKT1 podría estar implicado en la regulación de la apertura estomática y la transpiración de la planta. Esto sería posible, ya que se ha demostrado que el gen que codifica AKT1 se expresa en las células oclusivas de los estomas (Szyroki y col., 2001). Sin embargo su función en los movimientos estomáticos no está demostrada. En esta Tesis se obtienen evidencias de que AKT1 juega un papel importante en los movimientos estomáticos, en la transpiración y en las respuestas frente al estrés hídrico. También se muestra como el funcionamiento de AKT1 en la transpiración está regulado probablemente a través de la interacción con CIPK23, debido al hecho de que las plantas mutantes *atcipk23-5* y *atakt1* muestran el mismo fenotipo, según el cual las plantas *atakt1-2* y *atcipk23-5* muestran una mayor tolerancia al estrés hídrico que las plantas silvestres Col-0. Un segundo alelo de *atakt1*, *atakt1-1*, perteneciente al ecotipo WS, confirma estos resultados.

En un primer grupo de experimentos con rosetas escindidas, se observó que las plantas mutantes exhibieron una pérdida de agua significativamente menor que las plantas WT (Figura 4.1). El comportamiento de las plantas *atcipk23-5* observado es comparable con lo que ya había descrito anteriormente (Cheong y col., 2007), y las plantas mutantes *atakt1*, tanto del ecotipo Col-0 como del WS, muestran el mismo fenotipo que las plantas *atcipk23-5*.

En experimentos desarrollados en presencia de PEG, que simula un estrés hídrico al disminuir el potencial hídrico de la solución, las partes aéreas de las plantas mutantes *atakt1* y *atcipk23-5* mostraron unos mayores contenidos de agua y una menor conductancia estomática que las plantas WT, tanto en el ecotipo Col-0 como en el WS (Figuras 4.4 y 4.5). Al contrario que en el caso anterior, esta aproximación permitía estudiar la respuesta de la planta entera. El análisis mineral de las plantas mostró que las plantas mutantes tenían una concentración de  $K^+$  más bajas que las plantas WT (Tabla 4.1). Esto puede ser debido a que a la concentración de  $K^+$  utilizada para crecer las plantas (1,4 mM), la absorción de éste en las líneas mutantes se encuentra reducida, debido a la ausencia del canal AKT1 y a que otros posibles sistemas de absorción de  $K^+$  no son capaces de compensar la ausencia de ese canal (Rubio y col., 2010a; Rubio y col., 2008). Algunos estudios han mostrado que la transpiración en la planta puede verse afectada por el estatus de  $K^+$  de la misma (Benlloch-González y col., 2008; Harvey y van den Driessche, 1999; Kanai y col., 2011). Por ello, para poder descartar que los fenotipos de transpiración observados en las plantas mutantes fueran debidos a una nutrición deficiente de  $K^+$  en las mismas, se realizaron una serie de experimentos nuevos. Éstos seguían la misma línea que los realizados anteriormente, pero las plantas crecieron en una solución que contenía una concentración de  $K^+$  de 10 mM, para evitar deficiencias de  $K^+$  en las plantas mutantes. En trabajos anteriores se ha mostrado que la línea *atakt1* no muestra diferencias en la concentración de  $K^+$  con las plantas WT cuando se crecen en presencia de 10 mM  $K^+$  (Nieves-Cordones y col., 2010), y en esta Tesis se han corroborado esos resultados (Tabla 4.1). Al igual que ocurría en los experimentos realizados con plantas crecidas con concentraciones de  $K^+$  de 1,4 mM, el estrés hídrico producido por la adición de PEG a plantas crecidas con una concentración de  $K^+$  de 10 mM condujo a un mayor contenido de agua en la parte aérea y una menor conductancia estomática en las plantas mutantes que en las plantas WT (Figura 4.6 y 4.7). Además, las concentraciones de  $K^+$  obtenidas por el análisis mineral tanto en las plantas de la línea silvestre como en las de la mutante fueron bastante similares (Tabla 4.1),

descartando así el posible efecto de las distintas concentraciones de  $K^+$  en las distintas respuestas frente al estrés hídrico.

Este estrés hídrico también fue estudiado en plantas crecidas en suelo durante periodos de tiempo prolongados, para poder determinar si los fenotipos observados anteriormente eran resultado de una respuesta de la planta frente a un estrés hídrico puntual, que no se alargaba en el tiempo. En esta aproximación se observó un menor consumo de agua así como una menor conductancia estomática por parte de las plantas *atakt1* crecidas en macetas no irrigadas con respecto a las plantas WT (Figura 4.9). Estos resultados confirman el fenotipo de baja transpiración mostrado por las plantas *atakt1*, incluso en periodos de tiempo más prolongados. Llamó la atención el no observar diferencias significativas en el peso de las plantas, contenido de agua o concentraciones de  $K^+$  en el interior de la planta cuando se compararon estos parámetros en las plantas mutantes y las WT (Tabla 4.2). Esto indicaba que, aunque la línea mutante *atakt1* exhibiese un menor consumo de agua y una menor conductancia estomática, estas diferencias no eran lo suficientemente importantes en estas condiciones para producir cambios en, por ejemplo, su contenido de agua.

Finalmente, se pudo observar cómo los estomas de las plantas mutantes *atakt1* y *atcipk23-5* mostraban una mayor respuesta cuando se aplicaba ABA de forma exógena en comparación con la respuesta de los estomas de las plantas WT. La aplicación de esta hormona producía un mayor cierre estomático en las plantas de las dos líneas mutantes que el que producía en las plantas silvestres, tanto en el ecotipo Col-0 como en el WS, siendo la respuesta mostrada por *atcipk23-5* (Figura 4.10) concordante con la encontrada en estudios previos (Cheong y col., 2007). La menor apertura estomática de las líneas mutantes al adicionar ABA (Figura 4.10) puede explicar la menor transpiración registrada en condiciones de estrés hídrico (Figuras 4.4, 4.6 y 4.9), que a su vez podemos relacionar con los mayores contenidos de agua que se registraron en estas líneas de plantas mutantes (Figuras 4.5 y 4.7), así como con su menor consumo de agua (Figura 4.9). Los resultados mostrados en esta Tesis muestran que la ausencia de AKT1 no afecta al proceso de apertura del estoma (Figura 4.10), que está gobernado por canales rectificadores de la entrada de  $K^+$  (Lebaudy y col., 2008), o a la transpiración experimentada por todas las plantas cuando éstas se encontraban bajo condiciones control, pudiendo observarse el fenotipo de apertura estomática únicamente en condiciones de estrés hídrico. Esta ausencia de fenotipo en condiciones control también se

aprecia en las plantas *atcipk23* (Cheong y col., 2007). El comportamiento paralelo de las plantas mutantes *atakt1* y *atcipk23-5* observado a través del presente estudio sugiere de una forma bastante convincente que la ruta de señalización CBL1/CBL9-CIPK23 descrita en las células oclusivas por Cheong y colaboradores en 2007 actúa sobre AKT1 en dichas células para regular la transpiración foliar. Los resultados muestran que las plantas *atcipk23-5* son una fenocopia de las plantas *atakt1* y apuntan a una función primordial de CIPK23 en la regulación de la actividad de AKT1 en las células oclusivas, además de la que se ha descrito en la regulación de AKT1 para la absorción de K<sup>+</sup> a través de en la raíz (Xu y col., 2006).

El mecanismo por el cual el canal AKT1, regulado por la ruta CBL1/9-CIPK23, participa en la adaptación frente al estrés hídrico en las células oclusivas a través del cierre estomático inducido por el ABA no está del todo claro. En *Arabidopsis*, la familia de canales de K<sup>+</sup> *Shaker* comprende nueve miembros, de los cuales seis se expresan en las células oclusivas. Solo uno de ellos, GORK, codifica un canal rectificador de la salida de K<sup>+</sup>, mientras que cinco genes (*KAT1*, *KAT2*, *AKT1*, *AKT2* y *AtKC1*) codifican canales rectificadores de la entrada de K<sup>+</sup> en este tipo de células (Lebaudy y col., 2010). Esta diferencia en el número de canales encargados de la entrada de K<sup>+</sup> con respecto a los encargados de la salida podría significar que asegurar una rápida y selectiva entrada de K<sup>+</sup> mediante la hiperpolarización de la membrana es más importante para la fisiología de los estomas y/o más complejo de conseguir que la salida de K<sup>+</sup> de estas a través de la despolarización de la membrana (Lebaudy y col., 2008). De los canales rectificadores de la entrada de K<sup>+</sup> presentes en las células oclusivas, *KAT1* y *KAT2* se expresan en mayor medida que *AKT1*, *AKT2* y *AtKC1*, que se expresan a niveles menores, indicando una posible mayor relevancia de los dos primeros en estas células (Lebaudy y col., 2010). Por otro lado, no se ha detectado mRNA para los tres miembros restantes de la familia *Shaker*, *AKT5*, *AKT6* y *SKOR* (Szyroki y col., 2001).

Diversos trabajos han profundizado en el estudio de la relevancia de los canales de entrada de K<sup>+</sup> descritos anteriormente en el proceso de apertura estomática. Por ejemplo, Szyroki y colaboradores en 2001, (Szyroki y col., 2001), obtuvieron una línea mutante knockout del gen *KAT1* en la cual no identificaron ninguna variación en la absorción de K<sup>+</sup> en las células oclusivas de las plantas de esta línea mutante, así como tampoco en el proceso de apertura estomática inducida por luz, ni en la capacidad fotosintética de las células oclusivas entre los cloroplastos de las plantas WT y los correspondientes a las plantas de la línea que no

expresaba el gen *KAT1*, cuando realizaron medidas de fluorescencia de clorofilas. Estos datos sugieren que los otros sistemas que median corrientes de entrada de  $K^+$  en las células oclusivas suplen de manera correcta el déficit en alguno de ellos. Asimismo, Lebaudy y colaboradores en 2008 (Lebaudy y col., 2008), realizaron estudios muy similares a los llevados a cabo por Szyroki previamente, obteniendo una línea mutante knockout en el gen encargado de codificar *KAT2*. Al perder esta actividad, las plantas mutantes muestran una reducción del 60 % de la entrada de  $K^+$  en las células oclusivas. Sin embargo, esto no era suficiente para que la planta mostrara diferencias en la apertura estomática ni en la transpiración. Para poder observar un fenotipo de apertura estomática y transpiración fue necesario generar una planta que sobre expresara una versión de *KAT2* con un poro no funcional (*domneg*) sobre la línea *kat2*. Esta línea *kat2-domneg* mostraba una ausencia total de entrada de  $K^+$  en la célula guarda, una menor apertura estomática en respuesta a luz y una menor transpiración.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos sobre la función de los miembros de la familia *Shaker* en las células oclusivas, se podría decir que la actividad que desarrollan es la manera más rápida de convertir la hiperpolarización de la membrana en apertura estomática. Al conseguir que la hiperpolarización de la membrana de las células oclusivas desencadene rápidamente la apertura estomática a través de la actividad de los canales rectificadores de la entrada de  $K^+$ , se mejora la reacción frente a cambios de las condiciones internas y medioambientales (disponibilidad de  $CO_2$ , luz, demanda de evaporación, etc.). Esta actividad de los canales rectificadores de la entrada de  $K^+$  también permite que la apertura estomática sea independiente de los periodos de iluminación y fotosintéticos anteriores, probablemente debido a que la acumulación de  $K^+$  es menos costosa, desde un punto de vista energético, y más fácil de conseguir, que la acumulación de solutos orgánicos

En el proceso de cierre estomático, los canales de salida de  $K^+$  juegan un papel fundamental. El único canal de salida de  $K^+$  descrito en las células oclusivas es GORK. Las líneas mutantes deficientes en GORK no muestran salida de  $K^+$ , muestran un menor cierre estomático en respuesta a oscuridad o ABA y una menor transpiración (Hosy y col., 2003). Estos resultados muestran que el proceso de salida de  $K^+$  de la célula oclusiva está únicamente mediado por GORK y ningún otro sistema puede compensar su ausencia. Esto no ocurre, como se ha mencionado anteriormente, en el caso de la entrada de  $K^+$  en la célula oclusiva, que puede



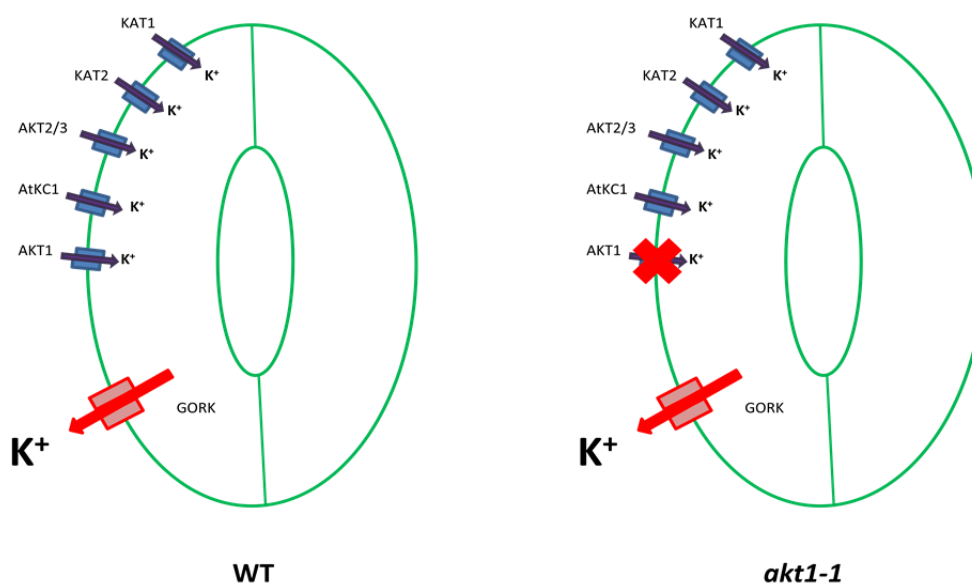
estar mediada por varios canales. En este caso, cuando se anula la función de uno de ellos, el resto puede suplir su falta.

Los canales de entrada y salida de  $K^+$  de la célula oclusiva dan lugar a flujos unidireccionales de entrada y salida, ya que son canales rectificadores, pero en conjunto determinan un flujo neto de  $K^+$  en la célula oclusiva. En última instancia, la apertura o el cierre estomático se produce, entre otros factores, por la entrada o la salida neta de  $K^+$  respectivamente (Pandey y col., 2007a). En esta Tesis Doctoral se muestra que la ausencia de actividad de un solo miembro de los canales de entrada de  $K^+$  *Shaker*, AKT1, ya sea debido a una mutación en el genoma que inhibe la expresión del canal (línea *atakt1*) o en una quinasa que aumenta su actividad (línea *atcipk23*), conduce a una mejora en el cierre estomático en respuesta a ABA y a una menor transpiración. Hay que tener en cuenta que los canales funcionales están formados por cuatro subunidades, y en muchos casos son heterotetrámeros. Anteriormente se ha mencionado que los canales rectificadores de la entrada de  $K^+$  más importantes en las células oclusivas corresponden con KAT1 y KAT2, y estudios recientes han demostrado que la heteromerización entre estos dos canales regula preferentemente la entrada rectificadora de  $K^+$  en las células oclusivas (Lebaudy y col., 2010). La pérdida de función de AKT1 podría implicar que en los canales en los que al menos una de las cuatro subunidades que lo forman fuese AKT1, se podría producir una pérdida de función parcial o total del canal, disminuyendo la entrada de  $K^+$  en la célula oclusiva.

La pregunta que surge es cómo la ausencia de un canal de entrada de  $K^+$  repercute en el proceso del cierre estomático, aumentándolo y dando lugar a una menor transpiración. La explicación podría estar en que la disminución de la entrada de  $K^+$  en la célula oclusiva en las líneas deficientes en AKT1, daría como resultado un mayor flujo neto de salida de  $K^+$  en el proceso de cierre estomático, produciendo los fenotipos observados (Figura 5.1). En relación con esto se ha descrito que las corrientes rectificadas de entrada de  $K^+$ , como las mediadas por AKT1, se ven disminuidas tras la exposición a ABA en las células oclusivas, promoviendo el cierre estomático (Blatt, 1990; Leyman y col., 1999). Se piensa que esta disminución no es esencial en el proceso de cierre de los estomas, pero sí que podría acelerar esta respuesta (MacRobbie, 1998), lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral. Al igual que ocurre en otros trabajos, la inactivación de un solo canal, como KAT1 o

KAT2, no produce ningún efecto en el proceso de apertura estomática, como aquí se muestra para AKT1.

En conclusión, mediante el empleo de mutantes que carecen de actividad del sistema de entrada rectificada de  $K^+$  AtAKT1, se ha podido estudiar el rol general de este sistema en la adaptación de las plantas frente al estrés hídrico, y predecir que su actividad, regulada por CBL1/9-CIPK23, es contraria a las otras respuestas que tienen lugar durante un estrés hídrico, ya que las plantas *atakt1* siempre mostraron una mejor respuesta, como por ejemplo una menor conductancia estomática, que las plantas WT. Los datos presentados ofrecen nuevos puntos de vista de la adaptación de la planta frente a la sequía. La regulación de la entrada de  $K^+$  mediada por AtAKT1 ha pasado a ser crucial en este proceso. Estudios posteriores que continúen con esta línea de estudio contribuirán a profundizar en nuestro conocimiento sobre este tema, centrando la investigación en obtener plantas mejor adaptadas a las condiciones de sequía. Por ejemplo, se podría modular la funcionalidad de AtAKT1 para reducirla en condiciones de sequía, dando lugar a una disminución de la transpiración y un ahorro de agua. Sería necesario por otra parte, que la funcionalidad de AtAKT1 en la raíz no se viera afectada, para asegurar el suministro de  $K^+$  a la planta desde la solución del suelo.



**Esquema del flujo neto de salida de  $K^+$  en el proceso de cierre estomático en una célula oclusiva de una planta WT y de una planta *atakt1-1*.** En WT, el flujo neto de salida de  $K^+$  en el proceso de cierre estomático es menor que en *atakt1-1*, por el déficit en este último de uno de los canales rectificadores de la entrada de  $K^+$ .

## 4.2. Entrada de $K^+$ de baja afinidad en plantas *athak5,atakt1* (2M)

### 4.2.1. Estudio farmacológico de la entrada de $K^+$

En este estudio se usaron varios inhibidores de la absorción de  $K^+$  para poder caracterizar los sistemas de entrada de  $K^+$  en línea doble mutante *athak5,atakt1* (2M), en comparación con la línea silvestre (WT).

Las plantas crecieron en cultivo hidropónico durante 30 días en la solución de cultivo 1/5 de Hoagland modificada con una concentración final de  $K^+$  de 10 mM, para evitar así diferencias en el crecimiento y las concentraciones internas de  $K^+$  entre ambas líneas (Tabla 4.3). A continuación las plantas se transfirieron a la misma solución nutritiva, en presencia de una concentración final de  $K^+$  de 0,5 mM, para que así la concentración interna de éste disminuyera y reducir la salida de  $K^+$  al medio externo durante los experimentos en los que se determina la absorción de  $K^+$  a partir de la desaparición del  $K^+$  de la solución externa. Las plantas se mantuvieron en estas condiciones durante 8 días y a continuación se transfirieron a soluciones 1/5 de Hoagland modificada con concentraciones finales de  $K^+$  de 1 mM, a las cuales se añadieron los distintos inhibidores de la absorción de  $K^+$ . Se mantuvieron en estas condiciones durante 3 días, tras los cuales se tomaron muestras de la solución externa para determinar la concentración final de  $K^+$  y calcular la diferencia entre su concentración final e inicial, resultando el flujo neto de  $K^+$ . El flujo neto de  $K^+$  en presencia de los inhibidores se indica referida a las condiciones control, es decir, frente a las condiciones donde no hay ningún tipo de inhibidor, que corresponderán al 100%.

**Tabla 4.3. Concentración de  $K^+$  en la planta completa tras los distintos periodos de crecimiento de las plantas a lo largo de los experimentos de absorción de  $K^+$ . Los resultados son medias de más de 20 repeticiones  $\pm$  error estándar.**

	[ $K^+$ ] (mg g <sup>-1</sup> DW) Tras 30 días en 10mM $K^+$	[ $K^+$ ] (mg g <sup>-1</sup> DW) Tras 8 días en 0,5mM $K^+$	[ $K^+$ ] (mg g <sup>-1</sup> DW) Tras 3 días en 1mM $K^+$
WT	93,4 $\pm$ 0,4	36,6 $\pm$ 0,4	34,2 $\pm$ 0,9
2M	95,9 $\pm$ 0,1	28,6 $\pm$ 1,2	25,5 $\pm$ 0,9

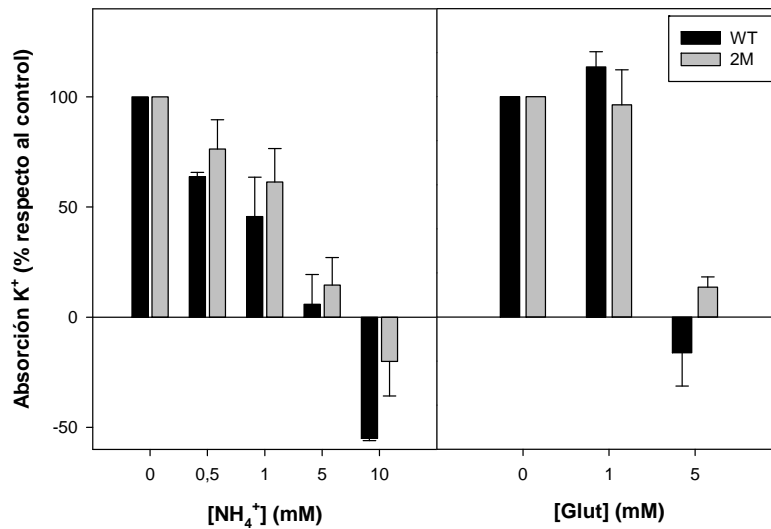
En primer lugar se determinaron las concentraciones internas de  $K^+$  de las plantas sometidas a los tratamientos descritos en el párrafo anterior (Tabla 4.3). La concentración de  $K^+$  en la planta tras el periodo de crecimiento de 30 días en una solución de crecimiento con una concentración final de  $K^+$  de 10 mM no muestra diferencias entre las plantas correspondientes a las líneas WT y 2M, confirmando los anteriores resultados obtenidos por el grupo. Tras este periodo de crecimiento, las plantas se pasaron a un medio con una concentración de  $K^+$  de 0,5 mM durante 8 días, disminuyendo bastante la concentración interna de  $K^+$  en ambas líneas, si bien ya comienzan a verse diferencias entre ellas, acusando más la bajada las plantas de la línea 2M (Tabla 4.3). Por último, tras crecer 3 días en una solución con una concentración de 1 mM de  $K^+$ , la concentración interna de éste catión disminuyó ligeramente. La concentración interna de  $K^+$  alcanzada por las plantas crecidas durante estos 3 últimos días de exposición a 1 mM  $K^+$  en presencia de inhibidores no fue nunca significativamente distinta a la alcanzada por las plantas crecidas sin inhibidores de su misma línea, que son las mostradas en la tabla 4.3.

En lo referente al flujo neto de  $K^+$ , se pudo observar que en algunos casos los inhibidores afectaban de forma diferente dicho flujo en las plantas silvestres WT y las doble mutantes (2M). Así, se consideró dividir los inhibidores en tres grupos: (i) aquellos que no daban lugar a diferencias significativas en el patrón de flujo neto de  $K^+$  entre las plantas WT y 2M, (ii) los que inhibían en mayor medida el flujo neto de  $K^+$  en las plantas WT que en las plantas 2M, y (iii) aquellos que producían una mayor inhibición en el flujo neto de  $K^+$  en las plantas 2M que en las plantas WT.

En el primer grupo de inhibidores (inhibían de igual forma ambas líneas) encontramos el ión amonio ( $NH_4^+$ ) y el ácido L-glutámico. En cuanto al  $NH_4^+$ , se observó que al aumentar la concentración del mismo aumentaba la inhibición de la entrada neta de  $K^+$ , llegando a reducirse al 6% y al 14% en las líneas WT y 2M respectivamente con respecto a la absorción de  $K^+$  de las plantas control cuando la concentración de  $NH_4^+$  aplicada era de 5 mM. Al aplicar una concentración de 10 mM del  $NH_4^+$ , se observó como el flujo neto de  $K^+$  pasa a ser negativo, indicando salida neta de  $K^+$  de la planta tanto en WT como en 2M (Figura 4.11).

Con respecto al patrón del flujo neto de  $K^+$  cuando el inhibidor añadido era el ácido L-glutámico, se observó que al aplicar una concentración del mismo de 1 mM, el flujo neto de  $K^+$

no se afectaba. Al aumentar la concentración del inhibidor a 5 mM, el flujo neto de  $K^+$  disminuía hasta valores donde el flujo de entrada y de salida del catión en la planta se iguala, pasando el flujo neto a ser nulo. (Figura 4.11).



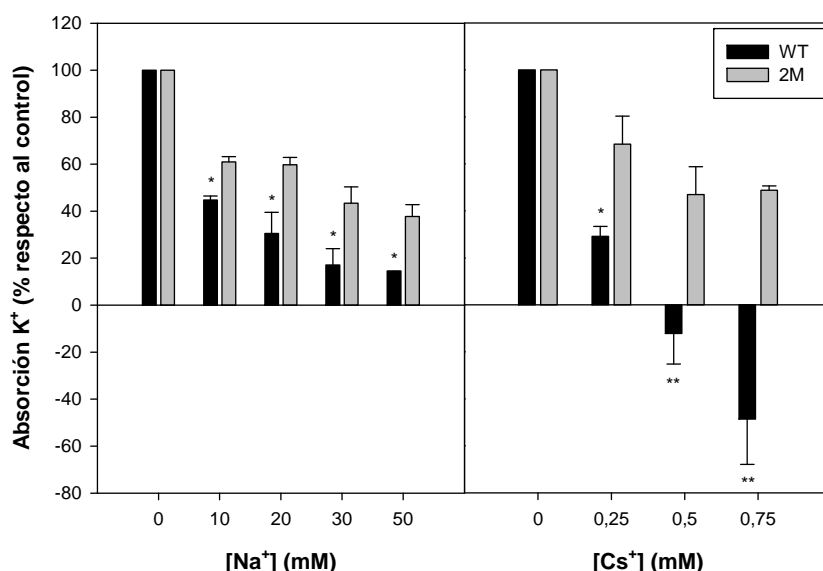
**Figura 4.11. Efecto del  $NH_4^+$  y del Ácido L-Glutámico en la absorción de  $K^+$  en WT y 2M** Las plantas WT (barras negras) y 2M (barras grises) se crecieron en cultivo hidropónico con 10 mM de  $K^+$  durante 30 días. A continuación fueron transferidas a 0,5 mM de  $K^+$  durante 8 días y por último a 1 mM de  $K^+$ , en presencia o no de  $NH_4^+$  o ácido glutámico a las concentraciones indicadas. Se tomaron muestras de la solución de crecimiento a los 3 días para determinar su concentración de  $K^+$ . La absorción de  $K^+$  se calculó como el  $K^+$  retirado por la planta de la solución por unidad de tiempo y unidad de peso seco de raíz. Los valores tomados en ausencia de inhibidores se tomaron como 100%, y los valores en presencia de los distintos inhibidores se refirieron a ellos. Los resultados son medias de al menos 5 repeticiones  $\pm$  error estándar. Se aplicaron modelos estadísticos para estudiar diferencias significativas entre WT y 2M (Test de Tukey).

En el segundo grupo de inhibidores se encuentran aquellos que inhiben más la entrada neta de  $K^+$  en las plantas WT que en las plantas 2M.

El primero de ellos es el  $Na^+$ . Se observa como la entrada neta de  $K^+$  por parte de ambas líneas disminuyó progresivamente a medida que aumentaba la concentración de  $Na^+$  en la solución externa, si bien siempre la entrada neta resultó menor en las plantas silvestres que en las mutantes. Cuando aplicamos una concentración de  $Na^+$  de 50 mM a la solución externa,

el flujo neto de  $K^+$  se ve reducido a valores relativos de un 14% y un 38% (WT y 2M respectivamente) con respecto a la absorción de las plantas control (Figura 4.12).

El otro inhibidor que inhibe más la entrada neta de  $K^+$  en las plantas WT que en las 2M es el  $Cs^+$ . La presencia de una concentración de  $Cs^+$  de 0,25 mM inhibió la entrada neta de  $K^+$  hasta un 29% del control en WT, mientras que en 2M lo hacía hasta un 68%. Cuando se aumentaba la concentración del inhibidor hasta valores de 0,5 mM y 0,75 mM, el flujo neto de  $K^+$  en las raíces de las plantas WT pasaba a ser negativo (salida neta de  $K^+$ ). Sin embargo en las plantas 2M, aunque estas concentraciones de  $Cs^+$  aumentaban la inhibición de la entrada neta de  $K^+$ , no daban lugar a valores negativos en el flujo neto y aún podía observarse entrada neta de  $K^+$  (alrededor de un 50% da la absorción de  $K^+$  de las plantas control ambas) (Figura 4.12).



**Figura 4.12. Efecto del  $Na^+$  y del  $Cs^+$  en la absorción de  $K^+$  en WT y 2M.** Las plantas WT (barras negras) y 2M (barras grises) se crecieron en cultivo hidropónico con 10 mM de  $K^+$  durante 30 días. A continuación fueron transferidas a 0,5 mM de  $K^+$  durante 8 días y por último a 1 mM de  $K^+$ , en presencia o no de  $Na^+$  o de  $Cs^+$  a las concentraciones indicadas. Se tomaron muestras de la solución de crecimiento a los 3 días para determinar su concentración de  $K^+$ . La absorción de  $K^+$  se calculó como el  $K^+$  retirado por la planta de la solución por unidad de tiempo y unidad de peso seco de raíz. Los valores tomados en ausencia de inhibidores se tomaron como el 100%, y los valores en presencia de los distintos inhibidores se refirieron a ellos. Los resultados son medias de al menos, 5 repeticiones  $\pm$  error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre WT y 2M a  $p < 0,05$  (\*) y  $p < 0,01$  (\*\*) según el test de Tukey.

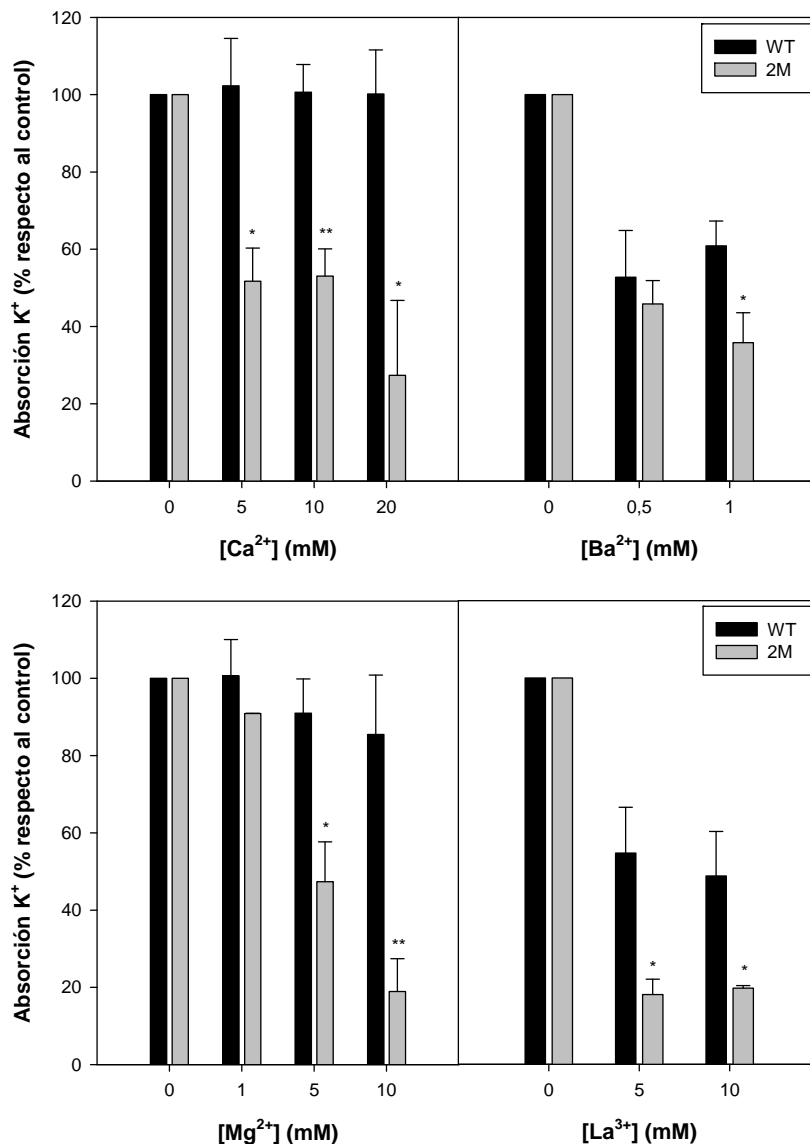
En el tercer y último grupo en los que se han dividido los inhibidores estudiados, se encuentran aquellos que inhiben en mayor medida la entrada neta de  $K^+$  en las plantas de la línea *2M* que en aquellas de la línea silvestre, a saber:  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $La^{3+}$ .

El  $Ca^{2+}$  no inhibió la entrada neta de  $K^+$  en las plantas de la línea WT a ninguna de las concentraciones estudiadas, mientras que su efecto en la línea mutante era completamente opuesto. Cuando se aplicó éste en la solución de absorción para alcanzar una concentración de 5 o 10 mM, la entrada neta de  $K^+$  en las plantas *2M* se redujo hasta alrededor de un 50%. Cuando la concentración de  $Ca^{2+}$  aplicada llegaba a 20 mM, la entrada neta de  $K^+$  se redujo, siendo un 27% de la experimentada por las plantas control (Figura 4.13).

Al añadir  $Ba^{2+}$  a una concentración de 0,5 mM, la entrada neta de  $K^+$  en las dos líneas se vio disminuida hasta niveles similares, sin mostrar diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, cuando la concentración aplicada de este inhibidor llegaba a niveles de 1 mM, los valores obtenidos en las plantas WT disminuían hasta un 60% de la entrada neta experimentada por las plantas WT crecidas sin este inhibidor, mientras que en las plantas *2M* la entrada neta disminuyó hasta un 35% de la experimentada por las plantas *2M* crecidas sin  $Ba^{2+}$  (Figura 4.13).

El  $Mg^{2+}$  produjo un efecto similar al que produjo el  $Ca^{2+}$ . No se observó disminución la entrada neta de  $K^+$  en la línea WT, mientras que en la línea *2M* se obtuvieron valores de entrada neta de un 47% y de un 19% de la absorción experimentada por las plantas control cuando la concentración aplicada de  $Mg^{2+}$  era de 5 mM y 10 mM respectivamente (Figura 4.13).

Finalmente, la adición de  $La^{3+}$  a la solución de crecimiento disminuía la entrada neta de  $K^+$  en ambas líneas, siendo más pronunciada esta disminución en la línea *2M*, donde los valores de entrada neta llegaron a ser 18% y 19% con respecto a la experimentada por sus plantas control, en presencia de concentraciones de 5 mM y 10 mM de  $La^{3+}$  respectivamente (Figura 4.13).



**Figura 4.13. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{La}^{3+}$  en la absorción de  $\text{K}^+$  en WT y 2M.** Las plantas WT (barras negras) y 2M (barras grises) se crecieron en cultivo hidropónico con 10 mM de  $\text{K}^+$  durante 30 días, transferidas a 0,5 mM de  $\text{K}^+$  durante 8 días y por último a 1 mM de  $\text{K}^+$ , en presencia o no de los distintos inhibidores a las concentraciones indicadas. Se tomaron muestras de la solución de crecimiento a los 3 días para determinar su concentración de  $\text{K}^+$ . La absorción de  $\text{K}^+$  se calculó como el  $\text{K}^+$  retirado por la planta de la solución por unidad de tiempo y unidad de peso seco de raíz. Los valores tomados en ausencia de inhibidores se tomaron como el 100%, y los valores en presencia de los distintos inhibidores se refirieron a ellos. Los resultados son medias de, al menos, 5 repeticiones  $\pm$  error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre WT y 2M a  $p < 0,05$  (\*) y  $p < 0,01$  (\*\*) según el test de Tukey.

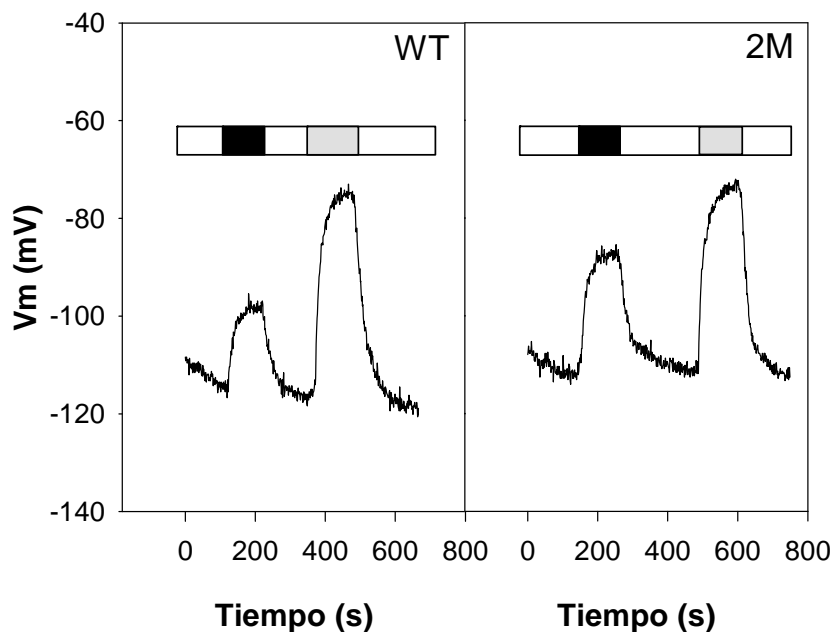


#### 4.2.2. Determinación de los potenciales eléctricos de la membrana plasmática en células de raíz

Un parámetro que puede afectar de forma importante a la absorción de  $K^+$ , al comportamiento de los transportadores de  $K^+$  y al efecto de sus inhibidores es el potencial eléctrico de la membrana plasmática de las células de la epidermis y las células corticales de la raíz. Debido a ello, se decidió estudiar las posibles diferencias que podría haber en este parámetro entre las líneas objeto de nuestro estudio. Como se indica en la sección de Material y Métodos, con la ayuda de un micromanipulador, los microelectrodos de borosilicato eran introducidos en las primeras capas de células de la raíz hasta obtener un potencial estable. Los valores que se obtuvieron de los potenciales de membrana para ambas líneas (WT y 2M) en la solución control fueron similares. Además, la exposición de las raíces de las plantas WT y 2M a concentraciones de  $K^+$  de 1 mM y 5 mM produjo despolarizaciones similares en sus potenciales de membrana. En la Figura 4.14 se muestra un registro representativo de estos experimentos. Los valores medios de los potenciales de membrana en plantas WT y 2M en la solución control ( $1 \mu M K^+$ ) y en las soluciones con 1 y 5 mM  $K^+$  se muestran en la Tabla 4.4, donde se comprueba que no hay diferencias significativas entre las dos líneas.

**Tabla 4.4. Potenciales de membrana de las células corticales y epidérmicas de raíces de plantas WT y 2M.** El potencial de membrana se obtuvo en una solución control (5 mM MES-Ca, pH 6) en presencia de 0,001, 1 y 5 mM de  $K^+$ . Los valores mostrados son medias de al menos 10 repeticiones independientes  $\pm$  error estándar.

[ $K^+$ ] externa (mM)	Vm (mV)	
	WT	2M
0,001	-119 $\pm$ 2,3	-116 $\pm$ 3,5
1	-105 $\pm$ 3,6	-97 $\pm$ 4,2
5	-75 $\pm$ 2,1	-73 $\pm$ 2,4



**Figura 4.14. Potencial de membrana de las células de raíz en WT y 2M a diferentes concentraciones de  $K^+$ .** Se estudiaron las células epidérmicas y corticales de la raíz de las plantas WT y 2M introduciendo en ellas unos microelectrodos para determinar su potencial de membrana. La solución de perfusión que bañaba las raíces estaba compuesta por MES 5 mM llevada a pH 6,0 con  $Ca(OH)_2$  y KCl 0,001 mM (barras blancas). Cuando se alcanzaba un registro estable, el KCl en la solución de perfusión se cambió a 1 mM (barras negras) o a 5 mM (barras grises). Aquí se muestra un experimento representativo.

#### 4.2.3. Respuesta de las plantas a altas concentraciones de $Ca^{2+}$ y $Cs^+$ en experimentos a largo plazo

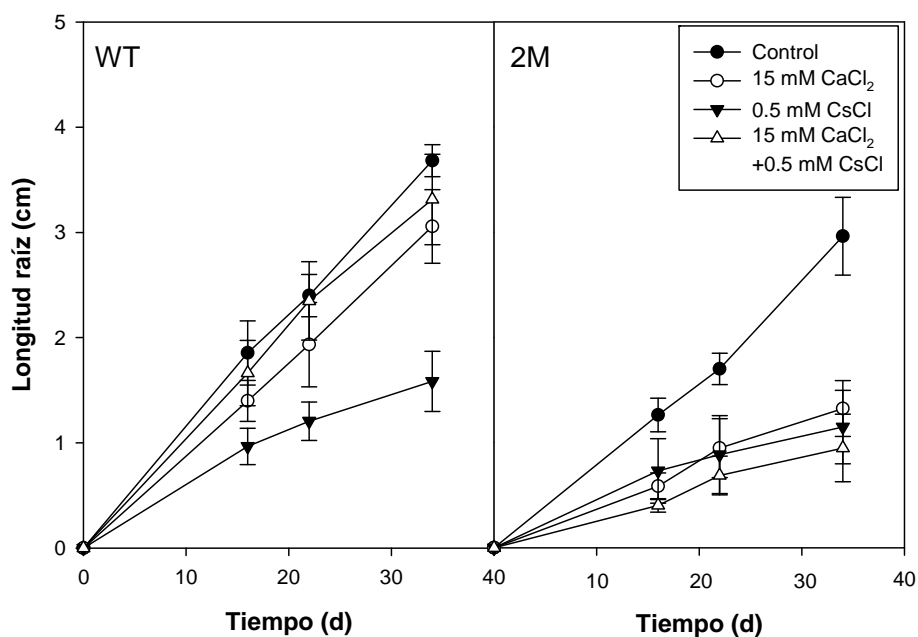
Se realizaron una serie de experimentos a largo plazo donde se estudió la entrada neta de  $K^+$ , el crecimiento de las líneas estudiadas, así como las concentraciones internas de  $K^+$  alcanzadas cuando las plantas crecían con y sin inhibidores. Para estos experimentos se escogió un inhibidor de la absorción de  $K^+$  de cada uno de los grupos en los que los dividimos anteriormente: un inhibidor que tuviese más efecto en la línea silvestre que en la doble mutante: el  $Cs^+$ , y otro que produjese una mayor inhibición en la entrada de  $K^+$  en la línea 2M

que en la WT: el  $\text{Ca}^{2+}$ . También se determinó la entrada neta de  $\text{Cs}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y las concentraciones internas de estos dos cationes.

La primera aproximación se realizó con estudios de crecimiento de las plantas en placas con medio sólido. Se germinaron y crecieron las semillas, previamente esterilizadas, en placas que contenían la solución de crecimiento 1/5 de Hoagland modificada con una concentración de  $\text{K}^+$  final de 10 mM, y solidificada con agarosa al 0,8%. Se mantuvieron en esas condiciones durante 7 días en la cámara de cultivo, orientadas verticalmente, al cabo de los cuales se procedió a seleccionar las plantas con porte similar para pasarlas, en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar, a otras placas que contenían el medio de crecimiento antes mencionado, con una concentración final de  $\text{K}^+$  de 1 mM, y en presencia o ausencia de los inhibidores previamente mencionados, a saber:  $\text{Ca}^{2+}$ , a una concentración de 15 mM, y  $\text{Cs}^+$ , a una concentración de 0,5 mM, y los dos añadidos de forma conjunta, a las mismas concentraciones que cuando se aplicaron individualmente.

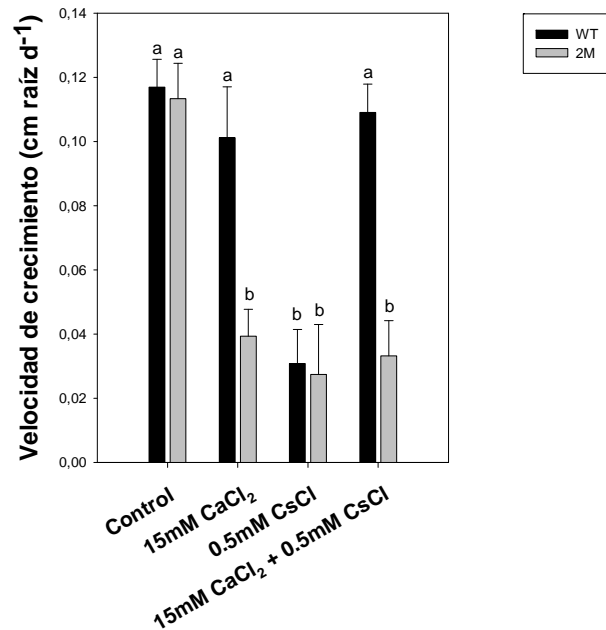
Se procedió a tomar medidas de la longitud de las raíces principales a distintos tiempos para poder estudiar la velocidad de crecimiento de la raíz en cada una de las condiciones mencionadas.

En ausencia de inhibidores, las raíces de las plantas 2M mostraron una menor longitud que las silvestres. Cuando se añadió  $\text{Ca}^{2+}$ , las raíces de las plantas WT redujeron su crecimiento, siendo éste un 83% del crecimiento experimentado por las plantas control sin  $\text{Ca}^{2+}$  extra añadido. El  $\text{Ca}^{2+}$  redujo el crecimiento de las raíces de las plantas 2M de forma más pronunciada, llegando al 45% del crecimiento que alcanzaban las plantas cuando no tenían un exceso de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el caso del  $\text{Cs}^+$ , las plantas de ambas líneas disminuían su crecimiento hasta valores muy similares (43% y 38% del crecimiento experimentado por las plantas control de su misma línea en el caso de WT y 2M respectivamente). Cuando se aplicaban los dos inhibidores al mismo tiempo, el comportamiento dependía de la línea: en las plantas silvestres, la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  a la solución que ya contenía  $\text{Cs}^+$  revertía los efectos de éste, pasando a crecer un 90% con respecto a sus plantas control. Por el contrario, cuando se adicionaron los dos inhibidores en la solución de crecimiento de las plantas 2M, el efecto era mayor que cuando se añadían de forma individual, aumentando la inhibición del crecimiento, pasando éste a ser un 32% del crecimiento de las plantas control de su misma línea (Figura 4.15).



**Figura 4.15. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y del  $\text{Cs}^+$  en el crecimiento en placa de las raíces de plantas WT y 2M.** Las semillas de las plantas WT y 2M se germinaron y crecieron en placas que contenían solución 1/5 de Hoagland solidificada con agarosa al 0,8%, con una concentración de  $\text{K}^+$  de 10 mM durante 7 días. A continuación se pasaron a otras placas con la misma solución solidificada, pero con una concentración de  $\text{K}^+$  de 1 mM, en ausencia (círculos negros) o en presencia de 15 mM  $\text{CaCl}_2$  (círculos blancos), 0,5 mM  $\text{CsCl}$  (triángulos negros) o 15 mM  $\text{CaCl}_2$  más 0,5 mM  $\text{CsCl}$  (triángulos blancos). Se procedió a medir la raíz principal de las plantas a diferentes tiempos, para estudiar su crecimiento. Los puntos son medias de 10 repeticiones  $\pm$  error estándar.

En cuanto a la velocidad de crecimiento, los resultados muestran como en ausencia de inhibidores no se observaron diferencias significativas entre ambas líneas, cuyas raíces crecieron a la misma velocidad. La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  o de  $\text{Ca}^{2+}$  más  $\text{Cs}^+$  en la solución nutritiva no afectó a la velocidad de crecimiento de las raíces de las plantas WT, mientras que redujo un 65% la velocidad de crecimiento en el caso de las plantas 2M cuando se adicionó  $\text{Ca}^{2+}$ , y un 71% cuando se añadían los dos inhibidores de forma conjunta. La presencia de  $\text{Cs}^+$  inhibía la velocidad en valores similares en ambas líneas (Figura 4.16).



**Figura 4.16. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y del  $\text{Cs}^+$  en la velocidad de crecimiento de las raíces de las plantas WT y 2M crecidas en placas.** Las semillas de las plantas WT (barras negras) y 2M (barras grises) se germinaron y crecieron en placas que contenían solución 1/5 de Hoagland solidificada con agarosa al 0,8%, con una concentración de  $\text{K}^+$  de 10 mM durante 7 días. A continuación se pasaron a otras placas con la misma solución solidificada, pero con una concentración de  $\text{K}^+$  de 1 mM, en ausencia o en presencia de 15 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{CsCl}$  o 15 mM  $\text{CaCl}_2$  más 0,5 mM  $\text{CsCl}$ . Se midió la raíz principal de las plantas en diferentes puntos del tiempo, y la velocidad de crecimiento de la raíz principal se calculó como el incremento de longitud de la misma por unidad de tiempo. Las barras son medias de 10 repeticiones  $\pm$  error estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas a  $p < 0,05$  en el test de Tukey.

Como segunda aproximación de este grupo de experimentos a largo plazo, las plantas se crecieron hidropónicamente para permitir el desarrollo de las mismas y poder estudiar así el crecimiento de la planta entera, el flujo neto de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cs}^+$ , y las concentraciones minerales alcanzadas dentro de los tejidos de las plantas. Estos experimentos se realizaron en plantas adultas que crecieron durante un periodo de 30 días en solución nutritiva 1/5 de Hoagland con una concentración final de  $\text{K}^+$  de 10 mM para evitar diferencias iniciales en el crecimiento y desarrollo entre las plantas de ambas líneas. A continuación se transfirieron a una solución con la misma composición, pero esta vez con una concentración final de  $\text{K}^+$  de 0,5 mM, donde se mantuvieron durante 8 días. Para comenzar el estudio del crecimiento y el efecto de los inhibidores, se pasaron las plantas a las soluciones experimentales, consistentes en solución

nutritiva 1/5 de Hoagland modificada con una concentración final de  $K^+$  de 1 mM. Distintos grupos de plantas se crecieron con diferentes concentraciones de  $Ca^{2+}$ ,  $Cs^+$ , y  $Ca^{2+}$  más  $Cs^+$ , mientras que un grupo creció en ausencia de inhibidores (plantas control). Para obtener los distintos parámetros a estudiar, se realizaron diferentes cosechas de material vegetal en diferentes puntos del tiempo.

Esta segunda aproximación se realizó a través de dos experimentos, en los que el diseño experimental fue exactamente el mismo. Las diferencias entre uno y otro radican exclusivamente en las concentraciones de los inhibidores usadas, a saber:

- Experimento 1:  $Ca^{2+}$  a una concentración de 15 mM;  $Cs^+$  a una concentración de 0,25 mM; y los dos inhibidores de forma conjunta, a 15 mM  $Ca^{2+}$  más 0,25 mM  $Cs^+$ .
- Experimento 2:  $Ca^{2+}$  a una concentración de 25 mM;  $Cs^+$  a una concentración de 0,1 mM; y los dos inhibidores de forma conjunta a 25 mM  $Ca^{2+}$  más 0,1 mM  $Cs^+$ .

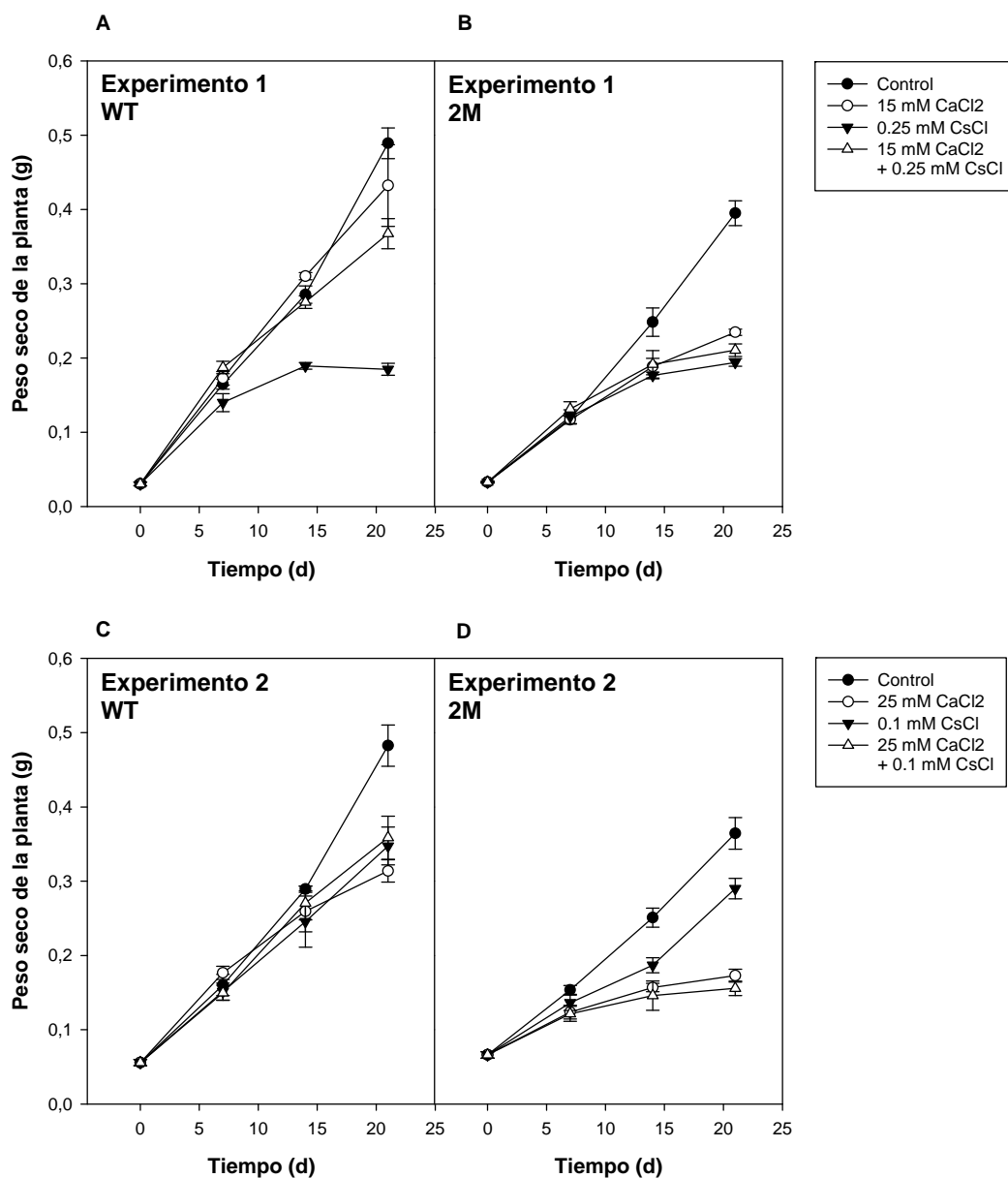
El hecho de que esta aproximación se llevase a cabo mediante dos experimentos distintos radica en el número de plantas necesario para obtener resultados representativos, así como en la duración de los mismos. En un único experimento habría sido muy difícil ser riguroso en el correcto desarrollo del estudio, así como en un idéntico trato a cada una de las plantas. En cada uno de los experimentos, los resultados siempre están referidos al control interno de ese mismo experimento, ya que aunque se realicen en las mismas condiciones controladas, cualquier mínima variación en su desarrollo podría acarrear diferencias. Aún así, los parámetros obtenidos independientemente en cada experimento son bastante similares en cuanto a las condiciones control. Las concentraciones elegidas de los inhibidores, así como sus combinaciones, proceden de la realización de experimentos preliminares en los que se observó el comportamiento de las plantas, y de los que se dedujo aquellos que proporcionarían más información al estudio. En el caso de haber usado el tratamiento de una concentración de 25 mM de  $Ca^{2+}$  y 0,25 mM de  $Cs^+$ , podría haber resultado demasiado estresante para las plantas *2M*, su crecimiento se hubiera visto muy afectado y prácticamente no se hubieran podido realizar cosechas de material vegetal en los últimos puntos del experimento, por lo que este tratamiento se descartó. En el otro extremo, si se hubiese decidido combinar las concentraciones menores de cada inhibidor (15 mM de  $Ca^{2+}$  y 0,1 mM de  $Cs^+$ ), los experimentos preliminares nos demostraron que a estas concentraciones, en las plantas WT

las diferencias obtenidas con las plantas control eran menores, a veces no significativas, por lo que se decidió aumentar la concentración de alguno de ellos para aumentar así las diferencias.

Los resultados muestran como, en condiciones control (concentración de  $K^+$  de 1 mM, sin adición extra de  $Ca^{2+}$  ni  $Cs^+$ ), el crecimiento de las plantas de la línea *2M* estaba ligeramente reducido en comparación con el crecimiento que mostraba la línea silvestre (Figura 4.17 A, B, C, y D). La presencia de  $Ca^{2+}$  produjo un efecto diferente en cada línea, inhibiendo el crecimiento de las plantas *2M* en mayor medida que el de las plantas WT. A una concentración de  $Ca^{2+}$  extra de 15 mM, el crecimiento de las plantas WT no se veía apenas afectado y las plantas alcanzaban al final del experimento un peso seco similar al de las plantas control. Sin embargo, en el caso de las plantas *2M*, esta concentración de  $Ca^{2+}$  inhibía el crecimiento, dando lugar a una reducción del 40% del peso seco en comparación con sus plantas control (Figura 4.17 A y B). Al incrementar la concentración añadida de  $Ca^{2+}$  hasta alcanzar una concentración de 25 mM, se reducía el crecimiento en ambas líneas, aunque el efecto era más pronunciado en las plantas correspondientes a la línea *2M*, donde su crecimiento terminaba deteniéndose al final del experimento (Figura 4.17 C y D).

La presencia de  $Cs^+$  inhibió el crecimiento de ambas líneas de una forma similar. Cuando la concentración de inhibidor aplicada era de 0,1 mM, la reducción del peso seco al final del experimento fue del 29% y del 27% en el caso de WT y *2M* respectivamente (Figura 4.17 C y D). Si se aplicaba  $Cs^+$  hasta alcanzar una concentración en la solución de crecimiento de 0,25 mM, el crecimiento se inhibía prácticamente de forma total, quedando el peso seco de las plantas de ambas líneas al final del experimento bastante por debajo que el experimentado por sus controles (Figura 4.17 A y B).

La presencia conjunta de  $Ca^{2+}$  y  $Cs^+$  en la solución producía efectos completamente distintos dependiendo de la línea. Mientras que en las plantas WT la presencia de  $Ca^{2+}$  revertía casi por completo el efecto negativo del  $Cs^+$  sobre el crecimiento, en las plantas de la línea *2M* no se observaba este efecto beneficioso del  $Ca^{2+}$ , viéndose el crecimiento prácticamente detenido. Es importante resaltar que de las dos combinaciones de estos inhibidores usadas, aquella en la que la concentración de  $Ca^{2+}$  era mayor (25 mM  $CaCl_2$  + 0,1 mM  $CsCl$ ), el efecto negativo sobre el crecimiento en las plantas *2M* también era mayor que cuando la concentración de  $Ca^{2+}$  era menor (15 mM  $CaCl_2$  + 0,25 mM  $CsCl$ ) (Figura 4.17 B y D).



**Figura 4.17. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y del  $\text{Cs}^+$  en el crecimiento de plantas WT y 2M crecidas en hidropónico.** Las plantas WT y 2M se crecieron en solución 1/5 de Hoagland modificada con una concentración de  $\text{K}^+$  de 10 mM durante 30 días, y a continuación durante 8 días con una concentración de  $\text{K}^+$  de 0,5 mM. Posteriormente se pasaron a 1/5 de Hoagland modificada con una concentración de  $\text{K}^+$  de 1 mM, en ausencia (círculos negros) o en presencia de 15 mM  $\text{CaCl}_2$  (círculos blancos, experimento 1), 25 mM  $\text{CaCl}_2$  (círculos blancos, experimento 2), 0,25 mM  $\text{CsCl}$  (triángulos negros, experimento 1), 0,1 mM  $\text{CsCl}$  (triángulos negros, experimento 2), 15 mM  $\text{CaCl}_2$  más 0,25 mM  $\text{CsCl}$  (triángulos blancos, experimento 1) o 25 mM  $\text{CaCl}_2$  más 0,1 mM  $\text{CsCl}$  (triángulos blancos, experimento 2). Se cosecharon las plantas de ambas líneas a diferentes tiempos y se secaron a 65°C para obtener el peso seco de cada planta. Cada punto corresponde a una media de 5 repeticiones  $\pm$  error estándar.

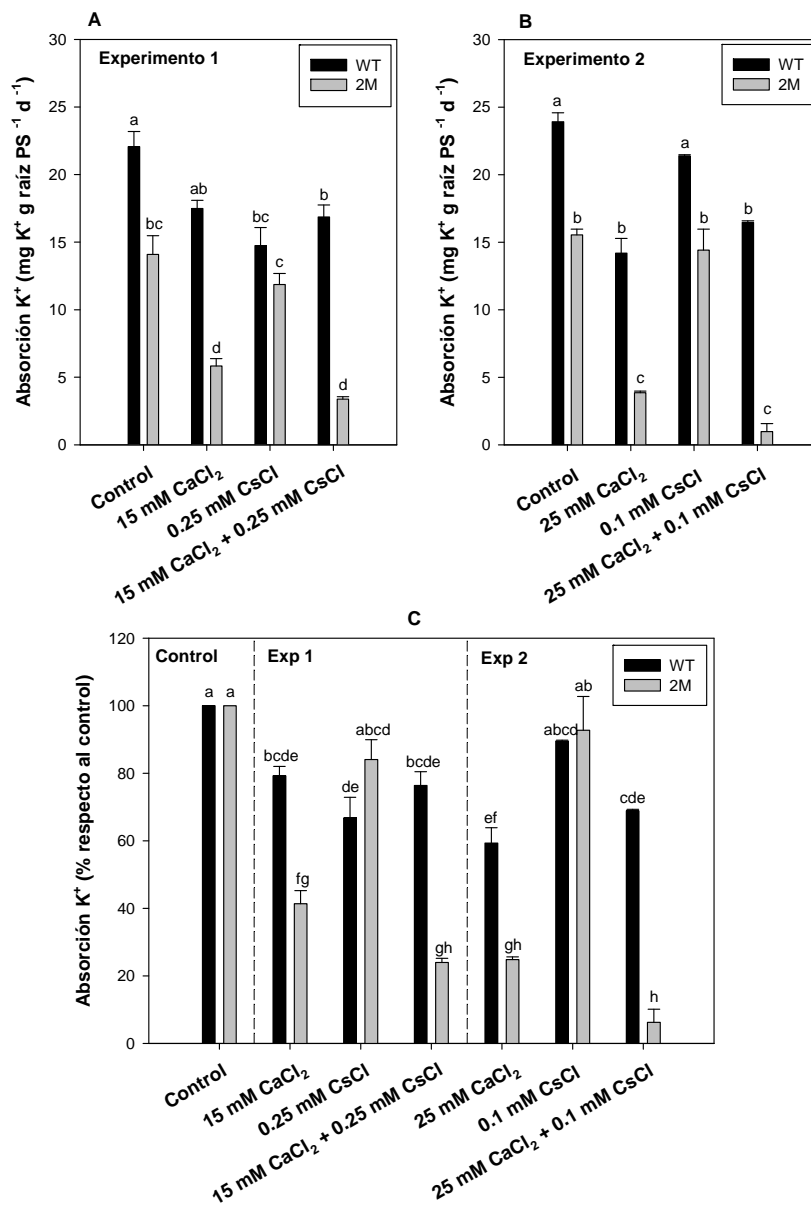


Otro de los parámetros estudiados en esta segunda aproximación fue el flujo neto de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cs^+$  en las plantas expuestas a las distintas concentraciones de los inhibidores descritos anteriormente. En este caso, los datos obtenidos también proceden de los dos experimentos mencionados. Bajo condiciones control, sin ningún tipo de inhibidores, en ambos experimentos se observaba como la entrada neta de  $K^+$  era menor en las plantas *2M* que en las plantas *WT*, observándose diferencias significativas (Figura 4.18 A y B). Aun partiendo de estos valores distintos de entrada neta de  $K^+$  en las dos líneas en condiciones control, se pudo comprobar cómo los inhibidores tenían un efecto diferente en cada una de ellas.

La presencia de  $Ca^{2+}$  a una concentración final de 15 mM redujo la entrada neta de  $K^+$  en las plantas silvestres al 79% de la absorción de  $K^+$  experimentada por sus plantas control. Cuando la concentración de  $Ca^{2+}$  aumentó hasta una concentración de 25 mM, la entrada neta de  $K^+$  se redujo aún más, hasta un valor del 60% experimentado por sus plantas control. En el caso de las plantas *2M*, el efecto del  $Ca^{2+}$  era mayor, disminuyendo la entrada neta de  $K^+$  hasta niveles del 41% y del 25% con respecto a la absorción neta de  $K^+$  en las plantas *2M*, en ausencia de inhibidores, a concentraciones finales de  $Ca^{2+}$  de 15 mM y 25 mM, respectivamente (Figura 4.18 A y B).

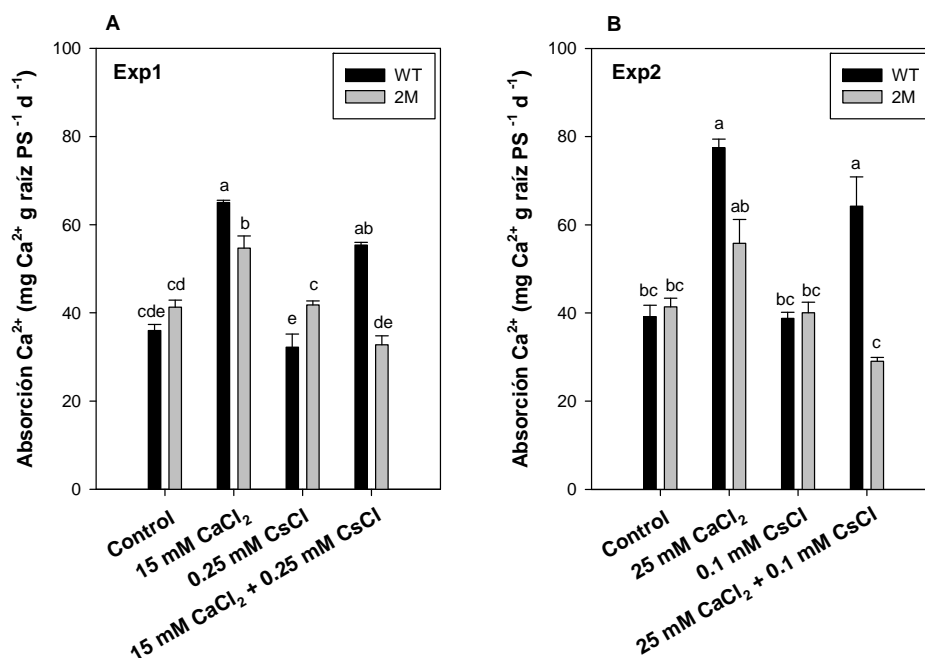
La presencia de  $Cs^+$  a una concentración de 0,1 mM apenas tuvo efecto en la entrada neta de  $K^+$  en ambas líneas, pero al aumentar la concentración de  $Cs^+$  hasta niveles de 0,25 mM, ésta sí se vio afectada. En presencia de 0,25 mM  $Cs^+$ , los valores absolutos de absorción de  $K^+$  fueron similares entre las plantas *WT* y *2M* (Figura 4.18 A y B). Sin embargo, cuando el efecto del inhibidor es referido a la entrada neta de  $K^+$  de las plantas control sin inhibidores, se observó que el  $Cs^+$  producía una mayor inhibición en la línea *WT* que en la línea mutante (61% y 76% respectivamente, Figura 4.18 C), si bien estas diferencias no eran significativamente distintas.

Finalmente, cuando se añadían los dos inhibidores,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cs}^+$ , de forma conjunta, se observaron efectos bastante distintos en función de la línea. La entrada neta de  $\text{K}^+$  en WT cuando se aplicaron los dos inhibidores conjuntamente se reducía con respecto al de las plantas control que no tenían inhibidores, observándose estos resultados tanto cuando se expresan en valores absolutos como cuando se hace en términos relativos. Además, en términos relativos, los inhibidores aplicados de forma individual o conjunta producían una inhibición similar (Figura 4.18 C). En el caso de la línea *2M*, la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  más  $\text{Cs}^+$  producía una mayor inhibición de la entrada neta de  $\text{K}^+$  que la producida por cada uno de ellos de manera individual en cualquiera de las dos combinaciones estudiadas (Figura 4.18 A, B y C). Esto lo podemos observar claramente en los valores relativos de absorción de  $\text{K}^+$ , donde al aplicar  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cs}^+$  conjuntamente a concentraciones de 15 mM y 0,25 mM respectivamente, la absorción se reducía a un 77% de la experimentada por sus plantas control en el caso de WT mientras que en la línea *2M*, la entrada neta de  $\text{K}^+$  relativa a la experimentada por las plantas de su misma línea, crecidas sin inhibidores, se reducía a un 24%. Cuando las concentraciones de los inhibidores añadidos conjuntamente eran de 25 mM y 0,1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cs}^+$  respectivamente, la absorción relativa de  $\text{K}^+$  disminuía a valores de un 69% en el caso de la línea WT, y de un 6% en el caso de la línea *2M* (Figura 4.18 C).



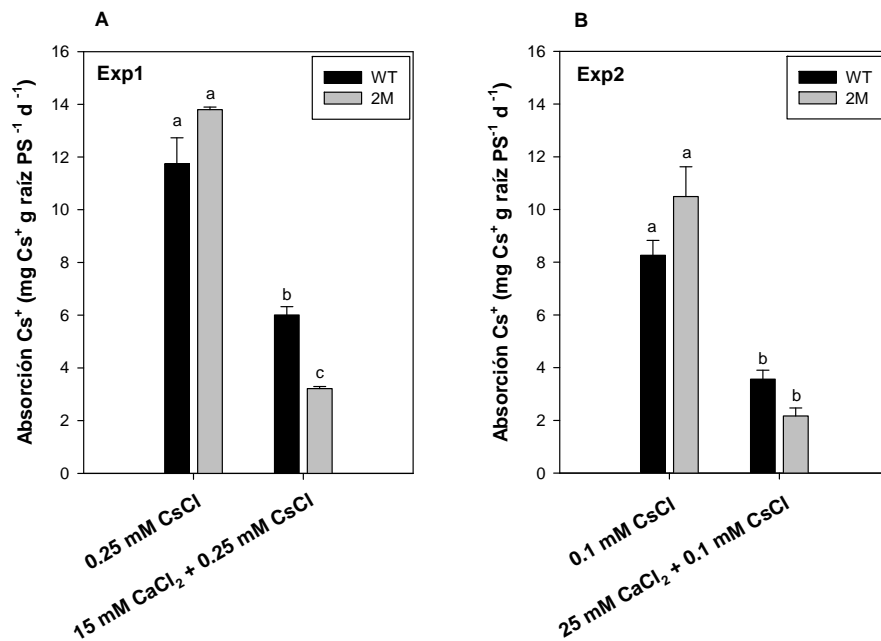
**Figura 4.18. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y del  $\text{Cs}^+$  en la absorción de  $\text{K}^+$  en las plantas WT y 2M.** Las plantas se crecieron como se indica en la figura 4.17. Se realizó una cosecha de plantas de ambas líneas antes de aplicar los tratamientos y tras 21 días creciendo en presencia de éstos. Las plantas se secaron, pesaron y se determinaron sus concentraciones internas de  $\text{K}^+$ . La absorción de  $\text{K}^+$  se calculó como el incremento del  $\text{K}^+$  total en la planta observado entre las dos cosechas por unidad de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Las barras son medias de 5 repeticiones  $\pm$  error estándar. Las figuras A y B corresponden con los experimentos 1 y 2, donde se usan distintas concentraciones de inhibidores, mostrando en ambas valores absolutos de absorción de  $\text{K}^+$ , mientras que la figura C muestra los mismos datos referidos a su control sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Cs}^+$  añadidos, que se toman como el 100%. Las diferentes letras indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  en un test de Tukey.

El flujo neto de  $\text{Ca}^{2+}$  bajo condiciones control fue similar tanto en WT como en 2M en ambos experimentos (Figura 4.19 A y B). La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  a la solución condujo a un aumento en la entrada neta de  $\text{Ca}^{2+}$  en las dos líneas, si bien este aumento fue mayor en la línea WT que en la línea 2M, tanto a 15 mM como a 25 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 4.19 A y B). La presencia de  $\text{Cs}^+$  en la solución a cualquiera de las dos concentraciones estudiadas no condujo a cambios en la entrada neta de  $\text{Ca}^{2+}$  con respecto a las plantas control (sin  $\text{Ca}^{2+}$  extra añadido) de su misma línea (Figura 4.19 A y B). Por último, cuando se añadían los dos inhibidores juntos, la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentó en las plantas de la línea WT si la comparamos con las plantas crecidas sin ninguno de estos inhibidores, mientras que en las plantas 2M la entrada neta de  $\text{Ca}^{2+}$  no aumentó, siendo la misma que en el tratamiento control sin  $\text{Ca}^{2+}$  añadido (Figura 4.19 A y B).



**Figura 4.19. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y del  $\text{Cs}^+$  en la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  en las plantas WT y 2M.** Las plantas se crecieron como se indica en la figura 4.17. Se realizó una cosecha de plantas de ambas líneas antes de aplicar los tratamientos y tras 21 días creciendo en presencia de éstos. Se secaron, pesaron y analizaron sus concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  internas. La absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  se calculó como el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  total en la planta observado entre las dos cosechas por unidad de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Las barras son medias de 5 repeticiones  $\pm$  error estándar. Las figuras A y B corresponden con los experimentos 1 y 2, donde se usan distintas concentraciones de inhibidores, mostrando en ambas valores absolutos de absorción de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las diferentes letras indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  en un test de Tukey.

En el caso de la entrada neta de  $\text{Cs}^+$ , ambas líneas mostraron unos valores muy similares cuando se aplicó a una concentración de 0,1 mM como cuando se hizo a 0,25 mM (Figura 4.20 A y B). Cuando además de  $\text{Cs}^+$  se añadió  $\text{Ca}^{2+}$ , la absorción del catión monovalente se vio disminuida en ambas líneas. Cuando se añadieron ambos inhibidores conjuntamente, a concentraciones de 25 mM en el caso del  $\text{Ca}^{2+}$  y 0,1 mM en el caso del  $\text{Cs}^+$ , la reducción en la absorción de este último se vio igualmente disminuida en ambas líneas (Figura 4.20 B) mientras que si se aplicaban a concentraciones de 15 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y 0,25 mM de  $\text{Cs}^+$ , sí que se apreciaron diferencias significativas entre las dos líneas, siendo menor la entrada de  $\text{Cs}^+$  en el caso de las plantas 2M (Figura 4.20 A).



**Figura 4.20. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y del  $\text{Cs}^+$  en la absorción de  $\text{Cs}^+$  en las plantas WT y 2M.** Las plantas se crecieron como se indica en la figura 4.17. Se realizó una cosecha de plantas de ambas líneas antes de aplicar los tratamientos y tras 21 días creciendo en presencia de éstos. Se secaron, pesaron y analizaron sus concentraciones de  $\text{Cs}^+$  internas. La absorción de  $\text{Cs}^+$  se calculó solo para las plantas crecidas en tratamientos que contenían este inhibidor, y se hizo como el incremento del  $\text{Cs}^+$  total en la planta observado entre las dos cosechas por unidad de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Las barras son medias de 5 repeticiones  $\pm$  error estándar. Las figuras A y B corresponden con los experimentos 1 y 2, donde se usan distintas concentraciones de inhibidores, mostrando en ambas valores absolutos de absorción de  $\text{Cs}^+$ . Las diferentes letras indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  en un test de Tukey.

El último parámetro estudiado en estos experimentos fue las concentraciones de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cs^+$  en las plantas, así como la relación  $Cs^+/K^+$  de las mismas tras 21 días de exposición a los diferentes tratamientos (Tabla 4.5 A y B).

En ambos experimentos realizados se pudo comprobar cómo la concentración de  $K^+$  en las plantas WT era mayor que la registrada en las plantas 2M (Tabla 4.5 A y B). Cuando se añadió el  $Ca^{2+}$  como inhibidor, tanto a una concentración final de 15 mM como a la de 25 mM, se observó una ligera disminución en la concentración de  $K^+$  en ambas líneas, si bien siempre fue mayor el descenso en las plantas de la línea 2M (Tabla 4.5 A y B). Al aplicar  $Cs^+$  a una concentración de 0,1 mM, se observó una ligera bajada en la concentración de  $K^+$  en ambas líneas, siendo mayor en la línea 2M (Tabla 4.5 B), mientras que al aplicar una mayor concentración de Cs (0,25 mM), el efecto es el contrario, observándose un aumento en la concentración de  $K^+$  de todas las plantas estudiadas. (Tabla 4.5 A). Cuando se añadieron los dos inhibidores al mismo tiempo, en las plantas WT la disminución en la concentración de  $K^+$  es muy ligera o nula, mientras que en las plantas de la línea 2M se observa una drástica disminución de la concentración de  $K^+$  (Tabla 4.5 A y B).

La concentración de  $Ca^{2+}$  encontrada en las plantas de la línea 2M fue siempre mayor que la de la línea WT en todas las condiciones estudiadas, a excepción del tratamiento consistente en la adición de los dos inhibidores juntos, donde la concentración de  $Ca^{2+}$  en las plantas WT era superior a la de las plantas 2M (Tabla 4.5 A y B).

Al aplicar como inhibidor  $Cs^+$ , en ambas líneas se alcanzaron concentraciones muy similares del mismo (Tabla 4.5 A y B). Al aplicar  $Ca^{2+}$  de forma conjunta con el  $Cs^+$ , la concentración de  $Cs^+$  disminuía con respecto al tratamiento con  $Cs^+$  solo. Esta disminución de la concentración de  $Cs^+$  por efecto de la presencia de  $Ca^{2+}$  era mayor en la línea 2M que en la línea WT (Tabla 4.5 A y B).

Para finalizar, se determinó la relación  $Cs^+/K^+$ . En todos los tratamientos en los que se aplicaba  $Cs^+$ , se calculó su relación con el  $K^+$ , mostrando como ésta siempre era superior en las plantas 2M que en las plantas WT (Tabla 4.5 A y B). Mencionar que en los tratamientos donde se aplicó  $Ca^{2+}$  y  $Cs^+$  conjuntamente, esta ratio disminuía en todos los casos (Tabla 4.5 A y B), si bien cuando se aplicó  $Ca^{2+}$  a una concentración de 15 mM y  $Cs^+$  a una concentración de 0,25 mM, esta reducción fue mayor en la línea WT (Tabla 4.5 A).

A	[K <sup>+</sup> ] (mg g <sup>-1</sup> DW)		[Ca <sup>2+</sup> ] (mg g <sup>-1</sup> DW)		[Cs <sup>+</sup> ] (mg g <sup>-1</sup> DW)		Cs <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	
	WT	2M	WT	2M	WT	2M	WT	2M
CONTROL	25,3 ± 0,4	16,6 ± 0,8	39,8 ± 1,9	45,6 ± 1,5				
15mM Ca <sup>2+</sup>	23,3 ± 0,2	14,0 ± 0,9	74,9 ± 3,3	77,8 ± 2,2				
0,25mM Cs <sup>+</sup>	28,4 ± 0,7	21,3 ± 0,7	53,3 ± 1,0	57,0 ± 1,1	16,9 ± 0,1	16,2 ± 0,2	0,53 ± 0,01	0,63 ± 0,02
15mM Ca <sup>2+</sup> + 0,25mM Cs <sup>+</sup>	24,5 ± 0,7	10,3 ± 0,2	75,5 ± 0,9	45,1 ± 0,3	7,4 ± 0,1	3,9 ± 0,1	0,23 ± 0,01	0,43 ± 0,03

B	[K <sup>+</sup> ] (mg g <sup>-1</sup> DW)		[Ca <sup>2+</sup> ] (mg g <sup>-1</sup> DW)		[Cs <sup>+</sup> ] (mg g <sup>-1</sup> DW)		Cs <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	
	WT	2M	WT	2M	WT	2M	WT	2M
CONTROL	32,5 ± 0,5	22,8 ± 0,6	48,9 ± 2,1	53,8 ± 1,6				
25mM Ca <sup>2+</sup>	25,8 ± 1,6	16,2 ± 0,5	87,2 ± 7,2	89,7 ± 2,1				
0,1mM Cs <sup>+</sup>	31,1 ± 0,6	19,6 ± 0,9	48,6 ± 1,4	53,1 ± 2,2	9,3 ± 0,5	9,7 ± 0,8	0,31 ± 0,01	0,51 ± 0,01
25mM Ca <sup>2+</sup> + 0,1mM Cs <sup>+</sup>	27,0 ± 0,9	13,0 ± 1,3	82,2 ± 5,5	62,7 ± 2,0	4,2 ± 0,3	3,0 ± 0,2	0,16 ± 0,01	0,24 ± 0,01

**Tabla 4.5 A y 4.5 B. Concentraciones de K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cs<sup>+</sup> y relaciones Cs<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en plantas completas de WT y 2M.** Las plantas se crecieron en presencia de 10 mM K<sup>+</sup> durante 30 días, se transfirieron a 0,5 mM K<sup>+</sup> durante 8 días y después a 1 mM K<sup>+</sup>. Las tablas muestran las concentraciones de cationes y las relaciones Cs<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> tras 21 días creciendo en la presencia de 1 mM K<sup>+</sup> (Control) o en la presencia de 1 mM K<sup>+</sup> más las distintas concentraciones empleadas de los inhibidores. Los datos corresponden a las plantas de los dos mismos experimentos empleados para las figuras 4.17, 4.18, 4.19 y 4.20. La tabla A corresponde con el experimento 1, mientras que la Tabla B corresponde al experimento 2. Los datos son medias de 5-7 repeticiones ± error estándar.

#### 4.2.4. Respuesta de las plantas a altas concentraciones de Na<sup>+</sup> en experimentos a largo plazo

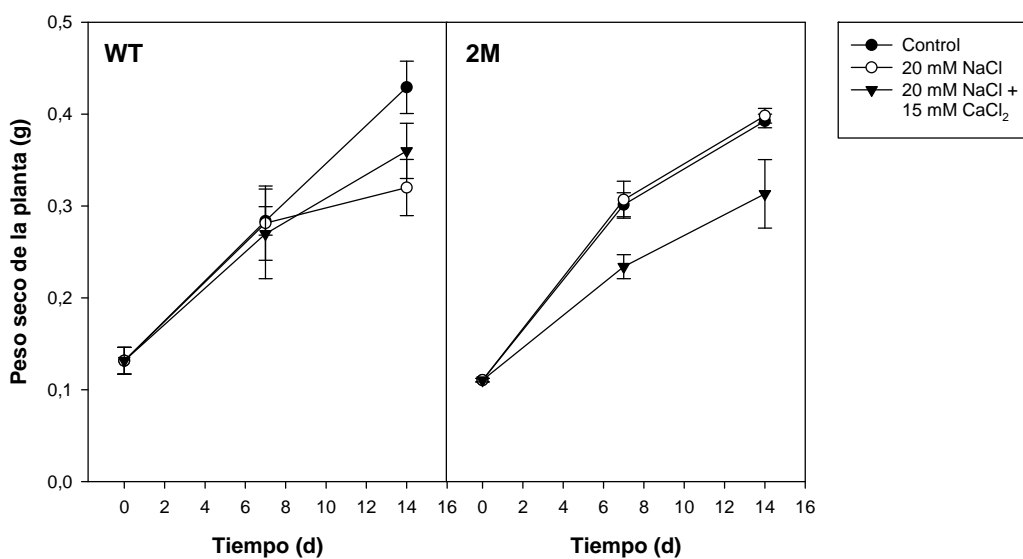
En los experimentos del apartado 4.2.1, en los que se lleva a cabo una caracterización farmacológica de la absorción de K<sup>+</sup> en las plantas WT y 2M, se observó que el Na<sup>+</sup> daba lugar a un efecto diferente en estas dos líneas. Debido a la importancia del Na<sup>+</sup> como componente mayoritario de las sales que causan los problemas de salinidad de las tierras de cultivo, se decidió estudiar con mayor profundidad el efecto de este inhibidor de la entrada de K<sup>+</sup> en ambas líneas. Para ello se utilizó el mismo abordaje que en los estudios a largo plazo citados anteriormente. Las plantas se crecieron hidropónicamente para permitir el desarrollo de las mismas y poder estudiar así el crecimiento de la planta entera, la absorción neta de K<sup>+</sup> y las concentraciones minerales alcanzadas dentro de los tejidos de las plantas. Estos experimentos se realizaron en plantas adultas que crecieron durante un periodo de 30 días en solución nutritiva 1/5 de Hoagland con una concentración final de K<sup>+</sup> de 10 mM. A continuación se transfirieron a una solución con 0,5 mM de K<sup>+</sup>, donde se mantuvieron durante 8 días. Para comenzar el estudio, se pasaron las plantas a las soluciones experimentales, consistentes en solución nutritiva 1/5 de Hoagland modificada con una concentración final de K<sup>+</sup> de 1 mM. Un grupo de plantas crecieron con NaCl en la solución de crecimiento a una concentración de 20 mM; otro grupo con 20 mM NaCl más 15 mM CaCl<sub>2</sub>, y otro grupo creció en ausencia de inhibidores (plantas control). Para obtener los distintos parámetros a estudiar, se realizaron diferentes cosechas de material vegetal a diferentes tiempos.

En lo referente al crecimiento, durante los primeros días en los que las plantas se encuentran creciendo con una concentración de K<sup>+</sup> de 1 mM, las plantas control (en ausencia de Na<sup>+</sup> o Ca<sup>2+</sup> adicional) de ambas líneas no mostraron diferencias significativas en cuanto a su peso seco, si bien en la segunda semana de crecimiento en estas condiciones, las plantas correspondientes a la línea 2M empezaron a disminuir su peso seco en relación a las plantas WT (Figura 4.21).



Cuando se añadió  $\text{Na}^+$  a una concentración de 20 mM a la solución de crecimiento, las plantas correspondientes a la línea WT sufrieron una visible disminución de su peso seco si se comparan con las plantas control de su misma línea, disminuyendo éste en un 25%. Por el contrario, en las plantas de la línea 2M no se apreció una disminución del crecimiento cuando crecieron en presencia de  $\text{Na}^+$  durante el periodo que dura el experimento, es decir, 14 días (Figura 4.21).

La adición de 15 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el tratamiento con 20 mM de  $\text{Na}^+$  parecía recuperar mínimamente el crecimiento de las plantas silvestres, sin llegar a observarse diferencias significativas en los pesos secos de las plantas tratadas solo con  $\text{Na}^+$  o con  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 4.21). En el caso de las plantas 2M, la adición de  $\text{Ca}^{2+}$ , como ya se observó en experimentos anteriores, disminuyó significativamente el crecimiento de las mismas, siendo éste un 20% menor que el experimentado por las plantas control de su misma línea (Figura 4.21).

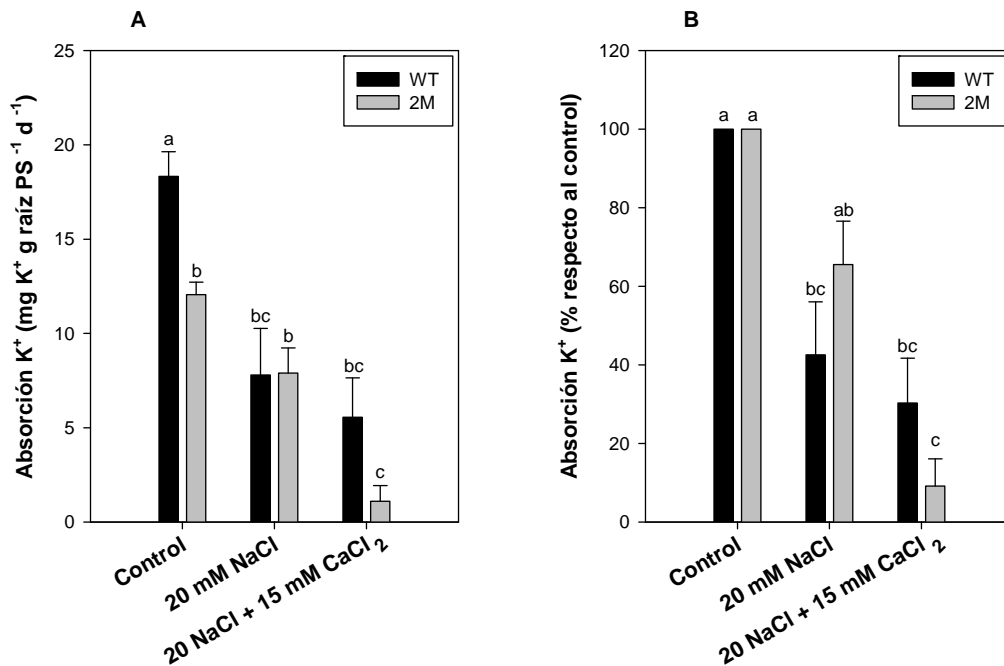


**Figura 4.21. Efecto del  $\text{Na}^+$  y del  $\text{Ca}^{2+}$  en el crecimiento de plantas WT y 2M crecidas en cultivo hidropónico.** Las plantas WT y 2M se crecieron en solución 1/5 de Hoagland modificada con una concentración de  $\text{K}^+$  de 10 mM durante 30 días, para a continuación crecerlas durante 8 días en la misma solución, con una concentración de  $\text{K}^+$  de 0,5 mM. Posteriormente se pasaron a 1/5 de Hoagland modificada con una concentración de  $\text{K}^+$  de 1 mM, en ausencia (círculos negros) o en presencia de 20 mM NaCl (círculos blancos) o 20 mM NaCl más 15 mM  $\text{CaCl}_2$  (triángulos negros). Se cosecharon las plantas de ambas líneas a diferentes tiempos y se secaron a 65°C para obtener el peso seco de cada planta. Cada punto corresponde a una media de 5 repeticiones  $\pm$  error estándar.

El estudio del flujo neto de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  también mostró diferencias significativas entre las dos líneas de plantas, así como entre los distintos tratamientos aplicados.

La absorción de  $K^+$  por parte de las plantas WT fue mayor que la experimentada por las plantas *2M* en ausencia de inhibidores (plantas control), como ocurrió en el resto de experimentos de absorción (Figura 4.22 A). La adición de NaCl a la concentración indicada condujo a una disminución en la absorción de  $K^+$  por parte de las dos líneas de plantas, si bien esta disminución era significativa en el caso de las plantas silvestres, mientras que no lo era en el caso de las plantas mutantes (Figura 4.22 A). Al calcular la absorción de  $K^+$  como porcentaje del absorbido por parte de las plantas control (sin  $Na^+$  ni  $Ca^{2+}$  extra), en el caso de las plantas WT, el  $Na^+$  redujo la entrada neta de  $K^+$ , siendo el 42% de la experimentada por sus controles, mientras que en el caso de las plantas *2M* la entrada neta de  $K^+$  fue un 65% de la entrada neta experimentada por las plantas crecidas sin NaCl (Figura 4.22 B).

Cuando se añadieron de forma conjunta NaCl y  $CaCl_2$  a la solución de crecimiento ocurrió algo distinto. Mientras que en las plantas WT no hubo diferencias significativas en cuanto a la entrada neta de  $K^+$  entre las plantas crecidas solo con  $Na^+$  o con  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , la adición de  $Ca^{2+}$  junto al  $Na^+$  produce en las plantas *2M* una disminución significativa en cuanto a la entrada neta de  $K^+$  (Figura 4.22 A). De nuevo expresándolo en tanto por ciento con respecto a sus controles, en el caso de WT disminuye, siendo un 31% de la entrada neta mostrada por el control, lo que no es significativamente distinto al porcentaje obtenido cuando sólo se añadió  $Na^+$ , mientras que en el caso de *2M* la absorción disminuye significativamente hasta un 9% de la entrada neta que mostraron las plantas control de su misma línea (Figura 4.22 B).



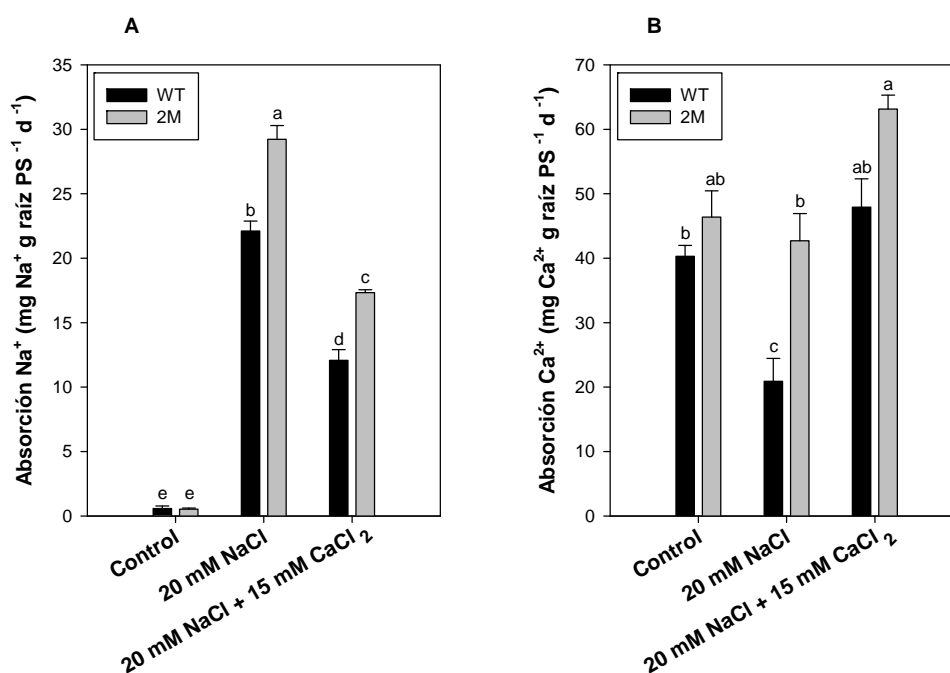
**Figura 4.22. Efecto del Na<sup>+</sup> y del Ca<sup>2+</sup> en la absorción de K<sup>+</sup> en las plantas WT y 2M.** Las plantas se crecieron como se indica en la figura 4.21. Se realizó una cosecha de plantas de ambas líneas antes de aplicar los tratamientos y tras 14 días creciendo en presencia de éstos. Las plantas se secaron, pesaron y se determinaron las concentraciones internas de K<sup>+</sup>. La absorción de K<sup>+</sup> se calculó como el incremento del K<sup>+</sup> total en la planta observado entre las dos cosechas por unidad de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Las barras son medias de 5 repeticiones  $\pm$  error estándar. La figura A muestra valores absolutos de absorción de K<sup>+</sup>, mientras que la B muestra el K<sup>+</sup> absorbido como porcentaje del absorbido por las plantas control, sin Na<sup>+</sup> ni Ca<sup>2+</sup> añadidos, que se toma como el 100%. Las diferentes letras indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  en un test de Tukey.

También se llevó a cabo el estudio de la entrada neta de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> por parte de las plantas de ambas líneas (Figura 4.23). La entrada neta de Na<sup>+</sup> experimentada por las plantas crecidas en la solución de crecimiento sin adición extra de NaCl fue muy baja, ya que la citada solución no contiene NaCl añadido, y el flujo que se aprecia en la figura puede deberse a trazas del catión en el agua con la que se prepara la solución o en las sales minerales para preparar la solución nutritiva. De hecho, la solución control contenía una concentración de Na<sup>+</sup> de 200  $\mu$ M, como se determinó por espectrometría de absorción atómica (Figura 4.23 A).

Cuando se añadió 20 mM de NaCl a la solución se observó en las plantas de ambas líneas entrada neta de Na<sup>+</sup>, siendo en las plantas 2M mayor que en las WT (22 mg Na<sup>+</sup> g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en

el caso de WT frente a los 29 de las plantas 2M) (Figura 4.23 A). Cuando además de Na<sup>+</sup> se añadió Ca<sup>2+</sup> a la solución, la entrada neta de Na<sup>+</sup> disminuyó significativamente en ambas líneas en relación a la experimentada por las plantas crecidas sólo con Na<sup>+</sup>, si bien la entrada neta de Na<sup>+</sup> seguía siendo mayor en las plantas 2M que en las plantas WT (Figura 4.23 A).

El flujo neto de Ca<sup>2+</sup> fue similar en las plantas de las líneas WT y 2M cuando crecían sin Na<sup>+</sup> ni Ca<sup>2+</sup> extra añadido (Figura 4.23 B). Cuando se añadía 20 mM NaCl a la solución de crecimiento, mientras que la entrada neta de Ca<sup>2+</sup> no experimentaba variaciones importantes en las plantas 2M, en las plantas WT ésta disminuía en un 50% con respecto a sus controles (Figura 4.23 B). Al añadir los dos inhibidores juntos (20 mM Na<sup>+</sup> más 15 mM Ca<sup>2+</sup>), la entrada neta de Ca<sup>2+</sup> aumentó en ambas líneas con respecto a la mostrada por las plantas control, si bien este aumento no llegó a ser significativo en ninguna de las dos líneas (Figura 4.23 B).



**Figura 4.23. Efecto del Na<sup>+</sup> y del Ca<sup>2+</sup> en la absorción de Na<sup>+</sup> (A) y Ca<sup>2+</sup> (B) en las plantas WT y 2M.** Las plantas se crecieron como se indica en la figura 4.21. Se realizó una cosecha de plantas de ambas líneas antes de aplicar los tratamientos y tras 14 días creciendo en presencia de éstos. Las plantas se secaron, pesaron y se determinaron las concentraciones internas de Na<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup>. La absorción de éstos se calculó como el incremento de Na<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup> total en la planta observado entre las dos cosechas por unidad de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Las barras son medias de 5 repeticiones ± error estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  en un test de Tukey.

El último parámetro estudiado fue la concentración alcanzada de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  en los tejidos de la planta completa, así como la relación  $K^+/Na^+$  y la suma de las concentraciones de  $K^+$  y  $Na^+$  tras 14 días de exposición a los distintos tratamientos (Tabla 4.6).

La concentración de  $K^+$  era mayor en las plantas WT que en las plantas 2M, como sucedió en los experimentos descritos anteriormente. Cuando las plantas crecieron con 20 mM  $Na^+$ , la concentración de  $K^+$  disminuyó en ambas líneas. Al añadir  $Ca^{2+}$  sobre el tratamiento con  $Na^+$ , la concentración de  $K^+$  se mantenía en WT, mientras que en 2M continuó disminuyendo aún más (Tabla 4.6).

La concentración de  $Ca^{2+}$  en las plantas de ambas líneas era similar en condiciones control. Cuando se aplicaba NaCl a la solución, esta concentración disminuía en ambas líneas, si bien lo hacía en mayor medida en las plantas WT (un 21% en WT frente a un 12% en 2M). Al crecer las plantas con NaCl y  $CaCl_2$ , la concentración de  $Ca^{2+}$  aumentaba en ambas líneas sin observarse diferencias significativas entre ellos (Tabla 4.6).

Apenas se encontró  $Na^+$  en los tejidos de las plantas control de ambas líneas en el tratamiento control sin NaCl añadido. Cuando éstas crecieron con una concentración de 20 mM NaCl, la concentración alcanzada en las plantas aumentó hasta 24,7 y 28,5 mg de  $Na^+$  gPS<sup>-1</sup> en WT y 2M respectivamente, mientras que si crecían con NaCl y  $CaCl_2$  las concentraciones no llegaban a valores tan altos, quedándose en 13,1 y 16,7 mg de  $Na^+$  gPS<sup>-1</sup> (Tabla 4.6).

La relación  $K^+/Na^+$  es un parámetro muy importante relacionado con la tolerancia a la salinidad. Cuando las plantas crecieron en ausencia de  $Na^+$  añadido, esta relación fue bastante alta, debido a la baja concentración de  $Na^+$  en el medio de crecimiento. Además, no se observaron diferencias significativas entre ambas líneas. En el caso de los dos tratamientos en los que las plantas crecían con  $Na^+$  exclusivamente como inhibidor, la relación  $K^+/Na^+$  disminuyó drásticamente, quedando en torno a uno en el caso de las plantas WT, y por debajo de éste en el caso de las 2M. Cuando además de NaCl se añadió  $CaCl_2$ , la relación  $K^+/Na^+$  también fue más alta en las plantas WT, siendo en este caso de 1,85, mientras que en el caso de las plantas 2M fue de 0,98 (Tabla 4.6).

Otro parámetro importante estudiado fue la suma de las concentraciones de  $K^+$  y  $Na^+$  en la planta. En el caso de las plantas control, éste valor era superior en las plantas WT, ya que en el tratamiento control apenas hay  $Na^+$  interno y las plantas WT tienen más concentración de  $K^+$  que las 2M. Cuando se añadió  $Na^+$  a la solución de crecimiento, la suma de ambas concentraciones aumentó en los dos grupos de plantas, siendo la suma de las concentraciones de  $K^+$  y  $Na^+$  más alta en las plantas WT, si bien la diferencia entre ambos valores disminuyó, estrechándose las diferencias, ya que el componente sódico de esta suma en el caso de las plantas 2M era superior al de las plantas WT. Cuando las plantas crecieron con NaCl y  $CaCl_2$ , el valor de la suma de las concentraciones de  $Na^+$  y  $K^+$  en las plantas WT fue similar al de las plantas WT crecidas sin NaCl, mientras que en las plantas 2M era significativamente superior al de las 2M control, crecidas en ausencia de  $Na^+$  (Tabla 4.6).

	[K <sup>+</sup> ] (mg g <sup>-1</sup> DW)		[Ca <sup>2+</sup> ] (mg g <sup>-1</sup> DW)		[Na <sup>+</sup> ] (mg g <sup>-1</sup> DW)		Relación [K <sup>+</sup> ]/[Na <sup>+</sup> ]		[K <sup>+</sup> ] + [Na <sup>+</sup> ] (mg g <sup>-1</sup> DW)	
	WT	2M	WT	2M	WT	2M	WT	2M	WT	2M
<b>CONTROL</b>	33,8 ± 2,1	23,3 ± 1,0	56,2 ± 0,4	59,3 ± 4,9	0,99 ± 0,16	0,77 ± 0,07	28,06 ± 1,1	30,6 ± 3	34,76 ± 2,0	24,04 ± 1,0
<b>20mM NaCl</b>	26,8 ± 1,0	19,1 ± 1,4	44,8 ± 2,4	52,3 ± 2,1	24,7 ± 1,1	28,5 ± 0,5	1,09 ± 0,06	0,62 ± 0,02	51,54 ± 1,6	46,26 ± 0,3
<b>20mM NaCl + 13,5mM CaCl<sub>2</sub></b>	25,1 ± 1,0	15,6 ± 0,2	73,6 ± 1,4	75,6 ± 1,0	13,1 ± 0,2	16,9 ± 2,9	1,85 ± 0,11	0,98 ± 0,17	37,46 ± 0,9	32,51 ± 3,1

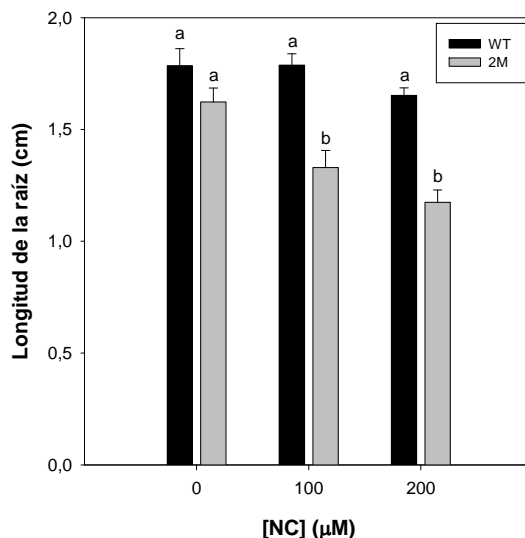
**Tabla 4.6: Concentraciones de K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> y suma de las concentraciones de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> en plantas completas de las líneas WT y 2M.** Las plantas se crecieron en presencia de 10 mM K<sup>+</sup> durante 30 días, se transfirieron a 0,5 mM K<sup>+</sup> durante 8 días y después a 1 mM K<sup>+</sup>. Las tablas muestran las concentraciones de cationes, las relaciones K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> y la suma de las concentraciones de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> tras 14 días creciendo en presencia de 1 mM K<sup>+</sup> (Control) o en presencia de 1 mM K<sup>+</sup> más las distintas concentraciones empleadas de los inhibidores. Los datos corresponden a las plantas del mismo experimento empleado para las figuras 4.21, 4.22 y 4.23. Los datos son medias de 5-7 repeticiones ± error estándar.

#### 4.2.5. Efecto de cAMP sobre la absorción de $K^+$

Se ha sugerido que algunos miembros de la familia de los canales regulados por nucleótidos cíclicos podrían constituir rutas de la absorción de  $K^+$ . Así, se decidió comprobar el efecto sobre el crecimiento y sobre la absorción de  $K^+$  de un derivado permeable a membrana de estos nucleótidos cíclicos: el N 6,2'-O-Dibutiriladenosin 3'-5'-monofosfato cíclico (NC). Se realizaron varios experimentos preliminares para determinar las concentraciones de NC a las cuales se observaban diferencias en el crecimiento entre las plantas de la línea WT y aquellas pertenecientes a la línea 2M, resultando que las concentraciones idóneas para este tipo de experimentos eran 100 y 200  $\mu$ M.

En un primer experimento, las plantas de las líneas WT y 2M se crecieron en medio 1/5 Hoagland sólido en placas, en ausencia y en presencia del NC, para posteriormente estudiar el crecimiento de la raíz principal de cada una de ellas. Las plantas crecieron durante 7 días en solución 1/5 de Hoagland con una concentración final de  $K^+$  de 10 mM, solidificada con agarosa al 0,8%. A continuación se pasaron a otras placas con el mismo medio de cultivo, pero esta vez con una concentración de  $K^+$  de 1 mM, y en ausencia o presencia del nucleótido cíclico. Se mantuvieron en estas condiciones durante 7 días, al cabo de los cuales el crecimiento de la raíz principal de las plantas de la línea WT no se vio afectado por la presencia del nucleótido, mientras que las plantas de la línea 2M que crecieron con concentraciones de 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M, vieron reducido el crecimiento de su raíz hasta alcanzar valores de 82% y 72% respectivamente con respecto al crecimiento de las plantas de su misma línea que crecieron en ausencia del nucleótido cíclico (Figura 4.24).

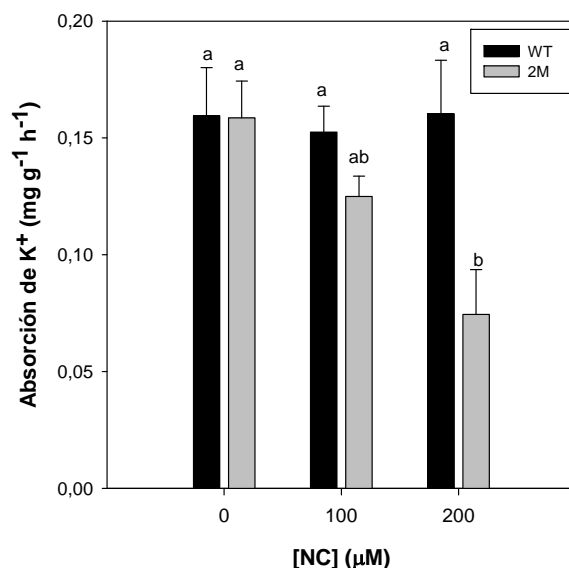




**Figura 4.24. Efecto del N 6,2'-O-Dibutiriladenosin 3'-5'- monofosfato cíclico (NC) sobre el crecimiento de la raíz de las plantas WT y 2M.** Las semillas de las plantas WT (barras negras) y 2M (barras grises) se germinaron en placas que contenían solución 1/5 Hoagland con una concentración final de  $K^+$  de 10 mM durante 7 días. Posteriormente fueron transferidas a otras placas con la misma solución, pero con una concentración de  $K^+$  de 1 mM, en presencia o en ausencia del NC a una concentración de 100 o 200  $\mu\text{M}$ . Se midió la longitud de la raíz principal tras 7 días de exposición al NC. Las barras muestran promedios de 10 repeticiones  $\pm$  error estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  en un test de Tukey.

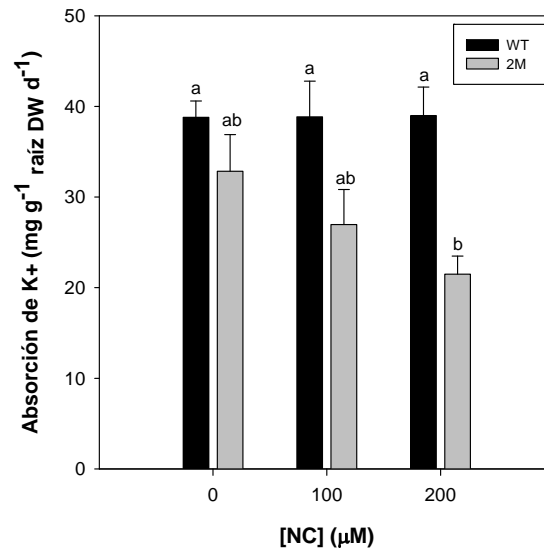
Para poder relacionar la reducción del crecimiento con una reducción en la absorción de  $K^+$  debida a la presencia del nucleótido cíclico, se estudió el flujo neto de  $K^+$  en experimentos de desaparición del mismo de una solución que contenía una concentración de 1 mM  $K^+$ . El crecimiento de las plantas se realizó de la misma forma que para los experimentos de absorción de  $K^+$  a corto plazo con los distintos inhibidores: se crecieron las plantas durante 30 días en una solución con una concentración de  $K^+$  de 10 mM, para posteriormente pasarlas a la misma solución pero con una concentración de  $K^+$  de 0,5 mM durante 8 días. A continuación se determinaba la desaparición del  $K^+$  externo de soluciones con una concentración de  $K^+$  de 1 mM, con y sin el NC, en un experimento que duraba 3 días. Mientras que en las plantas silvestres la presencia del NC no afectó a la entrada neta de  $K^+$ , en las plantas mutantes la adición del NC a concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$  redujo este

parámetro, siendo la entrada neta de  $K^+$  de un 79% y un 47% del de las plantas de su misma línea que crecieron en ausencia del NC (Figura 4.25).



**Figura 4.25. Efecto del N 6,2'-O-Dibutiriladenosin 3'-5'- monofosfato cíclico (NC) sobre la absorción de  $K^+$  en las plantas WT y 2M.** Las plantas WT (barras negras) y 2M (barras grises) se crecieron en cultivo hidropónico con una concentración de  $K^+$  de 10 mM durante 30 días, se transfirieron posteriormente a 0,5 mM de  $K^+$  durante 8 días y finalmente a 1 mM de  $K^+$  durante 3 días. A esta última solución se la añadió el NC a las concentraciones indicadas, y se procedió a tomar una muestra de ellas al final del experimento. La absorción de  $K^+$  se calculó como el  $K^+$  retirado por parte de la planta de la solución externa por unidad de tiempo y por unidad de peso seco de raíz. Las barras son promedios de 5 repeticiones  $\pm$  error estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  en un test de Tukey.

En una tercera aproximación se estudió el efecto de la presencia del NC sobre el flujo neto de  $K^+$  en experimentos a largo plazo durante 7 días. Mientras que en la línea WT, como sucediera en las aproximaciones anteriores, la entrada neta de  $K^+$  era similar entre las plantas de la línea WT que crecieron con y sin el NC, cuando se adicionaba éste a la solución de crecimiento de las plantas 2M a concentraciones de 100 y 200  $\mu\text{M}$ , la entrada neta de  $K^+$  se reducía, siendo un 82% y un 65% de la entrada neta de  $K^+$  experimentada por las plantas control de la línea 2M respectivamente (Figura 4.26).



**Figura 4.26. Efecto del N 6,2'-O-Dibutiriladenosin 3'-5'- monofosfato cíclico (NC) sobre la absorción de K<sup>+</sup> en las plantas WT y 2M.** Las plantas WT y 2M se crecieron en solución 1/5 de Hoagland modificada con una concentración de K<sup>+</sup> de 10 mM durante 30 días, para a continuación crecerlas durante 8 días en la misma solución, pero con una concentración de K<sup>+</sup> de 0,5 mM. Posteriormente se pasaron a 1/5 de Hoagland modificada con una concentración de K<sup>+</sup> de 1 mM, en ausencia o en presencia del NC, durante 7 días. Se realizó una cosecha antes de añadir el NC y otra al final del tratamiento. Las plantas se secaron, se pesaron y se analizaron sus concentraciones de K<sup>+</sup> internas. La absorción de K<sup>+</sup> se calculó como el incremento del K<sup>+</sup> total en la planta observado entre las dos cosechas por unidad de peso seco de raíz y unidad de tiempo. Las barras son medias de 5 repeticiones  $\pm$  error estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  en un test de Tukey.

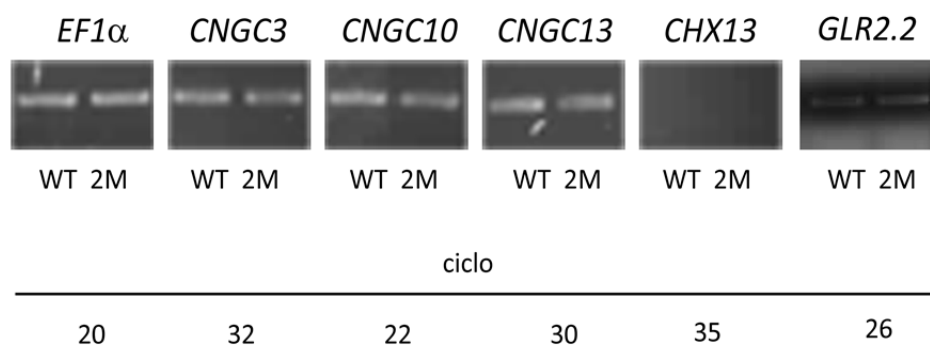
#### 4.2.6. Expresión de los genes CNGC3, CNGC10, CNGC13, CHX13 y GRL2.2

Los canales regulados por nucleótidos cíclicos de *Arabidopsis* AtCNGC3 y AtCNGC10 han sido propuestos como posibles rutas de la absorción de K<sup>+</sup> por parte de la raíz. Como ha quedado recogido en el apartado de introducción, otros posibles canales que podrían estar relacionados con el transporte de K<sup>+</sup> son un tercer miembro de esta familia: AtCNGC13, así como el antiportador catión-protón de *Arabidopsis* AtCHX13 y el receptor ionotrópico de glutamato GRL2.2. Por ello, se decidió estudiar los niveles de expresión de los genes que

codifican estas proteínas de transporte mediante la técnica de la PCR semicuantitativa. Las PCRs se realizaron sobre cantidades iguales de cDNA sintetizado a partir del RNA total obtenido de las raíces de las plantas de las líneas WT y 2M. Las plantas se crecieron como se indica en los experimentos anteriores, durante 30 días en una solución con una concentración de 10 mM de K<sup>+</sup> y a continuación durante 8 días con una concentración de 0,5 mM de K<sup>+</sup>. Se aplicaron diferentes ciclos de amplificación.

Como control interno de referencia se usó el gen correspondiente al factor de elongación 1 $\alpha$ , que es un gen que se expresa de manera constitutiva en todas las células de las plantas de las líneas objeto de estudio en esta tesis (WT y 2M). La expresión de los demás genes estudiados se comparó con la expresión de este gen de referencia.

Las reacciones de PCR se resolvieron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. En la Figura 4.27 se muestra el producto de PCR obtenido en el ciclo más bajo que produce una banda de cDNA detectable mediante observación a la luz UV. No se observaron diferencias en la expresión de los genes AtCNGC3, AtCNGC10, AtCNGC13y GLR2.2 entre las dos líneas. En el caso de AtCHX13, no se detectó cDNA incluso en el ciclo mayor empleado en la PCR (Figura 4.27).



**Figura 4.27. PCR semicuantitativa de AtCNGC3, AtCNGC10, AtCNGC13, AtCHX13 y GLR2.2 de raíces de plantas WT y 2M.** Se aisló el RNA total de raíces de plantas WT y 2M, se le realizó una transcripción reversa y el cDNA obtenido se usó para realizar una PCR. El gen constitutivo AtEF1 $\alpha$  se usó como control de referencia. Las muestras de productos de PCR se obtuvieron en diferentes ciclos de PCR. La figura muestra los productos de PCR que se visualizaron en un gel teñido con bromuro de etidio en el menor ciclo que mostró señal de amplificación.

#### 4.2.7. Discusión

El transportador de  $K^+$  de alta afinidad HAK5 y el canal rectificador de la entrada de  $K^+$  AKT1 han sido descritos como las principales vías de absorción de  $K^+$  por parte de las raíces de las plantas. Sin embargo, estudios realizados en la línea mutante de Arabidopsis *athak5,atakt1* han demostrado que existen otros sistemas que pueden suplir la falta de AtHAK5 y AtAKT1 cuando la concentración externa de  $K^+$  se encuentra por encima de un cierto nivel (Kugler y col., 2009; Pyo y col., 2010; Rubio y col., 2010a). Los estudios presentados en este apartado de la Tesis pretenden avanzar en la identificación de este sistema alternativo mediante el uso de aproximaciones farmacológicas, fisiológicas y moleculares. El estudio se ha realizado dentro del rango de concentraciones de  $K^+$  correspondientes al sistema de baja afinidad. En este rango, AtHAK5 no debería tener relevancia en la absorción de  $K^+$ , siendo la línea mutante *atakt1* suficiente para la caracterización del sistema alternativo. Sin embargo, se ha demostrado que la línea *atakt1* sobre expresa AtHAK5 (Qi y col., 2008; Rubio y col., 2008), y por lo tanto se eligió la línea doble mutante *athak5,atakt1* como una línea más apropiada para esta investigación.

##### 4.2.7.1. Estudio farmacológico de la entrada de $K^+$

Una parte de los estudios se ha centrado en la caracterización farmacológica del sistema alternativo de la entrada de  $K^+$ . Con esta aproximación se pretende determinar si el sistema de entrada de  $K^+$  presente en la línea *athak5,atakt1* (2M) muestra una sensibilidad diferente a distintos inhibidores de la entrada de  $K^+$  que el sistema presente en la línea WT, y que fundamentalmente debería ser AtAKT1. Para este estudio se han llevado a cabo experimentos de desaparición de  $K^+$  de la solución nutritiva a corto plazo en presencia o ausencia de inhibidores de la absorción de  $K^+$ . El  $Ca^{2+}$ , el  $Mg^{2+}$ , el  $Ba^{2+}$  y el  $La^{3+}$  inhibieron en gran medida la desaparición de  $K^+$  de la solución externa en la línea 2M, mientras que en el caso de WT o bien no disminuían la desaparición de  $K^+$  de la solución (caso del  $Ca^{2+}$  y del  $Mg^{2+}$ ), o bien la reducción de la desaparición de  $K^+$  era bastante menor que en la línea 2M (en el caso de  $Ba^{2+}$  o  $La^{3+}$ ) (Figura 4.13). Por el contrario, el  $Na^+$  y el  $Cs^+$  inhibieron la desaparición de  $K^+$  en mayor medida en las plantas WT que en las plantas 2M, indicando una baja sensibilidad de

este sistema desconocido capaz de transportar  $K^+$  frente a estos inhibidores (Figura 4.12). En un tercer grupo de inhibidores, el  $NH_4^+$  y el ácido glutámico inhibieron de igual forma la absorción de  $K^+$  en los dos grupos de plantas (Figura 4.11).

Una primera conclusión de estos resultados es que los sistemas que más contribuyen a la absorción de  $K^+$  cuando éste se encuentra a una concentración de 1 mM son diferentes en las plantas de las líneas WT y 2M. En el caso de las plantas 2M, el  $K^+$  entra por un sistema distinto a AtAKT1 y a AtHAK5, y ese sistema desconocido parece verse más inhibido por la presencia de cationes bivalentes y trivalentes que AtAKT1. Por el contrario, cuando se aplican como inhibidores cationes monovalentes, el sistema AtAKT1 parece verse más afectado que el sistema desconocido. Al determinar el efecto del ácido glutámico sobre la absorción de  $K^+$  en las dos líneas de plantas, no se observaron diferencias significativas entre ellas.

#### 4.2.7.2. Respuesta de las plantas a altas concentraciones de $Ca^{2+}$ y $Cs^+$ en experimentos a largo plazo

De todos los inhibidores probados en estos experimentos a corto plazo, se decidió utilizar el  $Ca^{2+}$  y el  $Cs^+$  como inhibidores representativos de cada grupo para realizar estudios a más largo plazo. Se utilizaron, bien individualmente, usando dos concentraciones distintas de cada uno, o bien de forma combinada, usando las concentraciones que experimentos preliminares demostraron que eran las más adecuadas, como se indica en el apartado de Resultados. Estos experimentos permitieron evaluar la importancia de los sistemas de absorción de  $K^+$  en el mantenimiento de las concentraciones internas de  $K^+$ , así como en el crecimiento general de la planta. Así, se observó que en presencia de una concentración de  $K^+$  de 1 mM, el sistema no identificado que mediaba la absorción de  $K^+$  en las plantas 2M no compensaba completamente la ausencia de AtAKT1. Las plantas 2M mostraron una absorción de  $K^+$  reducida, lo que resultó en unas concentraciones de  $K^+$  en las plantas menores, así como en un menor crecimiento de las mismas (Figuras 4.17, 4.18, 4.22, y Tablas 4.5 y 4.6). Cuando se aplicó una concentración de  $Ca^{2+}$  de 15 mM, tanto en experimentos en placa como en cultivo hidropónico, se inhibía el crecimiento de las plantas 2M, mientras que no lo hacía el de las plantas WT (Figuras 4.15 y 4.17 A y B). Además, estas concentraciones de  $Ca^{2+}$  también inhibieron la absorción de  $K^+$  en mayor medida en las plantas 2M que en las silvestres (Figura 4.18 A), estando estos datos de acuerdo con los obtenidos en los experimentos a corto plazo,

dando lugar a concentraciones de  $K^+$  muy bajas en estas plantas mutantes (Tabla 4.5 A). La segunda concentración a la que se utilizó el  $Ca^{2+}$  como inhibidor fue de 25 mM. A esta concentración el crecimiento de las plantas *2M* estaba también más inhibido que el de las plantas WT, viéndose prácticamente detenido, aunque en este caso el crecimiento de las plantas silvestres sí que se vio algo disminuido con respecto a las plantas control de su línea (Figura 4.17 C y D). En presencia de 25 mM de  $Ca^{2+}$ , la absorción de  $K^+$  en las plantas *2M* se veía fuertemente inhibida, siendo menor a la mostrada por las plantas WT (Figura 4.18 B) y dando lugar a menores concentraciones de  $K^+$  en el interior de la planta (Tabla 4.5 B). Teniendo en cuenta todos estos resultados, se podría concluir que los sistemas que median la entrada de  $K^+$  en las plantas *2M* son altamente sensibles a  $Ca^{2+}$ . Por otra parte, la reducción del crecimiento en las plantas WT debida a la presencia de 25 mM de  $Ca^{2+}$  podría explicarse por la alta concentración de  $Cl^-$  en las plantas sometidas a este tratamiento, ya que cuando se añade el  $Ca^{2+}$  como una mezcla de  $CaCl_2$  y  $CaSO_4$ , no se observa dicha disminución del crecimiento. Esto no ocurre en las plantas *2M*, en las que sea cual sea el anión que acompaña al  $Ca^{2+}$ , se produce la misma inhibición del crecimiento (resultados no mostrados).

Aunque la absorción de  $K^+$  mediada por el sistema objeto de estudio no compensa completamente la falta de *AtAKT1*, es esencial para el crecimiento de las plantas *2M*, ya que su crecimiento se ve reducido de una forma considerable cuando se adiciona  $Ca^{2+}$  a concentraciones de 15 mM (Figuras 4.15, 4.16 y 4.17 B). En presencia de concentraciones superiores de  $Ca^{2+}$  (25 mM), el crecimiento de las plantas *2M* se vio prácticamente detenido, al contrario que en las plantas WT, donde si bien este crecimiento sufre una ligera disminución, posiblemente por la presencia de una alta concentración de cloruros en la solución, es mucho menor que el experimentado por las plantas de la línea *2M* (Figura 4.17 C y D).

La inhibición de la absorción de  $K^+$  debida a  $Ca^{2+}$  en las plantas *2M* sugiere que estos dos cationes comparten el mismo sistema de entrada hacia el interior de las plantas de esta línea. La absorción de  $Ca^{2+}$  podría tener lugar a través de canales no selectivos independientes de voltaje permeables a  $Ca^{2+}$ . Se ha descrito que estos canales se inhiben por  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  y  $La^{3+}$  (Demidchik y Tester, 2002; White y col., 2002), como también se observa en la absorción de  $K^+$  en las plantas *2M*.

Por otro lado, la absorción de  $K^+$  es más sensible a  $Cs^+$  en las plantas WT que en las plantas *2M*. Cuando la concentración de  $Cs^+$  aplicada fue de 0,1 mM, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la absorción de  $K^+$  de las dos líneas al compararla con la absorción de  $K^+$  experimentada por las plantas control, ya que la concentración aplicada del inhibidor no es suficientemente alta como para que este parámetro se vea afectado (Figura 4.18 B y C). Cuando la concentración de  $Cs^+$  añadido aumentó a 0,25 mM, mientras que en la línea *2M* siguieron sin observarse diferencias significativas, en WT la absorción de  $K^+$  disminuyó en comparación con la absorción de  $K^+$  de las plantas WT crecidas sin inhibidores (Figura 4.18 C). Sin embargo, esta menor absorción de  $K^+$  observada en WT no repercutió en la concentración interna de  $K^+$  observada en la planta, que cabría esperar que fuese menor (Tabla 4.5 A). Esto podría explicarse por el menor tamaño de las plantas crecidas con esta concentración de  $Cs^+$ , por la toxicidad desarrollada en la planta al sustituir al  $K^+$  en funciones clave. Al reducirse el tamaño de la planta, la concentración interna de  $K^+$  aumenta. Apoyando esta idea también se observa que la concentración interna de  $Ca^{2+}$  en las plantas del tratamiento con 0,25 mM  $Cs^+$  sin  $Ca^{2+}$  extra añadido, también es mayor que en las plantas control (Tabla 4.5 A).

Aunque la absorción de  $K^+$  es más sensible a  $Cs^+$  en la línea silvestre que en la mutante, el hecho de que el valor absoluto de absorción de  $K^+$  sea mayor en WT, da lugar a que los valores relativos de absorción neta de  $K^+$  en presencia de una concentración de  $Cs^+$  de 0,25 mM sean similares en ambas líneas (Figura 4.18 A). Cuando se aplica  $Cs^+$  a una concentración de 0,25 mM, la absorción de  $K^+$  debería ser suficiente para el crecimiento de la planta. Por ejemplo, la absorción de  $K^+$  que se observa en las plantas WT en presencia de 15 mM de  $Ca^{2+}$  es de similar magnitud, y permite el crecimiento de las plantas (Figura 4.18 A). Además, como se ha mencionado previamente, las concentraciones de  $K^+$  halladas en la planta no se encuentran disminuidas por la presencia de 0,25 mM  $Cs^+$  (Tabla 4.5 A). Sin embargo, el crecimiento tanto de la línea WT como de *2M* se ve reducido de forma considerable por la presencia de  $Cs^+$  a una concentración de 0,25 mM (Figura 4.17 A y B). Esto podría ser explicado por el hecho de que el  $Cs^+$  es tóxico para las plantas, principalmente por su competencia con el  $K^+$  en el desarrollo de funciones bioquímicas esenciales, estando su toxicidad relacionada con la relación  $Cs^+/K^+$  en la parte aérea más que con el impedimento generado en la nutrición de  $K^+$  (Hampton y col., 2004). Los resultados aquí mostrados indican que el  $Cs^+$  es absorbido con



velocidades de entrada neta similares y se acumula a concentraciones parecidas tanto en una línea como en otra, de acuerdo con esta idea (Figura 4.20 y Tabla 4.5 A y B).

Cuando se adicionó  $\text{Ca}^{2+}$  junto con  $\text{Cs}^+$  a concentraciones de 15 mM y 0,25 mM respectivamente, las plantas WT recuperaban su crecimiento, pero no así las pertenecientes a la línea 2M (Figura 4.17 A y B). La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  inhibía la absorción de  $\text{Cs}^+$  en ambas líneas (Figura 4.20 A y B), reduciendo la concentración de  $\text{Cs}^+$  en la planta (Tabla 4.5 A y B). Esta inhibición fue más pronunciada en las plantas de la línea 2M (Figura 4.20 A y B y Tabla 4.5 A y B), respaldando la posibilidad de que el  $\text{Cs}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  pudiesen compartir sistema de entrada en las plantas de la línea 2M. Pero mientras que en WT la absorción de  $\text{K}^+$  disminuye levemente, en las plantas 2M se ve reducida de una forma significativa (Figura 4.18 A, B y C), resultando en una concentración de  $\text{K}^+$  en el interior de las plantas extremadamente baja (Tabla 4.5 A y B). Así, la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  redujo a valores más bajos la relación  $\text{Cs}^+/\text{K}^+$  en las plantas WT que en las plantas 2M (Tabla 4.5 A y B). Esto se observó cuando se usó el  $\text{Cs}^+$  a una mayor concentración (0,25 mM), ya que en el caso en el que se usó a 0,1 mM, la concentración de  $\text{Cs}^+$  alcanzada no era lo suficientemente alta como para poder observar diferencias significativas entre ambas líneas. Esto podría deberse a que, aunque el  $\text{Ca}^{2+}$  inhibiera más la entrada de  $\text{Cs}^+$  en las plantas 2M, como se ha mencionado antes, lo que desencadenaría menores relaciones  $\text{Cs}^+/\text{K}^+$  en las plantas 2M, este  $\text{Ca}^{2+}$  también disminuye en gran medida la entrada de  $\text{K}^+$  en las plantas de la línea 2M, y no lo hace en las plantas de la línea WT. Por ello, en WT el  $\text{Ca}^{2+}$  solo tiene efecto en el numerador de la relación, y en 2M afecta tanto al numerador como al denominador, manteniendo más alto el cociente. Esto podría explicar la recuperación en el crecimiento en WT y la inhibición del mismo en la línea 2M cuando se añadió  $\text{Ca}^{2+}$  extra (Hampton y col., 2004).

Estudios previos han demostrado que AtHAK5 transporta  $\text{Cs}^+$  (Rubio y col., 2000), y que en las plantas que expresan AtHAK5, ya sea debido al déficit de  $\text{K}^+$  o a la pérdida de AtAKT1, AtHAK5 podría constituir una vía de absorción de  $\text{Cs}^+$  (Qi y col., 2008). Por otro lado, la absorción de  $\text{Cs}^+$  a través de AtAKT1 se considera insignificante (Bassil y col., 2011). Los resultados obtenidos en esta Tesis sobre las plantas 2M muestran que en condiciones de  $\text{K}^+$  suficiente, un sistema diferente a AtHAK5 y AtAKT1 media la absorción de  $\text{Cs}^+$ , lo que contribuye en la acumulación del mismo en la planta, pudiendo desencadenar toxicidad. La sensibilidad hacia  $\text{Ca}^{2+}$  sugiere que este sistema de absorción de  $\text{Cs}^+$  podría ser un canal de

cationes no selectivo independiente de voltaje, como ya había sido sugerido previamente (Bassil y col., 2011; Broadley y col., 2001; Demidchik y Tester, 2002). Merece la pena destacar que en las plantas marinas *Riccia fluitans* que tienen un aporte de  $K^+$  suficiente, la absorción de  $Cs^+$  muestra una cinética lineal que se ve reducida cuando aumenta el  $Ca^{2+}$  externo. En plantas ayunadas de  $K^+$ , la absorción muestra una cinética de Michaelis-Menten, la cual se ve aumentada a altas concentraciones externas de  $Ca^{2+}$ . Se ha propuesto que en plantas de *R. fluitans* ayunadas de  $K^+$ , la absorción de  $Cs^+$  podría ocurrir a través de transportadores de  $K^+$  de alta afinidad como AtHAK5, mientras que en plantas con un aporte adecuado de  $K^+$ , esta absorción se produciría a través de canales de cationes no selectivos (Heredia y col., 2002), de acuerdo con los resultados presentados en esta Tesis. La identificación de este sistema podría aportar futuras aplicaciones biotecnológicas en la agricultura, ya sea produciendo plantas más tolerantes al  $Cs^+$  debido a una reducción en su absorción, o enfocadas a la fitorremediación, obteniendo plantas que aumentan la acumulación de  $Cs^+$  o radiocesio ( $^{137}Cs^+$ ).

El  $Cs^+$  se puede utilizar para separar farmacológicamente los canales selectivos de entrada de  $K^+$  de los no selectivos (Amtmann y Sanders, 1999), ya que los primeros se encuentran inhibidos por  $Cs^+$  mientras que los segundos no (Very y Sentenac, 2002). Por lo tanto, los resultados obtenidos en los experimentos con  $Ca^{2+}$  y  $Cs^+$  indican que en WT, el  $K^+$  es absorbido principalmente por canales selectivos de  $K^+$ , como por ejemplo AtAKT1, mientras que esta absorción de  $K^+$  en la línea 2M se encuentra mediada por canales no selectivos de cationes. De una forma similar, las principales vías de absorción de  $Ca^{2+}$  también parecen ser diferentes en WT y en 2M. Mientras que en WT la presencia de  $Cs^+$  a una concentración de 0,25 mM no tienen efecto en la absorción de  $Ca^{2+}$ , en la línea 2M se observa una inhibición bastante importante cuando las plantas crecen con los dos inhibidores (Figura 4.19 A). Además, la presencia de  $Cs^+$  a las dos concentraciones estudiadas, redujo las concentraciones de  $Ca^{2+}$  en las plantas 2M, mientras que no lo hizo en las WT (Tabla 4.5 A y B). Debido a que los canales no selectivos permeables a  $Ca^{2+}$  son también permeables a  $Cs^+$  (White y col., 2002), los resultados expuestos aquí sugieren que  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cs^+$  están entrando por el mismo sistema en las plantas 2M.

#### 4.2.7.3. Respuesta de las plantas a altas concentraciones de Na<sup>+</sup> en experimentos a largo plazo

Los estudios a largo plazo se complementaron con otros estudios con un diseño experimental similar, pero esta vez estudiando el efecto del Na<sup>+</sup>, a una concentración de 20 mM en la solución de crecimiento, o bien combinado con Ca<sup>2+</sup> a una concentración de 15 mM, sobre la absorción de K<sup>+</sup> y el crecimiento de plantas WT y 2M. Durante el periodo que duró el experimento, se observó como la presencia de Na<sup>+</sup> afectaba más al crecimiento de la línea silvestre que al de la línea 2M (Figura 4.21), al igual que ocurre con la absorción de K<sup>+</sup> (Figura 4.22 A y B). Al añadir Na<sup>+</sup>, la entrada neta de K<sup>+</sup> en las plantas WT disminuye significativamente en relación a la mostrada en condiciones control, mientras que en 2M no lo hace (Figura 4.22 B). Estos datos se ven reflejados en la concentración interna de K<sup>+</sup> en las plantas de la línea WT, la cual disminuye, aún disminuyendo el tamaño de las plantas, lo que hace que el contenido de K<sup>+</sup> sea aún menor (Tabla 4.6). En 2M la concentración de K<sup>+</sup> también disminuye (Tabla 4.6), lo que iría en contra de lo observado en la absorción de K<sup>+</sup>, pero en esta línea el tamaño de las plantas no es menor si se compara con el tamaño de las plantas control, por lo que el contenido total de K<sup>+</sup> se equipara en ambas líneas cuando crecen con Na<sup>+</sup>. Por otro lado, la absorción de Na<sup>+</sup> es mayor en las plantas 2M que en las plantas WT cuando crecen con una concentración de Na<sup>+</sup> de 20 mM (Figura 4.23 A). El sistema AtAKT1 no transporta Na<sup>+</sup>, por lo que no tendría por qué haber diferencias entre ambas líneas de plantas en cuanto a la entrada de Na<sup>+</sup>. Así, los resultados obtenidos podrían indicar que la entrada de Na<sup>+</sup> podría producirse por el mismo sistema en ambas líneas, si bien éste mostraría una mayor actividad en la línea 2M, por el mayor flujo neto de Na<sup>+</sup> observado en las plantas de esta línea. Cuando se añadió Na<sup>+</sup> a la solución, la absorción de Ca<sup>2+</sup> se vio más inhibida en las plantas de la línea WT que en las plantas de la línea 2M (Figura 4.23 B), pudiendo indicar también un mayor número de sistemas capaces de transportar Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup> en las plantas 2M que en las plantas WT, por lo que la adición de Na<sup>+</sup> podría repercutir más en las plantas que tuviesen menos sistemas capaces de transportar estos dos cationes. Estudiando en conjunto los datos de crecimiento, absorción y concentración de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en las plantas WT y 2M crecidas con Na<sup>+</sup> en la solución nutritiva, se podría pensar que en las plantas WT, la presencia de Na<sup>+</sup> en el citoplasma inhibe de alguna forma al sistema de entrada de K<sup>+</sup> AtAKT1 (Qi y Spalding, 2004), repercutiendo en la menor absorción de K<sup>+</sup> y en la menor concentración de K<sup>+</sup> observada en estas plantas al crecer

con  $\text{Na}^+$ . Con la menor absorción de  $\text{K}^+$ , el crecimiento también es menor. En las plantas *2M*, la absorción de  $\text{K}^+$  no varía significativamente, indicando que el sistema que media su entrada en estas plantas es distinto a *AtAKT1*, y no se ve inhibido por  $\text{Na}^+$ . Además, el crecimiento de estas plantas tampoco se ve inhibido cuando crecen con  $\text{Na}^+$ , aún absorbiendo más  $\text{Na}^+$  que las plantas *WT*, como indican los parámetros de absorción y concentración de este catión en las plantas. Esto podría explicarse según dos teorías. La primera se basa en el hecho de que las plantas *2M* utilicen el  $\text{Na}^+$  en lugar del  $\text{K}^+$  para mantener el turgor y la expansión celular, al encontrarse con un déficit de  $\text{K}^+$  en su interior, manteniendo el crecimiento mientras no se genere toxicidad. La segunda radica en la posibilidad de que las plantas *2M* posean una mayor capacidad de acumulación de  $\text{Na}^+$  en la vacuola, evitando así la toxicidad de éste en el citosol.

Al añadir  $\text{Ca}^{2+}$  junto con el  $\text{Na}^+$ , el efecto en ambas líneas es distinto, inhibiendo más el crecimiento de las plantas *2M* que el de las plantas *WT*, si lo comparamos con el crecimiento que desarrollan cuando solo crecen con  $\text{Na}^+$  (Figura 4.21), posiblemente por el papel previamente descrito del  $\text{Ca}^{2+}$  como inhibidor de la entrada de  $\text{K}^+$  mediante los canales no selectivos de cationes, predominante en las plantas *2M*. Además, las diferencias significativas aparecen ahora en las plantas *2M* si se compara el flujo neto de  $\text{K}^+$  en las plantas crecidas exclusivamente con  $\text{Na}^+$  como inhibidor, o se añade también  $\text{Ca}^{2+}$  a la solución, mientras que en *WT* no las hay (Figura 4.22 A y B). Por otro lado, el flujo neto de  $\text{Na}^+$  se ve reducido igualmente en las plantas de las dos líneas cuando crecen en presencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 4.23 A). Estos datos están de acuerdo con las concentraciones obtenidas al realizar el análisis mineral de las plantas (Tabla 4.6).

La relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , así como  $\text{K}^++\text{Na}^+$ , aporta más información sobre los sistemas de entrada de cationes a las plantas que se están estudiando en esta Tesis. La relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  es mayor siempre en las plantas de la línea *WT* (Tabla 4.6), ya que, aunque las concentraciones de  $\text{Na}^+$  alcanzadas en las plantas *2M* son ligeramente mayores que en las *WT*, en estas últimas las concentraciones internas de  $\text{K}^+$  obtenidas son mucho mayores que en las plantas mutantes, afectando directamente sobre la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ . En cuanto a la suma de las concentraciones, cuando las plantas crecen sin  $\text{Na}^+$  en la solución de crecimiento, el valor obtenido es claramente superior en las plantas de la línea *WT* por lo que se ha comentado en otras ocasiones: la mayor concentración de  $\text{K}^+$  obtenida en las plantas *WT* que en las *2M* por la deficiente compensación en la absorción de  $\text{K}^+$  de los sistemas de las plantas *2M*. Cuando se

añade  $\text{Na}^+$  a la solución de crecimiento, ya sea solo o acompañado de  $\text{Ca}^{2+}$  extra, la suma sigue siendo superior en las plantas WT, pero los valores se igualan bastante con los obtenidos en las plantas 2M (Tabla 4.6). Este hecho apoya la teoría de la función inicial del  $\text{Na}^+$  en la suplantación del  $\text{K}^+$  en los procesos de equilibrio osmótico y crecimiento que las plantas 2M ejercen para paliar la falta de  $\text{K}^+$ .

#### 4.2.7.4. Efecto de cAMP sobre la absorción de $\text{K}^+$

Los canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNGC), así como los receptores de glutamato (GLR) han sido propuestos como canales no selectivos de cationes, y algunos miembros de estas familias podrían estar implicados en la absorción de  $\text{K}^+$  en la raíz (Kaplan y col., 2007; Meyerhoff, 2005). Por ejemplo, las plantas mutantes de un miembro de la familia de los CNGC, *atcngc3*, muestran unas concentraciones de  $\text{K}^+$  un 50% menores que las mostradas por las plantas WT. En este mismo estudio se demuestra que *AtCNGC10* rescata parcialmente el mutante *atakt1*, mientras que la línea antisentido de *AtCNGC10* conduce a una concentración de  $\text{K}^+$  en el interior de la planta un 40% menor (Kaplan y col., 2007). Además, se ha sugerido que *AtCNGC10* podría estar implicado en la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de la raíz (Guo y col., 2010). Todo esto hace que *AtCNGC10* sea un buen candidato para mediar de la absorción de  $\text{K}^+$  sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  descrita aquí para la línea 2M. La reducción de la absorción de  $\text{K}^+$  y del crecimiento de las plantas provocada por el nucleótido cíclico (NC) (Figuras 4.24, 4.25 y 4.26) en las plantas de la línea 2M obtenidas en nuestros estudios sugiere una regulación del sistema objeto de estudio que se encarga de la absorción de  $\text{K}^+$  en las plantas 2M por los nucleótidos cíclicos. Los estudios sobre la regulación de los CNGC en *Arabidopsis* por nucleótidos cíclicos son controvertidos. En sistemas heterólogos, los nucleótidos cíclicos activan estos canales (Kaplan y col., 2007), mientras que por el contrario, la actividad de los canales de cationes voltaje independientes de *Arabidopsis* que se piensa que contribuyen a la entrada de  $\text{Na}^+$  mediada por CNGCs, se encuentra reducida en presencia de estos nucleótidos cíclicos (Maathuis y Sanders, 2001). Las conclusiones de los CNGCs en plantas basadas en sistemas heterólogos no son inequívocas, y algunos autores han recomendado tener especial cuidado en su interpretación (Demidchik y col., 2002; Kaplan y col., 2007). La regulación de los CNGCs de *Arabidopsis* son todavía desconocidas, y es posible que algunos de ellos se vean inhibidos por NC (Dietrich y col., 2010). Por todo lo expuesto, es posible que la absorción de  $\text{K}^+$

en la línea *2M* esté mediada por un CNGC cuya actividad se vea reducida por nucleótidos cíclicos.

#### 4.2.7.5. Potenciales eléctricos de la membrana plasmática en células de raíz

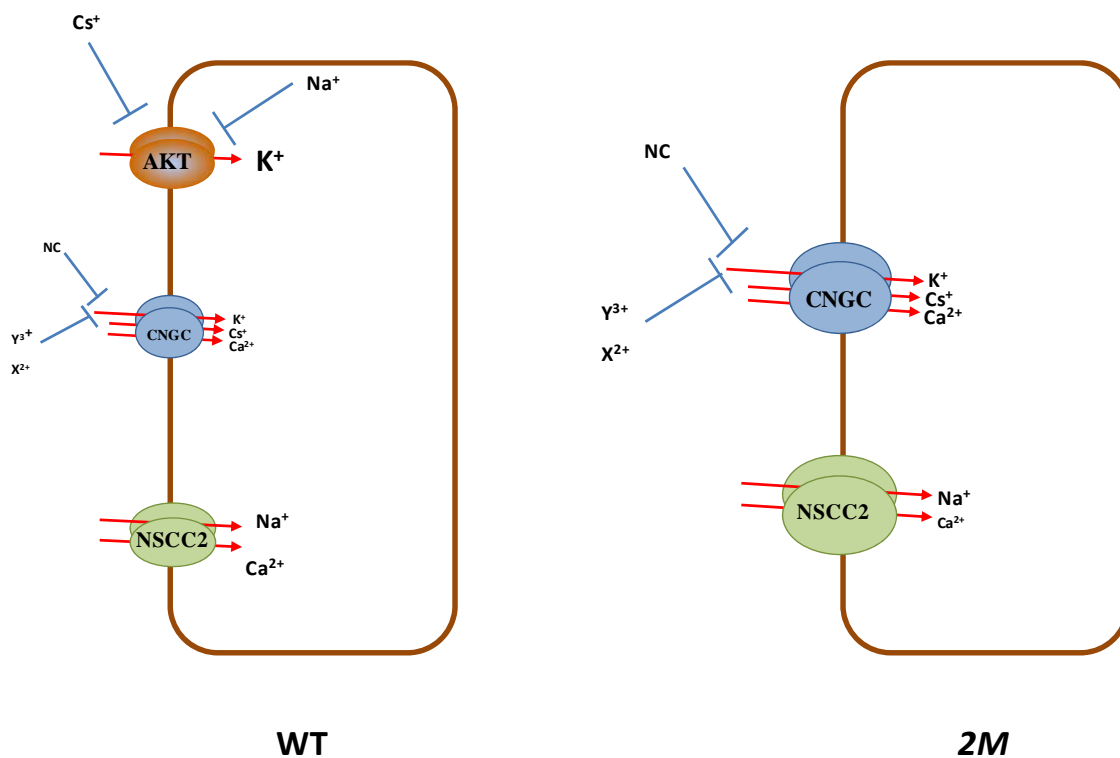
Otro posible mecanismo de compensación de la ausencia de AtAKT1 podría ser la hiperpolarización del potencial de membrana de las células de la raíz en las plantas de la línea *2M*. Como se ha mencionado anteriormente, las plantas *2M* tienen unas concentraciones de  $K^+$  en sus tejidos menores que las plantas WT, y ese estatus de potasio más bajo puede inducir a una mayor hiperpolarización de la membrana. Dicha hiperpolarización podría aumentar también la fuerza motriz de la absorción de  $K^+$  a través del sistema desconocido. Este hecho ocurre por ejemplo en la línea *atakt1-1*, la cual muestra un potencial de membrana más negativo que el mostrado por las plantas WT en presencia de una concentración de 0,1 mM y 1 mM de  $K^+$  (Spalding y col., 1999). Sin embargo, esta posibilidad puede ser descartada debido a que en las condiciones experimentales en las que se ha realizado este estudio, las plantas *2M* y WT mostraron valores similares en sus potenciales de membrana de las células de las raíces en ausencia de  $K^+$  así como despolarizaciones similares del potencial por 1 y 5 mM  $K^+$  (Tabla 4.4 y Figura 4.14).

#### 4.2.7.6. Expresión de los genes CNGC3, CNGC10, CNGC13, CHX13 y GRL2.2

Debido a que los resultados anteriores sugerían que el sistema de entrada de  $K^+$  en la línea *2M* podría estar codificado por un gen de la familia CNGC, se decidió determinar los niveles de expresión de los genes que codifican los canales regulados por nucleótidos cíclicos mencionados en el párrafo anterior: *AtCNGC3* y *AtCNGC10*. Además se incluyó en el estudio *AtCNGC13* por su proximidad filogenética a los dos anteriores, que podría sugerir un papel de este canal en la entrada de  $K^+$  en la raíz (Kaplan y col., 2007). También se estudiaron los niveles de expresión del gen que codifica el antiportador catión-protón AtCHX13 (Zhao y col., 2008). Todos estos sistemas se han descrito como posibles vías de entrada  $K^+$ . Asimismo también se determinaron los niveles de expresión del gen que codifica el receptor de glutamato GRL2.2, ya que, en un Microarray realizado por el grupo de investigación donde se ha realizado la Tesis, se observó que los niveles de expresión del gen *AtGLR2.2* en las plantas de la línea *2M* eran

bastante superiores a los obtenidos para las plantas WT. Esto, unido a su proximidad filogenética con otros miembros de esa familia (*AtGLR1.1* y *AtGLR1.4*) que se han demostrado que tienen dominios que conforman poros permeables a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , hicieron de *AtGLR2.2* objetivo de nuestro estudio. Mediante la técnica de la PCR semicuantitativa se mostró que *AtCNGC3*, *AtCNGC10*, *AtCNGC13* y *AtGLR2.2* se expresan en raíz, de acuerdo con su posible rol en la absorción de  $\text{K}^+$  del suelo. Sin embargo, no se encontraron diferencias en cuanto a sus niveles de expresión entre las líneas *2M* y WT (Figura 4.27). En el caso de *AtCHX13* no se observó ningún producto de PCR de acuerdo con resultados previos que muestran la inducción del gen únicamente cuando la concentración de  $\text{K}^+$  es limitante (Zhao y col., 2008) (Figura 4.27). Por otro lado, se podría descartar una contribución importante de *AtCHX13* a la absorción de  $\text{K}^+$  en la línea *2M* debido a que se ha descrito que *AtCHX13* muestra una alta sensibilidad frente a  $\text{Cs}^+$ , lo que no ocurre con la absorción de  $\text{K}^+$  mostrada por las plantas *2M*. Por otro lado, si tenemos en cuenta los resultados obtenidos en los estudios a corto plazo de desaparición de  $\text{K}^+$  del medio, donde se observó que no existían diferencias en la absorción de  $\text{K}^+$  entre las plantas WT y las *2M* cuando crecían con ácido glutámico (Figura 4.11), y los unimos a los estudios de expresión génica donde no se aprecian diferencias de la expresión del gen *AtGLR2.2* (Figura 4.27), se podría concluir que la actividad de este transportador no es la responsable de la entrada de  $\text{K}^+$  en las plantas *2M*, si bien estos resultados no son de todo concluyentes. Por lo tanto se puede concluir que, si la absorción de  $\text{K}^+$  a través de *AtCNGC3*, *AtCNGC10* o *AtCNGC13* se encuentra incrementada en la línea *2M* para compensar así la falta de *AtAKT1*, el mecanismo de compensación no está basado en la sobreexpresión del gen. Sin embargo, debería tenerse en cuenta que otros miembros pertenecientes a la familia de los CNGC, así como miembros de la familia de los GLR, podrían estar relacionados con la absorción de  $\text{K}^+$  en las plantas *2M*, aspecto que debería ser estudiado en un futuro.

La relevancia fisiológica de este sistema desconocido en la absorción de  $\text{K}^+$  en las plantas WT no se conoce hasta el momento, pero podría ser importante cuando la función de *AtAKT1* se encuentra inhibida, como por ejemplo en suelos contaminados con altas concentraciones de  $\text{Cs}^+$  (Bassil y col., 2011), o bajo salinidad (Qi y Spalding, 2004), lo que hace que merezca la pena la identificación de este sistema en futuras investigaciones.



Esquema de los posibles sistemas de absorción de K<sup>+</sup> en las plantas WT y 2M.



# 5. Conclusiones



## 5. CONCLUSIONES

1. Las plantas que carecen del canal rectificador de entrada de  $K^+$  AtAKT1 presentan una mayor tolerancia al estrés hídrico que aquellas que sí lo poseen, debido a una menor conductancia estomática que es consecuencia de un mayor cierre estomático en respuesta a ABA. Este hecho es debido, probablemente, a que el flujo neto de salida de  $K^+$  de la célula oclusiva sea mayor en estas plantas, al carecer de uno de los sistemas de entrada de  $K^+$  en la misma. Las plantas que carecen de la quinasa AtCIPK23, que activa AtAKT1, son fenocopias de las anteriores, mostrando la misma respuesta frente al estrés hídrico.
2. La concentración interna de  $K^+$  obtenida en las plantas WT, *atakt1* y *atcipk23-5* no muestran diferencias significativas tras crecer con una concentración de  $K^+$  de 10 mM, por lo que las diferencias de fenotipo de transpiración entre ambos grupos no son consecuencia de una deficiente nutrición de  $K^+$  en los mutantes *atakt1* o *atcipk23-5*.
3. La apertura estomática de las plantas WT y la correspondiente a las plantas mutantes *atakt1* y *atcipk23-5* no muestran diferencias significativas cuando las plantas crecen sin la adición de ABA exógeno. Cuando se le aplica esta hormona, las plantas de las líneas mutantes *atakt1* y *atcipk23-5* responden cerrando en mayor medida los estomas que las plantas WT, mostrando todas las líneas una respuesta independiente de si la concentración de ABA aplicada fue de 10 o 20  $\mu$ M.
4. Se confirma que el canal rectificador de la entrada de  $K^+$  AKT1 es la principal vía de absorción de  $K^+$  en plantas WT en el rango de concentraciones de baja afinidad, de acuerdo con anteriores resultados obtenidos tanto en nuestro grupo como en otros.
5. Cuando este canal no está presente, la actividad de otro sistema que es muy sensible a  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  y  $La^{3+}$ , y que también transporta  $Cs^+$ , compensa parcialmente la ausencia de AtAKT1.

6. Este sistema desconocido, aunque no compensa completamente la ausencia de AtAKT1, es esencial para la absorción de  $K^+$  necesaria para el crecimiento de la planta cuando AtAKT1 no está presente.
7. Las características farmacológicas, así como su regulación por nucleótidos cíclicos sugieren que este sistema desconocido es probablemente un canal permeable a  $Ca^{2+}$ , compatible con los canales de cationes no selectivos voltaje independientes (VIC/NSCC), identificados en las raíces de las plantas, y probablemente codificados por miembros de la familia CNGC.
8. Estudios en la expresión génica muestran que los genes encargados de codificar los miembros de la familia CNGC que han sido sugeridos como posibles vías en la absorción de  $K^+$ , AtCNGC3 y AtCNGC10, no se encuentran sobre expresados para compensar la ausencia de AtAKT1. Si alguno de estos canales se encontrase más activo en la mediación de la absorción de  $K^+$  en la línea *2M*, debería ser a través de una regulación a nivel de proteína.
9. También se descarta un aumento en la absorción de  $K^+$  debido a una hiperpolarización del potencial de membrana de la raíz en las plantas *2M*, como indicaron los estudios referentes a la medida del potencial de membrana.

# 6. Bibliografía



## 6. BIBLIOGRAFÍA

**Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., and Hedrich, R.** (2000). GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel. *FEBS Letters* *486*, 93-98.

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

**Albrecht, V., Ritz, O., Linder, S., Harter, K., and Kudla, J.** (2001). The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca<sup>2+</sup>-regulated kinases. *Embo Journal* *20*, 1051-1063.

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

**Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, and Rubio, F.** (2009b). Differential regulation of the HAK5 genes encoding the high-affinity K<sup>+</sup> transporters of *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany* *65*, 263-269.

**Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V., and Rubio, F.** (2011). Root K<sup>+</sup> Acquisition in Plants: The *Arabidopsis thaliana* Model. *Plant and Cell Physiology* *52*, 1603-1612.

**Allen, G.J., and Sanders, D.** (1996). Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium. *Plant J* *10*, 1055-1069.

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

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

**Amtmann, A., Hammond, J.P., Armengaud, P., White, P.J., and Callow, J.A.** (2006). Nutrient Sensing and Signalling in Plants: Potassium and Phosphorus. In *Advances in Botanical Research* (London, Academic Press), pp. 209-257.

**Amtmann, A., and Sanders, D.** (1999). Mechanisms of Na<sup>+</sup> uptake by plant cells. *Adv Bot Res* *29*, 75-112.

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

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

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

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

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

**Assmann, S.M., Simoncini, L., and Schroeder, J.I.** (1985). BLUE-LIGHT ACTIVATES ELECTROGENIC ION PUMPING IN GUARD-CELL PROTOPLASTS OF VICIA-FABA. *Nature* 318, 285-287.

**Balague, C., Lin, B.Q., Alcon, C., Flottes, G., Malmstrom, S., Kohler, C., Neuhaus, G., Pelletier, G., Gaymard, F., and Roby, D.** (2003). HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell* 15, 365-379.

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

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

**Bassil, E., Ohto, M.-a., Esumi, T., Tajima, H., Zhu, Z., Cagnac, O., Belmonte, M., Peleg, Z., Yamaguchi, T., and Blumwald, E.** (2011). The Arabidopsis Intracellular Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporters NHX5 and NHX6 Are Endosome Associated and Necessary for Plant Growth and Development. *Plant Cell*, tpc.110.079426.

**Benlloch-González, M., Arquero, O., Fournier, J.M., Barranco, D., and Benlloch, M.** (2008). K<sup>+</sup> starvation inhibits water-stress-induced stomatal closure. *Journal of Plant Physiology* 165, 623-630.

**Berthomieu, P., Conejero, G., Nublat, A., Brackenbury, W.J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Cellier, F., et al.** (2003). Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na<sup>+</sup> recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *Embo Journal* 22, 2004-2014.

**Blatt, M.R.** (1990). Potassium channel currents in intact stomatal guard cells: rapid enhancement by abscisic acid. *Planta* 180, 445-455.

**Blatt, M.R.** (2000). Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16, 221-241.

**Boyer, J.S.** (1982). PLANT PRODUCTIVITY AND ENVIRONMENT. *Science* 218, 443-448.

**Britto, D.T., and Kronzucker, H.J.** (2008). Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiol Plant* 133, 637-650.

**Broadley, M., Escobar Gutierrez, A., Bowen, H., Willey, N., and White, P.** (2001). Influx and accumulation of Cs<sup>+</sup> by the akt1 mutant of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. lacking a dominant K<sup>+</sup> transport system. *Journal of Experimental Botany* 52, 839-844.

**Cakmak, I.** (2005). The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde* 168, 521-530.



- Cellier, F., Conéjéro, G., Ricaud, L., Luu, D.T., Lepetit, M., Gosti, F., and Casse, F.** (2004). Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H<sup>+</sup> exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *The plant journal* 39, 834-846.
- Colmer, T.D., Flowers, T.J., and Munns, R.** (2006). Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany* 57, 1059-1078.
- Conley, D.J., Carstensen, J., Vaquer-Sunyer, R., and Duarte, C.M.** (2009). Ecosystem thresholds with hypoxia. *Hydrobiologia* 629, 21-29.
- Cuin, T.A., Miller, A.J., Laurie, S.A., and Leigh, R.A.** (2003). Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *Journal of Experimental Botany* 54, 657-661.
- Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Grant, J.J., Batistic, O., Li, L., Kim, B.G., Lee, S.C., Kudla, J., and Luan, S.** (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *Plant J* 52, 223-239.
- Christopher, D., Borsics, T., Yuen, C., Ullmer, W., Andeme-Ondzighi, C., Andres, M., Kang, B., and Staehelin, L.** (2007). The cyclic nucleotide gated cation channel AtCNGC10 traffics from the ER via Golgi vesicles to the plasma membrane of *Arabidopsis* root and leaf cells. *BMC Plant Biol* 7, 48.
- Davies, C., Shin, R., Liu, W., Thomas, M.R., and Schachtman, D.P.** (2006). Transporters expressed during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development are associated with an increase in berry size and berry potassium accumulation. *Journal of Experimental Botany* 57, 3209-3216.
- De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J.M., Thomine, S., Gambale, F., and Barbier-Brygoo, H.** (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* 442, 939-942.
- Deeken, R., Geiger, D., Fromm, J., Koroleva, O., Ache, P., Langenfeld-Heyser, R., Sauer, N., May, S., and Hedrich, R.** (2002). Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. *Planta* 216, 334 - 344.
- Demidchik, V.** (2004). Glutamate activates cation currents in the plasma membrane of *Arabidopsis* root cells. *Planta* 219, 167.
- Demidchik, V., Davenport, R.J., and Tester, M.** (2002). NONSELECTIVE CATION CHANNELS IN PLANTS. *Annual Review of Plant Biology* 53, 67-107.
- Demidchik, V., and Maathuis, F.** (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytol* 175, 387 - 404.
- Demidchik, V., and Tester, M.** (2002). Sodium Fluxes through Nonselective Cation Channels in the Plasma Membrane of Protoplasts from *Arabidopsis* Roots. *Plant Physiol* 128, 379-387.
- Desbrosses, G., Kopka, C., Ott, T., and Udvardi, M.K.** (2004). Lotus japonicus LjKUP is induced late during nodule development and encodes a potassium transporter of the plasma membrane. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 789-797.
- Dietrich, P., Anschütz, U., Kugler, A., and Becker, D.** (2010). Physiology and biophysics of plant ligand-gated ion channels. *Plant Biology* 12, 80-93.
- Dobermann, A., Cassman, K.G., Mamaril, C.P., and Sheehy, J.E.** (1998). Management of phosphorus, potassium, and sulfur in intensive, irrigated lowland rice. *Field Crops Research* 56, 113-138.

- Duby, G., Hosy, E., Fizames, C., Alcon, C., Costa, A., Sentenac, H., and Thibaud, J.B.** (2008). AtKC1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K<sup>+</sup> channels. *Plant Journal* 53, 115-123.
- Elumalai, R.P., Nagpal, P., and Reed, J.W.** (2002). A Mutation in the Arabidopsis KT2/KUP2 Potassium Transporter Gene Affects Shoot Cell Expansion. *The Plant Cell* 14, 119-131.
- Epstein, E., and Hagen, C.E.** (1952). A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiology* 27, 457-474.
- Epstein, E., Rains, D.W., and Elzam, O.E.** (1963). Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 49, 684-692.
- Fedoroff, N.V., Battisti, D.S., Beachy, R.N., Cooper, P.J.M., Fischhoff, D.A., Hodges, C.N., Knauf, V.C., Lobell, D., Mazur, B.J., Molden, D., et al.** (2010). Radically Rethinking Agriculture for the 21st Century. *Science* 327, 833-834.
- Flowers, T.J., Luchli, A., and Bielecki, R.L.** (1983). Sodium versus potassium: substitution and compartmentation. In *Inorganic plant nutrition*, A. Pirson, and M.H. Zimmermann, eds. (Berlin, Springer-Verlag), pp. 651-681.
- Forde, B.G., and Lea, P.J.** (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany* 58, 2339-2358.
- Frietsch, S., Wang, Y.F., Sladek, C., Poulsen, L.R., Romanowsky, S.M., Schroeder, J.I., and Harper, J.F.** (2007). A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 14531-14536.
- Fu, H.H., and Luan, S.** (1998). AtKuP1: a dual-affinity K<sup>+</sup> transporter from Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 63-73.
- Fulgenzi, F.R., Peralta, M.L., Mangano, S., Danna, C.H., Vallejo, A.J., Puigdomenech, P., and Santa-Maria, G.E.** (2008). The Ionic Environment Controls the Contribution of the Barley HvHAK1 Transporter to Potassium Acquisition. *Plant Physiology* 147, 252-262.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erismann, J.W., Bekunda, M., Cai, Z.C., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., and Sutton, M.A.** (2008). Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320, 889-892.
- Garciadeblas, B., Barrero-Gil, J., Benito, B., and Rodriguez-Navarro, A.** (2007). Potassium transport systems in the moss *Physcomitrella patens*: pphak1 plants reveal the complexity of potassium uptake. *Plant Journal* 52, 1080-1093.
- Garciadeblas, B., Benito, B., and Rodriguez-Navarro, A.** (2002). Molecular cloning and functional expression in bacteria of the potassium transporters CnHAK1 and CnHAK2 of the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Plant Molecular Biology* 50, 623-633.
- Gaxiola, R., Delarrinoa, I.F., Villalba, J.M., and Serrano, R.** (1992). A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J* 11, 3157-3164.
- Gaymard, F., Cerutti, M., Horeau, C., Lemaillet, G., Urbach, S., Ravallec, M., Devauchelle, G., Sentenac, H., and Thibaud, J.B.** (1996). The Baculovirus/Insect Cell System as an Alternative to *Xenopus* Oocytes. FIRST CHARACTERIZATION OF THE AKT1 K<sup>+</sup> CHANNEL FROM ARABIDOPSIS THALIANA. *Journal of Biological Chemistry* 271, 22863-22870.

- Gaynard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferriere, N., Thibaud, J.B., and Sentenac, H.** (1998). Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell* *94*, 647-655.
- Geiger, D., Becker, D., Vosloh, D., Gambale, F., Palme, K., Rehers, M., Anschuetz, U., Dreyer, I., Kudla, J., and Hedrich, R.** (2009). Heteromeric AtKC1/AKT1 channels in Arabidopsis roots facilitate growth under K<sup>+</sup> limiting conditions. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 21288-21295.
- Gibeaut, D.M., Hulett, J., Cramer, G.R., and Seemann, J.R.** (1997). Maximal Biomass of Arabidopsis thaliana Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiology* *115*, 317-319.
- Gierth, M., Maser, P., and Schroeder, J.I.** (2005). The Potassium Transporter AtHAK5 Functions in K<sup>+</sup> Deprivation-Induced High-Affinity K<sup>+</sup> Uptake and AKT1 K<sup>+</sup> Channel Contribution to K<sup>+</sup> Uptake Kinetics in Arabidopsis Roots. *Plant Physiol* *137*, 1105-1114.
- Gobert, A., Isayenkov, S., Voelker, C., Czempinski, K., and Maathuis, F.J.M.** (2007). The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K<sup>+</sup> conductance and plays a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 10726-10731.
- Gobert, A., Park, G., Amtmann, A., Sanders, D., and Maathuis, F.J.M.** (2006). Arabidopsis thaliana Cyclic Nucleotide Gated Channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport. *Journal of Experimental Botany* *57*, 791-800.
- Golldack, D., Su, H., Quigley, F., Kamasani, U.R., Munoz-Garay, C., Balderas, E., Popova, O.V., Bennett, J., Bohnert, H.J., and Pantoja, O.** (2002). Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. *Plant J* *31*, 529-542.
- Gorham, J., Bristol, A., Young, E.M., and Wyn Jones, R.G.** (1991). The presence of the enhanced K/Na discrimination trait in diploid Triticum species. *TAG Theoretical and Applied Genetics* *82*, 729-236.
- Grabov, A., Leung, J., Giraudat, J., and Blatt, M.R.** (1997). Alteration of anion channel kinetics in wild-type and abi1-1 transgenic Nicotiana benthamiana guard cells by abscisic acid. *Plant Journal* *12*, 203-213.
- Guo, K., Babourina, O., Christopher, D., Borsics, T., and Rengel, Z.** (2008a). The cyclic nucleotide-gated channel, AtCNGC10, influences salt tolerance in Arabidopsis. *Physiol Plant* *134*, 499 - 507.
- Guo, K.M., Babourina, O., Christopher, D.A., Borsic, T., and Rengel, Z.** (2010). The cyclic nucleotide-gated channel AtCNGC10 transports Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum* *9999*.
- Guo, Z.K., Yang, Q., Wan, X.Q., and Yan, P.Q.** (2008b). Functional characterization of a potassium transporter gene NrHAK1 in Nicotiana rustica J Zhejiang Univ Sci B *9*, 944-952.
- Hafke, J.B., Hafke, Y., Smith, J.A.C., Luttge, U., and Thiel, G.** (2003). Vacuolar malate uptake is mediated by an anion-selective inward rectifier. *Plant Journal* *35*, 116-128.
- Hampton, C.R., Bowen, H.C., Broadley, M.R., Hammond, J.P., Mead, A., Payne, K.A., Pritchard, J., and White, P.J.** (2004). Cesium Toxicity in Arabidopsis. *Plant Physiology* *136*, 3824-3837.

- Haro, R., Banuelos, M.A., Senn, M.E., Barrero-Gil, J., and Rodriguez-Navarro, A.** (2005). HKT1 Mediates Sodium Uniport in Roots. Pitfalls in the Expression of HKT1 in Yeast. *Plant Physiology* *139*, 1495-1506.
- Harvey, H.P., and van den Driessche, R.** (1999). Nitrogen and potassium effects on xylem cavitation and water-use efficiency in poplars. *Tree Physiology* *19*, 943-950.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., and Bohnert, H.J.** (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* *51*, 463-499.
- Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L., and Hedges, S.B.** (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* *293*, 1129-1133.
- Hedrich, R., Busch, H., and Raschke, K.** (1990).  $Ca^{2+}$  AND NUCLEOTIDE DEPENDENT REGULATION OF VOLTAGE DEPENDENT ANION CHANNELS IN THE PLASMA-MEMBRANE OF GUARD-CELLS. *Embo Journal* *9*, 3889-3892.
- Heredia, M.A., Zapico, R., Garcia-Sanchez, M.J., and Fernandez, J.A.** (2002). Effect of calcium, sodium and pH on uptake and accumulation of radiocesium by *Riccia fluitans*. *Aquatic Botany* *74*, 245-256.
- Hermans, C., Hammond, J.P., White, P.J., and Verbruggen, N.** (2006). How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science* *11*, 610-617.
- Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B., and Gallais, A.** (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* *58*, 2369-2387.
- Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P., and Sussman, M.R.** (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* *280*, 918-921.
- Honsbein, A., Sokolovski, S., Grefen, C., Campanoni, P., Pratelli, R., Paneque, M., Chen, Z., Johansson, I., and Blatt, M.R.** (2009). A Tripartite SNARE-K<sup>+</sup> Channel Complex Mediates in Channel-Dependent K<sup>+</sup> Nutrition in Arabidopsis. *The Plant Cell* *21*, 2859-2877.
- Horie, T., Costa, A., Kim, T.H., Han, M.J., Horie, R., Leung, H.Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G., and Schroeder, J.I.** (2007). Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na<sup>+</sup> influx component into K<sup>+</sup>-starved roots for growth. *Embo Journal* *26*, 3003-3014.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F.d.r., Porãe, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Vãry, A.-A.n., et al.** (2003). The Arabidopsis Outward K<sup>+</sup> 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*, 5549-5554.
- Hrabak, E.M., Chan, C.W.M., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., et al.** (2003). The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology* *132*, 666-680.
- Hwang, Y.S., Bethke, P.C., Cheong, Y.H., Chang, H.S., Zhu, T., and Jones, R.L.** (2005). A gibberellin-regulated calcineurin B in rice localizes to the tonoplast and is implicated in vacuole function. *Plant Physiology* *138*, 1347-1358.
- Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H.H., and Hedrich, R.** (2001). K<sup>+</sup> channel profile and electrical properties of Arabidopsis root hairs. *FEBS Letters* *508*, 463-469.

- Jones, R.D., Hancock, J.T., and Morice, A.H.** (2000). NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? *Free Radical Biology and Medicine* 29, 416-424.
- 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., et al.** (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, 3041-3046.
- Jung, J.Y., Shin, R., and Schachtman, D.P.** (2009). Ethylene Mediates Response and Tolerance to Potassium Deprivation in Arabidopsis. *The Plant Cell* 21, 607-621.
- Kaddour, R., Narsi, N., Mirah, S., Berthomieu, P., and Lachaal, M.** (2009). Comparative effect of potassium on K and Na uptake and transport in two accessions of Arabidopsis thaliana during salinity stress. *Comptes rendusBiologies* 332, 784-794.
- Kader, M.A., and Lindberg, S.** (2008). Cellular traits for sodium tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Biotechnology* 25, 247-255.
- Kanai, S., Moghaieb, R.E., El-Shemy, H.A., Panigrahi, R., Mohapatra, P.K., Ito, J., Nguyen, N.T., Saneoka, H., and Fujita, K.** (2011). Potassium deficiency affects water status and photosynthetic rate of the vegetative sink in green house tomato prior to its effects on source activity. *Plant Science* 180, 368-374.
- Kang, S., Kim, H.B., Lee, H., Choi, J.Y., Heu, S., Oh, C.J., Kwon, S.I., and An, C.S.** (2006). Overexpression in Arabidopsis of a plasma membrane-targeting glutamate receptor from small radish increases glutamate-mediated Ca<sup>2+</sup> influx and delays fungal infection. *Molecules and Cells* 21, 418-427.
- Kaplan, B., Sherman, T., and Fromm, H.** (2007). Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Letters* 581, 2237-2246.
- Kesler, S.E., and Wilkinson, B.H.** (2007). Derivation of Global Metallogenic and Resource Data from Ore-Deposit Age-Frequency Distributions (Dublin 4, Irish Assoc Econ Geol).
- Kim, E.J., Kwak, J.M., Uozumi, N., and Schroeder, J.I.** (1998). AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* 10, 51-62.
- Kim, K.N., Cheong, Y.H., Gupta, R., and Luan, S.** (2000). Interaction specificity of Arabidopsis calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiology* 124, 1844-1853.
- Kinoshita, T., Nishimura, M., and Shimazaki, K.I.** (1995). CYTOSOLIC CONCENTRATION OF CA<sup>2+</sup> REGULATES THE PLASMA-MEMBRANE H<sup>+</sup>-ATPASE IN GUARD-CELLS OF FAVA-BEAN. *Plant Cell* 7, 1333-1342.
- Kochian, L.V., and Lucas, W.J.** (1982). Potassium Transport in Corn Roots : I. Resolution of Kinetics into a Saturable and Linear Component. *Plant Physiol* 70, 1723-1731.
- Kolukisaoglu, U., Weinl, S., Blazevic, D., Batistic, O., and Kudla, J.** (2004). Calcium Sensors and Their Interacting Protein Kinases: Genomics of the Arabidopsis and Rice CBL-CIPK Signaling Networks. *Plant Physiology* 134, 43-58.
- Kourie, J., and Goldsmith, M.H.M.** (1992). K<sup>+</sup> channels are responsible for an inwardly rectifying current in the plasma membrane of mesophyll protoplasts of *Avena sativa* *Plant Physiol* 98, 1087-1097.

- Kovermann, P., Meyer, S., Hortensteiner, S., Picco, C., Scholz-Starke, J., Ravera, S., Lee, Y., and Martinoia, E.** (2007). The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *Plant Journal* 52, 1169-1180.
- Kronzucker, H.J., Szczerba, M.W., Moazami-Goudarzi, M.A.R.Y., and Britto, D.T.** (2006). The cytosolic Na<sup>+</sup> : K<sup>+</sup> ratio does not explain salinity-induced growth impairment in barley: a dual-tracer study using <sup>42</sup>K<sup>+</sup> and <sup>24</sup>Na<sup>+</sup>. *Plant, Cell and Environment* 29, 2228-2237.
- Kugler, A., Kohler, B., Palme, K., Wolff, P., and Dietrich, P.** (2009). Salt-dependent regulation of a CNG channel subfamily in Arabidopsis. *BMC Plant Biology* 9, 140.
- Kwak, J.M., Murata, Y., Baizabal-Aguirre, V.M., Merrill, J., Wang, M., Kemper, A., Hawke, S.D., Tallman, G., and Schroeder, J.I.** (2001). Dominant Negative Guard Cell K<sup>+</sup> Channel Mutants Reduce Inward-Rectifying K<sup>+</sup> Currents and Light-Induced Stomatal Opening in Arabidopsis. *Plant Physiology* 127, 473-485.
- Laegreid, M., Bockman, O. C., Kaarstad, E. O., ed. (1999). *Agriculture fertilizers and environment* (Wallingford).
- Lagarde, D., Basset, M., Lepetit, M., Conejero, G., Gaymard, F., Astruc, S., and Grignon, C.** (1996). Tissue-specific expression of Arabidopsis AKT1 gene is consistent with a role in K<sup>+</sup> nutrition. *Plant J* 9, 195-203.
- Lam, H.M., Chiu, J., Hsieh, M.H., Meisel, L., Oliveira, I.C., Shin, M., and Coruzzi, G.** (1998). Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* 396, 125-126.
- Laurie, S., Feeney, K.A., Maathuis, F.J., Heard, P.J., Brown, S.J., and Leigh, R.A.** (2002). A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant J* 32, 139-149.
- Lebaudy, A., Pascaud, F., Very, A., Alcon, C., Dreyer, I., and Thibaud, J.** (2010). Preferential KAT1-KAT2 Heteromerization Determines Inward K<sup>+</sup> Current Properties in Arabidopsis Guard Cells. *The Journal of biological chemistry* 285, 6265-6274.
- Lebaudy, A., Vavasseur, A., Hosy, E., Dreyer, I., Leonhardt, N., Thibaud, J.B., Very, A.A., Simonneau, T., and Sentenac, H.** (2008). Plant adaptation to fluctuating environment and biomass production are strongly dependent on guard cell potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5271-5276.
- Lebaudy, A., Very, A.A., and Sentenac, H.** (2007). K<sup>+</sup> channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *FEBS Letters* 581, 2357-2366.
- Leigh, R.A., and Jones, R.G.W.** (1984). A Hypothesis Relating Critical Potassium Concentrations for Growth to the Distribution and Functions of This Ion in the Plant-Cell. *New Phytologist* 97, 1-13.
- Lemtiri-Chlieh, F., and Berkowitz, G.A.** (2004). Cyclic adenosine monophosphate regulates calcium channels in the plasma membrane of Arabidopsis leaf guard and mesophyll cells. *Journal of Biological Chemistry* 279, 35306-35312.
- Leyman, B., Geelen, D., Quintero, F.J., and Blatt, M.R.** (1999). A Tobacco Syntaxin with a Role in Hormonal Control of Guard Cell Ion Channels. *Science* 283, 537-540.
- Li, L., Kim, B.G., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., and Luan, S.** (2006). A Ca<sup>2+</sup> signaling pathway regulates a K<sup>+</sup> channel for low-K response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 12625-12630.

- Li, X., Borsics, T., Harrington, H.M., and 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, 643-653.
- Luan, S., Lan, W., and Chul Lee, S.** (2009). Potassium nutrition, sodium toxicity, and calcium signaling: connections through the CBL-CIPK network. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 339-346.
- Maathuis, F.J., and Sanders, D.** (2001). Sodium uptake in Arabidopsis roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiol* 127, 1617-1625.
- Maathuis, F.J.M.** (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 250-258.
- Maathuis, F.J.M., and Amtmann, A.** (1999). K + Nutrition and Na + Toxicity: The Basis of Cellular K + /Na + Ratios. *Annals of Botany* 84, 123-133.
- Maathuis, F.J.M., Filatov, V., Herzyk, P., Krijger, G.C., Axelsen, K.B., Chen, S.X., Green, B.J., Li, Y., Madagan, K.L., Sanchez-Fernandez, R., et al.** (2003). Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *Plant J* 35, 675-692.
- Maathuis, F.J.M., and Sanders, D.** (1993). Energization of potassium uptake in Arabidopsis thaliana *Planta* 191, 302-307.
- Maathuis, F.J.M., and Sanders, D.** (1994). Mechanisms of high-affinity potassium uptake in roots of Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9272-9276.
- Maathuis, F.J.M., and Sanders, D.** (1996). Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiol Plant* 96, 158-168.
- Maathuis, F.J.M., Sanders, D., and Gradmann, D.** (1997). Kinetics of high-affinity K<sup>+</sup> uptake in plants, derived from K<sup>+</sup>-induced changes in current-voltage relationships - A modelling approach to the analysis of carrier-mediated transport. *Planta* 203, 229-236.
- MacRobbie, E.A.C.** (1998). Signal Transduction and Ion Channels in Guard Cells. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 353, 1475-1488.
- Mahouachi, J., Socorro, A.R., and Talon, M.** (2006). Responses of papaya seedlings (*Carica papaya* L.) to water stress and re-hydration: Growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance. *Plant and Soil* 281, 137-146.
- Marschner, H.** (1995). Mineral nutrition of higher plants (New York, Springer).
- Martínez-Cordero, M.A., Martínez, V., and Rubio, F.** (2005). High-affinity K<sup>+</sup> uptake in pepper plants. *Journal of Experimental Botany* 56, 1553-1562.
- Maser, P., Gierth, M., and Schroeder, J.I.** (2002). Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. *Plant and Soil* 247, 43-54.
- Maser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J., Sanders, D., et al.** (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiol* 126, 1646-1667.

- Medrano, H., Flexas, J.** (2004). Respuesta de las plantas al estrés hídrico. In *La Ecofisiología Vegetal*, M. Reigosa, Pedrol, N., Sánchez, A., ed. (Thompson).
- Mengel, K., Kirkby, E.A., Kosegarten, H., and Appel, T.** (2001). Principles on plant nutrition (Dordrecht, Kluwer).
- Meyerhoff, O.** (2005). AtGLR3.4, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold. *Planta* 222, 418-427.
- Munns, R., and Tester, M.** (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59, 651-681.
- Nickrent, D.L., Parkinson, C.L., Palmer, J.D., and Duff, R.J.** (2000). Multigene phylogeny of land plants with special reference to bryophytes and the earliest land plants. *Molecular Biology and Evolution* 17, 1885-1895.
- Nieves-Cordones, M., Aleman, F., Martinez, V., and Rubio, F.** (2010). The Arabidopsis thaliana HAK5 K<sup>+</sup> Transporter Is Required for Plant Growth and K<sup>+</sup> Acquisition from Low K<sup>+</sup> Solutions under Saline Conditions. *Mol Plant* 3, 326-333.
- Nieves-Cordones, M., Martinez-Cordero, M.A., Martinez, V., and Rubio, F.** (2007). An NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-sensitive component dominates high-affinity K<sup>+</sup> uptake in tomato plants. *Plant Science* 172, 273-280.
- Nieves-Cordones, M., Miller, A., Aleman, F., Martinez, V., and Rubio, F.** (2008). A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Molecular Biology* 68, 521-532.
- Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Kim, B.G., Grant, J.J., Li, L.G., and Luan, S.** (2007a). CIPK9: a calcium sensor-interacting protein kinase required for low-potassium tolerance in Arabidopsis. *Cell Research* 17, 411-421.
- Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Kim, K.N., Grant, J.J., Li, L.G., Hung, W., D'Angelo, C., Weinl, S., Kudla, J., and Luan, S.** (2004). The calcium sensor calcineurin B-Like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 1912-1924.
- Pandey, S., Zhang, W., and Assmann, S.M.** (2007b). Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Letters* 581, 2325-2336.
- Pei, Z.M., Kuchitsu, K., Ward, J.M., Schwarz, M., and Schroeder, J.I.** (1997). A network of early events in ABA signaling in guard cells. *Plant Physiology* 114, 40004-40004.
- Pei, Z.M., Ward, J.M., Harper, J.F., and Schroeder, J.I.** (1996). A novel chloride channel in Vicia faba guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. *Embo Journal* 15, 6564-6574.
- Peiter, E., Maathuis, F.J.M., Mills, L.N., Knight, H., Pelloux, J., Hetherington, A.M., and Sanders, D.** (2005). The vacuolar Ca<sup>2+</sup>-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* 434, 404-408.
- Peng, Y.H., Zhu, Y.F., Mao, Y.Q., Wang, S.M., Su, W.A., and Tang, Z.C.** (2004). Alkali grass resists salt stress through high [K<sup>+</sup>] and an endodermis barrier to Na<sup>+</sup>. *Journal of Experimental Botany* 55, 939-949.
- Philippar, K., Fuchs, I., Luthen, H., Hoth, S., Bauer, C.S., Haga, K., Thiel, G., Ljung, K., Sandberg, G., Bottger, M., et al.** (1999). Auxin-induced K<sup>+</sup> channel expression represents an



essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12186-12191.

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

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

**Pyo, Y.J., Gierth, M., Schroeder, J.I., and Cho, M.H.** (2010). High-Affinity K<sup>+</sup> Transport in Arabidopsis: AtHAK5 and AKT1 Are Vital for Seedling Establishment and Postgermination Growth under Low-Potassium Conditions. *Plant Physiol* 153, 863-875.

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

**Qi, Z., and Spalding, E.P.** (2004). Protection of Plasma Membrane K<sup>+</sup> Transport by the Salt Overly Sensitive1 Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> Antiporter during Salinity Stress. *Plant Physiol* 136, 2548-2555.

**Qiu, Y.L., and Palmer, J.D.** (1999). Phylogeny of early land plants: insights from genes and genomes. *Trends in Plant Science* 4, 26-30.

**Quintero, F.J., and Blatt, M.R.** (1997). A new family of K<sup>+</sup> transporters from Arabidopsis that are conserved across phyla. *FEBS Lett* 415, 206-211.

**Rains, D.W., and Epstein, E.** (1967). Sodium absorption by barley roots: its mediation by mechanism 2 of alkali cation transport. *Plant Physiol* 42, 319-323.

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

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

**Rodríguez-Navarro, A., Blatt, M.R., and Slayman, C.L.** (1986). A potassium-proton symport in *Neurospora crassa* *JGenPhysiol* 87, 649-674.

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

**Römheld, V., and Kirkby, E.** (2010). Research on potassium in agriculture: needs and prospects. *Plant and Soil* 335, 155-180.

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

**Rubio, F., Alemán, F., Nieves-Cordones, M., and Vicente, M.** (2010a). Studies on Arabidopsis *athak5*, *atakt1* double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K<sup>+</sup> uptake. *Physiol Plant* 139, 220-228.

- Rubio, F., Arévalo, L., Caballero, F., Botella, M.A., Rubio, J.S., García-Sánchez, F., and Martínez, V.** (2010b). Systems involved in K<sup>+</sup> uptake from diluted solutions in pepper plants as revealed by the use of specific inhibitors. *Journal of Plant Physiology* *167*, 1494-1499.
- Rubio, F., Gassmann, W., and Schroeder, J.I.** (1995). Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* *270*, 1660-1663.
- Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Alem n, F., and Martinez, V.** (2008). Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K<sup>+</sup> uptake in the high-affinity range of concentrations *Physiol Plant* *134*, 598-608.
- Rubio, F., Santa-Maria, G.E., and Rodríguez-Navarro, A.** (2000). Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiol Plant* *109*, 34-43.
- Rubio, J.S., Garcia-Sanchez, F., Rubio, F., Garcial, A.L., and Martínez, V.** (2010c). The importance of K<sup>+</sup> in ameliorating the negative effects of salt stress on the growth of pepper plants. *European Journal of Horticultural Sciences* *75*, 33-41.
- Rus, A., Lee, B.h., Muñoz-Mayor, A., Sharkhuu, A., Miura, K., Zhu, J.K., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M.** (2004). AtHKT1 Facilitates Na<sup>+</sup> Homeostasis and K<sup>+</sup> Nutrition in Planta. *Plant Physiology* *136*, 2500-2511.
- Sanderson, M.J.** (2003). Molecular data from 27 proteins do not support a Precambrian origin of land plants. *American Journal of Botany* *90*, 954-956.
- Santa-Marla, G.E., and Epstein, E.** (2001). Potassium/sodium selectivity in wheat and the amphiploid cross wheat X *Lophopyrum elongatum*. *Plant Science* *160*, 523-534.
- Santa-María, G.E., Rubio, F., Dubcovsky, J., and Rodríguez-Navarro, A.** (1997). The HAK1 Gene of Barley is a Member of a Large Gene Family and Encodes a High-Affinity Potassium Transporter. *Plant Cell* *9*, 2281-2289.
- Schachtman, D.P.** (1992). Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science* *258*, 1654-1658.
- Schachtman, D.P., and Schroeder, J.I.** (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* *370*, 655-658.
- Schmidt, C., Schelle, I., Liao, Y.J., and Schroeder, J.I.** (1995). STRONG REGULATION OF SLOW ANION CHANNELS AND ABSCISIC-ACID SIGNALING IN GUARD-CELLS BY PHOSPHORYLATION AND DEPHOSPHORYLATION EVENTS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 9535-9539.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., and Waner, D.** (2001). Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* *52*, 627-658.
- Schroeder, J.I., and Hagiwara, S.** (1989). CYTOSOLIC CALCIUM REGULATES ION CHANNELS IN THE PLASMA-MEMBRANE OF VICIA-FABA GUARD-CELLS. *Nature* *338*, 427-430.
- Schroeder, J.I., Hedrich, R., and Fernandez, J.M.** (1984). Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba* *Nature* *312*, 361-362.

- Schroeder, J.I., and Keller, B.U.** (1992). 2 TYPES OF ANION CHANNEL CURRENTS IN GUARD-CELLS WITH DISTINCT VOLTAGE REGULATION. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 5025-5029.
- Schroeder, J.I., Raschke, K., and Neher, E.** (1987). Voltage dependence of K<sup>+</sup> channels in guard-cell protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* *84*, 4108-4112.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J.M., Gaymard, F., and Grignon, C.** (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* *256*, 663-665.
- Shabala, S., and Cuin, T.A.** (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol Plant* *133*, 651-669.
- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T.A., Smith, S.J., Miller, A.J., Davies, J.M., and Newman, I.A.** (2006). Extracellular Ca<sup>2+</sup> Ameliorates NaCl-Induced K<sup>+</sup> Loss from Arabidopsis Root and Leaf Cells by Controlling Plasma Membrane K<sup>+</sup>-Permeable Channels. *Plant Physiology* *141*, 1653-1665.
- Sheldrick, R.D., Lavender, R.H., Tewson, V.J., and Cobby, J.M.** (1985). THE EFFECT ON ANNUAL DRY-MATTER YIELD OF USING A HAND-CONTROLLED MOWER OR A PLOT HARVESTER FOR CUTTING HERBAGE ON SMALL-PLOT TRIALS. *Grass and Forage Science* *40*, 103-107.
- Shimazaki, K., Iino, M., and Zeiger, E.** (1986). BLUE LIGHT-DEPENDENT PROTON EXTRUSION BY GUARD-CELL PROTOPLASTS OF VICIA-FABA. *Nature* *319*, 324-326.
- Shin, R., and Schachtman, D.P.** (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 8827-8832.
- Siegel, R.S., Xue, S.W., Murata, Y., Yang, Y.Z., Nishimura, N., Wang, A., and Schroeder, J.I.** (2009). Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K<sup>(+)</sup> channels in Arabidopsis guard cells. *Plant Journal* *59*, 207-220.
- Smith, P., Martino, D., Cai, Z., Gwary, D., Janzen, H., Kumar, P., McCarl, B., Ogle, S., O'Mara, F., Rice, C., *et al.*** (2008). Greenhouse gas mitigation in agriculture. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci* *363*, 789-813.
- Spalding, E.P., Hirsch, R.E., Lewis, D.R., Qi, Z., Sussman, M.R., and Lewis, B.D.** (1999). Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity: Inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *J Gen Physiol* *113*, 909-918.
- Su, H., Gollmack, D., Zhao, C., and Bohnert, H.J.** (2002). The Expression of HAK-Type K<sup>+</sup> Transporters Is Regulated in Response to Salinity Stress in Common Ice Plant. *Plant Physiology* *129*, 1482-1493.
- Su, Q., Feng, S., An, L., and Zhang, G.** (2007). Cloning and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a K<sup>+</sup> transporter, ALHAK, from the graminaceous halophyte, *Aeluropus litoralis*. *Biotechnology Letters* *29*, 1959-1963.
- Sunarpi, Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W.Y., Leung, H.Y., Hattori, K., *et al.*** (2005). Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na<sup>+</sup> unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J* *44*, 928-938.

- Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., Steinmeyer, R., et al.** (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 2917-2921.
- Takahashi, R., Nishio, T., Ichizen, N., and Takano, T.** (2007a). Cloning and functional analysis of the K<sup>+</sup> transporter, PhaHAK2, from salt-sensitive and salt-tolerant reed plants. *Biotechnology Letters* *29*, 501-506.
- Takahashi, R., Nishio, T., Ichizen, N., and Takano, T.** (2007b). High-affinity K<sup>+</sup> transporter PhaHAK5 is expressed only in salt-sensitive reed plants and shows Na<sup>+</sup> permeability under NaCl stress. *Plant Cell Reports* *26*, 1673-1679.
- Tapken, D., and Hollmann, M.** (2008). Arabidopsis thaliana Glutamate Receptor Ion Channel Function Demonstrated by Ion Pore Transplantation. *Journal of Molecular Biology* *383*, 36-48.
- Thiel, G., MacRobbie, E.A., and Blatt, M.R.** (1992). Membrane transport in stomatal guard cells: the importance of voltage control. *J Membr Biol* *126*, 1-18.
- Troufflard, S., Mullen, W., Larson, T., Graham, I., Crozier, A., and Amtmann, A.** (2010). Potassium deficiency induces the biosynthesis of oxylipins and glucosinolates in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biology* *10*, 172.
- Uozumi, N., Kim, E.J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E.P., Nakamura, T., and Schroeder, J.I.** (2000). The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na<sup>+</sup> currents in xenopus laevis oocytes and Na<sup>+</sup> uptake in Saccharomyces cerevisiae. *Plant Physiol* *122*, 1249-1259.
- Very, A.A., and Sentenac, H.** (2002). Cation channels in the Arabidopsis plasma membrane. *Trends in Plant Science* *7*, 168-175.
- Very, A.A., and Sentenac, H.** (2003). Molecular mechanisms and regulation of K<sup>+</sup> transport in higher plants. *Ann Rev Plant Biol* *54*, 575-603.
- Walker, D.J., Black, C.R., and Miller, A.J.** (1998). The Role of Cytosolic Potassium and pH in the Growth of Barley Roots. *Plant Physiology* *118*, 957-964.
- Walker, D.J., Leigh, R.A., and Miller, A.J.** (1996a). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* *93*, 10510-10514.
- Walker, N.A., Sanders, D., and Maathuis, F.J.** (1996b). High-affinity potassium uptake in plants. *Science* *273*, 977-979.
- Wang, Y., and Wu, W.-H.** (2010). Plant Sensing and Signaling in Response to K<sup>+</sup>-Deficiency. *Mol Plant* *3*, 280-287.
- Ward, J.M., Møller, P., and Schroeder, J.I.** (2009). Plant Ion Channels: Gene Families, Physiology, and Functional Genomics Analyses. *Annual Review of Physiology* *71*, 59-82.
- Ward, J.M., and Schroeder, J.I.** (1994). CALCIUM-ACTIVATED K<sup>+</sup> CHANNELS AND CALCIUM-INDUCED CALCIUM-RELEASE BY SLOW VACUOLAR ION CHANNELS IN GUARD-CELL VACUOLES IMPLICATED IN THE CONTROL OF STOMATAL CLOSURE. *Plant Cell* *6*, 669-683.
- Welch, R.M., and Epstein, E.** (1968). Dual Mechanisms of Alkali Cation Absorption by Plant Cells - Their Parallel Operation Across Plasmalemma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *61*, 447-&.

- White, P.J., Bowen, H.C., Demidchik, V., Nichols, C., and Davies, J.M.** (2002). Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1564, 299-309.
- White, P.J., and Hammond, J.P.** (2009). The Sources of Phosphorus in the Waters of Great Britain. *J Environ Qual* 38, 13-26.
- White, P.J.K., A.J.** (2010). Potassium. In *Cell Biology of Metals and Nutrients*, R.M.R.R. Hell, ed. (Heidelberg, Springer), pp. 199-224.
- Xu, J., Li, H.D., Chen, L.Q., Wang, Y., Liu, L.L., He, L., and Wu, W.H.** (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K<sup>+</sup> transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell* 125, 1347-1360.
- Yang, X.E., Liu, J.X., Wang, W.M., Ye, Z.Q., and Luo, A.C.** (2004). Potassium internal use efficiency relative to growth vigor, potassium distribution, and carbohydrate allocation in rice genotypes. *Journal of Plant Nutrition* 27, 837-852.
- Zhao, J., Cheng, N.H., Motes, C.M., Blancaflor, E.B., Moore, M., Gonzales, N., Padmanaban, S., Sze, H., Ward, J.M., and Hirschi, K.D.** (2008). AtCHX13 is a plasma membrane K<sup>+</sup> transporter. *Plant Physiology* 148, 796-807.
- Zhu, J.K.** (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 441-445.
- Zhu, J.K., Liu, J., and Xiong, L.** (1998). Genetic analysis of salt tolerance in arabidopsis. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10, 1181-1191.